



UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUIZ GALLO”
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
E INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA

TESIS

**“INCREMENTO DEL RENDIMIENTO ALCOHÓLICO FERMENTATIVO
MEDIANTE UN COMPLEJO ENZIMÁTICO (EFFYMOLL+) Y UN
ANTIBIÓTICO DE LÚPULO (BETABIO 45%) EN LA DESTILERÍA DE
INDUSTRIAL PUCALÁ S.A.C.”**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO(A) QUÍMICO(A)

PRESENTADO POR:

Bach. DE LA CRUZ CULQUICONDOR DEYVIN IVÁN

Bach. FLORES LAVÁN DÉLONIS

Lambayeque – Perú

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUIZ GALLO”
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
E INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA
TESIS



**“INCREMENTO DEL RENDIMIENTO ALCOHÓLICO FERMENTATIVO
 MEDIANTE UN COMPLEJO ENZIMÁTICO (EFFYMOLL+) Y UN
 ANTIBIÓTICO DE LÚPULO (BETABIO 45%) EN LA DESTILERÍA DE
 INDUSTRIAL PUCALÁ S.A.C.”**

PRESENTADO POR:

Bach. DE LA CRUZ CULQUICONDOR DEYVIN IVÁN

Bach. FLORES LAVÁN DÉLONIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO(A) QUÍMICO(A)

Aprobado por:

Dra. TARCILA AMELIA CABRERA SALAZAR

JURADO PRESIDENTE

Dr. JOSÉ LUIS VENEGAS KEMPER

JURADO SECRETARIO

M.Sc. RUBÉN ENRIQUE VARGAS LINDO

JURADO VOCAL

M.Sc. JOSÉ ENRIQUE HERNÁNDEZ ORÉ

ASESOR

Lambayeque – Perú

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUIZ GALLO”
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
E INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA



TESIS

PRESENTADO POR:

Bach. DE LA CRUZ CULQUICONDOR DEYVIN IVÁN

Bach. FLORES LAVÁN DÉLONIS

ASESORADO POR:

M.Sc. José Enrique Hernández Oré

Lambayeque – Perú

2018

TESIS

“INCREMENTO DEL RENDIMIENTO ALCOHÓLICO FERMENTATIVO MEDIANTE UN COMPLEJO ENZIMÁTICO (EFFYMOLL+) Y UN ANTIBIÓTICO DE LÚPULO (BETABIO 45%) EN LA DESTILERÍA DE INDUSTRIAL PUCALÁ S.A.C.”

Bach. Deyvin Iván De la Cruz Culquicondor

Tesista

Bach. Délonis Flores Laván

Tesista

Ing. José Enrique Hernández Oré

Asesor

Lambayeque – Perú

2018

DEDICATORIA

Sr. Francisco Laván Facundo, usted siempre confió en mis capacidades aun siendo una pequeña niña, desde las sumas y restas (diferencias, como usted me decía) que estuvieron en su poder yo aprendiera a mi corta edad, justo ahí comprendí lo mucho que usted esperaba de mí, hasta donde yo podría llegar y como usted decía, el que estudia, muchas cosas alcanzan y ahora algunos años después tengo la satisfacción de decirte lo logré, logré una de mis metas planteadas. Gracias abuelito, gracias por confiar en mí, fuiste desde siempre una pieza clave en mi vida personal y educativa, es a ti a quien dedico la presente tesis que en paz descanses. Q.E.P.D 13.08.2018

Délonis Flores Laván

Este arduo trabajo lo pude realizar gracias al constante apoyo de mis padres, a quienes les agradezco de todo corazón que hayan confiado en mí y en mi educación, a mi padre José María De la cruz López y a mi madre Dilcia Culquicondor Llacsahuanga, así como también a mí querida tía Aurora Medina Troncos quien me cuido y guió desde muy pequeño para ser hoy la persona que soy; y en un tiempo no muy lejano ser el gran profesional que idealizaron que sería.

Deyvin Iván De la cruz Culquicondor

*Nuestra recompensa se encuentra
en el esfuerzo y no en el resultado,
un esfuerzo total
es una victoria completa.*

Mahatma Gandhi

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	V
TABLA DE CONTENIDOS.....	VI
LISTA DE FIGURAS	XI
RESUMEN.....	XIV
ABSTRACT	XV

I. INTRODUCCIÓN	1
II. FUNDAMENTO TEÓRICO	4
2.1 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO	4
2.2 PROCESO DE FERMENTACIÓN.....	7
2.3 ETAPAS DEL PROCESO FERMENTATIVO EN INDUSTRIAL PUCALÁ S.A.C.	29
2.4 ALCOHOL ETÍLICO.....	34
2.5 RENDIMIENTO ALCOHÓLICO	35
2.6 CONTAMINACIÓN BACTERIANA.....	37
2.7 TRATAMIENTO CONTRA LA CONTAMINACIÓN BACTERIANA.	40
III. MATERIALES Y MÉTODOS	48
3.1. UBICACIÓN Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	48
3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA DEL ESTUDIO	48
3.3. TÉCNICAS DEL MUESTREO.....	49
3.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	49
3.5. MATERIALES.....	49
3.6. MÉTODO	51
3.6.1. <i>Procedimiento:</i>	51
3.6.2. <i>Descripción del proceso experimental</i>	52
3.6.3. <i>Diseño experimental (dosificación ppm de beta y eff)</i>	53
3.6.4. <i>Variables de control</i>	55
3.7. RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN:.....	56
IV. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	63
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	70

5.1	CONCLUSIONES	70
5.2	RECOMENDACIONES	71
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ANEXO A	78
ANEXO B	81
ANEXO C	85
ANEXO D	97
ANEXO E	103
ANEXO F	104
ANEXO G	121

LISTA DE TABLA

TABLA 1	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	18
TABLA 2	COMPOSICIÓN DE LA LEVADURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	19
TABLA 3	PROPIEDADES DE LA UREA	32
TABLA 4	PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS DEL ALCOHOL ETÍLICO	35
TABLA 5	FERMENTACIÓN: DEXTRANO Y LEVANO	40
TABLA 6	ESTRUCTURA QUÍMICA DE BETA - ÁCIDOS.....	42
TABLA 7	ESPECIFICACIÓN DEL PRODUCTO BETABIO 45%.....	43
TABLA 8	ESPECIFICACIONES DEL PRODUCTO EFFYMOLL+	47
TABLA 9	LOCALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	48
TABLA 10	MATERIAS PRIMAS E INSUMOS.....	49
TABLA 11	MATERIALES DE LABORATORIO	50
TABLA 12	EQUIPOS DE LABORATORIO	50
TABLA 13	CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LA MELAZA	53
TABLA 14	GRUPO CONTROL SOLO DESPUÉS DEL EFFYMOLL+	53
TABLA 15	GRUPO CONTROL SOLO DESPUÉS DEL BETABIO 45%	54
TABLA 16	VARIABLE CONTROL INDEPENDIENTE	55
TABLA 17	VARIABLE CONTROL DEPENDIENTE	55
TABLA 18	DATOS DE LAS MUESTRAS EN BLANCO	56
TABLA 19	DATOS DE LAS MUESTRAS DE BETABIO 45% EN DOSIS DE 6 PPM	57
TABLA 20	DATOS DE LAS MUESTRAS DE BETABIO 45% EN DOSIS DE 8 PPM	58
TABLA 21	DATOS DE LAS MUESTRAS BETABIO 45% EN DOSIS DE 10 PPM	59
TABLA 22	DATOS DE LAS MUESTRAS EFFYMOLL+ EN DOSIS DE 3 PPM	60
TABLA 23	DATOS DE LAS MUESTRAS EFFYMOLL+ EN DOSIS DE 5 PPM	61
TABLA 24	DATOS EN LAS MUESTRAS DE EFFYMOLL+ EN DOSIS DE 7 PPM.....	62
TABLA 25	GRADO ALCOHÓLICO REAL DEL BETABIO 45%.....	63
TABLA 26	RENDIMIENTO DE BETABIO 45% (L/TM)	63

TABLA 27	<i>EFICIENCIA FERMENTATIVA CON BETABIO 45% (%)</i>	64
TABLA 28	<i>GRADO ALCOHÓLICO REAL DEL EFFYMOLL+</i>	66
TABLA 29	<i>RENDIMIENTO DEL EFFYMOLL+ (L/TM)</i>	66
TABLA 30	<i>EFICIENCIA FERMENTATIVA CON EFFYMOLL+ (%)</i>	66
TABLA 31	<i>RESULTADOS DEL ESTADÍSTICO DE PRUEBA U DE MANN-WHITNEY</i>	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reproducción asexual por gemación de una levadura -----	16
Figura 2. Reproducción sexual de una levadura -----	16
Figura 3. Imagen de una <i>saccharomyces cerevisiae</i> en vista de un microscopio electrónico-----	17
Figura 4. Escalamiento del cultivo de levadura de <i>saccharomyces cerevisiae</i> -----	21
Figura 5. Cámara de conteo neubauer improved-----	22
Figura 6. Ruta metabólica para la fermentación y producción de etanol empleando <i>s.cerevisiae</i>	24
Figura 7. Efecto de la concentración de nitrógeno sobre la fermentación -----	33
Figura 8. <i>Humulus lupulus</i> -----	41
Figura 9. Comparación del grado alcohólico real entre las concentraciones para el BetaBio 45% -----	64
Figura 10. Comparación del rendimiento entre las concentraciones para el BetaBio 45% -----	65
Figura 11. Comparación de la eficiencia fermentativa entre concentraciones para el BetaBio 45% -----	65
Figura 12. Comparación del grado alcohólico entre concentraciones para el Effymoll+ -----	67
Figura 13. Comparación del rendimiento entre concentraciones para el Effymoll+-----	67
Figura 14. Comparación de la eficiencia fermentativa entre concentraciones para el Effymoll+	68
Figura 15. Reactivos necesarios para la propagación de la levadura -----	85
Figura 16. Caldo de nutrientes-levadura-----	85
Figura 17. Extracto de malta con levadura para corte -----	86
Figura 18. Balón con caldo de nutrientes y matraz con extracto de levadura para corte -----	86
Figura 19. Matraz con melaza diluida a 20 brix más levadura -----	87
Figura 20. Propagación de levadura con aeración-----	87

Figura 21. Bolsa de fosfato monoamónico utilizado. -----	88
Figura 22. Bolsas de urea en la planta -----	88
Figura 23. Propagación de levadura a 40 y 200 lt -----	89
Figura 24. Parte interior de los tanques con 40 y 200 lt con aeración -----	89
Figura 25. Posa de almacenamiento de la melaza -----	90
Figura 26. Tanque homogenizador de melaza diluida -----	90
Figura 27. Tanque homogenizador de melaza diluida -----	91
Figura 28. Tanque prefermentador vacío -----	91
Figura 29. Tanque prefermentador llenado al 10% -----	92
Figura 30. Muestreo de brix en el tanque prefermentador -----	92
Figura 31. Mostera volante en proceso -----	93
Figura 32. Llenado de mostera -----	93
Figura 33. Finalización del llenado de mostera -----	94
Figura 34. Fermentación del mosto -----	94
Figura 35. Fermentación de un tanque con presencia de espuma -----	95
Figura 36. Pasillo superior de la sección de tanques de fermentación -----	95
Figura 37. Vista superior de las ocho mosteras -----	96
Figura 38. Fermentación agotada en una dorna -----	96
Figura 39. Material de vidrio y reactivos de laboratorio -----	97
Figura 40. Producto Effymoll+ -----	97
Figura 41. 100 ml de semilla a 7,5 brix -----	98
Figura 42. Botellas de muestra en blanco con las semillas -----	98
Figura 43. Botellas de BetaBio 45% en dosis de 6 ppm y 8 ppm, con semilla incorporada -----	99

Figura 44. Botellas con muestras en su interior-----	99
Figura 45. Botellas de Effymoll+ en dosis de 3 ppm y 5 ppm, con semilla incorporada -----	100
Figura 46. Balde con melaza pura -----	100
Figura 47. Balde con melaza diluida a 20,2 brix -----	101
Figura 48. Solución de Effymoll+ y BetaBio 45% -----	101
Figura 49. Control de temperatura en botella 01 de Effymoll+ 3 ppm y en botella 01 de Effymoll+ 7 ppm-----	102
Figura 50. Equipo de destilación con el mosto fermentado -----	102
Figura 51. Relación de grados brix, densidad, grados baume a 15°C -----	103

RESUMEN

La empresa Industrial Pucalá cuenta con una planta de alcohol, que se encarga de formar recursos a partir de la melaza y este a su vez es un sub producto de la planta de fabricación de azúcar, ubicada a escasos metros de la planta de alcohol, el cual presenta un bajo rendimiento alcohólico en las dornas de fermentación, con el uso actual de un antibiótico comercial (Lipasa 9200), es por ello que surge la necesidad de utilizar un nuevo producto con una dosis optima hacia el fin de subir dicho rendimiento alcohólico fermentativo. Se realizaron veintiséis pruebas de fermentación a lo largo de la investigación, todas en simultáneo, simulando a las dornas de la planta de alcohol en una escala 100000 : 1 en litros, haciendo uso de tres diferentes dosis para cada producto los cuales son el BetaBio 45% (antibiótico) en 6, 8 y 10 ppm y con el Effymoll+ (complejo enzimático) fueron de 3, 5 y 7 ppm, el estudio realizado concluye que la muestra con mayor rendimiento alcohólico es en la dosis de 10 ppm con el BetaBio 45% y el de 3 ppm con el Effymoll+ respectivamente para cada producto.

Palabras claves: Antibiótico, complejo enzimático, dosis optima, fermentación, rendimiento alcohólico.

ABSTRACT

The Industrial company Pucalá has an alcohol plant, which is responsible for forming resources from molasses and this in turn is a byproduct of the sugar manufacturing plant, located a few meters from the alcohol plant, which presents a low alcoholic performance in the fermentation dornas, with the current use of a commercial antibiotic (Lipasa 9200), that is why it is necessary to use a new product with an optimal dose in order to increase this fermentation alcoholic performance. Twenty-six tests of fermentation were carried out throughout the investigation, all simultaneously, simulating the dornas of the plant of alcohol on a scale 100000:1 in litres, using three different doses for each product which are the BetaBio 45% (antibiotic) in 6, 8 and 10 ppm and with the Effymoll (enzyme Complex) were 3, 5 and 7 ppm, The study concluded that the sample with higher alcoholic performance is in the dose of 10 ppm with BetaBio 45% and 3 ppm with Effymoll respectively for each product.

Key words: Antibiotic, enzymatic complex, optimum dose, fermentation, alcoholic performance.

I. INTRODUCCIÓN

La constante contaminación presente en las plantas de producción de etanol acarrea un sinnúmero de consecuencias, una de las más notables es la disminución en el rendimiento alcohólico fermentativo expresado finalmente en pérdidas económicas para la fábrica.

El proceso de producción de etanol es propenso a una contaminación inherente de diferentes fuentes, comenzando la introducción de bacterias a través de la materia prima empleada, una vez introducidas estas prosperan con facilidad porque el proceso no es estéril y más aún cuando las líneas de transferencia y recipientes de almacenamiento no reciben una limpieza adecuada. Cuando estos microorganismos perjudiciales se instalan forman biopelículas de bacterias resistentes a antibióticos.

El rendimiento que se obtiene de alcohol resulta determinante como criterio selectivo de los materiales a fermentar, de ese modo tenemos a diferentes cultivos, pero el principal es el de caña. Por lo tanto, cabe resaltar que la caña de azúcar como cultivo y la melaza obtenida de este, proporciona el mayor rendimiento de alcohol como se informa en las bibliografías. Este potencial cultivo brinda hasta un rendimiento de alcohol de 8400 l/ha/año, es ahí donde nace la importancia de este cultivo como principal materia prima (melaza) para la producción de alcohol etílico, con respecto a otras alternativas agrícolas también potenciales y accesibles para el país.

Este rendimiento alcohólico se puede ver afectado por la presencia de bacterias, las cuales compiten por el sustrato, con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, aquello se refleja en la disminución de productividad en el proceso de fermentación alcohólica y es ahí donde se necesita la presencia de un agente externo como es el caso de un antibiótico, bactericida o cualquiera que produzca un efecto positivo sobre este mal, el cual es indispensable para obtener la eficiencia deseada en todo el proceso.

De ese modo se asevera, que uno de los problemas en las destilerías es la contaminación bacteriana durante el proceso de fermentación, aquello puede comenzar desde la recepción de la materia prima, además un inapropiado almacenaje de esta, la falta de limpieza en las tuberías y equipos, contribuye a la propagación de las bacterias y microorganismos más comunes encontrados en las destilerías como son: *Lactobacillus sp*, *Sporolactobacillus sp*, *Zymomonas sp*, *Micrococcus sp*, *Acetobacter sp* y *Gluconobacter sp*.

Actualmente la destilería perteneciente a la empresa Industrial Pucalá S.A.C., se encuentra trabajando con un rendimiento alcohólico muy inferior al promedio del resto de destilerías de la región, pese a que esta fábrica cuenta con una capacidad de planta muy amplia para generar gran cantidad de alcohol etílico rectificado de alta calidad, su producción diaria es inferior a la mitad de la capacidad instalada. La planta presenta una gran diversidad de problemas en el área productiva, es propicio resaltar que uno de los principales obstáculos que se puede manejar y variar, es la contaminación bacteriana persistente durante el proceso de fermentación, lo cual se refleja en el bajo rendimiento alcohólico producido durante esta fase. Al hallar esta situación y exponerse ante el comité de jefes encargados, se dio paso a una oportunidad de mejora para la empresa, dando acceso a las investigaciones y evaluaciones con el documento correspondiente.

Para analizar esta problemática es necesario plantearse la hipótesis que si los productos Effymoll+ y BetaBio 45% en concentraciones diferentes producen un incremento en el rendimiento alcohólico fermentativo.

En consecuencia, el presente trabajo tiene como justificación la necesidad de mejorar la productividad del proceso fermentativo al aplicar un producto diferente al que se emplea ahora (Lipesa 9200), estos nuevos agentes controladores, ambos con métodos de acción distintos, pero con un mismo objetivo en común, el cual es aumentar el rendimiento alcohólico. Estos elementos

(bactericida y enzimas) constaran de características específicas, en concordancia con el proceso productivo desarrollado en la empresa Industrial Pucalá S.A.C., y de esa manera se obtendrá un mejor rendimiento de alcohol etílico.

A fin de lograr se plantea, desarrollar del trabajo de investigación de una manera óptima con los siguientes objetivos tanto generales como específicos, estos son:

Objetivo general:

Determinar la concentración óptima de Effymoll+ y BetaBio 45% para incrementar el rendimiento alcohólico fermentativo.

Objetivos específicos:

Medir el rendimiento alcohólico con el Effymoll+ a concentraciones de 3, 5 y 7 ppm.

Evaluar la variación del rendimiento alcohólico producido por la aplicación de Effymoll+.

Medir el rendimiento alcohólico con el BetaBio 45% a concentraciones de 6, 8 y 10 ppm.

Evaluar la variación del rendimiento alcohólico producido por la aplicación de BetaBio 45%.

En el desarrollo del presente trabajo de investigación se estudió dos posibles usos en la introducción de productos nuevos con el objetivo de incrementar el rendimiento alcohólico fermentativo, se evaluó un producto enzimático Effymoll+ en dosis de 3, 5 y 7 ppm y un antibiótico derivado del Lúpulo BetaBio 45% en dosis de 6, 8 y 10 ppm para que finalmente se observe cual es el efecto en cada dosis y así obtener la más recomendable.

II. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio

El proceso de fermentación como tal, presenta diferentes dificultades durante su desarrollo, como en la mayoría de los procesos químicos o biológicos, sin duda unos se tornan más importantes que otros, por ello los científicos siempre están a la vanguardia en la búsqueda de nuevos métodos de intervención hacia esos problemas. La contaminación por microorganismos presentes es un claro ejemplo de los estudios constantes para el control de esta situación, evitar la proliferación y eliminar las bacterias portadoras en la reducción del rendimiento alcohólico.

Los investigadores y sus pesquisas revelan cuales son las bacterias presentes en esta contaminación, sus consecuencias al portarlas, mecanismos de control ya conocidos y otros novedosos. De ese modo se muestran algunas de estas publicaciones a continuación:

Boyona, M.; Ardua, M. & Castellano, O., en el año 2001 publicaron un artículo científico: “Determinación de bacterias contaminantes en el proceso de producción de alcohol etílico y su relación con la floculación de *Saccharomyces cerevisiae*”. La finalidad de este trabajo fue el de estudiar las bacterias presentes en diferentes etapas del proceso de fermentación, estas fueron: la etapa de dilución de melaza, reproducción de levadura y fermentación. Para ello se utilizaron métodos de aislamiento e identificación de bacterias predominantes, conteo microbiológico como los recuentos, y se obtuvo una relación entre la contaminación bacteriana y la floculación de las células de levadura. El trabajo se desarrolló de la siguiente manera, los muestreos se tuvieron que estandarizar a nivel de laboratorio para identificar los contaminantes bacterianos y la levadura, después se procedió con una aplicación de un desinfectante comercial (Sanitech ®) como microbicida de control y también se probó la adición de penicilina (Alipen ®) en inoculos. En los resultados se reportó lo siguiente, las bacterias identificadas fueron *Lactobacillus* sp en un nivel

promedio de 10×10^5 UFC/ml, y *Zymomonas mobilis* en un nivel promedio de 10×10 UFC/ml. El Sanitech ® fue efectivo en el control de *Zymomonas mobilis* y el Alipen ® es adecuado en la inhibición de *Lactobacillus* sp. De acuerdo a la relación de floculación de levaduras y bacterias, se comprobó una intervención directa con niveles de 10^6 UFC/ml de *Lactobacillus* sp, 10^5 UFC/ml de *Zymomonas mobilis* o 10 UFC/ml de la mezcla de estos microorganismos.

Peitzner, R. en el año 2013 sustentó una tesis de investigación denominada “Diseño de la investigación de evaluación de efectividad del complejo catalizador Effymoll+ en la productividad de la fermentación alcohólica de melaza”. En este trabajo se evaluó la efectividad en la productividad de la fermentación del producto Effymoll+ que está elaborado a base de enzimas. Su desarrollo experimental se hizo realizando fermentaciones por lotes, con dos clases de melaza (278 metros cúbicos por fermentador) extraídas de dos ingenios azucareros, para conocer primero los parámetros de control (temperatura, pH, la concentración de azúcares del sustrato y el grado alcohólico que se alcanza) se recolectaron muestras de los reactores de propagación, prefermentadores y fermentadores, la dosificación del Effymoll+ fue de 0,5 ppm en los reactores de propagación, 1,5 ppm en los prefermentadores y 2,0 ppm en los fermentadores.

Tzarax, Y. (2015) presentó un trabajo de tesis sobre “Evaluación del impacto del uso de lúpulo (*Humulus lupulus*) como agente bactericida en el proceso de fermentación alcohólica de melaza por lotes a nivel industrial”. Este proyecto consistió en poner a prueba varios fermentadores a nivel industrial con materia prima de melaza, en estos se realizaron pruebas analíticas al final del proceso de fermentación, empleando un blanco (sin antibiótico) y con antibiótico (agente bactericida natural-lúpulo). Este control se llevó en parámetros de pH, grados Brix, grado alcohólico y ácido láctico con el fin de determinar el impacto dentro del proceso. En los resultados obtenidos se indica que el lúpulo actúa inhibiendo a las bacterias gram positivas (*Lactobacillus* y *Pediococcus*) y

también interfiere en la viabilidad de la levadura, esta disminuye en un 17,6% con una diferencia en la desviación estándar de $\pm 0,14$ unidades, esto refleja que el lúpulo además de inhibir microorganismos perjudiciales, mata la levadura y afecta los medios necesarios para que se desarrolle adecuadamente, disminuyendo la posibilidad que pueda ser utilizada una vez más; en una comparación de contaminación bacteriana entre muestras con y sin lúpulo, esta atenúa en un 24,2% además de disminuir la formación de ácido láctico por ello el grado alcohólico aumenta, igualmente se produce un mejoramiento de la calidad sin alteraciones en las propiedades organolépticas. Finalmente se concluyó que la presencia del lúpulo aumenta en 0,5 grados Gay Lussac, la formación de ácido láctico disminuye en 0,07 ml/L, el pH no se ve influenciado por el lúpulo, y se afirma que este bactericida tiene un efecto de duración de 11 días.

Sanchez, L.; Otiniano, M.; Arellano, J.; Chavez, M.; Robles, H. & Lescano, L.; para el año 2012 publicaron un artículo científico sobre el “Efecto del complejo enzimático producido por *Aspergillus oryzae* sobre producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*”. En el estudio se procedió con el acondicionamiento de sistemas de fermentación (4 botellas de 400 ml de caldo de melaza cada una), aquí a tres de ellas se les adicionó el extracto enzimático en diferentes concentraciones 2,4 y 6% (v/v) y quedó un control sin extracto, en general se trabajó en condiciones anaeróbicas, a una temperatura ambiente durante 48 horas y los sistemas fueron inoculados con *S. cerevisiae*. En los resultados se muestra, que el mayor porcentaje alcohólico se obtuvo con el tratamiento de 4%, con una media de 4,47% de alcohol y una biomasa final de $1,36 \times 10^8$ cel/ml a diferencia del control en el que se obtuvo 3,73% de alcohol y la biomasa final de $9,92 \times 10^7$ cel/ml, además en todos los tratamientos disminuyó el Brix inicial de 14 a 6,57. Finalmente, se concluyó que el complejo enzimático producido por *A. oryzae*, tiene un efecto positivo sobre la producción de etanol por *S. cerevisiae* en condiciones de laboratorio.

2.2 Proceso de Fermentación

La fermentación del azúcar por las levaduras con formación de alcohol etílico es conocida por el hombre desde tiempos más antiguos (Mayer, 1987).

La esencia de la fermentación permaneció mucho tiempo desconocida, pudo aclararse cuando el microscopio reveló la misteriosa actividad y el crecimiento de las bacterias. Entonces se planteó la pregunta de cómo lleva a cabo la levadura la fermentación, si en virtud de su misma actividad vital o merced a algún proceso bioquímico originado por ella, polémica durante muchos años sostenida, que terminó al descubrir Buchner en el año 1897 que la levadura forma un fermento, la zimasa, que por sí solo, sin la presencia de las células de levadura vivas, produce la fermentación (Mayer, 1987).

La fermentación se define como un proceso, donde están presentes los sustratos que son sustancias orgánicas, estas sufren cambios químicos, reducciones y oxidaciones, y finalmente produce energía. Al finalizar la fermentación, se presenta una acumulación de varios productos, unos más oxidados (aceptaron electrones) y otros más reducidos (donaron electrones) que el sustrato, con un balance total de energía positivo. Esta energía es utilizada en el metabolismo de los microorganismos (Hernández A. , 2003).

La vía fermentativa de producción de etanol es hoy competitiva, porque es sostenible y en esta industria se busca fundamentalmente trabajar con materias primas baratas y una mayor eficiencia en los procesos de fermentación. La fermentación alcohólica consiste en la transformación de azúcares en etanol, gas carbónico y energía, por acción catalítica de microorganismos, especialmente levaduras (Garcia & Garcia.J, 2006).

2.2.1 Melaza de Caña de Azúcar. Conocida también como miel final y constituye el principal subproducto en la industria azucarera, llevándola a un proceso de fermentación con levaduras del tipo *Saccharomyces cerevisiae* para obtener el alcohol etílico (Gilces & Veloz, 2006).

La denominación melaza se aplica al efluente final obtenido en la preparación del azúcar mediante una cristalización repetida. El proceso de evaporación y cristalización es usualmente repetido tres veces, hasta el punto en el cual el azúcar invertido y la alta viscosidad de las melazas ya no permitan una cristalización adicional de la sacarosa (Fajardo & Sarmiento, 2007).

La miel o melaza final o residual es el subproducto (o producto final) ya sea de la fabricación o la refinación del azúcar crudo; es el líquido denso y viscoso que se separa de la masa cocida final de bajo grado, a partir del que no es posible cristalizar azúcar adicional mediante los métodos corrientes. Se describe por lo general como no comestible, porque no se usa para el consumo humano (Chen, 2000).

2.2.1.1 Propiedades físicas y químicas. La miel final o melaza es un líquido denso y viscoso de color oscuro, dulce y olor más o menos agradable, que queda como residuo de la fabricación o refinación de la sacarosa procedente de la caña de azúcar (Gilces & Veloz, 2006).

2.2.1.1.1 Viscosidad. Las relaciones entre concentración y viscosidad para soluciones de azúcar pura son igualmente válidas para las melazas. La viscosidad de las soluciones saturadas de azúcar impuro aumenta rápidamente con el contenido de impurezas debido al incremento de la concentración de sólidos. El efecto de las sales minerales sobre la viscosidad de las soluciones de azúcar es variable. Un enriquecimiento de iones Ca^{2+} aumenta la viscosidad, mientras que un incremento de iones K^{+} , la disminuye (Fajardo & Sarmiento, 2007).

Los compuestos orgánicos no azúcares, tienen un profundo efecto sobre la viscosidad, pues los componentes de alto peso molecular pueden incrementarla considerablemente (Fajardo & Sarmiento, 2007).

La aireación influye marcadamente sobre la viscosidad aparente de las soluciones de azúcar, y si se disminuye el contenido de aire en las melazas, disminuye la viscosidad (Fajardo & Sarmiento, 2007).

El efecto de las variaciones del pH sobre la viscosidad de las soluciones de azúcar es insignificante, excepto cuando el pH es superior a 11; en este caso, la viscosidad aumenta. El efecto de la concentración y la temperatura sobre la viscosidad de las melazas, tiene importancia práctica en la cantidad de melaza que fluye por las tuberías y bombas, así como la descarga por gravedad natural, o el desplazamiento por fuerza centrífuga, si se considera que la viscosidad de las melazas decrece a una temperatura dada, con una disminución de la concentración, y también cuando la concentración es constante y la temperatura aumenta (Fajardo & Sarmiento, 2007).

La región de viscosidad crítica en la melaza de caña, está en un intervalo de concentraciones en grados Brix entre 81 y 85. Esto significa que un aumento de solo algunas décimas en el valor de la concentración, determina un incremento notable en la viscosidad (Fajardo & Sarmiento, 2007).

2.2.1.1.2 pH. Las melazas de caña son ligeramente ácidas, tienen un pH entre 5,5 y 6,5; un pH bajo es atribuible a la presencia de ácidos alifáticos y al bajo pH de la clarificación, si es ácida (Fajardo & Sarmiento, 2007).

El pH de las melazas cambia con la temperatura y depende también de la naturaleza y de la cantidad de material estabilizador del pH que posea (Fajardo & Sarmiento, 2007).

La acción estabilizadora del pH tiene efecto sobre la melaza para resistir la adición de ácidos o álcalis, sin cambiar su naturaleza ácida o básica. En la melaza la acción estabilizadora depende del contenido de no azúcares y de las características de la melaza (Fajardo & Sarmiento, 2007).

La estabilización del pH en las melazas de caña tiene un patrón uniforme, es decir, no existen variaciones irregulares debidas a relaciones de cambio de peso entre las sustancias que intervienen, por lo tanto, la actividad estabilizadora se modifica (Fajardo & Sarmiento, 2007).

2.2.1.1.3 Calor específico y conductividad térmica. En las soluciones de azúcar, el calor específico depende de la temperatura, de la concentración y de la composición.

Se ha comprobado, que el calor específico disminuye al aumentar la concentración de las soluciones impuras de azúcar; es necesario, conocer el calor específico de las melazas para calcular la transferencia de calor durante el calentamiento o enfriamiento (Fajardo & Sarmiento, 2007).

2.2.1.1.4 Densidad. En las soluciones de azúcar, el calor específico depende de la temperatura, la concentración y la composición. Se ha comprobado, que el calor específico disminuye al aumentar la concentración de las soluciones impuras (Fajardo & Sarmiento, 2007).

2.2.1.2 Composición de la melaza. La miel final o melaza contiene la mayor porción de los no azúcares del jugo del cual se deriva, junto con una porción de sacarosa u azúcares reductores; por consiguiente, se desprende que la composición debe variar (como sucede con la composición del jugo de la caña) con la variedad y madurez de la caña, las condiciones climáticas y del terrazo, el grado de la molienda, la naturaleza de los procedimientos de clarificación y otros factores. Durante el proceso ocurren ciertos cambios; así, cualitativa y cuantitativamente, los no azúcares presentes en la miel difieren de los del jugo correspondiente. Los cambios ocasionados por la acción de la cal u otros álcalis a temperaturas elevadas sobre los azúcares reductores, especialmente la levulosa, constituyen la fuente principal de los nuevos compuestos que se encuentran en la miel (Chen, 2000).

2.2.1.2.1 Análisis Típico. No es posible formular un análisis típico, pero ciertas cifras generales revisten interés. La amplia gama de mieles como provienen de las centrífugas sería de 85 a 92 Brix o alrededor de 77 a 84% de sólidos por desecación. La sacarosa varía entre 25 a 40% y los azúcares reductores de 35 a 12% con la suma de los dos (azúcares totales) igual a 50% o mayor. La caña inmadura, como la que se encuentra en los países subtropicales, produce por lo general mieles con un más bajo en contenido de sacarosa y una mayor cantidad de azúcares reductores que la caña totalmente madura de los trópicos (Chen, 2000).

2.2.1.2.2 *Azúcares*. Los principales azúcares en la melaza son la sacarosa (60% - 63% en peso), la glucosa o dextrosa (6% - 9% en peso), y la fructosa o levulosa (5% - 10% en peso); estas dos últimas constituyen la mayor porción de los azúcares reductores encontrados en los análisis. La fructosa puede sufrir transformaciones al igual que la glucosa, debido a reacciones dependientes de la temperatura. El contenido de glucosa y fructosa en las melazas puede variar a causa de la hidrólisis de la sacarosa, a valores de pH ácido y a temperaturas altas (Fajardo & Sarmiento, 2007).

2.2.1.2.3 *No azúcares*. Los no azúcares están compuestos por 33% de sustancias inorgánicas (Fe^{+++} , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , As^{3+} , Cd^{2+} , Hg^+ , Pb^+ y Cl^- , NO_3^- , SO_2^-); el 42% corresponde a sustancias nitrogenadas (aminoácidos, péptidos, colorantes); y el 25% a sustancias orgánicas libres de nitrógeno (ácidos carboxílicos, alcoholes, fenoles, ésteres, vitaminas, gomas y dextranos) (Fajardo & Sarmiento, 2007).

2.2.1.2.4 *No azúcares orgánicos*. “Compuestos nitrogenados”. El nitrógeno total en las mieles varía de 0,4 a 1,5%, y basándose en esas cifras se calcula frecuentemente “la proteína cruda” como $\text{N} \times 6,3$, es decir, 2,5 a 9,0%. La proteína digerible puede tener un valor igual a la mitad o menos de la proteína cruda, un punto que reviste importancia en las mieles utilizadas para la alimentación (Chen, 2000).

2.2.1.2.5 *Cenizas*. En general la composición de las cenizas de las melazas es cualitativamente similar a la del jugo, del cual se obtiene éstas. Casi todos los análisis publicados, muestran que el contenido de potasa varía alrededor de 40% del peso del carbono total de la ceniza; el contenido de cal es de 10% al 20%, el de sulfatos varía entre el 10% y el 20%, y las sales de magnesio, sodio, aluminio, la sílice, los cloruros, fosfatos y los óxidos de hierro, completan el resto del contenido de cenizas (Fajardo & Sarmiento, 2007).

2.2.1.2.6 *Ácidos*. El ácido aconítico, es el más abundante de los ácidos orgánicos presentes en la caña que se acumula en las melazas, representando aproximadamente el 8% del peso de sólidos en la melaza. Los ácidos málico y cítrico están presentes en cantidades apreciables en las melazas. El ácido fórmico está presente como producto de descomposición; la mayoría de estos ácidos son metabolizados por los microorganismos, como fuente de carbono y no presentan problemas de inhibición de crecimiento (Fajardo & Sarmiento, 2007).

2.2.1.2.7 *Vitaminas*. Aquellas vitaminas resistentes a la acción del calor y de los álcalis, aparecen encontradas en las melazas. La niacina, ácido pantoténico y riboflavina, importantes para el crecimiento microbiano, pueden estar presentes en cantidades significativas y otras vitaminas lo están en cantidades muy pequeñas (Fajardo & Sarmiento, 2007).

2.2.1.2.8 *Fenoles y compuestos volátiles*. Los fenoles presentes en las mieles finales provienen de la parte fibrosa de la caña, éstos se derivan de los ácidos hidroxicinámico y parahidroxibenzóico (Fajardo & Sarmiento, 2007).

Es necesario tener en cuenta que, desde el punto de vista de la fermentación, algunos fenoles son indeseables, por presentar actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los microorganismos, a concentraciones de 0,5g/l. Los ácidos fenólicos que mayor actividad bacteriostática han demostrado son el cloragénico, el p-cumárico y el telúrico; estos dos últimos son capaces de inhibir totalmente el crecimiento de algunas bacterias. (Fajardo & Sarmiento, 2007).

2.2.1.2.9 Valor nutricional. Aunque hay muchos reportes sobre el valor nutritivo de las melazas, como ingredientes de las raciones para rumiante, parece haber poca concordancia entre los resultados obtenidos por los diversos investigadores. Aunque algunos de ellos llegan a la conclusión de que el valor nutritivo de las melazas es equivalente al 85% del maíz en grano (Fajardo & Sarmiento, 2007).

2.2.1.3 Microorganismos de la melaza. Mediante ensayos adecuados con soluciones diluidas de melazas, se ha demostrado que estas, a pesar de su bajo contenido de fósforo; constituyen un buen medio nutritivo para muchos microorganismos, tales como levaduras, hongos y bacterias (Fajardo & Sarmiento, 2007).

Se considera importante la presencia de microorganismos mesófilos y termófilos dentro de la melaza. Los organismos mesófilos se desarrollan bien durante la dilución de las melazas (Fajardo & Sarmiento, 2007).

2.2.2 Agua de dilución. El agua es uno de los agentes ionizantes más conocidos. Puesto que todas las sustancias son de alguna manera solubles en agua, se le conoce frecuentemente como el disolvente universal (Gilces & Veloz, 2006).

Un motivo importante de la dilución es facilitar el transporte del sustrato de un lugar a otro.

La altísima concentración de azúcares y sales presentes en las melazas impiden que los microorganismos puedan fermentarlas, debido a la gran presión osmótica que generan sobre sus paredes celulares; asimismo, las melazas son altamente viscosas, y su manipulación es difícil en estas condiciones. Por estas razones, es necesario diluir las melazas; para ello, se le agrega agua, hasta obtener diluciones de 25° Brix o menores; a valores mayores se tiene el riesgo de iniciaciones lentas de fermentación y contaminación bacteriana (Arteaga, Carvajal, & Bolaños).

La concentración elevada de sólidos (Brix) trae consigo la destrucción de las células de levadura, debido a la elevada presión osmótica. (Corporación Viñar S.A., s.f.).

2.2.3 Levadura. Las levaduras son organismos eucariotas, estas se diferencian de los hongos por presentar mayor actividad metabólica ($\text{moles O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), un crecimiento más rápido y tiene más efectividad como biocatalizadores (Parés & Juárez, 2002).

Se denomina levadura a los hongos que presentan predominantemente carácter unicelular. En contraste con los otros grandes grupos de microorganismos, las levaduras presentan escasa diversidad. Las levaduras solo se presentan en forma de células aisladas o, como mucho, pseudomicelios (células que no se desprenden en la gemación y forman una cadena). Se reproducen por ascosporas o solo asexualmente por gemación o división binaria (Parés & Juárez, 2002).

La gemación es una clase de reproducción asexual hecha por la mayoría de las levaduras, esto comienza con un debilitamiento local de la pared celular para dar pase a la formación de una pequeña protuberancia en la periferia de la célula, la pequeña protuberancia va creciendo al irse llenando con material citoplasmático y nuclear (replicación por mitosis), hasta llegar al tamaño de la célula madre. La reproducción sexual de la *Saccharomyces cerevisiae* se da por ascosporas mediante la fusión de dos células vegetativas compatibles (García, 2004).

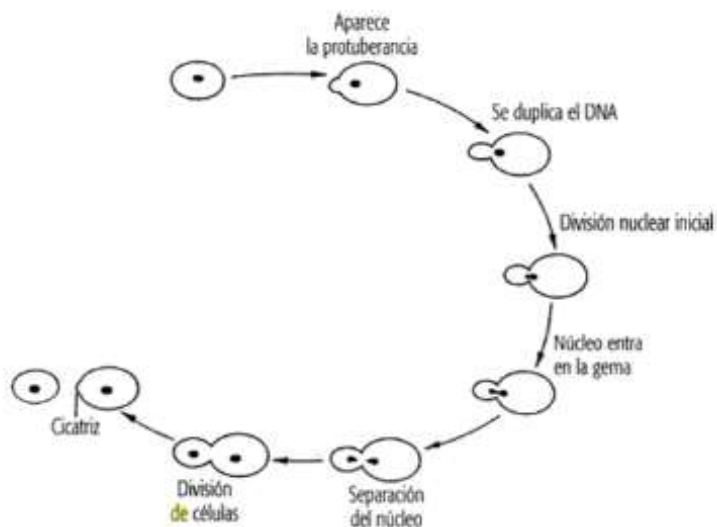


Figura 1. Reproducción asexual por gemación de una levadura.
Fuente: "Introducción a la Microbiología" por García, V., 2004.

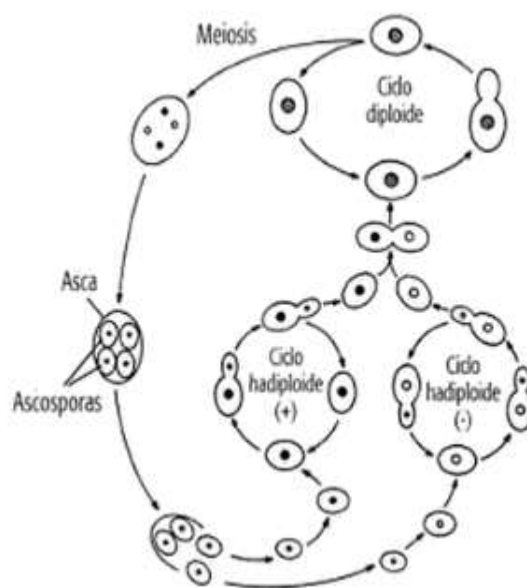


Figura 2. Reproducción sexual de una levadura.
Fuente: "Introducción a la Microbiología" por García, V., 2004.

Entre muchos microorganismos que han sido utilizados para la producción de etanol, *Saccharomyces cerevisiae* es sin duda la levadura de mayor uso a nivel industrial. Es un organismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, tolera altas concentraciones de etanol y de azúcares, en la fermentación produce bajas concentraciones de

subproductos y es osmotolerante (Restrepo, 2012). Así tenemos que la *Saccharomyces cerevisiae* y algunas especies próximas han sido muy empleadas, tanto en la microbiología industrial como en el desarrollo de la Bioquímica, gracias a esto se ha contribuido con la facilidad de disponer las levaduras de pan o de cerveza prácticamente puras y en condiciones excepcionalmente favorables de mantenimiento y cultivo (Parés & Juárez, 2002).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha evolucionado hasta llegar a ser un excelente microorganismo para la producción de bebidas alcohólicas (Tamayo, 2015).

El nombre de esta levadura deriva del vocablo *Saccharo* (azúcar), *myces* (hongo) y *cerevisiae* (cerveza), esta es una levadura heterótrofa, que obtiene la energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa (Suárez, Garrido, & Guevara, 2016). Esta especie fermenta la galactosa, la sacarosa, la maltosa y la rafmosa, y no utilizan nitritos (Campués & Tarupí, 2011).

Las células de *Saccharomyces cerevisiae* son generalmente redondas u ovaladas, presentan un tamaño entre 2 – 8 μm de diámetro por 3-15 μm de longitud, según la etapa de vida y las características del medio de cultivo (Calderon, 2007).



Figura 3. Imagen de una *Saccharomyces cerevisiae* en vista de un microscopio electrónico. Fuente: “Microbiology society”. Fungi, 2018.

En la Tabla 1, se presenta la clasificación taxonómica de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 1

Clasificación taxonómica de Saccharomyces cerevisiae

Taxón	Nombre	Comentarios
Reino	Fungi	
Filum	<i>Ascomicotina</i>	Formas Teliomorficas caracterizados por la formación de ascosporas encerrados dentro ascas
Sub-Filum	<i>Saccharomycotina</i> (<i>Sin. Hemiascomycotina</i>)	
Clase	<i>Saccharomycetos</i> (<i>Sin. Hemiascomycetos</i>)	Ascas no están dentro de ascosporas, se desarrollan directamente de cigotos
Orden	<i>Saccharomicetalos</i> (<i>Sin. Endomicetalos</i>)	Levadura rara vez en hifas
Familia	<i>Saccharomycetaceae</i>	
Genero	<i>Saccharomyces</i>	Forma ovoide, elíptica o cilíndrica. La reproducción vegetativa es por gemación multilateral. Pueden formarse Pseudohifas, pero las hifas no son septadas. La forma vegetativa es predominante. Diploide o de mayor poliploidia.
Especie-tipo	<i>S. cerevisiae</i>	

Nota. Adaptado de Briggs, Boulton, Brookes y Stevens, 2004 citado por “Evaluación de la estabilidad como starter de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de cerveza tipo lager”, Tamayo,K., 2015

En la Tabla 2 se muestra la composición de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 2
Composición de la levadura Saccharomyces cerevisiae

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

Nota. Adaptado de “*Levadura Saccharomyces cerevisiae y la producción de alcohol*”, Suárez, C.; Garrido, N. & Guevara, C., 2016, ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar, 50, 20-28.

Se denomina cultivo anéxico o puro al que contiene solo un tipo de microorganismos, es decir descende de una sola célula. Los cultivos puros suponen unas condiciones no naturales de iniciación a partir de colonias aisladas UFC, de tal forma la totalidad de individuos que conforman la colonia tienen la misma composición genética. En el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, son esenciales para tener el control de la fermentación etanólica, dirigiendo su metabolismo bajo condiciones controladas para producir los productos deseados (Altamirano, 2013).

2.2.3.1 *Sustratos para la levadura.* Como las melazas presentan deficiencia de fuentes de nitrógeno, el medio líquido debe ser suplementado con amonio, urea, sales de amonio o fosfato y una adición de minerales de calcio, magnesio y trazas de elementos como zinc, molibdeno, níquel y otras vitaminas.

2.2.3.2 *Propagación de la levadura.* La propagación tiene como objetivo obtener un volumen de células de levadura de cultivo anéxico, por ser una etapa importante, se debe asegurar que el cultivo sea puro y libre de contaminación, con una concentración celular óptima para ser utilizado en la primera escala de fermentación, esto se lleva acabo utilizando métodos microbiológicos tradicionales (Altamirano, 2013).

Para generar en el laboratorio la propagación celular de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, es necesario realizar una serie de cultivos intermedios, un escalamiento del medio de cultivo progresivamente creciente. El medio de cultivo adecuado para esta etapa de propagación es el caldo estéril de extracto de levadura, glucosa y peptona (YPG). El crecimiento de las células de levadura en el medio nutritivo, es estimulado por la continua aireación estéril, además se debe asegurar una óptima tasa de transferencia de oxígeno, alcanzándose una concentración celular por el método de recuento de células de levadura en cámara de Neubauer dentro del rango de 150-200 x 10⁶ células/ml, con una vitalidad y viabilidad superior al 98% en el medio de propagación destinado como inóculo o estárter (Altamirano, 2013).

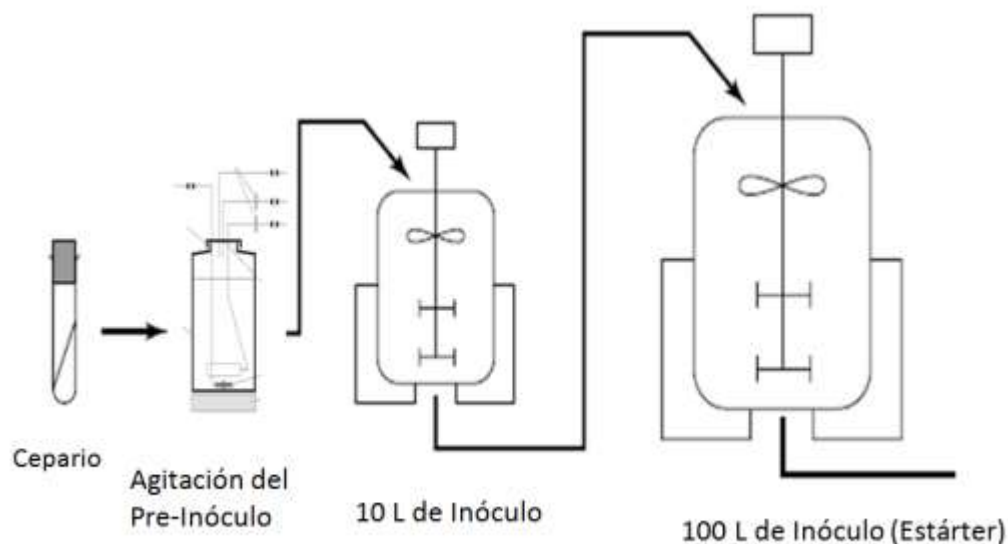


Figura 4. Escalamiento del cultivo de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*. Fuente: “Optimización de un método para la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la etapa de fermentación del mosto de cerveza, desde un nivel de laboratorio a un nivel piloto”, Altamirano, C., 2013

2.2.3.2.1 *Conteo celular*. El conocer la densidad celular nos permite predecir la cinética de crecimiento y por medio a esto, podemos determinar cuál es el tiempo necesario para obtener los metabolitos deseados y lograr resultados óptimos en la fermentación. Existen diferentes sistemas para detectar y medir el crecimiento de microorganismos, entre ellos tenemos al recuento directo (Altamirano, 2013).

- **Recuento directo:** La cámara de Neubauer Improved (Figura 5), es la que se utiliza para este procedimiento, con ella obtenemos un conteo celular y viabilidad de las levaduras (Altamirano, 2013). El responsable encargado de esto debe estar debidamente capacitado ya que el conteo se debe realizar de manera minuciosa, tener mucha paciencia para no equivocarse y así obtener un buen resultado.

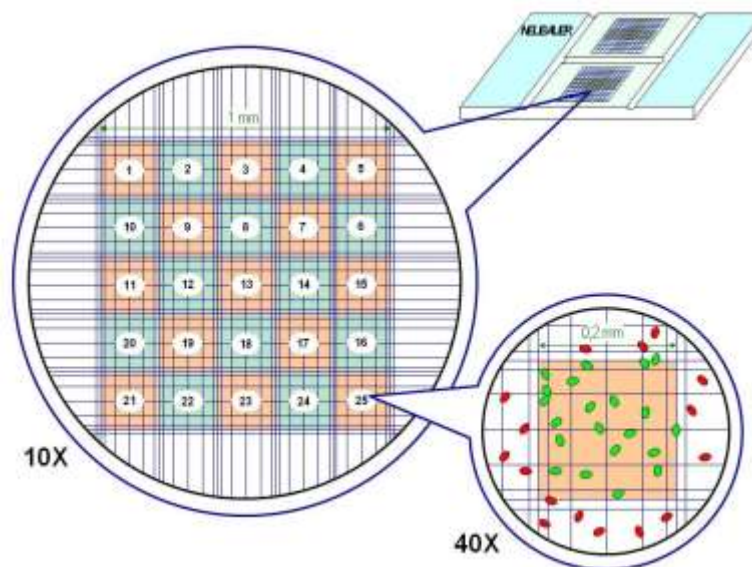


Figura 5. Cámara de conteo Neubauer Improved Fuente: “Cámara de conteo Neubauer improded”, Universidad del País Vasco, Mikros testak.org,s.f.,URL:http://insilico.ehu.eus/camara_recuento/neubauer_improved.php.

2.2.3.3 Bioquímica de la reacción de fermentación. La fermentación de glucosa a etanol y CO_2 por las levaduras se conoce desde muy antiguo, pero la investigación científica del mecanismo de la glucolisis empezó en la segunda mitad del siglo XIX (Villavicencio, 1993).

La reproducción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se lleva a cabo en condiciones aeróbicas, y utiliza la glucolisis y el ciclo de Krebs como metabolismo oxidativo para la generación de energía y biomasa, por el contrario cuando se encuentra en ausencia de oxígeno y se encuentre en las condiciones adecuadas, la levadura sigue la vía glucolítica generando el piruvato y posteriormente se convierte en etanol por acción enzimática (Calderon, 2007).

La glucolisis o vía de Embden-Meyerhof es un proceso por el cual la glucosa es convertida en piruvato generando 2 moles de ATP/mol de glucosa gracias a la acción catalítica de diez enzimas consecutivas (Villavicencio, 1993).

La glucosa libre para metabolizarse necesita ser activada, ya que hay tres barreras energéticas en la parte inicial de la vía glucolítica. Esta activación metabólica se consigue por fosforilación de

las hexosas por el ATP. El ATP no solo actúa como dador de fosfato, sino que además la energía liberada que acompaña el proceso de transfosforilación, permite sobrellevar la formación endergónica y termodinámicamente desfavorable de glucosa 6-fosfato y fructosa 1,6-bisfosfato. Los intermediarios glucolíticos entre glucosa y piruvato, todos son fosforilados (Villavicencio, 1993).

En condiciones de fermentación anaeróbicas, el metabolismo del piruvato sigue la vía denominada vía fermentativa, el piruvato tiene numerosos destinos alternativos en los microorganismos anaeróbicos y microaerofílicos, por ejemplo en las bacterias lácticas, el piruvato se convierte a lactato en un solo paso, mientras las levaduras convierten el piruvato en etanol en una ruta de dos pasos (Calderon, 2007).

En la primera etapa el piruvato es descarboxilado a acetaldehído por la descarboxilasa pirúvica (Villavicencio, 1993).

La segunda etapa es la reducción del acetaldehído a etanol que depende de NADH, catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa (Calderon, 2007).

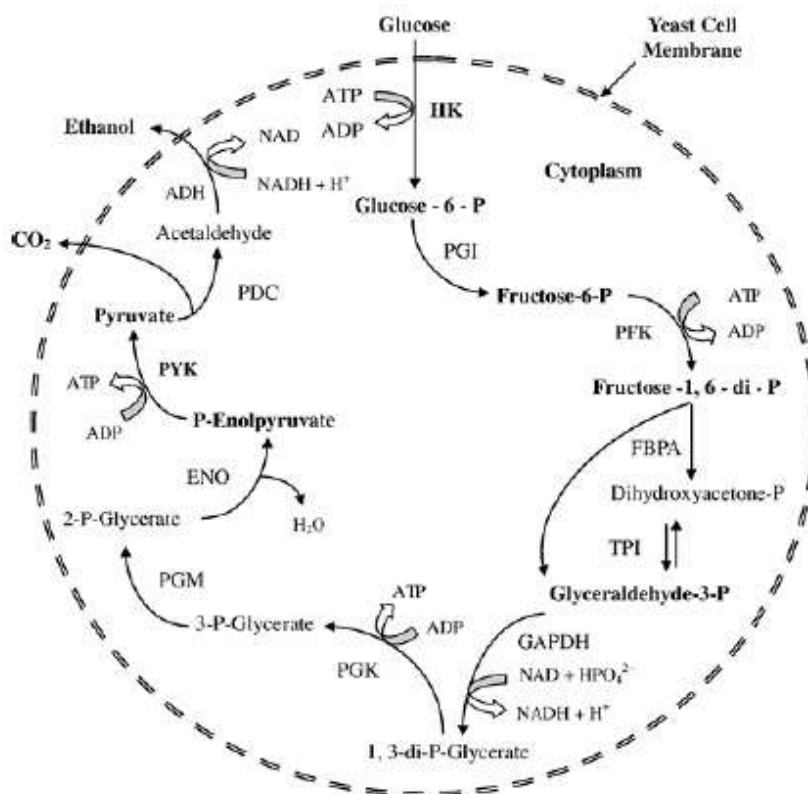


Figura 6. Ruta metabólica para la fermentación y producción de etanol empleando *S. Cerevisiae*. Abreviaturas: HK: Hexoquinasa; PGI: Glucosa fosfato isomerasa; PFK: Fosfofructoquinasa; FBPA: Fructosa biofosfato aldosa; TPI: Triosa fosfato isomerasa; GAPDH: Gliceralehído 3-fosfato deshidrogenasa; PGK: Fosfoglicerato quinasa; PGM: Fosfogliceratomitasa; ENO: Enolasa; PYK: Piruvato quinasa; PDC: Piruvato descarboxilasa; ADH: Alcohol deshidrogenasa. Fuente: “*Ethanol fermentation techonologies from sugar and starch feedstocks*”, Bai, F.; Anderson, W.; Moo-Young, M., 2007, *Biotechnology advances*, 89-105.

A continuación, se presentan las etapas fundamentales de la fermentación de la glucosa (Parés & Juárez, 2002).

- Formación de hexosas fosfato.
- Formación de triosas fosfato.
- Oxidación de gliceraldehído-3P.
- Formación de piruvato.
- Descarboxilación del piruvato.
- Reducción del acetaldehído.

Se considera tres tipos de reacciones fundamentales (Parés & Juárez, 2002):

- Transferencia de grupos fosfato.
- Transferencia de H^+ .
- Roturas del enlace C-C.

2.2.4 Fermentación discontinua. Son llamados también procesos en lote o Batch, estos pueden considerarse como un sistema cerrado, a lo largo de la fermentación se adiciona un agente antiespumante y ácidos o bases para controlar el pH (Fajardo & Sarmiento, 2007).

2.2.5 Parámetros a controlar en la fermentación

2.2.5.1 El pH. La importancia del pH en la fermentación no solo radica con el desarrollo de la levadura, sino también con la tasa de fermentación y la formación de espuma (Calderon, 2007).

El pH tiene un efecto en la velocidad de crecimiento y en el rendimiento (Quintero, 1981).

Con la presencia de un pH ácido, la inversión de sacarosa del sustrato a sus componentes monoméricos aumenta, incidiendo en el tiempo de fermentación. Cuanto mayor sea la disponibilidad de sacarosa invertida será benéfico para las levaduras y se originara una mayor tasa

de fermentación, al no presentarse la contaminación bacteriana o microbiológica en ello. Sin embargo, con pHs casi neutros, se facilita el desarrollo de flora microbiana contaminante del proceso y en consecuencia formación de subproductos indeseables (Calderon, 2007).

Una reacción optima de fermentación, se realiza con un pH de 4,5 y 5,0 (Carpenter, 1979), no obstante la variación del pH del mosto se encuentra supeditada al normal desarrollo de las levaduras, que estas no se perturben o inhiba el poder enzimático de las enzimas (Palacio, 1956).

En términos de acidez total, la reacción del medio optimo se da en 2,0- 2,5 g, de ácido sulfúrico por litro de mosto (Corporación Viñar S.A., s.f.).

2.2.5.2 *Requerimientos Nutricionales.* En la etapa fermentativa se suministra diferentes tipos de nutrientes, como son el sulfato de amonio y urea, dadores de nitrógeno y como aportador de fosfato se tiene al fosfato dibásico o fosfato de amonio (Campués & Tarupí, 2011).

Las sales minerales son importantes para la levadura (crecimiento) y también para las reacciones enzimáticas que ocurren durante la fermentación alcohólica. Normalmente se encuentra un desequilibrio entre diferentes sales minerales, en consecuencia, una suplementación de estas se torna necesaria, si tomamos como ejemplo el fosforo, una deficiencia de este elemento perjudicaría la fermentación porque afecta directamente al ciclo de la fermentación alcohólica. La adición de otras sales como el magnesio, cobalto, en dosis mínimas, se vuelve favorable para el proceso (Corporación Viñar S.A., s.f.).

El nitrógeno es un elemento importante en el desenvolvimiento de la levadura de la fermentación alcohólica, el nitrógeno amoniacal se asimila más rápido que el amínico (Corporación Viñar S.A., s.f.).

Las vitaminas son sintetizadas por las levaduras, pero algunas se encuentran en el substrato, se sabe que el complejo B, es muy requerido por el microorganismo fermentativo y un déficit de este puede ocasionar dificultades en la fermentación (Corporación Viñar S.A., s.f.).

2.2.5.3 Temperatura. La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, da lugar a la fermentación con un rango de temperatura, desde los 13-14°C hasta los 33-35°C, a una mayor temperatura del rango establecido, la velocidad del proceso es mayor y se producirán más productos secundarios, mientras que a menor temperatura, se torna difícil conseguir un mayor grado alcohólico porque las temperaturas altas hacen fermentar rápido a las levaduras, llegando a agotarlas antes (Campués & Tarupí, 2011).

La temperatura influye, en el tiempo de fermentación y en el metabolismo de las levaduras, el cual determina la composición química del producto y la aparición o no de sustancias no deseadas (Restrepo, 2012).

La fermentación es una reacción exotérmica, y la temperatura inicial puede aumentar de 1,5 a 2,5 °C (Hernández A. , 2003). De modo que la temperatura se torna un parámetro importante a controlar, porque a temperaturas mayores de 37°C, aumenta el efecto inhibitor del etanol, favorecen el desarrollo bacteriano, y las levaduras comienzan a morir deteniéndose el proceso fermentativo (Restrepo, 2012).

2.2.5.4 Aireación. La fermentación se lleva a cabo en un periodo definido de tiempo, durante el cual varia la composición del medio de cultivo, concentración de la biomasa o la de metabolitos (Hernández A. , 2003).

La diferencia entre la fermentación anaeróbica y aeróbica, es que en la primera, la mayor parte del carbono se emplea como energía, y solo el 2% se asimila como material celular, en cambio en la segunda, se produce gran cantidad de biomasa porque una característica de la levadura

Saccharomyces cerevisiae es la de poseer una alta actividad metabólica (Fajardo & Sarmiento, 2007).

La fermentación inicial se inicia en presencia de oxígeno, para la obtención de gran masa celular, a medida que avanza la fermentación, el gas carbónico y la carencia de oxígeno, crearan condiciones favoreciendo el metabolismo de los azúcares por fermentación (Corporación Viñar S.A., s.f.).

2.3 Etapas del proceso fermentativo en Industrial Pucalá S.A.C.

2.3.1 Etapa 1: Activación de levadura. El inicio del proceso se da con la activación de la levadura refrigerada que se almacena en un tubo de ensayo, a esta se le prepara un caldo con nutrientes necesarios para su reproducción. El caldo consta de los siguientes insumos: 10 g de azúcar, 1 g de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 0,2 g de MgSO_4 , 0,2 de KCl, 0,2 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 1 g de extracto de malta, 1 g de extracto de levadura granulada y 1 g de pectona, a continuación se enrasa con agua destilada a 100 ml. La mezcla se calienta de 30-35°C y por último se adiciona la levadura, finalmente se deja reposar por 24 - 48 hr. (Ver anexo C)

2.3.2 Etapa 2: Caldo de nutrientes. Se elabora una vez más el caldo de nutrientes, y se adiciona a la mezcla anterior, teniendo finalmente un total de 200 ml con levadura inicial, esto se deja reposar 12 hr. (Ver anexo C)

2.3.3 Etapa 3: Primeros cortes. En este paso se efectúa el primer corte, tomando una alícuota de 100 ml para llevarlo a un matraz de 1 l. que contiene 900 ml de melaza diluida (18 °Brix), 4 g de $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ /l, 1 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ /l y 1 ppm de antibiótico (Lipasa 9200), a esto se le inyecta aire durante 12 hr obteniendo un °Brix de 7 al final. Como se va a necesitar tener 200 ml para el siguiente corte, se realiza nuevamente la etapa 2 en etapa, todo en simultáneo. (Ver anexo C)

2.3.4 Etapa 4: Transvasado y acondicionamiento. Teniendo 1 litro de la anterior etapa se lleva a acondicionar con 4 litros de melaza diluida a 18 °Brix aquí también se le agrega 4 g de $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ /l, 1 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ /l y 1 ppm de antibiótico (Lipasa 9200) teniendo un total de 5 litro, a esto se le inyecta aire por 12 horas, se llega a un °Brix final de 7. (Ver anexo C)

2.3.5 Etapa 5: Transvasado y acondicionamiento II En un cilindro se mezcla los 5 litros trabajados en la etapa 4, con 35 litros de melaza diluida a 18 °Brix, además se le adiciona los nutrientes anteriores: 4 g de $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ /l, 1 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ /l y 1 ppm de antibiótico (Lipasa 9200), se continua con la inyección de aire por 12 hr hasta llegar a 7 °Brix. (Ver Anexo C)

2.3.6 Etapa 6: Transvasado y acondicionamiento III. Al contenedor de la etapa 5, se le agrega 160 litros de melaza diluida a 18 °Brix para así tener un total de 200 litros, del mismo modo se le sigue adicionando la $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y Lipasa 9200 a las cantidades que se mencionaron anteriormente, la aireación es continua por 12 hr. (Ver Anexo C)

2.3.7 Etapa 7: Etapa inicial en prefermentadores: La etapa de prefermentación se inicia con el llenado del 10% de capacidad de los prefermentadores, esto consiste en los 3000 litros de melaza más los 200 litros de la etapa anterior, comienza la etapa con un °Brix de 12, a todo esto, se le adiciona los nutrientes ya conocidos en las mismas cantidades y aire. Se deja reposar un promedio de 12 hr. (Ver anexo C)

2.3.8 Etapa 8: Etapa final en prefermentadores: La etapa de prefermentación finaliza con el llenado total de estos prefermentadores a 12 °Brix, también se le suma los nutrientes anteriores con una variación del antibiótico, 2 ppm, por la parte inferior de los equipos se inyecta aire de forma constante, resultado de esto un °Brix final de 7 a 6 en un estimado de 8 a 9 horas. (Ver anexo C)

2.3.9 Etapa 9: Fermentación en Mosteras. El paso a los fermentadores se lleva acabo trasvasando el 10% de volumen de los fermentadores más melaza diluida a 20 °Brix, aquí solo se le adiciona antibiótico. El °Brix inicial es de 18 a 19. Esto se deja fermentar durante 24 hr o hasta que se agote. En promedio el °Brix final es igual a 7. (Ver Anexo C)

2.3.10 Nutrientes en la fermentación

2.3.10.1 Urea. La urea, conocida también como carbamida, carbonildiamida o ácido arbamídico, es un compuesto cristalino e incoloro, soluble en agua y alcohol, poco soluble en éter (QuimiNet, 2007).

Suplementar el mosto con una fuente de nitrógeno asimilable, es una práctica común durante el proceso de fermentación, porque una deficiencia de este genera fermentaciones lentas o atascadas debido a que el nitrógeno es esencial para el metabolismo y el crecimiento de la levadura, de preferencia la adición en el mosto se realiza en etapas tempranas de la fermentación. Sin embargo, los excesos de nitrógeno pueden conducir a la producción de metabolitos no deseados como el carbamato de etilo o aminas biogénicas, en consecuencia, la cantidad suministrada de nitrógeno debe ser la justa, para la fermentación, sin excesos. La cantidad mínima absoluta de nitrógeno requerido para la fermentación se vuelve difícil de determinar porque cada cepa de levadura tiene diferentes requisitos de nitrógeno (Martínez, Morales, Gonzales, Mas, & Beltran, 2012).

Tabla 3
Propiedades de la Urea

Propiedad	Característica
Peso molecular	60,06 g/mol
Densidad	768 kg/m ³
Punto de fusión	132,9 °C
Calor de fusión	5,78 a 6 cal/g
Calor de combustión	2531 cal/g
Acidez equivalente a carbonato de calcio	84 (Partes de carbonato de calcio necesarias para neutralizar el efecto acidificante de 100 partes de urea)
Índice de salinidad	75,4
Calor de disolución en agua	57,8 cal/g (endotérmica)
Energía libre de formación a 25°C	47120 cal/mol (endotérmica)
Corrosividad	Altamente corrosivo al acero al carbón Poco corrosivo al Al, Zn, Cu

Nota. Adaptado de “Urea”, Textos científicos.com, 2005, URL: <https://www.textoscientificos.com/quimica/urea>.

2.3.10.2 Fosfato monoamónico. El fosfato monoamónico (NH₄)₃PO₄ (fosfato de amonio monobásico u ortofosfato), es una sustancia inorgánica en cuya estructura lleva un grupo fosfato (H₂PO₄) y amonio (NH₄), esa sal es soluble en agua y se produce al reaccionar amoniaco (NH₃) con ácido fosfórico (H₃PO₄), esta sustancia es normalmente estable (Rodriguez, 2018).

Las fuentes de nitrógeno necesarias en la fermentación son dos comúnmente conocidas las NAL (nitrógeno orgánico) y las DAP (nitrógeno inorgánico). Por un bajo nivel de nitrógeno asimilable las levaduras no terminan de consumir todo el azúcar presente, y una manera de evitar tal situación es cuando se le adiciona fosfato monoamónico, el cual es una fuente de nitrógeno y fosforo (Cabello, 2012).

En la Figura 7 se demuestra que en bajos niveles de nitrógeno, las fermentaciones son lentas a comparación de mostos con niveles de nitrógeno altos.

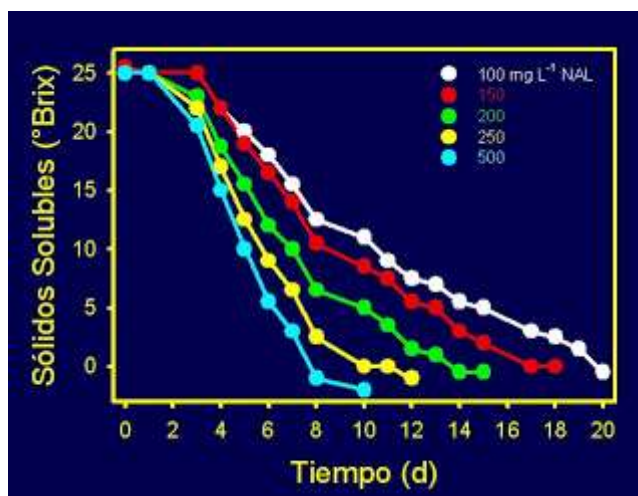


Figura 7. Efecto de la concentración de nitrógeno sobre la fermentación. Fuente: "Importancia del nitrógeno para las levaduras", Cabello, A., 2012, Blog: Fratelli Pasini, URL: <http://vinospasini.blogspot.pe/2012/02/importancia-del-nitrogeno-para-las.html>.

2.3.11 Insumos en la fermentación

2.3.11.1 Antiespumante. La espuma presente en las destilerías tiene una importancia en diversos aspectos de la empresa como técnico - económico, medioambiental y social, porque la espuma puede (Hernández R. , s.f.):

- Ocasionar perdidas por derrame.
- Reducir la capacidad en sistemas abiertos.
- Incrementar costos en limpieza general.
- Perturbar instrumentos de proceso (sensores, bombas, filtros).
- Conllevar a un impacto ambiental negativo cuando son descargados en zanjas, lagos o ríos.

La espuma presente en los fermentadores informa sobre el estado en que se encuentra el proceso, además de actuar como una capa de sellaje al mantener las condiciones de anaerobiosis. Esta espuma se forma por el CO_2 generado en la reacción química y en el llenado de las dornas, se destaca que en la política de las empresas se contrarrestan las pérdidas de material, y como una consecuencia del levantamiento excesivo de espuma, se ocasionan pérdidas, se ejerce una actividad supresora de la espuma, la aplicación del antiespumante es una de ellas (Hernández R. , s.f.).

Preparación del Mosto:

El termino mosto se traduce a cualquier liquido azucarado que se puede fermentar, incluyendo diferentes materias primas, entre las mencionables (melaza y jugos) tienen una composición variable de sólidos, azúcares, sales minerales, acidez, temperatura, etc., por ello se considera tener sumo cuidado para que estén dentro de ciertas características por un medio ideal.

2.4 Alcohol etílico

El alcohol etílico, cuya fórmula química es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$, es el componente activo esencial de las bebidas alcohólicas. Puede obtenerse a través de dos procesos de elaboración: la fermentación o descomposición de las azúcares contenidas en distintas frutas, y la destilación, consistente en la depuración de las bebidas fermentadas (Cadena Agroindustrial, 2004).

La obtención de alcohol etílico se puede dar de dos formas, una por hidratación del etileno y también por fermentación de melazas, las materias primas empleadas son la caña de azúcar y algunos granos (Cadena Agroindustrial, 2004).

“El etanol es un líquido de sabor ardiente, olor agradable y soluble en el agua” (Barrio, Andrés, & Antón, 2008). Las propiedades fisicoquímicas del etanol se encuentran mencionadas en la Tabla 4.

Tabla 4
Propiedades físico químicas del Alcohol Etilico

Propiedades	Característica
Peso molecular	46,07
Forma y color	Col. Liq.
Gravedad específica	0,789 ^{20/4}
Punto de fusión (°C)	-112
Punto de ebullición (°C)	78,4
	C ₁ =1,648; C ₂ =0,27627; C ₃ =513,92; C ₄ =0,2331
Densidad kmol/m ³ (T, °k)	$\frac{C_1}{(C_2)^{1+(1-\frac{T}{C_3})^{C_4}}}$
Temperatura crítica, K	513,92
Presión crítica * 1[E-06], Pa	6,12
Volumen crítico, m ³ /kmol	0,168
Calor de fusión, cal/g	25,76
	C ₁ * 1E-07 = 5,6900; C ₂ = 0,3359; C ₃ =0; C ₄ =0
Calor de vaporización J/kmol (T, °k)	$T_r = \frac{T}{T_c}$ $\Delta H_c = C_1 * (1 - T_r)^{C_2 + C_3 * T_r + C_4 * T_r * T_r}$

Nota. Adaptado de “Perry’s Chemical Engineers’ Handbook”, Mc Graw-Hill, Perry, R. ,1997, Ed 7ma

2.5 Rendimiento Alcohólico

El resultado de una fermentación se puede medir a partir de ciertas variables:

Rendimiento (real), cantidad de producto generado a partir de un sustrato determinado

Fórmula:

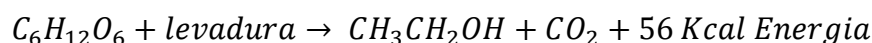
$$\frac{\text{Mole o Gramos del producto}}{\text{Moles o Gramos del sustrato}} * 100$$

El % de rendimiento, relaciona el rendimiento real con el rendimiento teórico

Fórmula:

$$\frac{\text{Rendimiento real}}{\text{Rendimiento teórico}} * 100$$

Rendimiento ideal (Gay-Lussac): Gay-Lussac estableció las siguientes relaciones según la ecuación química de la fermentación:



$$180 \text{ g de Glucosa} \rightarrow 92 \text{ g Etanol}$$

$$100 \text{ g de Glucosa} \rightarrow x$$

$$x = 51,1 \text{ g}$$

100 g de glucosa producen 51,1 g de Etanol, o 64,34 ml de Etanol a 15°C dado que la densidad del Etanol puro es 0,7943. Se liberan 56 Kcal, cuando un mol de glucosa se convierte en CO₂ y etanol, lo que se distribuye 40 Kcal disipadas en forma de calor y 16 Kcal almacenadas como energía química en forma de ATP (Barrera & Reyes, 2015).

La ecuación de Gay- Lussac no lleva en consideración la perdida de alcohol por evaporación, proyección, esterificación y oxidación (Corporación Viñar S.A., s.f.).

Rendimiento teórico (Pasteur)

Pasteur considera que el rendimiento teórico es aproximadamente el 95% del rendimiento ideal, porque se producen diferentes productos generados en mostos bien preparados y una fermentación normal (Barrera & Reyes, 2015).

Solo el 95% del azúcar reductor que ingresa al proceso es convertido en alcohol por la levadura, mientras que el 5% restante es empleado para el crecimiento celular y producción de otros metabolitos como ácidos orgánicos (Calderon, 2007).

2.6 Contaminación bacteriana

2.6.1 Fuentes de contaminación y proliferación. La melaza es la principal fuente de contaminación, comenzando con el cultivo de caña de azúcar hasta la producción de la melaza esta actúa como un reservorio importante de contaminantes, debido a su alto contenido de azúcar presente constituye un medio de cultivo para la flora microbiana, además durante su procesamiento y/o limpiezas poco eficientes en las pozas de almacenamiento, conducen al mantenimiento de microorganismos no deseables e incluso incontrolables a nivel de la fermentación alcohólica (Jacques, Lyons, & Kelsall, 1999).

La naturaleza de la melaza y el tratamiento que esta recibe durante la cristalización, puede contener una contaminación bacteriana, que por medio de su metabolismo producirían ácidos orgánicos lo cual conlleva a una disminución en el metabolismo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y como consecuencia hay una disminución en el rendimiento alcohólico a partir del sustrato, así como la generación de características indeseables en el producto final (Ruckle, 2005).

Una fuente adicional de contaminación, se presenta en los residuos de materia prima (melaza) que se adhieren a las líneas y la recirculación y/o propagación continua de levadura, porque brindan las condiciones adecuadas para el crecimiento microbiano, cuando un tipo de bacteria logra colonizar un sistema, se torna difícil la remoción y el control de este grupo, por ello los mecanismos de prevención y control se deben tener en cuenta constantemente (Bellissimi & Ingledew, 2004).

2.6.2 Infección de bacterias en la fermentación. Las condiciones en la fermentación como acidez, temperatura, concentraciones de sustrato e higiene así como el procesamiento mismo (preparación de pie de cuba y de mosto, limpieza, etc.) se tornan favorables para el desarrollo de otros tipos de microorganismos a parte de la levadura y actúan sobre los azúcares o sobre los productos originales de la fermentación alcohólica (oxidación de alcohol a ácido acético), formando otros compuestos (Gusils, y otros, 2018).

Las destilerías cuentan con un problema frecuente, que es la contaminación bacteriana durante el proceso de fermentación, desde la llegada de materia prima hasta la destilación final. La introducción de los contaminantes bacterianos hace que disminuya la cantidad del sustrato total destinado para las levaduras porque ambos compiten por este, conduciendo a una disminución del rendimiento de alcohol etílico o introducción de productos indeseables (Bayona, Ardua, Castellanos, & Rojas, 2002).

En las destilerías han sido encontrados microorganismos contaminantes como: *Lactobacillus sp*, *Sporolactobacillus sp*, *Zymomonas sp*, *Micrococcus sp*, *Acetobacter sp* y *Gluconobacter sp*. (Altech's, 1995). Se destacan las bacterias pertenecientes a los géneros como *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Costridium*, *Bacillus*, *Aeroobacte*, *Sreptococcus* y *Leuconostoc*. (Gilces & Veloz, 2006).

De acuerdo con los productos resultantes del metabolismo de esos grupos de microorganismos, esas bacterias son denominadas homofermentativas cuando el metabolito formado en mayor proporción es ácido láctico, y heterofermentativo cuando además del ácido láctico están presentes cantidades apreciables de otros ácidos orgánicos (butírico, acético, fórmico) (Gilces & Veloz, 2006).

El Dextrano y el Levaneo, son compuestos que también se hallan debido al metabolismo de algunos tipos de bacterias presentes durante la infección, como bacterias del género *Leuconostoc* y *Bacillus*, estas desdoblan la sacarosa y forman polímeros de peso molecular alto. Mientras que las bacterias pertenecientes al género *Acetobacter*, transforman el alcohol en ácido acético, su presencia trae serias consecuencias debido a que no solo compiten con la utilización de azúcar, sino que disminuyen la eficiencia de la levadura alcohólica debido a la toxicidad de sus productos metabólicos (Gilces & Veloz, 2006).

El dextrano tiene la característica de una sustancia mucilaginosa, su efecto es perjudicial porque conlleva a la pérdida de azúcares fermentables también genera una película superficial y aumenta la viscosidad del mosto de fermentación (Calderon, 2007). El levano, es un oligómero de fructosa que disminuye el rendimiento de etanol y además aumenta considerablemente la viscosidad del medio de fermentación, dificultando su manipulación y la separación del etanol en operaciones unitarias posteriores (Mariscal, 2011).

Tabla 5

Fermentación: Dextrano y Levanio

Característica	Fermentación del dextrano	Fermentación del levanio
Bacterias	<i>Leuconostoco mesenteroides</i>	<i>Bacillus</i> <i>Aerobacter</i> <i>Streptococcus</i>
Diagnostico	Aumento de viscosidad del mosto. Dificultad del desprendimiento del gas carbónico.	Aumento de viscosidad. Dificultad del desprendimiento del gas carbónico.
Condiciones de infección	Mala calidad de materia prima. Temperaturas elevadas del mosto en la fermentación (30-35°C).	Mala calidad de materia prima. Temperaturas elevadas del mosto en la fermentación (30-35°C).

Nota. Adaptado de “Manual de operación de destilerías de Alcohol Etílico”, Corporación Viñar, s.f.

2.7 Tratamiento contra la contaminación bacteriana.

La contaminación bacteriana se puede controlar a través de los siguientes factores (Barrera & Reyes, 2015):

- Emplear materia prima bien conservada.
- Preparar los mostos adecuadamente, de buena calidad.
- Usar los antisépticos dentro de las especificaciones técnicas.
- Emplear un fermento vigoroso, puro y en cantidad suficiente para realizar el proceso fermentativo en tiempo razonable.
- Efectuar contantemente análisis microscópicos para verificar el grado de contaminación de la levadura.
- Mantener todas las instalaciones de la destilería en condiciones asépticas.

Aquellas sustancias adicionadas a los mostos, por el motivo de causar un medio desfavorable a los microorganismos no deseables como las bacterias, se denominan antisépticos. Estos productos disminuyen la vitalidad bacteriana e impiden o retardan la multiplicación. Algunos antisépticos aparte de combatir las infecciones, estimulan la acción enzimática de la levadura, acelerando la fermentación y mejorando considerablemente su rendimiento. (Corporación Viñar S.A., s.f.)

2.7.1 Antibióticos. En teoría la producción de etanol es relativamente simple, pero en la práctica es muy complicado, esto se debe a diversos ítems intermediarios y otros factores externos, como las bacterias, los tanques de fermentación rutinariamente se contaminan, los productores no entienden el origen de esto, pero asumen que ingresa desde la materia prima o ya se encuentra presente en el entorno de la planta. Una salida viable es el uso de un antibiótico, los más comúnmente usados son la penicilina, virginiamicina, eritromicina, tilosina o tetraciclina (Olmstead, 2009).

2.7.1.1 Bactericida, BetaBio 45%. El BetaBio 45% es un bactericida natural producido por el lúpulo en extracto (Wallerstein Industrial y Comercial Ltda, s.f.).



Figura 8. *Humulus lupulus*. Fuente: “*Humulus lupulus*”, Cretan Botano Mountain Herbs, s.f. URL: <https://botano.gr/products/humulus-lupulus>.

Los compuestos del lúpulo actúan como inóforos, estos disipan el gradiente de pH a través de la membrana celular de las bacterias; hace que interrumpa la producción de energía y la absorción de nutrientes impidiendo su desarrollo y crecimiento, esto le brinda el carácter antibacteriano a lúpulo (Tzarax, 2015).

Los ácidos “alfa” y “beta” son componentes del lúpulo, en altas concentraciones. Los Beta-ácidos son conocidos por su intensa actividad antimicrobiana, sobre todo contra las bacterias gram-positivas y algunas algas (Wallerstein Industrial y Comercial Ltda, s.f.). Los ácidos Beta así como el alfa son metabolitos secundarios de alta toxicidad (Tzarax, 2015). Los β -ácidos se componen de Colupulona, Lupulona, Adlupulone, la estructura química se visualiza en la Tabla 6:

Tabla 6

Estructura química de beta - ácidos

β -ácidos	Estructura química
Colupulona	$R = -CH - (CH_3)_2$
Lupulona	$R = -CH_2 - CH - (CH_3)_2$
Adlupulone	$R = -CH(CH_3) - CH_2 - CH_3$

Nota. Adaptado de “Beta-Bio-45.docx”, Túllume, L., 2016 URL: <https://es.scribd.com/document/317549913/Beta-Bio-45-docx>.

2.7.1.1.1 Importancia y ventajas. El BetaBio 45% colabora con la reducción de las bacterias presentes en el procesamiento de azúcar, producción de alcohol y actúa como agente protector además de potenciar el aumento de la productividad de etanol. Un logro resaltante se le adjunta, el cual es la optimización de costos de producción debido a su rendimiento en el control de bacterias (Wallerstein Industrial y Comercial Ltda, s.f.).

Cuando este producto actúa con otros antibióticos, potencia la acción de estos (Wallerstein Industrial y Comercial Ltda, s.f.).

2.7.1.1.2 *Especificaciones.* Las especificaciones del producto BetaBio 45% están presentes en la Tabla 7 y su ficha técnica en el Anexo A

Tabla 7

Especificación del producto BetaBio 45%

Especificación	Característica
Descripción	Solución transparente, de color marrón, que contiene sales de ácidos beta-potasio hop
Beta- Ácidos	45% $\pm 2\%$ por HPLC
Propilenglicol	30% $\pm 8\%$
Humedad	10% - 18%
Densidad (20°C)	01:08 $\pm 0: 01$ g/ml

Nota. Elaboración: autores. Fuente de la información (Wallerstein Industrial y Comercial Ltda, s.f.)

2.7.1.1.3 Dosificación. La dosificación depende de la aplicación al cual se añadirá, de manera conjunta el beta-ácido se consideran eficaces como agentes antimicrobianos en las cantidades que fluctúa de 2 a 50 ppm. En la aplicación de fermentación alcohólica, específicamente en el proceso por lotes, la dosis que se recomienda es de 5-10 ppm, en relación al volumen de la Dorna (Wallerstein Industrial y Comercial Ltda, s.f.).

2.7.2 Complejos catalizadores enzimáticos. La levadura posee un complejo enzimático llamado zimasa, este es el encargado de convertir, glucosa y la fructosa (producidas a partir de la inversión de sacarosa agregada y de la hidrólisis del almidón) en etanol y dióxido de carbono (Hernández A. , 2003). Edward Buchner (Premio Nobel 1907) evidenció que un extracto de levaduras libre de células podía catalizar la fermentación, él llamo a este principio activo zimasa, años más tarde en 1897 Sir Arthur Harden (Premio Nobel 1929), demostró que la zimasa es una mezcla compleja de enzimas, catalizando cada una de ellas, una etapa separada en la degradación de la sacarosa (Vasudevan, Sreekumari, & Vaidyanathan, 2011).

La invertasa o sacarasa es utilizada por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para convertir la sacarosa en fructosa y galactosa porque no la puede asimilar directamente. Hay dos tipos de invertasa, una interna y otra externa, la función de la enzima interna aun no es muy clara, pero la enzima externa se encuentra en el espacio periplasmático de la célula y se emplea por la levadura para hidrolizar la sacarosa (Restrepo, 2012).

La enzima zimasa actúa sobre los azúcares sencillos D-glucosa, D-manosa y D—galactosa o sobre la fructosa y produce los productos de descomposición, alcohol etílico y dióxido de carbono (Linstromberg, 1979).

Las vitaminas aceleran la acción enzimática de la levadura, la pureza y la velocidad de fermentación se ven afectadas por este factor (Corporación Viñar S.A., s.f.).

Debido a los altos costos que implican el tratamiento de los contaminantes bacterianos presentes en la industria del alcohol, y sus efectos de la proliferación de estos como las pérdidas de azúcar, se han buscado nuevos tratamientos o productos que colaboren ante el problema. Como el uso de antibióticos en aplicaciones técnicas aumentó, debido al surgimiento de múltiples resistencias a los antibióticos y bacterias patógenas, se halla un entorno favorable a la aplicación de soluciones más naturales e inocuas (Jacques & et.al., 2003). De ese modo se abre paso hacia las enzimas, dando una nueva fuente de control y así se brinda de manera confiable la producción de un alcohol de calidad y con alto rendimiento durante el proceso.

2.7.2.1 *Catalizador enzimático, Effymoll+*. De acuerdo con la visión de hacer del mundo un lugar mejor, la empresa Praj ofrece nuevas tecnologías, productos y servicios requeridos en la planta de alcohol (Praj Industries, 2014).

La línea de Bioconsumibles de la empresa Praj, productora de soluciones diferentes para problemas presentes en la destilería tiene la gama de productos Effytone Performance Enhancers.

Effytone es un bionutriente con nutrición de levadura completa, para mejorar el rendimiento de la fermentación. Al tiempo que garantiza una alta tasa de metabolismo de la levadura. Effytone también proporciona micronutrientes vitales que facilitan el crecimiento saludable de la levadura. También da como resultado la conversión rápida de azúcares en alcohol, lo que garantiza un mayor rendimiento y una contaminación bacteriana mínima y la formación de subproductos. Praj ofrece variantes basadas en la materia prima y la aplicación. Así tenemos al producto Effymoll+ (Praj Industries, 2014).

Effymoll+ es un producto a base de una combinación de específicos microelementos, su formulación es el resultado de una ardua evaluación de los parámetros y requisitos del proceso de fermentación. En sus propiedades brinda la eliminación de contaminantes bacterianos, además de

proporcionar una ventaja, la cual es el convertir carbohidratos no fermentables en azúcares fermentables, además gracias a sus microelementos se proporciona factores vitales para el crecimiento de la levadura, y previene los efectos inhibidores de la levadura (Fadel, Abdel, El-Heeny, & Abdel, 2018).

2.7.2.1.1 Importancia y ventajas. Effymoll+ es un producto con una formulación muy efectiva y comprobada que mejora el proceso de fermentación de la melaza (Praj Industries limited, 2014). Entre las ventajas del producto se tiene:

- Disminuir la pérdida de azúcar residual.
- Prevenir la contaminación bacteriana y reduce la acidez volátil del macerado.
- Mejorar la calidad del producto.
- Reducir en el tiempo de retención de la fermentación debido a una reacción más rápida.
- Operaciones de fermentación contantes sin reducción en el rendimiento.

2.7.2.1.2 *Especificación.* Las especificaciones del producto se muestran en la Tabla 8 y su ficha técnica en el Anexo B.

Tabla 8

Especificaciones del producto Effymoll+

Especificación	Característica
Nombre comercial	Effymoll+
Código HS	2942.00.90
Característica química	Nutrientes de levadura.
Uso del producto	En destilería como potenciador en el crecimiento de la levadura.
Información del contacto	Praj Industries Ltd, “Praj Tower”, 274 & 275, Bhumkar Chowk-Hinhewadi Road, Hinjewadi, Pune-411 057, India.
Compuesto activo	Mezcla de nutrientes de proteínas, minerales, vitamina de soja y levadura.

Nota. Elaboración: autores. Fuente: Praj Industries limited, 2014

2.7.2.1.3 *Dosificación.* Típicamente se dosifica entre 65 a 70 gramos/kilolitro de la capacidad de la destilería (producción total) o 5 ppm en base a cantidad de lavado (Praj Industries limited, 2014).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación y diseño de la investigación

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en el laboratorio de alcohol en la planta de producción de etanol de Industrial Pucalá S.A.C., teniendo el apoyo del laboratorio fabrica (azúcar) para la obtención de datos necesarios en los cálculos, como son el °Brix, POL y pureza de muestra de melaza. El laboratorio de alcohol nos proporcionó los materiales y equipos para el proceso de fermentación y destilación, con el fin de hallar el grado alcohólico del mosto final.

La etapa de fermentación simuló en pequeña escala a las mosteras de esta empresa, con objeto de evaluar el mejor rendimiento fermentativo y posteriormente recomendar el resultado.

Características del área de estudio

Tabla 9

Localización de la investigación

Ubicación	Lugar
Departamento	Lambayeque
Provincia	Chiclayo
Distrito	Pucalá

Nota. Elaboración: Autores

3.2. Población y Muestra del estudio

Población. Al tomarse como base la naturaleza del problema a estudiar, se puso como referencia de población, la melaza (materia prima) proveniente de la línea de subproductos de la planta de azúcar ubicada en el distrito de Pucalá. La disponibilidad de la materia prima para la planta de alcohol depende de la producción de azúcar. Las características de la caña de azúcar procesada para tal fin fluctúan en sus propiedades, a pesar que la línea de suministro provee de forma continua la melaza, esta presenta variaciones en sus propiedades fisicoquímicas.

Muestra. La melaza localizada en la fosa de almacenamiento que esta 200 m de la planta de alcohol, primero se bombea desde aquí hacia un tanque de capacidad 1000 m³, ubicado en el quinto piso de la planta de alcohol, este tanque tiene una válvula en el cuarto piso para extraer muestras.

Se extrajo 20 litros de melaza como muestra total, para así tener uniformidad de las características fisicoquímicas en las 26 pruebas realizadas para este trabajo de investigación.

3.3. Técnicas del muestreo

Se siguió una técnica de muestreo aleatorio estratificado.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Los instrumentos de recolección de datos fueron de lápiz y papel, y los de medición fueron los materiales y equipos de laboratorio de la empresa Industrial Pucalá, precisando confiabilidad y valides en su uso.

La técnica empleada fue de observación y experimentación.

3.5. Materiales

En las tablas 11, 12 y 13 se muestra el material empleado.

Tabla 10

Materias primas e insumos

Material	Cantidad
Melaza de caña de azúcar	6687 gr
Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	225*10 ⁶ células/ml
Ácido Sulfúrico	9,57 ml
BetaBio 45%	96 ppm
Effymoll+	60 ppm

Nota. Elaboración: Autores

Tabla 11
Materiales de laboratorio

Material	Capacidad	Cantidad
Tubos de ensayo	10 ml	5
Probeta	25 ml y 50 ml	2
Pipeta	1 ml y 5 ml	2
Embudo	-	1
Matraz Erlenmeyer	100 ml	1
Balones	200 ml y 500 ml	2
Vaso de Precipitación	500 ml y 100 ml	2
Fiola	100 ml	1

Nota. Elaboración: Autores

Tabla 12
Equipos de laboratorio

Equipo	Capacidad	Cantidad
pHmetro	0-14	1
Brixómetro	0-10 Brix y 10-20 Brix	1
Refractómetro	0-100 Brix	1
Alcoholímetro	0-30° GL T=15	1
Balanza digital	0-5 kg	1
Termómetro	0-100°C	1

Nota. Elaboración: Autores

3.6. Método

3.6.1. Procedimiento:

Recolección de melaza: Se separó en un balde de 20 litros un contenido de melaza proveniente de la fosa de almacenamiento, con el fin de tener las características de una sola materia prima, por lo que esta puede variar en el contenido de sus características fisicoquímicas.

Dilución de melaza: Para mantener parámetros iniciales uniformes (Brix melaza diluida, Brix inicial, pH inicial, cantidad de H_2SO_4) toda la dilución se realizó en un solo recipiente con capacidad de 35 litros. Se pesó un total para las 29 botellas de fermentación (utilizadas solo 28), 6687 gr de melaza con un volumen de agua de 21582,641 ml, con el fin de obtener una melaza diluida a 20,2 °Brix resultado un volumen total de 26100 ml, posteriormente se adicionó un total de ácido de 9,57 ml.

Llenado de semilla: Se midió 100 ml de semilla para cada botella de fermentación.

Mezcla de melaza con semilla: Una vez puesta las semillas en cada botella de fermentación se procedió a medir 900 ml de melaza diluida para iniciar con la fermentación con un volumen de 1 litro en todos los envases.

Preparación de antibiótico y producto enzimático: Con el BetaBio 45% se utilizó 0,810 ml del producto mezclándolo con 100 ml de agua de proceso, en una probeta. Se pesó 0,54 gr de Effymoll+ para luego diluirlo en 100 ml de solución.

Dosificación de los productos: En la concentración de 8 ppm se dosificó 1 ml de la solución con BetaBio 45% a las 4 botellas de fermentación, siguiendo luego las de 6 ppm con 0,75 ml, después al de 10 ppm con 1,25 ml. Prosiguiendo con el otro producto al que para dosificar 5 ppm se le coloca 1 ml de dicha solución, al de 3 ppm con 0,6 ml y por último al de 7 ppm con 1,4 ml.

Inicio de la fermentación: Para iniciar la fermentación se calienta a una temperatura de 31 a 33°C, con el fin de tener un acondicionamiento necesario para la levadura, se sabe que es una reacción exotérmica, pero como la cantidad a fermentar es pequeña, la liberación de energía no interfiere en la fermentación.

Fin de la fermentación: Luego de 48 horas se finaliza el proceso de fermentación y se llega a medir los siguientes parámetros: °Brix final, T final, pH final.

Destilación del mosto fermentado: Una vez ocurrido el agotamiento de la melaza, se procedió a destilarla tomando una alícuota de 100 ml de vino y mezclándola con 100 ml de agua destilada, el total de la mezcla unos 200 ml se trasvasan a una olla que con ayuda de una cocina eléctrica se lleva a evaporación y con un condensador cambia de fase vapor-líquido para finalmente destilar 100 ml de una solución alcohólica, envasarla y ponerla a enfriamiento hasta una temperatura mínima de 15°C.

Medición de grado alcohólico: Luego de enfriar la solución alcohólica se lleva a una probeta para así poder hacer la medición con un alcoholímetro y un termómetro, con la ayuda de las tablas de corrección de grados alcohólicos GL se halla el valor verdadero de dicho valor.

La parte experimental fotografiada se encuentra en el Anexo D

3.6.2. Descripción del proceso experimental

Análisis físico químico de la melaza fue realizado por el laboratorio de fábrica de Industrial Pucalá y la resolución de las fórmulas se muestra en el Anexo E y F, ordenadas posteriormente en las tablas de análisis e interpretación de resultados.

Tabla 13

Características físicoquímicas de la melaza

Característica	Resultado
Densidad	1,45535 gr/ml
°Brix	86,08
POL= SACAROSA	33,70%
Pureza total	60,83%
% Azúcares Reductores	18,66%
% Azúcares Totales	52,36%

Nota. Elaboración: Autores

3.6.3. Diseño experimental (dosificación ppm de beta y eff)

El diseño de contrastación de hipótesis para el proyecto se utilizará el **diseño de grupo control solo después**. La aplicación del tratamiento se realizará al grupo experimental y no al de control, la medición “después” de la variable dependiente se hará tanto al grupo experimental como al de control.

X= Tratamiento experimental

O= Observación

Tabla 14

Grupo control solo después del Effymoll+

E	A	X ₁	O ₁
		X ₂	O ₂
		X ₃	O ₃
C	A	-	O _e

Nota. Elaboración autores.

X_1 = Effimoll+ 3 ppm.

X_2 = Effimoll+ 5 ppm.

X_3 = Effimoll+ 7 ppm.

O_e = Grado alcohólico grupo control

O_1 = Grado alcohólico con 3 ppm de Effymoll+

O_2 = Grado alcohólico con 5 ppm de Effymoll+

O_3 = Grado alcohólico con 7 ppm de Effymoll+

Tabla 15

Grupo control solo después del BetaBio 45%

E	A	X_4	O_4
		X_5	O_5
		X_6	O_6
C	A	-	O_b

Nota. Elaboración autores.

X_4 = BetaBio 45% 6 ppm.

X_5 = BetaBio 45% 8 ppm.

X_6 = BetaBio 45% 10 ppm.

O_b = Grado alcohólico grupo control.

O_1 = Grado alcohólico con 6 ppm de BetaBio 45%.

O_2 = Grado alcohólico con 8 ppm de BetaBio 45%.

O_3 = Grado alcohólico con 10 ppm de BetaBio 45%.

Características del experimento

Número de repeticiones: 4

Número de tratamientos: 6

Número de unidades experimentales: 24

3.6.4. Variables de control

Tabla 16

Variable control independiente

Variable independiente	Dimensión de variable	Descripción
BetaBio 45%		
Effymoll+		
Temperatura	°C	Temperatura inicial del proceso
Brix	°Brix _o	Grados Brix iniciales del proceso
pH	pH _o	Potencial de hidrogeno inicial del proceso

Nota. Elaboración: Autores

Tabla 17

Variable control dependiente

Variable independiente	Dimensión de variable	Descripción
Grado de alcohol	% vol Gay Lussac	Grado de alcohol al final del proceso (° Gay Lussac)
Rendimiento alcohólico	l / Tm Melaza	
Brix	°Brix _f	Grados Brix final del proceso
pH	pH _f	Potencial de hidrogeno final del proceso

Nota. Elaboración: Autores

3.7. Recolección de la información:

Tabla 18

Datos de las muestras en blanco

Muestra Blanco	Muestra 01	Muestra 02	Muestra 03	Muestra 04
Nomenclatura	MBL-01	MBL-02	MBL-03	MBL-04
Dosis de Muestreo	0	0	0	0
Semilla	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
°Bx Semilla	7,5	7,5	7,5	7,5
Melaza	226,647 g	226,647 g	226,647 g	226,647 g
°Bx Melaza	86,08	86,08	86,08	86,08
°Bx Melaza Diluida	20,2	20,2	20,2	20,2
H ₂ SO ₄	0,33 ml	0,33 ml	0,33 ml	0,33 ml
°Bx Inicial	19	19	19	19
pH Inicial	5,13	5,13	5,13	5,13
T° Inicial	32 °C	32 °C	32 °C	32 °C
T° Final	30°C	30°C	29,9 °C	29,9 °C

Nota. Elaboración: autores.

Tabla 19

Datos de las muestras de BetaBio 45% en dosis de 6 ppm

Muestra BetaBio 45%	Muestra 01	Muestra 02	Muestra 03	Muestra 04
Nomenclatura	MBb-01-6	MBb-02-6	MBb-03-6	MBb-04-6
Dosis de Muestreo	6 ppm	6 ppm	6 ppm	6 ppm
Semilla	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
°Bx Semilla	7,5	7,5	7,5	7,5
Melaza	226,647 g	226,647 g	226,647 g	226,647 g
°Bx Melaza	86,08	86,08	86,08	86,08
°Bx Melaza Diluida	20,2	20,02	20,2	20,2
H ₂ SO ₄	0,33 ml	0,33 ml	0,33 ml	0,33 ml
°Bx Inicial	19	19	19	19
pH Inicial	5,13	5,13	5,13	5,13
T° Inicial	32,5°C	32,1°C	33°C	32°C
T° Final	29,3°C	29,4°C	29,6°C	29,7°C

Nota. Elaboración: autores.

Tabla 20

Datos de las muestras de BetaBio 45% en dosis de 8 ppm

Muestra BetaBio45	Muestra 01	Muestra 02	Muestra 03	Muestra 04
Nomenclatura	MBb-01-8	MBb-02-8	MBb-03-8	MBb-04-8
Dosis de Muestreo	8 ppm	8 ppm	8 ppm	8 ppm
Semilla	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
°Bx Semilla	7,5	7,5	7,5	7,5
Melaza	226,647 g	226,647 g	226,647 g	226,647 g
°Bx Melaza	86,08	86,08	86,08	86,08
°Bx Melaza Diluida	20,2	20,2	20,2	20,2
H ₂ SO ₄	0,33 ml	0,33 ml	0,33 ml	0,33 ml
°Bx Inicial	19	19	19	19
pH Inicial	5,13	5,13	5,13	5,13
T° Inicial	32,2°C	32°C	32°C	32,5°C
T° Final	29,3°C	29,4°C	29,8°C	29,7°C

Nota. Elaboración: autores.

Tabla 21

Datos de las muestras BetaBio 45% en dosis de 10 ppm

Muestra BetaBio45	Muestra 01	Muestra 02	Muestra 03	Muestra 04
Nomenclatura	MBb-01-10	MBb-02-10	MBb-03-10	MBb-04-10
Dosis de Muestreo	10 ppm	10 ppm	10 ppm	10 ppm
Semilla	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
°Bx Semilla	7,5	7,5	7,5	7,5
Melaza	226,647 gr	226,647 gr	226,647 gr	226,647 gr
°Bx Melaza	86,08	86,08	86,08	86,08
°Bx Melaza Diluida	20,2	20,2	20,2	20,2
H ₂ SO ₄	0,33 ml	0,33 ml	0,33 ml	0,33 ml
°Bx Inicial	19	19	19	19
pH Inicial	5,13	5,13	5,13	5,13
T° Inicial	32,7°C	32,1°C	32°C	32°C
T° Final	29,5°C	29,7°C	29,9°C	29,9°C

Nota. Elaboración: autores.

Tabla 22

Datos de las muestras Effymoll+ en dosis de 3 ppm

Muestra Effymoll+	Muestra 01	Muestra 02	Muestra 03	Muestra 04
Nomenclatura	Mef-01-3	Mef-02-3	Mef-03-3	Mef-04-3
Dosis de Muestreo	3 ppm	3 ppm	3 ppm	3 ppm
Semilla	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
°Bx Semilla	7,5	7,5	7,5	7,5
Melaza	226,647 g	226,647 g	226,647 g	226,647 g
°Bx Melaza	86,08	86,08	86,08	86,08
°Bx Melaza Diluida	20,2	20,2	20,2	20,2
H ₂ SO ₄	0,33 ml	0,33 ml	0,33 ml	0,33 ml
°Bx Inicial	19	19	19	19
pH Inicial	5,13	5,13	5,13	5,13
T° Inicial	31,9°C	32,1°C	32°C	32,1°C
T° Final	28,9°C	29,4°C	29,4°C	29,3°C

Nota. Elaboración: autores.

Tabla 23

Datos de las muestras Effymoll+ en dosis de 5 ppm

Muestra Effymoll+	Muestra 01	Muestra 02	Muestra 03	Muestra 04
Nomenclatura	Mef-01-5	Mef-02-5	Mef-03-5	Mef-04-5
Dosis de Muestreo	5 ppm	5 ppm	5 ppm	5 ppm
Semilla	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
°Bx Semilla	7,5	7,5	7,5	7,5
Melaza	226,647 g	226,647 g	226,647 g	226,647 g
°Bx Melaza	86,08	86,08	86,08	86,08
°Bx Melaza Diluida	20,2	20,2	20,2	20,2
H ₂ SO ₄	0,33 ml	0,33 ml	0,33 ml	0,33 ml
°Bx Inicial	19	19	19	19
pH Inicial	5,13	5,13	5,13	5,13
T° Inicial	32°C	32,9°C	32°C	32,5°C
T° Final	29°C	29,2°C	29,3°C	29,2°C

Nota. Elaboración: autores.

Tabla 24

Datos en las muestras de Effymoll+ en dosis de 7 ppm

Muestra Effymoll+	Muestra 01	Muestra 02	Muestra 03	Muestra 04
Nomenclatura	Mef-01-5	Mef-02-5	Mef-03-5	Mef-04-5
Dosis de Muestreo	5 ppm	5 ppm	5 ppm	5 ppm
Semilla	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
°Bx Semilla	7,5	7,5	7,5	7,5
Melaza	226,647 gr	226,647 gr	226,647 gr	226,647 gr
°Bx Melaza	86,08	86,08	86,08	86,08
°Bx Melaza Diluida	20,2	20,2	20,2	20,2
H ₂ SO ₄	0,33 ml	0,33 ml	0,33 ml	0,33 ml
°Bx Inicial	19	19	19	19
pH Inicial	5,13	5,13	5,13	5,13
T° Inicial	32°C	32°C	33°C	32°C
T° Final	29°C	29,1°C	29,3°C	29,3°C

Nota. Elaboración: autores.

Plan de procesamiento de datos

Después de obtenida la base de datos se utilizó el software IBM SPSS versión 25 y MO Excel 2016, utilizando tablas y figuras para la presentación de resultados, considerando un valor $p < 0,05$ como significativo.

Las pruebas estadísticas que se emplearon para la contrastación de la hipótesis, se realizaron previa revisión de los supuestos paramétricos, si la muestra no provenía de una población con distribución normal se aplicó la pruebas U de Mann-Whitney y KruskalWallis.

IV. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo se presenta los resultados obtenidos de las pruebas realizadas según los objetivos planteados.

Se realizó como primera medición global la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk ($n \leq 30$) a los datos en cada muestra de análisis, lo cual arroja que en muchos grupos no existe normalidad en los mismos, ver Anexo G, por lo cual se trabajará con pruebas no paramétricas.

Medir el rendimiento alcohólico con el BetaBio45 a concentraciones de 6, 8 y 10 ppm.

En las tablas 25, 26 y 27 se muestran los valores obtenidos por cada una de las concentraciones aplicadas con el BetaBio 45% y el valor obtenido en la muestra control, para su posterior comparación.

Tabla 25

Grado Alcohólico real del BetaBio 45%

Repeticiones	B0	B1	B2	B3
R1	5,7	6,2	6,4	6,6
R2	5,7	6,2	6,3	6,6
R3	5,7	6,2	6,5	6,5
R4	5,7	6,1	6,2	6,5

Nota. B1= 6ppm, B2=8 ppm, B3=10 ppm. Elaboración: Autores.

Tabla 26

Rendimiento de BetaBio 45% (l/Tm)

Repeticiones	B0	B1	B2	B3
R1	234,009	254,536	262,747	270,958
R2	234,009	254,536	258,642	270,958
R3	234,009	254,536	266,853	266,853
R4	234,009	250,431	254,536	266,853

Nota. B0= 0ppm, B1= 6ppm, B2=8 ppm, B3=10 ppm. Elaboración: Autores.

Tabla 27

Eficiencia fermentativa con BetaBio 45% (%)

Repeticiones	B0	B1	B2	B3
R1	67,186	74,067	76,456	78,845
R2	67,186	74,067	75,261	78,845
R3	67,186	74,067	77,650	77,650
R4	67,186	72,872	74,067	77,650

Nota. B0= 0ppm, B1= 6ppm, B2=8 ppm, B3=10 ppm. Elaboración: Autores.

Evaluar la variación del rendimiento alcohólico producido por la aplicación de BetaBio 45%.

Como se observa en las figuras 9, 10 y 11, los diferentes valores obtenidos aplicando las diferentes concentraciones del producto BetaBio 45%, son mayores a la de la muestra control, en grado alcohólico real, rendimiento y eficiencia fermentativa, donde mejores resultados se obtuvo aplicando la concentración B3 (10 ppm).

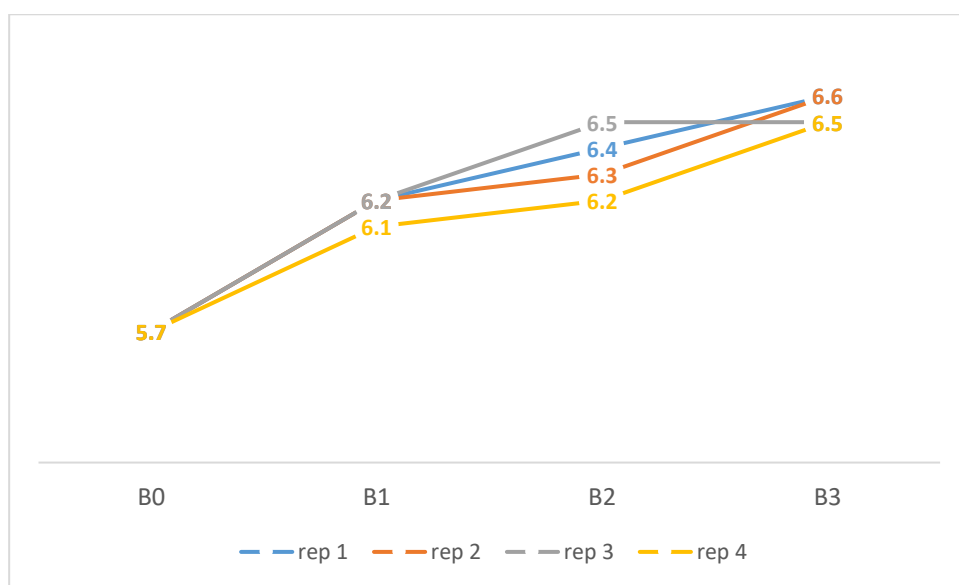


Figura 9. Comparación del grado alcohólico real entre las concentraciones para el BetaBio 45%.

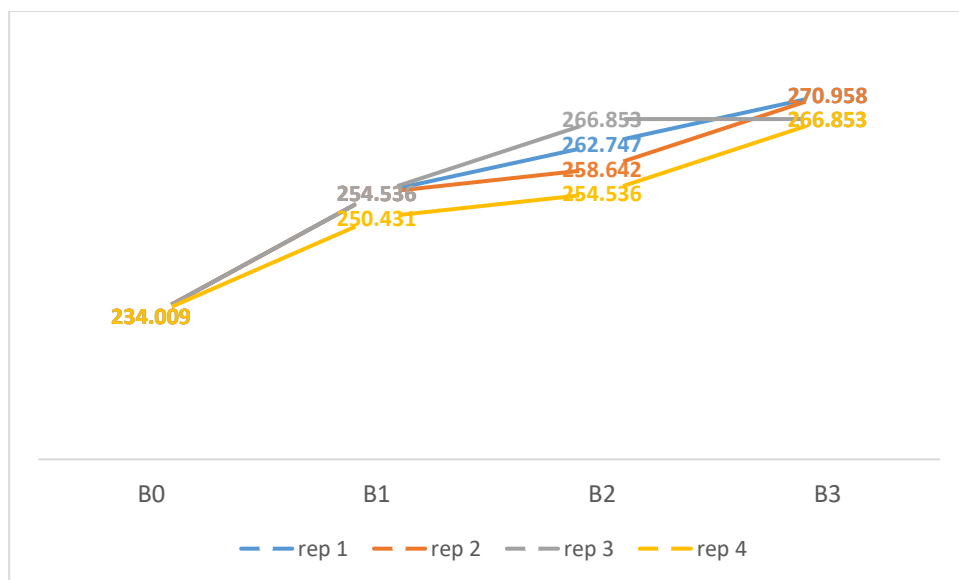


Figura 10. Comparación del rendimiento entre las concentraciones para el BetaBio 45%.

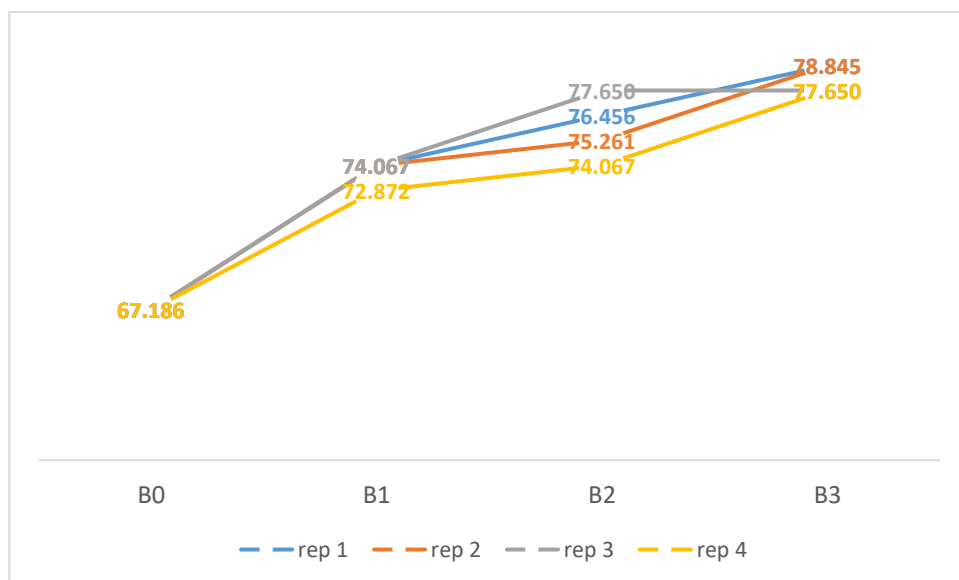


Figura 11. Comparación de la eficiencia fermentativa entre concentraciones para el BetaBio 45%.

Medir el rendimiento alcohólico con el Effymoll+ a concentraciones de 3, 5 y 7 ppm.

En las tablas 28, 29 y 30 se muestran los valores obtenidos por cada una de las concentraciones aplicadas con el Effymoll+ y el valor obtenido en la muestra control, para su posterior comparación.

Tabla 28

Grado alcohólico real del Effymoll+

Repeticiones	B0	B4	B5	B6
R1	5,7	6,5	6,4	6,3
R2	5,7	6,5	6,1	6,2
R3	5,7	6,3	6,1	6,1
R4	5,7	6,5	6,0	6,1

Nota. B0= 0ppm, B4= 3ppm, B5=5 ppm, B6=7 ppm. Elaboración: Autores.

Tabla 29

Rendimiento del Effymoll+ (l/Tm)

Repeticiones	B0	B4	B5	B6
R1	234,009	266,853	262,747	258,642
R2	234,009	266,853	250,431	254,536
R3	234,009	258,642	250,431	250,431
R4	234,009	266,853	246,326	250,431

Nota. B0= 0ppm, B4= 3ppm, B5=5 ppm, B6=7 ppm. Elaboración: Autores.

Tabla 30

Eficiencia fermentativa con Effymoll+ (%)

Repeticiones	B0	B4	B5	B6
R1	67,186	77,650	76,456	75,261
R2	67,186	77,650	72,872	74,067
R3	67,186	75,261	72,872	72,872
R4	67,186	77,650	71,677	72,872

Nota. B0= 0ppm, B4= 3ppm, B5=5 ppm, B6=7 ppm. Elaboración: Autores.

Evaluar la variación del rendimiento alcohólico producido por la aplicación de Effymoll+.

Como se observa en las figuras 12, 13 y 14, los diferentes valores obtenidos aplicando las diferentes concentraciones del producto Effymoll+, son mayores a la de la muestra control, en grado alcohólico real, rendimiento y eficiencia fermentativa, donde el mejor resultado se obtuvo aplicando la concentración B4 (3ppm).

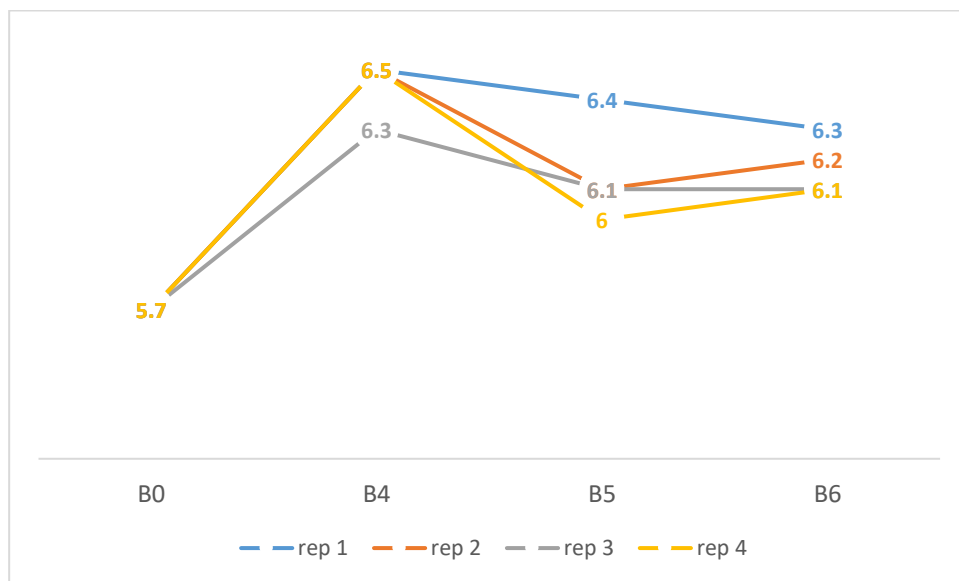


Figura 12. Comparación del grado alcohólico entre concentraciones para el Effymoll+.

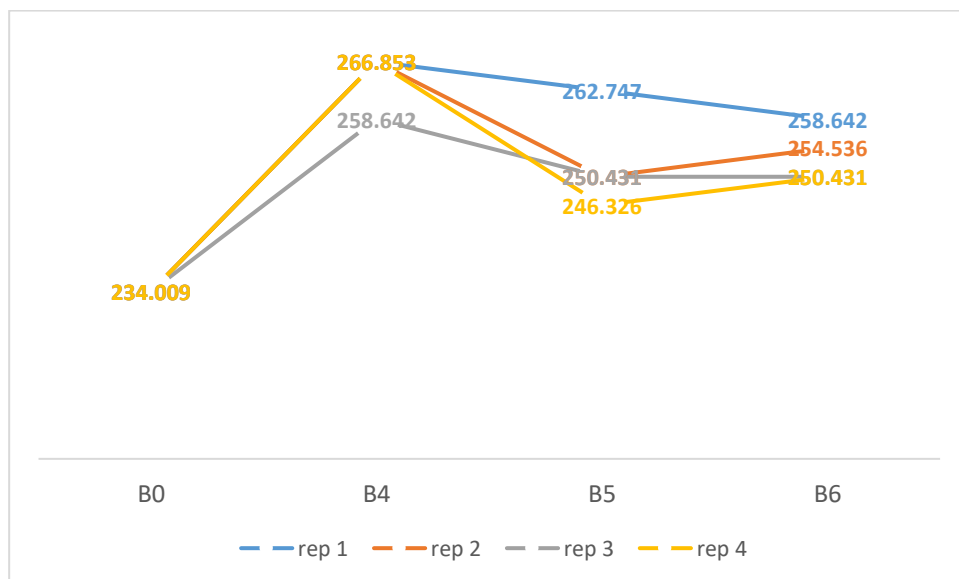


Figura 13. Comparación del rendimiento entre concentraciones para el Effymoll+.

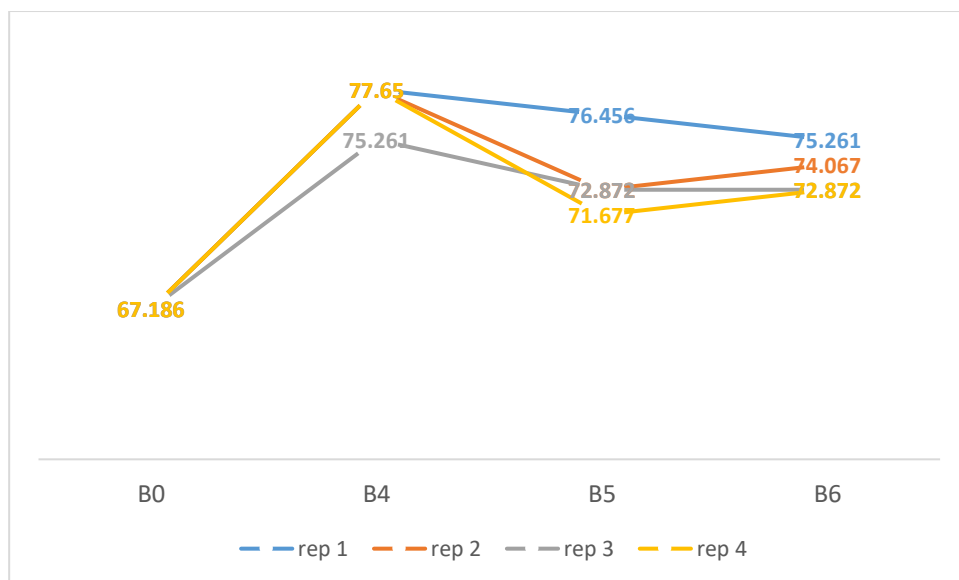


Figura 14. Comparación de la eficiencia fermentativa entre concentraciones para el Effymoll+.

Comparar el rendimiento alcohólico entre el BetaBio 45% y el Effymoll+

Para poder dar respuesta a este objetivo planteado, se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar si se daban diferentes resultados entre las diferentes concentraciones aplicadas por cada producto, ver Anexo H

Luego mediante la prueba no paramétrica de la U Mann-Whitney, se comparó cada par de concentraciones, ver Anexo I, donde los resultados más altos entre las concentraciones aplicadas con cada producto fueron para Betabio45 la concentración de 10pmm y para el Effymoll+ la de 3pmm, y al comparar ambas, no encontramos diferencias significativas entre ambas concentraciones para los dos productos, ya que los valores p encontrados (,098, ,096 y ,096) son mayores que $\alpha = ,05$, por lo cual no rechazamos la hipótesis nula y podemos concluir que ambas concentraciones dan resultados similares, para el grado alcohólico, rendimiento y eficiencia fermentativa , ver Tabla 31.

Tabla 31

Resultados del estadístico de prueba U de Mann-Whitney

			Grado			Eficiencia
			Alcohólico	Rendimiento		fermentativa
U de Mann-Whitney			3,000	3,000		3,000
W de Wilcoxon			13,000	13,000		13,000
Z			-1,654	-1,667		-1,667
Sig. asintótica(bilateral)			,098	,096		,096
Significación	exacta	[2*(sig.	,200 ^b	,200 ^b		,200 ^b
unilateral)]						

Nota. Elaboración: autores

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se pudo comprobar y determinar la concentración optima de Effymoll+ y BetaBio 45%, dando como resultado para el Effymoll+ una dosis de 3 ppm y en el BetaBio 45% una dosis de 10 ppm.

Se midió el rendimiento alcohólico con el Effymoll+ en concentraciones de 3, 5 y 7 ppm, dando como resultados diferentes entre sí, pero favorables en comparación con las pruebas en blanco, hallando el rendimiento máximo de 267 litros de alcohol/Tonelada métrica de melaza.

Al evaluar la variación del rendimiento alcohólico por la aplicación de Effymoll+, se observó que, al dosificar 5 y 7 ppm disminuía el rendimiento alcohólico, por lo que no es favorable, es por ello que se determinó que la mejor dosis es la de 3 ppm.

Se midió el rendimiento alcohólico con el BetaBio 45% en concentraciones de 6, 8 y 10 ppm, dando como resultado rendimientos altos en comparación con las pruebas en blanco, llegando a tener un rendimiento máximo de 271 litros de alcohol/Tonelada métrica de melaza.

Al evaluar la variación del rendimiento alcohólico por la aplicación de BetaBio 45% se observó, que al dosificar 6, 8 y 10 ppm, aumentaba progresivamente el rendimiento alcohólico, es por ello, que se determinó que la mejor dosis es la de 10 ppm.

5.2 Recomendaciones

En el presente trabajo se identificaron que ambos productos aumentan el rendimiento alcohólico a sus diferentes dosis, las dosis que afectan a esta variable en mejor forma son de 3 ppm para el Effymoll+ y de 10 ppm para el BetaBio 45%, en un caso es la mínima dosis probada mientras que en el segundo se halló con la mayor dosis, como ambos ocasionan un aumento muy similar en el rendimiento alcohólico, sería adecuado incluir una variable más, como el termino económico, y evaluar ese aspecto.

El agua es una fuente primaria durante este proceso, de ser posible sería recomendable realizar un análisis microbiológico e identificar si esta agua presenta una cantidad significativa de bacterias Gram + y/o Gram – que afecten a corto plazo en el proceso de ser así el cambio en el suministro de fuente sería una opción.

El no emplear ácido sulfúrico durante el proceso es una consecuencia del presente deterioro por corrosión de los tanques, se sugiere un cambio en las mosteras así como un continuo plan de mantenimiento para lograr alcanzar su vida útil, si esto ocurriera e implementaran el uso de ácido sulfúrico se vería un aumento favorable de 5,5 (sin ácido) a 5,7 (con ácido) con respecto al grado alcohólico, del mismo modo sucediera con el rendimiento alcohólico fermentativo.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altamirano, C. (2013). *Optimización de un método para la producción de biomasa de Saccharomyces cerevisiae empleada en la etapa de fermentación del mosto de cerveza desde un nivel de laboratorio a un nivel piloto*. Tesis pregrado, Universidad Mayor de San Marcos, Lima, Peru.
- Altech's. (1995). *Fifteenth annual international alcohol course*. Kentucky, E.E.U.U.
- Arteaga, L., Carvajar, G., & Bolaños, O. (s.f.). Proceso de producción de etanol a partir de melazas. *Grupo de investigación INMECNAR*, 1-8.
- Bai, F., Anderson, W., & Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology advances*, 26, 89-105.
- Barrera, R., & Reyes, J. (2015). *Optimización de los parámetros del proceso de fermentación del jugo de caña para obtener bioetanol en la planta piloto de alcohol de la facultad de ingeniería química-UNAP*. Tesis de pregrado, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
- Barrio, J., Andrés, D., & Antón, J. (2008). *Física y Química*. EDITEX.
- Bayona, M., Ardua, M., Castellanos, O., & Rojas, M. (2002). Determinación de bacterias contaminantes en el proceso de producción de alcohol etílico y su relación con la floculación de *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, IV(2), 64-71.
- Bellissimi, E., & Ingledew, W. (2004). *Metabolic acclimatization: preparing active dry yeast for fuel ethanol production* (Vol. 40).

- BODDBO. (2012). *Densidad del jarabe en grados Baume*. Obtenido de <http://boddbo.blogspot.pe/2012/02/densidad-del-jarabe-en-grads-baume.html>
- Botano. (s.f.). *Cretan Botano Mountain Herbs*. Obtenido de Humulus lupulus: <https://botano.gr/products/humulus-lupulus>
- Cabello, A. (12 de 02 de 2012). *Blog: Fratelly Pasini Vinicola*. Obtenido de Importancia del Nitrógeno para las levaduras: <http://vinospasini.blogspot.pe/2012/02/importancia-del-nitrogeno-para-las.html>
- Cadena Agroindustrial. (2004). *Etanol*. Nicaragua: IICA.
- Calderon, 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, Pontificia Universidad Javeriana , Bogotá, Colombia.
- Campués, J., & Tarupí, J. (2011). *Obtención de alcohol a partir de jugo de caña, cachaza y melaza, mediante la incorporación de dos niveles de fermento(Saccharomyces cerevisiae)*. Tesis de pregrado, Universidad Técnica del Norte, Ibarra,Ecuador.
- Carpenter, P. (1979). Microbiología. México: Editorial Interamericana.
- Chen, J. (2000). Manual del azúcar de caña. En J. Chen, *Manual del azúcar de caña* (págs. 465-498). Ciudad de mexico: Limusa, S.A.
- Corporación Viñar S.A. (s.f.). *Manual de Operaciones de destilerías de alcohol Etilico* . Lima,Perú: CODISTIL DEDINI.
- Fadel, M., Abdel, A., El-Heeny, M., & Abdel, A. (Enero de 2018). Managing of bacterial contamination in alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Asian Journal of Science and Technology*, 09, 7383-7391.

- Fajardo, E., & Sarmiento, S. (2007). *Evaluación de le melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Javiera, Bogota, Colombia.
- Fajardo, E., & Sarmiento, S. (2007). *Evalucación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Garcia, J., & Garcia.J. (2006). *Biocarburantes liquidos,biodiesel y bioetanol*. .
- García, V. (2004). *Introducción a la Microbiología*. Costa Rica: EUNED.
- Gilces, P., & Veloz, P. (2006). *Estudio del uso de los nutrientes para la levadura en fermentacion con el proposito de mejorar la produccion del alcohol etilico*. Tesis de pregrado, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.
- Gilces, P., & Veloz, P. (2006). *Estudio del uso de los nutrientes para la levadura en fermentación con el propósito de mejorar la producción del alcohol etílico*. Tesis de pregrado, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.
- Gusils, C., Aráoz, J., Guzman, P., Gonzalez, G., Pereira, J., Sustaita, G., & Ruíz, M. (2018). *Contaminación del proceso de fermentación alcohólica por Dekkera*. Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres.
- Hernández, A. (2003). *Microbiología Industrial*. Editorial Universidad Estatal a Distancia .
- Hernández, R. (s.f.). *Espuma no deseada en destilerías de alcohol. Métodos de control*. Monografía, Universidad de Matanzas, Cuba.
- Jacques, K., & et.al. (2003). *The Alcohol Textbook* (4ta ed.). Inglaterra: Nottingham University Press.

Jacques, K., Lyons, T., & Kelsall, D. (1999). *The Acohol Textbook* (3rd Edition ed.). Nottingham University press.

Juranek, P., & Duquette, P. (200).

Linstromberg, W. (1979). *Curso breve de Química Orgánica* . Barcelona, España: Editorial Reverté S.A.

Mariscal, J. (2011). *Evaluación y selección de microorganismos para la producción de etanol a nivel industrial*. Tesis pregrado, Universidad Nacional de Colombia.

Martínez, M., Morales, P., Gonzales, R., Mas, A., & Beltran, G. (10 de 4 de 2012). Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a fuction of nitrogen source. *Infowine*, 12(4), 477-485.

Mayer, L. (1987). *Metodos de la industria Quimica* . Barcelona: Editorial Reverté, S.A.

Microbiology Society. (2018). *Microbiology Online*. Obtenido de Fungi: <http://microbiologyonline.org/about-microbiology/introducing-microbes/fungi>

Olmstead, J. (2009). *Fueling Resistance? Antibiotics in Ethanol Production*. Institute of Agriculture and Trade Policy, Minneapolis, E.E.U.U.

Palacio, H. (1956). *Fabricacion de Alcohol*. Barcelona,España: Salvant Editores S.A.

Parés, R., & Juárez, A. (2002). *Bioquimica de los microorganismos*. Barcelona, España: Editorial Reverté,S.A.

Peitzner, R. (2013). *Diseño de la investigacion de evaluacion de efectividad del complejo catalizador Effymol+ en la productividad de la fermentación alcohólica de melaza* . Tesis de pregrado, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Perry, R. (1997). *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. New York: McGraw-Hill.

Praj Industries. (2014). *Praj: Innovate,Integrate, Deliver*. Obtenido de <https://www.praj.net/>

- Praj Industries limited. (2014). *Praj: Innovate, Integrate and Deliver*. Obtenido de Molasses Fermentation: <https://www.praj.net/wp-content/uploads/2017/10/EffyMoll.pdf>
- QuimiNet. (2007). *La urea y sus diversas aplicaciones*. Obtenido de https://www.quiminet.com/articulos/la-urea-y-sus-diversas-aplicaciones-21306.htm?mkt_source=22&mkt_medium=153748312&mkt_term=66&mkt_content=&mkt_campaign=1
- Quintero, R. (1981). *Ingenieria Bioquimica*. Mexico: Alambra.
- Restrepo, S. (2012). *Optimización del proceso de fermentacion de la fabrica de licores y alcoholes de antioquia (fla)*. Informe final de practicas profesionales realizadas en la Fabrica de Licores y Alcoholes de Antioquia, Universidad Nacional de Colombia, Medellin, Colombia.
- Rodriguez, D. (2018). *Lider.com*. Obtenido de Fosfato de Amonio: Fórmula, Propiedades y Usos Principales: <https://www.lifeder.com/fosfato-amonio/>
- Ruckle, L. (2005). *Hop acids as natural antibacterials in ethanol fermentation*. (Vol. 107 N°1275). International Sugar Journal.
- Sanchez, L., Otiniano, M., Arellano, J., Chavez, M., & Robles, H. y. (2012). Efecto del complejo enzimático producido por *Aspergillus oryzae* sobre producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. *SCIÉENDO*, 15(2), 1-12.
- Suárez, C., Garrido, N., & Guevara, C. (Enero-Abril de 2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. *ICIDCA.Sobre derivados de la caña de azucar*. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/2231/223148420004.pdf>

- Tamayo, K. (2015). *Evaluación de la estabilidad como startaer de Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis para la producción de cerveza tipo lager*. Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima, Perú.
- TextosCientificos.com. (2005). *Urea*. Obtenido de <https://www.textoscientificos.com/quimica/urea>
- Tullúme, L. (05 de 07 de 2016). *SCRIBD*. Obtenido de Beta-Bio-45.docx: <https://es.scribd.com/document/317549913/Beta-Bio-45-docx>
- Tzarax, Y. (2015). *Evaluación del impacto del uso de lúpulo (Humulus lupulus) como agente bactericida en el proceso de fermentación alcohólica de melaza por lotes a nivel industrial*. Tesis pregrado, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Universidad del País Vasco. (s.f.). *Mikros testak.org*. Obtenido de Càmara de contaje Neubauer improved: http://insilico.ehu.eus/camara_recuento/neubauer_improved.php
- Vasudevan, D., Sreekumari, S., & Vaidyanathan, K. (2011). *Texto de Bioquímica*. Jalisco, México: Editorial Cuéllar Ayala.
- Villavicencio, M. (1993). *Bioquímica*. Lima, Peru: A&B S.A.
- Wallerstein Industrial y Comercial Ltda. (s.f.). *BetaBio 45*. Obtenido de <http://www.betabio.com.br/page003.html>
- Weisser, P. (1996). *Expression of the Escherichia coli pmi Gene, encoding Phosphomannose isomerase in Zymomonas mobilis, leads to utilization of Mannose as a Novel Growth Substrate, wich can be used as a selectiva marker*. Applied and Environmental Microbiology.

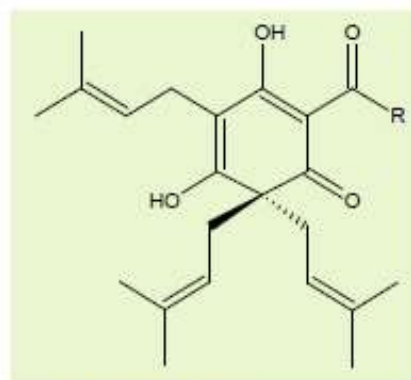
ANEXO A



Beta Bio 45 %

❖ Overview

- Beta Bio 45 % is produced from CO₂ extract of hops. It contains predominantly the natural β -acids fraction of hops extract dissolved in food grade Propylene Glycol.
- β -acids are well-known to have potent anti-microbial properties, and are particularly active against Gram positive bacteria and certain algae.
- Beta Bio 45 % is typically added to molasses based feed stocks for the production of yeast or alcohol at a 5 ppm dose rate.

Structure of β -acids

$R = -CH-(CH_3)_2$ (Colupulone)
 $R = -CH_2-CH-(CH_3)_2$ (Lupulone)
 $R = -CH(CH_3)-CH_2-CH_3$ (Adlupulone)

❖ Specification

- | | |
|------------------------|--|
| • Description: | A brown, clear solution containing the potassium salts of hop β -acids |
| • Beta-acids: | $45 \pm 1.5\%$ (w/w) by HPLC |
| • Density (at 20°C): | $1.07 (\pm 0.01)$ g/ml |
| • Viscosity (at 20°C): | typically about 300 cP |
| • pH: | 11.0 ± 0.5 (1 pt product: 3.5 pts water) |



❖ Properties

□ Appearance

A clear brown liquid at room temperature, becoming more mobile when heated. Remains fluid even at 0°C.

□ Organoleptic Properties

Pleasant, floral aroma. Bitter taste with floral overtones when diluted 1000 x into water.

□ Stability

When stored in the original unopened containers Beta Bio 45 % is very stable. Use any opened containers as soon as possible.

□ Quality

All Hopsteiner® products are produced in plants accredited to internationally accepted quality standards. Beta Bio 45 % is certified as Kosher, including for Passover, GRAS, Food Grade and is not an antibiotic.

❖ Packaging

Beta Bio 45% is regularly available in 20-kg pails (HDPE) or 200-kg drums (PP). Other package sizes (including totes) are available on request.

❖ Product Use

We recommend that Beta Bio 45 % be used in its undiluted form. It is not difficult to pump and is compatible with the usual materials used in food processing plants.

□ Dosage

Actual dosage will depend on the application, but typically 5-10 ppm of Beta Bio 45 % is effective as an antibacterial agent.

□ Application

Beta Bio 45 % may be dosed directly into process streams or added to solid or semi-solid products in a suitable blender. When dosing into pipelines or vessels it is best to ensure that there is vigorous mixing so as to disperse the product quickly. This can be achieved by injecting into the bulk fluid at high pressure through a suitable nozzle or small bore pipe so that a high degree of turbulence is generated.

□ Storage

Beta Bio 45 % has excellent storage stability and may be kept for at least one year at ambient temperature in unopened, original containers. Bulk storage in heated tanks (up to 40°C) is also possible provided the product is not directly exposed to air and used within about 3 months.

□ Safety

Beta Bio 45 % should be handled with due care, especially to prevent contact with the eyes. Any contamination of the skin should be washed off with soap and water. If Beta Bio 45 % gets into the eyes, irrigate with excess water until clear and seek immediate medical attention.

For full safety information please see the relevant Steiner material safety data sheet.



❖ Supplementary Information

❑ Beta-acids

β -acids are a natural major constituent of hops and are present in amounts ranging from about 2 – 12 % depending on the variety. They are soluble in organic solvents and are readily extracted by liquid or supercritical carbon dioxide. CO₂ hop extract produced commercially for use in brewing beer typically contain from 15 – 35 % β -acids, of which there are three major homologs – colupulone, lupulone and adlupulone. All three are active as anti-bacterial agents.

❖ Analytical Method

The active ingredient in Beta Bio 45 % may be assessed by either of the following methods:

- ❑ β -acids - by HPLC using the current hops extract ICE standard according to the ASBC Hops-14 or EBC 7.8 methods.*

*ICE = International Calibration Extract

ASBC = American Society of Brewing Chemists

EBC = European Brewery Convention

❖ Technical Support

We will be pleased to offer help and advice on the full range of Hopsteiner® products:

- ❑ Copies of all relevant analytical procedures
- ❑ Material Safety Data Sheets (MSDS)
- ❑ Assistance with pilot or commercial trials
- ❑ Specialist analytical services

ANEXO B



EFFYMOLL+

Material Safety Data Sheet

Section 1. Chemical Product And Company Identification

Commercial Product Name : EFFYMOLL+
HS Code : 2942.00.90
Chemical Characterization : Nutrients for Yeast
Product Use : In distilleries as growth enhancer for yeast.
Contact Information : Praj Industries Ltd, 'Praj Tower', 274 & 275, Bhumkar Chowk-Hinjewadi Road, Hinjewadi, Pune – 411 057, India
 Tel: +91-20-22941000/71802000

Section 2 – Information On Ingredient

Active component : Nutrient blend of Proteins, Minerals, Vitamins from Soyflour & Yeast.
CAS Number : 68513-95-1, 8013-01-2, 7733-02-0, 14168-73-1
Hazardous Ingredient : None
Exposure Limit : Not Established

Section 3 - Hazards Identification

Emergency Overview:

Description : Yeast growth enhancer for Industrial ethanol production
Appearance : White / off white powder
Odour : Slight Pleasant smell

Potential Health Effect :

Inhalation : Inhalation of dust may induce sensitization in susceptible individuals. Avoid inappropriate handling, which may result in dust generation.
Eye Contact : Non Irritating to the eyes. Avoid direct contact with the eyes.
Skin contact : Non irritating to the skin.
Ingestion : Ingestion of material is not known to cause adverse health effect.

Section 4 - First Aid Measures

Skin Contact : Wash skin with water
Eye Contact : Rinse eyes with water
Ingestion : Rinse mouth and throat thoroughly with water. Drink water.
Inhalation : Remove from exposure. If symptoms of irritation or sensitization occur call a doctor.

PRAJ INDUSTRIES LIMITED, Praj Tower', 274 & 275, Bhumkar Chowk-Hinjewadi Road, Hinjewadi, Pune – 411 057, India

Phone: +91-20-22941000/71802000, Fax: +91-20-22951715 / 22951515

This document is intellectual property of PRAJ Industries Limited and is generated for confidential business purposes. It should not be used for purposes other than designated or reproduced without written permission from PRAJ Industries Limited

Seller warrants that this product formulation conforms to its chemical description and is reasonably fit for the purpose referred to in the directions for use when used in accordance with the directions under normal conditions. The conformance of product performance will be done strictly by the analytical protocols given by the seller. All risks on account of use of the product not in accordance with the directions will be with the buyer. Seller makes no other warranty or representation of any kind, express or implied, about the product, including NO IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS OF THE GOODS for purposes other than specified by the seller. No such warranties shall be implied by law and no agent of seller is authorized to alter this warranty in any way except in writing with a specific reference to this warranty. The exclusive and maximum possible remedy against the seller shall be a claim for damages not to exceed the purchase price of the product, without regard to whether such a claim is based upon breach of contract/ warranty. Any dispute, controversy or claim arising out of this contract or breach thereof, shall be settled by arbitration in accordance with the provision of Indian arbitration and reconciliation act 1996 and shall be governed by Indian laws and shall have exclusive jurisdiction of Pune Maharashtra Court.



Section 5 - Fire and Explosion Data

Suitable extinguishing media	:	Water spray, foam, dry powder or CO ₂ .
Specific hazards during fire fighting	:	Not classed as flammable. If involved in a fire, no toxic fumes.
Special protective equipment for fire-fighters	:	No special protective equipment required. Suitable respiratory protection.

Section 6 - Accidental Release Measures

Personal precautions	:	Ensure suitable personal protection during removal of spillages.
Environmental precautions	:	Do not allow to enter drains, sewers or watercourses.
Methods for cleaning up	:	Absorb spillages onto sand, earth or any suitable adsorbent material. Transfer to a container for disposal.

Section 7 - Handling and Storage

Handling :

Advice on safe handling	:	Avoid contact with skin and eyes. Do not breathe spray.
-------------------------	---	--

Storage:

Requirements for storage areas and containers	:	Keep container tightly closed in a cool and dry place and protected from direct exposure to sunlight. Do not store in humid area.
---	---	---

Section 8 - Exposure Controls & Personal Protection

Recommended Personnel Protective Equipment

Respiratory Protection	:	Not required under usual conditions of use.
Hand protection	:	Impermeable gloves recommended.
Eye protection	:	Protective glasses or eye shield.
Protection	:	Wear suitable protective clothing

PRAJ INDUSTRIES LIMITED, Praj Tower, 274 & 275, Bhamburda Chowk-Hinjewadi Road, Hinjewadi, Pune – 411 057, India

Phone: +91-20-22941000/71802000, Fax: +91-20-22951718 / 22951515

This document is intellectual property of PRAJ Industries Limited and is ~~not~~ ^{not} to be used for confidential business purposes. It should not be used for purposes other than designated or reproduced without written permission from PRAJ Industries Limited.

Seller warrants that this product formulation conforms to its chemical description and is reasonably fit for the purpose referred to in the directions for use when used in accordance with the directions under normal conditions. The conformance of product performance will be done strictly by the analytical protocols given by the seller. All risks on account of use of the product not in accordance with the directions will be with the buyer. Seller makes no other warranty or representation of any kind, express or implied, about the product, including NO IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS OF THE GOODS for purposes other than specified by the seller. No such warranties shall be implied by law and no agent of seller is authorized to alter this warranty in any way except in writing with a specific reference to this warranty. The exclusive and maximum possible remedy against the seller shall be a claim for damages not to exceed the purchase price of the product, without regard to whether such a claim is based upon breach of contract/warranty. Any dispute, controversy or claim arising out of this contract or breach thereof, shall be settled by arbitration in accordance with the provision of Indian arbitration and reconciliation act 1996 and shall be governed by Indian laws and shall have exclusive jurisdiction of Pune Maharashtra Court.


Exposure Guidelines :
PEL (OSHA) : Not established

TLV (ACGIH) : Not established

Section 9 – Physical And Chemical Properties

Form	:	Powder
Colour	:	White / Off white
Odour	:	Slightly Pleasant
pH	:	Not applicable
Melting point	:	Not applicable
Flash point	:	Not applicable
Ignition temperature	:	Not applicable
Vapour pressure	:	Not applicable
Density	:	Not applicable
Solubility	:	Water soluble
Additional Information	:	Explosive property no data. Oxidising property no data.

Section 10 – Stability and Reactivity

This material is stable under normal conditions of use.

Conditions to avoid	:	None known
Materials to avoid	:	None known
Hazardous decomposition products	:	None known

Section 11 – Toxicological Information

Acute toxicity	:	The acute oral LD50 in rats for the male and female combined is greater than 5000mg/kg. This product is non toxic in a single dose ingestion.
Skin irritation	:	Repeated or prolonged skin contact may result in slight irritation.
Eye contact	:	May cause eye irritation.

PRAJ INDUSTRIES LIMITED, Praj Tower, 274 & 275, Bhamburda Chowk-Hinjewadi Road, Hinjewadi, Pune – 411 057, India

Phone: ++91-20-22941000/71802000, Fax: +91-20-22951718 / 22951515

This document is intellectual property of PRAJ Industries Limited and is generated for confidential business purposes. It should not be used for purposes other than designated or reproduced without written permission from PRAJ Industries Limited.

Seller warrants that this product formulation conforms to its chemical description and is reasonably fit for the purpose referred to in the directions for use when used in accordance with the directions under normal conditions. The conformance of product performance will be done strictly by the analytical protocols given by the seller. All risks on account of use of the product not in accordance with the directions will be with the buyer. Seller makes no other warranty or representation of any kind, express or implied, about the product, including NO IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS OF THE GOODS for purposes other than specified by the seller. No such warranties shall be implied by law and no agent of seller is authorized to alter this warranty in any way except in writing with a specific reference to this warranty. The exclusive and maximum possible remedy against the seller shall be a claim for damages not to exceed the purchase price of the product, without regard to whether such a claim is based upon breach of contract/warranty. Any dispute, controversy or claim arising out of this contract or breach thereof, shall be settled by arbitration in accordance with the provision of Indian arbitration and reconciliation act 1996 and shall be governed by Indian laws and shall have exclusive jurisdiction of Pune Maharashtra Court.



Section 12 – Ecological Information

Ecotoxicity	:	No eco-toxicity hazard is known.
Environmental Effects	:	No environmental hazard is known.
Persistence/Degradability	:	The organic components of the product are biodegradable
Bioaccumulation	:	Not available

Section 13 – Disposal Consideration

Disposal Method	:	Do not empty into drains. Disposal should be in accordance with local, state or national legislation.
-----------------	---	--

Section 14 – Transport Information

UN No.	:	Not applicable
Proper shipping name	:	None
Hazardous components	:	Not applicable

Section 15 – Regulatory Information

The product is non hazardous and contains all the regulatory information required -

TSCA – Not applicable,

SARA – Not Applicable

OSHA – Not applicable

Clean water act – Not applicable

Clean Air act – Not applicable

Other International Regulations – No information available.

Section 16 – Other Information

The Information contained in this material Safety Data Sheet, as of the issue date, is believed to be true and correct. However, the accuracy or completeness of this information and any recommendations or suggestions is made without warranty and guarantee.

Since the conditions of use are beyond the control of company, it is the responsibility of the user to determine the conditions of safe use of these preparations.

PRAJ INDUSTRIES LIMITED. Praj Tower, 274 & 275, Bhamburda Chowk-Hinjewadi Road, Hinjewadi, Pune – 411 057, India

Phone: ++91-20-22941000/71802000, Fax: ++91-20-22951718 / 22951515, Mail: info@praj.net

This document is intellectual property of PRAJ Industries limited and is generated for confidential business purposes. It should not be used for purposes other than designated or reproduced without written permission from PRAJ Industries Limited.

Seller warrants that this product formulation conforms to its chemical description and is reasonably fit for the purpose referred to in the directions for use when used in accordance with the directions under normal conditions. The conformance of product performance will be done strictly by the analytical protocols given by the seller. All risks on account of use of the product not in accordance with the directions will be with the buyer. Seller makes no other warranty or representation of any kind, express or implied, about the product, including NO IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS OF THE GOODS for purposes other than specified by the seller. No such warranties shall be implied by law and no agent of seller is authorized to alter this warranty in any way except in writing with a specific reference to this warranty. The exclusive and maximum possible remedy against the seller shall be a claim for damages not to exceed the purchase price of the product, without regard to whether such a claim is based upon breach of contract/ warranty. Any dispute, controversy or claim arising out of this contract or breach thereof, shall be settled by arbitration in accordance with the provision of Indian arbitration and reconciliation act 1996 and shall be governed by Indian laws and shall have exclusive jurisdiction of Pune Maharashtra Court.

ANEXO C



Figura 15. Reactivos necesarios para la propagación de la levadura.



Figura 16. Caldo de nutrientes-Levadura.



Figura 17. Extracto de malta con levadura para corte.



Figura 18. Balón con caldo de nutrientes y Matraz con extracto de levadura para corte.

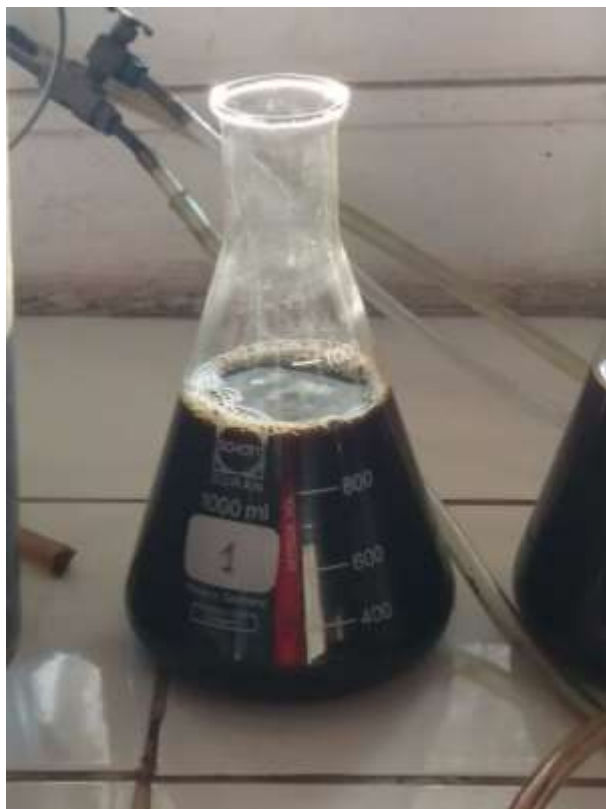


Figura 19. Matraz con melaza diluida a 20 °Brix más levadura.



Figura 20. Propagación de levadura con aeración.



Figura 21. Bolsa de Fosfato Monoamónico utilizado.



Figura 22. Bolsas de Urea en la planta.



Figura 23. Propagación de levadura a 40 y 200 Lt.



Figura 24. Parte interior de los tanques con 40 y 200 Lt con aeración.



Figura 25. Posa de almacenamiento de la melaza.



Figura 26. Tanque homogenizador de melaza diluida.



Figura 27. Tanque homogenizador de melaza diluida.



Figura 28. Tanque prefermentador vacío.



Figura 29. Tanque prefermentador llenado al 10%.



Figura 30. Muestreo de °Brix en el tanque prefermentador.



Figura 31. Mostera volante en proceso.



Figura 32. Llenado de mostera.



Figura 33. Finalización del llenado de mostera.



Figura 34. Fermentación del mosto.



Figura 35. Fermentación de un tanque con presencia de espuma.



Figura 36. Pasillo superior de la sección de tanques de fermentación.



Figura 37. Vista superior de las ocho mosteras.



Figura 38. Fermentación agotada en una dorna.

ANEXO D

Figura 39. Material de vidrio y reactivos de laboratorio.



Figura 40. Producto Effymoll+.



Figura 41. 100 ml de semilla a 7,5 Brix.



Figura 42. Botellas de muestra en blanco con las semillas.



Figura 43. Botellas de BetaBio 45% en dosis de 6 ppm y 8 ppm, con semilla incorporada.



Figura 44. Botellas con muestras en su interior.



Figura 45. Botellas de Effymoll+ en dosis de 3 ppm y 5 ppm, con semilla incorporada.



Figura 46. Balde con melaza pura.



Figura 47. Balde con melaza diluida a 20,2 Brix.



Figura 48. Solución de Effymoll+ y Betabio45.



Figura 49. Control de temperatura en botella 01 de Effymoll+ 3 ppm y en botella 01 de Effymoll+ 7 ppm.



Figura 50. Equipo de destilación con el mosto fermentado.

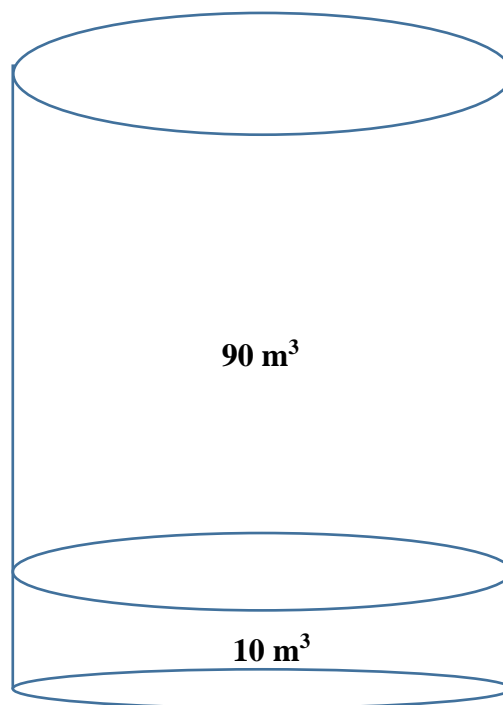
ANEXO E

<i>Grados Brix</i>	<i>Densidad</i>	<i>Grados Beaumé</i>	<i>Gramos de azúcar por litro de agua</i>	<i>Grados Brix</i>	<i>Densidad</i>	<i>Grados Beaumé</i>	<i>Gramos de azúcar por litro de agua</i>
1	1,0038	0,55	10,10	38	1,1692	20,80	612,90
2	1,0077	1,10	20,41	39	1,1743	21,40	639,34
3	1,0117	1,70	30,93	40	1,1794	21,90	606,77
4	1,0157	2,20	41,67	41	1,1846	22,40	694,92
5	1,0197	2,80	52,65	42	1,1898	23	724,14
6	1,0237	3,30	63,85	43	1,1950	23,50	754,35
7	1,0277	3	75,27	44	1,2003	24	785,71
8	1,0318	4,40	86,96	45	1,2056	24,60	816,18
9	1,0359	5	98,90	46	1,2110	25	851,85
10	1,0401	5,55	111,11	47	1,2163	25,60	886,79
11	1,0443	6,10	123,59	48	1,2218	26,10	923,08
12	1,0485	6,70	136,56	49	1,2272	26,70	960,78
13	1,0527	7,20	149,42	50	1,2327	27,20	1.000
14	1,0570	7,80	162,79	51	1,2383	27,70	1.040,81
15	1,0613	8,30	176,47	52	1,2439	28,20	1.083,83
16	1,0656	8,90	190,48	53	1,2495	28,75	1.127,65
17	1,0700	9,40	204,82	54	1,2551	29,30	1.172,91
18	1,0744	10	219,51	55	1,2608	29,80	1.222,22
19	1,0788	10,50	234,57	56	1,2665	30,30	1.272,72
20	1,0832	11,10	250	57	1,2723	30,80	1.325,58
21	1,0877	11,60	265,82	58	1,2781	31,30	1.380,95
22	1,0923	12,20	282,05	59	1,2840	31,85	1.439,02
23	1,0968	12,70	298,70	60	1,2898	32,40	1.500
24	1,1014	13,30	315,79	61	1,2958	32,90	1.564,10
25	1,1060	13,80	333,33	62	1,3017	33,40	1.631,57
26	1,1107	14,35	351,35	63	1,3077	33,90	1.702,70
27	1,1154	14,90	396,86	64	1,3138	34,40	1.777,77
28	1,1201	11,40	388,89	65	1,3198	34,90	1.857,14
29	1,1248	16	408,45	66	1,3260	35,40	1.941,17
30	1,1296	16,50	418,57	67	1,3322	35,90	2.030,30
31	1,1344	17,10	419,27	68	1,3384	36,40	2.125
32	1,1393	17,60	470,59	69	1,3446	36,90	2.225,80
33	1,1442	18,50	492,54	70	1,3509	37,40	2.333,33
34	1,1491	18,70	515,15	71	1,3572	37,90	2.448,27
35	1,1541	19,20	538,46	72	1,3635	38,30	2.571,42
36	1,1591	19,80	572,50	73	1,3699	38,80	2.703,70
37	1,1641	20,30	587,30	74	1,3761	39,30	2.846,15

Figura 51. Relación de grados Brix, densidad, grados Baume a 15°C.

ANEXO F

Cálculos para la parte experimental



Al llenar los 100 m³ se determinó el peso que este debía tener, a la densidad correspondiente en su respectivo grado Brix.

Volumen	Brix	Densidad	Peso
90 m ³	20,2	1,0841	P90
10 m ³	7,5	1,02975	P10

$$P = \frac{V * Brix * \rho}{100}$$

$$P90 = \frac{90m^3 * 20,2 * 1,0841 \frac{Tm}{m^3}}{100}$$

$$P90 = 19,70894 \text{ Tm}$$

$$P10 = \frac{10m^3 * 7,5 * 1,02975 \frac{Tm}{m^3}}{100}$$

$$P10 = 0,77231 \text{ Tm}$$

El peso del tanque es la suma de $P90 + P10$ y esto es igual a: 20,48125 Tm

Esto debe ser igual a

Volumen	°Brix	Densidad	Peso
100 m ³	B _x	D _x	20,48125 Tm

Hallamos el °Brix promedio y después se sometió a una serie de iteraciones para hallar un valor cercano al peso encontrado en el paso anterior.

°Brix promedio sin ajuste:

$$V1 * Brix1 + V2 * Brix2 = V3 * Brix3$$

$$90 m^3 * 20,2 + 10 m^3 * 7,5 = 100m^3 * Brix3$$

$$18,93 = Brix3$$

°Brix promedio con ajuste:

Número	Volumen	°Brix	Densidad	Peso
	100 m ³	B _x	D _x	20,48125 Tm
1	100 m ³	18,93	1,078492	20,41585 Tm
2	100 m ³	18,95	1,07858	20,43909 Tm
3	100 m ³	18,96	1,078624	20,45071 Tm
4	100 m ³	18,965	1,078646	20,45652 Tm
5	100 m ³	18,97	1,0784668	20,46233 Tm
6	100 m ³	18,975	1,07869	20,46814 Tm
7	100 m ³	18,98	1,07871	20,47392 Tm
8	100 m ³	18,986	1,078738	20,48092 Tm

Hallando el peso:

$$P_x = \frac{V * B_x * D_x}{100}$$

Iteración N°01

$$P_1 = \frac{V * B_1 * D_1}{100}$$

$$P_1 = \frac{100m^3 * 18,93 * 1,078492 \frac{Tm}{m^3}}{100}$$

$$P_1 = 20,41585 Tm$$

Iteración N°02

$$P_2 = \frac{V * B_2 * D_2}{100}$$

$$P_2 = \frac{100m^3 * 18,95 * 1,07858 \frac{Tm}{m^3}}{100}$$

$$P_2 = 20,43909 Tm$$

Iteración N°03

$$P_3 = \frac{V * B_3 * D_3}{100}$$

$$P_3 = \frac{100m^3 * 18,96 * 1,078624 \frac{Tm}{m^3}}{100}$$

$$P_3 = 20,45071 Tm$$

Iteración N°04

$$P_4 = \frac{V * B_4 * D_4}{100}$$

$$P_4 = \frac{100m^3 * 18,965 * 1,078646 \frac{Tm}{m^3}}{100}$$

$$P_4 = 20,45652 Tm$$

Iteración N°05

$$P_5 = \frac{V * B_5 * D_5}{100}$$

$$P_5 = \frac{100m^3 * 18,97 * 1,078668 \frac{Tm}{m^3}}{100}$$

$$P_5 = 20,46233 Tm$$

Iteración N°06

$$P_6 = \frac{V * B_6 * D_6}{100}$$

$$P_6 = \frac{100m^3 * 18,975 * 1,07869 \frac{Tm}{m^3}}{100}$$

$$P_6 = 20,46814 Tm$$

Iteración N°07

$$P_7 = \frac{V * B_7 * D_7}{100}$$

$$P_7 = \frac{100m^3 * 18,98 * 1,07871 \frac{Tm}{m^3}}{100}$$

$$P_7 = 20,47392 Tm$$

Iteración N°08

$$P_8 = \frac{V * B_8 * D_8}{100}$$

$$P_8 = \frac{100m^3 * 18,986 * 1,078738 \frac{Tm}{m^3}}{100}$$

$$P_8 = 20,48092 Tm$$

Peso de melaza a 86,08 °Brix para 100 m³

Con 20,2 °Brix en 90 m³:

$$P_{86,08} * Brix_1 = P_{20,2} Brix_2$$

$$P_{86,08} = \frac{1,0841 \frac{Tm}{m^3} * 90m^3 * 20,2}{86,08}$$

$$P_{86,08} = 22,896 Tm$$

Con 12 °Brix en 10 m³:

$$P_{86,08} * Brix_1 = P_{12} Brix_2$$

$$P_{86,08} = \frac{1,0485 \frac{Tm}{m^3} * 10m^3 * 12}{86,08}$$

$$P_{86,08} = 1,462 Tm$$

Con un total de 24, 358 Tm de melaza de 86,08 °Brix

P_t= 24,358 Tm

Peso de melaza a 86,08 °Brix para 1 litro.

Con 20,2 °Brix en 90 m³: 0,22896 kg de melaza de 86,08 °Brix.

Con 12 °Brix en 10 m³: 0,01462 kg de melaza de 86,08 °Brix.

Volumen total de melaza

Para una botella de fermentación se utiliza 228,961 g de melaza a 86,06 °Brix con una densidad de 1,45535 g/ml:

V_m : Volumen de melaza

M_m : Masa de melaza

δ_m : Densidad de melaza

$$V_m = \frac{M_m}{\delta_m} = 157,361 \text{ ml}$$

$$V_m = \frac{228,961 \text{ g}}{1,455 \frac{\text{g}}{\text{ml}}} = 157,361 \text{ ml}$$

Volumen de melaza por unidad de botella 157,361 ml

Hallando el volumen total de melaza (V_{mt}):

$$V_{mt} = V_m * Nb$$

$$V_{mt} = 157,361 \text{ ml} * 29$$

$$V_{mt} = 4563,469 \text{ ml}$$

Volumen total de melaza en las 29 botellas: 4563,469 ml

Volumen total de agua

Para el volumen de una botella se tiene:

V_T : Volumen total

V_{H_2O} : Volumen total de agua en una botella

V_m : Volumen de melaza a 86,06 °Brix en una botella

$$V_T = V_{H_2O} + V_m$$

$$900 \text{ ml} = X + 157,361 \text{ ml}$$

$$742,639 \text{ ml} = X$$

En una botella se emplea 742,639 ml de agua para diluir la melaza

Cantidad total de agua ($V_{H_2O_t}$) empleada en las 29 botellas:

$$V_{H_2O_t} = V_{H_2O} * Nb$$

$$V_{H_2O_t} = 742,639 \text{ ml} * 29$$

$$V_{H_2O_t} = 21536,531 \text{ ml}$$

Dosificación para Effymoll+

20,2 °Brix $\rightarrow \rho = 1,0841$

Para 5 ppm en un 1 litro tenemos:

$$5 \frac{mg}{kg} * 1,0841 \text{ kg} = 5,4205 \text{ mg}$$

Lo multiplicamos por 100 para facilitar el pesaje:

$$100 * 5,4205 \text{ mg} = 542,05 \text{ mg}$$

$$542,05 \text{ mg} = 0,54205 \text{ g}$$

En una solución de 0,1 litro = 100 ml

1 ml = 5 ppm

3 ppm será $= 3/5 = 0,6 \text{ ml}$

7 ppm será $= 7/5 = 1,4 \text{ ml}$

Dosificación para BetaBio 45%

20,2 °Brix $\rightarrow \rho = 1,0841$

Para 8 ppm en un 1 litro tenemos:

$$8 \frac{mg}{kg} * 1,0841 kg = 8,6728 mg$$

Lo multiplicamos por 100 para facilitar el pesaje:

$$100 * 8,6728 mg = 867,28 mg$$

$$867,28 mg = 0,86728 g$$

En una solución de 0,1 litro = 100 ml

Como el BetaBio 45% está en solución, se divide por la densidad para conocer el volumen a dosificar:

V_{Bb} = Volumen de BetaBio 45%

ρ_{Bb} = Densidad del BetaBio 45%

P = Peso

$$V_{Bb} = \frac{P}{\rho_{Bb}}$$

$$V_{Bb} = \frac{0,86728 g}{1,07 \frac{g}{ml}}$$

$$V_{Bb} = 0,810 ml$$

8 ppm = 1 ml

6 ppm = 0,75 ml

10 ppm = 1,25 ml

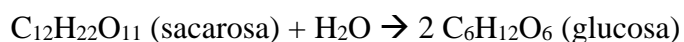
Hallando Rendimiento Teórico

La melaza tiene sacarosa y glucosa (reductores), estos datos nos lo brindaron los laboratoristas del laboratorio de fábrica con la melaza de estudio:

Sacarosa: 33,70%

Glucosa (reductores): 18,66%

Teniendo en cuenta que la relación de transformación de sacarosa a glucosa es:



$$\text{PM} = \quad \quad 342 \quad \quad 18 \quad \quad 360$$

$$\text{Diferencia} = 360 - 342 = 18$$

Con la siguiente ecuación hallamos el porcentaje de incremento de peso de la sacarosa al transformarse en glucosa:

$$\% = \frac{18 * 100}{342} = 5,263\%$$

Es decir que el peso de la sacarosa cuando se transforma a glucosa (reductores) se incrementa en 5,263%.

Entonces la sacarosa de esta melaza será: $33,70 \times 1,05263 = 35,474\%$

Más los reductores que tiene la melaza 18,66%

Total (A_{RT}) 54,134%

Esta melaza tiene azúcares totales como invertidos 54,134% y esto es lo que fermenta:



$$\text{PM} = \quad \quad 180 \quad \quad 92 \quad \quad 88$$

Como glucosa

$$180 \text{ ----- } 92$$

$$1000 \text{ ----- } x$$

$$X = \frac{1000 * 92}{180} = 511,111 \text{ kg}$$

Por cada 1000 kg de azúcares como invertidos, produciremos teóricamente 511,111 kg de etanol.

Transformando a litros de alcohol y dividiendo entre la densidad legal a la temperatura correspondiente, se tiene 643,4 litros de alcohol etílico anhidro por cada Tm de azúcares invertidos. Este es el factor que se aplica para hallar los litros de alcohol anhidro con una eficiencia al 100% (L_A).

Balance de rendimiento teórico:

Si fermentara al 100% de eficiencia, todo lo que va a un fermentador nos daría:

$$p_T * A_{RT} * L_A = L_{AT}$$

$$24,358Tm * 54,134\% * 643,4 \frac{l}{Tm} = 8483,846 \text{ l}$$

A_{RT} = Azúcares totales como invertidos.

L_A = Factor de conversión de Tm de azúcares invertidos a litros de alcohol etílico anhidro.

Esto quiere decir que si colocamos los 24,358 Tm de melaza y fermenta con una eficiencia del 100%, produciríamos 8483,846 l de etanol anhidro, al dividir dicho volumen con el peso total resulta 348,298 l/Tm el cual representa el rendimiento teórico (R_T).

Balance de rendimiento:

$$\frac{G_A * V_T}{P_T} = R_R$$

G_A = Grado alcohólico.

V_T = Volumen total por dorna.

P_T = Peso total por dorna.

R_R = Rendimiento real.

Para muestra en blanco

B0, R1:

$$\frac{5,7\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 234,009 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B0, R2:

$$\frac{5,7\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 234,009 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

Para el BetaBio 45%

B1, R1:

$$\frac{6,2\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 254,536 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B1, R2:

$$\frac{6,2\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 254,536 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B1, R3:

$$\frac{6,2\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 254,536 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B1, R4:

$$\frac{6,1\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 250,431 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B2, R1:

$$\frac{6,4\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 262,747 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B2, R2:

$$\frac{6,3\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 258,642 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B2, R3:

$$\frac{6,5\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 266,853 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B2, R4:

$$\frac{6,2\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 254,536 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B3, R1:

$$\frac{6,6\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 270,958 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B3, R2:

$$\frac{6,6\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 270,958 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B3, R3:

$$\frac{6,5\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 266,853 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B3, R4:

$$\frac{6,5\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 266,853 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

Para el Effymoll+

B4, R1:

$$\frac{6,5\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 266,853 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B4, R2:

$$\frac{6,5\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 266,853 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B4, R3:

$$\frac{6,3\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 258,642 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B4, R4:

$$\frac{6,5\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 266,853 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B5, R1:

$$\frac{6,4\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 262,747 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B5, R2:

$$\frac{6,1\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 250,431 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B5, R3:

$$\frac{6,1\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 250,431 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B5, R4:

$$\frac{6,0\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 246,326 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B6, R1:

$$\frac{6,3\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 258,642 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B6, R2:

$$\frac{6,2\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 254,536 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B6, R3:

$$\frac{6,1\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 250,431 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

B6, R4:

$$\frac{6,1\% * 100000 \text{ l}}{24,358 \text{ Tm}} = 250,431 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}$$

Eficiencia Fermentativa:

$$\frac{R_R * 100}{R_T} = \%R$$

Para muestra en blanco

B0, R1:

$$\frac{234,009 \frac{\text{l}}{\text{Tm}} * 100}{348,298 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}} = 67,186\%$$

B0, R2:

$$\frac{234,009 \frac{\text{l}}{\text{Tm}} * 100}{348,298 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}} = 67,186\%$$

Para el BetaBio 45%

B1, R1:

$$\frac{254,536 \frac{\text{l}}{\text{Tm}} * 100}{348,298 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}} = 73,080\%$$

B1, R2:

$$\frac{254,536 \frac{\text{l}}{\text{Tm}} * 100}{348,298 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}} = 73,080\%$$

B1, R3:

$$\frac{254,536 \frac{\text{l}}{\text{Tm}} * 100}{348,298 \frac{\text{l}}{\text{Tm}}} = 73,080\%$$

B1, R4:

$$\frac{250,431 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 71,901\%$$

B2, R1:

$$\frac{262,747 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 75,437\%$$

B2, R2:

$$\frac{258,642 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 74,259\%$$

B2, R3:

$$\frac{266,853 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 76,616\%$$

B2, R4:

$$\frac{254,536 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 73,080\%$$

B3, R1:

$$\frac{270,958 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 77,795\%$$

B3, R2:

$$\frac{270,958 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 77,795\%$$

B3, R3:

$$\frac{266,853 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 76,616\%$$

B3, R4:

$$\frac{266,853 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 76,616\%$$

Para el Effymoll+

B4, R1:

$$\frac{266,853 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 76,616\%$$

B4, R2:

$$\frac{266,853 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 76,616\%$$

B4, R3:

$$\frac{258,642 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 74,259\%$$

B4, R4:

$$\frac{266,853 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 76,616\%$$

B5, R1:

$$\frac{262,747 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 75,437\%$$

B5, R2:

$$\frac{250,431 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 71,901\%$$

B5, R3:

$$\frac{250,431 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 71,901\%$$

B5, R4:

$$\frac{246,326 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 70,723\%$$

B6, R1:

$$\frac{258,642 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 74,259\%$$

B6, R2:

$$\frac{254,536 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 73,080\%$$

B6, R3:

$$\frac{250,431 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 71,901\%$$

B6, R4:

$$\frac{250,431 \frac{l}{Tm} * 100}{348,298 \frac{l}{Tm}} = 71,901\%$$

ANEXO G

Usando la prueba de Shapiro-Wilk, si el valor de significancia es menor a ,05, entonces rechazamos el H_0 que los datos provienen de una población normal.

Normalidad de los datos para grado alcohólico

Dosis	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
b1	,441	4	.	,630	4	,001
b2	,151	4	.	,993	4	,972
b3	,298	4	.	,849	4	,224
b4	,441	4	.	,630	4	,001
b5	,364	4	.	,840	4	,195
b6	,283	4	.	,863	4	,272

Normalidad de los datos para rendimiento

Dosis	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
b1	,441	4	.	,630	4	,001
b2	,151	4	.	,993	4	,972
b3	,307	4	.	,729	4	,024
b4	,441	4	.	,630	4	,001
b5	,364	4	.	,840	4	,195
b6	,283	4	.	,863	4	,272

Normalidad de los datos para la eficiencia fermentativa

Dosis	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
b1	,441	4	.	,630	4	,001
b2	,151	4	.	,993	4	,972
b3	,307	4	.	,729	4	,024
b4	,441	4	.	,630	4	,001
b5	,364	4	.	,840	4	,195
b6	,283	4	.	,863	4	,272

ANEXO H

Usando la prueba de Kruskal-Wallis, se comparó las tres muestras tomadas en cada producto, donde si el valor de significancia es menor a ,05, entonces rechazamos H_0 que los resultados son similares.

Prueba de Kruskal-Wallis para Betabio45

	Grado Alcohólico	Rendimiento	Eficiencia fermentativa
H de Kruskal-Wallis	8,806	8,839	8,839
Gl	2	2	2
Sig. Asintótica	,012	,012	,012

P valor (,012) es menor que 0,05, por lo tanto, rechazamos H_0 , los resultados son diferentes entre sí.

Prueba de Kruskal-Wallis para Effymoll+

	Grado Alcohólico	Rendimiento	Eficiencia fermentativa
H de Kruskal-Wallis	6,525	6,525	6,525
Gl	2	2	2
Sig. Asintótica	,038	,038	,038

P valor (,038) es menor que 0,05, por lo tanto, rechazamos H_0 , los resultados son diferentes entre sí.

ANEXO I

Usando la prueba de Prueba U de Mann-Whitney, se comparó cada par de muestras tomadas por cada producto, donde si el valor de significancia es menor a ,05, entonces rechazamos el H_0 que los datos son similares.

Comparación de concentraciones para BetaBio 45%

B1 vs B2

	Grado Alcohólico	Rendimiento	Eficiencia fermentativa
U de Mann-Whitney	1,500	1,500	1,500
W de Wilcoxon	11,500	11,500	11,500
Z	-1,999	-1,999	-1,999
Sig. asintótica(bilateral)	,046	,046	,046
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,057 ^b	,057 ^b	,057 ^b

P valor (,046) es menor que 0,05, por lo tanto, rechazamos H_0 , los resultados son diferentes entre sí.

B1 vs B3

	Grado Alcohólico	Rendimiento	Eficiencia fermentativa
U de Mann-Whitney	,000	,000	,000
W de Wilcoxon	10,000	10,000	10,000
Z	-2,381	-2,397	-2,397
Sig. asintótica(bilateral)	,017	,017	,017
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,029 ^b	,029 ^b	,029 ^b

P valor (,017) es menor que 0,05, por lo tanto, rechazamos H_0 , los resultados son diferentes entre sí.

B2 vs B3

	Grado Alcohólico	Rendimiento	Eficiencia fermentativa
U de Mann-Whitney	1,000	1,000	1,000
W de Wilcoxon	11,000	11,000	11,000
Z	-2,071	-2,084	-2,084
Sig. asintótica(bilateral)	,038	,037	,037
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,057 ^b	,057 ^b	,057 ^b

P valor (,038) es menor que 0,05, por lo tanto, rechazamos H_0 , los resultados son diferentes entre sí.

Comparación de concentraciones para Effymoll+**B4 vs B5**

	Grado Alcohólico	Rendimiento	Eficiencia fermentativa
U de Mann-Whitney	1,000	1,000	1,000
W de Wilcoxon	11,000	11,000	11,000
Z	-2,084	-2,084	-2,084
Sig. asintótica(bilateral)	,037	,037	,037
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,057 ^b	,057 ^b	,057 ^b

P valor (,037) es menor que 0,05, por lo tanto, rechazamos H_0 , los resultados son diferentes entre sí.

B4 vs B6

	Grado Alcohólico	Rendimiento	Eficiencia fermentativa
U de Mann-Whitney	,500	,500	,500
W de Wilcoxon	10,500	10,500	10,500
Z	-2,247	-2,247	-2,247
Sig. asintótica(bilateral)	,025	,025	,025
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,029 ^b	,029 ^b	,029 ^b

P valor (,025) es menor que 0,05, por lo tanto, rechazamos H_0 , los resultados son diferentes entre sí.

B5 vs B6

	Grado Alcohólico	Rendimiento	Eficiencia fermentativa
U de Mann-Whitney	6,000	6,000	6,000
W de Wilcoxon	16,000	16,000	16,000
Z	-,615	-,615	-,615
Sig. asintótica(bilateral)	,538	,538	,538
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,686 ^b	,686 ^b	,686 ^b

P valor (,538) es mayor que 0,05, por lo tanto, no rechazamos H_0 , los resultados son similares entre sí.