

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

Evaluar el efecto de la temperatura y pH como pretratamiento para mejorar el rendimiento de la fermentación alcohólica en cultivo por lotes por “*Saccharomyces cerevisiae*”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORES:

Bach. Custodio Tolentino, Elisa Emérita

Bach. Rivas Sandoval, Walter Oswaldo

ASESOR:

Dr. Castro Alvarado, Ángel Pablo

ORCID: 0000-0002-5984-0587

NUEVO CHIMBOTE, PERÚ

2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

Evaluar el efecto de la temperatura y pH como pretratamiento para mejorar el rendimiento de la fermentación alcohólica en cultivo por lotes por "*Saccharomyces cerevisiae*"

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

Revisado y Aprobado por el Asesor:

Dr. Castro Alvarado Ángel Pablo

DNI: 06451148

ORCID: 0000-0002-5984-0587

NUEVO CHIMBOTE, PERÚ

2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

Evaluar el efecto de la temperatura y pH como pretratamiento para mejorar el rendimiento de la fermentación alcohólica en cultivo por lotes por "*Saccharomyces cerevisiae*"

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador:

M. Sc. José Manuel Villanueva Carlos

Presidente

DNI: 32733772

ORCID: 0000-0002-5056-0001

M. Sc. Jesús Gabriel Diestra Balta

Secretario

DNI: 70553964

ORCID: 0000-0003-2462-2229

Dr. Ángel Pablo Castro Alvarado

Integrante

DNI: 06451148

ORCID: 0000-0002-5984-0587

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en la reunión en el Laboratorio de Investigación en Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la UNS, dando cumplimiento a la Resolución N° 280-2024-UNS-CFC, siendo las 19:00 horas del día 19 setiembre del 2024

se reunió el Jurado Evaluador presidido por el Ms José Manuel Villanueva Carlos, y teniendo como miembros a M Sc. Jesús Gabriel Diestra Balta (secretario) (a) y Dr. Ángel Pablo Castro Alvarado (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA, realizado por él, (la), (los) tesista (as) Elisa Emérita Custodio Tolentino y Walter Oswaldo Rivas Sandoval de la Escuela Profesional de Biotecnología .quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada:

“Evaluar el efecto de la temperatura y pH como pretratamiento para mejorar el rendimiento de la fermentación alcohólica en cultivo por lotes por “*Saccharomyces cerevisiae*”

Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como **BUENO** asignándole un calificativo de Diecisiete (17) puntos. Según artículo 111° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 580-2022-CU-R-UNS)

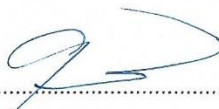
Siendo las 20:00 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad



Nombre: Ms José M. Villanueva Carlos
Presidente



Nombre: M Sc. Jesús G. Diestra Balta
Secretario



Nombre: Dr. Ángel P. Castro Alvarado
Integrante.

Distribución: Integrantes JE (03), tesisas () y archivo FC (02).



Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Walter Oswaldo- Elisa Emérita Rivas Sandoval- Custodio Tole...
Assignment title: Quick Submit
Submission title: Evaluar el efecto de la temperatura y pH como pretratamien...
File name: Informe_Final_de_Tesis-Walter_Rivas_y_Elisa_Custodio.docx
File size: 12.72M
Page count: 113
Word count: 22,168
Character count: 122,774
Submission date: 15-Oct-2024 09:54PM (UTC-0500)
Submission ID: 2486698115

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



Evaluar el efecto de la temperatura y pH como pretratamiento para mejorar el rendimiento de la fermentación alcohólica en cultivo por lotes por *Saccharomyces cerevisiae*

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORES:

Bach. Custodio Toleman, Elisa Emérita

Bach. Rivas Sandoval, Walter Oswaldo

ASESOR:

Dr. Castro Alvarado, Ángel Pablo

ORCID: 0009-0002-5984-0387

NEEVO CHIMBOTE, PERU

2024

10% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...




Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Texto citado

Exclusiones

- ▶ N.º de coincidencias excluidas

Fuentes principales

- 10%  Fuentes de Internet
- 2%  Publicaciones
- 3%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

DEDICATORIA

*Dedicado a Dios por bendecirme en cada momento,
A mis padres por su esfuerzo y apoyo durante los
años de estudio, a mi hermano por sus consejos
y apoyo intelectual, porque sin mi familia no hubiera
logrado este anhelado sueño*

ELISA EMÉRITA CUSTODIO TOLENTINO

*Dedicado a mi padre Baltazar, quien me inculcó los
valores de lucha, perseverancia y espíritu de sacrificio,
a mi “Johanita” y a mi pequeño “Blanco” fieles
compañeros en este peregrinar universitario y a toda
mi familia, ya que sin ellos no hubiera sido posible
llegar a este momento crucial de mi vida y mi carrera.*

WALTER OSWALDO RIVAS SANDOVAL

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mi familia por su apoyo absoluto en cada etapa de mi vida, sobre todo en épocas de estudiante, a los profesores Dr. Ángel Castro Alvarado y Dr. Willian Capa Robles por cada enseñanza y apoyo durante este logro, y por contribuir para el desarrollo de este trabajo satisfactoriamente.

ELISA EMÉRITA CUSTODIO TOLENTINO

Agradecer a Dios por ser siempre fiel a sus promesas y acompañarme en todo momento, a mi hna. Maritza y a toda mi familia por estar siempre presente en los momentos difíciles y en cada uno de mis logros, al Dr. Ángel Castro Alvarado y al Dr. Willian Capa Robles por su gran aporte a mi formación académica, al profesor Eterio Alva Muñoz por su apoyo logístico, a Yanil Saravia por contribuir al logro de esta meta y a todas aquellas personas que de alguna u otra manera contribuyeron para la culminación de este sueño llamado “titulación”

WALTER OSWALDO RIVAS SANDOVAL

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE GENERAL.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivos.....	5
1.1.1. Objetivo General.....	5
1.1.2. Objetivos Específicos.....	5
1.2. Hipótesis.....	6
II. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Caña de azúcar y sub-productos.....	6
2.2. Melaza.....	6
2.2.1. Composición.....	7
2.3. Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
2.4. Ruta Metabólica (Glucólisis-Alcohol).....	9
2.5. Fermentación.....	12
2.6. Inóculo.....	12
2.7. Uso de antibióticos.....	12
2.8. Producción de etanol a nivel industrial.....	13
2.8.1. Grados Brix.....	14
2.8.2. Nutrientes.....	14
2.8.3. Azúcares Fermentables.....	14
2.8.4. Parámetros Fermentativos.....	14
2.8.5. Producto final.....	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. Material de estudio.....	16

3.1.1.	Población	16
3.1.2.	Muestra	16
3.2.	Diseño Experimental.....	16
3.2.1.	Descripción de la unidad experimental	17
3.3.	Procedimiento Experimental.....	17
3.3.1.	Características de la melaza como sub-producto.....	17
3.3.2.	Activación de la levadura y preparación del inóculo	18
3.3.3.	Preparación del mosto (estándar y con pretratamiento)	20
3.3.4.	Análisis durante la fermentación	22
3.3.5.	Fermentación (Parámetros fermentativos).....	29
3.3.6.	Análisis Estadístico	29
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	29
4.1.	Determinación de los niveles de contaminación por medio del Recuento Total de Bacterias Acido Lácticas Viables (RTBALV).....	29
4.2.	Determinación de viabilidad, biomasa, brote e infección de la levadura por microscopía.....	30
4.3.	Evaluación de la cinética del proceso	33
4.4.	Determinación de los azúcares reductores (%AR)	45
4.5.	Determinación del porcentaje de etanol (% v/v)	46
4.6.	Determinación de sacarosa inicial y final	47
4.7.	Optimización estadística de las variables de respuesta.....	48
4.7.1.	Azúcares Reductores Residuales	48
4.7.2.	Porcentaje de Etanol	54
4.8.	Determinación de Parámetros Cinéticos: $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, Q_p y μ_{Max}	61
4.8.1.	Determinación $Y_{x/s}$:.....	61
4.8.2.	Determinación $Y_{p/s}$:.....	61
4.8.3.	Determinación Q_p :	61
4.8.4.	μ_{Max} (μ_{Max}):.....	61
4.9.	Evaluación económica del costo-beneficio al implementar el pretratamiento con los costos de instalación inherentes, alterno al uso de antibióticos.	63

4.9.1. Análisis de varianza ANOVA de los Rendimientos $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$; Q_p y μ_{Max} (como factores) de los 4 tratamientos, sus réplicas y el control.....	64
V. CONCLUSIONES	65
VI. RECOMENDACIONES	66
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
VIII. ANEXOS	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vía metabólica de la glucólisis	11
Figura 2: Procedimiento de preparación del inóculo o “Medio de Activación”	20
Figura 3: Preparación del “Mosto de Fermentación”	22
Figura 4: Determinación de biomasa, viabilidad, brote e infección por microscopía	25
Figura 5: Vista de bacterias ácido lácticas teñidas con azul de metileno bajo un microscopio óptico a 40X	27
Figura 6: Viabilidad, biomasa, brote e infección de la levadura después de 48 horas - Promedio de 3 réplicas	33
Figura 7: Comportamiento de la cinética de fermentación alcohólica en 48 horas – promedio Tratamiento N°1 (4.2 pH y 60°C)	35
Figura 8: Comportamiento de la cinética de fermentación alcohólica en 48 horas - promedio Tratamiento N°2 (4.2 pH y 80°C)	37
Figura 9: Comportamiento de la cinética de fermentación alcohólica en 48 horas - promedio Tratamiento N°3 (4.8 pH y 60°C)	39
Figura 10: Comportamiento de la cinética de fermentación alcohólica en 48 horas -promedio Tratamiento N°4 (4.8 pH y 80°C)	41
Figura 11: Comportamiento de la cinética de fermentación alcohólica en 48 horas - sin pretratamiento de pH y temperatura - Tratamiento control	43
Figura 12: Determinación de sacarosa por el método de polarimetría	47
Figura 13: Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para azúcares reductores residuales	49
Figura 14: Gráfico de superficie ajustada para azúcares reductores residuales	53
Figura 15: Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para etanol	55
Figura 16: Gráfico de superficie ajustada para etanol	59
Figura 17: Ecuación de Rendimiento teórico de etanol en la fermentación	61
Figura 18: Absorbancias del Medio de Activación, inicial y final a 4 horas	79
Figura 19: Curva de calibrado de biomasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80
Figura 20: Curva de calibrado de azúcares reductores por DNS	82
Figura 21: Determinación de azúcares reductores por el método de Miller 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	83

Figura 22: Acondicionamiento de muestras para la determinación de porcentaje de etanol por cromatografía de gases	84
Figura 23: Curva de calibrado de etanol por cromatografía de gases	85
Figura 24: Gráfico de cromatografía de gases para la determinación de etanol en la cinética de <i>S. cerevisiae</i>	86
Figura 25: Ploteo de la probabilidad de azúcares reductores residuales	89
Figura 26: Ploteo de probabilidad normal de azúcares reductores residuales	90
Figura 27: Valores observados vs predichos de azúcares reductores residuales	90
Figura 28: Valores predichos vs residuales de azúcares reductores residuales	91
Figura 29: Ploteo de la probabilidad de etanol	91
Figura 30: Ploteo de probabilidad normal de etanol	92
Figura 31: Valores observados vs predichos de etanol	92
Figura 32: Valores predichos vs residuales de etanol	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición proximal de la melaza de caña de azúcar	8
Tabla 2: Taxonomía de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
Tabla 3: Diseño Experimental Factorial 2 ² con 4 pretratamientos	17
Tabla 4: Resultados de Azúcares residuales y °Brix del pre-ensayo para la activación y adaptación de la levadura para inicio de fermentación	19
Tabla 5: Resultados de análisis de viabilidad, biomasa, brote de la levadura y contaminación de bacterias ácidos lácticas – Promedio de Tratamiento N°1 (4.2 pH y 60°C)	30
Tabla 6: Resultados de análisis de viabilidad, biomasa, brote de la levadura y contaminación de bacterias ácidos lácticas – Promedio de Tratamiento N°2 (4.2 pH y 80°C)	30
Tabla 7: Resultados de análisis de viabilidad, biomasa, brote de la levadura y contaminación de bacterias ácidos lácticas – Promedio de Tratamiento N°3 (4.8 pH y 60°C)	31
Tabla 8: Resultados de análisis de viabilidad, biomasa, brote de la levadura y contaminación de bacterias ácidos lácticas – Promedio de Tratamiento N°4 (4.8 pH y 80°C)	31
Tabla 9: Resultados de análisis de viabilidad, biomasa, brote de la levadura y contaminación de bacterias ácidos lácticas – Tratamiento control	32
Tabla 10: Cinética de fermentación alcohólica en 48 horas; concentración de glucosa, biomasa y etanol – promedio Tratamiento N°1 (4.2 pH y 60°C)	34
Tabla 11: Cinética de fermentación alcohólica en 48 horas; concentración de glucosa, biomasa y etanol – promedio Tratamiento N°2 (4.2 pH y 80°C)	36
Tabla 12: Cinética de fermentación alcohólica en 48 horas; concentración de glucosa, biomasa y etanol – promedio Tratamiento N°3 (4.8 pH y 60°C)	38
Tabla 13: Cinética de fermentación alcohólica en 48 horas; concentración de glucosa, biomasa y etanol – promedio Tratamiento N°4 (4.8 pH y 80°C)	40
Tabla 14: Cinética de fermentación alcohólica en 48 horas; concentración de glucosa, biomasa y etanol – Tratamiento control	42
Tabla 15: Resultados de análisis de °Brix, % sacarosa y densidad del mosto inicial y mosto atenuado después de 48 horas de fermentación de todos los tratamientos (T1, T2, T3 y T4) de los 3 ensayos y de la muestra control	48
Tabla 16: Efectos estimados para azúcares reductores residuales	50
Tabla 17: ANOVA para azúcares reductores residuales	51

Tabla 18: Coeficientes de regresión para azúcares reductores residuales	52
Tabla 19: Efectos estimados para etanol	56
Tabla 20: ANOVA para etanol	57
Tabla 21: Coeficientes de regresión para etanol	57
Tabla 22: Determinación de $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, Q_p y μ_{Max} . promedio de 3 réplicas	61
Tabla 23: ANOVA de $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, Q_p y μ_{Max} , tabla resumen de los 4 tratamientos, sus respectivas réplicas y el control	65
Tabla 24: Concentración de solución madre para curva de calibrado de biomasa	80
Tabla 25: Preparación de soluciones para a curva de calibrado de azúcares reductores	82
Tabla 26: Concentraciones de etanol y su respectiva área	84
Tabla 27: Determinación de etanol en los tratamientos T4 y control luego de 48 horas	85
Tabla 28: Análisis económica “costo-beneficio”	93
Tabla 29: Indicadores VAN y TIR	95

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Absorbancias de azúcares reductores del Inóculo o Medio de Activación por pruebas del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	79
ANEXO 2: Curva de calibrado de biomasa	79
ANEXO 3: Determinación de azúcares reductores y curva de calibrado de DNS	81
ANEXO 4: Determinación del porcentaje de etanol (% v/v) y curva de calibrado de etanol por cromatografía de gases	83
ANEXO 5: Lectura de etanol en el cromatógrafo de gases para T4 y control a las 48 horas de fermentación	85
ANEXO 6: Modelo Matemático Logístico en el software <i>Wolfram Mathematica 7</i> para los 4 pretratamientos y el Control: Determinación de las constantes k y XGD	87
ANEXO 7: Análisis Estadístico de azúcares residuales normalidad, observados vs predichos, predichos vs residuales	89
ANEXO 8: Análisis Estadístico de porcentaje de Etanol, normalidad, observados vs predichos, predichos vs residuales	91
ANEXO 9: Análisis Económico “costo-beneficio”	93
ANEXO 10: Indicadores VAN y TIR	95
ANEXO 11: Análisis de Varianza ANOVA de los cuatro tratamientos más el control en cada uno de los factores ($Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, Q_p y μ_{Max} . de 3 réplicas)	96

RESUMEN

Es muy común enfrentar contaminación por microorganismos indeseados procedentes de la materia prima, como lo son las levaduras silvestres y principalmente bacterias ácido-lácticas (BAL) durante los procesos de fermentación en un ingenio azucarero de la región Ancash, de donde proviene la melaza, la cual se usó como sustrato en esta investigación. Es por esto que surgió la alternativa de mejorar el rendimiento de la producción de etanol, por ello se intervino en los factores más influyentes durante el proceso, el pH del mosto, complementado con un tratamiento térmico, a modo de pretratamientos de la fermentación, para disminuir la carga bacteriana que afectan el proceso de fermentación y determinan la significancia en el rendimiento. Estadísticamente utilizamos la metodología de superficie de respuesta en la evaluación de los parámetros del proceso con aplicación de un diseño factorial 2². En este trabajo se implementó como parámetros a evaluar un sistema de 4 pre-tratamientos al mosto de fermentación de pH y temperatura T° en sinergia: pH 4.2 / 60°C; pH 4.2 / 80°C; pH 4.8 / 60°C y pH 4.8 / 80°C, se inoculó levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercial liofilizada FERMELE, se evaluaron biomasa, azúcares reductores, °Brix, sacarosa y porcentaje de etanol. Se inició la fermentación con 150 rpm, 25°Brix, 32°C, pH según cada tratamiento con una duración de 48 horas al cabo de las cuales se obtuvieron valores en concentración de etanol de hasta 78.4 g/L y rendimiento de 0.543 gr etanol/g azúcar (sin promediar réplicas), concluyendo que el pre-tratamiento que dio el mayor valor de productividad de etanol fue el Tratamiento 4 (T4: pH 4.8 / 80°C: 1.633 g etanol/L.h).

PALABRAS CLAVE: Bacterias ácido lácticas, mosto, pretratamiento, factorial, rendimiento.

ABSTRACT

It is very common to face contamination by unwanted microorganisms from the raw material, such as wild yeasts and mainly lactic acid bacteria (LAB) during the fermentation processes in a sugar mill in the Ancash region, where the molasses comes from, which was used as a substrate in this research. This is why the alternative of improving the yield of ethanol production emerged, so the most influential factors during the process were intervened, the pH of the wort, complemented with a heat treatment, as pretreatments of fermentation, to reduce the bacterial load that affects the fermentation process and determines the significance in the yield. Statistically, we used the response surface methodology in the evaluation of the process parameters with the application of a factorial design 2^2 . In this work, a system of 4 pre-treatments to fermentation wort of pH and temperature T° in synergy was implemented as parameters to be evaluated: pH 4.2 / 60°C; pH 4.2 / 80°C; pH 4.8 / 60°C and pH 4.8 / 80°C, freeze-dried commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeast FERMEL was inoculated, biomass, reducing sugars, °Brix, sucrose and ethanol percentage were evaluated. Fermentation began with 150 rpm, 25°Brix, 32°C, pH according to each treatment with a duration of 48 hours at the end of which ethanol concentration values of up to 78.4 g/L and yield of 0.543 gr ethanol/g sugar were obtained (without averaging replicates), concluding that the pre-treatment that gave the highest ethanol productivity value was Treatment 4 (T4: pH 4.8 / 80°C: 1.633 g ethanol/L.h).

KEY WORDS: Lactic acid bacteria, must, pretreatment, factorial, performance.

I. INTRODUCCIÓN

La producción, y uso de los biocombustibles aportan positiva y significativamente al medio ambiente, siendo su uso una alternativa para la disminución del efecto invernadero. Los biocombustibles son el resultado del procesamiento de la biomasa o desechos industriales como materia prima produciendo diversos tipos de biocombustibles: biogás, biodiesel y bioetanol, siendo este último obtenido principalmente por fermentación alcohólica de sub productos ricos en azúcares, almidón y materiales lignocelulósicos. El uso de estos biocombustibles ofrece la disminución del efecto invernadero, menguando el uso de los combustibles fósiles y por consiguiente minimiza la explotación de recursos naturales (Gil et al., 2021).

Los biocombustibles son considerados como una novedosa fuente alternativa de energía a nivel global, debido a que se generan gracias al acrecentamiento de la Biotecnología (Eggeman y Elander, 2005). El éxito actual de los biocombustibles y el anhelo inherente de aumentar su producción a todo nivel ha conllevado la investigación en lo que concierne a la obtención de etanol a partir del aprovechamiento y valoración de variadas materias primas, implementando el uso de diferentes microorganismos y variadas tecnologías (Mariscal, 2011).

La producción global de biocombustibles seguirá dependiendo de las tradicionales materias primas, bien llamada biomasa; aproximadamente el 60% del etanol es producido en base a maíz, 25% de caña de azúcar, 2% de melaza, 3% de trigo y lo restante de algunos cereales, así también yuca o betarraga azucarera que son productos de consumo humano (OCDE/ OEA 2021). Ventajosamente el etanol se produce en base a estos cultivos que captan gases de efecto invernadero (dióxido de carbono) durante su sistema fotosintético (Balat, 2008). En gran parte de los países, las políticas sobre biocombustibles están orientadas a disminuir las emisiones de estos gases y por ende ya no depender de los combustibles tradicionales (OCDE/ OEA 2021).

Debido a esto, los logros en investigación en lo que concierne a la elaboración de este producto químico son muy fructíferos y están direccionados hacia todos los elementos que integran la cadena productiva, incentivado en la actualidad por su aplicación como

biocombustible y justificado ambientalmente por los beneficios inherentes de su uso (Mariscal, 2011).

Globalmente, las perspectivas predicen un incremento en la producción y consumo de biocombustibles, pero con ritmo lento en el periodo de proyección comparado con periodos previos, máxime, como resultado de las políticas de Estados Unidos y la Unión Europea, que disminuyen el apoyo a este sector. Se prevé que la producción mundial de etanol liderados por EEUU., Unión Europea, Brasil, China, Indonesia, Argentina, Tailandia, India, Canadá y Colombia se incrementará a 132 Miles de millones de litros (Mml) para 2030. Países productores de etanol de menor importancia económica son Paraguay, Filipinas y Perú, cuya producción total estima los 0.8 Mml, 0.6 Mml y 0.3 Mml, respectivamente, para 2030 (OCDE/OEA 2021).

Evidentemente en Perú, el desarrollo de la producción de etanol es muy incipiente; por un déficit tecnológico que supla las exigencias de la industria alcoholera, precipitando la necesidad de estudiar novedosas alternativas y métodos de producción para el aprovechamiento máximo de los desechos industriales, como lo son los subproductos de caña de azúcar (Vázquez, Dacosta, 2007). Según Reyes (2015) de las opciones para producir etanol la más relevante es por fermentación de materias primas predominantemente carbohidratos (azúcar, almidón, celulosa, etc.). Este material primario procede de frutas y vegetales, así como de la melaza de caña de azúcar.

La producción de etanol depende de la melaza y de los actores inmersos en el proceso en planta, principalmente de la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la temperatura de fermentación y el monitoreo permanente de la producción, los cuales optimizan el proceso industrial, traduciéndose en un mejor rendimiento del porcentaje de etanol producido y en la disminución de la concentración de los azúcares residuales (Gnecco, 2005; De la Vara et al., 2014). Pramanik (2003), señala que los parámetros principales que deben ser controlados en la fermentación alcohólica son temperatura, pH, concentración de azúcar, inhibición por producto y elementos del medio de cultivo, así también durante la activación de la levadura es importante la inyección de aire que facilite el crecimiento de la biomasa fermentadora.

El seleccionar la biomasa idónea para la fermentación, cuyo metabolismo se ajuste a las características del sustrato, los parámetros operacionales y demás requerimientos particulares, permite optimizar la productividad de etanol y poseer un adecuado control y dominio del proceso en marcha (Balat, 2009).

Sin embargo, la contaminación bacteriana es un problema importante en la producción de etanol comercial en las destilerías de todo el mundo, los microorganismos contaminantes producen ácido acético y láctico que tiene un efecto perjudicial sobre la eficiencia de la fermentación (Leja, 2009). La producción del producto final metabólico de estas bacterias, el ácido láctico, inhibe el desarrollo de toda la maquinaria metabólica de las levaduras y se convierte en la principal causa de la caída del rendimiento de etanol (Maiorella, Blanch, Wilke, 1983). *Bacillus* y *Lactobacillus* son bacterias que generalmente contaminan la fermentación etanólica de las levaduras y pueden influir en la viabilidad de la levadura (Alcarde, Horii, Walder, 2003).

Asimismo, algunas investigaciones determinaron que las bacterias contaminantes producen ácido acético y láctico deteriorando el desarrollo celular y convirtiendo a *Saccharomyces cerevisiae* en un cultivo mixto poco viable en la fermentación alcohólica, dicha contaminación alcanza niveles superiores a 10^6 - 10^7 células/mL⁻¹ en el mosto, provocando una significativa caída en el rendimiento alcohólico (Thomas , Hynes , Ingledew, 2001; Amorim y Oliveira, 1982).

La eliminación de bacterias contaminantes reduce la competencia microbiana por los nutrientes en los medios de crecimiento, lo que aumenta la eficiencia y la productividad del cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, los microorganismos se pueden reducir significativamente limpiando, desinfectando el equipo, manteniendo el fondo a una temperatura superior a 70° C, pasteurizando o esterilizando químicamente los sustratos (Narendranath et al., 1997).

El método de pasteurización de alimentos es dependiente de algunos agentes como la tolerancia térmica del microorganismo o contaminante que se pretenda eliminar, es usual el tratamiento térmico leve en un medio acidificado, ya que los microorganismos se muestran poco resistentes en medio ácido (pH < 4.5), en el caso de los moderadamente ácidos con pH

entre 4.5 y 5.3. o los escasamente ácidos de pH >5.3, se suelen implementar regímenes más fuertes de exposición al calor (Orrego, 2003). El óptimo pH determinado a las levaduras está en el rango de 4.0 a 5.0, quien tiene una extrema influencia en el producto final del metabolismo fermentativo (Fajardo y Sarmiento, 2007).

El pH no está limitado para la hidrólisis de sacarosa, su valor adecuado es necesario para un óptimo desarrollo del microorganismo encargado de la fermentación, e indirectamente controla la aparición de productos no deseados, generados por bacterias contaminantes (Jacques, Kelsall, Lyons, 2003).

En tanto menor sea el pH, será menos óptimo para las levaduras al momento de metabolizar los azúcares fermentables (Rojas, Lorenzo, Domenech, 2011). Es posible que la fructosa al igual que la glucosa sufra transformaciones, debido a factores dependientes del calor. La concentración de glucosa y fructosa en las melazas podría variar debido a la inversión de la sacarosa, con valores de pH ácido y a altas temperaturas (Castro, 1993). Una disminución de pH debería ser controlado para evitar daños en el metabolismo e inactivación de *Saccharomyces cerevisiae*, algunas cepas de origen comercial soportan pH específicos que generalmente son mayores a 2.0 es por eso que las consideraciones para determinar el pH del medio deben ser que este sea el adecuado para el microorganismo fermentador, así también que controle la contaminación bacteriana y la hidrólisis de la sacarosa existente en el medio (Jacques, Kelsall, Lyons, 2003).

Así queda demostrada la importancia del pH y su control, no solamente para una eficiente hidrólisis de la sacarosa; sino de la misma manera para un buen desenvolvimiento de la cepa del microorganismo elegido y para poder controlar la aparición de productos no deseados (Jacques, Lyons y Kelsall, 1999).

Respecto a la acción por calor como tratamiento a la melaza y jugos procedentes de caña, éste es capaz de eliminar gran parte de los microorganismos, pero podría descomponer la sacarosa formando productos poliméricos y/o coloreados por acción de la reacción de Maillard precipitando a los denominados infermentecibles o amino azúcares en jugos y melaza de caña, perjudicando el rendimiento, se debe implementar este tratamiento en la

producción de azúcar así como también al sustrato antes de la fermentación para producir etanol (Mibielli, Filho 1999).

Es así que, es imprescindible, para la Planta de Destilería de un ingenio azucarero de la región Ancash, mejorar el rendimiento de la producción de etanol, por ello se ve en la necesidad de evaluar uno de los factores más influyentes durante el proceso, el pH del mosto, complementado con un tratamiento térmico antes de la fermentación, para disminuir carga de bacterias contaminantes que afectan el proceso de fermentación y determinar la significancia en el rendimiento.

En virtud de los argumentos ya mencionados, se propone evaluar ¿Cuál es el efecto de la temperatura y pH como pretratamiento del mosto para mejorar el rendimiento de la fermentación alcohólica en cultivo por lotes por *Saccharomyces cerevisiae*?

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la temperatura y pH como pretratamiento del mosto para mejorar el rendimiento de la fermentación alcohólica en cultivo por lotes por “*Saccharomyces cerevisiae*”

1.1.2. Objetivos Específicos

- Evaluar diferentes pH (4.2 y 4.8) y temperaturas (60°C y 80°C) como pretratamiento en la fermentación alcohólica.
- Evaluar el mosto con pretratamiento de diferentes temperaturas y pH en comparación con el mosto sin pretratamiento en la fermentación alcohólica.
- Determinar $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, Q_p y μ_{Max} (μ_{Max}) de los tratamientos.
- Implementar un análisis estadístico considerando como variables de respuesta a los azúcares reductores residuales y al etanol como producto final.

1.2. Hipótesis

El mosto pretratado a una temperatura de 60°C con pH 4.2, produce 5% más de etanol que el mosto de una fermentación convencional en un sistema de cultivo por lote.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Caña de azúcar y sub-productos

La caña de azúcar es una planta herbácea de gran tamaño que se cultiva en países tropicales y subtropicales, derivadas principalmente del *Saccharum officinarum* y otras especies. El principal objetivo del procesamiento de la caña es recuperar el azúcar, químicamente denominado sacarosa, formada en la planta a través de un proceso bioquímico complejo que esencialmente consiste en la combinación de dos monosacáridos, fructosa y glucosa (Peter Rein, 2012).

En una industria azucarera se tiene otros productos adicionales al azúcar que son denominados frecuentemente subproductos, aquellos que pueden elaborarse a través de un proceso subsecuente o de una valorización de los mismos, entre ellos tenemos el bagazo, la melaza y el alcohol, etc. (Peter Rein, 2012).

En aprovechamiento de obtener una fuente de energía renovable de fácil acceso, segura, eficaz y amigable con el medioambiente, es una de las metas que todo ser humano debe alcanzar. El etanol obtenido por métodos biotecnológicos es una importante alternativa en reemplazo de las fuentes de energía primaria. La producción de etanol a partir de la caña de azúcar es económicamente viable porque se produce a bajos costos de producción (Núñez, et al., 2019).

2.2. Melaza

Calderón (2007) afirma que, durante la elaboración del azúcar en los ingenios azucareros, la caña es exprimida en tren de molinos para obtener el primer jugo, que es calentado, clarificado y filtrado, conjuntamente con adición de cal para remoción de cenizas, lodos u

otros insolubles, luego este jugo pasa por un tren de evaporación para concentrar la sacarosa e iniciar la operación de cristalización; posteriormente es centrifugado para separar los cristales formados de cada masa y como subproducto no beneficiable se obtiene la melaza o miel C.

La melaza de caña de azúcar es un subproducto rico en sacarosa, azúcares reductores, vitaminas y minerales beneficioso para el crecimiento y vitalidad de *Saccharomyces cerevisiae*, el cual impacta significativamente en la eficiencia y eficacia de la producción de etanol (Kosaric, 2000).

La melaza contiene microorganismos que pueden ser perjudiciales para la fermentación los cuales compiten por el mismo sustrato ocasionando la producción de otros metabolitos. El más común es la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, la cual polimeriza las moléculas de sacarosa en dextranos no fermentables (Garzón et al., 2009).

Sostienen Jacques, et al. (2003) que la melaza representa una materia prima fácilmente metabolizable por la levadura ya que el azúcar predominante en la melaza es la sacarosa. La levadura contiene la enzima sacarasa, que hidroliza la sacarosa en sus monosacáridos glucosa y fructosa.

2.2.1. Composición

La melaza con una alta concentración de azúcar es adecuada para la fermentación y producción de etanol (Darvishi y Abolhasan, 2019). En la **Tabla 1** se muestra su composición proximal.

Tabla 1: Composición proximal de la melaza de caña de azúcar.

Componentes	Constituyentes	Contenido
Componentes mayores	Materia seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60-63% p/p
	Azúcares reductores	3-5% p/p
	Diferentes azúcares	4-8% p/p
	Agua	16%
	Grasa	0.40%
	Cenizas	9%
Componentes de minerales	Calcio	0.74%
	Magnesio	0.35%
	Fósforo	0.08%
	Potasio	3.67%
Contenido de aminoácidos	Glicina	0.10%
	Leucina	0.01%
	Lisina	0.01%
	Treonina	0.06%
	Valina	0.02%
Contenido de vitaminas	Colina	600 ppm
	Niacina	48.86 ppm
	Ácido pantoténico	42.90 ppm
	Piridoxina	44 ppm
	Riboflavina	4.40 ppm
	Tiamina	0.88 ppm

Fuente: Barrera (2011).

2.3. Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura es el principal microorganismo industrial utilizado para la producción de etanol, la biomasa se propaga en condiciones aeróbicas en las que para reproducirse necesita del oxígeno para su metabolismo oxidativo, sin embargo, las condiciones anaeróbicas son adecuadas para la fermentación alcohólica (Darvishi y Abolhasan, 2019).

Las levaduras son hongos donde la forma unicelular es la más predominante, las cuales se reproducen por gemación. *Saccharomyces cerevisiae* es la especie que posee forma ovalada de 3-15 µm de largo y 2-8 µm de ancho; es la especie producida en grandes cantidades para panadería y propósitos de fermentación (Jacques et al., 2003).

Reyes (2015) afirma, que las levaduras del género *Saccharomyces* (principalmente *S. cerevisiae*) son los microorganismos responsables de la producción de las bebidas alcohólicas, ya que fermentan la glucosa y normalmente, la sacarosa, la maltosa y la galactosa.

Su taxonomía se describe en la **Tabla 2**:

Tabla 2: Taxonomía de *Saccharomyces cerevisiae*

Dominio	Eukarya
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Subfilo	Saccharomycotina
Clase	Saccharomycetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Género	Saccharomyces
Género y Especie	Saccharomyces cerevisiae
TAX	4932

Fuente: KEGG Organisms in the NCBI Taxonomy (2023)

2.4. Ruta Metabólica (Glucólisis-Alcohol)

La glucólisis y la fermentación son las rutas metabólicas por las que se sintetiza etanol por acción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (**Figura 1**). Mediante una ruta bioquímica de reacciones enzimáticas conocidas como la glucólisis, una molécula de glucosa se oxida para producir dos moléculas de piruvato. Asimismo, se sintetizan dos moléculas de Adenosin Trifosfato (ATP) a partir de Adenosin Difosfato (ADP) y dos de Dinucleótido de Adenina y Nicotinamida reducido (NADH) a partir de NAD- también llamado NAD oxidado. El ATP es una molécula de alta energía que se utiliza en la célula para transportar la energía extraída de la glucosa, y el NADH es un acarreador de electrones. Para que la glucólisis continúe funcionando, el NAD- necesita ser regenerado a partir de NADH; esto se logra gracias a la

fermentación. La fermentación consiste finalmente en la conversión de piruvato en etanol por efecto de la catálisis de las enzimas piruvato descarboxilasa (PDC: 1.2.4.1) y de la alcohol deshidrogenasa (ADH: 1.1.1.2), resultando ser el etanol un residuo metabólico de la extracción de energía de la glucosa (Zamora, 2009).

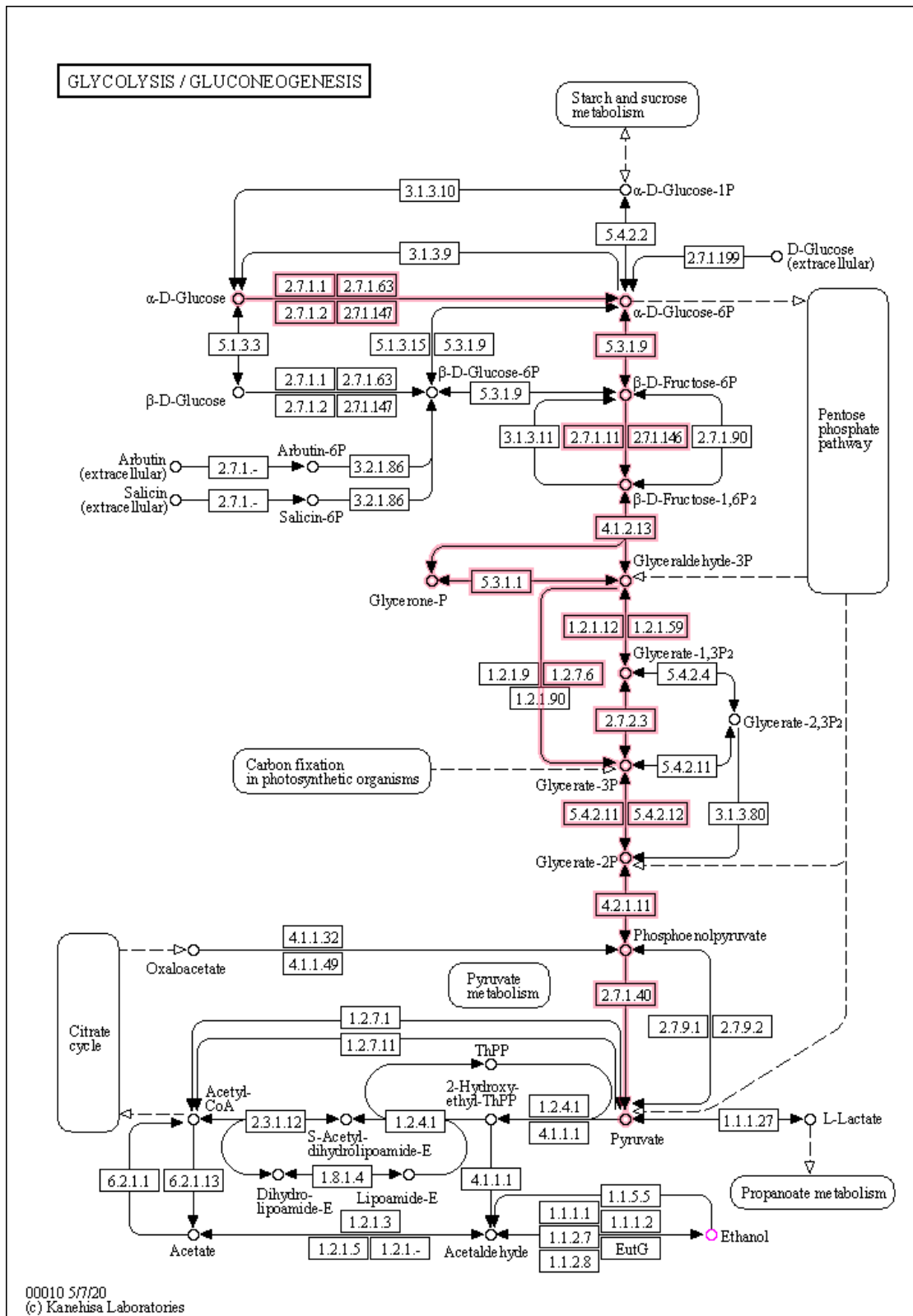


Figura 1: Vía metabólica de la glucólisis. Fuente: KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

2.5. Fermentación

La fermentación alcohólica es un proceso bioquímico complejo en el cual las levaduras convierten los azúcares en etanol, dióxido de carbono y otros metabolitos que contribuyen a la composición química y las propiedades sensoriales de los alimentos fermentados, bajo condiciones anaeróbicas. (Buratti y Benedetti, 2016).

Durante el proceso de fermentación se descomponen los azúcares por acción de las levaduras para formar moléculas de piruvato, también conocido como glucólisis, que por acción de la enzima piruvato descarboxilasa (PDC) y de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) son convertidos en etanol (Santanu, et al., 2020).

2.6. Inóculo

La levadura generalmente realiza el proceso de fermentación aeróbica en presencia de oxígeno para su reproducción y crecimiento, pero también puede optar usar otra vía metabólica para fermentar las materias primas en condiciones anaeróbicas en ausencia de oxígeno y producir etanol. La fermentación alcohólica en ausencia de oxígeno, ocurre en el citosol de la levadura. El inóculo representa un porcentaje del volumen total del mosto de fermentación, por regla general es el 10% y es muy útil para determinar los valores iniciales de biomasa. (Argote et al., 2015).

2.7. Uso de antibióticos

Las bacterias ácido lácticas como *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, son los contaminantes más comunes de la fermentación alcohólica de la levadura e impactan negativamente durante el proceso (gallo, 1989). La contaminación bacteriana es el principal problema en la industria del etanol, porque las bacterias compiten con la levadura por los azúcares y nutrientes, produciendo ácidos orgánicos que pueden estresar o matar la levadura, así como a los brotes pudiendo causar pérdidas significativas en el rendimiento de la planta de etanol, o incluso parar el proceso de fermentación (Fadel et al., 2018).

Los antibióticos se han utilizado para controlar la contaminación bacteriana durante la fermentación en la producción de etanol hace varios años atrás. (Fadel et al., 2018).

Según Koizumi (2005), las melazas de caña se constituyen como el sustrato más utilizado a nivel mundial para la producción de alcohol, pero es uno de los sustratos que por sus características fisicoquímicas y microbiológicas representan el principal problema de contaminación por bacterias ácido lácticas y factores que causan estrés a la levadura.

Dado que la melaza de caña de azúcar tiene un alto contenido de azúcares, actúa como la principal fuente de contaminación, constituyéndose como un medio de cultivo para el crecimiento de otros microorganismos como bacterias y levaduras salvajes; además, a nivel de la fermentación alcohólica, la limpieza deficiente de los equipos y materia residual que se adhiere a las líneas y la recirculación continua de levadura, favorecen la contaminación microbiana; después que las bacterias se vuelvan resistentes a los métodos de desinfección en un sistema, será difícil de eliminarlas y controlarlas (González, Sossa y Vanegas, 2009).

Afirma Muhammad et al., (2011) que la melaza tiene carga continua de contaminación en las destilerías. Las BAL (bacterias ácido lácticas) son microorganismos que están presentes en las mieles de caña utilizadas como sustratos de fermentación para la producción de etanol pueden ser controladas en sistemas de fermentación por lotes con el uso de antibióticos (Calderón, 2007). La Virginiamicina tiene ciertas ventajas sobre otros antibióticos tales como alto nivel de resistencia a la temperatura y estabilidad a pH bajos; su acción inmediata es evitar la reproducción de las bacterias ácido lácticas, siendo el ácido láctico una sustancia indeseable en la fermentación alcohólica pues inhibe el metabolismo de los azúcares en las levaduras. El uso de antibióticos en la producción de etanol a escala industrial es una fuente confiable para evitar pérdidas por contaminación y debe hacerse con cuidado según las especificaciones (Ledesma 2013; Muhammad et al., 2011).

2.8. Producción de etanol a nivel industrial

El etanol es uno de los compuestos orgánicos más antiguos que se conocen y es vital en la fabricación de muchos productos (Cámara et al., 2024).

En Perú, la producción de etanol no está muy desarrollada; por la falta de innovación tecnológica que supla las exigencias de la industria, generando la necesidad de estudiar nuevas alternativas y métodos de producción que permitan el máximo aprovechamiento de los subproductos industriales como la melaza para producir etanol (Arellano et al., 2012).

El etanol puede usarse como solvente y es particularmente útil para la extracción de productos medicinales de plantas, tejidos animales y como composición en la fabricación de tónicos, jarabes, pinturas y antisépticos. Se utiliza en el procesamiento de vacunas y es esencial en la fabricación de productos farmacéuticos como antibióticos (Cámara et al., 2024).

2.8.1. Grados Brix

El grado Brix de una solución de sacarosa pura es el porcentaje en peso de la sacarosa disuelta en ella, en la industria azucarera se considera como el porcentaje de materia sólida por peso, sea sacarosa o no, que contenga la solución. (Peter Rein, 2012).

2.8.2. Nutrientes

Durante la fermentación alcohólica, la levadura metaboliza el nitrógeno y otros nutrientes para apoyar el crecimiento y producir biomasa, así como compuestos volátiles. (Vilanova et al., 2007). La formación de biomasa junto con macro y micronutrientes, incluido el nitrógeno, parecen ser parámetros esenciales involucrados en el mecanismo de fermentación lenta (Gobert et al., 2021). La proporción de fuentes de nitrógeno y carbono durante la fermentación debe equilibrarse para garantizar una buena actividad metabólica de la levadura, así como el rendimiento de biomasa (Gobert et al., 2021; Varela et al., 2004). Los tiempos de fermentación se reducen con la adición de nitrógeno, permitiendo una fermentación más rápida (Bach et al., 2011).

2.8.3. Azúcares Fermentables

En este grupo encontramos a las hexosas, las cuales corresponden a la glucosa y la fructuosa, maltosa, maltotriosa y sacarosa, caracterizados por su alto contenido de carbohidratos (Rocha et al., 2005; González, et al. 2015).

2.8.4. Parámetros Fermentativos

2.8.4.1. pH: En gran parte las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero se desarrollan mejor en un medio ligeramente ácido con un pH entre 4.5 a 6.5 (Suarez et al, 2016).

2.8.4.2. Temperatura: La producción de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, así como la de etanol son reacciones exotérmicas, por lo que es necesario eliminar el calor desprendido en el transcurso de la fermentación y mantener la temperatura cerca del valor óptimo (32 a 34 °C); de lo contrario la temperatura aumenta hasta 40 o 42 °C con sensibles pérdidas en el rendimiento. Se considera un índice apropiado de liberación de calor el de 287 Kcal L⁻¹ de etanol formado (Suárez et al, 2016).

2.8.4.3. Presión osmótica: El estrés osmótico puede causar una disminución en la biomasa celular, también afecta, la velocidad de fermentación, así como la viabilidad celular. La nutrición de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un proceso puramente osmótico, es importante evitar medios hipertónicos o hipotónicos (Suárez et al., 2016).

2.8.4.4. Consumo de azúcares: La melaza es convertida de forma directa en hexosas, por acción enzimática (invertasa), sintetizada por la propia levadura *Saccharomyces cerevisiae* durante el proceso (Arango y Peña, 2009).

2.8.4.5. Producción de biomasa: Básicamente depende del estado fisiológico de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en el cultivo, lo que puede deducirse en un enfoque de equilibrio de flujo metabólico adecuado (Barrera et al. 2011).

2.8.5. Producto final

El etanol es producido a través de un proceso de fermentación que pueden realizar varios microorganismos tales como *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae es el microorganismo más útil para la producción de etanol por la fermentación alcohólica de diversas materias primas ricas en azúcares. *Saccharomyces cerevisiae*, metaboliza el azúcar fermentable en ausencia de oxígeno, produce etanol y dióxido de carbono. La siguiente ecuación química resume la conversión: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CH_2OH + 2CO_2$ (Zamora, 2009).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material de estudio

La melaza de caña de azúcar, proveniente de un ingenio azucarero de la región Ancash, la cual tiene una concentración de sólidos entre 82-85°Brix, fue diluida a una concentración de 25°Brix para la elaboración del mosto de fermentación. Así como también se utilizó levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* cepa liofilizada (FERMEL) proveniente de Brasil, esta se usa en La Planta de Destilería de un ingenio azucarero de la región Ancash, Perú, en la producción de etanol.

3.1.1. Población

Un inóculo de [1 g/L] de concentración de levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, en un volumen de 23 mL, el cual representa el 10% del volumen total de fermentación.

3.1.2. Muestra

La muestra consiste en microtubos de 2.0 mL de mosto tomados cada 6 horas, a lo largo de todo el proceso de fermentación, los cuales fueron objeto de los diferentes análisis requeridos en el presente trabajo de investigación, dichos análisis fueron: Determinación de viabilidad, brote y biomasa de levadura por microscopía con cámara de Neubauer, determinación de los niveles de contaminación por recuento total de bacterias ácido lácticas viables (BALV), determinación de azúcares reductores totales (% ART) por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), determinación de sacarosa por el método de polarimetría, determinación de biomasa de *S. cerevisiae* por densidad óptica mediante espectrofotometría en NanoDrop, determinación de porcentaje de etanol producido por *S. cerevisiae* por la técnica de cromatografía de gases.

3.2. Diseño Experimental

Se aplicó un Diseño Factorial 2², con 2 factores (como variables independientes T° y pH) y 2 niveles por factor; nivel inferior y nivel superior (-1, +1), o sea 4 tratamientos por bloque, con 2 réplicas, en total 12 corridas experimentales haciendo uso del software STATISTICA

versión 10 (**Tabla 3**). Se realizó un ensayo control, sin pretratamiento (ensayo estándar, tal cual se hace en planta) solo para efectos de comparar eventualmente la producción de etanol en ambos casos.

Tabla 3: *Diseño Experimental Factorial 2² con 4 pretratamientos.*

N° de Corridas	Variable Natural		Variable Codificada	
	ϵ_1	ϵ_2	X1 (°C)	X2 (pH)
1	60	4.2	-1	-1
2	80	4.2	1	-1
3	60	4.8	-1	1
4	80	4.8	1	1
5	60	4.2	-1	-1
6	80	4.2	1	-1
7	60	4.8	-1	1
8	80	4.8	1	1
9	60	4.2	-1	-1
10	80	4.2	1	-1
11	60	4.8	-1	1
12	80	4.8	1	1

3.2.1. Descripción de la unidad experimental

El presente trabajo tuvo como unidad experimental a un matraz con capacidad para 250 mL, se usó un volumen de 230 mL de mosto a base de melaza diluida a 25° Brix, sin embargo, fueron 4 nuestros pretratamientos al inicio de la fermentación con 4.2/60 °C, 4.2/80 °C, 4.8/60 °C y 4.8/80 de pH y temperatura respectivamente, según el pretratamiento, más el control 4.5 de pH y posteriormente todos llevados a 32°C de temperatura de fermentación con agitación a 150 RPM.

3.3. Procedimiento Experimental

3.3.1. Características de la melaza como sub-producto

En este trabajo utilizamos melaza de caña de azúcar, la cual tiene una concentración de sólidos entre 82-85°Brix y una concentración de azúcares entre 50-54 %ART, proveniente de un ingenio azucarero de Ancash, Perú.

3.3.2. Activación de la levadura y preparación del inóculo

3.3.2.1. Pre-ensayo

Se realizó un pre-ensayo para determinar el tiempo de activación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, así como también definir la concentración de biomasa del inóculo que sería utilizado para toda nuestra fermentación y sus respectivas réplicas.

Para un volumen de 40 mL, se pesó 0.5 g de levadura liofilizada para rehidratarla en 10 mL y calentarla por un tiempo aproximado de 15 minutos, el cual estará a una concentración de biomasa de 50 g/L, se calentó en baño maría los 10 mL a una temperatura de 30-35°C por el tiempo establecido, paralelamente se pesó 2.35g de melaza, para preparar un volumen total de 40 mL, alcanzando 5°Brix, la cual fue diluida en 10 mL, luego se agregó a una probeta de 100 mL y se aforó a 30 mL, ya que con los 10 mL de la levadura rehidratada alcanzaremos el volumen final de 40 mL con una concentración de 1 g/L del cual solo tomamos 23 mL a la hora de inocular. Se Añadió el nutriente sulfato de amonio el cual debe estar a una concentración de 0.3 g/L, para 40 mL corresponde 0.012g, ajustamos pH 4.5. Se Inició la fermentación con agitación de 150 rpm a 32°C.

Los resultados del pre-ensayo determinaron que el tiempo de activación debe durar 4h, momento en el cual en consumo de sustrato es máximo según resultados de las pruebas del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), también conocida como técnica de Miller (Miller, 1959) estando la levadura plenamente activa, lista para ser inoculada en el mosto de fermentación. Los resultados se muestran en la **Tabla 4**. Las absorbancias resultantes de este pre-ensayo se encuentran en el **ANEXO 1**.

Tabla 4: Resultados de Azúcares residuales y °Brix del pre-ensayo para la activación y adaptación de la levadura para inicio de fermentación.

Nº Horas	Azúcares Residuales (g/L)	°Brix
0	28.39	5
4	9.32	2.7

3.3.2.2. Preparación del inóculo

Habiendo establecido con nuestro pre ensayo los parámetros y características del inóculo, se procedió a replicarlo de forma similar para todos los tratamientos, considerando su respectivo pH y temperatura, así como sus réplicas (**Figura 2**).

Para un volumen de 40 mL, se pesó 0.5 g de levadura liofilizada para rehidratarla en 10 mL y calentarla por un tiempo aproximado de 15 minutos, el cual estará a una concentración de biomasa de 50 g/L, se calentó en baño maría los 10 mL a una temperatura de 30-35°C por el tiempo establecido, paralelamente se pesó la melaza para preparar un volumen total de 40 mL y alcanzar 5 °Brix, se pesó en este caso 2.4 g de melaza, la cual fue diluida en 10 mL, luego se agregó a una probeta de 100 mL y se aforó a 30 mL, ya que con los 10 mL de la levadura rehidratada se alcanzará el volumen final de 40 mL con una concentración de 1 g/L del cual solo se tomó 23 mL a la hora de inocular, todo esto en 4 matraces de 110 mL. Se Añadió el nutriente sulfato de amonio el cual debe estar a una concentración de 0.3 g/L, para 40 mL corresponde 0.012 g, ajustamos pH para los respectivos pretratamientos de los 4 matraces mencionados: 4.2, 4.2, 4.8, 4.8 de pH respectivamente. Se Inició la fermentación con agitación de 150 rpm a 32°C por un tiempo de 4 h. Todo esto basados en los datos de temperatura, pH, °Brix, peso en gramos y tiempo en horas que se obtuvieron gracias al pre ensayo.



Figura 2: Procedimiento de preparación del inóculo o “Medio de Activación”. **a.** Melaza a 85 °Brix, **b.** pesaje de la melaza, **c.** dilución de la melaza **d.** pesaje de la levadura, **e.** temperatura de activación de la levadura, **f.** pesaje del sulfato de amonio, **g.** homogenizado del inóculo, **h.** inóculos listos para la fermentación.

3.3.3. Preparación del mosto (estándar y con pretratamiento)

En este trabajo se ha realizado un pretratamiento al mosto antes de la fermentación a 25°Brix con temperaturas de 60 y 80 °C, en sinergia con valores de pH 4.2 y 4.8 conjugados unos con otros respectivamente (diseño factorial) para reducir los riesgos de contaminación. También se preparó un mosto sin pretratamiento para usarlo a manera de control y hacer las comparaciones correspondientes de rendimiento.

3.3.3.1. Mosto sin pretratamiento (estándar)

La preparación del mosto estándar fue llevada a cabo realizando dilución melaza-agua hasta alcanzar 25° brix con ayuda de un refractómetro digital. Nuestra unidad de fermentación fue un matraz de 250 mL para el mosto sin pretratamiento denominado “control”. Para preparar un volumen final de 230 mL, tomando en

cuenta que le será añadido el inóculo se pesó 67.6 g de melaza e inmediatamente se diluyó en 50 mL, se agregó a la probeta de 200 mL y se aforó a 207 mL, posteriormente se añadió el nutriente sulfato de amonio 0.069 g para lograr la concentración de 0.3 g/L, se homogenizó y se agregó el medio de activación o inóculo 23 mL, con el cual se completó el volumen total de 230 mL, se agregó 0.000805 g del antibiótico effymol (3.5 ppm), la corrección del pH se hizo con ácido clorhídrico concentrado con un potenciómetro digital hasta alcanzar un pH 4.5, se tomaron alícuotas de muestras en microtubos de 2.0 mL para determinar valores iniciales de biomasa, azúcares reductores y °brix, los matraces se llevaron a agitación en shaker a 150 rpm, 32 °C por un tiempo de 48 h. Se tomaron muestras cada 6 horas para determinar el porcentaje de etanol durante las 48 h de cultivo. Todo este procedimiento se aplicó a todos los tratamientos y a la vez a sus respectivas réplicas.

3.3.3.2. Mosto pretratado térmicamente y acidificado

La preparación del mosto pre-tratado (**Figura 3**) fue llevada a cabo realizando dilución melaza-agua hasta alcanzar 25° brix con ayuda de un refractómetro digital. Nuestra unidad de fermentación fue un matraz de 250 mL para los diferentes tratamientos: pH 4.2 / 60°C; pH 4.2 / 80°C; pH 4.8 / 60°C y pH 4.8 / 80°C. Se preparó un volumen final de 230 mL, tomando en cuenta que le será añadido el inóculo, se pesó 67.6 g de melaza e inmediatamente se diluyó en 50 mL, se agregó a la probeta de 200 mL y se aforó a 207 mL y luego se llevó a baño María y se le dio el pre-tratamiento de temperatura de 60 y 80°C según estaba establecido para cada uno de los cuatro pre-tratamientos, esperamos a que los 4 pre-tratamientos enfríen a la temperatura adecuada de fermentación establecida 32 °C, posteriormente se añadió el nutriente sulfato de amonio 0.069 g para lograr la concentración de 0.3 g/L, se homogenizó y se agregó el medio de activación o inóculo 23 mL, con el cual se completó el volumen total de 230 mL, la corrección del pH se hizo con ácido clorhídrico concentrado con un potenciómetro digital hasta alcanzar el pH 4.2 y 4.8 de los 4 tratamientos según lo establecido. Se tomaron alícuotas de muestras en microtubos de 2.0 mL para determinar valores

iniciales de biomasa, azúcares reductores y °brix, los matraces se llevaron a agitación en shaker a 150 rpm, 32 °C por un tiempo de 48 h. Se tomaron muestras cada 6 horas para determinar el porcentaje de etanol durante las 48 h de cultivo. Todo este procedimiento se aplicó a todos los tratamientos y a la vez a sus respectivas réplicas.

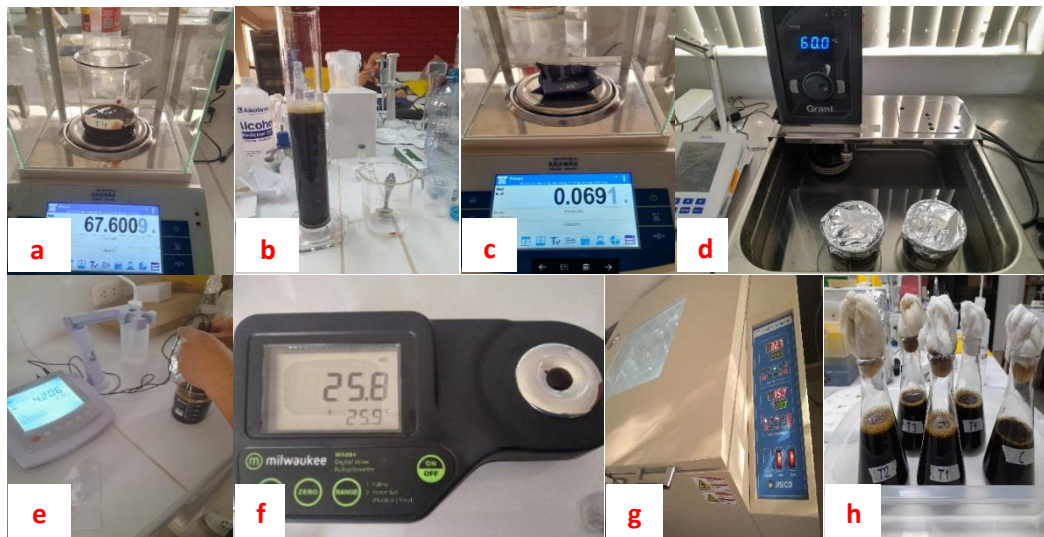


Figura 3: Preparación del “Mosto de Fermentación”. **a.** pesaje de la melaza para llegar a 25°Brix, **b.** dilución y homogenizado, **c.** pesaje del sulfato de amonio, **d.** pretratamiento en baño maría a 60°C, **e.** ajuste de pH, **f.** lectura del °brix, **g.** en el shaker con los parámetros establecidos, **h.** tratamientos en plena fermentación en un momento de toma de muestra.

3.3.4. Análisis durante la fermentación

3.3.4.1. Determinación de los niveles de contaminación por medio del Recuento Total de Bacterias Acido Lácticas Viables (BALV)

Las bacterias contaminantes que más prevalecen son las acidolácticas, las cuales están presentes en la materia prima, así como durante cada etapa del proceso durante la elaboración del alcohol, éstas al desarrollarse en pH 4.2-4.5 similares a *Saccharomyces cerevisiae*, compiten con esta levadura por el mismo sustrato y metabolizan los azúcares produciendo otro tipo de metabolitos diferentes al etanol,

entre ellos el ácido láctico, por tal motivo es importante controlar el incremento de la contaminación bacteriana. La levadura está sometida al estrés por presión osmótica por acción de la propia enzima invertasa que se genera, esto implica que exista una rápida disponibilidad de glucosa y fructosa para los contaminantes bacterianos, el cual podría incrementar la reproducción bacteriana (Cherubin, 2023).

3.3.4.2. Determinación de viabilidad, brote y biomasa de la levadura por microscopía

Se contabilizó la población inicial de biomasa con cámara de Neubauer, de la misma manera se determinó la población final (Argote et al., 2015).

El conteo de células para la determinación de viabilidad, brote y biomasa se realizó por el método de conteo directo por medio de microscopía. Se determinó con cámara de Neubauer, haciendo uso de un microscopio a un aumento de 40 X, previa tinción con azul de metileno al 0.5 % como lo hicieron Arellano et al., 2012, de igual forma se realiza en el ingenio azucarero de la región Ancash, de donde proviene nuestro objeto de estudio y se realizó según su protocolo ya estandarizado de la siguiente manera:

Definiciones

- **Cámara de Neubauer mejorada (Hemocitómetro):** Equipo de vidrio óptico especial de precisión, utilizado para contar células u otras partículas en suspensión bajo el microscopio.
- **Porcentaje de viabilidad:** Relación entre células vivas y muertas, expresado en porcentaje.
- **Levaduras:** Células de forma ovalada o redonda, inmóviles y de dimensiones mayores a las bacterias.
- **Brotos:** Levaduras en proceso de reproducción (gemación).
- **Bacilos:** Son bacterias de forma de bastones, cortos, largos o en cadena, contaminantes de productos en soluciones como mosto fermentado, pie de

levadura, mosto de alimentación. De gran importancia en procesos fermentativos.

- **Bacterias:** Son microorganismos unicelulares contaminantes en productos como alimentos y en procesos de elaboración de ellos. En la industria alcoholera son causantes de la inversión de la sacarosa/glucosa, acidez; presente en la melaza, mosto de alimentación y en el mosto fermentado.
- **Colorante Azul de Metileno al 0.5 %:** Colorante de naturaleza vegetal que tiene la propiedad de teñir a microorganismos muertos, diferenciándolos de los vivos, pues estos no se tiñen.
- **Mosto fermentado:** Llamado también vino levadurado, que es obtenido como consecuencia de la fermentación de las levaduras sobre los azúcares presentes en el mosto de melaza y/o miel.

Procesamiento de la muestra:

Se desinfectó el área de trabajo con alcohol al 70% y luego se prepararon las diluciones de las muestras con agua destilada estéril. Solo se trabajó con una dilución (10^{-1}).

Preparación de diluciones

- Dilución 10^{-1} .- Para ello se debe tener tubos con 0.9 mL de agua estéril. Se extrajo 0.1 mL de la muestra de mosto fermentado que se iba a analizar y se colocó en un tubo que contenía 0.9 mL de agua estéril, se homogeneizó con ayuda de una micropipeta de 1000 μ L de arriba hacia abajo por cuatro veces seguidas.

De la muestra obtenida con la dilución deseada se tomó 0.1 mL y se colocó en un vial estéril o llamada también cámara de tinción, luego con la ayuda de la micropipeta se colocó 50 μ L de la solución azul de metileno 0.5 %, inmediatamente se cargó la cámara de Neubauer y se llevó a observar al microscopio con un aumento de 40X.

Se realizaron 2 recuentos por cada muestra a analizar y en cada uno de ellos se contó el número de levaduras vivas (no coloreadas), número de levaduras muertas (coloreadas), número de gemas y la cantidad de contaminantes (bacilos cortos/largos) en los 5 cuadrantes de la cámara Neubauer, tal como se muestra en la **Figura 4**.

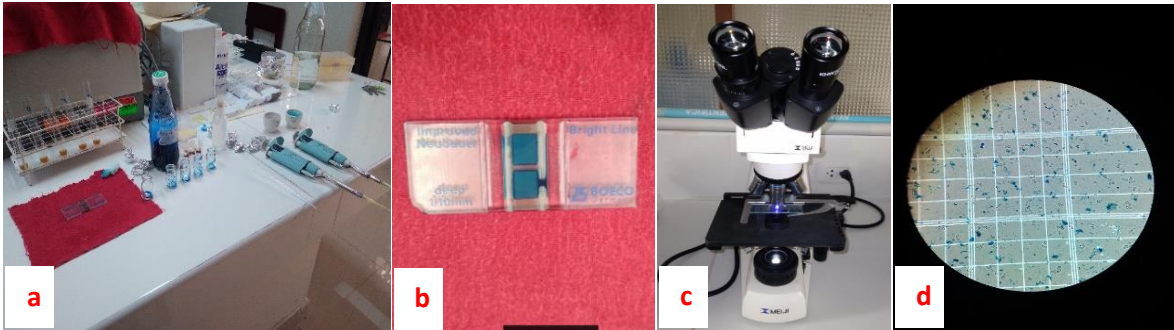


Figura 4: *Determinación de biomasa, viabilidad, brote e infección por microscopía. a.* Las diluciones y todo el material e instrumentos necesarios para la tinción de levaduras con azul de metileno por cámara de Neubauer, **b.** Cámara de Neubauer cargada, **c.** Microscopio 40X, **d.** Muestra de levaduras en metabolismo.

Una vez finalizado el conteo se procedió a determinar biomasa, viabilidad, brote y bacilos según los siguientes criterios:

Cálculo y Expresión de Resultados

Biomasa viva (Bx millones/mL):

Nº Lev = Número promedio de levaduras vivas, el número total de levaduras vivas se divide por el número de recuentos realizados.

D = Inverso de dilución empleada (usualmente es 100).

10^4 = Factor de conversión a cm^3 (mL).

$\text{Bx mill/mL} = \text{N}^\circ \text{ Lev} \times 25 \times 10^4 \times D$

= $\text{N}^\circ \text{ Lev} \times 2.50$ (Si la dilución es 10^{-1})

= $\text{N}^\circ \text{ Lev} \times 25$ (Si la dilución es 10^{-2})

Se expresa en = N° de Levaduras x 10⁶/ mL

Porcentaje de viabilidad de Levaduras (% Viabilidad):

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Biomasa viva}}{\text{Biomasa viva} + \text{Biomasa muerta}} \times 100$$

Porcentaje de Brote (% Brote):

$$\% \text{ Brote} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total brotes}}{\text{N}^\circ \text{ total levaduras vivas}} \times 100$$

Cantidad de Bacilos (Bacilos/mL):

En la **Figura 5** se muestra una vista en microscopio a 40X donde se observan microorganismos bacilares, los cuales se diferencian de las levaduras.

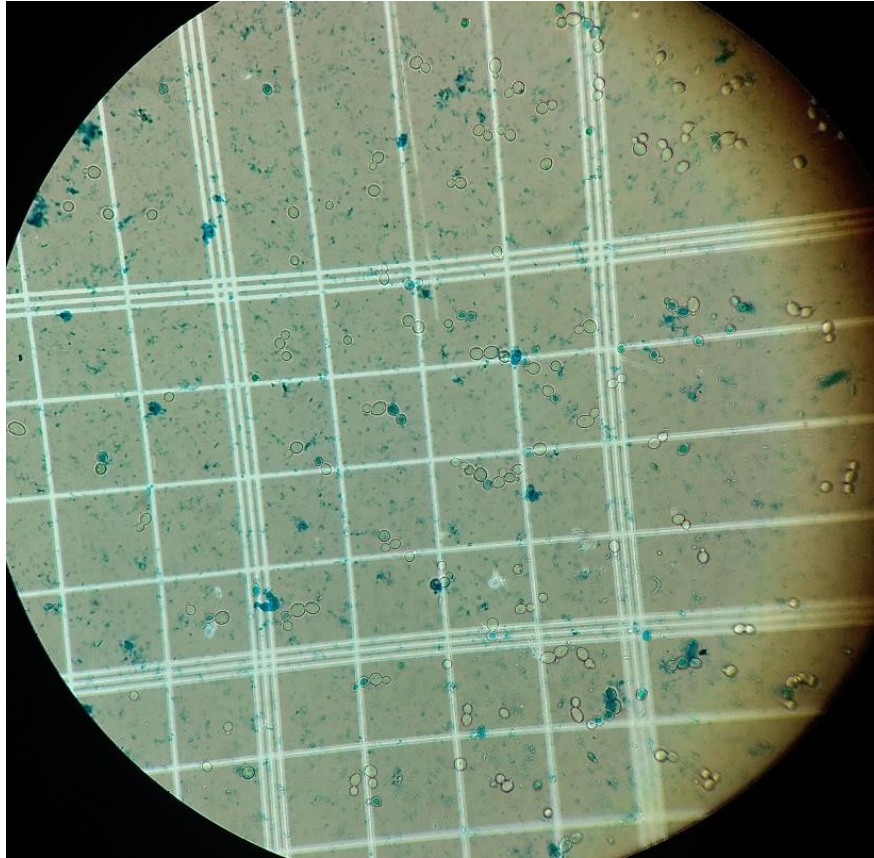


Figura 5: Vista de infección por bacterias ácido lácticas bajo un microscopio óptico a 40X.

Si la dilución es 10^{-1} :

N° Bacilos/mL = N° bacilos contados x 190177.

3.3.4.3. Determinación de biomasa de *S. cerevisiae*

Se determinó la concentración de biomasa de la cinética por densidad óptica. Obtenidas las absorbancias a 600 nm de la biomasa por densidad óptica mediante espectrofotometría en el equipo NanoDrop, estos datos de cada punto de muestreo fueron convertidos en unidades de g/L gracias a una curva de calibrado que se elaboró previamente, las cuales van en concentraciones de 0.00, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.00 g/L de biomasa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, luego se elaboró una solución blanco para usarla en el equipo NanoDrop, la cual tiene las mismas características del mosto, pero sin la levadura, a este blanco y a la muestra a analizar se les aplicó una dilución (1:100), generándose un factor de dilución (x

100). La absorbancia que se obtuvo por espectrofotometría en el equipo NanoDrop se contrastó en la ecuación resultante de la curva de calibrado (**ANEXO 2**) y el resultado obtenido se expresó en concentración de g/L. Esta muestra analizada tiene su equivalente expresado en número de células $\times 10^7$ resultante del conteo por microscopía, entonces se extrapoló todos los valores de las diferentes muestras obtenidos por microscopía con el valor en g/L encontrado gracias a la lectura en el equipo NanoDrop. Solo así pudimos transformar número de células $\times 10^7$ en biomasa en g/L de todos los tratamientos, sus respectivos puntos y sus réplicas a lo largo de la fermentación. Posteriormente estos datos fueron linealizados en una escala logarítmica para determinar su velocidad específica de crecimiento (Madrigal et al., 2018).

3.3.4.4. Determinación de los azúcares reductores (AR)

Se determinaron los azúcares reductores de todas las muestras tomadas en tiempo “cero” o “inicial” y a lo largo del tiempo total de fermentación (48 h), usando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) o técnica de Miller (Miller, 1959) (**ANEXO 3**).

3.3.4.5. Determinación de etanol de *S. cerevisiae*

Se determinó la concentración de etanol en las cinéticas mediante la técnica de cromatografía de gases (**ANEXOS 4 y 5**).

3.3.4.6. Determinación de sacarosa inicial y final

Se tomaron muestras iniciales y finales de los 4 tratamientos incluido el Control, así como también de sus respectivas réplicas. Se tomaron 200 mL de mosto tanto inicial como fermentado final, se le realizó termo shock, primero se le calentó a 65°C por 10 minutos y luego al frío del hielo por 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 4500 rpm por 20 minutos. Se guardaron las muestras en ultracongelación -80 °C, para posteriormente ser trasladadas a las instalaciones del ingenio azucarero de la región Ancash.

Se usó 13 g de muestra (mosto fermentado) y se diluyó en 100 ml de agua destilada, luego se agregó 4 g de acetato de plomo. Se mezclaron los tres componentes y al final se filtró para poder cuantificar en el polarímetro.

3.3.5. Fermentación (Parámetros fermentativos)

En nuestra investigación se ejecutó la fermentación en 4 matraces Erlenmeyer de 250mL con un volumen total de 230 mL de mosto cada uno, los cuales estaban a una concentración del nutriente sulfato de amonio de 0.3 g/L, a 25°Brix. El inóculo fue el 10% del total o sea 23 mL. Durante las 48 horas se mantuvo en agitación a 150 rpm a una temperatura de 32°C. Se trabajó los tratamientos de la siguiente manera: T1= pH 4.2/60°C, T2= pH 4.2/80°C, T3= pH 4.8 /60°C y T4= pH 4.8/80°C, con sus respectivas réplicas.

3.3.6. Análisis Estadístico

Se propone con los resultados un análisis de diseño factorial 2² con superficie de respuesta y análisis de varianza ANOVA en el software STATISTICA versión 10. Utilizar la metodología de superficie de respuesta, permite estudiar una amplia cantidad de cambios con las variables de manera óptima (Michel 2017).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Determinación de los niveles de contaminación por medio del Recuento Total de Bacterias Acido Lácticas Viables (RTBALV)

Se determinó la contaminación de bacterias ácido lácticas viables por medio de microscopia, con cámara de Neubauer. Haciendo uso de un microscopio a un aumento de 40 X, previa tinción con azul de metileno al 0.5 %.

Los resultados del RTBALV para cada tratamiento y el control se encuentran en las **Tablas 5, 6, 7, 8 y 9**.

4.2. Determinación de viabilidad, biomasa, brote e infección de la levadura por microscopía

Tabla 5: Resultados de análisis de viabilidad, biomasa, brote de la levadura y contaminación de bacterias ácidos lácticas – Promedio de Tratamiento N°1 (4.2 pH y 60°C)

Horas	VIABILIDAD (%)	BIOMASA (x10⁶ Levaduras/mL)	BROTE (%)	INFECCIÓN (x10⁷ Bacilos/mL)
0	87.0 ± 5.4	30.3 ± 0.6	1.3 ± 1.6	0.5 ± 0.3
6	91.6 ± 4.1	42.7 ± 1.5	5.2 ± 3.5	0.7 ± 0.6
18	96.5 ± 1.1	105.0 ± 54.1	11.5 ± 8.5	0.5 ± 0.3
24	94.4 ± 0.1	154.0 ± 39.1	6.1 ± 5.3	0.5 ± 0.3
30	91.2 ± 2.5	135.0 ± 32.4	6.2 ± 2.3	0.3 ± 0.1
42	89.0 ± 1.0	122.3 ± 34.6	5.3 ± 1.9	0.2 ± 0.1
48	78.4 ± 3.0	93.7 ± 24.8	3.5 ± 0.9	0.2 ± 0.1

Tabla 6: Resultados de análisis de viabilidad, biomasa, brote de la levadura y contaminación de bacterias ácidos lácticas – Promedio de Tratamiento N°2 (4.2 pH y 80°C)

Horas	VIABILIDAD (%)	BIOMASA (x10⁶ Levaduras/mL)	BROTE (%)	INFECCIÓN (x10⁷ Bacilos/mL)
0	86.4 ± 3.8	21.7 ± 1.2	1.2 ± 1.2	0.6 ± 0.4
6	91.8 ± 4.1	33.0 ± 2.0	4.6 ± 1.3	0.5 ± 0.4
18	95.4 ± 1.0	95.3 ± 45.6	13.1 ± 8.4	0.5 ± 0.4
24	95.5 ± 0.6	133.0 ± 30.3	3.8 ± 1.6	0.4 ± 0.1
30	92.9 ± 1.5	127.7 ± 29.5	5.1 ± 3.8	0.4 ± 0.1
42	85.1 ± 1.4	103.3 ± 11.6	4.8 ± 2.7	0.3 ± 0.2
48	78.2 ± 1.1	89.3 ± 23.0	4.0 ± 1.5	0.2 ± 0.1

Tabla 7: Resultados de análisis de viabilidad, biomasa, brote de la levadura y contaminación de bacterias ácidos lácticas – Promedio de Tratamiento N°3 (4.8 pH y 60°C).

Horas	VIABILIDAD (%)	BIOMASA (x10⁶ Levaduras/mL)	BROTE (%)	INFECCIÓN (x10⁷ Bacilos/mL)
0	91.0 ± 1.8	33.3 ± 5.1	1.1 ± 1.8	0.5 ± 0.2
6	94.7 ± 1.3	40.7 ± 7.2	4.0 ± 2.7	0.6 ± 0.4
18	95.7 ± 1.4	130.3 ± 0.6	16.0 ± 3.0	0.4 ± 0.3
24	93.5 ± 2.4	156.3 ± 6.4	9.6 ± 4.5	0.3 ± 0.1
30	93.3 ± 1.6	146.3 ± 7.5	10.1 ± 2.9	0.3 ± 0.2
42	87.5 ± 5.6	138.0 ± 7.8	9.0 ± 1.7	0.2 ± 0.1
48	81.0 ± 5.5	118.3 ± 10.7	9.8 ± 2.8	0.2 ± 0.0

Tabla 8: Resultados de análisis de viabilidad, biomasa, brote de la levadura y contaminación de bacterias ácidos lácticas – Promedio de Tratamiento N°4 (4.8 pH y 80°C).

Horas	VIABILIDAD (%)	BIOMASA (x10⁶ Levaduras/mL)	BROTE (%)	INFECCIÓN (x10⁷ Bacilos/mL)
0	88.2 ± 5.9	25.7 ± 1.5	2.1 ± 3.7	0.6 ± 0.4
6	94.9 ± 0.5	37.7 ± 12.5	5.3 ± 4.0	0.4 ± 0.2
18	94.5 ± 0.4	119.3 ± 18.8	14.4 ± 6.4	0.5 ± 0.4
24	91.5 ± 2.7	116.7 ± 32.2	9.5 ± 4.1	0.3 ± 0.1
30	92.2 ± 3.7	123.3 ± 29.3	8.3 ± 2.6	0.3 ± 0.2
42	89.8 ± 1.1	115.0 ± 30.4	7.9 ± 3.9	0.2 ± 0.1
48	80.6 ± 3.7	92.0 ± 45.7	7.0 ± 3.6	0.2 ± 0.1

Tabla 9: Resultados de análisis de viabilidad, biomasa, brote de la levadura y contaminación de bacterias ácidos lácticas – Tratamiento control.

Horas	VIABILIDAD (%)	BIOMASA (x10⁶ Levaduras/mL)	BROTE (%)	INFECCIÓN (x10⁷ Bacilos/mL)
0	86.4	36.5	0.0	0.9
6	88.8	57.3	6.6	0.6
18	96.1	128.8	6.9	0.8
24	94.5	160.1	8.3	0.2
30	96.3	177.5	5.8	0.5
42	89.8	155.8	5.6	0.2
48	89.7	141.5	6.2	0.2

La viabilidad es afectada por diferentes tipos de estrés y su porcentaje comienza a disminuir durante el tiempo que dura el proceso, afectando el rendimiento alcohólico. Ferrari y Teixeira (2023), afirman que la baja viabilidad, brote y biomasa se ve afectada por factores externos como altas temperaturas, dosis de antibióticos, ácido sulfúrico, falla operativa, flujo de alimentación inadecuado, levaduras salvajes, contaminantes bacterianos y paradas largas de planta.

En la **Figura 6** se muestra un gráfico de barras donde se observa simultáneamente la comparación del promedio de la viabilidad, biomasa, brote e infección de los 4 tratamientos aplicados y el control después de las 48 horas de fermentación. En esta figura, se puede apreciar que los valores más altos de viabilidad y biomasa se obtuvieron con el control, además de que el mayor valor de brote se observó con el tratamiento 3 (4.8 pH y 60°C), mientras que la infección fue igual para todos ensayos realizados.

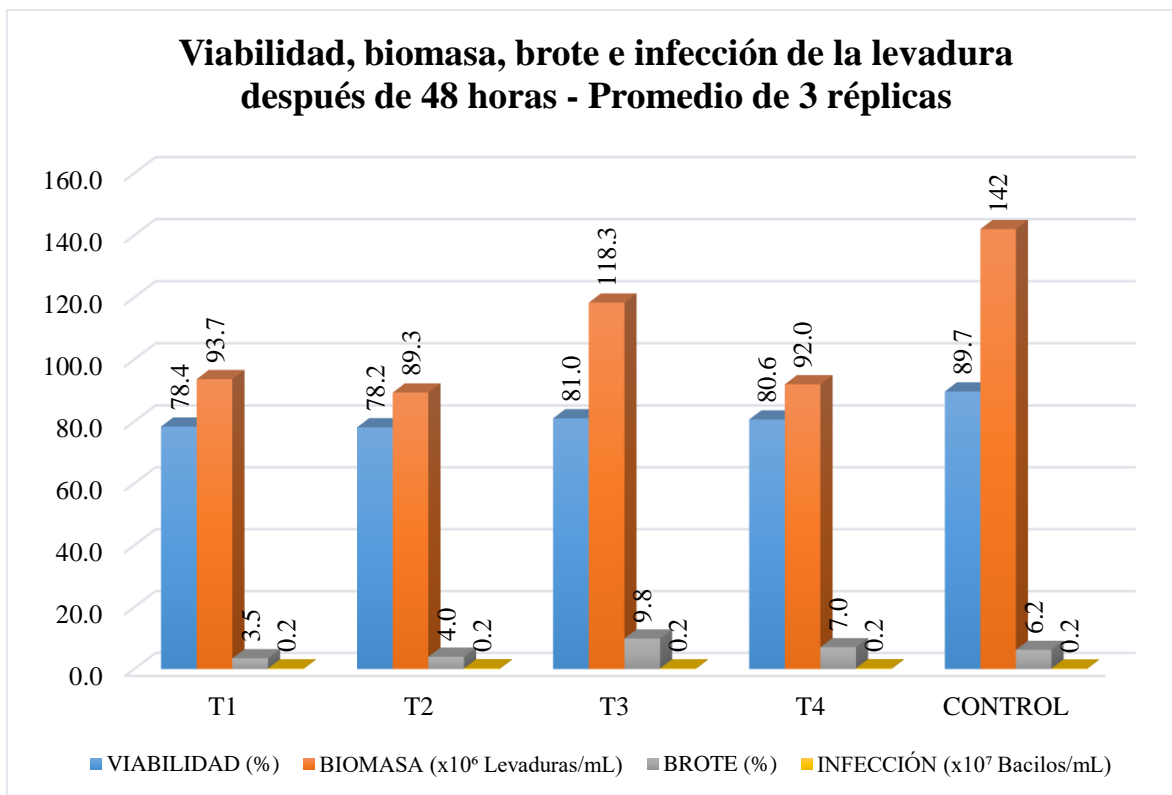


Figura 6: Viabilidad, biomasa, brote e infección de la levadura después de 48 horas - Promedio de 3 réplicas.

4.3. Evaluación de la cinética del proceso

El estudio cinético de un bioproceso fermentativo, consiste en todo un complejo mecanismo, el cual debe ser evaluado desde el enfoque metabólico de los microorganismos en cuestión, llámese en este caso levaduras. Estos estudios deben ser abordados mediante modelos cinéticos que analicen el crecimiento de microorganismos, como por ejemplo la tan utilizada ecuación de Monod o la Ecuación del modelo matemático Logístico. Pero, para aplicar estos modelos requerimos una evaluación del comportamiento de los microorganismos a medida que avanza el proceso, así como un estudio exhaustivo de la viabilidad celular y la implementación de las curvas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (Acosta, 2012).

Los resultados se muestran en las **Tablas 10, 11, 12, 13 y 14** y en las **Figuras 7, 8, 9, 10 y 11**.

Tabla 10: Cinética de fermentación alcohólica en 48 horas; concentración de A. reductores, biomasa y etanol – promedio Tratamiento N°1 (4.2 pH y 60°C).

TIEMPO (h)	A. Reductores (S) g/L	Biomasa (X) g/L	Etanol (P) g/L
0	66.6 ± 0.8	5.8 ± 0.1	0.0 ± 0.0
6	75.3 ± 5.6	8.2 ± 0.3	7.3 ± 1.3
18	87.9 ± 11.1	20.2 ± 10.4	36.9 ± 4.0
24	44.4 ± 3.6	29.6 ± 7.5	54.8 ± 10.9
30	22.2 ± 3.1	26.0 ± 6.2	72.1 ± 2.1
42	17.5 ± 0.5	23.5 ± 6.7	73.4 ± 1.7
48	16.6 ± 0.1	18.0 ± 4.8	74.4 ± 1.6

En este tratamiento el valor máximo de azúcares reductores (87.9 g/L) lo alcanza a las 18 h, debido a la hidrólisis de sacarosa, los valores máximos de biomasa (29.6 g/L) los alcanza a las 24 h, mientras que el etanol va de valores 0 hasta alcanzar 74.4 g/L hacia el final de la fermentación, momento en el cual los azúcares reductores caen a valores de 16.6 g/L mostrando un comportamiento asintótico.

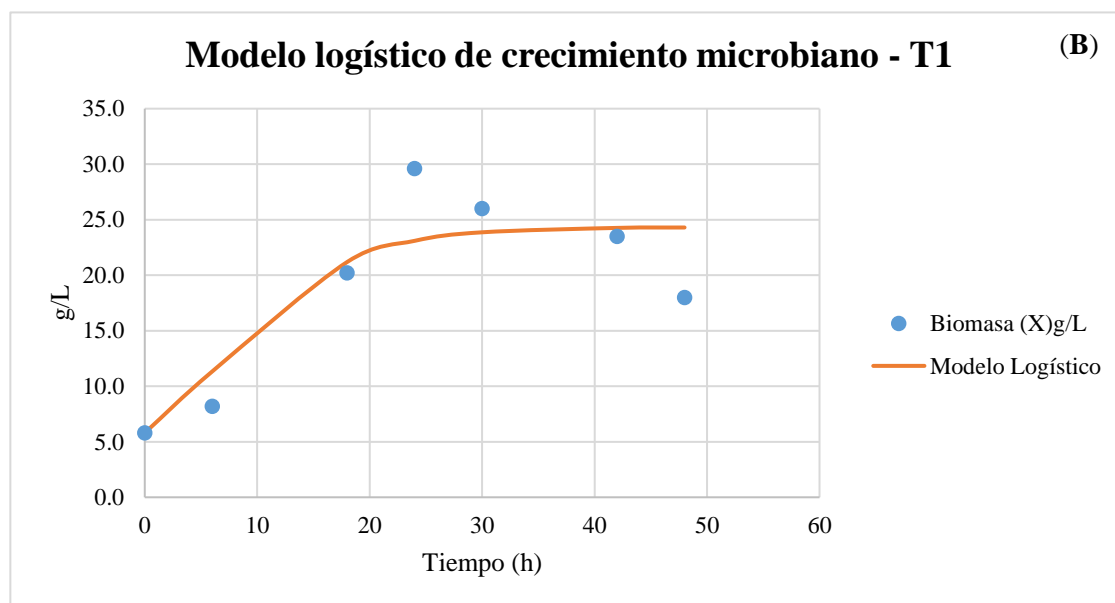
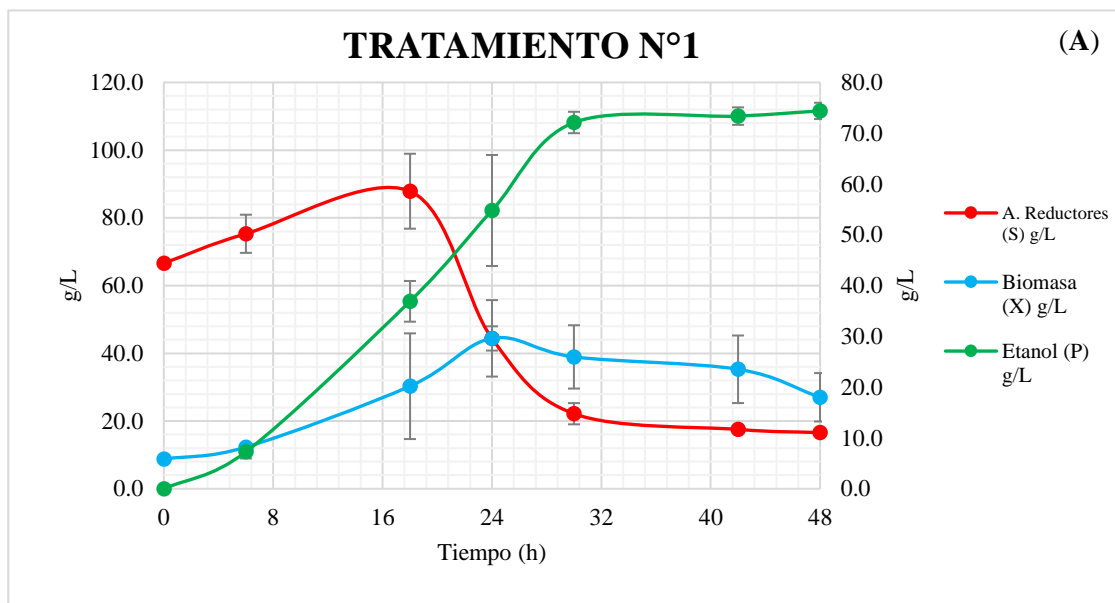


Figura 7: Comportamiento de la cinética de fermentación alcohólica en 48 horas – promedio Tratamiento N°1 (4.2 pH y 60°C). (A) Cinética de crecimiento de biomasa, de consumo de A. reductores y de producción de etanol. (B) Cinética de crecimiento de biomasa experimental y ajustada mediante el modelo logístico, con las constantes $K = 0.17081$ y $XGD = 24.321$ obtenidas al correr los valores experimentales de la biomasa en el software *Wolfram Mathematica 7* a lo largo de 48 horas, además de un $R^2 = 0.799$ (ANEXO 6).

Tabla 11: Cinética de fermentación alcohólica en 48 horas; concentración de A. reductores, biomasa y etanol – promedio Tratamiento N°2 (4.2 pH y 80°C).

TIEMPO (h)	A. Reductores (S) g/L	Biomasa (X) g/L	Etanol (P) g/L
0	68.0 ± 0.8	4.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0
6	76.5 ± 6.1	6.3 ± 0.4	6.8 ± 1.1
18	93.6 ± 11.5	18.3 ± 8.8	34.8 ± 4.4
24	49.3 ± 3.3	25.6 ± 5.8	56.3 ± 1.1
30	25.2 ± 1.6	24.6 ± 5.7	69.0 ± 2.2
42	18.4 ± 0.7	19.9 ± 2.2	72.1 ± 2.1
48	17.0 ± 1.2	17.2 ± 4.4	72.9 ± 2.2

En este tratamiento el valor máximo de azúcares reductores (93.6 g/L) lo alcanza a las 18 h, debido a la hidrólisis de sacarosa los valores máximos de biomasa (25.6 g/L) los alcanza a las 24 h, mientras que el etanol va de valores 0 hasta alcanzar 72.9 g/L hacia el final de la fermentación, momento en el cual los azúcares reductores caen a valores de 17.0 g/L mostrando un comportamiento asintótico.

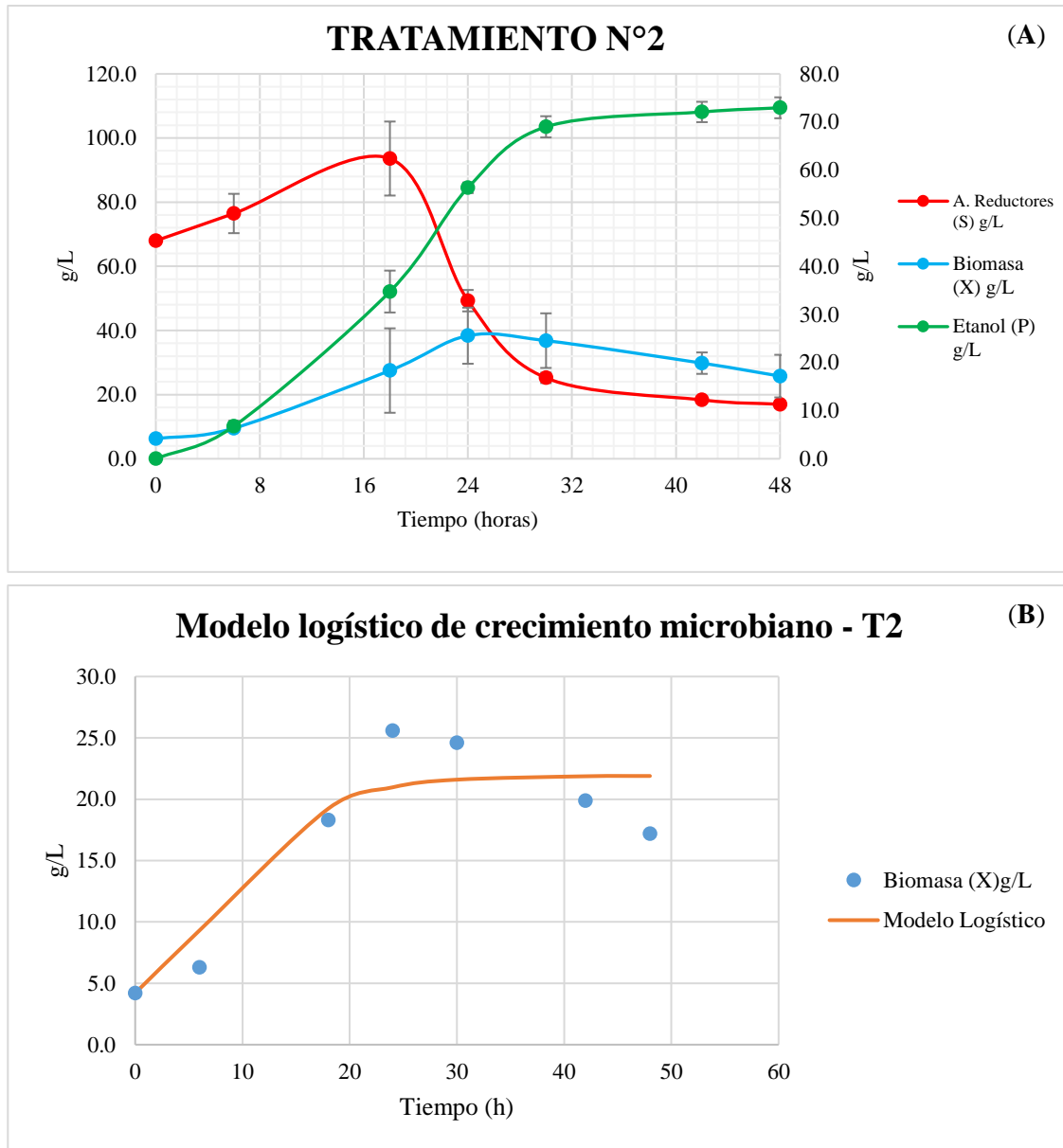


Figura 8: Comportamiento de la cinética de fermentación alcohólica en 48 horas - promedio Tratamiento N°2 (4.2 pH y 80°C). **(A)** Cinética de crecimiento de biomasa, de consumo de A. reductores y de producción de etanol. **(B)** Cinética de crecimiento de biomasa experimental y ajustada mediante el modelo logístico, con las constantes $K = 0.189537$ y $XGD = 21.9057$ obtenidas al correr los valores experimentales de la biomasa en el software *Wolfram Mathematica 7* a lo largo de 48 horas, además de un $R^2 = 0.848$ (ANEXO 6).

Tabla 12: *Cinética de fermentación alcohólica en 48 horas; concentración de A. reductores, biomasa y etanol – promedio Tratamiento N°3 (4.8 pH y 60°C).*

TIEMPO (h)	A. Reductores (S) g/L	Biomasa (X) g/L	Etanol (P) g/L
0	66.3 ± 1.9	6.4 ± 1.0	0.0 ± 0.0
6	81.4 ± 4.6	7.8 ± 1.4	7.0 ± 0.5
18	66.3 ± 10.9	25.1 ± 0.1	43.5 ± 0.5
24	26.9 ± 4.5	30.1 ± 1.2	61.0 ± 10.9
30	18.3 ± 2.1	28.1 ± 1.4	71.7 ± 1.3
42	18.5 ± 0.5	26.5 ± 1.5	72.9 ± 0.8
48	17.4 ± 0.3	22.8 ± 2.1	74.1 ± 1.1

En este tratamiento el valor máximo de azúcares reductores (81.4 g/L) lo alcanza a las 6 h, debido a la hidrólisis de sacarosa, los valores máximos de biomasa (30.1 g/L) los alcanza a las 24 h, mientras que el etanol va de valores 0 hasta alcanzar 74.1 g/L hacia el final de la fermentación, momento en el cual los azúcares reductores caen a valores de 17.4 g/L mostrando un comportamiento asintótico.

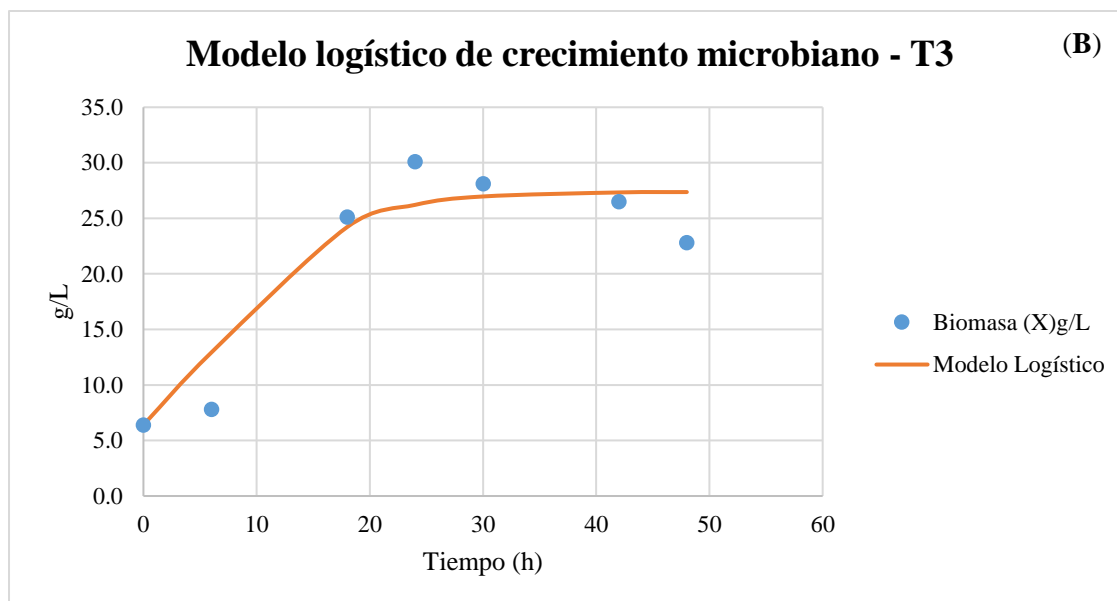
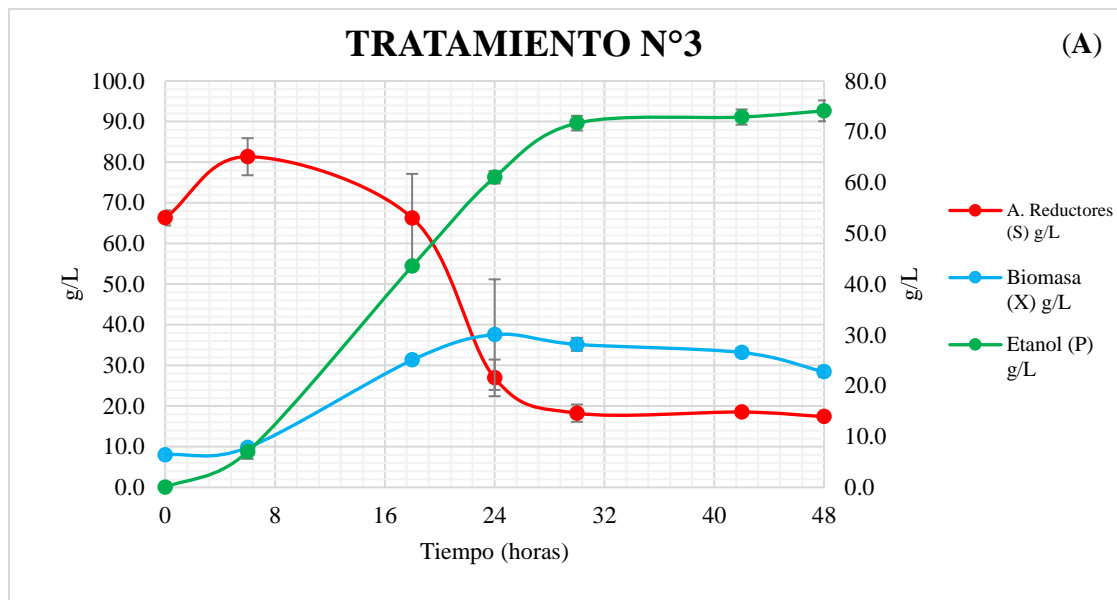


Figura 9: Comportamiento de la cinética de fermentación alcohólica en 48 horas - promedio Tratamiento N°3 (4.8 pH y 60°C). **(A)** Cinética de crecimiento de biomasa, de consumo de A. reductores y de producción de etanol. **(B)** Cinética de crecimiento de biomasa experimental y ajustada mediante el modelo logístico, con las constantes $K = 0.17906$ y $XGD = 27.3806$ obtenidas al correr los valores experimentales de la biomasa en el software *Wolfram Mathematica 7* a lo largo de 48 horas, además de un $R^2 = 0.898$ (ANEXO 6).

Tabla 13: Cinética de fermentación alcohólica en 48 horas; concentración de A. reductores, biomasa y etanol – promedio Tratamiento N°4 (4.8 pH y 80°C).

TIEMPO (h)	A. Reductores (S) g/L	Biomasa (X) g/L	Etanol (P) g/L
0	67.7 ± 2.7	4.9 ± 0.3	0.0 ± 0.0
6	79.0 ± 6.3	7.2 ± 2.4	7.2 ± 1.8
18	75.9 ± 8.3	22.9 ± 3.6	40.4 ± 1.1
24	34.5 ± 3.0	22.4 ± 6.2	58.0 ± 8.5
30	19.8 ± 4.8	23.7 ± 5.6	73.6 ± 0.6
42	18.4 ± 1.1	22.1 ± 5.9	75.3 ± 1.8
48	14.3 ± 2.7	17.7 ± 8.8	77.3 ± 1.1

En este tratamiento el valor máximo de azúcares reductores (79.0 g/L) lo alcanza a las 6 h, debido a la hidrólisis de sacarosa, los valores máximos de biomasa (23.7 g/L) los alcanza a las 30 h, mientras que el etanol va de valores 0 hasta alcanzar 77.3 g/L hacia el final de la fermentación, momento en el cual los azúcares reductores caen a valores de 14.3 g/L mostrando un comportamiento asintótico.

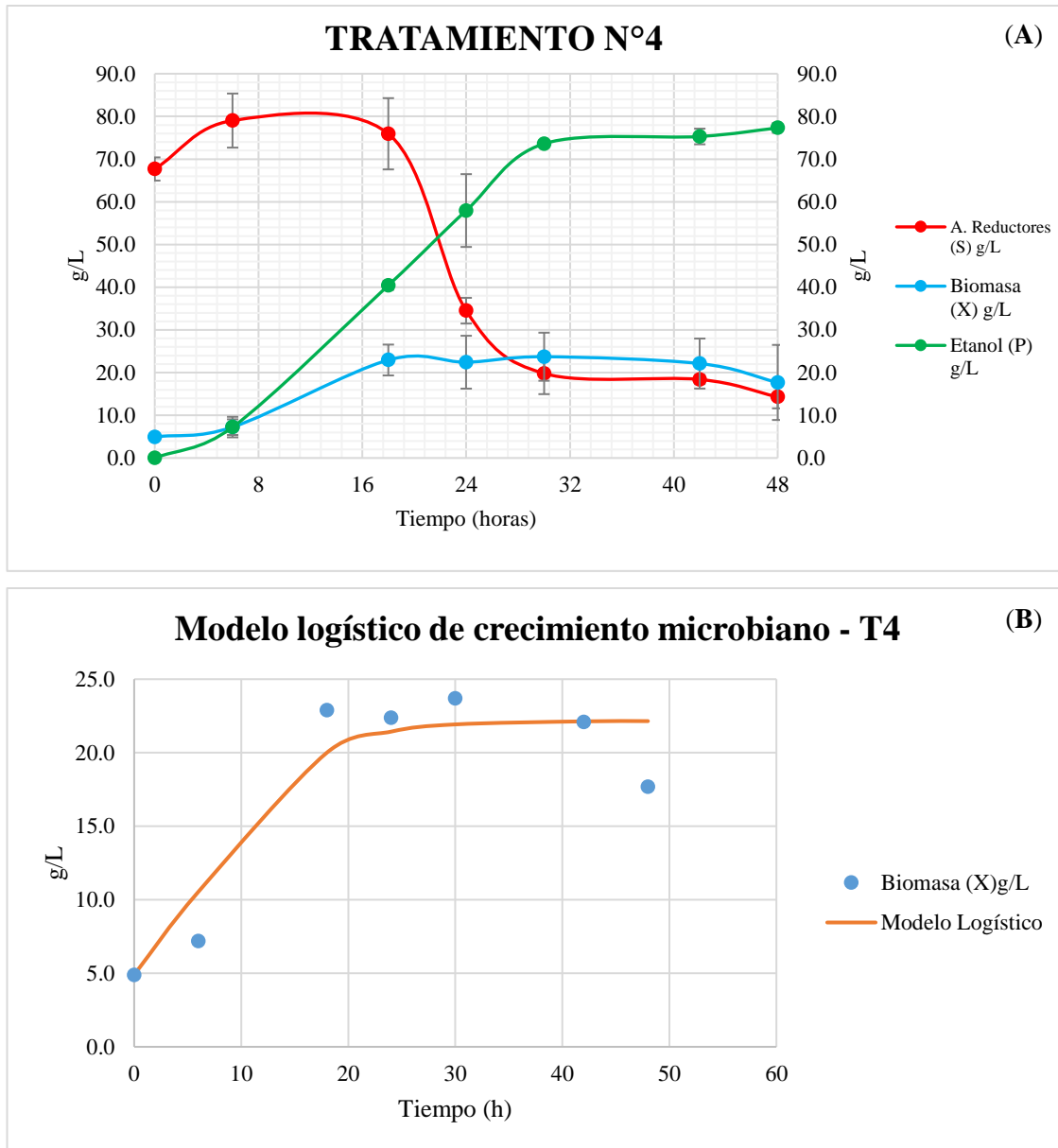


Figura 10: Comportamiento de la cinética de fermentación alcohólica en 48 horas - promedio Tratamiento N°4 (4.8 pH y 80°C). **(A)** Cinética de crecimiento de biomasa, de consumo de A. reductores y de producción de etanol. **(B)** Cinética de crecimiento de biomasa experimental y ajustada mediante el modelo logístico, con las constantes $K = 0.193719$ y $XG = 22.1566$ obtenidas al correr los valores experimentales de la biomasa en el software *Wolfram Mathematica 7* a lo largo de 48 horas, además de un $R^2 = 0.891$ (ANEXO 6).

Tabla 14: Cinética de fermentación alcohólica en 48 horas; concentración de A. reductores, biomasa y etanol – Tratamiento control.

TIEMPO (h)	A. Reductores (S) g/L	Biomasa (X) g/L	Etanol (P) g/L
0	72.6	7.1	0.0
6	87.4	11.0	5.9
18	84.7	25.0	38.4
24	34.2	30.8	61.6
30	22.2	34.2	70.1
42	16.9	30.0	72.5
48	18.5	27.3	73.2

En este tratamiento el valor máximo de azúcares reductores (87.4 g/L) lo alcanza a las 6 h, debido a la hidrólisis de sacarosa, los valores de biomasa (34.2 g/L) lo alcanza a las 30 h, mientras que el etanol va de valores 0 hasta alcanzar 73.2 g/L hacia el final de la fermentación, momento en el cual los azúcares reductores caen a valores de 18.5 g/L mostrando un comportamiento asintótico.

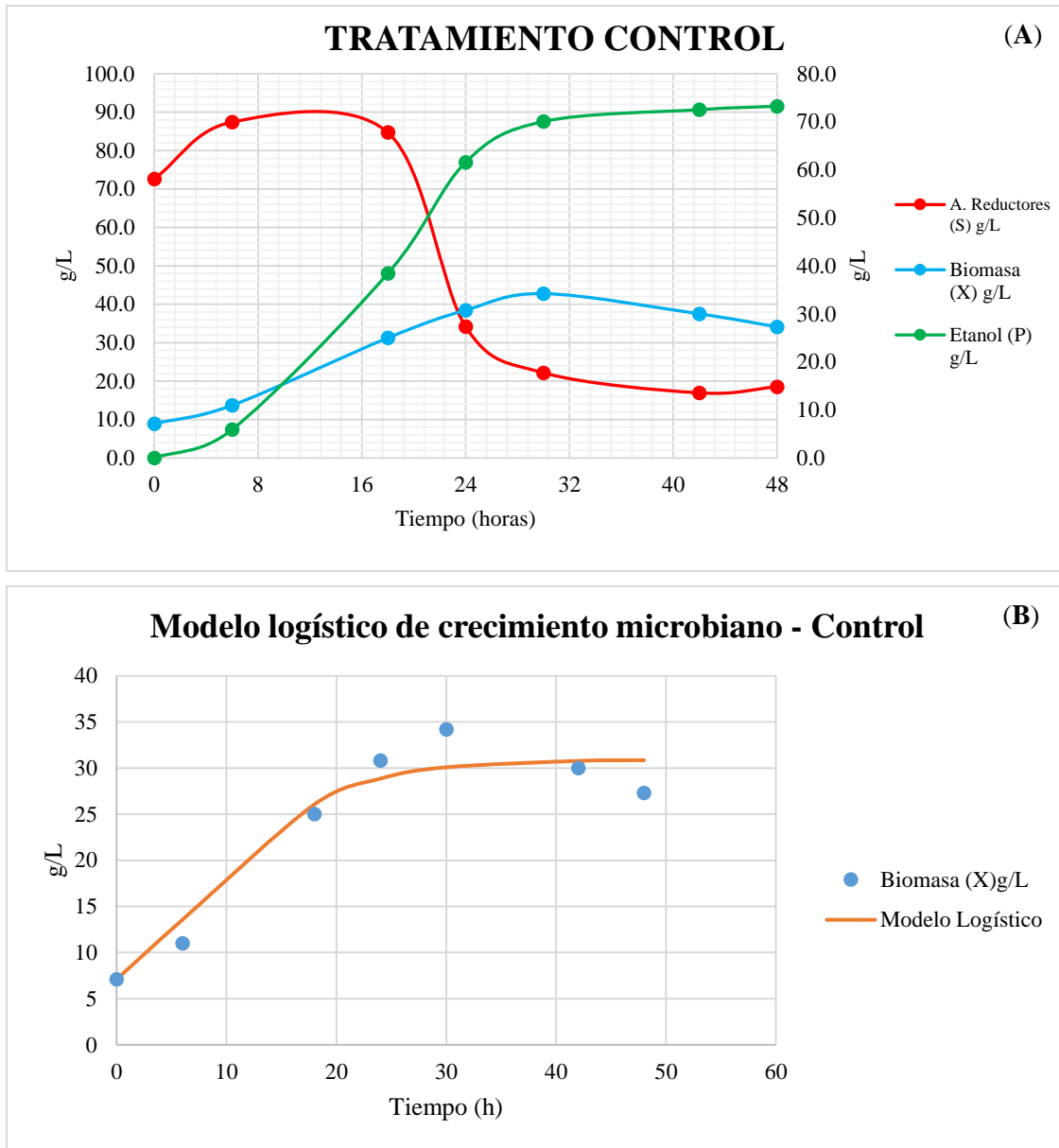


Figura 11: Comportamiento de la cinética de fermentación alcohólica en 48 horas - sin pretratamiento de pH y temperatura - Tratamiento control. (A) Cinética de crecimiento de biomasa, de consumo de A. reductores y de producción de etanol. (B) Cinética de crecimiento de biomasa experimental y ajustada mediante el modelo logístico, con las constantes $K = 0.160718$ y $XG = 30.8988$ obtenidas al correr los valores experimentales de la biomasa en el software *Wolfram Mathematica 7* a lo largo de 48 horas, además de un $R^2 = 0.939$ (ANEXO 6).

A medida que el tiempo de fermentación transcurre, la cantidad de biomasa aumenta, ya que cuenta con las mejores condiciones del medio y la caída del °Brix puede evidenciarlo. (Aguilar et al., 2015). Llegamos a la fase estacionaria al notar que ya no había incremento de la biomasa después de las 24 a 30 horas en promedio a lo largo de la fermentación en todas las réplicas y el control, similar comportamiento obtuvo Pérez, L. (2016) quién en el proceso anaerobio llegó a la fase estacionaria a las 16 h de haber iniciado su proceso fermentativo.

Respecto al sustrato, Arshad et al. (2017) identificaron que la concentración de azúcares reductores aumentó hasta alcanzar un pico máximo a las 25 horas del cultivo debido a la hidrólisis de la sacarosa, para luego disminuir uniformemente hasta las 60 h, lo que significó el final del bioproceso. Este comportamiento fue corroborado en la presente investigación, debido a que la levadura es capaz de hidrolizar la sacarosa en glucosa y fructosa, y luego convertir selectivamente la glucosa en biomasa y etanol.

En lo que respecta a la producción de etanol en todas las réplicas incluido el control observamos que su producción estuvo en función del consumo de sustrato, evidenciando un comportamiento ideal que comenzó en valores cero y se fue incrementando a medida que se desarrollaba la fermentación, siempre fue de menos a más hasta lograr comportamiento asintótico. Entre los resultados de los tratamientos y el control, se identificó que la mayor concentración de etanol luego de 48 h de fermentación se consiguió con el T4 (**Tabla 13**), con 77.3 ± 1.1 g/L, (en el **ANEXO 5** se muestran los resultados del análisis cromatográfico después de 48 h. del T4 y el control sin promediar), mientras que la menor concentración se alcanzó con el T2 (**Tabla 11**), con 72.9 ± 2.2 g/L, el cual fue un valor similar al obtenido por Zohri et al. (2022), con 72.98 g/L después de 24 h. Asimismo, la presente investigación tuvo resultados superiores a lo reportado por Ortiz-Muñiz et al. (2010) que lograron 58.4 g/L de etanol después de 36 h, Shafaghat et al. (2010) que obtuvieron 14.87 g/L de etanol después de 12 h, Wiratno et al. (2014) que alcanzaron 36.85 g/L después de 72 h, Rasmey et al. (2018) que lograron 67.47 g/L de etanol después de 24 h y Kruasuwan et al. (2023) alcanzaron 66.5 g/L de etanol después de 72 h. Sin embargo, se obtuvo concentraciones menores de etanol en comparación con Arshad et al. (2017) obtuvieron 96.26 g/L después de 50 h, Peña-Serna et al. (2012) alcanzaron 119.74 g/L luego de 35 h, Wu et al. (2020) obtuvieron 114.71 g/L de

etanol después de 24 h, Kaur y Kocher (2021) obtuvieron 92.09 g/L de etanol después de 24 h y Wang et al. (2024) obtuvieron 111.65 g/L de etanol después de 60 h.

Los valores de la cinética respecto de la biomasa fueron contrastados con el modelo matemático Logístico como lo corrobora Torres et al., (2012); quien en su estudio demostró que el modelo Logístico presenta un mejor ajuste con los datos experimentales de los ensayos implementados. No obstante, en el presente estudio no se obtuvieron excelentes ajustes con dicho modelo, tal como lo indican los valores de R^2 para cada tratamiento (**Figuras 7, 8, 9 y 10**), los cuales resultaron menores a 0.95; sin embargo, el mejor ajuste posible resultó ser el del control (**Figura 11**), con un R^2 de 0.939, lo cual se considera un valor aceptable. A diferencia de otras investigaciones donde se empleó la melaza de caña de azúcar como fuente de carbono y energía, el modelo logístico presentó un excelente ajuste a los datos experimentales de biomasa, tales como los trabajos de Shafaghat et al. (2010) con un R^2 de 0.991, Dodić et al. (2012) con un R^2 de 0.997 y Agu y Oduola (2021) con un R^2 de 0.974.

4.4. Determinación de los azúcares reductores (%AR)

En nuestros resultados se observó incrementos en la concentración de azúcares reductores a lo largo de las primeras 6 a 18 horas de fermentación, en tanto que las enzimas de la levadura fueron hidrolizando la sacarosa en glucosa y fructosa permitiendo que se incremente gradual y progresivamente los niveles de glucosa, momento en el cual la levadura usa la glucosa que se encuentra en el sustrato; comportamiento similar obtuvieron Fajardo y Sarmiento (2007). Posteriormente a medida que pasaba las horas de fermentación, la glucosa que resultó de la hidrólisis de la sacarosa se fue consumiendo también al ser un azúcar fácilmente asimilable, fue consumido casi en su totalidad por las levaduras (Trujillo 2013).

Una vez terminadas las fermentaciones del mosto de melaza diluida a 25°Brix se analizó los azúcares reductores residuales que aún estaban en el medio para la determinación de la cantidad de reductores que no fueron consumidos por *S. cerevisiae*, como lo hizo De La Vara (2014) obteniendo resultados de 7.44 g/L.

Según Calderón (2007) normalmente al usar melaza como sustrato para el mosto en un sistema por lote los valores porcentuales de azúcares reductores residuales están por encima del 2% (p/v) llegando incluso a 2.4% (p/v).

Sin embargo, De La Vara et al. (2014) con levadura comercial FT-858 presentaron menos valores porcentuales de azúcares reductores residuales consiguiendo metabolizar una mayor cantidad de azúcares en sus dos variedades de melaza.

Con el uso de antibiótico Virginiamicina 2.0 ppm (Muhammad et al., 2011) lograron disminuir los azúcares reductores residuales a valores por debajo de 1.12% (p/v).

En nuestro mejor tratamiento T4, que fue el que dio mejores resultados en la disminución de azúcares reductores residuales finales (12.12 g/L sin promediar) comparado con el control (18.5 g/L,) observamos una importante diferencia.

4.5. Determinación del porcentaje de etanol (% v/v)

La producción de etanol se encuentra asociada fundamentalmente con el consumo de azúcares reductores en especial glucosa por el microorganismo empleado como lo es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Argote et al., 2015).

La temperatura se mantuvo en valores cercanos a los 32 °C, sin embargo, notamos que se incrementó al transcurrir el tiempo de fermentación al disminuir el oxígeno y aumentar la producción de dióxido de carbono, así lo reportaron Argote et al. (2015), lo cual obedece a que el metabolismo celular inicia la fermentación cuando se manifiesta una atmósfera oxidoreductora, en esta etapa se evidenció una mayor producción de etanol en cada uno de los tratamientos.

Aguilar (2014) obtuvo 10% de alcohol en melaza de *Saccharum officinarum* después de 96 horas de fermentación. Sin embargo, Calderón, 2007 logró una producción de alcohol significativamente más alta cuando utilizó melaza como sustrato y su máximo valor de rendimiento fue de 42% con inóculo tratado con virginiamicina 2.0 ppm.

Muhammad et al. (2011) encontraron que, a 2 ppm de antibiótico, el nivel máximo de alcohol que se obtuvo coincidió con el potencial de la melaza utilizada y de manera óptima se obtuvo 8.5% de etanol a 2 ppm de concentración de antibiótico utilizado, sin embargo, en la presente investigación al usar antibiótico effymol 3.5 ppm en el tratamiento control se logró resultados cercanos (7.3%), pero con el pretratamiento propuesto se alcanzó un valor mayor (7.8%) sin la necesidad de utilizar antibióticos. En el presente estudio el análisis de etanol producido se

hizo efectivo a través de cuantificación por cromatografía de gases tal como lo hizo Arango y Peña (2009). Los resultados de la cromatografía fueron mostrados por el equipo en porcentaje (% v/v), sin embargo, para efectos del análisis de datos, estos fueron transformados a unidades de concentración en g/L.

4.6. Determinación de sacarosa inicial y final

La determinación de la sacarosa inicial y final se realizó mediante el método por polarimetría (**Figura 12**) en el laboratorio de control calidad de un ingenio azucarero de la región Ancash.



Figura 12: Determinación de sacarosa por el método de polarimetría. **a.** Calentamiento del mosto, **b.** mosto en el frío del hielo, **c.** pesado de muestras para equilibrio en la centrífuga, **d.** muestras en la centrífuga, **e.** centrífuga en funcionamiento, **f.** filtrado de la dilución, **g.** lectura y resultado del valor de sacarosa.

La melaza no sólo presenta azúcares reductores que fácilmente son metabolizables por la levadura, sino también la sacarosa el cual es un disacárido que aprovecha la levadura en hidrolizarla para luego consumir los monosacáridos. Durante la elaboración de azúcar, la melaza empleada en esta investigación presenta valores de sacarosa muy variables entre 32 – 40%, para el proceso de elaboración de alcohol es beneficioso tener una melaza con mayor porcentaje de sacarosa, el cual se ve reflejado en el rendimiento. Los resultados de este análisis se muestran en la **Tabla 15**.

Tabla 15: Resultados de análisis de °Brix, % sacarosa y densidad del mosto inicial y mosto atenuado después de 48 horas de fermentación de todos los tratamientos (T1, T2, T3 y T4) de los 3 ensayos y de la muestra control.

Mosto Pretratado	°Brix lectura	Sacarosa (%)	Densidad (g/L)
Mosto inicial	25.00	9.06	1.094
Final - I T1	15.02	0.65	1.061
Final - I T2	15.10	0.65	1.062
Final - I T3	15.03	0.57	1.061
Final - I T4	15.15	0.58	1.062
Final - II T1	15.15	0.62	1.062
Final - II T2	15.16	0.64	1.062
Final - II T3	14.22	0.54	1.058
Final - II T4	15.38	0.60	1.063
Final - III T1	14.90	0.70	1.061
Final - III T2	15.01	0.66	1.061
Final - III T3	15.05	0.56	1.062
Final - III T4	15.03	0.54	1.061
Final- Control	17.94	0.66	1.074

Por lo anterior, se podría afirmar que se lleva a cabo el proceso conocido como inversión de la sacarosa; la presencia de esta enzima depende de las concentraciones de glucosa, de la temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, donde se evidencia mayor actividad de la enzima invertasa (Ortiz et al. 2008), que está directamente relacionada con la actividad metabólica, debido a que la enzima se encuentra cerca de la superficie de la célula y puede actuar mejor a estas condiciones (Zech y Gorish, 1995).

4.7. Optimización estadística de las variables de respuesta

4.7.1. Azúcares Reductores Residuales

Los azúcares reductores al final de la fermentación han sido considerados como variables de respuesta ya que son el resultante de los pretratamientos planteados; así lo consideraron Miranda y Molina (2015), quienes obtuvieron valores finales de azúcares

reductores muy similares a los valores que se obtuvieron en nuestras fermentaciones y consideraron estos valores como variables de respuesta (valores promedios de las todas las réplicas: T1=16.6 g/L T2=17 g/L, T3=17.4 g/L, T4=14.3 g/L y control=18.5 g/L.), resultando el T4 el tratamiento que mostró valores mínimos comparado con el resto de tratamientos incluso con el control, sin embargo, no resultó significativo dado que los resultados arrojados por el análisis de varianza ANOVA así lo demostraron, como lo veremos más adelante en la **Tabla 17**.

Diagrama de Pareto:

Del diagrama de Pareto (**Figura 13**), se puede observar que para la variable de respuesta: azúcares reductores residuales ninguno de los efectos principales, llámese temperatura de pretratamiento y pH, ni en el caso de la interacción tampoco fueron significativos, dado que la línea roja que representa el valor crítico, no corta ninguno de los factores ya mencionados.

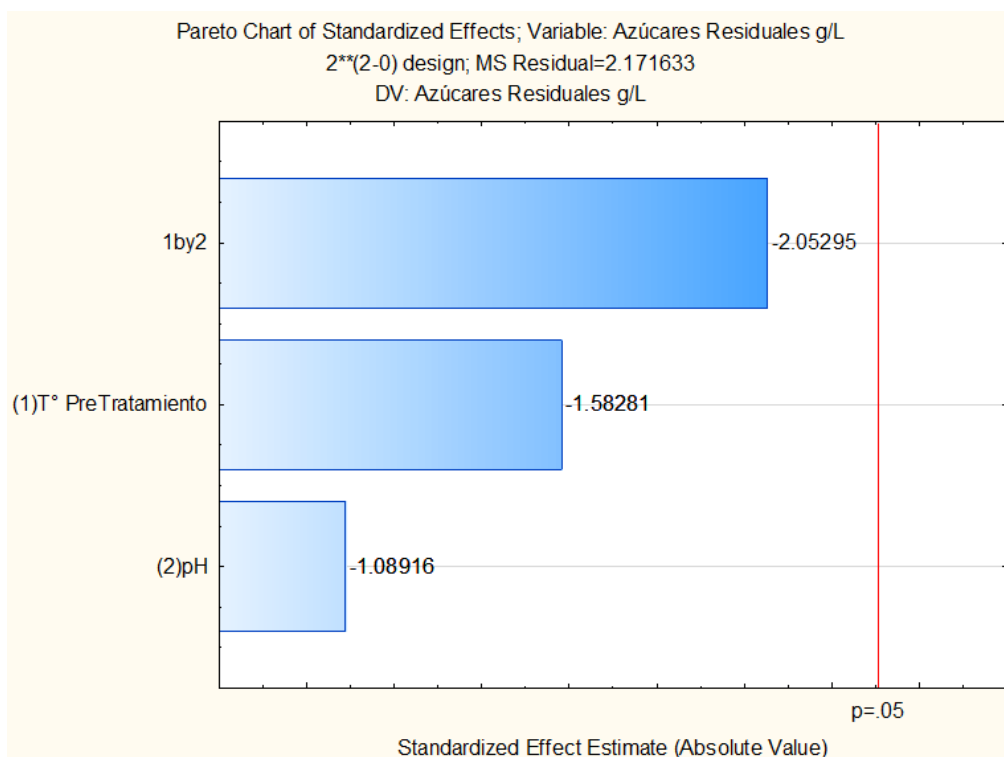


Figura 13: Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para azúcares reductores residuales.

Efectos Estimados:

En la **Tabla 16** se puede observar estimaciones de los efectos principales y de la interacción cuando evaluamos la variable: azúcares reductores residuales, también muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. También encontramos información de la media del valor observado del factor principal evaluado, así como su error estándar y finalmente los intervalos de confianza al 95% para la respuesta media.

Tabla 16: Efectos estimados para azúcares reductores residuales.

Factor	Effect	Std.Err.	t(8)	p	-95.% Cnf. Limt.	+95.% Cnf. Limt.	Coeff.	Std. Err. Coeff.	-95.% Cnf. Limt.	+95.% Cnf. Limt.
Mean/Interc.	16.3167	0.42541	38.356	0.00000	15.3357	17.2977	16.3167	0.425405	15.33568	17.29765
(1)T° Pre Tto.	-1.34667	0.85081	-1.5828	0.152124	-3.30864	0.6153	-0.67333	0.425405	-1.65432	0.30765
(2)pH	-0.92667	0.85081	-1.0892	0.307803	-2.88864	1.0353	-0.46333	0.425405	-1.44432	0.51765
1 by 2	-1.74667	0.85081	-2.0530	0.074168	-3.70864	0.2153	-0.87333	0.425405	-1.85432	0.10765

Var: Azúcares Reductores g/L; R-sqr = 0.49705; Adj: 0.30844; MS Residual = 2.171633.

DV: Azúcares Reductores g/L.

Análisis de Varianza (ANOVA):

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de azúcares reductores residuales en piezas separadas para cada uno de los efectos, entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso 0 efectos tienen un valor-p menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

El ANOVA para el modelo lineal de primer orden de la respuesta: azúcares reductores residuales (**Tabla 17**) indicó que el efecto lineal de la temperatura de pretratamiento, del pH, incluso la interacción de los factores son términos no significativos ($p > 0.05$). El valor-p es mucho mayor para un nivel de significancia de 5%. En este caso, 0 efectos tienen un valor $p < 0.05$, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%, por lo tanto, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos (Suárez-Morales et al., 2021). El R^2 ajustado para este modelo fue de 0.30844 aproximadamente el 30.84% de la variable de respuesta, explicándose así la no

significancia al mostrarse muy disminuido (Rebollar-Rebollar et al., 2018). Además, dado que el R^2 y el R^2 ajustado son cifras que difieren drásticamente, se infiere que el modelo de regresión tiene términos no significativos (Myers et al., 2016), lo cual se evidencia por el valor-p mayor >0.05 de los términos lineales y la interacción lineal de las variables.

Tabla 17: ANOVA para azúcares reductores residuales.

Factor	SS	df	MS	F	p
(1)T° Pretratamiento	5.44053	1	5.440533	2.505273	0.152124
(2)pH	2.57613	1	2.576133	1.186265	0.307803
1 by 2	9.15254	1	9.152533	4.214585	0.074168
Error	17.37307	8	2.171633		
Total SS	34.54227	11			

Var: Azúcares Reductores g/L; R-sqr = 0.49705; Adj: 0.30844; MS

Residual = 2.171633. DV: Azúcares Reductores g/L.

Coefficientes de Regresión:

Sostiene Montgomery (2004) que esta metodología para evaluar los coeficientes de regresión se basa en la generación de estimaciones de las medias de los mínimos cuadrados de los factores. La **Tabla 18** de los coeficientes de regresión para azúcares reductores residuales nos muestra el error estándar de la media, de los efectos principales y de la interacción, pero principalmente nos muestra los valores de coeficientes que se convertirán en la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos. La ecuación del modelo es la siguiente:

$$\text{Azúcares Reductores} = -63.7200 + 1.2427 * \text{T}^\circ \text{Pretratamiento} + 18.8333 * \text{pH} - 0.2911 * \text{T}^\circ \text{Pretratamiento} * \text{pH}$$

En donde los valores de las variables están especificados en sus unidades originales.

Tabla 18: Coeficientes de regresión para azúcares reductores.

Factor	Regressn Coeff.	Std.Err.	t(8)	p	-95.% Cnf. Limt.	+95.% Cnf. Limt.
Mean/Interc.	-63.72	45.22118	-1.40907	0.196476	-168	40.56022
(1)T° Pretratamiento	1.2427	0.63952	1.94311	0.087923	-0.232	2.71741
(2)pH	18.8333	10.02689	1.87828	0.097162	-4.289	41.95539
1 by 2	-0.2911	0.1418	-2.05295	0.074168	-0.618	0.03588

Var: Azúcares Reductores g/L; R-sqr = 0.49705; Adj: 0.30844; MS Residual = 2.171633.

DV: Azúcares Reductores g/L.

Superficie de Respuesta Ajustada:

Afirma Montgomery (2004) que obtener una gráfica del plano de los valores de “Y” generadas por las múltiples combinaciones de dos efectos principales, llámese X1 y X2, a esta gráfica tridimensional se le denomina “gráfica de superficie de respuesta”.

Con la finalidad de analizar los efectos principales y su interacción en los resultados evaluados en la variable de respuesta: azúcares reductores residuales, hemos implementado la metodología de superficie de respuesta, la cual se ha ilustrado en forma de gráficos en 3D, como lo hizo Michel (2017) quien probó sus variables en forma experimental y comprobó la eficacia de la optimización en el modelo.

En la **Figura 14.A** se presenta la gráfica de superficie de respuesta tridimensional del rendimiento de este modelo en la variable de respuesta “azúcares reductores residuales”, sin embargo, ya que los efectos principales y su interacción (temperatura de pretratamiento y pH) han resultado no significativas como lo pudimos notar en el diagrama de Pareto y el Análisis de varianza ANOVA, se puede afirmar que la gráfica no muestra relevancia estadística. Puesto que el modelo es de primer orden (es decir que contiene los efectos principales y la interacción, al margen de ser significativo o no), la superficie de respuesta ajustada no es un plano propiamente dicho (Myers et al., 2016). Al examinar la gráfica de contorno (**Figura 14.B**) se puede identificar que son líneas onduladas y se logra observar que los azúcares reductores residuales disminuyen cuando la temperatura de pretratamiento se incrementa y el pH aumenta. Frecuentemente se usa

una superficie ajustada como ésta para encontrar la dirección del mejoramiento potencial de un proceso (Myers et al., 2016).

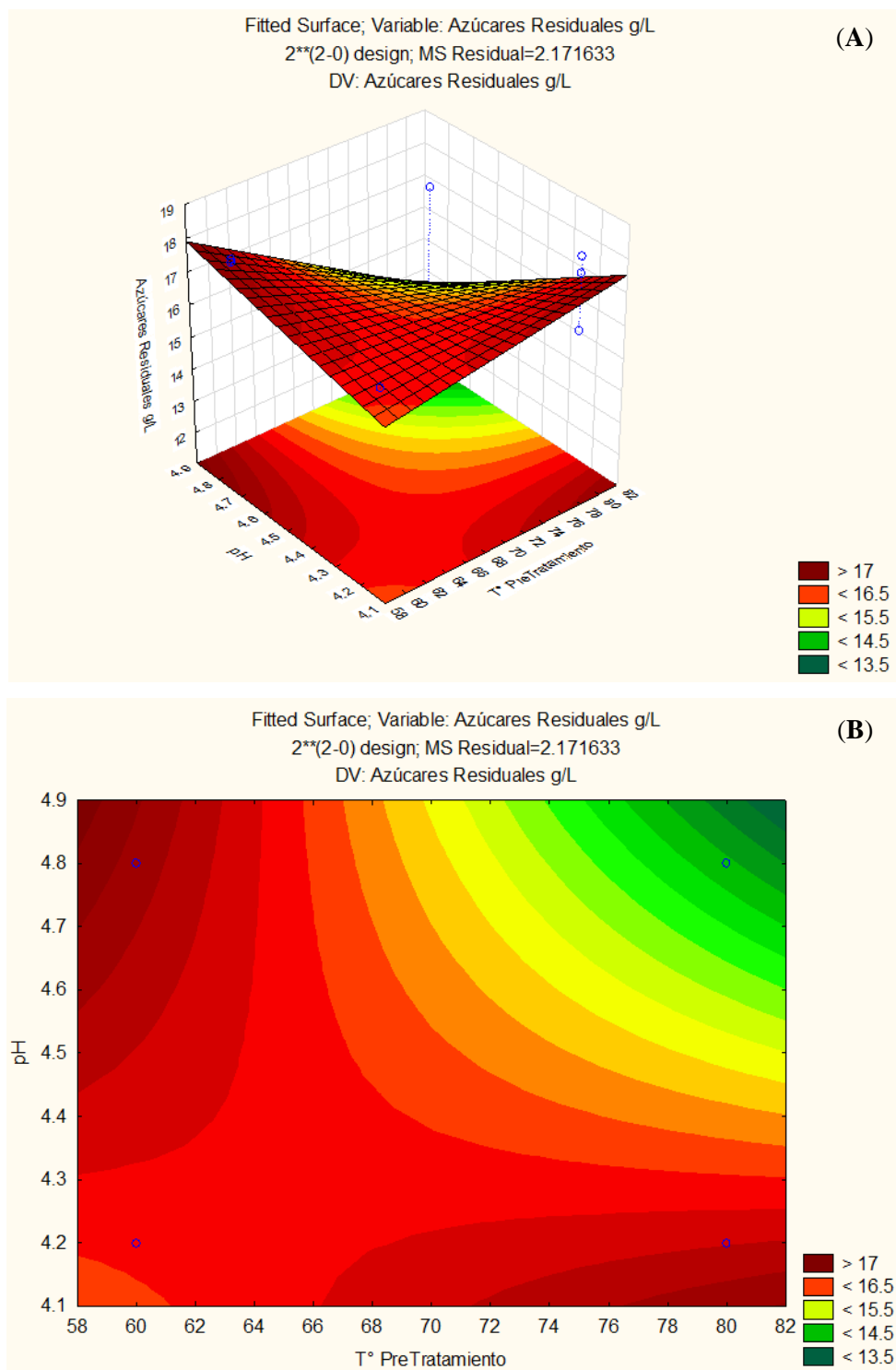


Figura 14: Gráfico de superficie ajustada para azúcares reductores residuales. **(A)** Gráfico de superficie de respuesta. **(B)** Gráfico de contorno.

Respecto del resto de gráficas para azúcares reductores residuales que arroja el análisis completo del software utilizado y que se encuentran en el **ANEXO 7**, podemos acotar que en la **gráfica de probabilidad (Figura 25)**, el valor normal esperado para las interacciones y para la temperatura de pretratamiento es negativo y para el pH es ligeramente positivo, lo que se traduce en un R^2 de 0.49 y un R^2 ajustado de 0.31. En la gráfica de **probabilidad normal (Figura 26)** se puede apreciar una ligera dispersión de los valores contrastados entre el valor normal esperado y los residuales resultantes del análisis del modelo matemático. En la gráfica de **valores observados vs predichos (Figura 27)** observamos una adecuación entre los valores observados y los predichos y logramos evidenciar una considerable dispersión de los valores respecto a los valores predichos por el modelo. Estando en congruencia con el valor de R^2 reportado anteriormente. Similar resultado obtuvo Michel (2017), quien logró considerables dispersiones en su análisis factorial entre sus valores observados y predichos al evaluar grados Brix. En la gráfica de **valores predichos vs residuales (Figura 28)** se aprecia que los valores mínimos de azúcares reductores residuales predichos por el modelo dista de varias unidades (respecto del valor cero del eje Y) con los valores residuales que surgen como producto del análisis contrastados con los valores observados o experimentales; sin embargo los valores máximos de azúcares reductores residuales tienen poca diferencia con los valores residuales que surgieron como producto del análisis contrastados con los valores observados o experimentales, es decir que a mayor distancia del valor cero mayor es el residual y por consiguiente los valores observados Vs los predichos son mas diferentes para un mismo punto. Aquí se logró observar que los valores residuales que son las diferencias entre el valor observado y el valor ajustado de la variable de respuesta: azúcares reductores residuales, dichos residuales que se encuentran en el eje “Y” a su vez son contrastados con los valores predichos que han sido ajustados al modelo, así lo afirma Montgomery (2004).

4.7.2. Porcentaje de Etanol

Se obtuvieron valores promedio de las todas las réplicas: T1=74.4 g/L T2=72.9 g/L, T3=74.1 g/L, T4=77.3 g/L y control=73.2 g/L, resultando el T4 el mejor tratamiento, ya que mostró valores máximos comparado con el resto de tratamientos incluso con el

control, es por eso que resultó significativo dado que los resultados arrojados por el análisis de varianza ANOVA así lo demostraron, como lo veremos más adelante.

Diagrama de Pareto:

Del diagrama de Pareto (**Figura 15**), se puede observar que para la variable de respuesta: porcentaje de etanol, de los efectos principales, llámese temperatura de pretratamiento y pH, solamente la interacción fue significativa, dado que la línea roja que representa el valor crítico, corta los factores ya mencionados. Nótese que es la interacción de los efectos principales la que tiene significancia estadística, acorde a sus valores del ANOVA como se muestra en la **Tabla 20**.

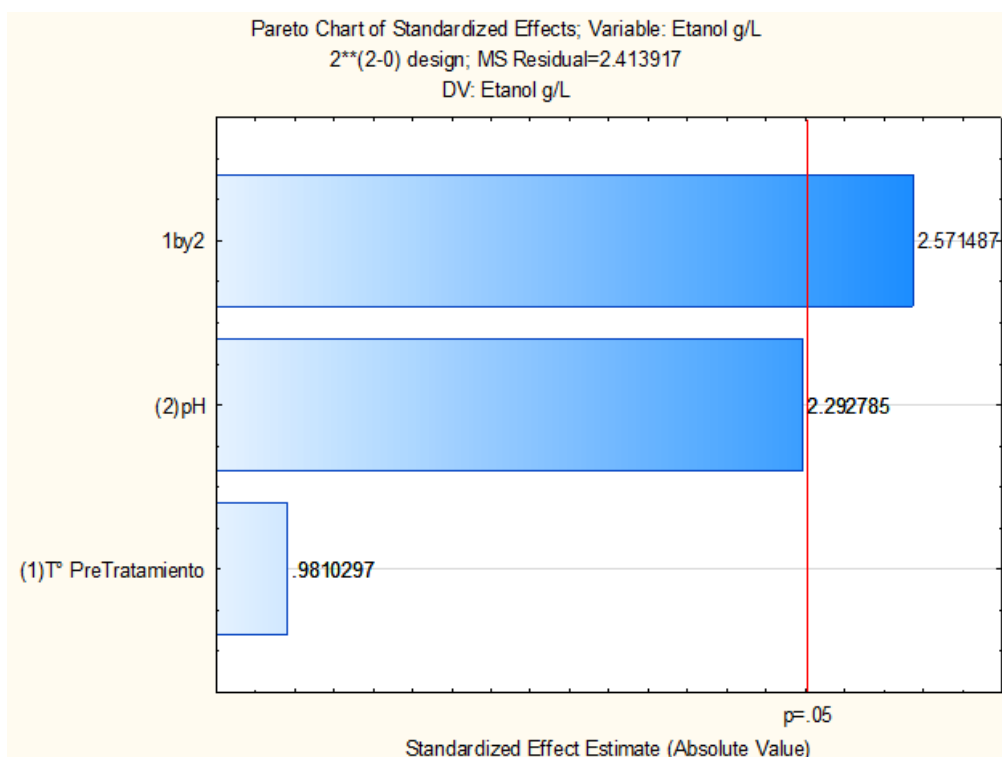


Figura 15: Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para etanol.

Efectos Estimados:

En la **Tabla 19** se puede observar estimaciones de los efectos principales y de la interacción cuando se evaluó la variable: porcentaje de etanol, también muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. También se encontró información de la media del valor observado del factor principal evaluado, así

como su error estándar y finalmente los intervalos de confianza al 95% para la respuesta media.

Tabla 19: Efectos estimados para etanol.

Factor	Effect	Std.Err.	t(8)	p	-95.% Cnf. Limt.	+95.% Cnf. Limt.	Coeff.	Std. Err. Coeff.	-95.% Cnf. Limt.	+95.% Cnf. Limt.
Mean/Interc.	74.685	0.448508	166.5186	0.000000	73.65074	75.71926	74.685	0.448508	73.65074	75.71926
(1)T° Pretratamiento	0.88	0.897017	0.981	0.355311	-1.18852	2.94852	0.44	0.448508	-0.59426	1.47426
(2)pH	2.05667	0.897017	2.2928	0.051042	-0.01186	4.12519	1.02833	0.448508	-0.00593	2.0626
1 by 2	2.30667	0.897017	2.5715	0.033051	0.23814	4.37519	1.15333	0.448508	0.11907	2.1876

Var: Etanol g/L; R-sqr = 0.61597; Adj: 0.47196; MS Residual = 2.413917. DV: Etanol g/L.

Análisis de Varianza (ANOVA):

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de porcentaje de etanol en piezas separadas para cada uno de los efectos, entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso 1 efecto tiene un valor-p menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

El ANOVA para el modelo lineal de primer orden de la respuesta: porcentaje de etanol (**Tabla 20**) indicó que el efecto lineal de la interacción de los efectos principales, es decir temperatura de pretratamiento y pH, son significativos ($p < 0.05$), el valor-p es menor para un nivel de significancia de 5%, mas no la temperatura de pretratamiento ni el pH. En este caso, 1 efecto tiene un valor $p < 0.05$, indicando que es significativamente diferente de cero con un nivel de confianza del 95.0%, por lo tanto, si hay indicación de autocorrelación serial en los residuos (Suárez-Morales et al., 2021). El R^2 ajustado para este modelo fue de 0.47196 aproximadamente el 47.20% de la variable de respuesta, explicándose así una mínima significancia al mostrarse muy disminuido (Rebollar-Rebollar et al., 2018). Además, dado que el R^2 y el R^2 ajustado son cifras que difieren considerablemente, se infiere que el modelo de regresión tiene términos no significativos (Myers et al., 2016), lo cual se evidencia por el valor- $p > 0.05$ de los términos lineales también llamados efectos principales.

Tabla 20: ANOVA para etanol.

Factor	SS	df	MS	F	p
(1)T° Pretratamiento	2.3232	1	2.3232	0.962419	0.355311
(2)pH	12.68963	1	12.68963	5.256865	0.051042
1 by 2	15.96213	1	15.96213	6.612545	0.033051
Error	19.31133	8	2.41392		
Total SS	50.2863	11			

Var: Etanol g/L; R-sqr = 0.61597; Adj: 0.47196; MS Residual = 2.413917. DV: Etanol g/L.

Coefficientes de Regresión:

Sostiene Montgomery (2004) que esta metodología para evaluar los coeficientes de regresión se basa en la generación estimaciones de las medias de los mínimos cuadrados de los factores. La **Tabla 21** de los coeficientes de regresión para porcentaje de etanol nos muestra el error estándar de la media, de los efectos principales y de la interacción, pero principalmente nos muestra los valores de coeficientes que se convertirán en la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos. La ecuación del modelo es la siguiente:

$$\text{Porcentaje de Etanol} = 177.2800 - 1.6860 \cdot \text{T}^\circ\text{Pretratamiento} - 23.4833 \cdot \text{pH} + 0.3844 \cdot \text{T}^\circ\text{Pretratamiento} \cdot \text{pH}$$

En donde los valores de las variables están especificados en sus unidades originales.

Tabla 21: Coeficientes de regresión para etanol.

Factor	Regressn Coeff.	Std.Err.	t(8)	p	-95.% Cnf. Limt.	+95.% Cnf. Limt.
Mean/Interc.	177.28	47.67709	3.71835	0.005885	67.3364	287.2236
(1)T° Pretratamiento	-1.686	0.67426	-2.50053	0.036911	-3.2408	-0.1312
(2)pH	-23.4833	10.57144	-2.22139	0.057058	-47.8611	0.8945
1 by 2	0.3844	0.1495	2.57149	0.033051	0.0397	0.7292

Var: Etanol g/L; R-sqr = 0.61597; Adj: 0.47196; MS Residual = 2.413917. DV: Etanol g/L.

Superficie de Respuesta Ajustada:

Afirma Montgomery (2004) que obtener una gráfica del plano de los valores de “Y” generadas por las múltiples combinaciones de dos efectos principales, llámese X1 y X2, a esta gráfica tridimensional se le denomina “gráfica de superficie de respuesta”

Con la finalidad de analizar los efectos principales y su interacción en los resultados de la evaluación de la variable de respuesta: porcentaje de etanol, se implementó la metodología de superficie de respuesta, en la cual se ha ilustrado en forma de gráficos en 3D, como lo hizo Michel (2017) quien probó sus variables en forma experimental y comprobó la eficacia de la optimización en el modelo.

En la **Figura 16.A** se presenta la gráfica de superficie de respuesta tridimensional del rendimiento de este modelo en la variable de respuesta “porcentaje de etanol”, sin embargo, ya que solo la interacción (temperatura de pretratamiento y pH) han resultado significativas como lo pudimos evidenciar en el diagrama de Pareto y el Análisis de varianza ANOVA, se puede afirmar que la gráfica muestra relevancia estadística. Puesto que el modelo es de primer orden (es decir que contiene los efectos principales y la interacción, al margen de ser significativo o no), la superficie de respuesta ajustada no es un plano propiamente dicho, así lo sostiene Montgomery (2004) quien observó que el efecto significativo de la interacción provoca el “torcimiento del plano, este torcimiento de la superficie de respuesta produce líneas de contorno curvas para las repuestas constantes en el plano X1,X2, por lo tanto una interacción es una forma de curvatura en el modelo de superficie de respuesta fundamental del experimento; demostrándose así que el análisis de superficie de respuesta nos ratifica como mejor tratamiento al tratamiento T4.

Al examinar la gráfica de contorno (**Figura 16.B**) se puede observar que son líneas onduladas o curvas y se logra observar que el porcentaje de etanol aumenta cuando la temperatura de pretratamiento aumenta y el pH también aumenta. Frecuentemente se usa una superficie ajustada como ésta para encontrar la dirección del mejoramiento potencial de un proceso (Myers et al., 2016).

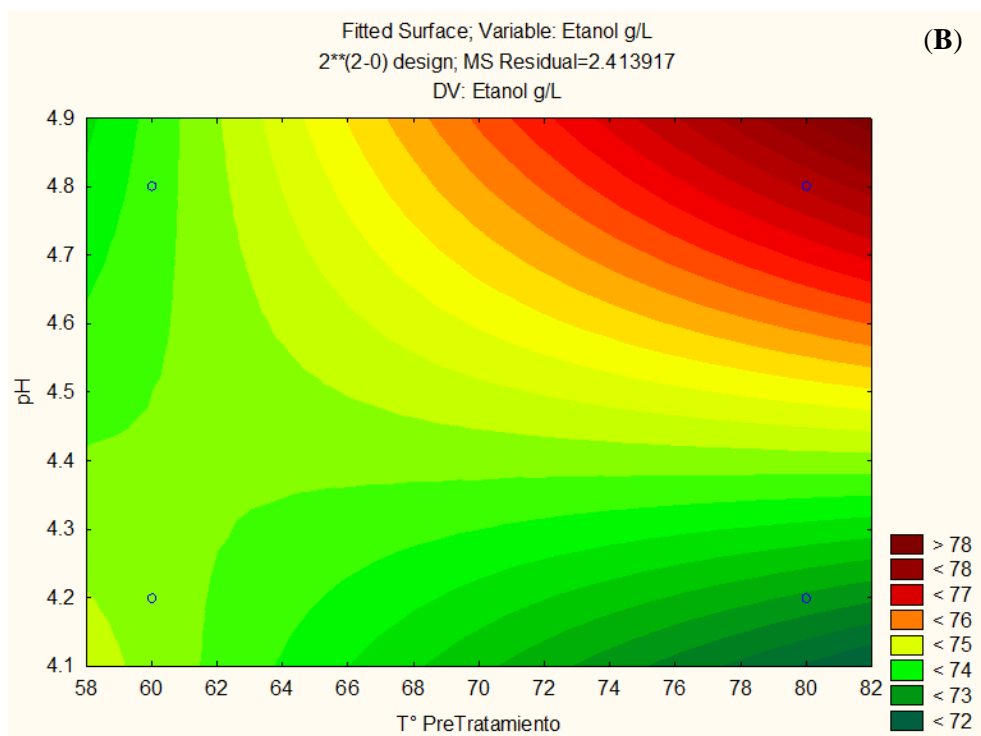
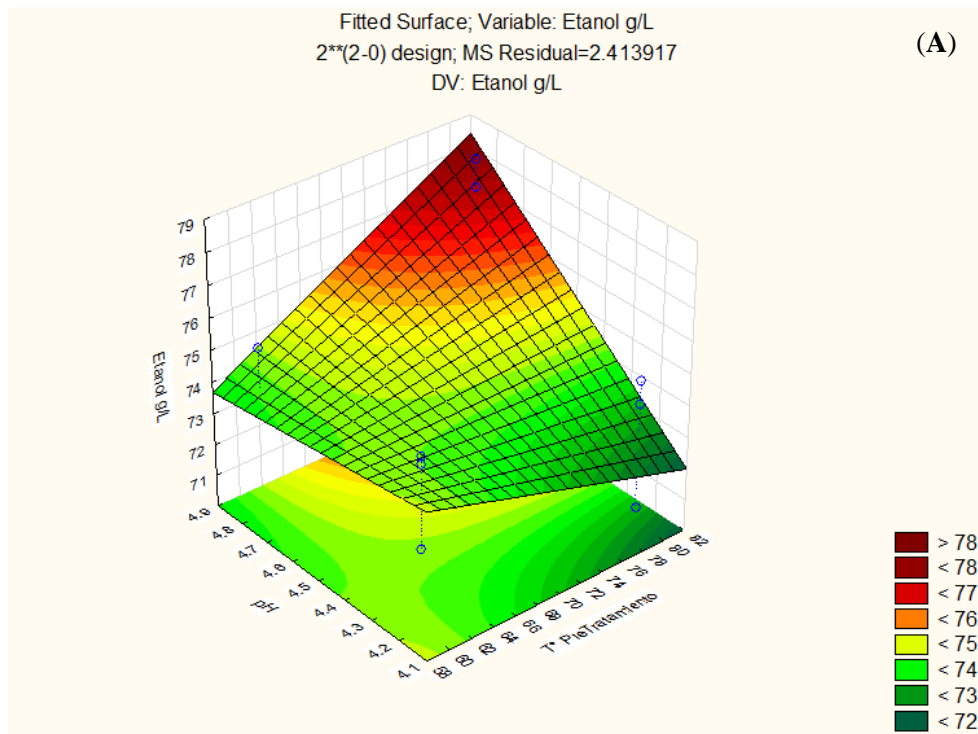


Figura 16: Gráfico de superficie ajustada para etanol. (A) Gráfico de superficie de respuesta. (B) Gráfico de contorno.

Respecto del resto de gráficas para etanol que arroja el análisis completo del software utilizado y que se encuentran en el **ANEXO 8**, podemos acotar que en la **gráfica de probabilidad (Figura 29)**, el valor normal esperado para el pH y las interacciones es positivo y para la temperatura de pretratamiento es ligeramente negativo, lo que se traduce en un R^2 de 0.62 y un R^2 ajustado de 0.52. En la gráfica de **probabilidad normal (Figura 30)** se puede apreciar una mínima dispersión de los valores contrastados entre el valor normal esperado y los residuales resultantes del análisis del modelo matemático. En la gráfica de **valores observados vs predichos (Figura 31)** observamos una adecuación entre los valores observados y los predichos y logramos evidenciar una ligera dispersión de los valores respecto a los valores predichos por el modelo. Estando en congruencia con el valor de R^2 reportado anteriormente. Similar resultado obtuvo Michel (2017), quien logró considerables dispersiones en su análisis factorial entre sus valores observados y predichos. En la gráfica de **valores predichos vs residuales (Figura 32)** se aprecia que la mayoría de los valores de etanol predichos por el modelo dista de pocas unidades (respecto del valor cero del eje Y) con los valores residuales que surgen como producto del análisis contrastados con los valores observados o experimentales; pero también se evidencia que a mayor distancia del valor cero, mayor es el residual y por consiguiente los valores observados Vs los predichos son mas diferentes para un mismo punto. Aquí se logró observar que los valores residuales que son las diferencias entre el valor observado y el valor ajustado de la variable de respuesta: porcentaje de etanol, dichos residuales que se encuentran en el eje “Y” a su vez son contrastados con los valores predichos que han sido ajustados al modelo, así lo afirma Montgomery (2004).

Afirman Colque et al. (2023) que mediante los parámetros cinéticos y los modelos matemáticos de estimación es posible predecir y determinar las óptimas condiciones para el desarrollo de los microorganismos y sacar provecho de todas sus variadas aplicaciones, es por eso que en nuestro trabajo de investigación se ha evaluado nuestros resultados de las variables de respuesta con el software Statistica versión 10, obteniendo resultados de diagrama de Pareto, efectos estimados, ANOVA, coeficientes de regresión, residuales, predichos, observados y superficie de respuesta.

4.8. Determinación de Parámetros Cinéticos: $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, Q_p y μ_{Max} .

Una eficiente herramienta para analizar la cinética de los bioprocesos, para el diseño de biorreactores y en general para diseñar y evaluar los bioprocesos está constituido por el modelamiento de la conducta de microorganismos en un sistema de biorreacción. La capacidad de predecir eventos, que se basan en la utilización de modelos matemáticos, se ha convirtiendo velozmente en un relevante componente de la metodología científica la cual permite observar el desenvolvimiento de un fenómeno bajo variados enfoques y modalidades de experimentación (Pérez 2016).

4.8.1. Determinación $Y_{x/s}$: Coeficiente de rendimiento global de formación celular de biomasa por consumo de sustrato.

4.8.2. Determinación $Y_{p/s}$: Coeficiente de rendimiento global de formación de producto por consumo de sustrato.

4.8.3. Determinación Q_p : Productividad volumétrica de etanol, que mide la cantidad de etanol formado en la unidad de volumen de cultivo en función del tiempo.

4.8.4. μ_{Max} (μ_{Max}): Tasa específica de crecimiento máximo celular.

Tabla 22: Determinación de $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, Q_p y μ_{Max} . promedio de 3 réplicas.

TRATAMIENTOS	$Y_{x/s}$ (g biomasa/ g azúcar)	$Y_{p/s}$ (g etanol/ g azúcar)	Q_p (g etanol/L.h)	μ_{Max} (h^{-1})
T1 (4.2pH - 60°C)	0.086 ± 0.034	0.523 ± 0.014	1.550 ± 0.033	0.0722 ± 0.0046
T2 (4.2pH - 80°C)	0.091 ± 0.033	0.510 ± 0.022	1.520 ± 0.045	0.0754 ± 0.0117
T3 (4.8pH - 60°C)	0.116 ± 0.011	0.525 ± 0.015	1.544 ± 0.022	0.0834 ± 0.0045
T4 (4.8pH - 80°C)	0.089 ± 0.064	0.531 ± 0.011	1.611 ± 0.024	0.0869 ± 0.0042
Control	0.138	0.501	1.526	0.0697

$$\frac{1 \text{ mol } C_6H_{12}O_6}{180 \text{ g}} * \frac{2 \text{ mol } CH_3CH_2OH}{1 \text{ mol } C_6H_{12}O_6} * \frac{46.02 \text{ g}}{1 \text{ mol } CH_3CH_2OH} = 0.511 \frac{\text{g Etanol}}{\text{g Glucosa}}$$

Figura 17: Ecuación de Rendimiento teórico de etanol en la fermentación

Los resultados obtenidos después de realizar los ensayos con sus 2 réplicas para los cuatro tratamientos incluido el control se muestra en la **Tabla 22** (valores promedio por cada número de ensayo I, II y II). Como se puede observar, respecto a la formación celular por consumo de sustrato, el T3 resultó con mejor rendimiento en 0.116 g/g a comparación del T1, T2 Y T4, sin embargo, esto indicaría que en el T3 se consumió en gran parte el sustrato para beneficio de la reproducción de células de levadura, más no para la producción de etanol, porque los resultados de rendimiento de producto por consumo de sustrato y la productividad no fueron valores significativos para este tratamiento. Los resultados indican que el T4, es el mejor tratamiento que beneficiaría el proceso de fermentación cuyo rendimiento en formación del producto por consumo de sustrato es 0.531 g/g, ligeramente mayor que el rendimiento teórico (**Figura 17**) según la ecuación que propone Michel (2017), y productividad de 1.611 g/L.h. El tratamiento que resultó menos beneficiado en comparación de los demás es el T2, con Y p/s de 0.510 g/g y productividad de 1.520 g/L.h. Sin embargo, el tratamiento Control obtuvo valor de Y p/s de 0.501 g/g, ligeramente más bajo que el valor de rendimiento teórico.

Ortiz-Muñiz et al. (2010) evaluaron la cinética de la fermentación con la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01, en un sistema por lotes a diferentes concentraciones de glucosa, pH y temperatura del sistema para determinar las condiciones óptimas de la fermentación, indicando que los parámetros óptimos para la producción de etanol es de 3.5 pH, 30 °C y concentración inicial de glucosa 150 g L⁻¹; obteniéndose una productividad de etanol de 1.8 g L⁻¹ h⁻¹ y un rendimiento de etanol de 0.41 g g⁻¹.

También, en contraste con estudios semejantes, el μ_{Max} de 0.0869 ± 0.0042 h⁻¹ obtenido con el T4 fue mayor que los reportados por Peña-Serna et al. (2012) con 0.044 h⁻¹, Agu y Oduola (2021) con 0.0422 h⁻¹. Caso contrario se observó en comparación con las investigaciones de Shafagat et al. (2010) con 0.74 h⁻¹, Arshad et al. (2017) con 0.38 h⁻¹, Varilla (2018) con 0.319 h⁻¹ y García y Contreras (2019) con 0.165 h⁻¹.

A su vez, el rendimiento Yp/s de 0.531 ± 0.011 g/g del T4 resultó superior que los reportados por Ortiz-Muñiz (2010) con 0.408 g/g, Varilla (2018) con 0.459 g/g y Kruasuwan et al. (2023) con 0.51 g/g, pero inferior que el obtenido por Peña-Serna (2012) con 0.75 g/g.

Asimismo, el Qp resultado de aplicar el T4 fue de 1.611 ± 0.024 g/L.h, el cual se identificó como ligeramente inferior que los obtenidos por Ortíz-Muñiz (2010) con 1.84 g/L.h, Rasmeý et al. (2018) con 1.78 g/L.h, Varilla (2018) con 1.861 g/L.h y Wang (2024) con 1.86 g/L.h, sin embargo, representó más de la mitad que el reportado por Peña-Serna (2012) con 3.42 g/L.h.

Por último, respecto al Yx/s, se identificó que el mejor valor se obtuvo con el T3, con 0.116 ± 0.011 g/g, mientras que el control presentó un valor mayor, con 0.138 g/g. Estos resultados fueron superiores que los obtenidos por Peña-Serna (2012) con 0.022 g/g y Varilla (2018) con 0.084 g/g, pero menor al determinado por Agu y Oduola (2021) con 0.183 g/g. Sin embargo, este valor no reflejó ser un parámetro relacionado a la producción de etanol por *S. cerevisiae*, dado que los mejores resultados de Yp/s y Qp se obtuvieron con el T4, a pesar de tener un Yx/s menor que el T3, con 0.089 ± 0.064 g/g.

4.9. Evaluación económica del costo-beneficio al implementar el pretratamiento con los costos de instalación inherentes, alternativo al uso de antibióticos.

Se realizó la evaluación económica considerando un año de producción (ver **ANEXO 9**), donde se propone el uso de consumo del vapor de escape y el aprovechamiento de la vinaza para la transferencia de calor, ambos permitirán llevar a cabo el proceso de pretratamiento del mosto a alta temperatura, también es necesario intercambiadores de calor para realizar la transferencia de calor de líquido frío a caliente y viceversa, bombas de mosto, interconexión de líneas y materiales o equipos de instrumentación. Obras civiles entre otros servicios también son necesarios para la ejecución del proyecto.

Para un tratamiento convencional sin pretratamiento y haciendo uso de antibióticos en el cual se obtiene un 7.4% v/v en el mosto, según valores del mercado se tiene un precio de venta del alcohol etílico rectificado de S/2.54 por litro de alcohol y el alcohol etílico neutro en S/3.25 por litro de alcohol sin %IGV, el costo de producción promedio en S/ 2.79 y S/ 2.82 para ambos tipos de alcohol respectivamente.

Para el proyecto de pretratamiento del mosto según nuestros resultados experimentales a nivel laboratorio se obtiene un valor de 7.7% v/v, con esta concentración de alcohol en el mosto se tendría los siguientes costos de producción para el alcohol etílico rectificado S/ 2.53

y alcohol etílico neutro S/ 2.60, se considerará el mismo precio de venta para ambos tratamientos.

Como resultado final se calculó el VAN (Valor actual neto) y el TIR (Tasa interna de retorno), se considera un coste de oportunidad del 14% para el cálculo. Se obtuvo VAN (\$188,087) y TIR (35%), siendo este último mayor que el coste de oportunidad, concluyéndose que el proyecto es rentable para ejecutar, con un periodo de retorno de la inversión en 2.7 años (ver **ANEXO 10**).

4.9.1. Análisis de varianza ANOVA de los Rendimientos Y_x/s , Y_p/s ; Q_p y μ_{Max} (como factores) de los 4 tratamientos, sus réplicas y el control.

Se implementó un análisis de varianza ANOVA (haciendo uso del programa SPSS V23) en forma independiente a cada uno de los factores: Y_x/s , Y_p/s , Q_p y μ_{Max} de todos los tratamientos y sus respectivas réplicas más el control, de los cuales extrajimos el valor p o significancia al 5% con un nivel de confianza del 95%. Podemos evidenciar que tanto el rendimiento de biomasa en función del sustrato Y_x/s y el rendimiento del producto en función del sustrato Y_p/s no son estadísticamente significativos ya que muestra valores por encima del valor p al 5% ($p > 0.05$), sin embargo en lo que concierne a la productividad volumétrica Q_p y la tasa específica de crecimiento máximo celular μ_{Max} observamos que son estadísticamente significativos, el valor p es menor ($p < 0.05$) para un nivel de significancia del 5% con un nivel de confianza del 95%, como se muestra en la **Tabla 23**. En el **ANEXO 11** se muestra el ANOVA con mayor detalle.

Se esperaba que los pretratamientos, las réplicas y el control evaluados en los cuatro factores ya mencionados, uno de ellos resulte estadísticamente significativo respecto del control en lo que concierne estrictamente a la producción de etanol, pero los datos no lo permiten, por lo tanto evidenciamos que no hay diferencias significativas; no obstante con el análisis económico “costo-beneficio” se demostró que este pequeño margen de diferencia a favor del mejor tratamiento “T4” con respecto al “control” que representa a una fermentación convencional, si resulta redituable a mayor escala en términos financieros a mediano plazo, considerando aún los costes inherentes que este nuevo sistema demanda.

Tabla 23: ANOVA de Y_x/s , Y_p/s , Q_p y μ_{Max} , tabla resumen de los 4 tratamientos, sus respectivas réplicas y el control.

Factor	SS	df	MS	F	p
Rendimiento Y_x/s g/L	0.006	4	0.002	1.179	0.377
Rendimiento Y_p/s g/L	0.002	4	0.000	2.139	0.150
Prod.Vol. QP g/Lh	0.016	4	0.004	4.577	0.023
Miu Max μ_{Max} h ⁻¹	0.001	4	0.000	4.135	0.031
Total SS	0.025	16			

Análisis de Varianza: nivel de significancia al 5% con un nivel de confianza de 95%

V. CONCLUSIONES

- De todos los tratamientos propuestos y evaluados en esta investigación, el pretratamiento que nos dio valores de mayor rendimiento en formación del producto por consumo de sustrato y productividad es el Tratamiento 4 (T4: pH 4.8 / 80°C), considerándose el mejor tratamiento en porcentaje de etanol.
- Se comprobó que en fermentaciones con pre tratamiento obtenemos mejores resultados en comparación a una fermentación convencional considerada “control” en nuestra investigación tal cual se implementa en el ingenio azucarero de la región Ancash.
- Se determinó que al evaluar los 4 tratamientos más el control, fue el tratamiento 3 (T3) el que presentó el mayor valor de rendimiento de biomasa en función del consumo de sustrato (Y_x/s); sin embargo, el tratamiento 4 (T4) se destacó por presentar los valores más elevados de rendimiento de formación de producto por consumo de sustrato (Y_p/s), productividad volumétrica de etanol (Q_p) y tasa específica máxima de crecimiento celular (μ_{Max}).
- Los resultados del diseño factorial determinaron que la variable de respuesta “azúcares reductores residuales” no fue influenciada de forma estadísticamente significativa por el pretratamiento de pH y temperatura. Sin embargo, determinaron que la variable de respuesta “porcentaje de etanol” fue influenciada

de manera estadísticamente significativa por la interacción entre la temperatura de pre tratamiento y el pH.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda trabajar con todas las medidas de esterilización de materiales y desinfección del área de trabajo.
- Se recomienda implementar un sistema de filtrado eficiente del mosto fermentado en base a melaza a la hora de determinar el porcentaje de etanol por cromatografía de gases.
- Se recomienda implementar un nuevo sistema de fermentación usando de manera experimental la ecuación o modelo matemático arrojado por los coeficientes de regresión con los valores de las variables del mejor tratamiento (T4) y así optimizar los resultados tanto en laboratorio como desde el enfoque económico “costo-beneficio” con resultados redituables.
- Se recomienda examinar otros niveles de temperatura de pretratamiento, manteniendo fijo el nivel de pH que fue casi significativo, para evaluar mejor la interacción que en nuestro experimento fue significativa.
- Se recomienda elegir la mejor cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, acorde a los resultados obtenidos en esta investigación para optimizar la disminución de los azúcares reductores residuales y aumentar el rendimiento y productividad del etanol.
- Se recomienda implementar diseño compuesto rotable con puntos centrales para optimizar los resultados estadísticos.
- Se recomienda evaluar la influencia de otros microorganismos que compiten con *Saccharomyces cerevisiae* por los mismos azúcares.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta C. (2012). Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel. (Tesis de pregrado) Universidad Nacional de Colombia, p 111.
- Acosta-Piantini, E., Rodríguez-Díez, E., Chavarri, M., López-De-Armentia, I., Villaran, M. C. y Lombraña, J. I. (2023). Preparation of Hydrolyzed Sugarcane Molasses as a Low-Cost Medium for the Mass Production of Probiotic *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19. *Separations*, 10(1), 33. <https://doi.org/10.3390/separations10010033>
- Agu, N. K. C. y Oduola, N. M. K. (2021). Kinetic modeling of ethanol production by batch fermentation of sugarcane juice using immobilized yeast. *Global Journal Of Engineering And Technology Advances*, 7(1), 124-136. <https://doi.org/10.30574/gjeta.2021.7.1.0060>
- Aguilar J, Espinoza M, Cabanillas J, Ávila I, García A, Julca J, Tacanga D, Zuta I, Linares G. (2015). Evaluación de la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo. *J. Agroindustrias Sci* 5 (1) 9.
- Aguilar, C. (2014). Efecto de tres mostos en la producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* “killer” K+R+ (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional del Santa, Ancash – Perú, p. 15.
- Alcarde A, Horii J, Walder J. (2003). Influence of gamma radiation on microbiological parameters of the ethanolic fermentation of sugar-cane must. *Radiation Physics and Chemistry*, 66: 411- 413.
- Amorim, H, Oliveira A. (1982). Infecção na fermentação: como evitá-la. *Álcool e Açúcar*, 2(5): 12-18
- Arellano J, Chávez M, Lescano L, Otiniano M, Robles H, Sánchez L. (2012). Efecto del complejo enzimático producido por *aspergillus oryzae* sobre producción de etanol por *67icrocentrífu cerevisiae*. *Sciéndo* 15(2): 3-4.

- Arango R. y Peña C. (2009). Evaluación de la Producción de Etanol Utilizando Cepas Recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* a Partir de Melaza de Caña de Azúcar. *Dyna*, Año 76, Nro. 159, pp. 153-161.
- Argote F, Cuervo R, Osorio E, Delgado J, Villada H. (2015). Evaluación de la Producción de Etanol a Partir de Melaza con Cepas Nativas *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*.13(2): 43-47.
- Arshad, M., Hussain, T., Iqbal, M. y Abbas, M. (2017). Enhanced ethanol production at commercial scale from molasses using high gravity technology by mutant *S. cerevisiae*. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 48(3), 403-409. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.003>
- Atiyeh H y Duvnjak Z (2003). Production of Fructose and Ethanol from Cane Molasses Using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36858. *Acta Biotechnol.* 23 (2003) 1, 37–48
- Bach B, Colas S, Massini L, Barnavon L, Vuchot P.2011.Effect of nitrogen addition during alcoholic fermentation on the final content of biogenic amines in wine. *Ann Microbiol.* 61,185–190
- Balat M, Balat H, Oz C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(5): 551-573
- Balat M, Balat H. (2009). Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. *Applied Energy*, 86(11): 2273-2282.
- Barrera I, González R, Salgado E, Aranda J. (2011). A simple metabolic flux balance analysis of biomass and bioethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* Fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16 (1): 13-22.
- Blasco, Iñaki. 2001. Los ácidos del vino. Reporte técnico. II Simposio Vinicultura Abril 17. Chile. 13 pp.
- Buratti S, Benedetti S. 2016. Alcoholic Fermentation Using Electronic Nose and Electronic Tongue, In *Electronic Noses and Tongues in Food Science*. Academic Press, (pp. 291-299).

- Cámara C, Del Vecchio G, Guimaraes C, Madaleno L. (2024). Ethanolic destillation: a case study of etanol loss upon degassing. *Ciencia y Tecnología: FATEC-JB*. 16(1),2178-9436.
- Calderón, N. (2007). Evaluación del uso de antibióticos como mecanismo para el control de contaminantes bacterianos en la fermentación para la producción de alcohol etílico (Tesis de Pregrado) Pontifica Universidad Javeriana. Bogotá D.C – Colombia, p. 40, 102, 103,107, 109, 110, 111, 119.
- Calzada V. (2013). Búsqueda de nuevos sustratos de la industria azucarera para fermentación alcohólica (Master en calidad, desarrollo e innovación de alimentos) Universidad de Valladolid, Valladolid – España, p. 12.
- Castro M. (1993). Estudio de la melaza de caña como sustrato de la fermentación acetobutílica. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Colombia, 3-35
- Cazetta M, Celligoi M, Buzato J, Scarmino I. (2007). Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource Technology*. (98) 2827.
- Cherubin R. (2023). Efeito da viabilidade da levadura e da contaminacao bacteriana na fermentacao alcoólica. (Tesis Doctoral). Universidade de Sao Pulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, Brasil,p.33.
- Colque E, Chambi A y Pampa-Quispe N. (2023). Caracterización y modelado del crecimiento microbiano en el desarrollo de una bebida probiótica no láctea de extracto vegetal de tarwi (*Lupinus mutabilis* S.). *Journal of High Andean Research* 25(1), 47
- Darvishi F & Abolhasan (2019). Optimization of an industrial médium from molasses for bioetanol production using the taguchi statistical experimental-desing method.
- De La Vara I, Espinoza E, Lugo-Sepulveda R, Valencia D, Ortega J. (2014). Evaluación de tres cepas de levadura comercial en la producción de Etanol a partir de Melaza. *Invurnus*, 9(2): 31-36.

- De La Vara I. (2014). Evaluación de tres cepas de levadura en la producción de Etanol a partir de Melaza (Tesis de Pregrado) Universidad de Sonora, Sonora – México, p. 36.
- Dodić, J. M., Vučurović, D. G., Dodić, S. N., Grahovac, J. A., Popov, S. D. y Nedeljković, N. M. (2012). Kinetic modelling of batch ethanol production from sugar beet raw juice. *Applied Energy*, 99, 192-197. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.05.016>
- Eggeman, T., y Elander, R. T. (2005). Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 96(18), 2019 – 2025.
- Fadel M, Abdel A, El-Heeny M, Abdel N. (2018). Managing of bacterial contamination in alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Asian Journal of science and Tecnology*, 09(01), 7383-7391.
- Fajardo E. y Sarmiento S. (2007). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. (Tesis Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá – Colombia, p. 74, 82, 101.
- Ferreira, S.F.; Caliari, M.; Soares Júnior, M.S. y Beleia, A. del P. (2013) – Produção de açúcares redutores por hidrólise ácida e enzimática de farinha de arroz. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, vol. 4, n. 15, p.383-390
- Gallo, C.R. Determinação da microbiota bacteriana de mostos e de dornas de fermentação alcoólica. 1989
- García, C. y Contreras, J. D. (2019). *Evaluación de los parámetros cinéticos de Saccharomyces cerevisiae en medio de cultivo a base de melaza con y sin aireación* [Tesis de pregrado, Institucional del Tecnológico Nacional de México]. Repositorio Institucional del Tecnológico Nacional de México (RI - TecNM). <https://rinacional.tecnm.mx/jspui/handle/TecNM/5350>
- Garzón S, Hernández C. (2009). Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 Y *Cándida utilis* ATCC 9950. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia.

- Gil R, Hermenegildo R, Lujan G. (2021). Biocombustibles mediante residuos agroindustriales: por un mejor cuidado del medio ambiente del planeta *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, Ciudad de México, México. ISN 2707-2207 / ISSN 5(6): 2707-2215 (en línea), https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v5i6.1410 p14443
- Gnecco J. (2005). El precio de la melaza continua creciendo. *Revista Tecnicaña*, 9(17): 31-32.
- Gobert A, Tourdot-Maréchal R, Sparrow C, Morge C, Hervé A. Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation. *Food Microbiology*, 2019, 83, pp.71 – 85
- González Y, Meza J, Hernández J y Sanjuán R. (2015). Obtención de azúcares fermentables desde residuos de cartón para cultivar levaduras de interés biotecnológico. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. Vol.6 (28): 88-105.
- González L, Sossa D y Vanegas M. (2009). Aislamiento e identificación de *Lactobacillus* contaminantes en una planta colombiana de fermentación alcohólica. *Rev. UDCA*, 12 (2): 163-172.
- Guzmán H, Hurtado M, Parrado D, Ramos I. (2011). Aislamiento e Identificación de Bacterias Ácido Acéticas en Materia Prima y Tren de Fermentación en el Ingenio Providencia S.A., *Revista Tecnicaña*, 4(27).
- Hawaz, E., Tafesse, M., Tesfaye, A., Kiros, S., Beyene, D., Kebede, G., Boekhout, T., Groenwald, M., Theelen, B., Degefe, A., Degu, S., Admasu, A., Hunde, B. y Muleta, D. (2024). Bioethanol production from sugarcane molasses by co-fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* isolate TA2 and *Wickerhamomyces anomalus* isolate HCJ2F-19. *Annals Of Microbiology*, 74(1). <https://doi.org/10.1186/s13213-024-01757-8>
- ICUMSA (2011) – Method book. International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis. Berlin, Bartens, 128p

- Jacques K, Kelsall D, Lyons T. (2003). *The Alcohol: A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries*. Textbook 4th Edition. Bath, England. Nottingham University Press. P. 1-396
- Jacques K, Lyons T, Kelsall D. (1999). *The Alcohol Textbook*. 3rd Edition. Nottingham University press. 386pp.
- Jayanti, A. N., Sutrisno, A., Wardani, A. K. y Murdiyatmo, U. (2019). Bioethanol production from sugarcane molasses by instant dry yeast (effect of pretreatment and fermentation temperature). *IOP Conference Series Earth And Environmental Science*, 230, 012102. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/230/1/012102>
- Jeong-Sun Seo, Hyonyong Chong, Hyun Seok Park, Kyoung-Oh Yoon, Cholhee Jung, Jae Joon Kim, Jin Han Hong, Hyungtae Kim, Jeong-Hyun Kim, Joon-Il Kil, Cheol Ju Park, Hyun-Myung Oh, Jung-Soon Lee, Su-Jung Jin, Hye-Won Um, Hee-Jong Lee, Soo-Jin Oh, Jae Young Kim, Hyung Lyun Kang, Se Yong Lee, Kye Joon Lee Hyen Sam Kang. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nat. Biotechnol.* 23, 63-68 (2005).
- Kaur, S. y Kocher, G. S. (2021). Effect of nutrient supplements on molasses fermentation by salt preconditioned cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural Research Journal*, 58(1), 107-113. <https://doi.org/10.5958/2395-146x.2021.00015.6>
- KEGG-NCBI-Taxonomy (2023). Disponible en : <https://www.genome.jp/brite/br08610>
- Koizumi T. (2005). The Brazilian ethanol programme: impacts on world ethanol and sugar markets. *International Sugar Journal*, 107:1275.
- Kosaric, N.; Duvnjak, Z.; Farkas, A.; Sahm, H.; Bringer-Meyer, S.; Goebel, O.; Mayer, D. Ethanol. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2000; pp. 1–72.
- Kruasuwan, W., Puseenam, A., Am-In, S., Trakarnpaiboon, S., Sornlek, W., Kocharin, K., Jindamorakot, S., Tanapongpipat, S., Bai, F. y Roongsawang, N. (2023). Evaluation of thermotolerant and ethanol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* as an alternative strain

for bioethanol production from industrial feedstocks. 3
Biotech, 13(1). <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03436-4>

Ledesma L. (2013). Efecto de la Virginiamicina sobre el crecimiento de bacterias ácido lácticas durante la producción de etanol de la Empresa Cartavio S.A.A. (Tesis Pregrado) Universidad Nacional de Trujillo. Perú, P. 19

Leja M. (2009). The occurrence and identification of microbiological contamination in fuel ethanol production. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 8(4):25-31

Li D. y Suárez M. (2021). Selección de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*, °brix y pH de operación para aumentar el rendimiento de alcohol etílico en destilería D’Cobre. (Tesis Pregrado). Facultad de Ingeniería Química e Industrias Alimentarias. Universidad Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque – Perú, p. 70.

Madrigal L., González J., Olivares I., Regalado C., *Saccharomyces cerevisiae* Exponential Growth Kinetics in Batch Culture to Analyze Respiratory and Fermentative Metabolism. *J. Vis. Exp.* (139), e58192, doi:10.3791/58192 (2018).

Maiorella, B, Blanch H, Wilke C. (1983). By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 25:103–121

Mariscal J. (2011). Evaluación y selección de microorganismos para la producción de etanol a nivel industrial. (Tesis Pregrado). Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Universidad Nacional de Colombia, Manizales – Colombia, p. 1-79

Mercado C. (2006). Rendimiento de Etanol y Producción de Vinaza con Cuatro Sustratos para la Fermentación de Melaza con *Saccharomyces cerevisiae*. (Tesis de Pregrado). Universidad Zamorano, Honduras, p.7

Mibielli G, Filho F. (1999). Síntese do 73icroce de obtencao de dextrana clínica e fructose a partir de sacarose. Congress of Chemical Engineering XIX Interamerican. Universidade estadual de campinas. Brasil, 1-10.

- Michel, R. (2017). Optimización de las condiciones de fermentación para producir una bebida de agave empleando metodología de superficie de respuesta. (Tesis de Pregrado). Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería campus Zacatecas, Zacatecas – México, p. 48.
- Miller G. 1959. Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3): 426-428.
- Miranda B, Molina M. (2015). Evaluación de Factores que Pueden Influir en el Proceso de Sacarificación-Fermentación Simultáneas para la Producción de Etanol a Partir de Materiales Amiláceos. *Ingeniería* 25 (1): 47-61, ISSN: 1409-2441; San José, Costa Rica
- Montgomery, D. C. (2004). *Diseño y Análisis de Experimentos* (2th ed.). Limusa Wiley SA. De C.V. Grupo Noriega Editores, Balderas 95, México, D.F. C.P. 06040. Universidad Estatal de Arizona. P, 224.
- Muhammad A, Muhammad A, Muhammad A, HaqNawaz B. (2011). Improving bioethanol yield: Using virginiamycin and sodium 74icrocen at a Pakistani distillery. *African Journal of Biotechnology*, 10(53): 11072-11073.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C. y Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments* (4th ed.). Wiley.
- Narendranath N, Hynes S, Thomas K, Ingledew W. (1997). Effects of Lactobacilli on Yeast-Catalyzed Ethanol Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(11): 4158–4163.
- Núñez, M. (2019). “Diseño de un biorreactor para la producción de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) de panificación, utilizando como sustrato melaza para la empresa panificadora LEFSKI-PAN” (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador, p.13.

- OCDE/FAO (2021), “OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas”, *Estadísticas de la OCDE sobre agricultura* (base de datos), <http://dx.doi.org/10.1787/agr-outl-data-en>. Disponible en: <https://www.oecd-ilibrary.org/sites/d4bef568-es/index.html?itemld=/content/component/d4bef568-es>
- Orrego C. (2003). Procesamiento de alimentos, Universidad nacional de Colombia SEDE Manizales, primera edición. Colombia, p. 146-150.
- Ortiz-Muñiz, B., Carvajal-Zarrabal, O., Torrestiana-Sanchez, B. y Aguilar-Uscanga, M. G. (2010). Kinetic study on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 yeast isolated from sugar cane molasses. *Journal Of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(10), 1361-1367. <https://doi.org/10.1002/jctb.2441>
- Peña-Serna, C., Castro-Gil, C. y Peláez-Jaramillo, C. A. (2012). Evaluación de la producción de etanol por dos cepas recombinantes y una comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (Fungi: Ascomycota) en melaza de caña de azúcar y mostos de banano de rechazo de Urabá (Antioquia), Colombia. *Deleted Journal*, 34(96), 21-31. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.14239>
- Pérez, L. (2016). Análisis teórico-experimental de la ruta metabólica fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* en la obtención de etanol (Tesis de maestría). Centro de investigaciones y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México DF – México, p. 34-35.
- Peter Rein, 2012. Ingeniería de la caña de azúcar. Berlin. Pág. 393-407
- Pramanik K. (2003). Parametric studies on batch alcohol fermentation using *Saccharomyces* yeast, extracted from toddy. *J-Chin-Inst-Chem-Enrs*, 34(4):487-492
- Rahman, S. S. A., Pasupathi, S. y Karuppiah, S. (2022). Conventional optimization and characterization of microbial dextran using treated sugarcane molasses. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 220, 775-787. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.094>

- Rasmey, A., Hassan, H., Aboseidah, A. y Abdulwahid, O. (2018). Enhancing Bioethanol Productivity from Sugarcane Molasses by *Saccharomyces cerevisiae* Y17 KP096551. *Egyptian Journal Of Botany*, 58(3), Artículo 20. <https://doi.org/10.21608/ejbo.2018.1820.1126>
- Rebollar-Rebollar, S., Hernández-Martínez, J., Guzmán, E. y Rebollar, E. (2018). Determinantes de la demanda de carne bovina en México, 1996-2017: un análisis por regiones. *Debate Económico*, 8(2), 63-82.
- Reyes, K. (2015). Cuantificación de vinagre obtenido de cáscara de piña por medio de fermentación alcohólica y acética, y su incidencia en la productividad, en una empresa guatemalteca (Tesis de maestría). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, p. 25-26.
- Rocha de Oliveira, Andréa; Batista Buzato, João; de Oliveira Haully, Maria Célia. 2005. Produção contínua de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* a partir de melaço de cana-de-açúcar suplementado. *Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portuga*. Vol 26(1). Pp. 53-59.
- Rojas L, Lorenzo Y, Domenech F. (2011). Estudio del consumo de ácidos en el ajuste de pH en diferentes medios de fermentación alcohólica. *ICIDCA. Sobre los derivados de la Caña de Azúcar*, 45(2): 57-62.
- Sanchez, N., Ruiz, R., Plazas, A., Vasquez, J. y Cobo, M. (2020). Effect of pretreatment on the ethanol and fusel alcohol production during fermentation of sugarcane press-mud. *Biochemical Engineering Journal*, 161, 107668. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107668>
- Santanu M, Sanjib K.P, Jolvis P. 2020. Elsevier. *Biotechnological Interventions in beverage production.. pp. 1-37.*
- Shafaghat, H., Najafpour, G., Rezaei, S. y Sharifzadeh, M. (2010). Optimal growth of *Saccharomyces cerevisiae* (PTCC 24860) on pretreated molasses for ethanol production: Application of response surface methodology. *Chemical Industry And*

Chemical Engineering Quarterly, 16(2), 199-206.
<https://doi.org/10.2298/ciceq100201029s>

Suárez-Machín, Caridad; Garrido-Carralero, Norge Antonio; Guevara-Rodríguez, Carmen Amarilys. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. 2016. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. 50(1),pp. 20-28

Suárez-Morales, J. A., Marín-Benítez, M. E. y Riera-González, G. (2021). Deshidratación osmótica de la piña var. Española Roja para su incorporación a una leche fermentada: Osmotic dehydration of pineapple var. Red Spanish for their incorporation in to fermented milk. *Ciencia Y Tecnología De Alimentos*, 31(2), 47-52.
<https://revcitecal.iiia.edu.cu/revista/index.php/RCTA/article/view/276>

Thomas K, Hynes S, Ingledew W. (2001). Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi continuos alcoholic fermentation of corn mash. *Journal of Applied Microbiology*, 90(3): 819-828.

Torres, V, Barbosa, I, Meyer, R, Noda, A, y Sarduy L. (2012). Criterios de bondad de ajuste en la selección de modelos no lineales en la descripción de comportamientos biológicos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 46(4), 345-350.

Trujillo C. (2013). Evaluación de la Capacidad Productiva de Etanol Utilizando Levaduras Aisladas de Agave y Taberna. (Tesis de pregrado). Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, México, p.62-73

Varela, C., Pizarro, F., Agosin, E., 2004. Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3392–3400.

Varilla, A. (2018). *Estudio comparativo de la capacidad fermentativa entre las levaduras Saccharomyces cerevisiae ITV-01 y Saccharomyces cerevisiae Ethanol Red en la producción de etanol* [Tesis de pregrado, Institucional del Tecnológico Nacional de México]. Repositorio Institucional del Tecnológico Nacional de México (RI - TecNM).
<https://rinacional.tecnm.mx/jspui/handle/TecNM/2498>

- Vázquez H, Dacosta O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería Investigación y Tecnología*. 8(4): 249-259.
- Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I.S., Henschke, P.A.(2007). Assimilable nitrogen microcentrí and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77,145–157.
- Wang, W., Wang, B., Su, H., Wei, M., Wei, Y. y Niu, F. (2024). Key role of K⁺ and Ca²⁺ in high-yield ethanol production by *S. Cerevisiae* from concentrated sugarcane molasses. *Microbial Cell Factories*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02401-5>
- Wiratno, E. N., Ardyati, T. y Wardani, A. K. (2014). Effect of Reducing Sugar and Total Nitrogen to Ethanol Production from Molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal Of Experimental Life Sciences*, 4(2), 50-55. <https://doi.org/10.21776/ub.jels.2014.004.02.05>
- Wu, R., Chen, D., Cao, S., Lu, Z., Huang, J., Lu, Q., Chen, Y., Chen, X., Guan, N., Wei, Y. y Huang, R. (2020). Enhanced ethanol production from sugarcane molasses by industrially engineered *Saccharomyces cerevisiae* via replacement of the PHO4 gene. *RSC Advances*, 10(4), 2267-2276. <https://doi.org/10.1039/c9ra08673k>
- Zamora, F. (2009). Biochemistry of alcoholic fermentation in: Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (Eds.), *Wine chemistry and biochemistry*. Springer, New York, pp. 3-26.
- Zohri, A. E., Soliman, M., Ibrahim, O. y Abdelaziz, A. (2022). Reducing heavy metals content in sugarcane molasses and its effect on ethanol fermentation efficiency. *Egyptian Sugar Journal*, 18, 60-67. <https://doi.org/10.21608/esugj.2022.143054.1011>

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: Absorbancias de azúcares reductores del Inóculo o Medio de Activación por pruebas del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)



Figura 18: Absorbancias del Medio de Activación, inicial y final a 4 horas.

ANEXO 2: Curva de calibrado de biomasa

Fue necesario construir una curva de calibrado para determinar biomasa por densidad óptica (DO), para así poder tener puntos de referencia y convertir los valores expresados de número de células de biomasa $\times 10^7$ a gramos por litro (g/L).

Se preparó una solución madre consistente en 10 mL de agua destilada y 0.01g de levadura comercial FERMEL, con lo cual llegamos a una concentración de 1 g/L, dicha solución madre se utilizó para la elaboración de una curva de calibrado (**Tabla 24**).

Tabla 24: Concentración de solución madre para curva de calibrado de biomasa

Nº TUBO	SOLUCIÓN MADRE mL	AGUA DESTILADA	CONCENTRACIÓN g/L	OD (Nano Drop λ 600 nm)
0	1.00	0.00	1.00	2.55
1	0.75	0.25	0.75	1.73
2	0.50	0.50	0.50	1.20
3	0.25	0.75	0.25	0.88
4	0.00	1.00	0.00	0.00

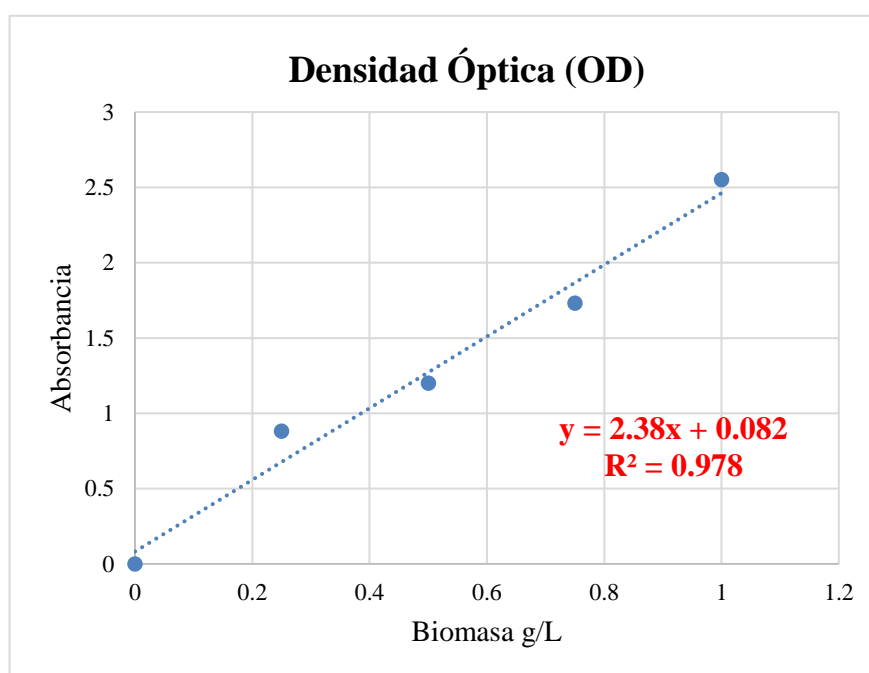


Figura 19: Curva de calibrado de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Preparación de la solución Blanco para el equipo NanoDrop:

Se preparó medio de activación 40 mL volumen total, con 2.40 g de melaza, 0.012g de sulfato de amonio y alcanzamos 5 °Brix, luego se preparó mosto de fermentación 180 mL. Con 60g de melaza, se le agregó 0.06g de sulfato de amonio. Se tomó solamente 20 mL de medio de activación y se le agregó a los 180 mL del mosto de fermentación para sumar un volumen total de 200 mL y se midió en refractómetro digital alcanzando 25°Brix, no se ajustó pH dada la sensibilidad del equipo, pero se tomó lectura y nos encontrábamos en un valor intermedio 4.5. Se guardaron alícuotas para el uso posterior como solución Blanco. Al momento de hacer

las respectivas lecturas en el equipo de NanoDrop se tuvieron que hacer diluciones 1:100 tanto de la muestra a analizar, como también de la solución Blanco, así deberá hacerse siempre.

Posteriormente se hicieron algunas lecturas de OD en el equipo Nano Drop, cuyo valor en número de células era ya conocido por microscopía y así su valor de absorbancia fue transformado en g/L haciendo uso de la curva de calibrado y el factor de dilución (x 100). Solo así pudimos transformar la biomasa expresada en número de células $\times 10^7$ de biomasa en g/L de todos los tratamientos, sus respectivos puntos y sus réplicas a lo largo de la fermentación.

ANEXO 3: Determinación de azúcares reductores y curva de calibrado de DNS

Determinamos los azúcares reductores del muestreo tomado a medida que transcurría el tiempo total de fermentación, usando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), bien utilizada como técnica de Miller (Miller, 1959).

En este paso tomamos una alícuota muestral de 0.5 mL, se centrifugó a 10 000 rpm por tiempo de 5 min en una micro centrífuga, se separó el sobrenadante de la biomasa, se tomó 100 μ L de la fase acuosa no sedimentada e hicimos la dilución correspondiente en tubo de ensayo de 15 mL considerando que nuestra muestra consistente en melaza contiene muchas partículas extrañas y tiene una coloración oscura, hicimos esta dilución a todas nuestras muestras de forma gradual conforme iba avanzando nuestra fermentación. Posteriormente agregamos 250 μ L de muestra ya diluida de cada uno de nuestros 4 tratamientos en tubos con tapa, considerando también el tubo que será la muestra “blanco” al cual solo añadimos 250 μ L de agua destilada. Así a nuestras 4 muestras y el blanco, le agregamos 250 μ L de reactivo DNS. Paralelamente tuvimos agua en ebullición en un beaker y por otro lado un recipiente con hielo semi diluido. Una vez adicionado el reactivo DNS inmediatamente tapamos los tubos y llevamos a ebullición por 5 min, cumplido este tiempo pusimos en enfriamiento rápido al hielo por 5 min, cumplido el tiempo retiramos los tubos, destapamos y adicionamos 2.5 mL de agua destilada completando un volumen total de 3 mL, tapamos y dejamos reposar por 20 min, pero 5 min antes de cumplirse este tiempo agitamos en vortex, culminado este tiempo llevamos a lectura en el espectrofotómetro a longitud de onda de 540 nm. Los

resultados de las absorbancias se interpolaron en una curva de calibrado previamente elaborada para conocer la concentración de glucosa de cada muestra. En la **Tabla 25** se muestran las concentraciones de azúcares reductores y su equivalente absorbancia a 540 nm.

Tabla 25: Preparación de soluciones para a curva de calibrado de azúcares reductores

N°	Sol. Estándar	H ₂ O	Conc. [g/L]	Abs (540nm)
1	250	0	2	1.381
2	200	50	1.6	0.987
3	150	100	1.2	0.710
4	100	150	0.8	0.447
5	50	200	0.4	0.231
6	25	225	0.2	0.131
7	0	250	0	0.000

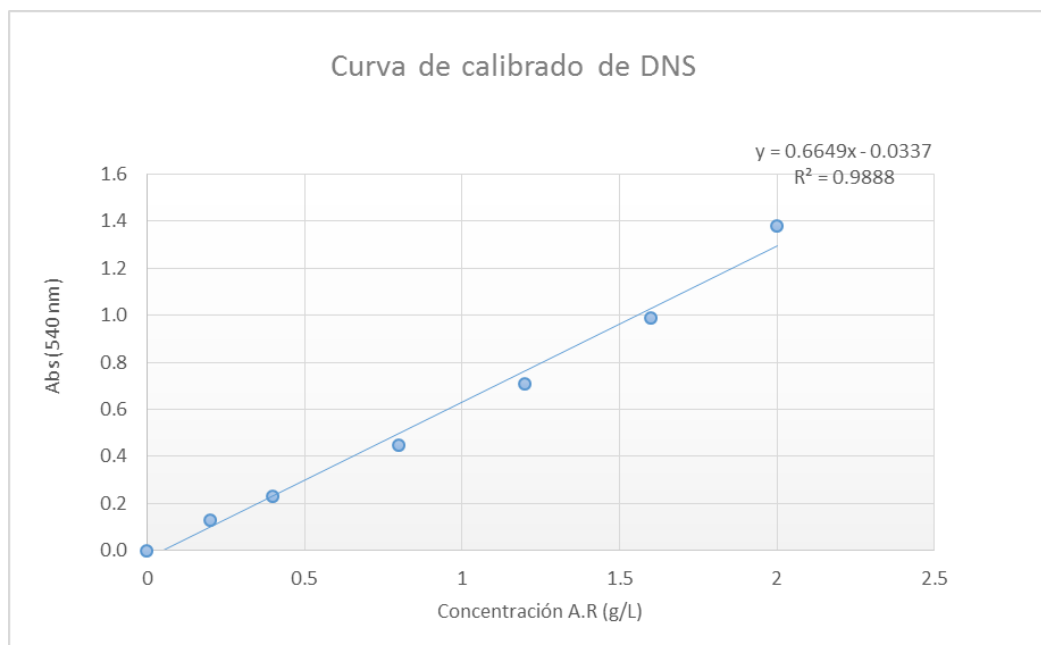


Figura 20: Curva de calibrado de azúcares reductores por DNS.

Ecuación:

$$y = 0.6649x - 0.0337$$

$$R^2 = 0.9888$$



Figura 21: Determinación de azúcares reductores por el método de Miller 3,5- dinitrosalicílico (DNS). **a.** Dilución del mostro dada la turbidez de la melaza, **b.** una vez agregado el reactivo a ebullición, **c.** luego al frío del hielo, **d.** muestras listas para ser medidas por el espectrofotómetro.

ANEXO 4: Determinación del porcentaje de etanol (% v/v) y curva de calibrado de etanol por cromatografía de gases

Para la determinación de etanol en el primer ensayo se tomaron muestras a modo de alícuotas en microtubos de 2.0 mL, para los cuatro tratamientos desde el punto 1 (P1) hasta el punto 6 (P6) a lo largo de las 48 horas de fermentación, de igual forma se hizo para el segundo y tercer ensayo que fueron las réplicas de nuestras fermentaciones. Las alícuotas fueron sometidas a shock térmico (60° C por 5 min y luego hielo por 5 min) para frenar el crecimiento de levaduras, así como también para evitar que continúe metabolizando y pueda generar metabolitos indeseados. Posteriormente centrifugamos a 10 000 rpm durante 5 min en una microcentrífuga refrigerada, se guardaron las muestras en refrigeración -20°C, para posteriormente llevarlas a cromatógrafo de gases, para lo cual se requirió un nuevo tratamiento de centrifugado y filtrado.

Se centrifugaron las muestras tres veces más a 10 000 rpm durante 20 min cada vez, al separar el sobrenadante de la biomasa y otras partículas sedimentadas, se tomaba el sobrenadante con jeringa de 5 mL, previamente rotulada y se trasvasaba a otro microtubo de 1.5 mL, hasta completar las tres centrifugaciones. Luego cada una de las muestras y sus respectivas réplicas fueron filtradas haciendo uso de jeringas de 5 mL y filtros cuya medida de poro es de 0.20 µm y diámetro de filtro 25 mm; las muestras fueron doblemente filtradas y pasaron a viales ámbar de capacidad de volumen de 1.5 mL, obviamente nuestros volúmenes de muestra

habían disminuido debido al doble filtrado, pero obtuvimos lo suficiente para el paso siguiente, así las muestras estuvieron listas para ingresar al equipo cromatógrafo de gases y hacer la lectura de porcentaje de etanol, como lo muestra la **Figura 22**.

Para hacer la respectiva medición de porcentaje de etanol en el equipo de cromatógrafo de



Figura 22: Acondicionamiento de muestras para la determinación de porcentaje de etanol por cromatografía de gases. **a.** muestras triplemente centrifugadas son trasvasadas con jeringa, **b.** muestras en el rotor del equipo, previamente rotuladas, **c.** Microcentrifuga refrigerada a 10 000 rpm por 20 min., **d.** doble filtrado de muestras.

gases fue necesario hacer una curva de calibrado que nos sirvió para relacionar nuestros resultados, la curva de calibrado se muestra a continuación:

Tabla 26: Concentraciones de etanol y su respectiva área

Etanol (%)	Área
0.5	89,201
5	1,079,871
10	2,195,723
15	3,336,185
20	4,524,282

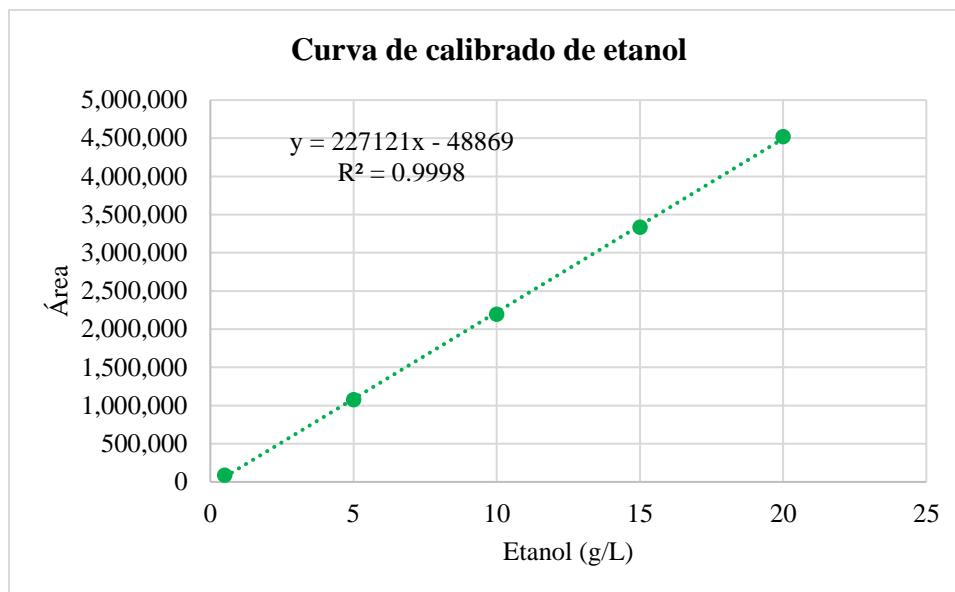


Figura 23: Curva de calibrado de etanol por cromatografía de gases.

ANEXO 5: Lectura de etanol en el cromatógrafo de gases para T4 y control a las 48 horas de fermentación

Tabla 27: Determinación de etanol en los tratamientos T4 y control luego de 48 horas.

Tratamiento	Tiempo de retención	Área	Peso	Etanol (%)
T4	4.653	1,730,904.8	665,864.2	7.83624
Control	4.661	1,614,450.9	613,294.2	7.32350

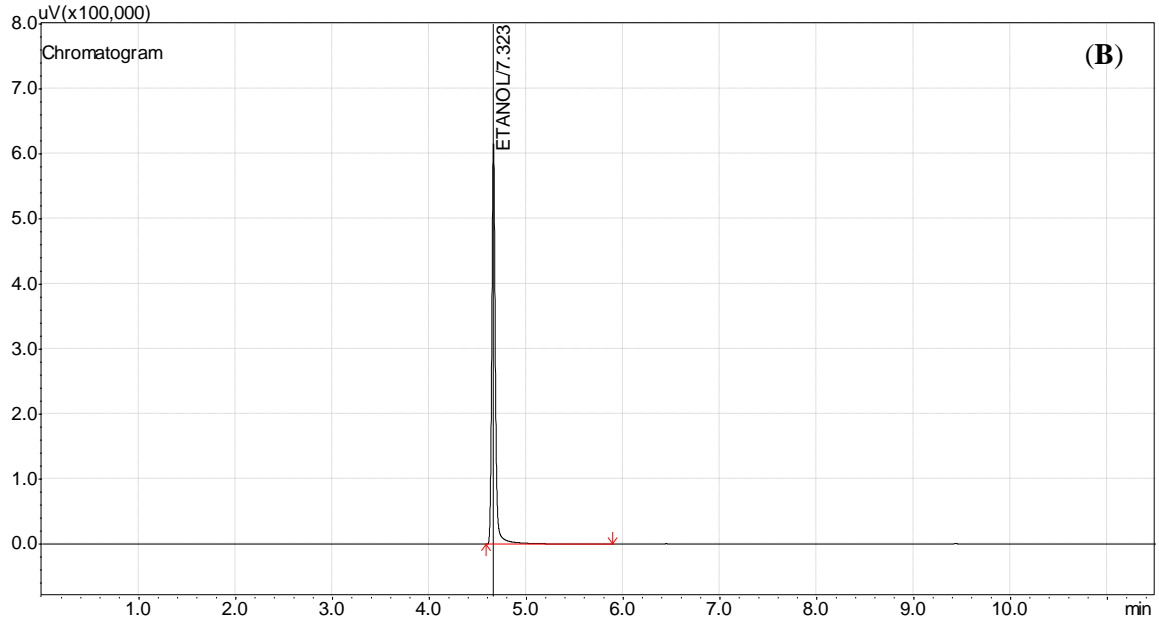
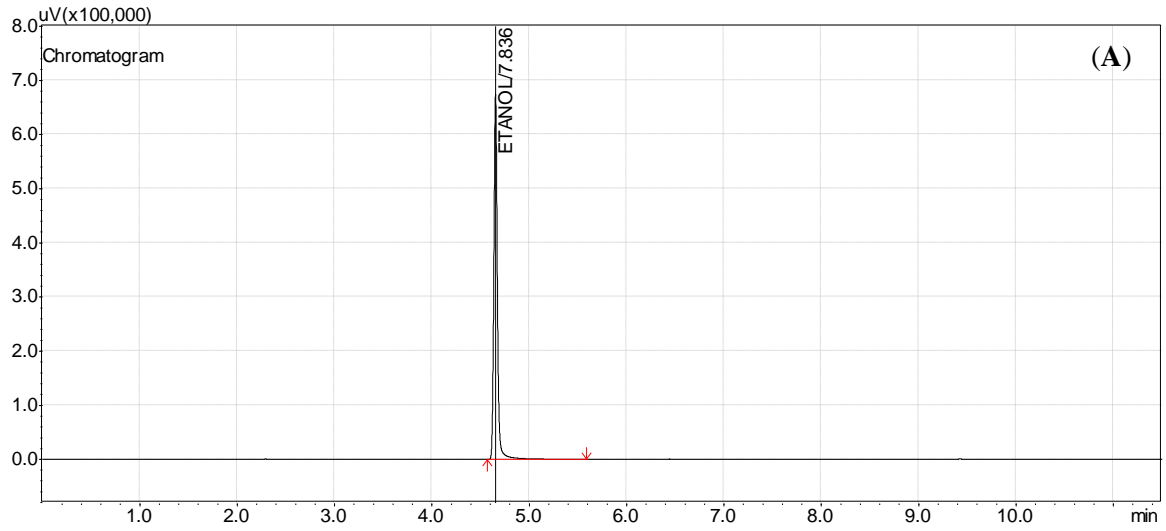


Figura 24: Gráfico de cromatografía de gases para la determinación de etanol en la cinética de *S. cerevisiae*. (A) Tratamiento 4 - punto final (48 h). (B) Control - punto final (48 h).

ANEXO 6: Modelo Matemático Logístico en el software *Wolfram Mathematica 7* para los 4 pretratamientos y el Control: Determinación de las constantes k y XG

T1: pH 4.2/60°C

```

In[1]:= data = {{0, 0.6}, {6, 0.8}, {18, 2.0}, {24, 3.0}, {30, 2.6}, {42, 2.4}, {48, 1.8}};
x0 = 0.6;
model = (x0*Exp[k*t]) / (1 - (x0/xu) * (1 - Exp[k*t]));
fit = FindFit[data, model, {k, xu}, t]

```

```
Out[4]= {k -> 0.172081, xu -> 2.4321}
```

```

In[5]:= modelf = Function[{t}, Evaluate[model /. fit]]

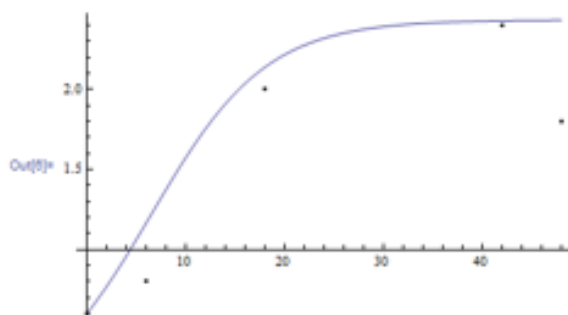
```

```
Out[5]= Function[t,  $\frac{0.6 e^{0.172081 t}}{1 - 0.2467 (1 - e^{0.172081 t})}$ ]
```

```

In[6]:= Plot[modelf[t], {t, 0, 48}, Epilog -> Map[Point, data]]

```



T2: pH 4.2/80°C

```

In[1]:= data = {{0, 0.4}, {6, 0.6}, {18, 1.8}, {24, 2.6}, {30, 2.5}, {42, 2}, {48, 1.7}};
x0 = 0.4;
model = (x0*Exp[k*t]) / (1 - (x0/xu) * (1 - Exp[k*t]));
fit = FindFit[data, model, {k, xu}, t]

```

```
Out[4]= {k -> 0.189537, xu -> 2.19057}
```

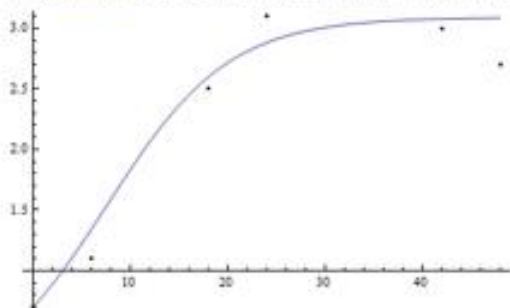
```

modelf = Function[{t}, Evaluate[model /. fit]]

```

```
Function[t,  $\frac{0.4 e^{0.189537 t}}{1 - 0.226546 (1 - e^{0.189537 t})}$ ]
```

```
Plot[modelf[t], {t, 0, 48}, Epilog -> Map[Point, data]]
```



T3: pH 4.8 /60°C

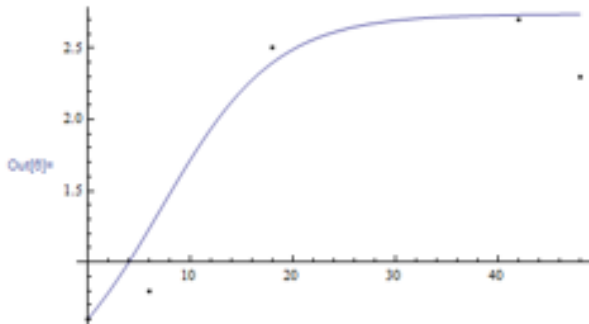
```
In[1]:= data = {{0, 0.6}, {6, 0.8}, {18, 2.5}, {24, 3.0}, {30, 2.8}, {42, 2.7}, {48, 2.3}};
x0 = 0.6;
model = (x0*Exp[k*t]) / (1 - (x0/xu) * (1 - Exp[k*t]));
fit = FindFit[data, model, {k, xu}, t]
```

```
Out[4]:= {k -> 0.17906, xu -> 2.73806}
```

```
In[2]:= modelf = Function[{t}, Evaluate[model /. fit]]
```

```
Out[5]:= Function[{t},  $\frac{0.6 e^{0.17906 t}}{1 - 0.219133 (1 - e^{0.17906 t})}$ ]
```

```
In[3]:= Plot[modelf[t], {t, 0, 48}, Epilog -> Map[Point, data]]
```



T4: pH 4.8 /80°C

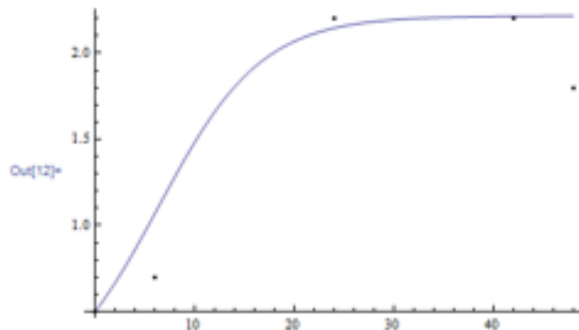
```
In[7]:= data = {{0, 0.5}, {6, 0.7}, {18, 2.3}, {24, 2.2}, {30, 2.4}, {42, 2.2}, {48, 1.8}};
x0 = 0.5;
model = (x0*Exp[k*t]) / (1 - (x0/xu) * (1 - Exp[k*t]));
fit = FindFit[data, model, {k, xu}, t]
```

```
Out[10]:= {k -> 0.193719, xu -> 2.21566}
```

```
In[11]:= modelf = Function[{t}, Evaluate[model /. fit]]
```

```
Out[11]:= Function[{t},  $\frac{0.5 e^{0.193719 t}}{1 - 0.225667 (1 - e^{0.193719 t})}$ ]
```

```
In[12]:= Plot[modelf[t], {t, 0, 48}, Epilog -> Map[Point, data]]
```



Control

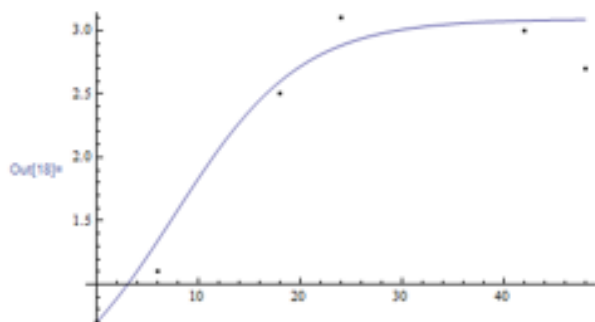
```
In[13]:= data = {{0, 0.7}, {6, 1.1}, {18, 2.5}, {24, 3.1}, {30, 3.4}, {42, 3}, {48, 2.7}};
x0 = 0.7;
model = (x0*Exp[k*t]) / (1 - (x0/xu) * (1 - Exp[k*t]));
fit = FindFit[data, model, {k, xu}, t]
```

```
Out[16]:= {k -> 0.160718, xu -> 3.08988}
```

```
In[17]:= modelf = Function[{t}, Evaluate[model /. fit]]
```

```
Out[17]:= Function[{t},  $\frac{0.7 e^{0.160718 t}}{1 - 0.226546 (1 - e^{0.160718 t})}$ ]
```

```
In[18]:= Plot[modelf[t], {t, 0, 48}, Epilog -> Map[Point, data]]
```



ANEXO 7: Análisis Estadístico de azúcares reductores residuales, normalidad, observados vs predichos, predichos vs residuales.

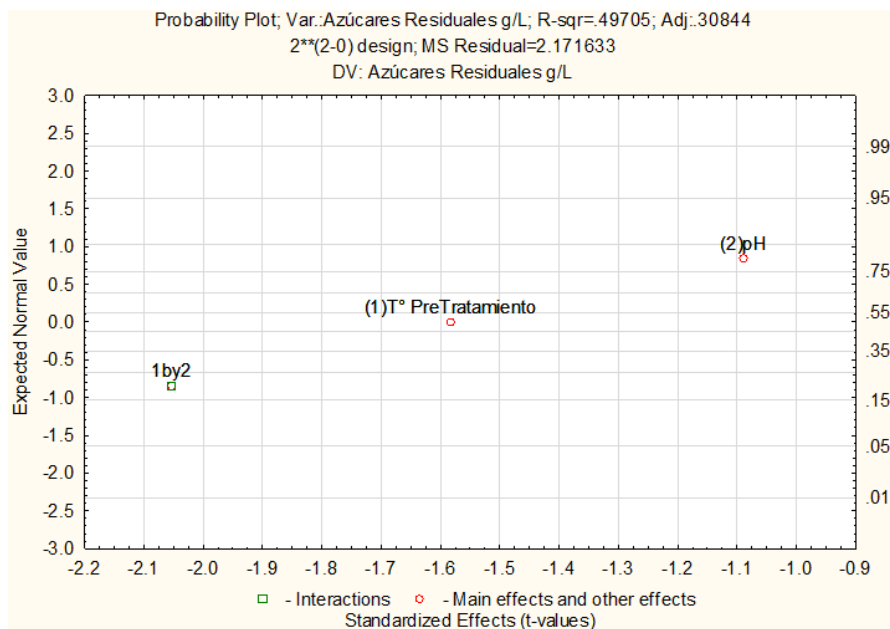


Figura 25: Ploteo de la probabilidad de azúcares reductores residuales.

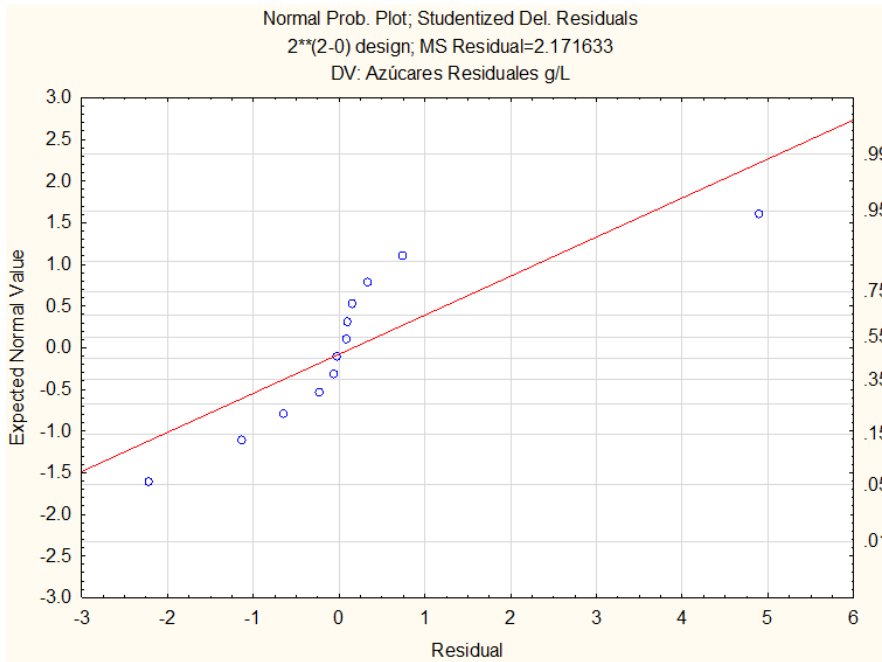


Figura 26: Ploteo de probabilidad normal de azúcares reductores residuales.

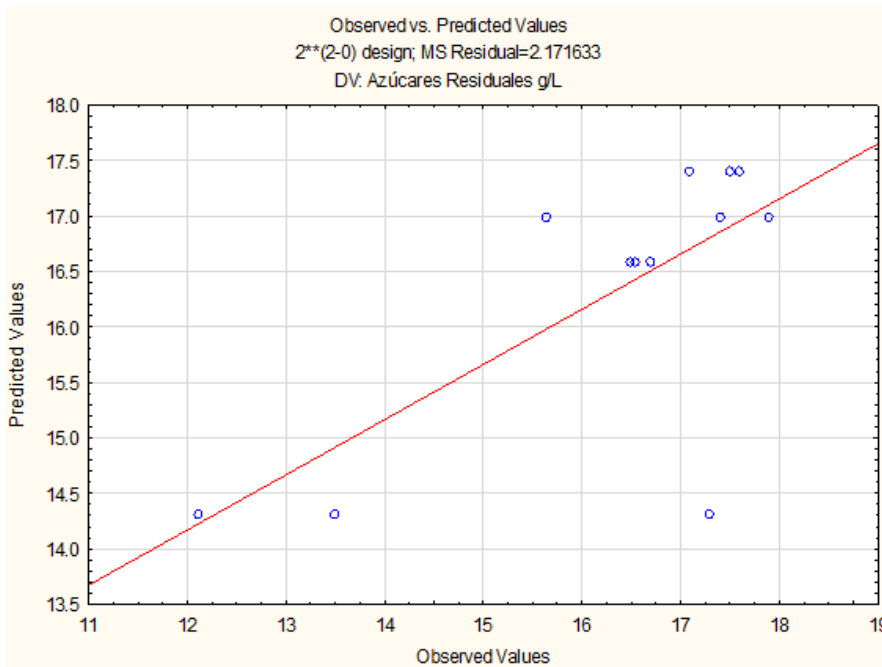


Figura 27: Valores observados vs predichos de azúcares reductores residuales.

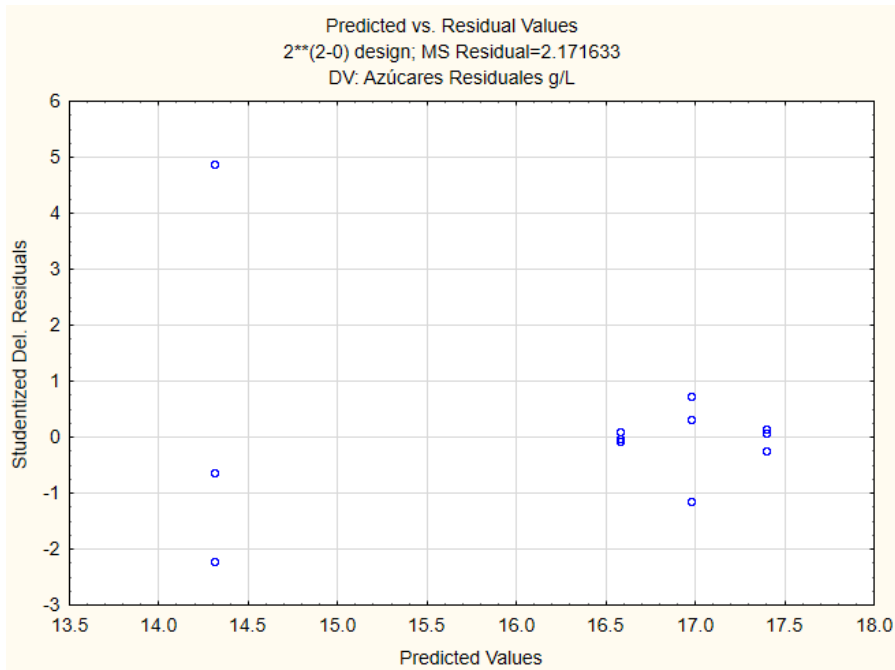


Figura 28: Valores predichos vs residuales de azúcares reductores residuales.

ANEXO 8: Análisis Estadístico de porcentaje de Etanol, normalidad, observados vs predichos, predichos vs residuales.

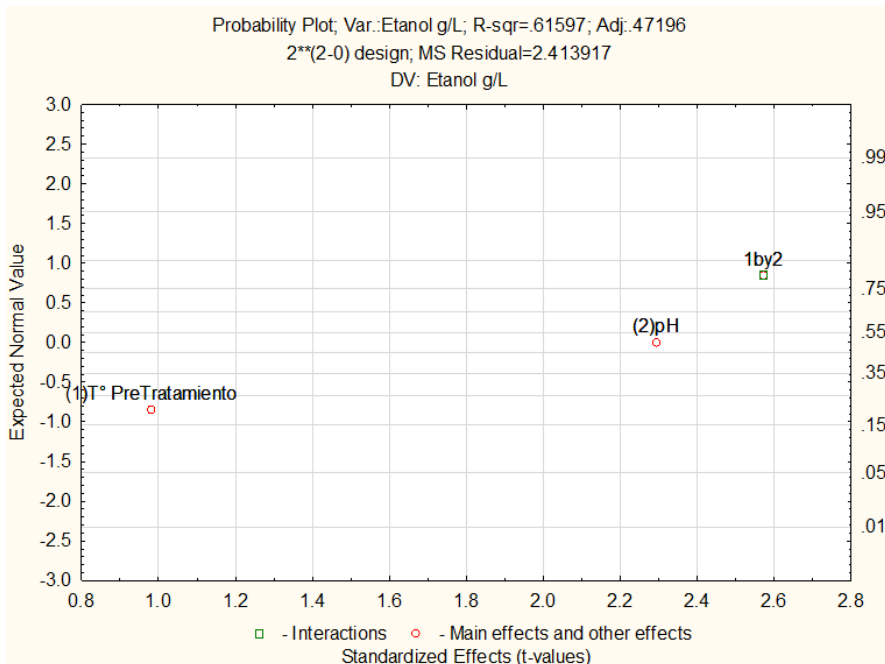


Figura 29: Ploteo de la probabilidad de etanol.

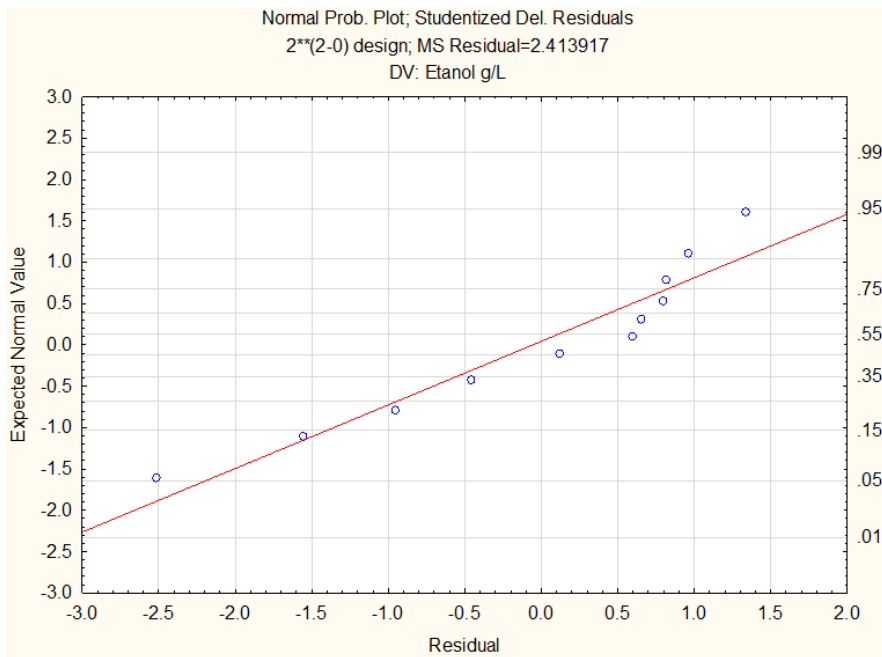


Figura 30: Ploteo de probabilidad normal de etanol.

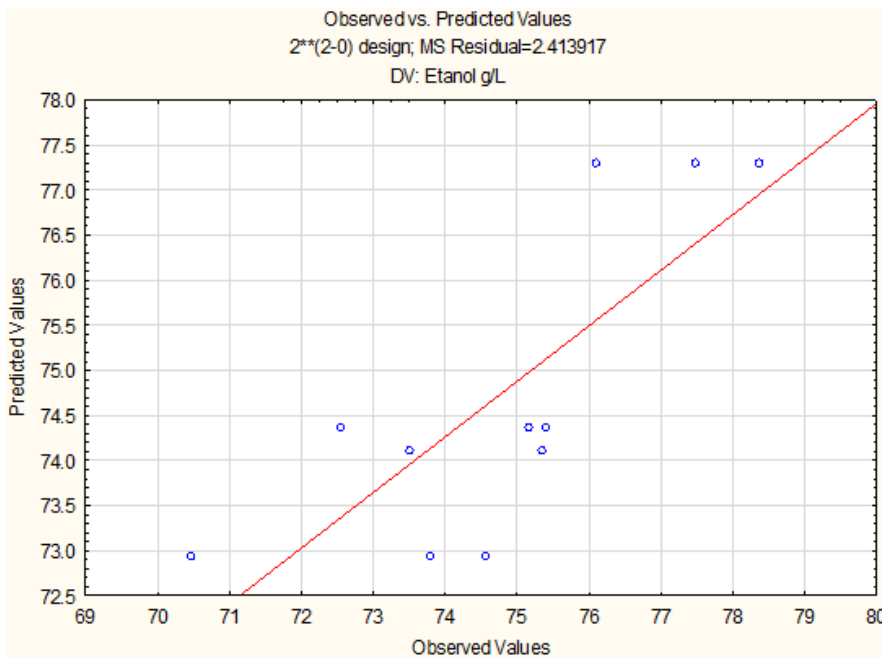


Figura 31: Valores observados vs predichos de etanol.

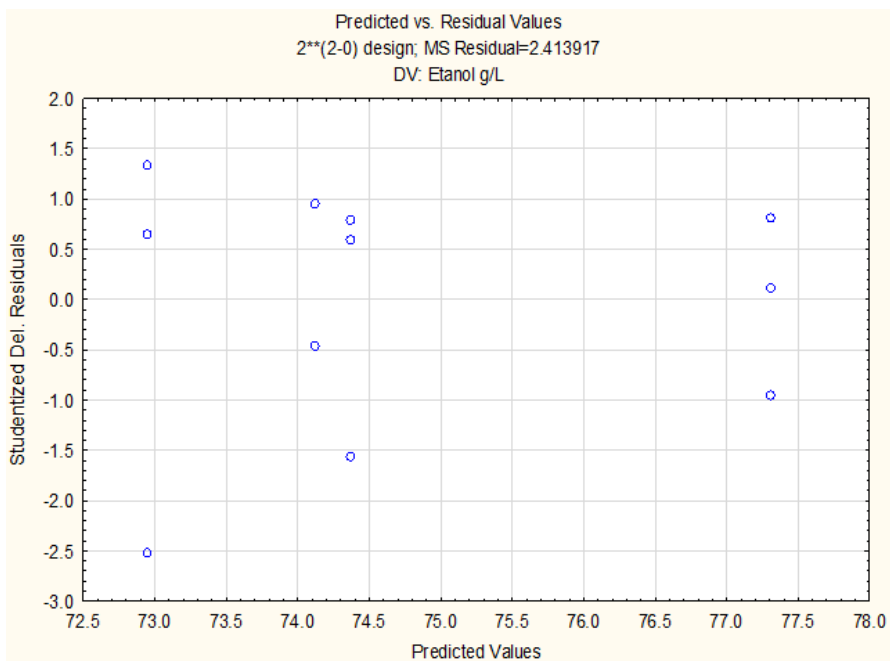


Figura 32: Valores predichos vs residuales de etanol.

ANEXO 9: Análisis Económico “costo-beneficio”

Tabla 28: Análisis económica “costo-beneficio”.

ANALISIS DE COSTO BENEFICIO //PRETRATAMIENTO DEL MOSTO				
SUSTENTO DE LA INVERSIÓN				
Item	Parámetro	CANTIDAD	PEN	USD
1	INVERSIONES		773,463	203,543
1.1	<u>INSUMO/EQUIPOS/OBRAS CIVILES/SERVICIOS</u>		650,000	171,053
1.1.1	<u>INSUMO/EQUIPOS</u>			
1.1.1.1	Consumo vapor	30	90,963	23,938
1.1.1.2	Intercambiadores de calor	2	200,000	52,632
1.1.1.3	Bomba		60,000	15,789
1.1.1.4	Materiales para interconexión de líneas de tubería		100,000	26,316

1.1.1.5	Materiales para instrumentación		60,000	15,789
1.1.1.6	Sub total		420,000	110,526
1.1.2	<u>OBRAS CIVILES</u>			
1.1.2.1	Base para intercambiadores de calor		100,000	26,316
1.1.2.2	Sub total		100,000	26,316
1.1.3	<u>SERVICIOS E INSTALACIONES</u>			
1.1.3.1	Servicio de montaje de equipos		100,000	26,316
1.1.3.2	Aislamiento térmico		30,000	7,895
1.1.3.3	Sub total		130,000	34,211
1.1.3.6	Imprevistos 5%		32,500	8,553
2	BENEFICIO TOTAL			
			385,436	101,430
3	DATOS			
3.1	Beneficio		-	-
			621,707	163,607
3.2	Volumen producido REN (Litros)	5,370,202	-	1,329,808
3.3	Volumen producido Neutro (Litros)	1,389,879	597,648	
3.4	Total alcohol producido	6,760,081		
3.5	SIN PROYECTO			
	Consumo antibiótico (Kg)	260.00	110,453	
3.5.1	Precio de venta REN (S/L)	2.54		
3.5.2	Precio de venta Neutro (S/L)	3.25		
3.5.3	Costo de producción REN (S/L)	2.79		
3.5.4	Costo de producción Neutro (S/L)		2.82	
3.6	CON PROYECTO			
3.6.1	Beneficio		1,007,142	265,037
3.6.2	Volumen producido REN (Litros)	5,587,913	69,139	18,194

3.6.3	Volumen producido Neutro (Litros)	1,446,225	938,004	246,843
3.6.4	Precio de venta REN (S/L)	2.54		
3.6.5	Precio de venta Neutro (S/L)	3.25		-
3.6.6	COSTO DE PRODUCCIÓN			-
3.6.7	Costo de producción REN (S/L)	2.53		
3.6.8	Costo de producción Neutro (S/L)	2.60		-
3.6.10	Tipo de Cambio USD/PEN		3.80	

ANEXO 10: Indicadores VAN y TIR

Tabla 29: Indicadores VAN y TIR.

<u>INDICADORES</u>		
VAN	188,087	\$
TIR	35%	
Payback	2.7	años

ANEXO 11: Análisis de Varianza ANOVA de los cuatro tratamientos más el control en cada uno de los factores (Yx/s, Yp/s, Qp y μ Max. de 3 réplicas)

Rendimiento Yx/s (g/L)

Descriptivos

Rendimiento X/S (g/L)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
T 1	3	,08567	,034588	,019969	-,00025	,17159	,048	,116
T 2	3	,09100	,033045	,019079	,00891	,17309	,057	,123
T 3	3	,11567	,011060	,006386	,08819	,14314	,104	,126
T 4	3	,08833	,063909	,036898	-,07042	,24709	,029	,156
Control	3	,13800	,000000	,000000	,13800	,13800	,138	,138
Total	15	,10373	,036953	,009541	,08327	,12420	,029	,156

ANOVA de un factor

Rendimiento X/S (g/L)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,006	4	,002	1,179	,377
Intra-grupos	,013	10	,001		
Total	,019	14			

Rendimiento Yp/s (g/L)

Descriptivos

Rendimiento P/S (g/L)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
T 1	3	,52333	,014154	,008172	,48817	,55849	,507	,532
T 2	3	,50967	,021455	,012387	,45637	,56296	,485	,524
T 3	3	,52433	,015308	,008838	,48631	,56236	,515	,542
T 4	3	,53067	,011590	,006692	,50187	,55946	,520	,543
Control	3	,50100	,000000	,000000	,50100	,50100	,501	,501
Total	15	,51780	,016519	,004265	,50865	,52695	,485	,543

ANOVA de un factor

Rendimiento P/S (g/L)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,002	4	,000	2,139	,150
Intra-grupos	,002	10	,000		
Total	,004	14			

Productividad Volumétrica QP (g/Lh)

Descriptivos

Productividad V (g/Lh)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
T 1	3	1,54967	,033620	,019411	1,46615	1,63318	1,511	1,572
T 2	3	1,51967	,045369	,026194	1,40696	1,63237	1,468	1,553
T 3	3	1,54433	,022234	,012837	1,48910	1,59956	1,531	1,570
T 4	3	1,61067	,024173	,013956	1,55062	1,67072	1,585	1,633
Control	3	1,52600	,000000	,000000	1,52600	1,52600	1,526	1,526
Total	15	1,55007	,041543	,010726	1,52706	1,57307	1,468	1,633

ANOVA de un factor

Productividad V (g/Lh)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,016	4	,004	4,577	,023
Intra-grupos	,009	10	,001		
Total	,024	14			

Tasa específica de crecimiento máximo celular Miu Max ($\mu\text{Max h}^{-1}$)

Descriptivos

Miu (μMax)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
T 1	3	,072167	,0045960	,0026535	,060750	,083584	,0670	,0758
T 2	3	,075433	,0117219	,0067677	,046314	,104552	,0619	,0824
T 3	3	,083433	,0045347	,0026181	,072169	,094698	,0784	,0872
T 4	3	,086900	,0042226	,0024379	,076411	,097389	,0823	,0906
Control	3	,069700	0E-7	0E-7	,069700	,069700	,0697	,0697
Total	15	,077527	,0086404	,0022309	,072742	,082312	,0619	,0906

ANOVA de un factor

Miu (μMax)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,001	4	,000	4,135	,031
Intra-grupos	,000	10	,000		
Total	,001	14			