

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas

Departamento de Ingeniería Química

Facultad Química-Farmacía



UNIVERSIDAD CENTRAL

"MARTA ABREU" DE LAS VILLAS

VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA

Trabajo de Diploma

*Alternativas de incremento de la eficiencia en
fermentación alcohólica en la destilería
"Heriberto Duquesnet".*

Autor: Yurisbel Crespo Suárez

Tutores: Ing. Yenisleidy Martínez Martínez

Dra. Leyanis Mesa Garriga

2013-2014



Pensamiento

Bueno es ir a la lucha con determinación, abrazar la vida y vivir con pasión, perder con clase y vencer con osadía, porque el mundo pertenece a quien se atreve y la vida es mucho más para ser insignificante.

Charles Chaplin



Dedicatoria

La constancia de pequeños detalles construye grande cosas, por lo que dedico este triunfo con todo el amor que se merecen a mi mamá y a mi papá ya que no puedo estar más agradecido del cariño y el apoyo que me han brindado.

Y por último, lo dedico en especial a la persona que me ha obsequiado un pedacito de su corazón cada mañana, a mi tía querida Reina.



Agradecimientos

La vida es una carrera llena de obstáculos y la mía no ha sido la excepción, pero he salido victorioso gracias al apoyo constante, las experiencias, memorias y consejos de personas que directa o indirectamente provocaron un buen desarrollo personal y profesional en mí.

Agradezco en primer lugar a Dios por abrirme las puertas, hacer de lo imposible lo posible y por ayudarme en cada minuto de mi vida.

A mis tutoras Leyanis y Yenisleidys y a Cristina, por todo el apoyo brindado, en especial a Yeni por esa magia intelectual que utilizo en la realización de mi proyecto, lo cual nunca olvidaré.

A mi madre, que es lo que más quiero al igual que a mi padre, gracias a ambos por haberme dejado conocer a mi ángel de la guarda.

A mi abuela, a mi padrastro y a mis dos hermanos por estar presentes, a mis tías Marielkis y Mayisleidys así como al resto de mi familia.

A mi profesora de matemática Maida por haberme ayudado a elegir este camino.

A todos mis vecinos, en especial a Marlenis, Mabel, Delia, Yeny, Mariza, Deisy y Argelia por la ayuda brindada.

A mi primo Abelardo y a mi prima Daily.

A mis compañeros de aula por haber cursado estos cinco años de experiencia inolvidable así como a mis verdaderos amigos.

A los profesores de la facultad que me ayudaron y supieron impregnar un ejemplo a seguir.

A todos los trabajadores que me ayudaron en la destilería, gracias por el apoyo.

A las personas que no mencioné y que de una forma u otra me ayudaron, muchas gracias.

Y por último, a la persona más importante en mi carrera, que desde los 12 años me ha sabido cuidar y se ha entregado en cuerpo y alma a mi vida, como madre, padre, abuela y amiga, a mi ángel de la guarda, mi tía linda, Reina, la cual quiero y adoro con la vida.

A todos muchas gracias.



Resumen

El presente trabajo se desarrolló en la destilería “Heriberto Duquesne” perteneciente al municipio de Remedios con el objetivo de evaluar alternativas para el incremento de la eficiencia en fermentación y la reducción del impacto ambiental de sus producciones. Para ello se realizó una revisión exhaustiva de la bibliografía, plasmando una serie de aspectos conceptuales relacionados con la temática. Se llevaron a cabo experiencias en el laboratorio para evaluar el impacto del uso de jugo de los filtros y vinazas sobre la fermentación a través de un diseño experimental del tipo enrejado simple. Se determinaron los valores de porcentaje alcohólico y rendimiento para cada experimento. Los resultados se procesaron estadísticamente, permitiendo determinar el polinomio que da el cambio en la eficiencia para cualquier punto de mezcla. Se determinó el punto de mezcla óptimo para esta variante, resultando ser de un 54,1% del aporte de azúcares por parte de los Jugos de los filtros y 45,9 % por parte de la miel diluida con vinazas para una eficiencia del 73,92 %. Se realizó el análisis económico de esta variante, la cual logra recuperar la inversión en un período de 8,5 años. Se realizaron experiencias en el laboratorio encaminadas a mejorar la eficiencia fermentativa a través del método de VIMAS. Los resultados se procesaron estadísticamente y se determinó el modelo que relaciona la eficiencia en fermentación con el número de refrescos. Se realizó la optimización del modelo obtenido, resultando ser de cuatro refrescos para una eficiencia de 73,5 %. Y por último se realizó el análisis económico comparando los Costos Totales Producción para esta alternativa con la utilizada en la fábrica obteniéndose un ahorro de \$ 15600 anuales al utilizar cuatro refrescos en lugar de tres que es lo que se encuentra implementado en la destilería “Heriberto Duquesne”.



Abstract

The present work was developed in "Heriberto Duquesne" distillery belonging to Remedios with the objective of evaluating alternatives for the increment of the efficiency in fermentation and the reduction of the environmental impact of its productions. For that, it was carried out an exhaustive bibliography revision, capturing a series of conceptual aspects related with the thematic. It was carried out several experiences in the laboratory to evaluate the impact of the use of juice of the filters and stillage on the fermentation through an experimental design of simple grid type. The values of alcoholic percent and yield were determined for each experiment. The results were processed statistically, allowing us to determine the polynomial equation that gives the change in the efficiency for any mixture point. The best mixture point was determined for this variant, turning out to be of 54,1% of the contribution of sugars on the part of the Juices of the filters and 45,9% on the part of the honey diluted with stillage for an efficiency of 73,92%. It was carried out the economic analysis of this variant, which is able to recover the investment in a 8,5 year-old period. It was carried out experiences in the laboratory guided to improve the fermentation efficiency through the method of VIMAS. The results were statistically processed and the pattern was determined that relates the efficiency in fermentation with the number of sodas. It was carried out the optimization of the obtained pattern, turning out to be of four sodas for an efficiency of 73,5%. And lastly he/she was carried out the economic analysis comparing the Costs Total Production for this alternative with the one used in the factory being obtained a saving of \$15600 annual when using four sodas instead of three that is what is implemented in the still "Heriberto Duquesne."



Índice

	Resumen	
	Introducción	1
1	Capítulo I. Revisión bibliográfica	
1.1	Etanol. Generalidades.	3
1.2	Fermentación. Generalidades.	3
1.2.1	Usos de la fermentación	4
1.3	Fermentación alcohólica	5
1.3.1	Fundamentos bioquímicos de la fermentación alcohólica.	5
1.3.2	Microorganismos utilizados en la fermentación alcohólica	6
1.4	Principales variables que inciden en el proceso de fermentación.	9
1.5	Materias primas y su importancia en el proceso fermentativo.	11
1.5.1	Melazas	12
1.5.2	Combinaciones de sustratos en fermentación	15
1.5.3	Recirculación de vinazas a la etapa fermentativa.	16
1.6	Evaluación del uso combinado de miel final con jugo de los filtros y vinazas en la fermentación.	17
1.6.1	Fermentación de Miel con Jugos de los filtros y Vinazas.	18
1.6.2	Llenado de Fermentadores por el sistema de Refrescos.	18
1.6.3	Sistema de Volúmenes Incrementados por Múltiples Adiciones Secuenciales (VIMAS).	19
1.7	Conclusiones parciales.	19
2	Capítulo II. Desarrollo experimental para la búsqueda de mejoras en el proceso fermentativo.	21
2.1	Estudio de la fermentación con Jugo de los filtros y vinazas.	21
2.1.1	Análisis de los resultados.	27
2.1.2	Análisis estadístico del diseño.	29
2.1.3	Optimización del modelo.	33
2.2	Estudio de la fermentación por el método de los Volúmenes Incrementados por Múltiples Adiciones Secuenciales (VIMAS).	34
2.2.1	Análisis de los Resultados	39
2.2.3	Análisis Estadístico de los experimentos.	43
2.2.4	Optimización del modelo.	47
2.3	Conclusiones Parciales	48
3	Capítulo III. Análisis económico de alternativas	49
3.1	Determinación de los Costos de Producción de la Variante Patrón	49
3.2	Determinación de los Costos de Producción del sistema VIMAS	52
3.3	Determinación de los Costos de Producción de la mezcla de sustratos.	54
3.4	Análisis de los resultados.	57
35	Conclusiones parciales.	58
	Conclusiones	59
	Recomendaciones	60
	Bibliografía	61



Introducción

La crisis del mercado internacional del azúcar ha traído como consecuencia la necesidad de incrementar el desarrollo de tecnologías y de nuevos productos derivados de la caña. La mayoría de los países latinoamericanos, entre ellos los productores de azúcar, están en la búsqueda de nuevas estrategias para la reconversión de sus economías productivas para dar respuesta con ello a la apertura de nuevos mercados y a la integración regional. Una estrategia de diversificación es necesaria para lograr una explotación más amplia de la caña de azúcar que permita, junto a la producción de azúcar, la producción de un mayor número de derivados transformándola en una industria multidimensional productora de alimentos, de combustibles y de productos orgánicos.

La elevación de los precios del petróleo hicieron volver los ojos hacia la vía fermentativa de producción de etanol y hoy se trabaja fundamentalmente en la búsqueda de materias primas baratas, que sustituyan a las tradicionales materias azucaradas y que garanticen mejores resultados en los procesos de fermentación, recuperación y purificación al alcohol producido. En la búsqueda de nuevos sustratos azucarados, la industria azucarera ofrece corrientes intermedias, como jugos secundarios y de los filtros, que han sido utilizados en mezclas con mieles para fermentar, elevando el impacto de las producciones de etanol al disminuir los Costos de Producción.

Por otra parte, el desarrollo de procesos tecnológicos y químicos con el fin de obtener productos de gran demanda de la población, ha traído aparejado fenómenos negativos como son los provocados por sus desechos industriales que son vertidos al medio ambiente y traen consigo la contaminación de los recursos naturales. En particular, en los procesos de producción de bebidas y licores se obtienen residuales altamente agresivos. Tal es el caso de las vinazas. Si estos desechos reciben determinados tratamientos, pudieran ser aprovechados, por lo cual dejarían de ser contaminantes y por otro lado, los convertirían en una fuente adicional de recursos.

La destilería “Heriberto Duquesne” enfrenta serios problemas con la disposición de sus vinazas, por ello la búsqueda de alternativas que mejoren la eficiencia en fermentación a la par que disminuyan el impacto ambiental de sus producciones impulsan el desarrollo de este trabajo, que trae como problemática:

Problema Científico

La necesidad de explotar alternativas fermentativas de producción de etanol en Heriberto Duquesne en busca de mejores resultados económicos, tecnológicos y ambientales.

Hipótesis

Es posible la búsqueda de mejores resultados económicos, tecnológicos y ambientales a partir de alternativas de fermentación a etanol en Heriberto Duquesne.

Objetivo General

Evaluar el impacto económico de alternativas fermentativas para la obtención de etanol en la destilería Heriberto Duquesne.

Objetivos Específicos

1. Realizar un análisis técnico y ambiental del proceso fermentativo en la destilería Heriberto Duquesne.
2. Determinar el impacto del uso de diferentes sustratos (Jugo de los filtros y vinaza para la dilución de miel) sobre la eficiencia del proceso de producción de etanol en la destilería Heriberto Duquesne.
3. Evaluar el proceso fermentativo Fed batch de obtención de etanol a partir de mieles usando mayor número de alimentaciones.
4. Evaluar el impacto económico, tecnológico y ambiental de las alternativas estudiadas en las condiciones de la destilería Heriberto Duquesne.



Capítulo I

El alcohol etílico (C_2H_5OH), es un líquido incoloro, límpido y volátil, de olor etéreo y sabor picante. Muchos alcoholes pueden ser creados por fermentación de frutas o granos con levadura, pero solamente el etanol es producido comercialmente de esta manera **(Alemán, L., 2007)**.

Tiene grandes usos ya que se emplea en la elaboración de algunas bebidas alcohólicas, tales como el vino, la cerveza, la sidra, el cava, etc. Aunque en la actualidad se empieza a sintetizar también etanol mediante la fermentación a nivel industrial a gran escala para ser empleado como biocombustible. **(Wikipedia, 2009)**

Por su baja toxicidad y disponibilidad para disolver sustancias no polares, el etanol es utilizado frecuentemente como solvente en fármacos, perfumes y en esencias, como versátiles intermediarios en la síntesis orgánica. Una gran aplicación viene dada por su capacidad de hacerse combustir de una manera más limpia que la gasolina o el gasoil. **(Blanco, 1982)**. Es empleado además para aclarar y diluir recubrimientos de aeroplano, esmaltes, pulimentos para metales, barnices para metal y madera. **(Gámez, 2005)**.

1.1- Fermentación. Generalidades.

El conocimiento alcanzado en la actualidad de los mecanismos a través de los cuales las moléculas combustibles son degradadas por los seres vivos para obtener energía para los procesos vitales, permite tener una idea mucho más precisa sobre los procesos conocidos por fermentaciones; es decir, los procesos mediante los cuales muchos organismos extraen energía química de la molécula de glucosa y de otros combustibles en ausencia de oxígeno molecular. **(Hernández, 1986)**

La fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta, totalmente anaeróbico, siendo el producto final un compuesto orgánico. Estos productos finales son los que caracterizan los diversos tipos de fermentaciones. Fue descubierta por Louis Pasteur, que la describió como la "vie sans l'air" (la vida sin el aire) y es normalmente llevada a cabo por las levaduras. También algunos metazoos y protistas son capaces de realizarla. **(Wikipedia, 2009)**

En los seres vivos, la fermentación es un proceso anaeróbico y en él no interviene la mitocondria ni la cadena respiratoria. Son propias de los microorganismos, como algunas bacterias y levaduras. También se produce en la mayoría de las células de los animales

(incluido el hombre), excepto en las neuronas que mueren rápidamente si no pueden realizar la respiración celular. Algunas células, como los eritrocitos, carecen de mitocondrias y se ven obligadas a fermentar. También se conoce que el tejido muscular de los animales realiza la fermentación láctica cuando el aporte de oxígeno a las células musculares no es suficiente para el metabolismo aerobio y la contracción muscular.

Desde el punto de vista energético, las fermentaciones son muy poco rentables si se comparan con la respiración, ya que a partir de una molécula de glucosa, sólo se obtienen 2 moléculas de ATP, mientras que en la respiración se producen 38 moléculas de ATP a partir de una molécula de glucosa. Esto se debe a la oxidación del NADH_2 , que en lugar de penetrar en la cadena respiratoria, cede sus electrones a compuestos orgánicos con poco poder oxidante. **(Lehninger, A. y col. 2 Edic, 1993)**

En la industria la fermentación puede ser oxidativa, es decir, en presencia de oxígeno, pero es una oxidación aeróbica incompleta, como la producción de ácido acético a partir de etanol.

Las fermentaciones pueden ser clasificadas como:

- ✓ Naturales: Las condiciones ambientales permiten la interacción de los microorganismos y los sustratos orgánicos susceptibles.
- ✓ Artificiales: El hombre propicia condiciones y el contacto referido. **(Wikipedia, 2009)**

1.2.1- Usos de la fermentación.

Dentro de todos los usos que se le pueden dar a la fermentación, sin duda el industrial constituye uno primario. Ejemplo de ello lo tenemos en la conversión del mosto en vino, la cebada en cerveza y carbohidratos en dióxido de carbono para hacer pan. Otros usos de la fermentación son la producción de suplementos de vitamina B_{12} .

(Steinkraus, 1995) reporta que la fermentación de alimentos sirve a 5 propósitos generales:

1. Enriquecimiento de la dieta a través del desarrollo de una diversidad de sabores, aromas y texturas en los sustratos de los alimentos.
2. Preservación de cantidades substanciales de alimentos a través de ácido láctico, etanol, ácido acético y fermentaciones alcalinas.
3. Enriquecimiento de sustratos alimenticios con proteína, aminoácidos, ácidos grasos esenciales y vitaminas.

4. Detoxificación durante el proceso de fermentación alimenticia.
5. Disminución de los tiempos de cocinado y de los requerimientos de combustible.

La fermentación tiene algunos usos exclusivos para los alimentos ya que hace uso de su energía y puede crear condiciones inadecuadas para organismos indeseables, lo que contribuye a su preservación. También puede producir nutrientes importantes o eliminar antinutrientes.

1.2- Fermentación alcohólica.

La fermentación alcohólica es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire (oxígeno - O_2), originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono, por regla general azúcares (por ejemplo la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el almidón, etc.) para obtener como productos finales alcohol en forma de etanol (CH_3-CH_2-OH), dióxido de carbono (CO_2) en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico.

Las levaduras y bacterias causantes de este fenómeno son microorganismos muy habituales en las frutas y cereales y contribuyen en gran medida al sabor de los productos fermentados. Una de las principales características de estos microorganismos es que viven en ambientes completamente carentes de oxígeno (O_2).

Por otro lado el etanol no es el único compuesto que se obtiene al fermentar materiales azucarados y ciertamente no todos los componentes que se pueden obtener por fermentación resultan beneficiosos. Durante la fermentación alcohólica se producen una serie de compuestos, principalmente ácidos, aldehídos, ésteres y alcoholes de alto peso molecular que constituyen impurezas necesarias de eliminar para garantizar la calidad del etanol (producto principal). Este residuo es conocido como aceite de Fusel.

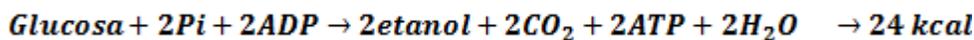
1.3.1- Fundamentos bioquímicos de la fermentación alcohólica.

La ruta enzimática de la glucólisis (degradación de glucosa por vía aerobia) y de la fermentación alcohólica fue aclarada en el transcurso de muchos años de investigación a finales del siglo XIX y en la primera mitad del XX.

Las observaciones fundamentales efectuadas con los extractos de levadura y el descubrimiento posterior de que los extractos musculares pueden catalizar la glucólisis hasta lactato, sirvieron para realizar investigaciones más intensas. La secuencia de reacciones entre

la glucosa y el piruvato se conoce por el nombre de ruta de Embden-Meyerhof, o también de Embden-Meyerhof-Parnas, en honor a sus descubridores.

Los sustratos más comúnmente usados para la fermentación son los azúcares, en especial la D-glucosa. Una clase de fermentación importante de la glucosa es la fermentación alcohólica. Para muchas levaduras en un medio adecuado, la fermentación significa la conversión de hexosas, principalmente glucosa, fructosa, manosa y galactosa, en ausencia de aire, en los siguientes productos finales:



Alrededor del 70 % de la energía es liberada como calor, el resto es preservado en dos enlaces fosfatos terminales de ATP (trifosfato de Adenosina) para usarlo en las reacciones de transferencia, tales como la activación de la glucosa (fosforilación) y de aminoácidos antes de las polimerización. **(Hernández, M., 2007)**

1.3.2- Microorganismos utilizados en la fermentación alcohólica

Enzimas producidas por los microorganismos son las responsables de que un sustrato de origen azucarado, amiláceo o celulósico, pueda ser transformado en alcohol etílico. **(Verbina, N., 1988)** y **(Martínez, J. y col., 1989)** coinciden en que las levaduras son los microorganismos más utilizados para la producción de etanol por la vía fermentativa, debido a que producen un mejor proceso de separación después de la fermentación, además originan un contenido de toxinas muy inferior a otros microorganismos. Entre los géneros más utilizados están: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. ellipsoideus*, *S. anamensis*, *Candida seudotropicalis*, *S. carlsbergensis*, *Kluyveromyces marxianus* y *Candida bytyrii*, *Pichia stipitis*.

Diferentes investigadores han realizado evaluaciones de cepas alcoholeras de levadura atendiendo a varios aspectos tales como **(Mesa, L. 2006)**:

- ✓ tolerancia al etanol,
- ✓ tolerancia a las altas temperaturas
- ✓ tolerancia a altas concentraciones de azúcar,
- ✓ rendimiento alcohólico,
- ✓ eficiencia en la fermentación y productividad

Tolerancia al alcohol

La tolerancia al etanol es un elemento importante en la selección de una cepa de levadura, pues de su capacidad de mantenerse activa en condiciones crecientes de concentración alcohólica en el medio dependerá el rendimiento del proceso. Estudios en cuanto a la tolerancia al etanol, usando concentraciones de etanol desde 0 a 12 % (V/V), reportan resultados en % alcohólico y eficiencia en la fermentación superiores a 7 °GL y 80 % respectivamente. Las levaduras utilizadas fueron de la especie *S. cerevisiae*.

Tolerancia a la alta temperatura

Muchas levaduras son sensibles a la temperatura: si ésta se eleva la productividad puede disminuir. Tenemos que decir que los sistemas de enfriamiento son caros, por lo que hay una razón económica para desarrollar cepas termotolerantes, que trabajen a temperaturas por encima de 40 °C sin pérdidas en la eficiencia, y que a la vez mantengan la estabilidad genética.

Tolerancia a la alta concentración de azúcares

Trabajar con altas concentraciones de azúcares produce mayor eficiencia y productividad del proceso fermentativo.

Se reporta que la cepa T-17 de levadura *S. cerevisiae*, aislada del jugo de caña, posee alta tolerancia a la concentración de azúcares y a la temperatura, con elevada producción de bioetanol. En condiciones industriales obtuvo mejores resultados en porcentaje alcohólico y eficiencia que la *S. cerevisiae* "Hualien", que es la más ampliamente empleada en Taiwan. Se han realizado experiencias con cepas osmófilas de *S. cerevisiae*, en la fermentación del mosto a 26 °Brix y se han alcanzado concentraciones de alcohol del orden de 11,4 % v/v.

En investigaciones realizadas por **(Mansur, H. y col., 1990)**, se probaron 12 cepas de las especies *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Richia membranaefaciens* en cuanto a rendimiento alcohol-sustrato, biomasa-sustrato y productividad. De la evaluación realizada se obtuvo un grupo de cinco cepas con rendimiento etanol-sustrato superiores a 50 mL/100 g de azúcares consumidos y productividades volumétricas máximas por encima de 5 mL/L-h.

(Valdés, I. y col., 1996), realizaron estudios en cuanto a la tolerancia al etanol, usando concentraciones de etanol desde 0-12 % (V/V). Para los experimentos de osmotolerancia emplearon un medio de glucosa-base nitrogenada de levadura suplementado con D-Sorbitol,

obteniendo resultados en % alcohólico y eficiencia en la fermentación, superiores a 7 °GL y 80 % respectivamente. Las levaduras utilizadas fueron de la especie *S. cerevisiae*.

(Del Castillo, L. y col., 1997), estudiaron la tolerancia al alcohol de varias cepas a diferentes temperaturas (22-37 °C) y porcentos alcohólicos entre 10 y 15 % y determinaron que el ergosterol es un factor importante en la tolerancia alcohólica, así una alta concentración de ergosterol implica tolerancia al etanol.

Por otra parte **(Otero, M. y col., 1990)**, también han trabajado con cepas termotolerantes y osmotolerantes. Laluece plantea que muchas levaduras son sensibles a la temperatura por lo que si esta se eleva la productividad puede disminuir y los sistemas de enfriamiento son caros, por lo que hay una razón económica para desarrollar cepas termotolerantes, que toleren temperaturas por encima de 40 °C sin pérdidas en la eficiencia y que mantengan la estabilidad genética.

Estudios realizados por **(Biert, J. y col., 1982)**, reportan la levadura *S. cerevisiae* T-17 aislada del jugo de caña con alta tolerancia a la concentración de azúcares y a la temperatura, obteniendo elevada producción de etanol; posteriormente la probó en condiciones industriales logrando mejores resultados en porcentaje alcohólico y eficiencia que la *S. cerevisiae* "Hualien" que es la más ampliamente empleada en Taiwán.

En Rusia **(Kamm, 2008)**, realizaron experiencias con cepas osmófilicas de *S. cerevisiae* realizando la fermentación del mosto a 26 °Brix y han alcanzado concentraciones de alcohol del orden de 11,4 % v/v.

En Cuba **(Sánchez, O., 1996)**, ha trabajado con *K. fragilis* mutante termotolerante, obteniendo altas productividades de etanol.

Resultados publicados por Singh y colaboradores **(Martin, 2009)**, discute las ventajas de la levadura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* IMB3, entre las que señalan la eliminación del sistema de enfriamiento y buena capacidad metabólica. Ellos obtienen buenos resultados tanto a escala de laboratorio como industrial en la India, a pesar de que señala que en sistemas a temple (batch) la levadura evaluada no muestra una alta velocidad de crecimiento bajo condiciones anaerobias, lo cual es característico de la *Saccharomyces cerevisiae*.

1. En el mundo actualmente está tomando mucho auge la levadura turbo yeast, que no es más que una *Saccharomyces* sumamente alcoholera. Esta cepa requiere del empleo de nutrientes complejos, pero es capaz de fermentar la masa de sustrato y convertirlas

rápidamente en alcohol. Se han realizado varios estudios, dando como resultado que para la fermentación de los siguientes sustratos es la más idónea: el azúcar de fermentos, el maíz, las mieles, la cebada, el trigo, la papa, etc. (<http://es.wikipedia.org/fermentación>).

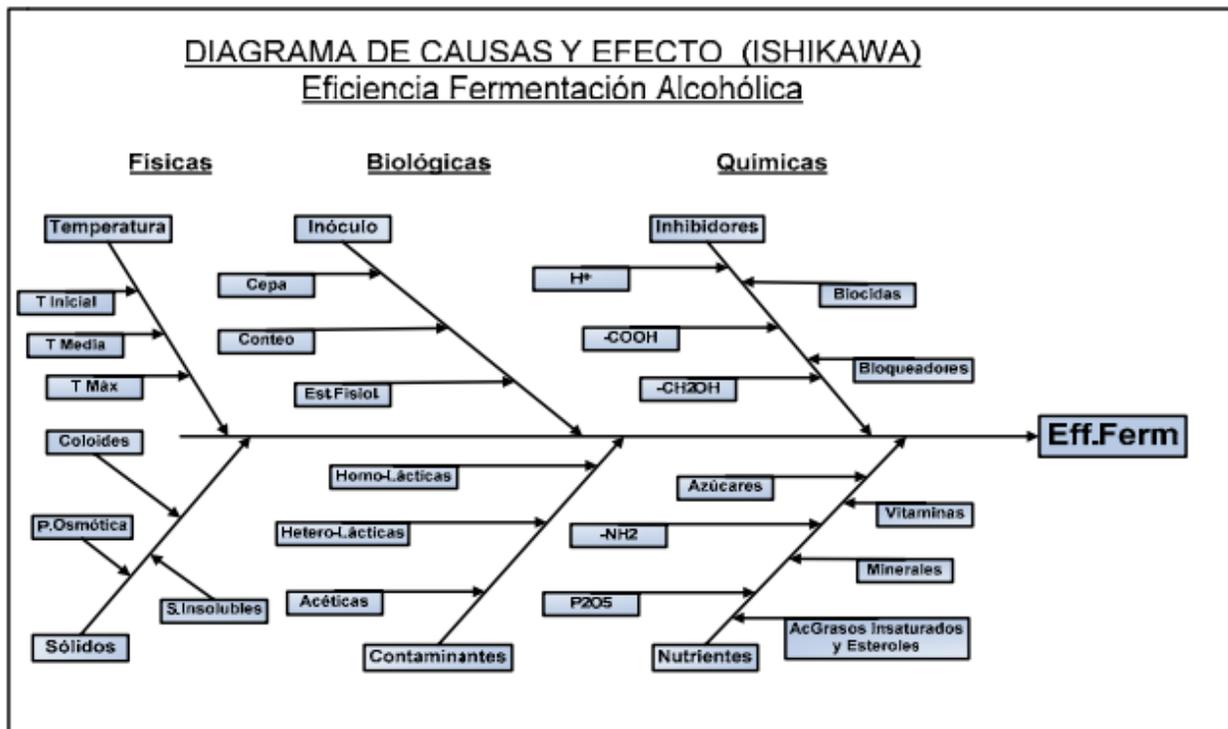
Las ventajas que trae son:

1. Una fermentación más rápida por lo que trae consigo una producción más alta con los mismos costos de la producción.
2. Tiene la tolerancia de temperatura alta: +40 °C para 14%, 38 °C para 16-17%.
3. Tiene alta tolerancia al alcohol.
4. Presenta una fermentación pura: 1% menos de fusel reemplazado por el alcohol puro, mientras ahorra el 2% de azúcar de gastarse.
5. Produce 17% de alcohol y utiliza la misma cantidad de nutrientes usado en las masas más débiles.
6. Tolera más sólidos y concentraciones de azúcares.

1.4 - Principales variables que inciden en el proceso de fermentación.

Todo proceso fermentativo en medio líquido es isotérmico (**Fabelo, J. y col., 1998**) y en la fermentación alcohólica se presentan los tres estados de la materia: el líquido representado por el sustrato, el gaseoso por el CO₂ que se desprende y el sólido a cuenta de dicha biomasa. Por todo ello, científicamente es un proceso biotecnológico isotérmico heterogéneo multiestado, que necesaria e inevitablemente parte de sus variables van modificándose en el transcurso del proceso discontinuo, siendo las más complejas de todas, las biológicas en los estados sólido y líquido (**Obregón, 2000**).

Las principales variables demostradas de los procesos fermentativos son pH, temperatura, tipo de microorganismo, composición y concentración del sustrato (**Laluce C, 1991**)y (**Alvarez R y col; 1992**). Analizado con profundidad el grado de complejidad y de variables incidiendo concomitantemente en la eficiencia de la fermentación alcohólica en específico, se detecta que pese a conocerse perfectamente, existen pocos estudios de la incidencia simultánea de las variables físicas, químicas y biológicas. La Figura 1 ilustra una compilación realizada al respecto.



Fuente: (Estévez, 2006)

Figura 1: Incidencia de variables en la eficiencia de la fermentación alcohólica

Además de las variables anteriormente mencionadas, existen otras que pueden ser medidas durante la fermentación y que influyen en los resultados de la fermentación. Dentro de estos tenemos:

Conteo Celular: Oscila entre 300-500 millones de células por litros. Este es el rango óptimo de trabajo.

- ✓ Conteo celular por debajo de los 180 millones y un porcentaje alcohólico de 6.5 por ciento, la levadura comienza a ser una limitante, haciendo más lenta la fermentación y afectando el rendimiento.
- ✓ Conteo celular por encima de los 500 millones se encuentra una tendencia a la disminución del rendimiento, ya que se está utilizando una mayor cantidad de azúcares para la producción de biomasa.

pH: Encuentra sus valores óptimos entre 3,8 y 4,2.

- ✓ Si los valores de pH se encontraran por debajo de 3 de forma sostenida se afecta el pH citoplasmático y se frena la actividad metabólica.
- ✓ Valores de pH por encima de 5.8 se frena la acción de la enzima invertasa que es la encargada de hidrolizar la sacarosa transformándola en Glucosa mas Fructosa, además se afectan los mecanismos de transferencia de sustrato por ósmosis y difusión a través de la célula de levadura

1.5- Materias primas y su importancia en el proceso fermentativo.

Para la producción de etanol han sido utilizadas diferentes fuentes de carbono como materia prima; estas deben ser transformadas con facilidad en azúcar fermentable. Su uso práctico estará determinado por el rendimiento en etanol, por su costo y el tipo de microorganismo que se utilice.

Varios autores, coinciden en definir 3 tipos de materias primas para la producción de etanol: **(Obregón, 2000)**.

- 1- Substratos portadores de azúcares simples, siendo los principales jugos de frutas, de caña de azúcar y melazas de esta y de remolacha, suero lácteo.
- 2- Substratos amiláceos, los que son ricos en almidón como el trigo, maíz, cebada, avena, centeno arroz, sorgo y yuca, entre otros.
- 3- Substratos lignocelulósicos como la madera, bagazo de caña, residuos agrícolas y de fábricas de tableros, papel y cartón.

Se incluye un cuarto grupo de materia prima Hidrocarburos gaseosos.

El gran potencial de Cuba lo constituye el grupo 1, procedentes de la caña de azúcar y sus subproductos, particularmente las melazas.

El etanol se produce por fermentación de estas materias primas con levaduras u otros microorganismos. Las de la primera clase fermentan directamente.

El segundo tipo consta de hidratos de carbono complejos, como el almidón, que primero se deben convertir en azúcares fermentables mediante la acción de enzimas. Las sustancias celulósicas de la tercera clase se convierten en azúcares fermentables por hidrólisis con ácidos inorgánicos, principalmente.

Otra alternativa para la fermentación alcohólica es el suero de leche. Este tiene diferentes efectos sobre el proceso, dado por el incremento de la producción de levadura, aproximadamente 0,5 toneladas por día de producción, aumentando un 0,29 % del por ciento alcohólico de la batición y reduciendo el ciclo fermentativo en una o dos horas.

En particular, son de interés las materias primas del primer grupo, o sea, las materias azucaradas (sustancias sacarinas), dentro de las cuales están: azúcar de caña o remolacha, melazas, jugos de frutas y suero de leche pues son los más fácilmente fermentables y en general basta la acción enzimática asociada al microorganismo para metabolizar el sustrato sin necesidad de tratamientos previos en la degradación de carbohidratos.

La producción de etanol a partir de estos materiales generalmente incluye tres etapas fundamentales: primero, la conversión de carbohidratos en azúcares simples o asimilables por los microorganismos productores de alcohol, después la fermentación de estos azúcares a etanol y finalmente la separación del etanol y otros productos por destilación.

Se reporta, sobre todo en otros países, de la utilización de jugo de caña concentrado a 60 °Brix, aunque el almacenamiento de este por largo tiempo es restringido

Las materias azucaradas son las más fácilmente fermentables y en general basta la acción enzimática que posee el microorganismo para metabolizar el sustrato sin necesidad de tratamientos previos para la degradación de los carbohidratos.

1.5.1- Melazas.

Dentro de las materias azucaradas más favorables para la fermentación está la miel final de caña, la cual siempre ha sido apreciada por los consumidores extranjeros para ser mezclada con mieles de otra procedencia, por ejemplo, de remolacha. También son usados principalmente en otros países el jarabe, es decir, jugo de caña concentrado a 60 °Brix como reporta **(Amaral, G., 1989)**. Pero el almacenamiento por largo tiempo del jarabe es restringido, debido a la elevada concentración de sacarosa y la baja concentración de azúcares reductores; así se favorece el proceso de cristalización y se dificulta el manejo de esta materia prima.

Para países grandes productores de azúcar de caña tiene una importancia básica la utilización de la miel final, como fuente de carbono, para la fermentación alcohólica.

En Cuba siempre se ha empleado la miel final de caña (miel C) como materia prima fundamental para la producción de alcohol etílico, aunque se han realizado varios estudios donde se utilizan las mieles de blanco directo, miel B, etc. **(Martínez J. y Villa, 1996)**, realizaron análisis de las mieles de blanco directo y la mezcla de las mismas con mieles finales, recomendando las mejores condiciones operacionales para aumentar la eficiencia en la fermentación alcohólica.

Ampliando la posibilidad de disponer de nuevas materias primas **(Fabelo, J. y col., 1998)**, reportan estudios realizados de modelación y optimización de la etapa fermentativa, con la utilización de diferentes sustratos, tales como vinazas y jugo de los filtros mezclados con miel final en diferentes proporciones.

(Llerena, G. y col. 1999), analizan diferentes alternativas de sustratos para la producción de alcohol, entre los que figuran el jugo de los filtros y la miel B. Plantean que por el bajo nivel de probióticos de la miel B, el ciclo fermentativo tiende a alargarse como promedio a 13 horas, por lo que recomiendan mezclarla con mieles finales en niveles no inferiores al 20% de esta.

Las mieles cubanas han sido muy estudiadas en el país. Los reportes de **(Biar, J. y col., 1982)**, y de **(Otero, M. y col., 1990)**, indican características típicas tales como:

- ✓ Los sólidos solubles oscilan entre 85- 88 °Brix.
- ✓ Las cenizas oscilan entre 6 y 15 %.
- ✓ El lodo expresado en base seca es próximo a 4 %.
- ✓ Los azúcares susceptibles de ser fermentados oscilan de 48 %-60 %.
- ✓ Los no azúcares orgánicos se hallan entre 9-10 % y los constituyentes inorgánicos entre 11 y 14 %.

Estudios realizados por **(Hsie, M., 1992)**, reportan que el calcio, magnesio y potasio componen más del 99 % de los iones metálicos en las mieles cubanas analizadas. Los niveles de los dos primeros son suficientes para soportar el crecimiento de microorganismos y la producción de etanol y superiores a la de las mieles de remolacha investigadas por **(Demirbas, 2010)**. Sin embargo, la relación entre el Mg y el K tiene importancia metabólica, pues concurren entre sí en el mismo sistema de transporte, y se comprobó, por **(Hsie, M., 1992)**, que existe una clara

tendencia a disminuir la μ_{max} con la relación Mg/K. Este mismo autor plantea que el azufre suministrado en forma de sulfatos es asimilado por la levadura, pero en forma de SO_2 , altamente inhibidor más allá del 0,01 %.

Se reporta en mieles cubanas el efecto inhibitorio del ácido butírico por **(Amaral, 1989)** y se plantea que es desfavorable para el proceso de fermentación la presencia de ácidos volátiles, que en concentraciones superiores a 0,20 % de ácido butírico y 0,75 % de acético, entorpecen el proceso de fermentación.

También **(Jenkins, 2008)**, coincide en que los ácidos acético y butírico presentes en las mieles disminuye la velocidad de división celular y, por tanto, tienen un efecto negativo en el crecimiento de la levadura.

(Manseer, H. y col., 1990), reportan el efecto de los ácidos propiónico, acético, butírico, valérico y caprónico en la dinámica y características de la fermentación alcohólica de mieles, con diferentes cepas de levaduras, encontrando que los ácidos antes mencionados retardan el proceso fermentativo.

(Moo, Y. y Moreira., 1985), investigó que la producción de alcohol disminuye con el incremento de la concentración de ácidos grasos volátiles.

Un aspecto importante en la calidad de las mieles finales es su contenido microbiano. Entre la microflora encontrada en las mieles finales cubanas, de acuerdo a lo reportado por **(Biar, J. y col., 1982)** y **(Otero, M., 1990)**, se hallan el *Bacillus subtilis*, el *Lactobacillus*, que puede resistir temperaturas cercanas a 90 °C y algunos micrococos, que resisten las operaciones fabriles, entre otros. Los hongos presentes en los jugos parecen no resistir las condiciones de fabricación, puesto que no aparecen en la microflora de las mieles finales cubanas. Algunas levaduras se han aislado de las mieles cubanas, tales como la *S. pombe*, *Saccharomyces roussii* y *C. tropicales*, entre otras. En resumen, se puede decir que la microflora de las mieles finales está formada principalmente por bacterias.

Existen además otros factores que influyen en el deterioro de las mieles, que tienen que ver con la cosecha de la caña; la mecanización, fertilización y limpieza de cañas atrasadas u otros relacionados con el proceso de fabricación del azúcar **(Biar, J. y col., 1982)** y **(Otero, A., 1990)**.

1.5.2- Combinaciones de sustratos en fermentación.

En la búsqueda de alternativas que propicien una disminución de los costos de producción en el proceso productivo de etanol, sin lugar a dudas el uso de diversos sustratos azucarados constituye un punto de partida. Del proceso azucarero se obtiene, además del azúcar como producto principal una serie de corrientes intermedias ricas en azúcares que pueden ser utilizados como mezclas de sustratos para la obtención de etanol (**Mesa, L., 2006**). Tal es el caso del Jugo de los Filtros, el cual posee aproximadamente un 5% de sólidos insolubles, lo que obliga a recircularlos en cantidades de 10 a 20% con el jugo mezclado en el proceso de fabricación del azúcar y se hace necesario para poder trabajar con mezcla de jugo de los filtros y mieles su clarificación con poliacrilamida como floculante.

Las alternativas de uso de jugos de los filtros se basan en las características que poseen los mismos y que influyen en la fermentación. Algunos de estos aspectos se muestran en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1: Aspectos que influyen en la Fermentación.

G E N E R A L E S	FÍSICOS	A P O R T A D O S	FÍSICOS
	<p>Temperatura <i>(inicial, media, final)</i></p>		<p>Sólidos Insolubles: Constituyen soporte para microorganismos, origina incrustaciones, barreras en la transferencia de calor.</p>
	<p>Sólidos <i>(sólidos Insolubles, presión osmótica, coloides)</i></p>		<p>Coloides: causa espumación durante la fermentación, barreras en la de transferencia de masa con la pared y membrana celulares.</p> <p>Presión osmótica: Elemento estresante a la célula por su participación activa en la actividad fermentativa. La constitución del jugo ejerce gran influencia en su valor.</p>
	QUÍMICOS		QUÍMICOS
	<p>Inhibidores</p>		<p>Concentración de hidrogenotes (H+): La influencia del pH es marcada en la actividad de la levadura. Un jugo con adecuado pH (5.5-5.7) garantizará una disminución hasta los valores</p>

	<p>(H^+, $COOH$, <i>bloqueadores</i>)</p> <p>Nutrientes</p> <p>(<i>azúcares, ácidos grasos, vitaminas, NH_2, minerales, P_2O_5.</i>)</p>		<p>óptimos de trabajo durante la propia fermentación.</p> <p>Bloqueadores: Compuestos que se asocian a enzimas específicas deteniendo una reacción bioquímica dada. Cuando los jugos son sulfatados, la presencia de sulfito provoca la detención de la deshidrogenación del acetaldehído para su transformación a etanol.</p> <p>Nutrientes: De su presencia y justa dosificación dependerá el éxito del proceso.</p>
	BIOLÓGICOS		BIOLÓGICOS
	<p>Inóculo</p> <p>(<i>cepa, conteo, estado fisiológico</i>)</p> <p>Contaminantes</p> <p>(<i>L. acéticas, hetero-lácticas, homo-lácticas</i>)</p>	<p>J</p> <p>U</p> <p>G</p> <p>O</p> <p>S</p>	<p>Inóculo: No depende de las características del jugo pues las levaduras alcoholeras utilizadas normalmente fermentan jugos, aunque el uso de levaduras aclimatadas al trabajo con este sustrato beneficiaría la fermentación.</p> <p>Contaminantes: Aunque pueden provenir de diversas fuentes, el aporte proveniente del sustrato resulta ser marcado. La presencia de microorganismos que desvíen la ruta metabólica hacia la formación de otros productos afecta la fermentación.</p>

1.5.3- Recirculación de vinazas a la etapa fermentativa.

Presentan un gran efecto contaminante sobre los recursos donde se descarguen. La problemática principal radica en que por cada hectolitro de alcohol producido a partir de miel final, se obtienen de manera adicional aproximadamente 15 hectolitros de vinaza como residual que pueden causar graves daños en los recursos hídricos donde se descarguen debido a su poder contaminante.

Las vinazas de destilería presentan diversas aplicaciones:

- 1- Medio para el crecimiento de microalgas, empleadas posteriormente para la obtención de alcohol de tercera generación, a la par que reduce las emisiones de CO_2 y la carga contaminante.
- 2- Como abono químico, para fertilizar directamente suelos con permeabilidad razonable y una buena capa de materia orgánica.

- 3- Mediante la digestión anaerobia para producir gas metano que podría ser empleado como combustible para la producción del vapor necesario para la destilación, la limpieza de fermentadores y otras labores con un ahorro del combustible convencional.
- 4- Utilizar el mosto como alimento animal.
- 5- La recirculación al proceso de obtención de etanol, incorporándolo a la fermentación permite ahorrar parte del agua empleada como diluyente en el proceso.

Como se expone anteriormente, una de las aplicaciones que tienen las vinazas es su recirculación al proceso, lo que trae consigo diversas ventajas y desventajas.

Ventajas.

1. Menor consumo de vapor en la esterilización.
2. Reducción del volumen de efluentes de vinazas.
3. Menor consumo de agua.
4. Menor consumo de ácido sulfúrico.

Desventajas.

1. Limitaciones con el porcentaje de formación alcohólica a lograr.
2. Aumento del contenido de ácidos orgánicos y otros metabolitos tóxicos a las levaduras.
3. Necesidad de un mayor control biológico para que los ácidos orgánicos no sean muy elevados.
4. Aumento de la presión osmótica con un aumento de los sólidos no azúcares.

Se reportan estudios que muestran la influencia que tiene en el rendimiento en fermentación el empleo de una mezcla de agua-vinazas-flemazas en sustitución de un porcentaje del agua empleada para la dilución de la miel (**Martínez, Y., 2013**). Los resultados de la optimización de los modelos obtenidos arrojan la posibilidad de sustituir hasta un 20% el agua empleada con este fin sin afectar el rendimiento alcohólico (**Del Castillo, L. y col., 1997**). Esta inclusión de residuales del propio proceso se debe realizar de forma controlada para garantizar la no afectación de los parámetros operacionales del proceso. Brinda como ventajas un menor

vertimiento de estos agresivos residuales al medio ambiente, un menor consumo de agua y el aporte de nutrientes a la fermentación.

1.6- Evaluación del uso combinado de miel final con jugo de los filtros y vinazas en la fermentación.

A partir del diseño de experimento Enrejado Simplex se puede obtener el comportamiento de las propiedades de una mezcla de tres componentes a escala de laboratorio. Este método resulta ventajoso pues requiere de un plan experimental mínimo y brinda una información completa.

Para desarrollar este plan experimental se necesitan realizar seis puntos de composición conocida del enrejado. Es suficiente una medida de la propiedad que se desea estudiar en cada punto para obtener el modelo que describe el comportamiento de esa propiedad al variar la composición de la mezcla. El polinomio que brinda las respuestas medidas se muestra a continuación:

$$Y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (ec. 1.1)$$

A través de este polinomio es posible obtener la superficie respuesta de cada propiedad en dependencia de la composición de la mezcla. Con el objetivo de probar la adecuación del modelo obtenido se propuso realizar un punto de chequeo situado dentro del triángulo. Este punto puede tomarse como punto experimental de un modelo más complejo en caso de que no ser adecuado el modelo obtenido (Martínez, Y., 2013).

1.6.1- Fermentación de Miel con Jugos de los filtros y Vinazas.

Una vez decidido el diseño experimental se montan los puntos experimentales necesarios para satisfacer el diseño. La fermentación se desarrolla de similar manera a como se realiza en la fábrica. Las materias primas provienen de la destilería Heriberto Duquesne y su caracterización se desarrolla de acuerdo a las normas cubanas. Las técnicas para las determinaciones de las materias primas se reportan en el anexo 1.

1.6.2- Llenado de Fermentadores por el sistema de Refrescos.

El sistema de refrescos consiste en llenar de forma progresiva los fermentadores durante la fermentación. Este método permite que las levaduras no estén sometidas a altas concentraciones de sustratos y permite la obtención de mejoras en las eficiencias fermentativas ya que se le suministrarán los azúcares a medida que el microorganismo lo vaya necesitando para su transformación en etanol.

El momento para refrescar el fermentador se decide de acuerdo a dos variantes. El escoger una u otra dependerá de la persona que controla la fermentación.

1. Cuando el Brix desciende al 70% del inicial.
2. Cuando la temperatura en el fermentador se eleva y el refresco me garantiza que retorne a los valores establecidos.

Procedimiento para los Refrescos

- 1- Añadir en el fermentador una cantidad de batición (pie) y después un volumen de pre fermento, estas cantidades deben de ser iguales y seleccionadas al Brix de corrida orientado.
- 2- Cuando halla actividad en el medio se puede empezar a adicioanar el 1er refresco y después de bajar el Brix a 70% de la medición inicial se sigue refrescando.

Tabla 1.2: Sistema de llenado de fermentadores para refrescos.

	2 refresco	3 refresco	4 refresco
Colchón + prefermento	$2/10 * V_{\text{Fermentador}}$	$2/10 * V_{\text{Fermentador}}$	$2/10 * V_{\text{Fermentador}}$
Primer Refresco	Hasta la mitad	Hasta $1/3 * V_{\text{Fermentador}}$	Hasta $1/4 * V_{\text{Fermentador}}$
Segundo Refresco	Hasta llenar	Hasta 70 %	Hasta la mitad
Tercer refresco		Hasta llenar	Hasta 70 %
Cuarto refresco			Hasta llenar

1.6.3- Sistema de Volúmenes Incrementados por Múltiples Adiciones Secuenciales (VIMAS).

El sistema VIMAS consiste en una extensión del sistema de llenado de los fermentadores por refrescos. Su gran ventaja radica en la obtención de mayores eficiencias fermentativas al permitir que el llenado se realice en un número elevado de refrescos. La desventaja se encuentra en la necesidad de contar con un sistema automatizado para realizar los refrescos, por lo que se hace imposible su implementación en plantas que no posean tecnologías de punta.

1.7- Conclusiones parciales.

1. La fermentación alcohólica es un proceso anaerobio donde los microorganismos consumen azúcares y producen etanol, CO_2 y moléculas de ATP las cuales consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular.
2. Las características más importantes que debe reunir las levaduras para garantizar buena eficiencia en fermentación son: la tolerancia a altas concentraciones de etanol, azúcar y elevadas temperaturas.
3. Durante la fermentación alcohólica, las variables más importantes a controlar son el pH, temperatura y conteo celular en los prefermentadores.
4. El empleo de otras materias primas azucaradas como los jugos de los filtros contribuye a lograr una mejor rentabilidad de la planta al disminuir los costos de las materias primas. También al recircular vinazas se logra un ahorro de agua para diluir la miel, así como un menor impacto ambiental por parte de este agresivo residual.
5. El sistema de llenado de los fermentadores por refrescos garantiza mejores eficiencias en fermentación y a su vez ayuda al control de parámetros operacionales como la temperatura en los fermentadores.



Capítulo II

- Estudio de la fermentación con Jugo de los filtros y vinazas.

Actualmente Heriberto Duquesne enfrenta un gran problema con las vinazas, por lo que la búsqueda de alternativas para reducir los volúmenes de vertimiento constituye una necesidad. En la búsqueda de mejores beneficios económicos se encuentran muchas veces el uso de nuevas materias primas con bajos costos constituyendo una opción para lograr la reducción de los costos de producción. De acuerdo a lo reportado en la literatura, ya se ha trabajado anteriormente con jugos de los filtros como sustrato en la fermentación alcohólica. Atendiendo a todo esto, se procede al desarrollo experimental de la fermentación usando como materias primas mieles finales y jugo de los filtros y vinazas en sustitución de un porcentaje de agua para la dilución de la miel.

La caracterización de las materias primas utilizadas se muestra en las siguientes tablas.

Tabla 2.1: Caracterización de la miel.

Parámetro	Valor
°Brix	85,2
ART (%)	56,149
RL (%)	147,88
Az. Ferment. (%)	52,476
Infer. (g/L)	3,673
Sac. (%)	39,293
Densidad (g/ml)	1,44675
Lodos (%)	6,183
pH	5,6

Tabla 2.2: Caracterización del jugo de los filtros.

Parámetro	Valor
°Brix	12
ART (g/L)	104
Densidad (g/ml)	1,04646
pH	5.8

Tabla 2.3: Caracterización de las vinazas.

Parámetro	Valor
°Brix	4,93
ART (g/L)	2
Densidad (g/ml)	1,01746
pH	4,5

Se conoce que a partir del diseño de experimento Enrejado Simplex se puede obtener el comportamiento de las propiedades de una mezcla de tres componentes a escala de laboratorio. Para el desarrollo de este diseño experimental se necesitan realizar seis puntos de composición conocida del enrejado y un punto central que le brindará rugosidad al modelo. La planificación experimental llevada a un diagrama triangular se muestra en la figura 2.1.

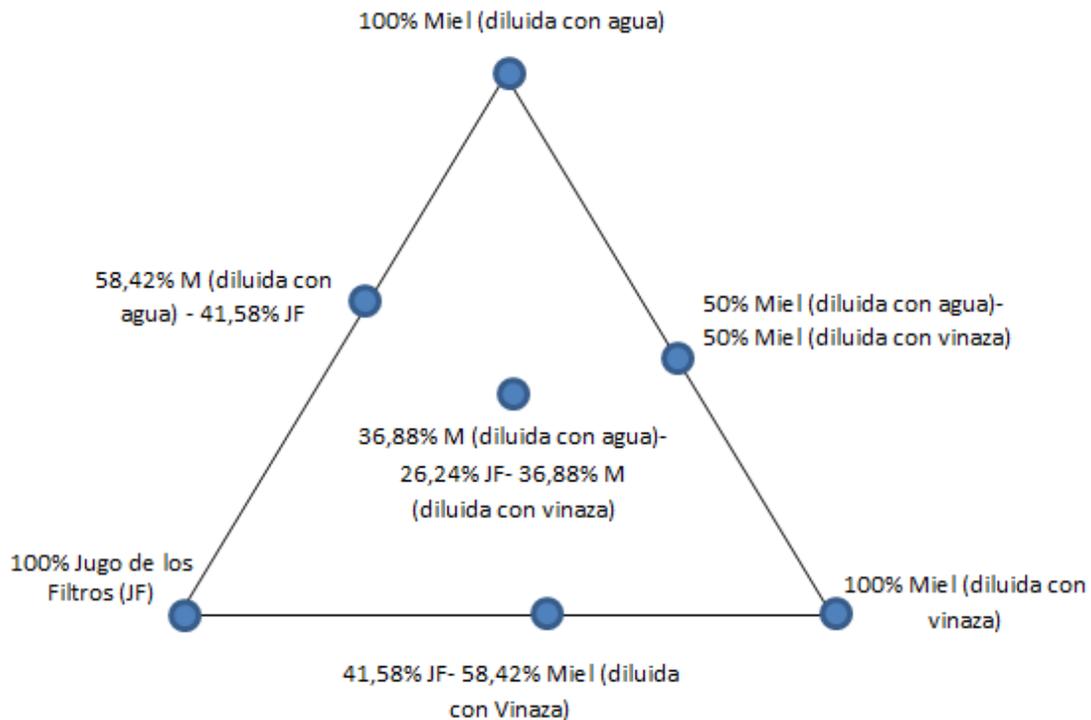


Figura 2.1: Esquema del diseño experimental.

NOTA: Todos los puntos en lo que se encuentren vinaza significa que se trabaja con miel pero diluida con vinaza.

Los vértices del diagrama se corresponden con fermentaciones donde solamente el componente indicado aporta los azúcares. Los puntos ubicados en los lados del triángulo se corresponden con fermentaciones donde los azúcares son aportados por dos componentes en la proporción que se muestra en la tabla 2.4, y en el punto central los azúcares son aportados a la fermentación por los tres componentes.

Tabla 2.4: Planificación del experimento.

Experimento	Composición p/p		
	Miel (diluida con agua)	Jugo Filtro	Miel (diluida con vinaza
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	58,42	41,58	0
5	50	0	50
6	0	41,58	58,42
7	36,88	26,24	36,88

El procedimiento para llevar a cabo la fermentación se realizó de forma similar a como se desarrolla en la fábrica. Primeramente se adicionó un pequeño colchón de miel. Sobre ese colchón se adiciona el volumen de prefermento necesario para realizar la inoculación del fermentador. El prefermento se tomó directamente de la fábrica y su caracterización se muestra en la tabla 2.5.

Tabla 2.5: Características del prefermento utilizado.

Parámetro	Valor
°Brix	7,45
ART (g/L)	26
Grado alcohólico (°GL)	4,1
Conteo celular ($\times 10^6$)	281
Gemación (%)	23
Viabilidad (%)	96

pH	4,10
----	------

Los resultados de los balances para el colchón de miel y prefermento se muestran en la tabla 2.6.

Tabla 2.6: Resultado de los balances para el colchón y prefermento.

Exp.		Valor	Ecuaciones
Colchón	Miel (L)	0,01408	$M + A = C$ $M * \%ARF_M = C * ARF_C$
	Miel (g)	20,37	
	Agua (L)	0,08592	
	ARF _C (g/L)	106,92	
Colchón + Prefermento	Miel ferment. (g)	15,55	$Pre * ARF_{Pre} + C * ARF_C = g_{miel\ ferment.}$

Se realizaron los siete puntos de cada diseño de forma simultánea en recipientes de 2L. Se fijaron los azúcares reductores iniciales en todos los experimentos y se determinaron las cantidades de miel, jugo de los filtros, vinazas y agua de acuerdo a la planificación experimental a través de balances de materiales. Los resultados de los balances se muestran en la tabla 2.7.

Tabla 2.7: Resultado de los balances para cada experimento.

Exp.		Valor	Ecuaciones
1	Miel (L)	0,2745	$C + Pre + M + A = B$ $15,55 + M * \%ARF_M = B * ARF_B$ $M = \frac{B * ARF_B - 15,55}{\%ARF_M}$
	Miel (g)	392,23	
	Agua (L)	1,4254	
2	Miel (L)	0,04853	$C + Pre + M + JF = B$

	Miel (g)	70,22	$15,55 + M * \%ART_M + JF * ART_{JF} = B * ART_B$ $M_{JF} = \rho_{JF} * JF$
	Jugo Filtro (L)	1,65	
	Jugo Filtro (g)	1726,66	
3	Miel (L)	0,2745	$C + Pre + M + V = B$ $15,55 + M * \%ARF_M = B * ARF_B$ $M = \frac{B * ARF_B - 15,55}{\%ARF_M}$ $M_V = \rho_V * V$
	Miel (g)	392,23	
	Vinaza (L)	1,4254	
	Vinaza (g)	1450,33	
4	Miel (L)	0,16038	$C + Pre + M + JF + A = B$ $15,55 + M * \%ARF_M + JF * ART_{JF} = B * ARF_B$ $JF * ART_{JF} = 0,4158 * (B * ART_B - 15,55)$ $M * \%ART_M = 0,5842 * (B * ART_B - 15,55)$ $M_{JF} = \rho_{JF} * JF$
	Miel (g)	232,04	
	Jugo Filtro (L)	0,8334	
	Jugo Filtro (g)	872,18	
	Agua (L)	0,7062	
5	Miel (L)	0,27456	$C + Pre + M + A + V = B$ $15,55 + M * \%ARF_M = B * ARF_B$ $M = \frac{B * ARF_B - 15,55}{\%ARF_M}$ $(V + A) = B - M - 15,55$ $A = 0,5 * (B - M - 15,55)$ $M_V = \rho_V * V$
	Miel (g)	392,23	
	Vinaza (L)	0,7127	
	Vinaza (g)	725,16	
	Agua (L)	0,7127	
6	Miel (L)	0,16038	$C + Pre + M + JF + A = B$ $15,55 + M * \%ARF_M + JF * ART_{JF} = B * ARF_B$ $JF * ART_{JF} = 0,4158 * (B * ART_B - 15,55)$ $M * \%ART_M = 0,5842 * (B * ART_B - 15,55)$ $M_V = \rho_V * V \quad M_{JF} = \rho_{JF} * JF$
	Miel (g)	232,04	
	Jugo Filtro (L)	0,8334	
	Jugo Filtro (g)	872,18	
	Vinaza (L)	0,7062	
	Vinaza (g)	718,55	

Una se 7	Miel (L)	0,2025	$15,55 + M * \%ARF_M + JF * ART_{JF} = B * ARF_B$ $M * \%ART_M = 0,7376 * (B * ART_B - 15,55)$ $JF * ART_{JF} = 0,2624 * (B * ART_B - 15,55)$ $A = \frac{2}{3} * (B - C - Pre - M - JF)$ $V = \frac{1}{3} * (B - C - Pre - M - JF)$ $M_V = \rho_V * V$	vez
	Miel (g)	292,99		
	Jugo Filtro (L)	0,526		
	Jugo Filtro (g)	550,43		
	Vinaza (L)	0,3238		
	Vinaza (g)	329,45		
	Agua (L)	0,6476		

adiciona el prefermento al colchón de miel diluida se deja fermentando bajo condiciones anaerobias para garantizar la transformación de los azúcares en alcohol y no buscando la propagación de las levaduras. Este primer paso se realiza con el objeto de ir adaptando gradualmente el microorganismo al medio. Cuando se comience a observar actividad en el medio se realiza el llenado del fermentador. El llenado se realizó por refrescos, al igual que se realiza a escala industrial. La figura 2.2 muestra el esquema para el llenado del fermentador en tres refrescos.

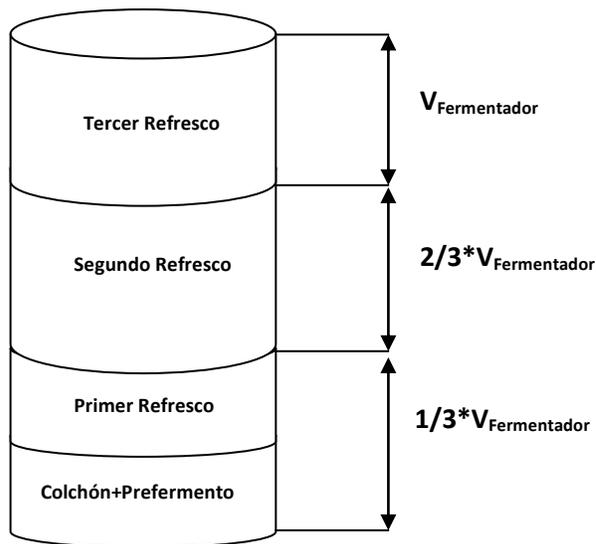


Figura 2.2: Procedimiento para el llenado del fermentador en tres refrescos.

Para llenar el fermentador en tres refrescos primeramente se añade batición al colchón y prefermento hasta la tercera parte del fermentador. Cuando el Brix desciende al 70 % de su valor inicial se está listo para refrescar, esta vez hasta las dos terceras partes del fermentador. Se sigue el mismo procedimiento en relación al Brix y por último se rellena completamente el fermentador. Este método resulta más ventajoso en relación al llenado del fermentador

completamente desde el principio pues permite a las levaduras tomar solamente lo que necesita y no sobresaeta el medio de azúcares que no van a ser consumidos inmediatamente. Otra ventaja es que permite refrescar la temperatura del fermentador. Una vez lleno el fermentador se sigue la fermentación cada dos horas hasta que el Brix se mantenga constante y no observar actividad en el mosto. Una vez finalizada la fermentación se procede a determinar los azúcares reductores residuales, el grado alcohólico del mosto y el rendimiento en fermentación.

2.1.1- Análisis de los resultados.

Una vez lleno los fermentadores, se sigue la fermentación a través del Brix y cuando este se mantiene constante por espacio de más de dos lecturas seguidas se da por concluida.

La figura 2.2 y 2.3 muestran el comportamiento del Brix y pH respectivamente para las cinco réplicas durante toda la fermentación. Los datos se encuentran reportados en los Anexos 2.

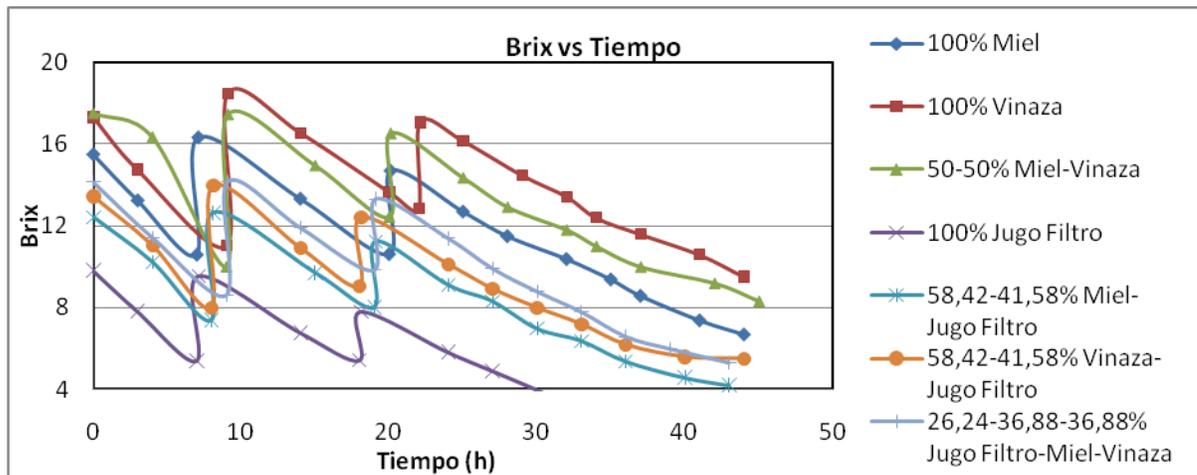


Figura 2.3: Comportamiento del Brix durante la fermentación.

Como se puede observar, en todas las experiencias se observó el descenso que experimenta el Brix con el tiempo, lo que evidencia el consumo de sustrato. No se observaron anomalías durante la fermentación que muestre alguna acción inhibitoria por parte de los sustratos no convencionales.

Por otro lado, aunque el pH no muestra una tendencia al igual que el Brix, si se mantiene dentro del rango óptimo durante toda la fermentación.

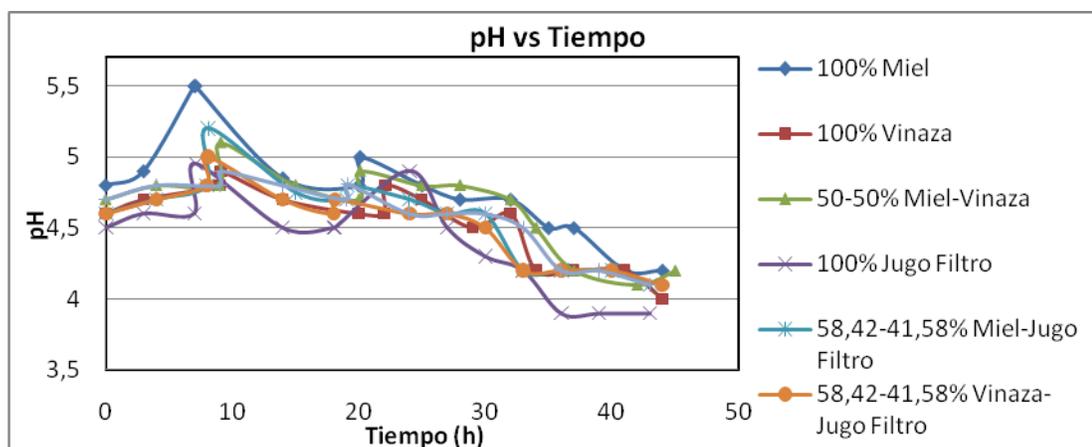


Figura 2.4: Comportamiento del pH durante la fermentación.

Durante la fermentación, todos los parámetros se mantuvieron dentro del rango establecido y no se observaron anomalías en cuanto al consumo de sustrato. Una vez finalizada la fermentación se determinó el grado alcohólico y la eficiencia. Los resultados se muestran en la tabla 2.8.

Tabla 2.8: Resultados de los experimentos para Jugo de los filtros.

Muestras		ART (g/L)	%Alcoh. °GL	Eficiencia (%)
1	Inicial	112	5,55	77,66
	Final	1,2		
2	Inicial	112	4,86	67,95
	Final	2		
3	Inicial	112	4,7	65,66
	Final	1		
4	Inicial	112	5,12	71,59
	Final	1,2		
5	Inicial	112	4,9	68,45
	Final	1		
6	Inicial	112	5,31	74,2
	Final	1,4		
7	Inicial	112	5,04	70,53
	Final	1		

$$Eficiencia = \frac{ml_{(alcohol\ producido)} * \rho_{(etanol)}}{\frac{gramos\ (miel\ fermentable)}{0,51}} \quad (ec. 2.1)$$

Como se observa en la tabla anterior, los mejores resultados son aquellos donde todos los azúcares son aportados por la miel, seguido de la fermentación de los jugos de los filtros con vinazas y luego los jugos fermentados con mieles. Los resultados menos favorables son aquellos donde se empleó solamente vinaza para diluir la miel, seguido de la fermentación de jugos solamente.

Los resultados de las fermentaciones con vinazas coincide con lo reportado por **Granado, 2010**, donde las eficiencias en fermentación van disminuyendo a medida que se incrementa el porcentaje de vinazas en la mezcla. También coinciden con **Torres, 2005**, que reporta los peores resultados cuando se fermentan solamente los jugos.

2.1.2- Análisis estadístico del diseño.

Se analizó el diseño experimental utilizando el software STATGRAPHICS Plus v. 5.1. y se obtuvo el modelo que describe el comportamiento de la Eficiencia y Grado alcohólico en dependencia de la composición de la mezcla, los cuales se muestran en las ecuaciones 2.2 y 2.3 respectivamente.

$$Eficiencia = 77,7427 * M + 68,0327 * JF + 65,7427 * V - 6,5144 * M * JF - 14,4944 * M * V + 27,9256 * JF * V \quad (ec. 2.2)$$

Tabla 2.9: Tabla ANOVA para Eficiencia.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Modelo Cuadrático	98,4503	5	19,6901	21,80	0,1590
Error Total	0,903275	1	0,903275		
Total (corr.)	99,3535	6			

Tabla 2.10: Cuadrático Resultados del Modelo ajustado para Eficiencia

Parámetro	Estimación	Error Estándar	Estadístico T	p-Valor
A: Miel	77,7427	0,9468		
B: Jugo Filtro	68,0327	0,9468		

C: Vinaza	65,7427	0,9468		
AB	-6,5144	4,3521	-1,4968	0,3750
AC	-14,4944	4,3521	-3.3303	0,1857
BC	27,9256	4,3521	6,4164	0,0984

R-cuadrado = 99,0908 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 94,5451 por ciento

Error Estándar de Est. = 0,950408

Error absoluto de la media = 0,283619

Estadístico Durbin-Watson = 1,24242

Autocorrelación residual Lag 1 = 0,068182

El StatAdvisor

Esta tabla muestra un análisis de varianza para el modelo cuadrático seleccionado actualmente. Dado que el p-valor para este modelo es mayor o igual a 0,10, no hay relación estadísticamente significativa entre Eficiencia y los componentes al 90% de nivel de confianza o superior.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo así ajustado explica el 99,0908% de la variabilidad en Eficiencia. El estadístico R-cuadrado ajustado, el cual es más adecuado para la comparación de números diferentes de variables independientes, es 94,5451%. El error estándar de la estimación muestra la desviación normal de los residuos para ser 0,950408. El error absoluto de la media (MAE) de 0,283619 es el promedio del valor de los residuos. El estadístico Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay cualquier correlación significativa basada en el orden en el que se suceden en el fichero de datos. Puesto que el p-valor es inferior a 0,05, hay indicios de una posible correlación de serie. Represente los residuos frente al orden

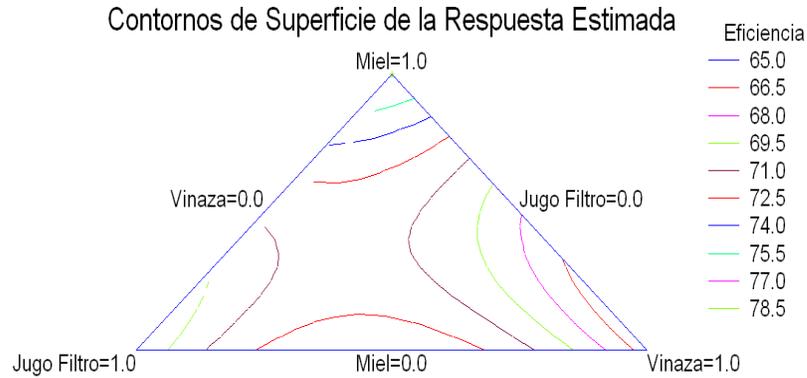


Figura: 2.5: Contornos de superficie estimada para la Eficiencia.

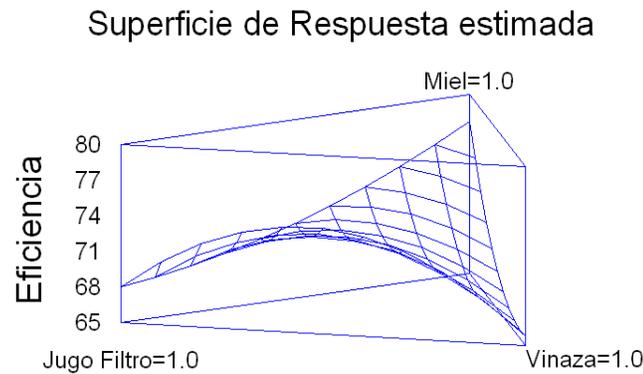


Figura: 2.6: Superficie estimada para la Eficiencia.

$$\checkmark \text{ Grado Alc.} = 5,55644 * M + 4,86644 * JF + 4,70644 * V - 0,468781 * M * JF - 1,02878 * M * V + 1,99122 * JF * V \quad (\text{ec.2.3})$$

Tabla 2.11: Tabla ANOVA para Grado alcohólico.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Modelo Cuadrático	0,495813	5	0,0991626	18,12	0,1740
Error Total	0,00547289	1	0,00547289		
Total (corr.)	0,501286	6			

Tabla 2.12: Cuadrático Resultados del Modelo ajustado para Grado alcohólico.

Parámetro	Estimación	Error Estándar	Estadístico T	p-Valor
A: Miel	5,5564	0,073698		

B: Jugo Filtro	4,8664	0,073698		
C: Vinaza	4,7064	0,073698		
AB	-0,46878	0,33877	-1,38377	0,3984
AC	-1,02878	0,33877	-3,03681	0,2025
BC	1,99122	0,33877	5,8778	0,1073

R-cuadrado = 98,9082 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 93,4494 por ciento

Error Estándar de Est. = 0,073979

Error absoluto de la media = 0,0220767

Estadístico Durbin-Watson = 1,24242

Autocorrelación residual Lag 1 = 0,068182

El StatAdvisor

Esta tabla muestra un análisis de varianza para el modelo cuadrático seleccionado actualmente. Dado que el p-valor para este modelo es mayor o igual a 0,10, no hay relación estadísticamente significativa entre Grado Alcohólico y los componentes al 90% de nivel de confianza o superior.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo así ajustado explica el 98,9082% de la variabilidad en Grado Alcohólico. El estadístico R-cuadrado ajustado, el cual es más adecuado para la comparación de números diferentes de variables independientes, es 93,4494%. El error estándar de la estimación muestra la desviación normal de los residuos para ser 0,073979. El error absoluto de la media (MAE) de 0,0220767 es el promedio del valor de los residuos. El estadístico Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay cualquier correlación significativa basada en el orden en el que se suceden en el fichero de datos. Puesto que el p-valor es inferior a 0,05, hay indicios de una posible correlación de serie.

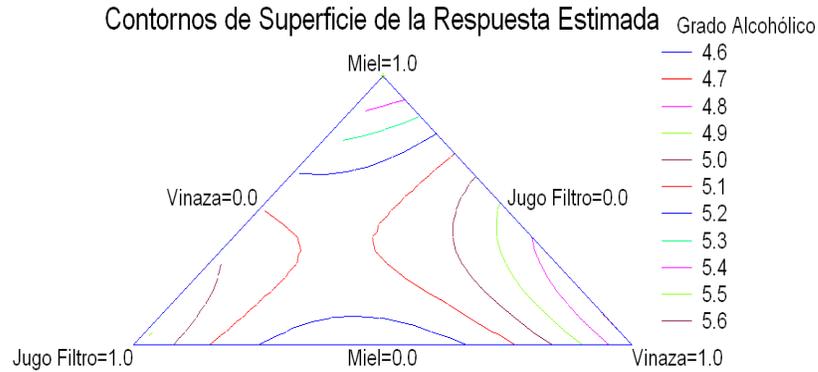


Figura: 2.7: Contornos de superficie estimada para el Grado alcohólico.

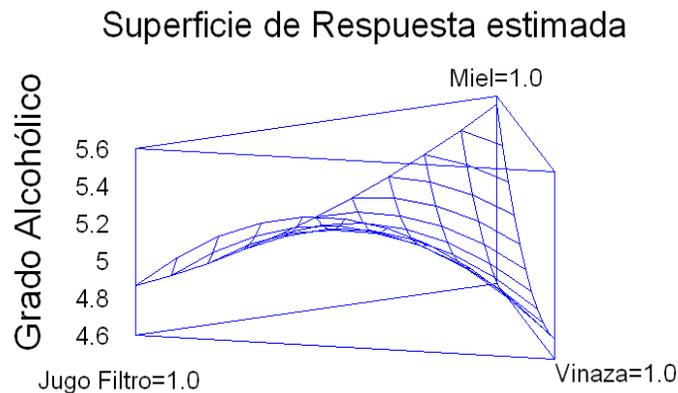


Figura: 2.8: Superficie estimada para el Grado alcohólico.

2.1.3- Optimización del modelo.

El análisis estadístico de los experimentos realizados nos brinda el modelo que relaciona la composición de la mezcla miel-jugo de los filtros-vinaza con la eficiencia en fermentación, por lo que a través de la optimización de este modelo podemos encontrar la composición óptima que me garantiza una eficiencia máxima. Para la optimización se utilizó la herramienta Solver del Excel.

Como se observa en la tabla 2.13, los resultados óptimos se obtienen cuando los azúcares fermentables son aportados por el jugo de los filtros en un 54,1% y el resto por la miel, pero diluida por vinazas, lo que supone de antemano un ahorro de agua y menores volúmenes de vinaza a biogás.

Tabla 2.13: Resultados de la optimización.

Name	Final Value
$Eficiencia = 77,7427 * M + 68,0327 * JF + 65,7427 * V - 6,5144 * M * JF - 14,4944 * M * V + 27,9256 * JF * V$	73,92
Name	Final Value
Miel	0
Jugo de los Filtros	0,541
Vinazas	0,459

2.2- Estudio de la fermentación por el método de los Volúmenes Incrementados por Múltiples Adiciones Secuenciales (VIMAS).

Un segundo caso fue propuesto para determinar alternativas de mejoras de la etapa fermentativa. El método VIMAS nos permite, a través de la adición de infinitos de los llamados “refrescos”, un acercamiento a una forma continua de fermentación.

Primeramente se hace necesario caracterizar las materias primas. En este caso se trabajará solamente con miel como fuente de azúcares y su dilución se realizará solamente con agua, de la forma tradicional. Los resultados de los análisis efectuados a la miel se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2.14: Caracterización de la miel final.

Parámetro	Valor
°Brix	81,82
ART (%)	57,481
RL (%)	14,543
Az. Ferment. (%)	53,701
Infer. (%)	37,8
Az. Totales (%)	55,334
Densidad (g/ml)	1,42373
Lodos (%)	6,084
pH	6,1

La planificación experimental consiste en la realización de siete experimentos diferenciados únicamente por el número de refrescos necesarios para completar el volumen del fermentador. A diferencia de los experimentos anteriores donde se utilizó el prefermento proveniente de la destilería, esta vez se hace necesario comenzar desde el principio con la propagación de la levadura. Siguiendo la forma en que se realiza en la fábrica, la primera etapa de propagación se realiza en el cultivador. El volumen de cultivo representa la décima parte del volumen del prefermentador. La levadura utilizada es la *Saccharomyces cerevisiae*. Se le adicionan como nutrientes fosfato de amonio, sulfato de amonio y nutriente para levadura (QUIMIQZ – 350 A). Como el resultado buscado es el crecimiento y propagación de la levadura, esta etapa es aerobia. Los resultados del balance de materiales para esta etapa se muestran en la tabla 2.15.

Tabla 2.15: Resultados de los balances para el cultivador.

	Valor	Ecuaciones
Volumen (L)	0,4	$M + A = Cult.$ $M * \%ARF_M = Cult.* ARF_C$ $ARF_C = \frac{M * \%ARF_M}{Cult.}$ $M_M = \rho_M * M$
Miel (L)	0,0446	
Miel (g)	63,63 (0,0446 L)	
Agua (L)	0,3554	
ARF _C (g/L)	85,42	
Sulfato de amonio (g)	5,2	<i>Sulfato de amonio = 13 g/L_{batición}</i>
Fosfato de amonio (g)	0,8	<i>Fosfato de amonio = 2 g/L_{batición}</i>
Nutriente (g)	0,08	<i>Nutriente = 0,2 g/L_{batición}</i>
Ph	4,35	-

Una vez preparado el cultivador, se le burbujea aire y se le realizan cada dos horas mediciones de Brix, pH, conteo celular (número de células, gemación y viabilidad) hasta que el Brix descienda a la mitad más uno de su valor inicial. Cuando se alcanza ese punto, se está listo para inocular el prefermentador.

El objetivo del prefermentador es continuar con el crecimiento y desarrollo de la levadura, por tanto se realiza bajo condiciones aerobias y requiere de los mismos nutrientes utilizados en el cultivador. El volumen de prefermento representa la décima parte del volumen del fermentador. Los resultados de los balances se muestran en la tabla 2.16.

Tabla 2.16: Resultado de los balances para el prefermentador.

	Valor	Ecuaciones
Volumen (L)	4	$M + A = P$ $M * ARF_M = P * ARF_{Pre}$ $ARF_P = \frac{M * \%ARF_M}{P}$
Miel (L)	0,5839	
Miel (g)	831,31	
Agua (L)	3,416	
ARF _{Pre} (g/L)	111,6	
ARF _{Final Pre} (g/L)	10	
Sulfato de amonio (g)	52	<i>Sulfato de amonio = 13 g/L_{batición}</i>
Fosfato de amonio (g)	8	<i>Fosfato de amonio = 2 g/L_{batición}</i>
Nutriente (g)	0,8	<i>Nutriente = 0,2 g/L_{batición}</i>
pH	4,8	-

El seguimiento del prefermentador se realiza de igual manera que en el cultivador y cuando el Brix descienda a la mitad más uno de su valor inicial está listo para pasar a fermentación.

La fermentación se llevó a cabo en reactores de 5L y se realizaron siete experiencias. La variable manipulada fue el número de refrescos. El criterio que se seleccionó para refrescar fue el de esperar a que el Brix descendiera al 70 % del inicial. El volumen de prefermento utilizado fue la décima parte del volumen del fermentador. A la hora de montar el fermentador se adicionó primeramente un colchón de miel a Brix de corrida, de igual volumen al volumen de prefermento. Luego se adicionó el prefermento y se esperó hasta observar actividad para comenzar con la adición de los refrescos. Esto duró aproximadamente tres horas. La determinación de la cantidad de miel y agua a utilizar para preparar la batición se determinó a través de balances de materiales y se muestran en la tabla 2.17. Para todas las experiencias planificadas, la cantidad de miel y agua utilizar es la misma, solamente varía el número de refrescos en que se llenó el fermentador.

Tabla 2.17: Resultado de los balances para el fermentador.

	Valor	Ecuaciones
Volumen (L)	5	$Colchón + P + M + A = B$ $Colchón * \%ARF_{Colchón} + P * ARF_{final Pre} + M * \%ARF_M = B * ARF_B$
Miel (L)	0,6216	
Miel (g)	885,03	
Agua (L)	3,378	
Colchón (L)	0,5	

Prefermento (L)	0,5	$M = \frac{B * ARF_B - Colchón * \%ARF_{Colchón} - P * ARF_{final\ Pre}}{\%ARF_M}$
ARF _{final Pre} (g/L)	10	
ARF _B (g/L)	112	
ARF _{Colchón+Pre.} (g)	84,73	

Se planificaron siete corridas: un primer experimento con un solo refresco, luego dos refrescos, tres, cinco, siete, ocho y nueve refrescos. Las concentraciones de todos los refrescos se realizaron a 112 g/L. Los volúmenes utilizados para refrescar se muestran en la tabla 2.18.

Tabla 2.18: Programación del llenado de los fermentadores por refrescos.

Experimento	1	2	3	4	5	6	7
1er refresco (L)	4	2	1,333	0,4	0,2	0,133	0,1
2do refresco (L)	-	2	1,333	0,640	0,6	0,333	0,350
3er refresco (L)	-	-	1,334	0,840	0,8	0,533	0,550
4to refresco (L)	-	-	-	1,060	0,6	0,5	0,375
5to refresco (L)	-	-	-	1,060	0,6	0,5	0,375
6to refresco (L)	-	-	-	-	0,6	0,5	0,375
7mo refresco (L)	-	-	-	-	0,6	0,750	0,625
8vo refresco (L)	-	-	-	-	-	0,751	0,625
9no refresco (L)	-	-	-	-	-	-	0,625

Una vez puesta en marcha la fermentación se realizan mediciones de Brix y pH cada dos horas. Se le realiza además conteo celular y se continuó hasta no observar cambios en el Brix y dar por terminada la fermentación.

2.2.1- Análisis de los Resultados

El desarrollo de las levaduras en el cultivador se realizó a partir de tubo de ensayo en el laboratorio. Se realizó el seguimiento del Brix, pH, conteo celular, gemación y viabilidad hasta comprobar que el Brix desciende al cincuenta por ciento más uno del inicial. Los resultados de las mediciones realizadas se muestran en la figura 2.9 y figura 2.10.

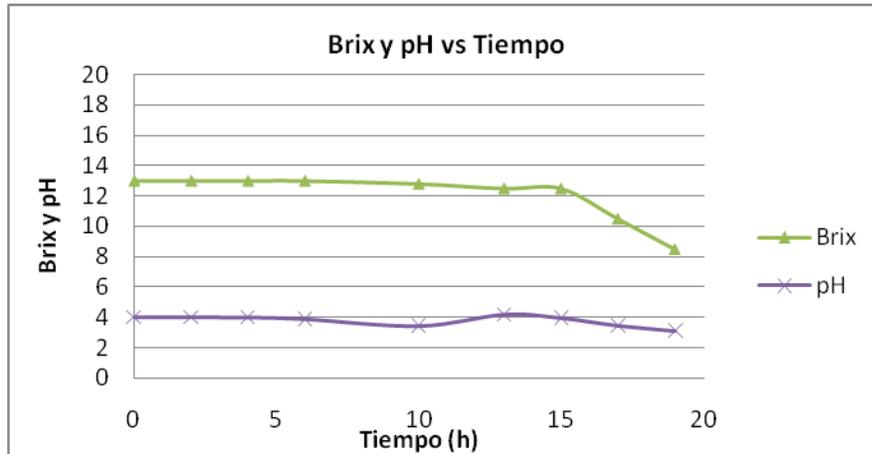


Figura 2.9: Comportamiento del Brix y pH en el cultivador.

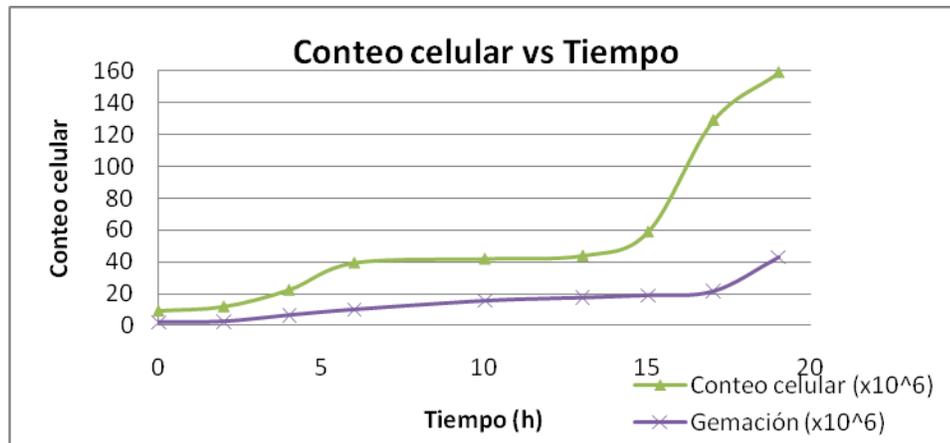


Figura 2.10: Comportamiento del Conteo celular en el cultivador.

Una vez el Brix del cultivador desciende al cincuenta por ciento más uno se inocula el prefermentador. El comportamiento del Brix, pH y conteo celular se muestra en la figura 2.11 y 2.12.

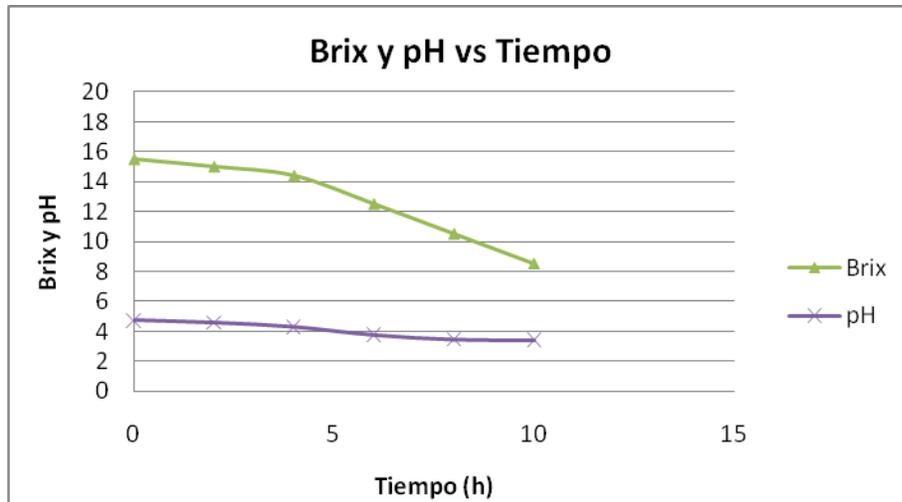


Figura 2.11: Comportamiento del Brix y pH en el prefermentador.

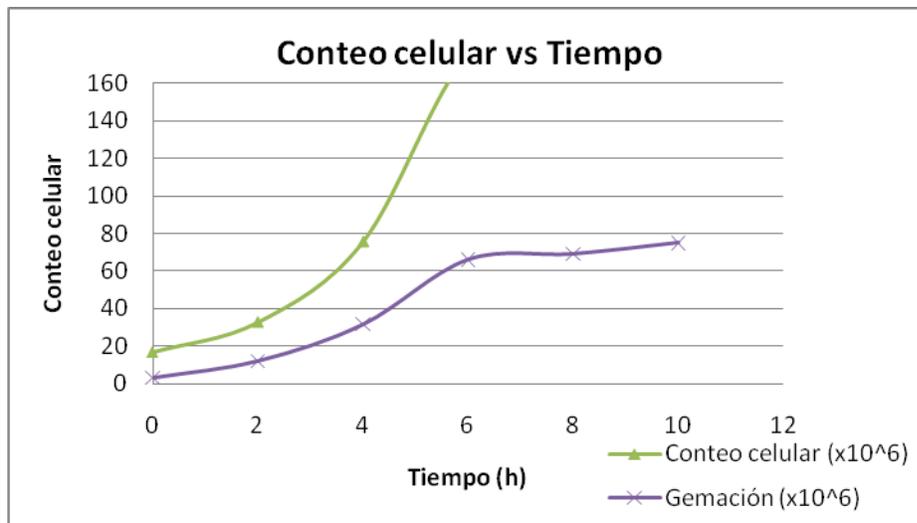


Figura 2.12: Comportamiento del Conteo celular en el prefermentador.

Una vez lleno los fermentadores, se sigue la fermentación a través del Brix y cuando este se mantiene constante por espacio de más de dos lecturas seguidas se da por concluida. El comportamiento del Brix y pH durante la fermentación se muestran en las siguientes figuras. Los datos se encuentran reportados en los Anexos 3.

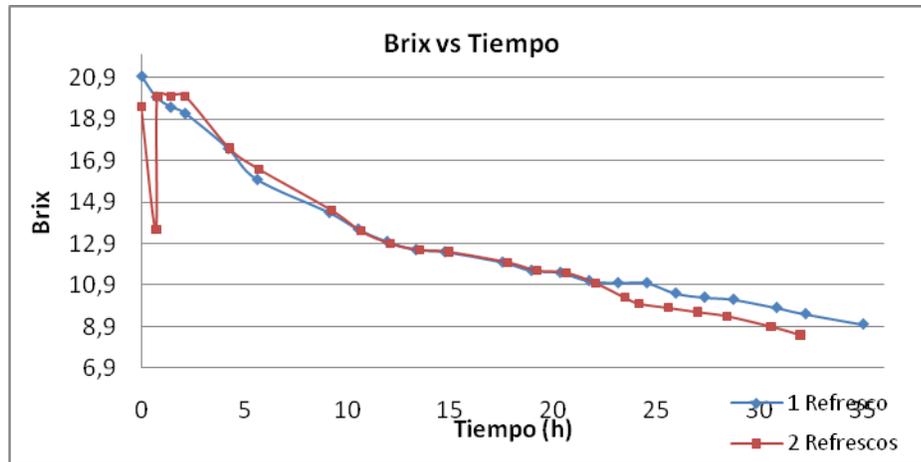


Figura 2.13: Comportamiento del Brix durante fermentación para 1 y 2 Refrescos.

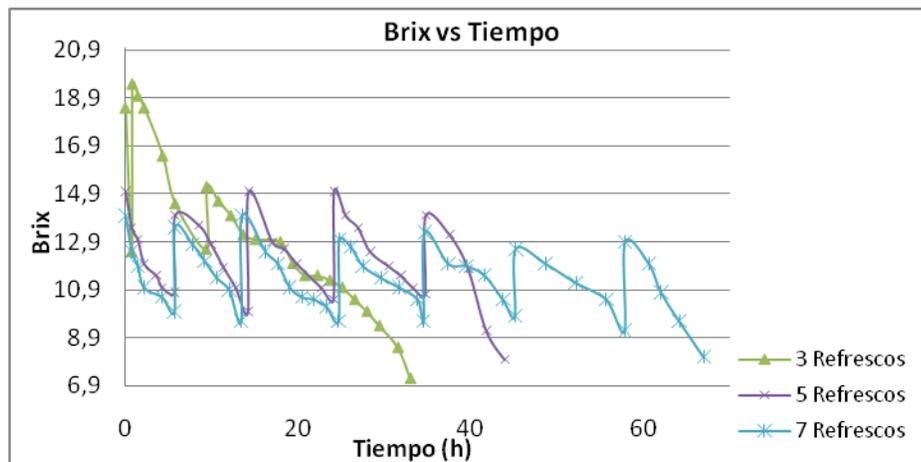


Figura 2.14: Comportamiento del Brix durante fermentación para 3,5 y 7 Refrescos.

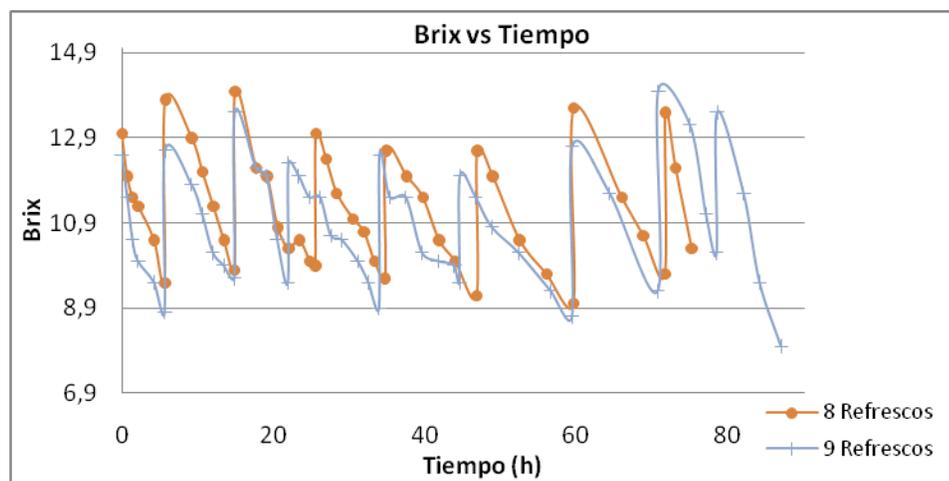


Figura 2.15: Comportamiento del Brix durante fermentación para 8 y 9 Refrescos.

Como se puede observar, en todas las experiencias se observó el descenso que experimenta el Brix con el tiempo, lo que evidencias el consumo de sustrato. Por otro lado, el pH se mantiene dentro del rango óptimo durante toda la fermentación.

Podemos decir que aquellos experimentos donde se realizó mayor número de refrescos tuvo un considerable aumento en la duración de la fermentación. Esto se debe a que el conteo celular del prefermentador se encontraba por debajo de los 280 millones. Durante las fermentaciones de aquellos experimentos de gran número de refrescos se observó que cuando se partía de pequeños volúmenes de refresco, el Brix demoraba más en descender al 70% de su valor inicial.

Una vez finalizada la fermentación se determinó el grado alcohólico alcanzado, así como el rendimiento fermentativo por la ecuación 2.1. Los resultados alcanzados se muestran en la tabla 2.19.

Donde: 0,51 corresponde a la eficiencia máxima teórica según Gay Lussac.

Tabla 2.19: Resultados de la fermentación.

Muestras		ART (g/L)	%Alcohólico °GL	Eficiencia (%)
1	Inicial	112	4,36	61
	Final	5,2		
2	Inicial	112	4,59	64,15
	Final	5,0		
3	Inicial	112	5,24	73,3
	Final	4,4		
5	Inicial	112	5,28	73,79
	Final	4,6		
7	Inicial	112	5,37	75,07
	Final	4.4		
8	Inicial	112	5,92	82,65
	Final	4.1		
9	Inicial	112	5,98	83,63
	Final	4.1		

Como se evidencia, a medida que el número de refrescos aumenta, se extiende el tiempo de fermentación y aumenta el rendimiento fermentativo. Esto se debe a que la levadura se encuentra sometida a una menor concentración de azúcares y por tanto menor presión osmótica. A medida que se añaden más refrescos, el sustrato adicionado va siendo justo el necesitado por las levaduras para su transformación en etanol.

A pesar que a medida que el número de refrescos aumenta, también lo hace la eficiencia, se hace necesario a la hora de determinar los mejores resultados ver cómo se comporta la productividad. Esto se debe a los largos tiempos de fermentación. Para el cálculo de la productividad utilizamos la ecuación 2.4.

$$Productividad = \frac{\text{Concentración del producto}}{\text{Tiempo de fermentación}} \left[\frac{g}{L * h} \right] \quad (ec. 2.4)$$

Tabla 2.20: Productividades para cada experimento.

Refrescos	1	2	3	5	7	8	9
Productividad (g/Lh)	0,979	1,137	1,263	0,954	0,633	0,602	0,544

De acuerdo a la tabla anterior, se observa que los mejores resultados se obtienen cuando se realizan 2 y 3 refrescos y los peores resultados se observan para 9 refrescos debido al tiempo de fermentación.

Consideramos que el mejor resultado se obtiene para tres refrescos debido a que las eficiencias en fermentación prácticamente no difieren y la productividad del experimento de tres refrescos es mucho mayor que el de cinco.

2.2.3- Análisis Estadístico de los experimentos.

Se realizó un análisis de Regresión Polinomial para determinar la dependencia del Rendimiento en fermentación y Productividad con el número de refrescos utilizando el STATGRAPHICS Plus v.5.1.

Tabla 2.21: Análisis de Regresión Lineal para Eficiencia.

Variable dependiente: Eficiencia

Parámetro	Estimación	Error Estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	60,4912	2,32056	26,0675	0,000
Pendiente	2,57862	0,402221	6,41096	0,0014

Tabla 2.22: Análisis de la Varianza para Eficiencia.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados Medios	F-Ratio	P-Valor
Modelo	385,659	1	385,659	41,10	0,0014
Residuo	46,9167	5	9,38333		
Total (Corr.)	432,575	6			

R-cuadrado = 89,1541 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 86,9849 porcentaje

Error estándar de est. = 3,06322

Error absoluto medio = 2,03101

Estadístico de Durbin-Watson = 2,29678 (P=0,1447)

Autocorrelación residual en Lag 1 = -0,194094

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados del ajuste al modelo lineal para describir la relación entre Eficiencia y Refrescos. La ecuación del modelo ajustado es:

$$Eficiencia = 60,4912 + 2,57862 * Refrescos \quad (ec.2.5)$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,01, existe relación estadísticamente significativa entre Eficiencia y Refrescos para un nivel de confianza del 99%. El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 89,1541% de la variabilidad en Eficiencia. El coeficiente de correlación es igual a 0,944214, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 3,06322. Este valor puede usarse para construir límites de la predicción para las nuevas observaciones seleccionando la opción Predicciones del menú del texto. El error absoluto medio (MAE) de 2,03101 es el valor medio de los residuos. El estadístico Durbin-

Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se han introducido los datos en el fichero. Dado que el p-valor es superior a 0,05, no hay indicio de autocorrelación serial en los residuos.

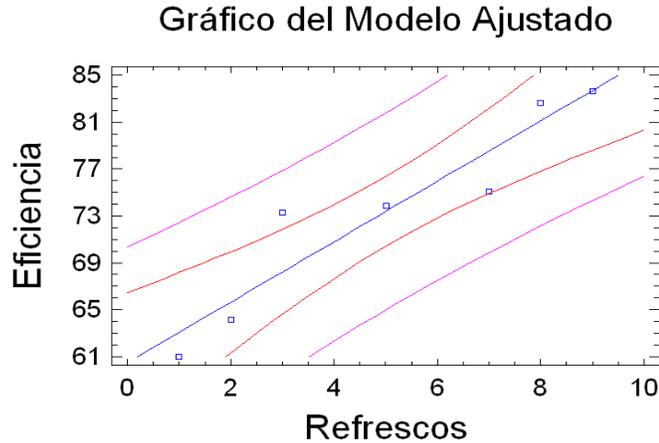


Figura 2.16: Gráfico del modelo ajustado para Eficiencia.

Se realizó un análisis de regresión para la productividad. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 2.23: Análisis de Regresión Lineal para Productividad.

Variable dependiente: Productividad				
Parámetro	Estimación	Error Estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	1,2703	0,114013	11,1401	0,0001
Pendiente	-0,0793966	0,0197618	-4,01767	0,0101

Tabla 2.24: Análisis de la Varianza para Productividad.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados Medios	F-Ratio	P-Valor
Modelo	0,365621	1	0,365621	16,14	0,0101
Residuo	0,113254	5	0,0226507		
Total (Corr.)	0,478875	6			

R-cuadrado = 76,35 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 71,62 porcentaje

Error estándar de est. = 0,150502

Error absoluto medio = 0,0964539

Estadístico de Durbin-Watson = 1,32639 (P=0,0468)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,138303

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados del ajuste al modelo lineal para describir la relación entre Productividad y Refrescos. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Productividad} = 1,27013 - 0,0793966 * \text{Refrescos} \quad (\text{ec. 2.6})$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,05, existe relación estadísticamente significativa entre Productividad y Refrescos para un nivel de confianza del 95%. El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 76,35% de la variabilidad en Productividad. El coeficiente de correlación es igual a -0,873785, indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 0,150502.

El error absoluto medio (MAE) de 0,0964539 es el valor medio de los residuos. El estadístico Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se han introducido los datos en el fichero. Dado que el p-valor es inferior a 0,05, hay indicio de una posible correlación serial.

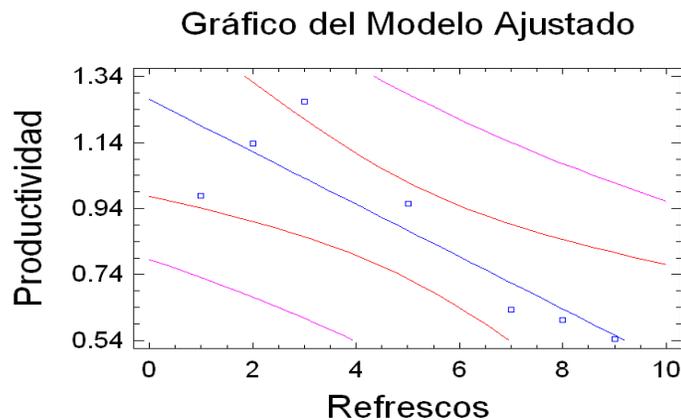


Figura 2.17: Gráfico del modelo ajustado para Productividad.

2.2.4- Optimización del modelo.

Se desea conocer el número de refrescos óptimos para lograr una eficiencia máxima, por lo que se utiliza la herramienta Solver del Excel para optimizar los modelos obtenidos en análisis anteriores.

En este caso el objetivo es la Eficiencia en fermentación, condicionada por los valores de productividad ($1 < \text{Prod.} < 2$). Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Tabla 2.25: Resultados de la optimización.

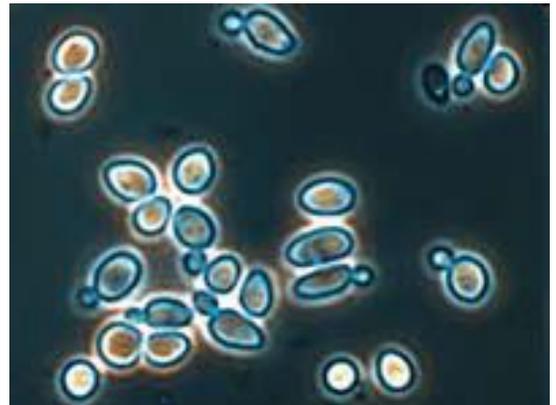
Name (Función Objetivo)	Final Value
<i>Eficiencia = 60,4912 + 2,57862 * Refrescos (ec.2.5)</i>	93.5
Name (Restricción)	Final Value
<i>Productividad = 1,27013 – 0,0793966 * Refrescos (ec.2.6)</i>	1

Como se puede observar, la eficiencia óptima se obtiene para cuatro refrescos con una productividad de 1 g/Lh de etanol.

2.3- Conclusiones Parciales.

1. Es posible la utilización de jugo de los filtros y vinazas en conjunto con las mieles para la obtención de etanol, aunque con la mezcla de estos sustratos se evidencia una ligera disminución de la eficiencia respecto a la miel como único sustrato.
2. La fermentación con vinazas tiene como resultado más baja eficiencia en fermentación, lo cual puede deberse a la existencia de acción inhibitoria de la vinaza sobre el microorganismo.
3. La optimización del modelo obtenido por el análisis del diseño Enrejado simplex arrojó que la eficiencia óptima será de 73,92 % para un aporte de azúcares del 54,1% por parte de los Jugos de los filtros y 45,9 % por parte de la miel diluida con vinazas.

4. En las fermentaciones donde se varió el número de refrescos se observó que la eficiencia en fermentación aumenta con el número de refrescos, no siendo así la productividad que disminuye a causa de los grandes tiempos de fermentación.
5. De acuerdo a la optimización realizada, el número de refrescos para garantizar una eficiencia máxima es cuatro, con una productividad de 1g/Lh.



Capítulo III

3.1- Determinación de los Costos de Producción de la Variante Patrón.

En capítulos anteriores se determinaron aquellas alternativas que por sus resultados a escala de laboratorio resultaron ser promisorias para elevar el impacto de las producciones de etanol. Para analizar cada la factibilidad de cada variante, se determinara primeramente un patrón que servirá de punto de comparación.

El patrón lo constituye la fermentación de mieles como sustrato para alcanzar una eficiencia en fermentación de 77,66 %. Se desea lograr un grado alcohólico de 5,5 °GL. Los balances para alcanzar estas condiciones en un fermentador arrojan que es necesario tener 10 m³ de un inóculo con 40 Kg/m³ de azúcares fermentables, 10 m³ de colchón a 118 Kg/m³ y una batición a igual concentración de azúcares fermentables que el colchón. La concentración de azúcares en el fermentador será de 110 Kg/m³. Las cantidades de materias primas determinadas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3.1: Determinación de las materias primas.

Materias Primas	Cantidad	Precio (\$/U.M)	Importe (\$/d)
Miel (t)	20,118	60	1207,08
Agua (m ³)	76,13	0,53	40,3489
Vinaza (m ³)	0	0	0
Urea (Kg)	21	0,722	15,162
Sulfato (Kg)	12,1	0,955	11,5555
Fosfato (Kg)	4,81	2,645	12,72245
Nutriente (Kg)	0,7	0,08462	0,059234
Total 55 HL			1286,928
TOTAL 500 HL			11582,35

La determinación de los Costos Totales de Producción se realizó sobre la base de determinados índices extraídos de la ficha de costo de la destilería para 500 HL/d:

Tabla 3.2: Indicadores energéticos.

Indicadores	Valor
Combustible (Kg)	32,26 Kg/HL
Electricidad (kw-h)	14,37 kw-h/HL
Vapor	296 Kg/HL
Agua enfriamiento (Mieles)	23,7 m ³ /HL
Agua enfriamiento (Jugos)	30,32 m ³ /HL

Tabla 3.3: Costos Totales de Producción para 500 HL/d.

Aspectos	Indicador energético	Índice \$/HL	Precio (\$/U.M)	Costo \$/d
Materias Primas				11582,35
Reparación y mantenimiento		1,14		570
Combustible	32,26		0,7562	12197,51
Electricidad	14,37		0,22	1580,7
Vapor	296		0,01	1480
Agua enfriamiento	23,7		0,53	6280,5
Distribución y ventas		0,08		40
Salarios		3,22		1610
Depreciación		1,79		895
Costos Totales de Producción				36236,06

Esta variante trabaja 300 días al año solamente con mieles como sustrato. La ganancia viene dada por el consumo de materias primas.

Tabla 3.4: Costos Totales de Producción anuales.

	ZAFRA	NO ZAFRA	TOTAL
COSTOS TOTALES DE PRODUCCIÓN	-	-	10870818
GANANCIA			1247,43

3.2- Determinación de los Costos de Producción del sistema VIMAS con alimentaciones óptimas.

Como se señalaba en capítulos anteriores, el sistema de llenado de Volúmenes Incrementados por Múltiples Adiciones Secuenciales puede ser empleado para aumentar la eficiencia en fermentación. En esta variante se evaluará la factibilidad de implementar este sistema en su número de refrescos óptimo de acuerdo a los resultados experimentales.

El número de refrescos óptimo es cuatro para una eficiencia en fermentación de 73,5 %. Se desea lograr un grado alcohólico de 5,5 °GL. Los balances para alcanzar estas condiciones en un fermentador arrojan que es necesario tener 10 m³ de un inculo con 40 Kg/m³ de azúcares fermentables, una batición a 125 Kg/m³ de azúcares fermentables y una concentración de 117 Kg/m³ en el fermentador. Las cantidades de materias primas determinadas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3.5: Determinación de las materias primas.

Materias Primas	Precio (\$/U.M)	3 Refrescos		4 Refrescos	
		Cantidad	Importe (\$/d)	Cantidad	Importe (\$/d)
Miel (t)	60	21,447	1286,82	21,35	1281
Agua (m ³)	0,53	75,22	39,8666	75,3	39,91
Vinaza (m ³)	0	0	0	0	0
Urea (Kg)	0,722	21	15,162	21	15,162
Sulfato (Kg)	0,955	12,1	11,5555	12,1	11,556
Fosfato (Kg)	2,645	4,81	12,72245	4,81	12,72
Nutriente (Kg)	0,08462	0,7	0,059234	0,7	0,059234
Total 55 HL/fermentador			1366,186		1360,41
TOTAL 500 HL/d			12295,67		12243,67

Se determinaron los Costos Totales de Producción para cuatro refrescos. Los resultados se muestran en la tabla 3.6.

Tabla 3.6: Costo Total de Producción para 500 HL/d.

				3 R	4 R
Aspectos	Indicador energético	Índice \$/HL	Precio (\$/U.M)	Costo \$/d	Costo \$/d
Materias Primas	-	-		12295,67	12243,67
Reparación y mantenimiento		1,14		570	570
Combustible	32,26	-	0,7562	12197,51	12197,51
Electricidad	14,37	-	0,22	1580,7	1580,7
Vapor	296	-	0,01	1480	1480
Agua enfriamiento	23,7	-	0,53	6280,5	6280,5
Distribución y ventas		0,08		40	40
Salarios		3,22		1610	1610
Depreciación		1,79		895	895
CTP				36949,38	36897,38

Esta variante trabaja 300 días al año solamente con mieles como sustrato. La ganancia viene dada por el ahorro de materias primas respecto a la variante patrón.

Tabla 3.7: Costos Totales de Producción anuales.

	3 R	4 R
COSTOS TOTALES DE PRODUCCIÓN (\$/año)	11084813	11069214

3.3- Determinación de los Costos de Producción de la Mezcla de sustratos.

El empleo de mezcla de sustratos en la fermentación constituye otra de las variantes estudiadas. La determinación de los indicadores económicos permitirá decidir si es factible o no la implementación de dicha variante.

Se desea obtener un grado alcohólico de 5,5 °GL con una eficiencia en fermentación de 73,92 %. Estos resultados se eligen del punto óptimo del diseño de mezclas estudiado en el capítulo anterior, donde el porcentaje de azúcares aportados por el Jugo es de 54,1 % y un 45,9 % por mieles diluyendo con vinazas. Los balances para alcanzar estas condiciones en un fermentador arrojan que es necesario tener 10 m³ de un inóculo con 40 Kg/m³ de azúcares fermentables, 10 m³ de colchón a 124 Kg/m³ y una concentración de azúcares fermentable en el fermentador de 116 Kg/m³. Las cantidades de materias primas determinadas se muestran en la siguiente tabla

Tabla 3.8: Determinación de las materias primas.

Materias Primas	Cantidad	Precio (\$/U.M)	Importe (\$/d)
Miel (t)	11,02	60	661,2
Agua (m ³)	8,37	0,53	4,4361
Vinaza (m ³)	22,22	0	0
Jugo Filtro (T)	54,2	9,5	514,9
Urea (Kg)	21	0,722	15,162
Sulfato (Kg)	12,1	0,955	11,5555
Fosfato (Kg)	4,81	2,645	12,72245
Nutriente (Kg)	0,7	0,08462	0,059234
Total 55 HL			1220,035
TOTAL 500 HL			10980,32

Al igual que en la variante anterior, se utilizará el sistema para fermentar con jugos. Para esta variante además se le incluirá una nueva línea que llevara la vinaza del tanque de recepción al disolutor de miel, un intercambiador de calor y una bomba. Los resultados del costo del equipamiento de muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3.9: Costo de adquisición del equipamiento.

Equipo	Cantidad	Índice anterior	Índice actual	Costo anterior (\$)	Costo actual (\$)
I.C	1	-	-	-	3700
Bomba	1	-	-	-	7500

Tuberías	30 m	356	575	1968	3178,7
Total					14378,65

Los costos fueron sacados de **(Peters, 1991)** y los índices de costo para la actualización de la **(Chemical Engineering, 2014)**. La actualización de costos se realiza a través de la siguiente ecuación.

$$\text{Costo actual} = \text{Costo anterior} * \frac{\text{Indice actual}}{\text{Indice anterior}} \quad (\text{ec. 3.1})$$

El costo del Intercambiador de calor y bomba fueron extraídos de (<http://www.matche.com/equipcost/MatHand.html>).

Tabla 3.10: Costos Totales de Inversión

Concepto	% Base E. entregado	Valor
Entrega de equipo	0,1*C.Equipo	1278,933
Equipamiento entregado		14068,3
Instalación del equipamiento	0,47	6612,081
Ingeniería y supervisión	0,33	4642,525
Gastos de construcción	0,41	5767,986
Contratos	0,22	3095,017
Gastos legales	0,04	562,7303
TOTAL		34748,6

Tabla 3.11: Costos Totales de Producción para 500 HL/d.

Aspectos	Indicador energético	Índice \$/HL	Precio (\$/U.M)	Costo \$/d
Materias Primas	-	-		10980,32
Reparación y mantenimiento		1,14		570
Combustible	32,26	-	0,7562	12197,51
Electricidad	14,37	-	0,22	1580,7
Vapor	296	-	0,01	1480
Agua enfriamiento	30,32	-	0,53	8034,8

Distribución y ventas		0,08		40
Salarios		3,22		1610
Depreciación		1,79		895
Costos Totales de Producción				37388,23

Esta variante trabajara 300 días al año. Del total de días trabajará 100 procesando jugos cuando se esté en zafra y el resto trabajará con mieles solamente. La ganancia viene dada por el ahorro de materias primas respecto a la variante patrón.

Tabla 3.12: Costos Totales de Producción anuales.

	ZAFRA	NO ZAFRA	TOTAL
COSTOS TOTALES DE PRODUCCIÓN	3738832	7247211,8	10986044
GANANCIA			6689,28

Se determinaron los Indicadores Dinámicos de Rentabilidad para chequear la factibilidad de la variante para una tasa de interés bancario del 12 % y un plazo de 10 años. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3.13: Indicadores Dinámicos de Rentabilidad.

VAN (\$)	2719,93
TIR (%)	14,11%
PRD (años)	8,50

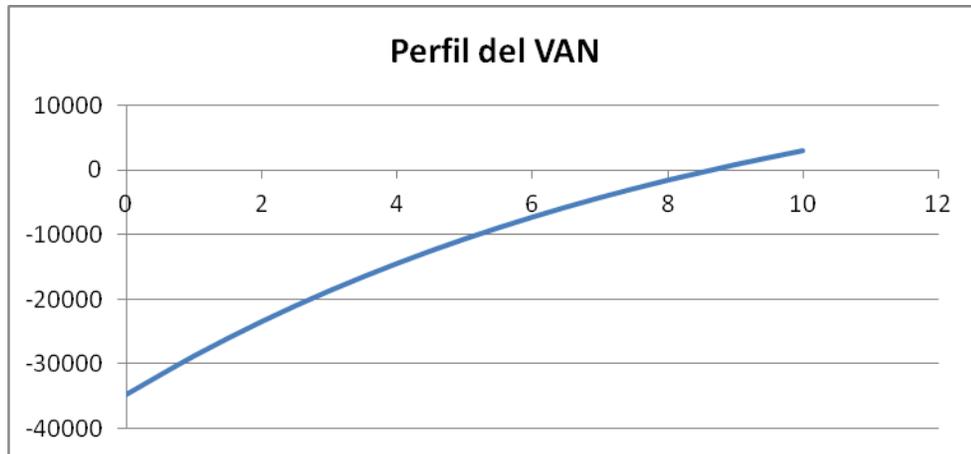


Figura 3.1: Perfil del VAN.

3.4- Análisis de los Resultados.

Se comprobó que al aumentar el número de alimentaciones a proceso Fed Batch se incrementa la eficiencia del proceso productivo de etanol, lo que se traduce en una disminución de los Costos Totales de Producción. Este sistema de alimentaciones debe ser evaluado con mayor profundidad a nivel industrial para justificar así la compra del sistema de control automático para su implementación.

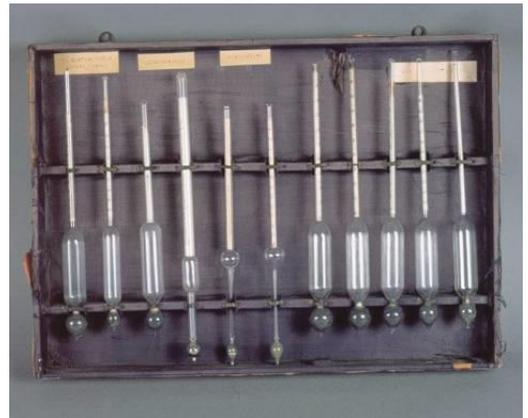
La planta de tratamiento de biogás situada en el poblado de Adela recibe las vinazas producidas por la destilería “Heriberto Duquesne”. Actualmente el biogás consume el 70 % aproximadamente de estas vinazas. Se conoce además por trabajos realizados en la cuenca del Río Guaní al cual tributan los residuales de la destilería por el Centro de Estudios y Servicios Ambientales (CESAM, Villa Clara) que existe contaminación de las aguas superficiales y subterráneas y de la zona costera de la bahía San Juan de los Remedios **(CESAM, 2010)**.

Lo anteriormente expuesto refleja la necesidad de encontrar un uso a los grandes volúmenes de vinazas producidos, por lo que teniendo en cuenta que con esta variante se logran reutilizar 22,22 m³/d de vinazas y se logra un ahorro de igual magnitud de agua para dilución, por lo que

es necesario realizar estudios más detallados de las mezclas de estos sustratos para la producción de etanol para lograr su sustentabilidad económica.

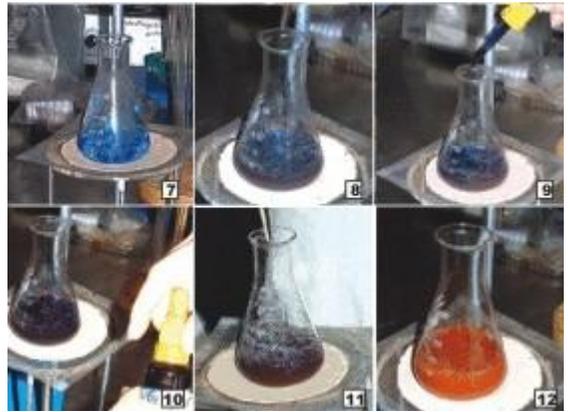
3.5- Conclusiones parciales

1. La alternativa de incremento del número de refrescos es factible técnica y económicamente.
2. Dado que la destilería “Heriberto Duquesne” ha trabajado con anterioridad las mezclas de jugos y mieles, los gastos inversionistas para la implementación de la nueva variantes de fermentación (mezcla vinaza-jugo de los filtro-miel) son mínimas, reduciéndose a tuberías, bombas, intercambiador de calor.
3. El ahorro de agua de 22,22 m³/d no compensa los costos inversionistas para el uso de la mezcla miel-jugo de los filtros-vinaza debido a la disminución de la eficiencia en fermentación, reflejándose en los indicadores dinámicos determinados (TIR 14,11 %, PRD 8,5 años).



Conclusiones

1. De acuerdo a las características de la instalación de la destilería Heriberto Duquesne es posible, desde el punto de vista técnico (instalaciones auxiliares presentes) el uso de las vinazas y otros sustratos como materia prima para la fermentación a etanol.
2. Es posible utilizar mezclas de jugo de los filtros, mieles y vinazas para la producción de etanol, a pesar de una disminución en la eficiencia fermentativa con respecto a la fermentación con mieles.
3. El ahorro de agua de 22,22 m³/d no compensa los costos inversionistas para el uso de la mezcla miel-jugo de los filtros-vinaza debido a la disminución de la eficiencia en fermentación, reflejándose en los indicadores dinámicos determinados (TIR 14,11 %, PRD 8,5 años).
4. Con el incremento del número de alimentaciones se mejora la eficiencia en fermentación.
5. El Costo Total de Producción disminuye en \$ 15600 anuales cuando se utilizan cuatro refrescos en lugar de tres que es lo que se encuentra implementado en la destilería "Heriberto Duquesne".



Recomendaciones

1. Continuar con los estudios a escala de laboratorio y piloto del método VIMAS modificando variables operacionales para lograr su implementación a escala industrial.
2. Continuar el estudio de las mezclas de sustratos para mejorar los resultados económicos.



Bibliografía

1. AIBA S.: *Biochemical Engeneering* / S AIBA, A. E. Humprey. N. F. Mellis. La Habana Editorial Ciencia y Técnica, 1970. pp 104 – 108.
2. Álvarez, R.M. y col.: *Efecto de la temperatura sobre la producción de alcohol en levaduras*. II Seminario Internacional sobre Azúcar y Derivados de la Caña. Diversificación'92. Comunicaciones cortas. Tomo I, 1992. p. 120-122
3. Álvarez, R.M. y col.: *Efecto del tamaño del inóculo en la fermentación alcohólica por lotes*. Rev. Latinoamericana de Microbiología 35: 33-38; 1993
4. Amaral Germek, H.: *Fermentación alcohólica*. Colección GEPLACEA, PNUD. Serie Diversificación. México, 1989. p. 16-20, 35
5. *Azúcar, alcohol e subproductos*. Revista STAB Vol. 1 N° 2, 1982
6. Bacila and Horii J.TIBS.: *Biotechnology Bioengineering Symposium N° 6*, 1979.
7. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Edit. Wilkins company, 8th edition. 1994
8. Biart, J. y col.: *Estudio de las mieles finales de la caña de azúcar.*/ J. Biart. Editorial Científico Técnica. 1982
9. Biart. R.: *Caracterización de las mieles finales cubanas*. Edición Científico- Técnica. La Habana.1986
10. Blake, J.D, Clarke. M. L.: *La industria de los derivados de la caña de azúcar (ICIDCA)*. Editorial Científico-Técnica. La Habana. pp 342 – 348
11. Blanco C. G.: *Diagnóstico de la industria para la producción de alcohol etílico*. CIDCA, 1978
12. Blanco C. G.: *Posibilidades de la producción de etanol* / C. G. Blanco y Z. Rodríguez. Revista ICIDCA. Número 23 .1984
13. Blanco C.G.: *La producción de alcohol a partir de la industria azucarera y sus posibilidades*. Ed. Científico-Técnica, 1982
14. Blanco, C. G.: *La producción de Alcohol a partir de la industria azucarera y sus posibilidades*. Edición Científico. Cuba.1982

15. Blanco, G.: *La producción de alcohol a partir de la industria química y sus posibilidades*. Rev. ICIDCA. 21, 2, 12-18, 1987
16. *Brasil Acucareiro*. Vol. 99. Año, 1982
17. Brizuelas, Antonieta. M. A y otros: *Revista ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*. No 3, Vol xx, año 1986. pp 1
18. Callender, I. J; Barford, J. P.: *Biotechnol Letters*, 1983.
19. Chibata, I.: *Am. Chem. Soc. Symp.* Ser 106,186.1979
20. *Cuba Azúcar*. 28, 3, 49-52, 1999
21. Dahiya D.S; Koshy M. Dhamijass; otros: *Spent Wash Recycling for molasses Fermentation*. Int.Sugar Journal. Vol 84. N° 1004, 1982
22. David Posada E.: *Aceite de fusel: fenómenos que determinan su producción*. Rev. Cuba Azúcar. 2, 10-19, 1968
23. David, P.E.: *Cómo ahorro miel en la destilería* / P.E.David .MINAZ. Tecnología azucarera.11. pp3-14
24. Del Castillo, L. y col.: *Aspectos genéticos de la tolerancia alcohólica de las levaduras*. Trabajo presentado en TIPAL'97, Universidad de Matanzas. 1997
25. Devine, S. J. et. al. : *The effect of medium composition on the production of ethanol by Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Letters. 9, 1, 19-21, 1980
26. Domínguez, V. E. y col.: *Influencia de la harina de maíz y el salvado de arroz en la formación de productos derivados en la fermentación alcohólica*. Int. Sug. JNL. 100, 1197, 474, 1998
27. Dr. Kretzchmarh: *Levaduras, alcohol y otros productos de la fermentación*. Edit. Reverté, 1980
28. Estévez, R.: *Fundamentos de la generación de levadura en destilerías*. Memorias I Seminario de producción de levadura Torula. MINAZ. 1997
29. Fabelo, J. A.: *Estudio de la etapa de fermentación alcohólica utilizando mezcla de diferentes sustratos*. Tesis de Doctorado .Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Abril, 1999
30. Fabelo, J. y col.: *Determinación de los costos de producción de la etapa de fermentación alcohólica con la utilización de diferentes sustratos*. Rev. Centro Azúcar 3, 12-15, 1998
31. Fabelo, J. y col.: *Estudio estadístico de la etapa de fermentación alcohólica para diferentes sistemas de sustratos*. Rev. Centro Azúcar 2, 27-30, 1998

32. Fabelo, J. y col.: *Modelación y optimización de la etapa de fermentación alcohólica utilizando diferentes sistemas de sustratos*. Rev. Centro Azúcar 2, 32-34, 1998
33. Fahrasmane, L. et. al.: *Production of higher alcohols and short chain fatty acids by different yeasts used in rum fermentations*. J. Food. Sci., 50, 5, 1424-30, 1985
34. *Folleto impreso para la producción de alcohol a partir de melasas*. UCLV. 1986
35. Fundora, N. y col.: *Influencia de sales nitrogenadas en la producción de alcohol*. Memorias. TIPAL'99. Matanzas, Cuba. 1999
36. GEPLACEA.: *Intervenciones especiales en el tercer Seminario Internacional de azúcar y derivados de la caña de azúcar*. Palacio de las Convenciones. Ciudad de La Habana, Cuba. 1993
37. Gilbert, H. Ayres: *Análisis Químico cuantitativo*. Ediciones del Castillo s.a, Madrid, España. Año 1970
38. Hernández, N.: *Microbiología de las producciones azucareras, producciones microbianas derivadas*. ISPJAE. 1986
39. <http://es.wikipedia.org/fermentación>.
40. Humhprey, A.E.: *Symposium on Enzymatic Hidrolysis of cellulose*. Aulanko, Finland. 12-14 March. SITRA. Helsinki. pp 1975.437
41. Internet //www. sicoar. com.uy/claes. "Informe de la FAO, 2001"
42. Iturria, Pedro Jesús: *Tesis de maestría." Estudio medioambiental de la etapa de fermentación alcohólica utilizando diferentes sustratos y sus combinaciones"*, 2001
43. Jorgenser, A.: *Microbiología de la fermentación industrial*.- Séptima edición . Año1979. pp – 453
44. Kelsall, D. R: *The alcohol Texbook. Chapter 9. The management of fermentations in the production of alcohol*. Mc Graw-Hill. 1995. pp 89
45. Larson, E.: *Summary Report on a Visit to Cuba*. Princeton University, N. J., 1994
46. Laval Cia: *Producción de etanol por proceso denominado: "Biostil"*. Rev. Brasil Azucarero. Año L Vol. c. N° 6, 1982
47. Lehninger, A. y col.: *Principles of biochemistry / Albert Lehninger*. Worth Publishers Inc. New York. USA. 2 Edic., 1993
48. Llerena, G. y col.: *Alternativas de sustratos para la producción de alcohol*. Rev.

49. Llerena, G. y col.: *Alternativas de sustratos para la producción de alcohol*. Rev. Cuba Azúcar. 28, 3, 49-52, 1999
50. Llistó, A. M. et. al.: *Alguns componentes do coeficiente não-álcool das aguardentes de canna: ésteres*. Brasil açucareiro 94, 5, 20-21, 1979
51. Mansur M; Cuellar A; otros: *Caracterización de jugo crudo y clarificado para la fermentación alcohólica*. II Seminario Internacional sobre azúcar y derivados de la caña. Tomo I. Diversificación, 1990
52. Mantovani, G.: *Descomposición espontánea de las mieles*. 1994
53. *Manual analítico para el control unificado (MACU) para la producción de azúcar crudo*
54. Marrero, S.: *Producción de alcohol a partir de melazas*. UCLV.Cuba. 1986
55. Mc-Pherson, D.; Reyes, K.; Socarrás, Y. 2002. *Evaluación de alternativas de fermentación alcohólica utilizando diferentes sustratos y sus combinaciones*. 1985
56. Mesa, L; González, E; González, M. 2006. *Estudio preliminar del mezclado de los sustratos: Jugos de los filtros, Jugos secundarios y miel en la producción de etanol*. Revista Centro Azúcar.
57. MINAZ: *Seminario Nacional de alcoholes. Destilería Arechabala*. Trabajo presentado. 1982
58. Moo Young, M. Moreira: *A. The Filamentous Fungi Fungai Technology Ed D.E. Smith. V IV Chap 5*, 1985. pp117-114
59. Morel F. I. *Tecnología azucarera. Ed Pueblo y educación*, 1985
60. Navarro Campa, J.: *La destilación del aguardiente*. Memorias. II Seminario de productores de ron. MINAZ. 1996
61. Neish, A. C.: *Desasimilación de glucosa por levadura a concentraciones en equilibrio de ión hidrógeno*. Can. J. Technol. 29, 123-29, 1961
62. Nikitin, G. A.: *Fundamentos Bioquímicas de las producciones Microbiológicas*. Ed. Peipal. 1981. p 312
63. NOA.S.H.: *Consideraciones económicas de los derivados de la caña de azúcar / S.H.NOA*. Revista Cuba Azúcar Julio-Sept. 1981
64. Obregón, L. J. J.: *Análisis de la materia prima y otras consideraciones microbiológicas*. Cuba Alcohol s.a. Documento Interno. 2000

65. Otero, M. A y otros: *Efecto inhibitorio de las melanoidinas sobre el crecimiento de la Candida utilis*. II Seminario Internacional de Azúcar y Derivados de la caña. Abril 10-13. La Habana, 1990
66. Panchal, C. y col.: *Fermentation ethanol production. Application of the new genetics and ancient art*. Energy Technol. and Econ. Production, 1984. p. 1270-1273
67. Paterson, M. et. al.: *Remoção de contaminantes orgânicos a través do sistema de hidrosseleção no processo de fabricação de etanol*. Brasil açucareiro 106, 6, 20-26, 1988
68. Quintero, R. R: *Ingeniería Bioquímica*. Ed. Alhambra Mexicana. 1ed México, 1981
69. Revilla, J. G. y otros: *Estudio de las proteínas solubles en jugo de caña*. Revista ICIDCA. Vol 10 Año 1976
70. *Revista Centro Azúcar*. No. 1, año 27, octubre –diciembre, 2000
71. Reyes, A. y col.: *Influencia de los microcomponentes de las mieles finales en su potencial fermentativo. Diversificación '90. Comunicaciones cortas*. Tomo I. 60-63, 1990
72. Sánchez O. y col.: *Estudio de promotores en la fermentación alcohólica*. Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería. 2, 15-18, 1996
73. Stryer, L.: *Biochemistry* / Lubert Stryer, W.H. Freeman and Company. New York. 4th Edic., 1995
74. Valdés I; García, R. *Obtención de cepas resistentes a alcohol y termotolerantes por métodos de selección en cultivo continuo* .Primer Taller Internacional de Producción de alcoholes. Febrero 3-5.1997. TIPAL, 1997
75. Valdés, I.: *Evaluación de cepas productoras de alcohol*. Memorias. II Seminario Nacional de productores de alcohol. MINAZ, 1996
76. Varrabeda, L. I.: *Industria microbiológica* / L. I. Varrabeda. Edición Vem. 1989. pp 294
77. Verbina N. Mm; otros: *Microbiología de las producciones alimenticias*. Ed. Agro, 1988
78. Wikipedia, 2009



Anexos

- **Determinación de Azúcares reductores totales (para jugos). (ICINAZ, MACU. Tomo I y II. Octubre, 1996)**

Fundamentos del método: Los azúcares reductores presentes en las distintas muestras objeto de análisis tienen la propiedad de reducir el cobre del estado cúprico al estado cuprosos en disoluciones alcalinas. El punto final se detecta utilizando azul de metileno como indicador interno.

Preparación de la muestra y/o porción de ensayo: En jugos agitar con vigor las muestras compuestas hasta homogenizarla. Filtrar por papel de filtro a temperatura ambiente. Desechar los primeros 10ml del filtrado. Del filtrado anterior pese 50.00g transfíralos en un frasco volumétrico de 200ml y añada 1,5ml de solución al 10 % de oxalato de sodio o potasio. Enrase hasta la marca con agua destilada. Mezcle y filtre añadiendo tierra de infusorios sobre el papel de filtro. Cubra el embudo con vidrio reloj mientras dura la filtración. Del filtrado anterior tomar 25ml del filtrado en matraz de 300ml, añadir 100ml de agua destilada. Calentar a 65 ° C y añadir 10ml HCL 6,34Normal. Dejar en reposo durante 30 minutos. Añada 3 gotas de fenoltaleina como indicador y neutralizar con NaOH 1Normal y se enrasa. Esta constituye mi solución problema. Hacer reductores totales.

Procedimiento general: Cargue una bureta de 0-50ml con la solución básica (problema) anteriormente preparada. Prepare dos frascos erlenmeyer de 250-300ml y en ambos pipetee 5ml de Felling B y 5ml de Felling A en ese mismo orden. Un frasco se destina para la valoración normal.

El volumen de solución A añadido a cada frasco erlenmeyer tiene que ser rigurosamente exacto. Añada a uno de los dos frascos anteriores 20ml de agua destilada y 8ml de la solución básica problema antes preparada. Caliente el erlenmeyer colocándolo sobre una tela metálica amiantada en una hornilla con regulador de temperatura de manera que el contenido comience a hervir en cuatro minutos. Después que comience a hervir contar 2 minutos (exactos), transcurridos estos se añaden 0,5ml de la solución indicadora de azul de metileno sin tocar las paredes del frasco, se comienza a valorar con la solución problema sin retirar de la

plancha hasta que desaparezca el color azul y cambie al color rojo ladrillo característico del óxido cuproso precipitado el calentamiento debe durar 7 minutos. Anote los ml de solución básica consumidos, este dato se utiliza al efectuar la segunda valoración. En esta segunda valoración se resta para determinar la cantidad de agua a añadir:

Cantidad de agua = 60 - 10 felling - lo que se gastó en la primera valoración

En el segundo erlenmeyer se añade el volumen de agua calculado anteriormente, se añade el volumen gastado de solución problema en la valoración anterior- 1ml de solución problema.

Se coloca en la hornilla y se valora como se hizo anteriormente...

Se toma el valor de la segunda valoración ya que es el más exacto.

$$\text{Cálculos: ART} = \frac{52.2}{V_{\text{gastado}}} * 4.88$$

Donde: ART = número de reductores totales en la muestra

V = volumen gastado en la valoración final (ml)

- **Determinación de Azúcares reductores totales (para mieles). (ICINAZ, MACU. Tomo I y II. Octubre, 1996)**

Preparación de la muestra y/o porción de ensayo: Para mieles se pesa 5g de miel llevar a un matras de 500 ml, se le añade 2,5ml de solución al 10 % de oxalato de sodio o potasio. Enrase hasta la marca con agua destilada. Mezcle y filtre añadiendo tierra de infusorios sobre el papel de filtro. Del filtrado anterior tomar 100ml del filtrado en matraz de 300ml, añadir 50ml de agua destilada. Calentar a 65 ° C y añadir 10ml HCL 6,34 Normal. Dejar en reposo durante 30 minutos. Añada 3 gotas de fenoltaleina como indicador y neutralizar con NaOH 1 Normal y se enrasa. Esta constituye mi solución problema. Hacer reductores totales.

Procedimiento general: Cargue una bureta de 0-50ml con la solución básica (problema) anteriormente preparada. Prepare dos frascos erlenmeyer de 250-300ml y en ambos pipetee 5ml de Felling B y 5ml de Felling A en ese mismo orden. Un frasco se destina para la valoración normal.

El volumen de solución A añadido a cada frasco erlenmeyer tiene que ser rigurosamente exacto. Añada a uno de los dos frascos anteriores 20ml de agua destilada y 15ml de la solución básica problema antes preparada. Caliente el erlenmeyer colocándolo sobre una tela metálica amiantada en una hornilla con regulador de temperatura de manera que el contenido comience a hervir en cuatro minutos. Después que comience a hervir contar 2 minutos (exactos), transcurridos estos se añaden 0,5ml de la solución indicadora de azul de metileno sin tocar las paredes del frasco, se comienza a valorar con la solución problema sin retirar de la plancha hasta que desaparezca el color azul y cambie al color rojo ladrillo característico del óxido cuproso precipitado el calentamiento debe durar 7 minutos. Anote los ml de solución básica consumidos, este dato se utiliza al efectuar la segunda valoración. En esta segunda valoración se resta para determinar la cantidad de agua a añadir:

Cantidad de agua = 60 - 10 felling - lo que se gastó en la primera valoración

En el segundo erlenmeyer se añade el volumen de agua calculado anteriormente, se añade el volumen gastado de solución problema en la valoración anterior- 1ml de solución problema.

Se coloca en la hornilla y se valora como se hizo anteriormente...

Se toma el valor de la segunda valoración ya que es el más exacto.

$$\text{Cálculos: ART} = \frac{m \cdot v}{m_a \cdot v_1} (100)(3)$$

Donde: ART = número de reductores en la muestra

$$m = 0.0525\text{g}$$

m_a = masa de la muestra original (g)

v = volumen en que se diluye m_a , en (ml)

v_1 = volumen gastado en la valoración final (ml)

Se multiplica por tres porque es el factor de dilución.

- **Determinación cuantitativa de las células de la levadura presentes en el inóculo y en el cultivo en desarrollo.**

Fundamento del método: Está basado en el conteo de la cantidad de células por unidad de volumen presentes en una muestra, previamente diluida, al observarla al microscopio.

Aparatos y utensilios: Cámara de Neubauer 0,1 mm de profundidad

Microscopio óptico

Procedimiento: Preparación de la muestra de ensayo. Se toma la muestra y se diluye en agua en una relación conocida, para garantizar que en cada cuadrado de la cámara no haya más de 60 células ni menos de 20.

Determinación: Se toma la muestra con una pipeta volumétrica, soplando y absorbiendo hasta su homogeneidad. Se coloca el cubre objeto sobre el área cuadrículada de la cámara Neubauer y se presiona suavemente con la yema de los dedos, no debe existir remanente de aire en la cámara porque se puede sobreestimar la población celular. Con una pipeta Pasteur se toma una pequeña gota de la dilución y se desliza por el borde del cubre objeto, manteniendo la misma 1 min en reposo. Se observa al microscopio y se realiza el conteo, teniendo en cuenta que:

- a) el conteo se efectuará sobre los cuadrados extremos y sobre el cuadrado central
- b) si la yema tiene un tamaño mayor que la mitad de la célula madre, se considerará como una célula de levadura, no como una célula gemante
- c) la célula se contará cuando posea el 50 % o más de su tamaño dentro del área del cuadrado.

Expresión de los resultados:

Métodos para los cálculos.

$$Y = A * d * 25 * 10^4 \text{ [células /mL]}$$

Donde:

Y = número de células por unidad de volumen

A = número total de células

d = dilución

Aproximación de los resultados.

Los resultados se reportan en notación científica hasta la centésima

- Tabla 1.1: Determinación del grado alcohólico.

Grado real de los líquidos marcados a 15oC. Grados marcados por el alcoholímetro										
Temperatura	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
15	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0
16	0,9	1,9	2,9	3,9	4,9	5,9	6,9	7,9	8,9	9,9
17	0,8	1,8	2,8	3,8	4,8	5,8	6,8	7,8	8,8	9,8
18	0,7	1,7	2,7	3,7	4,5	5,7	6,7	7,7	8,7	9,7
19	0,6	1,6	2,6	3,6	4,4	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5
20	0,5	1,5	2,4	3,4	4,3	5,4	6,4	7,3	8,3	9,3
21	0,3	1,4	2,3	3,3	4,1	5,2	6,2	7,1	8,1	9,1
22	0,1	1,3	2,1	3,2	4,0	5,1	6,1	7,0	7,9	8,9
23		1,1	1,9	3,1	3,8	4,9	5,9	6,8	7,8	8,7
24		1,0	1,7	2,9	3,6	4,8	5,8	6,7	7,6	8,5
25		0,8	1,6	2,7	3,5	4,6	5,5	6,5	7,4	8,3
26		0,7	1,5	2,6	3,3	4,4	5,4	6,3	7,2	8,1
27		0,5	1,3	2,4	3,1	4,3	5,2	6,1	7,0	7,9
28		0,3	1,1	2,2	2,9	4,1	5,0	5,9	6,8	7,7
29		0,1	0,9	2,0	2,8	3,9	4,8	5,7	6,6	7,5
30		0,0	0,8	1,9	2,6	3,7	4,6	5,5	6,4	7,3
31			0,6	1,7	2,4	3,5	4,4	5,3	6,2	7,1

32			0,4	1,5	2,2	3,3	4,2	5,1	6,0	6,8
33			0,2	1,3	2,0	3,1	4,0	4,9	5,7	6,6
34				1,1	1,8	2,9	3,8	4,6	5,5	6,4
35				0,9	1,5	2,7	3,5	4,4	5,3	6,1
36				0,6	1,4	2,4	3,3	4,2	5,0	5,9
37				0,4	1,1	2,2	3,1	3,9	4,8	5,6
38				0,2	0,9	2,0	2,8	3,7	4,5	5,4
39					0,6	1,7	2,6	3,4	4,3	5,1
40						1,5	2,4	3,2	4,0	4,0

Tabla 2.1: Resultados obtenidos para 100% Miel (diluida con agua).

100% MIEL				
Intervalos de tiempo (h)	Refrescos	Brix	Ph	Temperatura
0	1er Refresco	15,51	4,8	28
3		13,26	4,9	30
7		10,6	5,5	32
7,1	2do Refresco	16,34	5,5	27
14		13,34	4,85	31
20		10,63	4,8	30
20,1	2er Refresco	14,71	5	28
25		12,71	4,8	31
28		11,51	4,7	31
32		10,39	4,7	32
35		9,39	4,5	32
37		8,59	4,5	32
41		7,39	4,2	32
44		6,7	4,2	32

Tabla 2.2: Resultados obtenidos para 100% Miel (diluida con vinaza).

100% Miel (diluida				
---------------------------	--	--	--	--

con vinaza)				
Intervalos de tiempo (h)	Refrescos	Brix	Ph	Temperatura
0	1er Refresco	17,31	4,6	28
3		14,74	4,7	31
9		11,03	4,8	30
9,1	2do Refresco	18,46	4,9	27
14		16,54	4,7	31
20		13,66	4,6	30
22		12,83	4,6	30
22,1	3er Refresco	17,06	4,8	30
25		16,14	4,7	31
29		14,46	4,5	31
32		13,42	4,6	32
34		12,39	4,2	32
37		11,59	4,2	32
41		10,59	4,2	32
44		9,51	4	31

Tabla 2.3: Resultados obtenidos para 50% Miel (diluida con agua)- 50%Miel (diluida con vinaza).

50% MIEL- 50% VINAZA				
Intervalos de tiempo (h)	Refrescos	Brix	Ph	Temperatura
0	1er Refresco	17,5	4,7	28
4		16,33	4,8	30
9		10	4,8	30
9,1	2do Refresco	17,44	5,1	27
15		14,94	4,8	31
20		12,43	4,7	30
20,1	3er Refresco	16,51	4,9	28
25		14,34	4,8	31
28		12,91	4,8	31
32		11,79	4,7	32
34		10,99	4,5	32
37		9,99	4,2	32
42		9,19	4,1	32

45		8,31	4,2	31
----	--	------	-----	----

Tabla 2.4: Resultados obtenidos para 100% Jugo de los Filtros.

100% JUGO DE FILTROS				
Intervalos de tiempo (h)	Refrescos	Brix	Ph	Temperatura
0	1er Refresco	9,82	4,5	27
3		7,82	4,6	30
7		5,4	4,6	30
7,1	2do Refresco	9,56	4,95	27
14		6,78	4,5	32
18		5,42	4,5	30
18,1	3er Refresco	7,81	4,5	27
24		5,82	4,9	30
27		4,9	4,5	31
30		3,98	4,3	32
33		3,01	4,2	32
36		2,41	3,9	32
39		2,01	3,9	32
43		1,81	3,9	31

Tabla 2.5: Resultados obtenidos para 58,42% Miel (diluida con agua)- 41,58% Jugo de los Filtros.

41,58% JUGO DE FILTROS- 58,42% MIEL				
Intervalos de tiempo (h)	Refrescos	Brix	Ph	Temperatura
0	1er Refresco	12,42	4,6	27
4		10,23	4,7	30
8		7,4	4,8	30
8,1	2do Refresco	12,62	5,2	27
15		9,71	4,75	31
19		8,02	4,7	30
19,1	3er Refresco	11,22	4,8	27
24		9,11	4,7	31
27		8,31	4,6	31
30		6,98	4,6	32
33		6,38	4,2	32
36		5,38	4,2	32
40		4,58	4,2	32
43		4,2	4,1	31

Tabla 2.6: Resultados obtenidos para 58,42% Miel (diluida con vinaza)- 41,58% Jugo de los Filtros.

41,58% JUGO DE FILTROS- 58,42% VINAZA				
Intervalos de tiempo (h)	Refrescos	Brix	Ph	Temperatura
0	1er Refresco	13,44	4,6	27
4		11,03	4,7	30
8		8	4,8	30
8,1	2do Refresco	13,97	5	27
14		10,91	4,7	31
18		9,03	4,6	30
18,1	3er Refresco	12,42	4,7	27
24		10,11	4,6	31
27		8,91	4,6	31
30		7,99	4,5	32
33		7,18	4,2	32
36		6,18	4,2	32
40		5,58	4,2	32
44		5,5	4,1	31

Tabla 2.5: Resultados obtenidos para 33,75% Miel (diluida con agua)- 32,5% Jugo de los Filtros- 33,75% Miel (diluida con vinaza).

32,5% JUGO DE FILTROS-33,75 MIEL- 33,75% VINAZA				
Intervalos de tiempo (h)	Refrescos	Brix	Ph	Temperatura
0	1er Refresco	14,14	4,7	27
4		11,43	4,8	30
9		8,6	4,8	30
9,1	2do Refresco	14,17	4,9	27
14		11,91	4,8	31
19		9,83	4,7	30
19,1	3er Refresco	13,31	4,81	28
24		11,39	4,6	32
27		9,91	4,6	31
30		8,79	4,6	32

33		7,79	4,5	32
36		6,58	4,2	32
39		5,98	4,2	32
43		5,3	4,1	31

Tabla 3.1: Resultados obtenidos para el cultivador.

CULTIVADOR				
Tiempo(h)	pH	Brix	# cel	gem
0	4,03	13	9,34	2
2	4,02	13	12	2,5
4	4,01	13	22,5	6,5
6	3,9	13	39,5	10
10	3,45	12,8	42	15,5
13	4,2	12,5	44	17,5
15	3,97	12,5	59	19
17	3,47	10,5	129	21,5
19	3,12	8,5	159	43

Tabla 3.2: Resultados obtenidos en el pre fermentador.

PREFERMENTADOR				
Tiempo(h)	pH	Brix	# cel	gem
0	4,73	15,5	17	3
2	4,57	15	33	12
4	4,3	14,4	76	31,5
6	3,78	12,5	176	66
8	3,49	10,5	196	69
10	3,45	8,5	200	75

Tabla 3.3: Resultados obtenidos para un refresco.

1 REFRESCO			
Intervalos de tiempo (h)	Refrescos	Brix	Ph
0	1er Refresco	21	5,07
1		20	5,06
1		19,5	5,04

2		19,2	4,72
4		17,5	4,46
6		16	4,43
9		14,4	4,34
11		13,6	4,34
12		13	4,37
13		12,6	4,36
15		12,5	4,36
18		12	4,34
19		11,6	4,34
20		11,5	4,33
22		11,1	4,34
23		11	4,33
25		11	4,33
26		10,5	4,34
27		10,3	4,36
29		10,2	4,37
31		9,8	4,4
32		9,5	4,4
35		9	4,4

Tabla 3.4: Resultados obtenidos para dos refrescos.

2 REFRESCOS			
Intervalos de tiempo (h)	Refrescos	Brix	Ph
0	1er Refresco	19,5	4,57
1		13,6	4,48
1	2do Refresco	20	5,1
1		20	5,1
2		20	4,7
4		17,5	4,54
6		16,5	4,48
9		14,5	4,36
11		13,5	4,35
12		12,9	4,35
13		12,6	4,35
15		12,5	4,35
18		12	4,35
19		11,6	4,35

21		11,5	4,34
22		11	4,34
23		10,3	4,34
24		10	4,33
26		9,8	4,35
27		9,6	4,36
28		9,4	4,38
31		8,9	4,39
32		8,5	4,4

Tabla 3.5: Resultados obtenidos para tres refrescos.

3 REFRESCOS			
Intervalos de tiempo (h)	Refrescos	Brix	Ph
0	1er Refresco	18,5	4,68
1		12,5	4,65
1	2do Refresco	19,5	4,5
1		19	4,48
2		18,5	4,41
4		16,5	4,38
6		14,5	3,86
9		12,6	4,2
9	3cer Refresco	15,2	4,5
11		14,6	4,46
12		14	4,46
14		13,2	4,44
15		13	4,44
18		12,9	4,45
19		12	4,41
21		11,5	4,41
22		11,5	4,41
24		11,3	4,39
25		11	4,39
27		10,5	4,39
28		10	4,38
29		9,4	4,38
32		8,5	4,38
33		7,2	4,31

Tabla 3.6: Resultados obtenidos para cinco refrescos.

5 REFRESCOS			
Intervalos de tiempo (h)	Refrescos	Brix	Ph
0	1er Refresco	15	4,33
1		13,5	4,16
1		13	4,15
2		12	3,92
4		11,5	3,9
4		11	3,9
6		10,8	3,88
6	2do Refresco	14	4,28
9		13,6	4,26
10		12,8	4,23
11		11,85	4,23
13		11	4,24
14		10	4,25
14	3cer Refresco	15	4,39
17		12,9	4,21
18		12,6	4,26
20		12	4,26
23		11	4,24
24		10,5	4,25
24	4to Refresco	15	4,29
26		14	4,27
27		13,5	4,28
28		12,5	4,29
30		11,9	4,3
32		11,5	4,28
33		11	4,32
35		10,7	4,32
35	5to Refresco	14	4,31
38		13,2	4,3
40		11,8	4,3
42		9,2	4,3
44		8	4,31

Tabla 3.7: Resultados obtenidos para siete refrescos.

7 REFRESCOS	Refrescos	Brix	Ph
Intervalos de tiempo (h)			

0	1er Refresco	14	3,94
1		12,5	3,98
1		11,9	4
2		11	3,77
4		10,6	3,98
6		10	3,96
6	2do Refresco	13,5	4,3
8		12,8	4,38
9		12,1	4,33
11		11,4	4,33
12		10,9	4,34
13		9,6	4,33
13	3cer Refresco	14	4,36
16		12,5	4,29
18		12	4,27
19		11	4,24
20		10,6	4,23
22		10,5	4,24
23		10,2	4,25
25		9,6	4,26
25	4to Refresco	13	4,32
26		12,7	4,27
27		11,9	4,28
30		11,4	4,27
32		11	4,28
34		10,5	4,29
35		9,6	4,28
35	5to Refresco	13,3	4,33
37		12	4,29
39		11,9	4,29
42		11,5	4,29
44		10,5	4,31
45		9,8	4,32
45	6to Refresco	12,6	4,33
49		12	4,32
52		11,2	4,31
56		10,5	4,32
58		9,2	4,31
58	7mo Refresco	12,9	4,34
61		12	4,31

62		10,8	4,3
64		9,6	4,1
67		8,1	4,1

Tabla 3.8: Resultados obtenidos para ocho refrescos.

8 REFRESCOS			
Intervalos de tiempo (h)	Refrescos	Brix	Ph
0	1er Refresco	13	3,85
1		12	3,91
1		11,5	3,92
2		11,3	3,78
4		10,5	3,92
6		9,5	3,87
6	2do Refresco	13,8	4,29
9		12,9	4,31
11		12,1	4,3
12		11,3	4,38
13		10,5	4,25
15		9,8	4,17
15	3cer Refresco	14	4,35
18		12,2	4,3
19		12	4,23
21		10,8	4,18
22		10,3	4,18
23		10,5	4,19
25		10	4,21
26		9,9	4,25
26	4to Refresco	13	4,29
27		12,4	4,24
28		11,6	4,24
30		11	4,23
32		10,7	4,23
33		10	4,25
35		9,6	4,25
35	5to Refresco	12,6	4,27
38		12	4,26
40		11,5	4,26
42		10,5	4,29
44		10	4,27
47		9,2	4,29

47	6to Refresco	12,6	4,3
49		12	4,27
52		10,5	4,26
56		9,7	4,29
60		9	4,31
60	7mo refresco	13,6	4,34
66		11,5	4,31
69		10,6	4,34
72		9,7	4,34
72	8vo refresco	13,5	4,3
73		12,2	4,2
75		10,3	4,1
78		8	4,1

Tabla 3.9: Resultados obtenidos para nueve refrescos.

9 REFRESCOS			
Intervalos de tiempo (h)	Refrescos	Brix	Ph
0	1er Refresco	12,5	4,04
1		11,5	3,82
1		10,5	3,83
2		10	3,83
4		9,5	3,87
6		8,8	3,84
6	2do Refresco	12,6	4,22
9		11,8	4,23
11		11,1	4,23
12		10,2	4,25
13		9,9	4,25
15		9,6	4,25
15	3cer Refresco	13,5	4,3
18		12,2	4,21
19		12	4,25
21		10,5	4,15
22		9,5	4,13
22	4to Refresco	12,3	4,19
23		12	4,18
25		11,5	4,17
26		11,5	4,18
28		10,6	4,19

29		10,5	4,21
31		10	4,22
33		9,5	4,21
34		8,9	4,23
34	5to Refresco	12,5	4,27
35		11,5	4,26
37		11,5	4,23
40		10,2	4,24
42		10	4,26
44		9,9	4,26
45		9,5	4,27
45	6to Refresco	12	4,29
47		11,5	4,27
49		10,8	4,27
52		10,2	4,27
57		9,3	4,28
59		8,7	4,26
59	7mo refresco	12,7	4,32
64		11,6	4,3
71		9,3	4,2
71	8vo refresco	14	4,32
75		13,2	4,3
77		11,1	4,1
78		10,2	4,1
79	9no refresco	13,5	4,3
82		11,6	4,25
84		9,5	4,21
87		8	4,13