

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA**

TITULO DEL PROYECTO

Evaluación de las condiciones de la fermentación
alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y jugo de
caña de azúcar como sustrato para obtener etanol.

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

HERNÁN OSWALDO NIETO GALARZA

SANGOLQUI, DICIEMBRE DE 2009

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADOR POR

HERNÁN OSWALDO NIETO GALARZA

COORDINADOR DE LA CARRERA

SR. ING. RAFAEL VARGAS

SECRETARIO ACADÉMICO

DR. MIGUEL RAMIREZ

Sangolqui, Diciembre de 2009.

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por el **Sr. HERNÁN OSWALDO NIETO GALARZA** como requerimiento parcial a la obtención del título de **Ingeniero en Biotecnología**.

Sangolqui, Diciembre de 2009

Ing. Pablo Araujo
Director

Ing. Marco Taipe
Codirector

REVISADO POR

DEDICATORIA

A mis padres,
mis hermanos,
y en especial a mi familia
Sara y Martín.

Hernán Nieto

AGRADECIMIENTO

A mis padres quienes me han apoyado siempre, mis profesores el Ing. Pablo Araujo y el Ing. Marco Taipe quienes dedicaron su tiempo para colaborarme con la ejecución de este proyecto y en especial a la Universidad Estatal de Bolívar quien a través de Ing. Gabriel Galarza quien me apoyo con la ejecución del mismo.

Hernán Nieto

Índice de Contenidos

PARTE INTRODUCTORIA

Hoja título o carátula	i
Legalización del proyecto	ii
Certificación del director y codirector	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimiento	v
Índice de contenidos	vi
Listado de Tablas	x
Listado de Cuadros	xiii
Listado de Figuras	xiv
Listado de Anexos	xvii
Resumen	xviii
Abstract	xix

CUERPO DE LA TESIS

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema	1
1.3 Objetivos de la investigación	2
1.3.1 Objetivo General	2
1.3.2 Objetivo Específico	2
1.4 Marco Teórico	3
1.4.1 La caña de azúcar	3
1.4.1.1 Taxonomía	3
1.4.1.2 Aspectos Botánicos	3
1.4.1.2.1 Raíz	4
1.4.1.2.2 Tallo	4
1.4.1.2.3 Hoja	5
1.4.1.2.4 Inflorescencia	6
1.4.1.3 Requerimientos climáticos y edáficos	7
1.4.1.4 Maduración	7
1.4.1.5 Composición química de la caña de azúcar	8
1.4.2 Levaduras	11
1.4.2.1 Introducción	11
1.4.2.2 Clasificación de las levaduras	12
1.4.3.2 Morfología de las levaduras	12
1.4.2.3.1 Forma y tamaño	12
1.4.2.3.2 Estructura celular	13
1.4.2.4 Fisiología de las levaduras	13
1.4.2.4.1 Requerimientos nutricionales	13
1.4.2.5 Liberación de energía en los sistemas biológicos	15
1.4.2.5.1 Fermentación	15
1.4.2.5.1.1 Fermentación de la glucosa: oxidación y producción de ATP	16

1.4.2.5.1.2 Fermentación de la glucosa: etapa reductora	17
1.4.2.5.1.3 Fermentación de la glucosa: resultados netos y prácticos	18
1.4.2.5.2 Fermentación discontinua	19
1.4.2.5.3 Condiciones que deben medirse y controlarse en una fermentación discontinua	20
1.4.2.5.3.1 Temperatura	20
1.4.2.5.3.2 pH	20
1.4.2.5.3.3 °Brix	21
1.4.2.5.3.4 Aireación	21
1.5 Sistema de hipótesis o pregunta de investigación	21
CAPITULO 2: MATERIALES Y METODOS	22
2.1 Ubicación y diseño de la investigación	22
2.2 Sustrato utilizado	22
2.3 Levadura utilizada	22
2.4 Adaptación de la levadura	22
2.4.1 Hidratación de la levadura activa seca (LAS)	23
2.4.2 Preparación del sustrato para la adaptación	23
2.4.3 Pruebas de fermentación	23
2.4.4 Recuperación de la levadura	23
2.4.5 Conservación de la levadura	24
2.5 Evaluación de las condiciones de pH, °Brix y temperatura en que se lleva la fermentación	24
2.5.1 Preparación de solución amortiguadoras	25
2.5.2 Determinación de azúcares reductores como glucosa	25
2.5.2.1 Fundamento	25
2.5.2.2 Principio de la reacción	26
2.5.2.3 Características de la prueba	26
2.5.2.4 Método usado para determinar azúcares reductores como glucosa	26
2.5.2.5 Procedimiento realizado para determinar la concentración de glucosa en gr/L de las muestras obtenidas del proceso de fermentación	27
2.5.3 Evaluación de las condiciones de pH, °Brix y temperatura en que se lleva la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA)	28
2.5.3.1 Hidratación de la levadura activa seca (LAS) a pH 5,7, 4,7 y 3,7	28
2.5.3.2 Preparación del inóculo a pH 5,7, 4,7 y 3,7	29
2.5.3.3 Preparación del sustrato a pH 5,7, 4,7 y 3,7	29
2.5.3.4 Pruebas de fermentación	30
2.5.3.5 Recuperación de la levadura	31
2.5.3.6 Conservación de la levadura	31
2.5.3.7 Método de destilación	31
2.5.3.7.1 Método para determinar el grado alcohólica	31
2.6 Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) con la adición de	32

tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas	
2.6.1 Hidratación de la levadura activa seca (LAS)	32
2.6.2 Preparación del inóculo	33
2.6.3 Preparación del sustrato	33
2.6.4 Pruebas de fermentación	34
2.6.5 Recuperación de la levadura	35
2.6.6 Conservación de la levadura	35
2.6.7 Método de destilación	35
2.7 Evaluación de la cantidad de inóculo por litro de sustrato en el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA)	35
2.7.1 Hidratación de la levadura activa seca (LAS)	36
2.7.2 Preparación del inóculo	36
2.7.3 Preparación del sustrato	37
2.7.4 Pruebas de fermentación	37
CAPITULO 3: RESULTADOS	38
3.1 Adaptación de la levadura	38
3.1.1 Preparación del inóculo	38
3.1.2 Pruebas de fermentación	38
3.1.3 Conservación de la levadura	43
3.2 Evaluación de las condiciones de pH, °Brix y temperatura en que se llevo la fermentación alcohólica	43
3.2.1 Preparación de soluciones amortiguadoras	43
3.2.2 Determinación de azúcares reductores como glucosa	44
3.2.3 Evaluación de las condiciones de pH, °Brix y temperatura en que se llevo la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA)	45
3.2.4 Análisis estadístico de la evaluación de las condiciones de pH, °Brix y temperatura en que se llevo a cabo la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS)	46
3.2.5 Análisis estadístico de la evaluación de las condiciones de pH, °Brix y temperatura en que se llevo la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA)	57
3.3 Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas	67
3.3.1 Análisis estadístico de la evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas	68
3.3.2 Análisis estadístico de la evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas	78
3.4 Evaluación de la cantidad de inóculo por litro de sustrato en el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA)	87
3.4.1 Análisis estadístico para el número de °Brix disminuidos al evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS)	88

3.4.2 Análisis estadístico para el número de °Brix disminuidos al evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA)	91
CAPITULO 4: DISCUSIONES	93
CAPITULO 5: RECOMENDACIONES	110
CAPITULO 6: CONCLUSIONES	111
CAPITULO 7: BIBLIOGRAFIA	113
ANEXOS	118

Listado de Tablas

Tabla 3.1 Representación porcentual de los °Brix disminuidos en los ciclos del proceso de adaptación de la levadura	39
Tabla 3.2 Datos de la absorbancia a 546 nm obtenidos al medir la glucosa a una concentración de 1 gr/L, 0,5 gr/L, 0,25 gr/L y 0,0 gr/L	44
Tabla 3.3 Identificación de los tratamientos realizados para evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la LAS y la LA	46
Tabla 3.4 Análisis de varianza para la concentración de glucosa disminuida, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	48
Tabla 3.5 Análisis de varianza para el número de °Brix disminuidos, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	50
Tabla 3.6 Análisis de varianza para el grado alcohólico obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	52
Tabla 3.7 Análisis de varianza para el grado alcohólico, obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	54
Tabla 3.8 Análisis de varianza para la cantidad de alcohólico, obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	56
Tabla 3.9 Análisis de varianza para la concentración de glucosa disminuida, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	58
Tabla 3.10 Análisis de varianza para el número de °Brix disminuidos, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	60
Tabla 3.11 Análisis de varianza para el grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	62
Tabla 3.12 Análisis de varianza para el grado alcohólico (% Vol.) obtenido al	64

	final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	
Tabla 3.13	Análisis de varianza para la cantidad de alcohol (mL) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	66
Tabla 3.14	Identificación de los tratamientos realizados para evaluar la fermentación alcohólica por la LAS y la LA con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas	67
Tabla 3.15	Análisis de varianza para la concentración de glucosa (gr/L) disminuida, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	69
Tabla 3.16	Análisis de varianza para el número de °Brix disminuidos, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	71
Tabla 3.17	Análisis de varianza para el grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	73
Tabla 3.18	Análisis de varianza para el grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	75
Tabla 3.19	Análisis de varianza para la cantidad de alcohol (mL) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	77
Tabla 3.20	Análisis de varianza para la concentración de glucosa (gr/L) disminuida, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	79
Tabla 3.21	Análisis de varianza para el número de °Brix disminuidos, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	81
Tabla 3.22	Análisis de varianza para el grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres	83

	tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	
Tabla 3.23	Análisis de varianza para el grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	85
Tabla 3.24	Análisis de varianza para la cantidad de alcohol (mL) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	87
Tabla 3.25	Identificación de los tratamientos realizados para evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS)	88
Tabla 3.26	Identificación de los tratamientos realizados para evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en el proceso de fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA)	88
Tabla 3.27	Análisis de varianza para el número de °Brix disminuidos, al evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	90
Tabla 3.28	Análisis de varianza para el número de °Brix disminuidos, al evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009	92

Listado de Cuadros

Cuadro 1.1 Clasificación botánica de la caña de azúcar	3
Cuadro 1.2 Promedio de la composición química (%) de los tallos y el jugo de la caña de azúcar	8
Cuadro 1.3 Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12

Listado de Figuras

Figura 1.1 Sistema radicular de la caña de azúcar	4
Figura 1.2 Tallo de la caña de azúcar A) Diferenciación del tallo B) El nudo y entrenudo partes principales C) Formas del entrenudo del tallo	5
Figura 1.3 Partes de la hoja de la caña de azúcar	6
Figura 1.4 Flor de la caña de azúcar	6
Figura 1.5 Vía de Embden-Meyerhof, secuencia de reacciones enzimáticas en la conversión de la glucosa a piruvato y después a productos de fermentación.	19
Figura 2.1 Procedimiento seguido para la adaptación de la levadura	24
Figura 2.2 Procedimiento seguido para la hidratación de la levadura	28
Figura 2.3 Procedimiento seguido para la preparación del inóculo	29
Figura 2.4 Procedimiento seguido en la preparación del sustrato	30
Figura 2.5 Procedimiento seguido para las pruebas de fermentación, recuperación de la levadura y destilación	32
Figura 2.6 Procedimiento seguido en la preparación del sustrato	34
Figura 2.7 Procedimiento seguido en la hidratación de la LAS	36
Figura 2.8 Procedimiento seguido en la preparación del inóculo	36
Figura 2.9 Procedimiento seguido en las pruebas de fermentación	37
Figura 3.1 Δ °Brix y Δ pH de cada ciclo del proceso de adaptación	38
Figura 3.2 Representaciones graficas del pH y °Brix de todos los ciclos del proceso de adaptación en un periodo de 8 horas	42
Figura 3.3 Curva de valoración del ácido acético con acetato de potasio	44
Figura 3.4 Absorbancia a 546 nm determinada al medir la glucosa a una concentración de 1 gr/L, 0,5 gr/L, 0,25 gr/L y 0,0 gr/L	45
Figura 3.5 Promedio y rangos de significancia para el factor concentración de glucosa (gr/L) disminuida, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura activa seca (LAS)	47
Figura 3.6 Promedio y rangos de significancia para el factor número de °Brix disminuido, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura activa seca (LAS)	49
Figura 3.7 Promedio y rangos de significancia para el factor grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura activa seca (LAS)	51
Figura 3.8 Promedio y rango de significancia para el factor el grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura activa seca (LAS)	53
Figura 3.9 Promedio y rangos de significancia para el factor cantidad de alcohol obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la	55

	fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura activa seca (LAS)	
Figura 3.10	Promedio y rangos de significancia para el factor concentración de glucosa (gr/L) disminuida, al evaluar la fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura adaptada (LA)	57
Figura 3.11	Promedio y rangos de significancia para el factor número de °Brix disminuidos, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura adaptada (LA)	59
Figura 3.12	Promedio y rangos de significancia para el factor grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura	61
Figura 3.13	Promedio y rangos de significancia para el factor grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura adaptada (LA)	63
Figura 3.14	Promedio y rangos de significancia para el factor cantidad de alcohol (mL) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura	65
Figura 3.15	Promedio y rangos de significancia para el factor concentración de glucosa (gr/L) disminuida, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutriente a tres concentraciones distintas	68
Figura 3.16	Promedio y rangos de significancia para el factor °Brix disminuido, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutriente a tres concentraciones distintas	70
Figura 3.17	Promedio y rangos de significancia para el factor grado alcohólico (%Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas	72
Figura 3.18	Promedio y rangos de significancia para el factor grado alcohólico (%Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutriente a tres concentraciones distintas	74
Figura 3.19	Promedio y rangos de significancia para el factor cantidad de alcohol (mL) obtenido al finalizar el proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutriente a tres concentraciones distintas	76
Figura 3.20	Promedio y rangos de significancia para el factor concentración de glucosa (gr/L) disminuida, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutriente a tres concentraciones distintas	78

Figura 3.21 Promedio y rangos de significancia del factor °Brix disminuido, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutriente a tres concentraciones distintas	80
Figura 3.22 Promedio y rangos de significancia para el factor grado alcohólico (%Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutriente a tres concentraciones distintas	82
Figura 3.23 Promedio y rangos de significancia para el factor grado alcohólico (%Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutriente a tres concentraciones distintas	84
Figura 3.24 Promedio y rangos de significancia para el factor cantidad de alcohol (mL) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutriente a tres concentraciones distintas	86
Figura 3.25 Promedio y rangos de significancia para el factor número de °Brix disminuidos en 8 horas, al evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS)	89
Figura 3.26 Promedio y rangos de significancia para el factor °Brix disminuido en 8 horas, al evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA)	91
Figura 4.1 Promedio de la concentración de glucosa disminuida (gr/L), número de °Brix disminuidos y el grado alcohólico obtenido al final del proceso de fermentación al evaluar las condiciones de pH, °Brix y temperatura por: A) La levadura activa seca (LAS); B) La levadura adaptada (LA)	96
Figura 4.2 Promedio de la cantidad de alcohol y el grado alcohólico obtenido al final del proceso de destilación al evaluar la fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por: A) La levadura activa seca (LAS); B) La levadura adaptada (LA)	99
Figura 4.3 Promedio de la concentración de glucosa disminuida (gr/L), número de °Brix disminuidos y el grado alcohólico obtenido al final del proceso de fermentación al evaluar la fermentación alcohólica con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones por: A) La levadura activa seca (LAS); B) La levadura adaptada (LA)	101
Figura 4.4 Promedio de la cantidad de alcohol y el grado alcohólico obtenido al final del proceso de destilación al evaluar el proceso de fermentación alcohólica con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones por: A) La levadura activa seca (LAS); B) La levadura adaptada (LA)	106
Figura 4.5 Promedio del número de °Brix disminuidos al evaluar el proceso de fermentación alcohólica con la adición de cinco diferentes	108

cantidades de inóculo por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA)

Listado de Anexos

Anexo A Bioreactor 1 con su dispensador y termómetro	118
Anexo B Datos de pH y ° Brix del proceso de adaptación de la levadura	119
Anexo C Bioreactor 1 y 2 con sus dispensadores, termómetros y mangueras para eliminar el CO ₂	120
Anexo D Glucosa en gr/L que se consumió, ° Brix disminuido, grado alcohólico al finalizar el proceso de fermentación (% Vol. 1), grado alcohólico obtenido al finalizar el proceso de destilado simple (% Vol. 2) y cantidad de alcohol obtenido en ml al terminar el destilado simple todos los datos para la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) respectivamente	121
Anexo E Glucosa en gr/L que se consumió, ° Brix disminuido, grado alcohólico al finalizar el proceso de fermentación (% Vol. 1), grado alcohólico obtenido al finalizar el proceso de destilado simple (%Vol. 2) y cantidad de alcohol obtenido en ml al terminar el destilado simple todos los datos para la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) respectivamente.	122
Anexo F ° Brix disminuido en un periodo de 8 horas al evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) respectivamente	123
Anexo G Glucosa en gr/L que se consumió, ° Brix disminuido, grado alcohólico al finalizar el proceso de fermentación (% Vol. 1), grado alcohólico obtenido al finalizar el proceso de destilado simple (%Vol. 2) y cantidad de alcohol obtenido en mL al terminar el destilado simple todos los datos para la levadura activa ciclo corto (Lev. 1) y la levadura adaptada ciclo largo (Lev 2)	124

Resumen

El propósito de este trabajo fue evaluar la fermentación alcohólica por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* activa seca (LAS), frente a la misma levadura pero que ha provenido de un proceso de adaptación (LA), utilizando como sustrato jugo de caña de azúcar.

La adaptación de la levadura se realizó en jugo de caña de azúcar a 4.7 de pH, 20 °Brix y a una temperatura de 28 °C, este proceso se realizó en ciclos repetitivos, con lo cual se logró que la levadura se desarrolle, acople al medio por fermentar y se conserve en un medio líquido bajo condiciones controladas. El paso siguiente fue evaluar las condiciones de pH, °Brix y temperatura a la cual la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA), tienen una mejor capacidad fermentativa, para lo cual el experimento se diseñó con nueve tratamientos y tres repeticiones, los datos se analizaron en un diseño anidado cruzado y se determinó para las dos levaduras que a 3.7 de pH, 20 °Brix y a una temperatura de 22 °C tienden a tener una mejor capacidad fermentativa. Tras el proceso de evaluación de las condiciones de pH, °Brix y temperatura, se evaluó la fermentación alcohólica con la adición de urea, acetato de potasio y fosfato ácido de potasio trihidratado a 0.5 gr/L, 1.0 gr/L y 1.5 gr/L para cada nutriente. Los datos obtenidos determinaron que la adición de nutrientes independiente del tipo y su concentración, mejoran la capacidad de transformación de los azúcares a etanol, pero la levadura adaptada (LA) fue con la cual se presentó un incremento de la capacidad fermentativa al estar presente la urea. Además se evaluó la cantidad de inóculo en el proceso de fermentación para reducir el tiempo de fermentación y se comprobó que a mayor cantidad de inóculo menor es el tiempo de la fermentación.

Abstract

The purpose of this work was to evaluate the alcoholic fermentation for the yeast *Saccharomyces cerevisiae* dry active (LAS), in front of the same yeast but that it has come from a process of adaptation (LA), using as basis sugar cane juice.

The adaptation of the yeast has been made in sugar cane juice at 4.7 of pH, 20 °Brix and into a temperature of 28 °C, this process was made in repetitive cycles, with that achieve that the yeast developed, adapted to the environment to ferment and it is conserved in a liquid environment under controlled conditions. The following step was to evaluate the pH conditions, °Brix and temperature to the dry active yeast (LAS) and the adapted yeast (LA), so they have a better fermentative capacity, then the experiment has designed with nine treatments and three repetitions; the data were analyzed in a design crossed nested and it was determined for the two yeasts that to a 3.7 of pH, 20 °Brix and to a temperature of 22 °C they have a better fermentative capacity. After the process of evaluation of the pH conditions, °Brix and temperature, the alcoholic fermentation is evaluated with the urea addition, potassium acetate and acid phosphate of tri-hydrate potassium to 0.5 gr/L, 1.0 gr/L and 1.5 gr/L for each nutrient. The obtained data determined that the addition of nutrients independent of the type and their concentration, they improve the transformation capacity of sugar to ethanol, but the adapted yeast (LA) was the only that presented an increment of the fermentative capacity when urea was added. Then also it evaluated the quantity of inoculum in the process of fermentation to reduce the time of fermentation, and it was realized that to a bigger quantity of smaller inoculum lesser is time of the fermentation.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

En los últimos años, el sector cañicultor de la Provincia de Bolívar, se ha visto afectado por los precios de sus cultivos, debido a un incremento en la producción (Del Pozo, 2008). Dicho sector reviste gran importancia, no solo por su contribución al desarrollo agrícola e industrial, sino también por su capacidad para crear una fuente de empleo, además de la generación y captación de divisas y al aportar al suplemento calorífico de la dieta alimentaria (panela, azúcar morena), a la producción de alcohol (puro, pájaro azul), y con componentes alimenticios para animales (Lombeida, 2007). Este exceso en la producción ha creado la necesidad de aprovechar al máximo la materia prima para producir etanol (Galarza G, Abril 22, 2008), producto biotecnológico que se puede obtener por vía fermentativa y a través de la investigación se puede mejorar el proceso (Brock & Madigan, 1982).

1.2 Justificación del problema

Entre las tecnologías para la producción de etanol, las basadas en el jugo de caña de azúcar se vislumbra como las más prometedoras para la Provincia de Bolívar, debido a su ubicación geográfica que ha generado un incremento en la producción (Del Pozo, 2008) y sobre todo, a que esta Provincia se ha caracterizado en la producción de alcohol como es el pájaro azul (Lombeida, 2007).

En nuestros días cobra gran importancia la sustitución de los combustibles fósiles o tradicionales derivados del petróleo por otros de origen vegetal, por varias razones fundamentales, como el hecho de provenir de una fuente renovable, ser un instrumento de lucha contra el deterioro ambiental, además de ser un factor de desarrollo de la agricultura e industrias y otros beneficios (Journal Oil & Power, 2008). Durante la última década se ha desarrollado avances significativos en el desarrollo de cada una de las etapas que componen el proceso, no obstante; todavía queda oportunidad por conseguir un avance significativo en el que se

consiga aumentar el rendimiento, productividad y eficiencia y por lo tanto, a la reducción de los costos de esta tecnología (Estorla et al., 2006). Por lo que se hace necesario investigar cómo mejorar la etapa de la fermentación de los azúcares (Brock & Madigan, 1982), razón por la cual se recogió en esta tesis de grado en la que se evaluó el proceso de la fermentación alcohólica para obtener etanol, con la ejecución de este proyecto de tesis de grado se enfocó como trabaja el organismo a diferentes rangos de temperatura, °Brix y pH, con la adición de nutrientes y una cantidad de inóculo adecuada para a través de esto saber cómo incrementar la producción de etanol.

A demás de seguir avanzando en el desarrollo de la producción de etanol, los resultados obtenidos de esta investigación se están evaluando en una planta piloto con el objeto de verificar la tecnología y obtener datos útiles que permita fortalecer las debilidades que se van a encontrar y mejorar las etapas del proceso con el propósito de aumentar la unificación del proceso, reducir el número de etapas, el consumo de energía y permitir así reutilizar las diferentes corrientes generadas en el mismo, con el objeto de minimizar las necesidades de agua y reducir los efluentes (Journal Oil & Power, 2008).

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

- Evaluar las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol.

1.3.2 Objetivo Especifico

- Adaptación de la levadura comercial en jugo de caña de azúcar para ser utilizada en la fermentación alcohólica.
- Establecer rangos de pH, °Brix y temperatura en el proceso de la fermentación alcohólica para dos tipos de levadura.
- Evaluar el proceso de fermentación con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas para dos tipos de levaduras.

- Determinar la cantidad de inóculo que debe ser usado por litro de sustrato para reducir el tiempo que se demora la fermentación alcohólica.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 La caña de azúcar

La caña de azúcar es una planta monocotiledónea que pertenece a la familia de las gramíneas (Osorio, 2007).

1.4.1.1 Taxonomía

La caña de azúcar se ubica en la siguiente clasificación botánica (Osorio, 2007).

Cuadro 1.1 Clasificación botánica de la caña de azúcar.

Clasificación Botánica	
Reino	Vegetal
Tipo	Fanerógamas
Subtipo	Angiospermas
Clase	Monocotiledóneas
Orden	Glumales
Familia	Gramíneas
Tribu	Andropogoneas
Genero	Saccharum
Especie	Spontaneum y robustum (silvestres), edule, barberi, sinense y officinarum (domesticadas)

Fuente: (Osorio, 2007)

1.4.1.2 Aspectos Botánicos

Las partes básicas de la estructura de una planta, que determinan su forma, son: la raíz, el tallo, las hojas y la flor (Osorio, 2007).

1.4.1.2.1 Raíz

El sistema radicular de la caña de azúcar actúa como anclaje para la planta y para la absorción del agua y nutrientes del suelo. Su forma es tubular y está formada por la cofia, el punto de desarrollo, la región de elongación y la región de pelos radiculares. La cofia se encarga de proteger al punto de desarrollo de posibles daños mecánicos ya que las raíces están en contacto con partículas densas del suelo y con rocas (Brizuela, 2003).

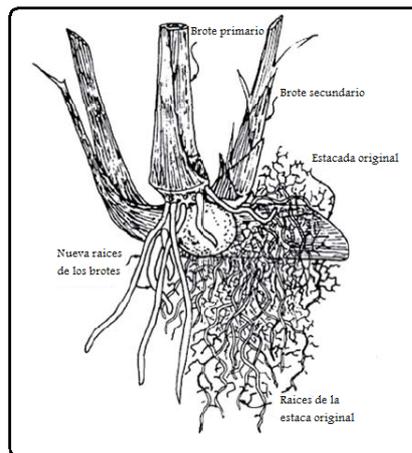


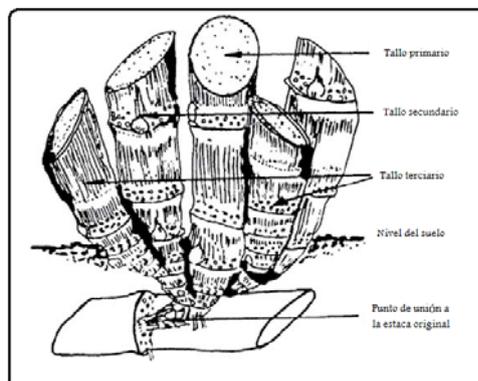
Figura 1.1 Sistema radicular de la caña de azúcar
Fuente: (Osorio, 2007)

1.4.1.2.2 Tallo

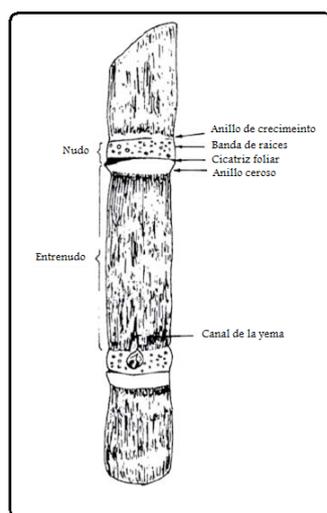
El tallo de la caña de azúcar se despliega en forma de matas, sus hábitos de desarrollo son diferentes, pero en general producen tallos de 2 a 3 m de longitud por año, formando tres canutos por mes, con un aproximado de tallos de 1 hasta 23 por macolla según la variedad, estos se dividen en primarios, secundarios y mamonos o terciarios. Los tallos sirven como tejidos de transporte de agua y nutrientes. El tallo está compuesto por: la epidermis o corteza; los tejidos y fibras que se extienden en toda la longitud del tallo, poseen aproximadamente un 75% de agua. Y está formado por dos partes diferentes que son nudos y entrenudos los que difieren o cambian con las diferentes variedades en longitud, diámetro, forma y color (Brizuela, 2003).

El tallo de la caña de azúcar se considera como el fruto agrícola, ya que en el se almacena el azúcar. El azúcar se va acumulando en los entrenudos inferiores

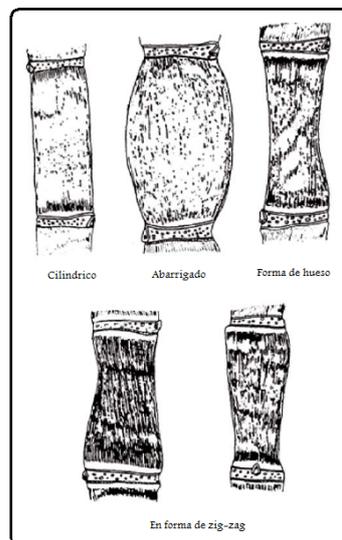
disminuyendo su concentración a medida que va ascendiendo hacia la parte superior del tallo (Brizuela, 2003).



A



B



C

Figura 1.2 Tallo de la caña de azúcar A) Diferenciación del tallo B) El nudo y entrenudo partes principales C) Formas del entrenudo del tallo.

Fuente: (Osorio, 2007)

1.4.1.2.3 Hoja

Las hojas de la caña son la fábrica donde las materias primas: agua, dióxido de carbono y nutrientes se convierten en carbohidratos por la acción de la luz del sol. Las hojas son laminas largas, delgadas que miden entre 0.90 a 1.5 m de largo y varían de 1 a 10 cm de ancho, según la variedad. La vaina que es la parte inferior de la hoja que está unida al tallo. Es de forma tubular más ancha en

la base y gradualmente se estrecha hacia la banda ligular. Las hojas están a menudo cubiertas con pelos y tienen numerosas estomas (Brizuela, 2003).

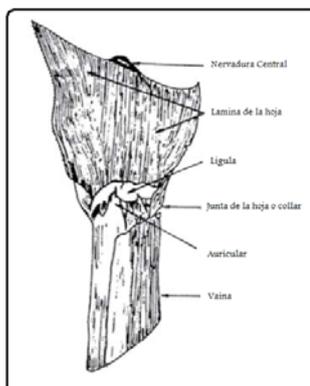


Figura 1.3 Partes de la hoja de la caña de azúcar

Fuente: (Osorio, 2007)

1.4.1.2.4 Inflorescencia

Es una panícula formada por pequeñas flores perfectas y sedosas llamadas espigas. La floración es un proceso que ocurre cuando las plantas han completado su ciclo vegetativo para iniciar el período reproductivo. No todas las variedades de caña de azúcar florecen, ya que hay factores genéticos que regulan la floración y factores ambientales que a su vez la inducen (Brizuela, 2003).

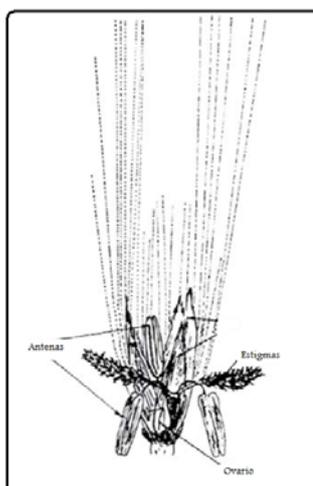


Figura 1.4 Flor de la caña de azúcar

Fuente: (Osorio, 2007)

1.4.1.3 Requerimientos climáticos y edáficos

La temperatura, la humedad y la luminosidad, son los principales factores del clima que controlan el desarrollo de la caña. La caña de azúcar es una planta tropical y se desarrolla mejor en lugares calientes y asoleados (Brizuela, 2003).

Cuando prevalecen temperaturas altas la caña de azúcar alcanza un gran crecimiento vegetativo y bajo estas condiciones la fotosíntesis se desplaza, hacia la producción de carbohidratos de alto peso molecular, como la celulosa y otras materias que constituyen el follaje y el soporte fibroso del tallo (Brizuela, 2003).

Es indispensable proporcionar una adecuada cantidad de agua a la caña durante su desarrollo vegetativo, para que permita la absorción, transporte y asimilación de los nutrientes. La luz juega un papel muy importante, como principal fuente de energía de la caña de azúcar en el almacenamiento de la sacarosa. A menor luminosidad menor almacenamiento de azúcares (Brizuela, 2003).

1.4.1.4 Maduración

Es un proceso metabólico durante el cual la planta suspende su crecimiento y comienza a almacenar en el tallo energía en forma de sacarosa. Las condiciones óptimas para su maduración son: poca lluvia, temperatura fresca y bastante luminosidad (Brizuela, 2003).

Para determinar el punto óptimo de cosecha de la caña de azúcar es necesario dar un seguimiento a las manifestaciones tanto externas como internas de la planta. Dentro de las manifestaciones externas se puede mencionar el acortamiento de entrenudos en el cogollo, cese del crecimiento, presencia de hojas amarillas delgadas y quebradizas, tallos desprendiendo cerosina, brotación de yemas y formación de medula corchosa en la parte superior del tallo. En cuanto a las manifestaciones internas tenemos el contenido de humedad de algunos de los tejidos, el brix, el contenido de sacarosa del mismo (Brizuela, 2003).

La cosecha tiene como meta entregar tallos de caña de azúcar de buena calidad, medida por el contenido de sacarosa, para esto se debe cortar las puntas o cogollos en la operación de recolección, ya que las puntas y las hojas de la caña, contienen poca sacarosa disminuyendo el rendimiento de azúcar, la punta

se elimina de manera efectiva por el corte a mano que es el método de recolección escogido (Brizuela, 2003).

1.4.1.5 Composición química de la caña de azúcar

Los tallos corresponden a la sección anatómica y estructural de la caña de azúcar, que presenta mayor valor económico e interés para la fabricación de alcohol, motivo por el cual su composición química reviste especial significado (Chávez, 2004).

En términos generales, la composición química de la caña de azúcar es el resultante de la integración e interacción de varios factores que intervienen en forma directa e indirecta sobre sus contenidos, variando los mismos entre lotes, localidades, regiones, condiciones del clima, variedades, edad de la caña, estado de madurez de la plantación, grado de despunte del tallo, manejo incorporado, periodos de tiempo evaluados, características físico-químicas y microbiológicas del suelo, grado de humedad (ambiente y suelo), fertilización aplicada, entre muchos otros factores (Chávez, 2004).

Cuadro 1.2 Promedio de la composición química (%) de los tallos y el jugo de la caña de azúcar.

Constituyentes Químicos	Porcentaje
En los tallos	
Agua	73 – 76
Sólidos:	24 – 27
• Sólidos solubles (Brix)	10 – 16
• Fibra (Seca)	11 – 16
En el jugo	
Azucares:	
• Sacarosa	75 – 92
• Fructosa	70 – 88
• Glucosa	2 – 4
Sales:	

• Inorgánico	3,0 – 3,4
• Orgánico	1,5 – 4.5
Ácidos orgánicos	1 – 3
Aminoácidos	1,5 – 5,5
Otros no azúcares:	
• Proteínas	0,5 – 0,6
• Almidones	0,001 – 0,050
• Gomas	0,3 – 0,6
• Ceras, grasas	0,15 – 0,50
• Compuestos fenólicos	0,10 – 0,80

Fuente: (Chávez, 2004)

En el Cuadro 1.2 se demuestra que la caña de azúcar el contenido de agua representa entre el 73 y el 76%. Los sólidos solubles totales (brix % Caña) fluctúan entre 10% y 16%, y la fibra (% de caña) varía entre 11% y 16%. Entre los azúcares más simples se encuentran la glucosa y la fructuosa (Azúcares Reductores), que existen en el jugo de caña con grado avanzado de madurez en una concentración entre 1% y 5% (Chávez. 2004).

Además de los azúcares contenidos en el jugo, existen también otros constituyentes químicos de naturaleza orgánica e inorgánica, representados por sales de ácidos orgánicos, minerales, polisacáridos, proteínas y otros no azúcares. La calidad de los jugos afecta el procesamiento de la caña y la recuperación de la sacarosa (Chávez, 2004).

Según Chávez (2004) para muchos tecnólogos y especialistas, la caña como materia prima se constituye fundamentalmente de fibra y jugo, donde:

$$\text{CAÑA} = \text{JUGO} + \text{FIBRA}$$

$$\text{CAÑA} = \text{FIBRA} + \text{SÓLIDOS SOLUBLES (BRUX)}$$

Bajo este criterio la fibra es la parte formada por celulosa, la que a su vez se compone de azúcares simples como la glucosa (Dextrosa). A los sólidos solubles en agua expresados como porcentaje y representados por la sacarosa, los azúcares reductores y otros componentes, comúnmente se les conoce como

La glucosa es un componente normal de la caña de azúcar en cualquier fase de desarrollo de la planta, encontrándosele en el jugo en mayor o menor cantidad. La fructuosa o levulosa se encuentra en mayores concentraciones en cañas que aún no alcanzan su madurez fisiológica y disminuye conforme este estado avanza y la planta madura (Chávez, 2004).

Es importante destacar que no existe diferencia ni selectividad en los criterios agroindustriales que tipifican una caña como idónea para producir alcohol, respecto a otra destinada a la fabricación de azúcar, puesto que toda caña que posea una alta concentración de sacarosa es buena para producir alcohol. No resulta inclusive limitante que la pureza (%) del jugo (Relación Sacarosa/Brix) sea baja, puesto que en la obtención del alcohol lo que interesa es el contenido (%) de Azúcares Fermentables Totales (AFT) o Azúcares Reductores Totales (ART). Esta condición tan particular y especial de la materia prima, amplía significativamente las zonas idóneas y con potencial para sembrar caña de azúcar destinada a la producción de alcohol (Chávez, 2004).

1.4.2 Levaduras

1.4.2.1 Introducción

Se les denomina levaduras a un grupo de hongos unicelulares cuya actividad ha sido siempre de gran importancia, estos organismos son abundantes especialmente en donde existe la presencia de azúcares (Burdon & Willians, 1971). Las levaduras son de forma esférica, ovalada o cilíndrica y en general la división celular se lo lleva a cabo por gemación (Brock & Madigan, 1982).

Las levaduras no forman filamentos ni micelio y las células de levadura permanecen como una colección de células solas (Brock & Madigan, 1982), por lo que se destacan como células individuales (Burdon & Willians, 1971). Algunas levaduras se reproducen sexualmente a lo que se conoce como apareamiento, en la cual dos células se fusionan (Brock & Madigan, 1982).

1.4.2.2 Clasificación de la levadura

La *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más conocida y de importancia industrial ya que es la especie de levadura utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial debido a que es un organismo de fácil manipulación y de recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajas concentraciones de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclaje y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior (Fajardo & Sarmientos, 2007). La clasificación taxonómica se describe a continuación:

Cuadro 1.3 Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Reino	Hongo
División	Amastogomycota
Clase	Ascomycetes
Subclase	Hemiascomycetidae
Orden	Endomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Subfamilia	Saccharomycetidae
Genero	Saccharomyces
Especie	Cerevisiae

Fuente: (Fajardo & Sarmientos, 2007)

1.4.2.3 Morfología de la levadura

1.4.2.3.1 Forma y tamaño

Son esféricas, elípticas y cilíndricas su tamaño varía notablemente pero el diámetro de la *Saccharomyces cerevisiae* oscila de 2 a 8 micras (Carpenter, 1969).

1.4.2.3.2 Estructura celular

Una célula de levadura está incluida en una pared celular y por una membrana citoplasmática en la que contiene un núcleo, una vacuola y numerosos gránulos y glóbulos de grasa. No contiene flagelos u otros órganos de locomoción. La pared celular está integrada por polímeros de glucosa y manosa, con cantidades pequeñas de proteínas, lípidos y quitina (Herdoisa, 2006).

1.4.2.4 Fisiología de las levaduras

1.4.2.4.1 Requerimientos nutricionales.

Los nutrientes son sustancias que después de pasar por la membrana celular se emplean como material sintético o para que la célula obtenga energía. Las levaduras necesitan los mismos elementos químicos que otros seres vivos como es el carbono, hidrogeno, oxígeno, nitrógeno, fosforo, potasio, azufre, magnesio, hierro, zinc, manganeso, cobre y molibdeno. Los últimos cinco elementos se necesitan en cantidades mínimas como componentes o activadores de enzima (Carpenter, 1969).

La concentración de nutrientes puede afectar tanto a la velocidad de crecimiento, como al rendimiento del crecimiento del organismo. El efecto de la concentración de nutrientes sobre la producción de células es fácil de comprender: si el nutriente se convierte en material celular, cuanto más nutriente haya, mayor será la producción de células. La razón para reducir la velocidad de crecimiento a concentraciones muy bajas de nutriente, es porque no se puede transportar ese nutriente al interior de la célula con suficiente rapidez para satisfacer las demandas metabólicas del nutriente y la velocidad de crecimiento es proporcional a la concentración de dichos nutrientes; sin embargo, a estas concentraciones bajas, el nutriente es utilizado para la proliferación (Brock & Madigan, 1982).

Los principales nutrientes y las formas más comunes de satisfacerlos son:

1. **Carbono.**- Los compuestos son considerados a la vez como fuente de energía y como fuente de carbono por *Saccharomyces cerevisiae* ya que necesita D-azúcares como hexosa, glucosa, fructosa,

manosa, porque los L-azúcares pueden ser considerados como no fermentables por este organismo (Gamazo et al., 2005)

2. **Nitrógeno.**- Este elemento es un constituyente importante en los medios de cultivos para promover el crecimiento, ya que está representado en un 10% del peso de las levaduras. *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de utilizar este elemento en forma de ión amonio. Estos iones pueden ser aportados por el cloruro de amonio, nitrato de amonio, fosfato de amonio y el sulfato de amonio. Otra fuente de amonio son los aminoácidos, dipéptidos, tripéptidos y la urea (Carballo, 2000).
3. **Fosforo.**- Es esencial para el crecimiento, regula la síntesis de los lípidos y los carbohidratos y mantiene la integridad de la pared celular. El fósforo es asimilado por la célula en forma de ion fosfato (H_2PO_4^-). La fuente de fósforo en el medio de cultivo está constituido por el dihidrogenofosfato de potasio o por el dihidrogenofosfato disódico (Carballo, 2000).
4. **Azufre.**- Constituye el 0.4% del peso seco de la levadura. La fuente de amonio es el sulfato de amonio, el sulfito y el tiosulfito; la metionina puede ser utilizada como fuente única de azufre y permite un crecimiento más rápido que los iones sulfatos (Carballo, 2000).

Los macronutrientes son K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn, Cl. Se requiere en concentraciones de 0.1 a 1 mM.

1. **Potasio.**- A pH ácido estimula la fermentación y la respiración, actúa como efector de numerosas enzimas; piruvato quinasa, aldolasas, aldehídos deshidrogenasas, y permeasas e interviene en la estructura de los ARN. Las fuentes de potasio son el cloruro de potasio y los fosfatos mono y dipotásico (Carballo, 2000).
2. **Magnesio.**- Es activador de las enzimas glucolíticas, estimula la síntesis de los ácidos grasos, regula las ATPasas de la membrana y

participa con el potasio en la penetración del fosfato. El magnesio es aportado en los medios de cultivos en forma de sulfato o de cloruro de magnesio (Carballo, 2000).

Los micronutrientes son Co, B, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni y Va. Se requiere en concentraciones de 0.1 a 100 uM. Los micronutrientes pueden actuar como inhibidores, las cuales pueden afectar el crecimiento cuando se encuentra a concentraciones superiores a 100 uM. Hg, Ag, Ar, Ba, Li, Ni, Os, Pb, Se, Te (Gamazo et al., 2005).

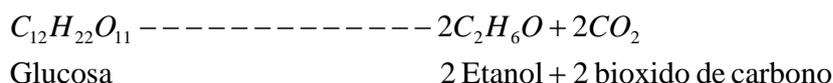
1.4.2.5 Liberación de energía en los sistemas biológicos

Las series de reacciones que comprende la oxidación de un compuesto se denomina vía bioquímica. Las vías para la oxidación de los compuestos orgánicos y la conservación de la energía en el ATP se puede dividir en dos procesos principales: 1) Fermentación, en el cual el proceso de oxido reducción se efectúa en ausencia de cualquier aceptor terminal de electrones; 2) Respiración, en el cual el oxígeno molecular o cualquier otro oxidante actúa como el aceptor oxidante de electrones (Brock & Madigan, 1982).

1.4.2.5.1 Fermentación

“En ausencia de aceptor de electrones, muchos organismos efectúan reacciones redox balanceadas de algunos compuestos orgánicos, con liberación de energía. Este proceso se llama fermentación. Existen muchos tipos diferentes de fermentación, pero en procesos fermentativos solamente se efectúan una oxidación parcial de los átomos de carbono del compuesto orgánico y, por consiguiente una pequeña cantidad de energía se libera. La oxidación en una fermentación esta acoplada a la reducción posterior de un compuesto orgánico generado a partir del catabolismo del sustrato inicial fermentable; así, no se requiere un aceptor de electrones suministrado exteriormente” (Brock & Madigan, 1982, p. 109).

El ATP se produce en las fermentaciones en un proceso que se llama fosforilización a nivel de sustrato, en la que el ATP se sintetiza durante etapas enzimáticas específicas en el catabolismo del compuesto orgánico. Un ejemplo de fermentación es el catabolismo de la glucosa por levaduras en ausencia de oxígeno (Brock & Madigan, 1982).



En esta reacción parte de los átomos de carbono terminan en CO₂, una forma más oxidada que la de los átomos de carbono de la molécula que partió, mientras que los otros átomos de carbono terminan en etanol, que es más reducido que la glucosa (Brock & Madigan, 1982).

La energía liberada en la reducción de la glucosa a etanol es – 238.8 KJ/mol se conservar por fosforilaciones a nivel de sustrato en forma de enlaces fosfato de alta energía en el ATP, con una producción neta de dos de estos enlaces. Explicaremos las etapas bioquímicas comprendidas en la fermentación de la glucosa a etanol y la forma en que parte de la energía liberada se conserva en enlaces fosfato de alta energía (Brock & Madigan, 1982).

1.4.2.5.1.1 Fermentación de la glucosa: oxidación y producción de ATP

La degradación de la glucosa se la puede dividir en tres etapas (Ver Figura 1.5): La etapa I es una serie de reacciones de re-acomodación que no implica oxidación-reducción y no se libera energía, pero que conducen a la producción de dos moléculas de un compuesto intermedio, el gliceraldehido-3-fosfato. En la etapa II hay oxido-reducción, se produce un enlace fosfato alto en energía en forma de ATP y se forman dos moléculas de piruvato. En la etapa III, ocurre una segunda reacción de oxido-reducción y se forman los productos de fermentación (etanol y CO₂). La vía metabólica de la glucosa a piruvato se llama glucolisis (ruptura de la glucosa) que se llama vía de Embder-Meyerhof, por su descubridor (Brock & Madigan, 1982).

“Inicialmente la glucosa es fosforilada por el ATP produciendo glucosa-6-fosfato, este se convierte en un isómero, y una segunda fosforilación conduce a la formación fructosa-1,6-difosfato, que es el producto intermedio. La enzima aldosa cataliza la división de la fructosa-1,6-difosfato en dos moléculas de tres carbonos, el gliceraldehido-3-fosfato y su isómero la dihidroxiacetona fosfato. Hasta el momento no habido reacciones de oxido-reducción; todas las reacciones, incluyen el consumo de ATP, han procedido sin transferencia de electrones. La única reacción de oxidación de la glucólisis ocurre en la conversión del gliceraldehido-3-fosfato al ácido 1,3-difosfoglicérico. En esta reacción (que ocurre dos veces una que cada molécula), una enzima que actúa en la coenzima NAD^+ acepta dos átomos de hidrogeno y se convierte en NADH. Simultáneamente cada molécula de gliceraldehido-3-fosfato se fosforila por adición de una molécula de fosfato inorgánico se ha convertido en orgánico, sienta las bases para el siguiente, el paso en el cual el ATP es formado realmente. La formación de enlaces de alta energía es posible debido a cada uno de los fosfatos de una molécula de ácido 1,3- difosfoglicérico representa un enlace fosfato de alta energía. La síntesis del ATP tiene lugar cuando cada molécula de ácido 1,3- difosfoglicérico, se convierte en ácido 3-fosfoglicérico, y posteriormente, en la vía, cuando cada molécula de fosfoenolpiruvato se convierte en piruvato” (Brock & Madigan, 1982, p. 110).

“En la glucólisis se consumen dos moléculas de ATP en las dos fosforilaciones de la glucosa y se sintetizan cuatro de ATP (dos moléculas a partir de cada ácido 1,3-difosfoglicérico que se convierte en piruvato). Así, la ganancia neta para el organismo es de dos moléculas de ATP por molécula de glucosa fermentada” (Brock & Madigan, 1982, p. 110).

1.4.2.5.1.2 Fermentación de la glucosa: etapa reductora

“Durante la formación de las dos moléculas de ácidos 1,3- difosfoglicérico se redujeron dos NAD^+ a NADH (Ver Figura 1.5). Sin embargo la célula tiene un suministro ilimitado de NAD^+ , y si todo se convierte en NADH, se detendría la oxidación de la glucosa; la oxidación continuada el gliceraldehido-3-fosfato sólo puede proceder si hay una molécula de NAD^+ que puede aceptar los electrones

liberados. Este impedimento se salva en la fermentación por la reoxidación de NADH a NAD⁺ a través de las reacciones que incluyen la reducción del piruvato a los diversos productos de la fermentación, en el caso de la levadura, el piruvato se reduce a etanol con liberación de CO₂ (Brock & Madigan, 1982, p. 110)". Existen muchas rutas para reducir el piruvato pero el resultado es el mismo; el NADH debe regresar a la forma oxidada NAD⁺ para que las reacciones productoras de energía la fermentación continúen. Como una coenzima difusible, el NADH se puede separar de la enzima que oxida al gliceraldehído-3-fosfato, unirse a una enzima que reduzca el piruvato a ácido láctico, y difundirse de nuevo para continuar la conversión a NAD⁺ a fin de repetir una vez más el ciclo" (Brock y Madigan, 1982).

"En cualquier proceso que produzca energía, la reacción debe balancear la reducción y debe haber un aceptor de electrones por cada electrón eliminado. En este caso, la reducción del NAD⁺ en una etapa enzimática se acopla con otra. El producto final debe estar en equilibrio de oxidación-reducción con el sustrato inicial, la glucosa. Por esto, el etanol y el CO₂ están en equilibrio eléctrico con la glucosa" (Brock & Madigan, 1982, p. 112).

1.4.2.5.1.3 Fermentación de la glucosa: resultados netos y prácticos.

El resultado último de la glucólisis es el consumo de la glucosa, la síntesis neta de dos ATP y la formación de productos de fermentación. Para el organismo el producto crucial es el ATP, el cual se utilizan en una amplia variedad de materiales en el cual requieren energía y los productos de fermentación son meramente productos de desecho (Brock & Madigan, 1982).

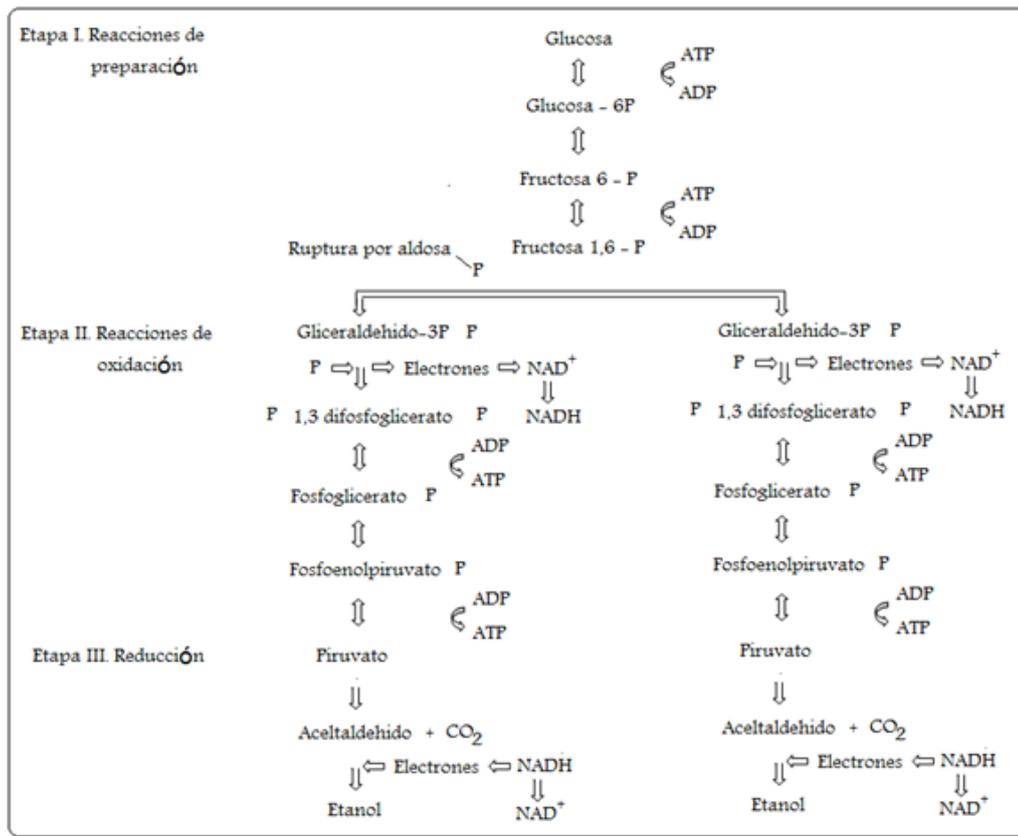


Figura 1.5 Vía de Embden-Meyerhof, secuencia de reacciones enzimáticas en la conversión de la glucosa a piruvato y después a productos de fermentación.

Fuente: (Brock & Madigan, 1982)

1.4.2.5.2 Fermentación discontinua

Llamados también procesos “Batch” o lote, son de gran importancia dentro de la biotecnología y son de gran uso industrial. Las técnicas en que se llevan el proceso va a depender de que el proceso sea aerobio o anaerobio (Doran, 1998).

Un proceso discontinuo o “Batch” puede considerarse como un sistema cerrado. A tiempo cero, la solución esterilizada de nutrientes se inocula con microorganismos y se permite que se lleve a cabo la fermentación en condiciones óptimas. A lo largo de la fermentación no se adiciona nada, excepto ácidos o bases para controlar el pH. La composición del medio, la concentración de sustrato, la concentración de biomasa y la concentración de metabolitos cambia continuamente como resultado del metabolismo de la célula (Doran, 1998).

1.4.2.5.3 Condiciones que deben medirse y controlarse en una fermentación discontinua

Una vez que el sustrato y el organismo han sido seleccionados es necesario darles las condiciones adecuadas de operación y optimización del sistema (Doran, 1998). Desde el punto de operación es importante decidir las siguientes variables: temperatura, pH, brix, nutrientes y productividad entre otras. Una de estas variables se mide de manera continua y otras intermitentemente. Las variables que se puede medir de manera continua son: temperatura, pH, brix, nutrientes y las variables que se puede medir de manera intermitente son: biomasa, producto y consumo de sustrato (Fajardo & Sarmientos, 2007).

1.4.2.5.3.1 Temperatura

La temperatura ejerce un marcado efecto sobre la velocidad metabólica del organismo. La temperatura tiene una influencia directa sobre la velocidad de reacción y esta puede cambiar la configuración de los constituyentes celulares, especialmente de las proteínas y de los componentes de la membrana (Doran, 1998). La temperatura optima de crecimiento de las levaduras especialmente de la *Saccharomyces cerevisiae* es de 30 a 35°C. La temperatura afecta al organismo de manera notable ya que los organismos de una especie dada solo pueden crecer en un rango de temperatura y esto afecta de manera notable al organismo (Fajardo & Sarmientos, 2007).

1.4.2.5.3.2 pH

La acidez o alcalinidad de una solución se expresa por su índice de pH en una escala de 0 a 14. Es importante recordar que el pH es una función logarítmica, un cambio en una unidad de pH representa un cambio de diez veces en la concentración de iones hidrogeno (Brock & Madigan, 1982). El pH tiene un marcado efecto en la velocidad de crecimiento y en el rendimiento. El pH óptimo para algunos organismos en especial para las levaduras se encuentra en un rango de 4.0 a 6.0. Un cambio en el valor de pH puede afectar su composición o su naturaleza de la superficie microbiana al disociarse ácidos y bases. Este último

puede afectar la floculación de la biomasa o la adhesión a las paredes. El pH tiene una gran influencia en los productos finales del metabolismo anaerobio (Fajardo & Sarmientos, 2007).

1.4.2.5.3.3 °Brix

El °Brix o grados Balling es otra escala del hidrómetro utilizada en la industria azucarera. Normalmente las escalas brix se calibran a 15.6 a 20°C. Con la escala a 20°C, cada °Brix indica 1 gramo de sacarosa por cada 100 gr de líquido (Doran, 1998).

1.4.2.5.3.4 Aireación

La ausencia o abundancia de oxígeno permite una selección tanto de microorganismo como de productos metabólicos. Cuando el cultivo se produce en presencia de oxígeno molecular, la fermentación se denomina fermentación aeróbica y cuando se realiza en ausencia de oxígeno molecular se denomina anaeróbica. Si la fermentación es anaeróbica, la mayor parte del carbono se emplea como energía y solo el 2% se asimila como material celular. *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura que posee alta actividad metabólica, por lo que en un proceso fermentativo en base aeróbica se caracteriza por la producción de biomasa y en base anaeróbica generalmente por la producción de etanol (Fajardo & Sarmientos, 2007).

1.5 Sistema de hipótesis o pregunta de investigación:

El proceso de fermentación evaluado a diferentes rangos de temperatura, pH, °Brix, con la adición de nutrientes y complementando con una cantidad de inóculo correcta presentó buen rendimiento, fue eficiente y productivo en el proceso de transformación de los azúcares reductores a etanol por parte de la levadura.

CAPITULO 2: MATERIALES Y METODOS

2.1 Ubicación y diseño de la investigación.

Los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo en el Laboratorio General de la Universidad Estatal de Bolívar, que se encuentran ubicados en la Ciudad de Guaranda, Sector Aguacoto.

Dentro de la investigación realizada se distinguen cuatro etapas: 1) Adaptar a la *Saccharomyces cerevisiae* activa seca. 2) Establecer rangos de pH, °Brix y temperatura en el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) obtenida de la etapa anterior. 3) Evaluar el proceso de fermentación alcohólica con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) obtenida de la primera etapa y 4) Determinar la cantidad de inóculo por litro de sustrato para reducir el tiempo de fermentación por la LAS y la LA.

La fermentación se realizó en un sistema de fermentación por lotes.

2.2 Sustrato utilizado.

Se usó jugo de la caña de azúcar como sustrato. La caña de azúcar que se usó para obtener el jugo se obtuvo de los cañicultores del sub-trópico de la Provincia de Bolívar.

2.3 Levadura utilizada.

Para llevar a cabo esta investigación se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* activa seca, levadura que fue obtenida de la empresa Levapan del Ecuador S.A.

2.4 Adaptación de la levadura.

En la adaptación de la *Saccharomyces cerevisiae* activa seca se utilizó un envase de plástico con capacidad para 1500 mL, este envase estaba provisto de una tapa de similares características que sirvió para darles las condiciones anaerobias a la que se le adaptó: un termómetro de marca MSC de escala de 0 °C a 250 °C para controlar la temperatura, un dispensador para tomar las muestras

del sustrato y una manguera para que elimine el CO₂ del interior. Este envase se utilizo como bioreactor (Anexo A). La adaptación de la levadura se realizo en 17 ciclos repetitivos, en el que utilizo 1000 mL de jugo de caña de azúcar como sustrato y 100 mL de inóculo.

2.4.1 Hidratación de la levadura activa seca (LAS).

Se pesaron 10 gr de levadura activa seca (LAS) que se disolvió e hidrato mediante agitación en un matraz de 250 mL que contenía 100 mL de jugo de caña a 4,7 de pH, 20 °Brix y temperatura ambiente. Para darle las condiciones de pH y °Brix se utilizó 30 mL de ácido sulfúrico a una concentración 0,1 N y 60 mL de agua destilada respectivamente. Este procedimiento se realizo solo una vez al iniciarse la adaptación (Figura 2.1).

2.4.2 Preparación del sustrato para la adaptación.

La preparación del sustrato se realizo en un envase de plástico de 1500 mL (bioreactor) con 1000 mL de jugo de caña de azúcar recién molido a 4,7 de pH, 20 °Brix y a una temperatura de 28 °C. Para darle las condiciones de pH, °Brix y temperatura se utilizó ácido sulfúrico a una concentración de 0,1 N y ácido cítrico a una concentración de 0,1 N (último ciclo), 100 mL de agua destilada para disminuir 1 °Brix y una plancha de calentamiento respectivamente (Figura 2.1).

2.4.3 Pruebas de fermentación.

Los 17 ciclos del proceso de adaptación fueron realizados en un bioreactor de 1500 mL con 1000 mL de sustrato preparado. Al que se le añadió 100 mL de inóculo preparado y se incubo a una temperatura de 28 °C con agitación. De los ciclos de adaptación se tomaron muestras periódicas del °Brix y de pH cada hora y cada dos horas respectivamente, esto durante 8 horas (Figura 2.1) (Anexo B).

2.4.4 Recuperación de la levadura.

La recuperación de la levadura del mosto fermentado se efectuó suspendiendo el proceso de agitación con el propósito que las levaduras en

suspensión precipiten. Al precipitado recuperado (levaduras) al finalizar cada ciclo de adaptación se utilizó para el siguiente, manteniendo la relación 1:10 inóculo sustrato (Figura 2.1).

2.4.5 Conservación de la levadura.

La levadura recuperada se almacena en un matraz enlenmeyer con jugo de caña de azúcar a pH de 4,7, 19 °Brix y temperatura ambiente (Figura 2.1).

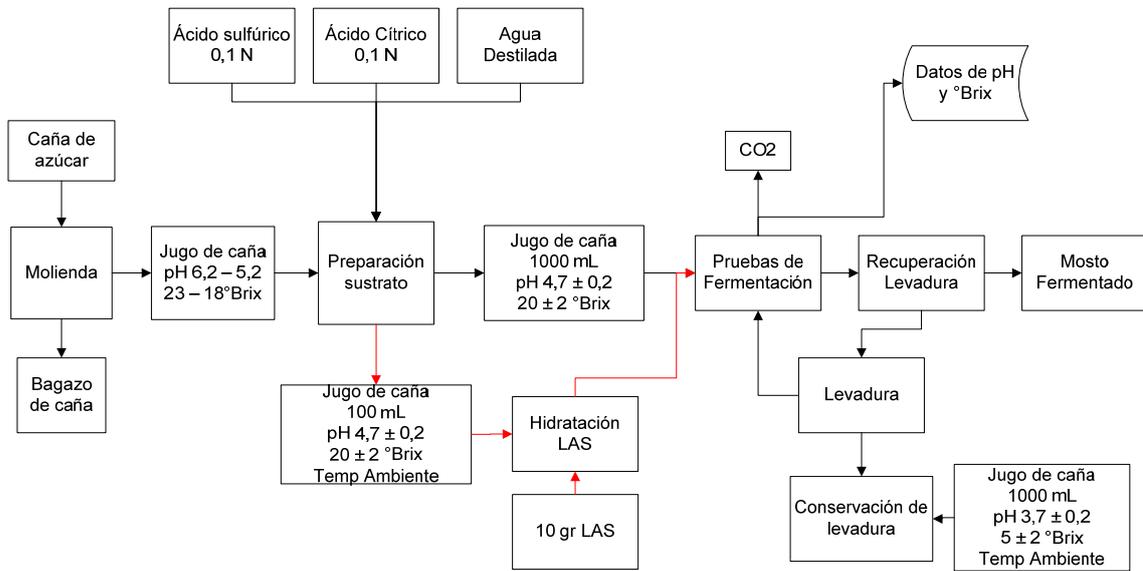


Figura 2.1 Procedimiento seguido para la adaptación de la levadura.

Las flechas de color rojo indican el procedimiento realizado solo al inicio de la etapa de adaptación.

2.5 Evaluación de las condiciones de pH, °Brix y temperatura en que se llevo la fermentación.

Para evaluar las condiciones en que se llevo la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) a 3,7, 4,7 y 5,7 de pH, 10 °Brix, 15 °Brix y 20 °Brix a una temperatura de 35 °C, 29 °C, 22 °C se utilizó un bioreactor con capacidad para 1500 mL, en el que se evaluó la concentración de glucosa disminuida, °Brix reducidos, grado alcohólico (% Vol.) al finalizar el proceso de fermentación como al finalizar el proceso de destilación simple y cantidad de alcohol obtenido al primer destilado simple. Los datos

obtenidos se analizaron en un modelo de diseño anidado cruzado con tres repeticiones.

2.5.1 Preparación de solución amortiguadoras.

En la preparación de soluciones amortiguadoras se tomo en cuenta lo siguiente:

- El pK_a se encuentre entre 4,5 – 5,0
- Inerte con el proceso de fermentación alcohólica
- No sea tóxico para la levadura
- Este disponible en el laboratorio

Con todos estos antecedentes se selecciono acetato de potasio y ácido acético porque su pK_a es 4,7, no es tóxico para la levadura, no es caro y está disponible en el laboratorio (Anapara, 1973).

Para evaluar las condiciones en que se lleva la fermentación alcohólica a 3,7, 4,7 y 5,7 de pH se preparo tres soluciones amortiguadoras. En la realización de estas soluciones amortiguadoras se elaboro una curva de valoración que se obtuvo cuando a 20 mL de una solución de ácido acético 0,1 N se valoro con una solución de acetato de potasio 0,5 M. Esta curva se obtuvo experimentalmente, al medir el pH del ácido acético 0,1 N antes y después de añadir una alícuota de 5 mL de acetato de potasio con la utilizó un pH-metro marca HANNA previa calibración (Hichs. 2001).

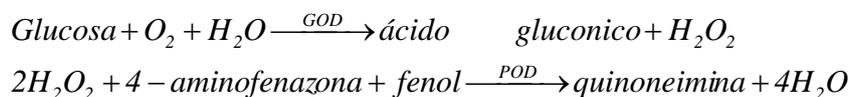
2.5.2 Determinación de azúcares reductores como glucosa.

Para determinar la glucosa se utilizó el método GOD-PAP es una prueba enzimática colorimétrica para glucosa, es un método sin desproteínización.

2.5.2.1 Fundamento.

La glucosa se determina después de la oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno formado reacciona bajo la catálisis de peroxidasa con fenol y 4-aminofenazona formando un complejo rojo-violeta usando la quinoneimina como indicador.

2.5.2.2 Principio de la reacción.



2.5.2.3 Características de la prueba.

La prueba es lineal hasta una concentración de glucosa de 4 gr/L. Si la concentración de glucosa es superior a estos límites, es necesario diluir la muestra y repetir la determinación.

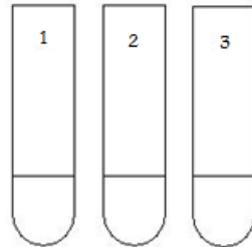
2.5.2.4 Método usado para determinar azúcares reductores como glucosa.

Para determinar la concentración de glucosa se elaboro una curva patrón (absorbancia vs. concentración de glucosa) para lo cual se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible con una longitud de onda de 546 nm, reactivo enzimático **RGT** y estándar **STD** (1000 mgr/L o 1 gr/L).

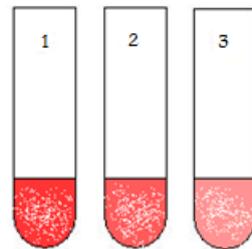
Para la construcción de la curva patrón se realizó lo siguiente:

1. Se tomó 3 tubos de ensayo estériles.
2. Al tubo 1 se colocó 0.1 mL del estándar + 2.5 mL de reactivo enzimático.
3. Al tubo 2 se realizó una dilución 1:1 del estándar para tener una concentración 0.500 gr/L de glucosa y se colocó + 2.5 mL de reactivo enzimático.
4. Al tubo 3 se realizó una dilución 1:4 del estándar para tener una concentración 0.250 gr/L de glucosa y se colocó + 2.5 mL de reactivo enzimático.
5. A los tubos se les puso en baño maría durante 5 minutos a 37 °C.

Reactivo eszimatico	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Estandar	0,1 ml	0,05 ml	0,025 ml
Agua	-----	0,05 ml	0,075 ml



baño maría a 37° C por 5 minutos



6. Medió la absorbancia a 546 nm después de transcurrido los 5 minutos en baño maría frente a un blanco, para lo cual se utilizo celdillas para espectrofotómetro.

2.5.2.5 Procedimiento realizado para determinar la concentración de glucosa en gr/L de las muestras obtenidas del proceso de fermentación.

Se tomo en un tubo de ensayo una alícuota de 10 mL de sustrato de cada bioreactor. A los tubos con las muestras se les sometió a centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante obtenido se realizo una dilución 1:1000, 1:100 o 1:10 con agua destilada. De las muestras diluidas se tomo una alícuota de 1 mL en un tubo de ensayo estéril y se adiciono 2,5 mL de reactivo enzimático e inmediatamente le se le colocó en baño maría a 37 °C durante 5 minutos. Después que transcurrió los 5 minutos en baño maría se procedió a leer la absorbancia con la utilización de una celda para espectrofotómetro frente a un blanco, si la absorbancia determinada era mayor a los 0,700 se procedió a realizar la dilución de la muestra hasta que la absorbancia sea menor. Con el dato de la absorbancia se determino la concentración de glucosa en gr/L previa multiplicación con el factor de dilución.

2.5.3 Evaluación de las condiciones de pH, °Brix y temperatura en que se llevo la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA).

2.5.3.1 Hidratación de la levadura activa seca (LAS) a pH 5,7, 4,7 y 3,7.

Se peso 10 gr de levadura activa seca (LAS) para cada tratamiento. Los gramos de LAS pesados se disolvió e hidrato mediante agitación en un matraz de 250 mL que contenía 100 mL de jugo de caña a pH 5,7 con un °Brix de 10, 15 y 20 para los tratamientos 1, 2 y 3 respectivamente. Se realizo el mismo procedimiento a pH 4,7 para los tratamientos 4, 5 y 6 y para los tratamientos 7, 8 y 9 a pH de 3,7 (Figura 2.2).

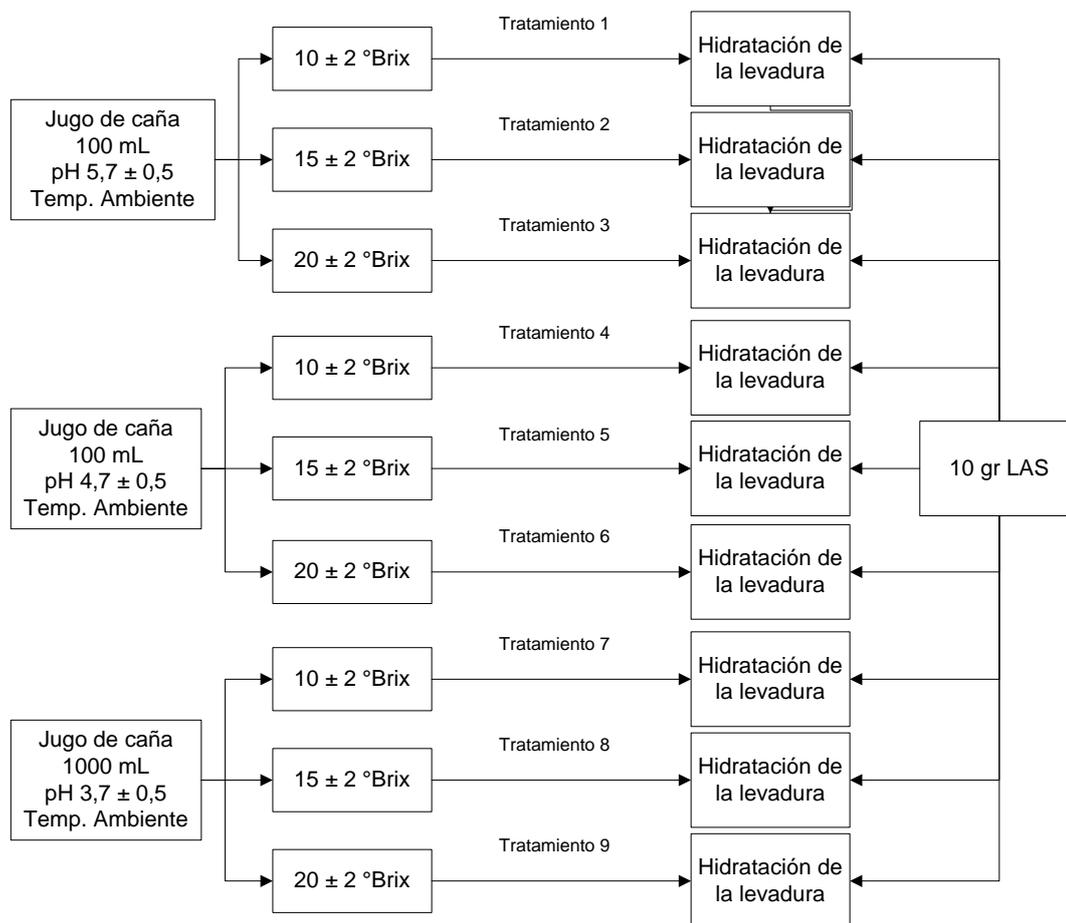


Figura 2.2 Procedimiento seguido para la hidratación de la levadura.

2.5.3.2 Preparación del inóculo a pH 5,7, 4,7 y 3,7.

Se tomo 100 mL de levadura adaptada (LA) en un matraz de 250 mL al que se adiciono hidróxido de sodio a una concentración de 0,1 N para darle las condiciones 5,7 de pH para los tratamientos 1, 2 y 3, así como 4,7 de pH para los tratamientos 4, 5 y 6 y finalmente 3,7 de pH para los tratamientos 7, 8 y 9 respectivamente. (Figura 2.3).

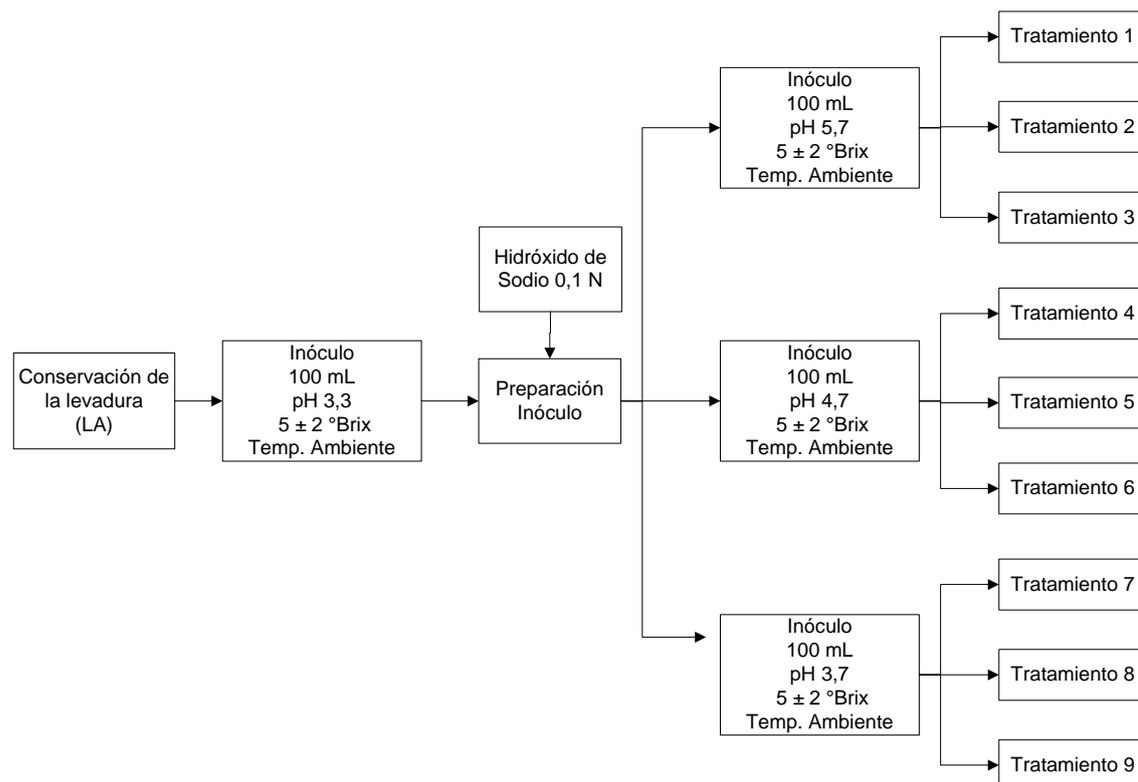


Figura 2.3 Procedimiento seguido para la preparación del inóculo.

2.5.3.3 Preparación del sustrato a pH 5,7, 4,7 y 3,7.

La preparación del sustrato se realizó en un envase de plástico de 1500 mL (bioreactor) con 1000 mL de jugo de caña de azúcar recién molido a pH de 5,7 con 10 °Brix, 15 °Brix y 20 °Brix para los tratamientos 1, 2 y 3 respectivamente a una temperatura de 35°C al que se adiciono 100 mL de una solución amortiguadora a pH 5,7. Para los tratamientos 4, 5 y 6 se utilizo jugo de caña de azúcar recién molido a pH de 4,7 con 10 °Brix, 15 °Brix y 20 °Brix respectivamente a una temperatura de 29 °C al que se le adiciono 60 mL de una solución

amortiguadora a pH 4,7 y finalmente para los tratamientos 7, 8 y 9 se utilizó jugo de caña de azúcar recién molido con un pH de 3,7 a 10 °Brix, 15 °Brix y 20 °Brix respectivamente a una temperatura de 22 °C. Para darle las condiciones de pH y °Brix se utilizó ácido cítrico a una concentración de 0,1 N e hidróxido de sodio a una concentración de 0,1 N y 100 mL de agua destilada para disminuir 1 °Brix respectivamente (Figura 2.4).

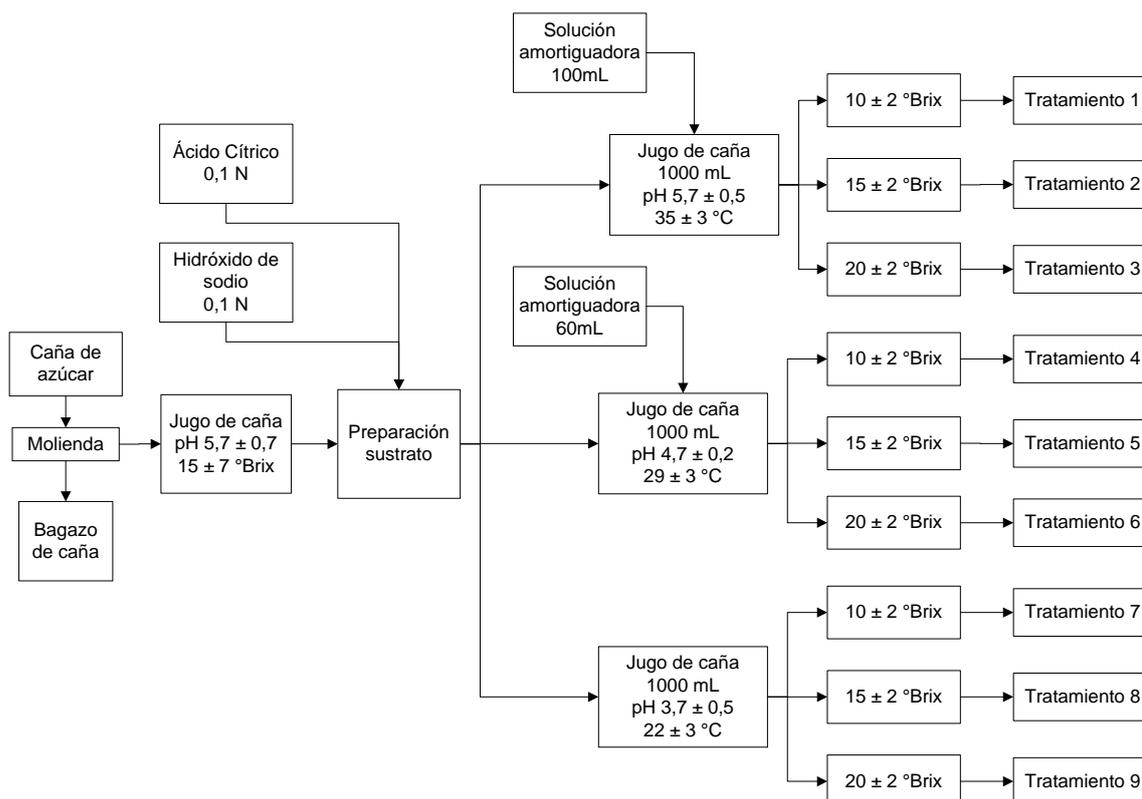


Figura 2.4 Procedimiento seguido en la preparación del sustrato.

2.5.3.4 Pruebas de fermentación.

Para evaluar las condiciones de pH, °Brix y temperatura en que se llevó a cabo el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y por la levadura adaptada (LA) se utilizó un bioreactor con capacidad para 1500 mL con 1000 mL de sustrato preparado al que se le añadió 100 mL de inóculo preparado y se incubó a una temperatura de 35 °C para los tratamientos 1, 2 y 3, 29 °C para los tratamientos 4, 5 y 6 y a una temperatura de 22 °C para los tratamientos 7, 8 y 9 con agitación. Se realizó tres repeticiones por cada

tratamiento en el que se analizó concentración de glucosa disminuida, °Brix reducidos y grado alcohólico al finalizar el proceso de fermentación (Figura 2.5) (Anexo D).

2.5.3.5 Recuperación de la levadura.

Para recuperar la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) del mosto fermentado se procedió a centrifugar en una centrifugadora manual por 5 minutos a la que se adaptó dos recipientes de plástico de 300 mL, el precipitado (levaduras) se recuperó en un matraz enlenmeyer de 250 mL (Figura 2.5).

2.5.3.6 Conservación de la levadura.

La levadura recuperada fue almacenada en un matraz enlenmeyer con jugo de caña de azúcar a pH 3,7, y °Brix de 5 a temperatura ambiente (Figura 2.5).

2.5.3.7 Método de destilación.

El sobrenadante que fue recuperado del proceso de centrifugado fue sometido a destilar para lo cual se utilizó dos equipos de destilado simple, el alcohol obtenido se recolectó en un vaso de precipitación de 250 mL. Al finalizar el proceso de destilación se procedió a determinar el grado alcohólico y la cantidad de alcohol obtenido (Figura 2.5).

2.5.3.7.1 Método para determinar el grado alcohólica.

Al alcohol obtenido del proceso de destilado se procedió a medir el grado alcohólico para lo cual se utilizó una probeta de 100 mL y un alcoholímetro, el grado alcohólico se lo midió en % Vol. a la temperatura de 20 °C.

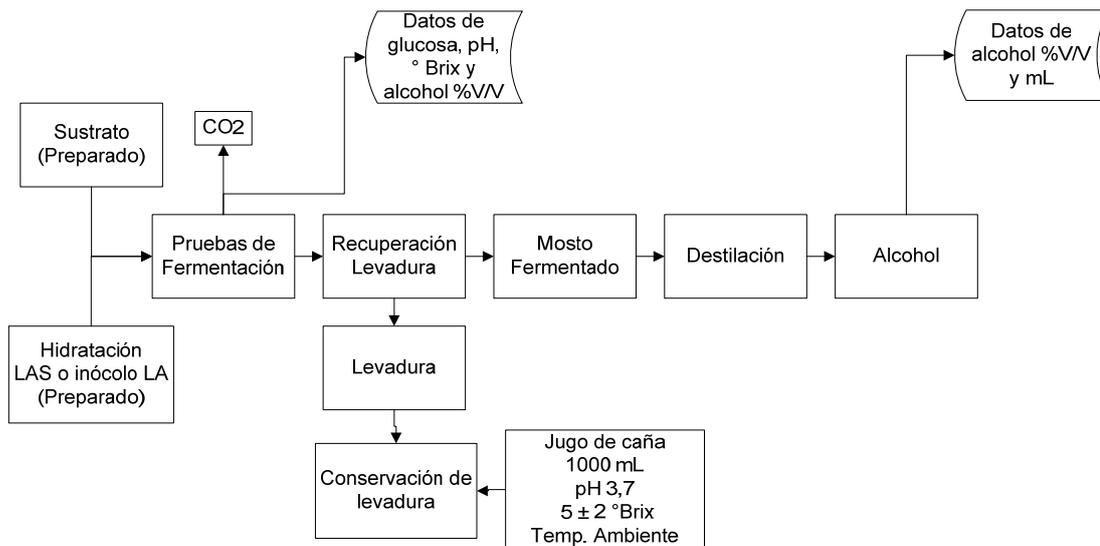


Figura 2.5 Procedimiento seguido para las pruebas de fermentación, recuperación de la levadura y destilación.

2.6 Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas.

Para evaluar las condiciones de la fermentación alcohólica con la adición de urea (H_2NCONH_3), acetato de potasio ($C_2H_3KO_2$) y fosfato ácido de potasio trihidratado ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) a una concentración de 5 gr/L, 10 gr/L y 15 gr/L se utilizó un envase de plástico (bioreactor) con capacidad para 1500 mL con 1000 mL de jugo de caña a 3,7 de pH, 20 °Brix con 10 gr de LAS en 100 mL de sustrato o 100 mL de levadura adaptada (LA) incubada a una temperatura de 22 °C con agitación (Anexo C). En el que se evaluó la concentración de glucosa disminuido, °Brix reducidos, grado alcohólico (% Vol.) al finalizar el proceso de fermentación como al finalizar el proceso de destilación simple y cantidad de alcohol obtenido al primer destilado simple. Los datos obtenidos se realizaron en un Diseño Completo al Azar (DCA) con cuatro repeticiones.

2.6.1 Hidratación de la levadura activa seca (LAS).

Se peso 10 gr de levadura activa seca (LAS) que se disolvió e hidrato mediante agitación en un matraz de 250 mL que contenía 100 mL de jugo de caña

a pH 3,7 con 20 °Brix a temperatura. Para darle las condiciones de pH y °Brix se utilizó ácido cítrico a una concentración de 0,1 N y 100 mL de agua destilada para disminuir 1 °Brix respectivamente.

2.6.2 Preparación del inóculo.

Se tomo 100 mL de levadura adaptada (LA) en un matraz de 250 mL al que se adiciono hidróxido de sodio a una concentración de 0,1 N para darle las condiciones 3,7 de pH para todos los 9 tratamientos.

2.6.3 Preparación del sustrato.

La preparación del sustrato se realizo en un envase de plástico de 1500 mL (bioreactor) con 1000 mL de jugo de caña de azúcar recién molido a pH de 3,7 con 20 °Brix para todos los 9 tratamientos a una temperatura de 22°C al que se adiciono 0,5 gr, 1,0 gr y 1,5 gr de urea para los tratamiento 1, 2 y 3 respectivamente. De la misma forma se adiciono 0,5 gr, 1,0 gr y 1,5 gr de acetato de potasio para los tratamientos 4, 5 y 6 respectivamente y finalmente se adiciono 0,5 gr, 1,0 ge y 1,5 gr de fosfato ácido de potasio trihidratado para los tratamientos 7, 8 y 9 respectivamente. Para darle las condiciones de pH se utilizó ácido cítrico a una concentración de 0,1 N. (Figura 2.6).

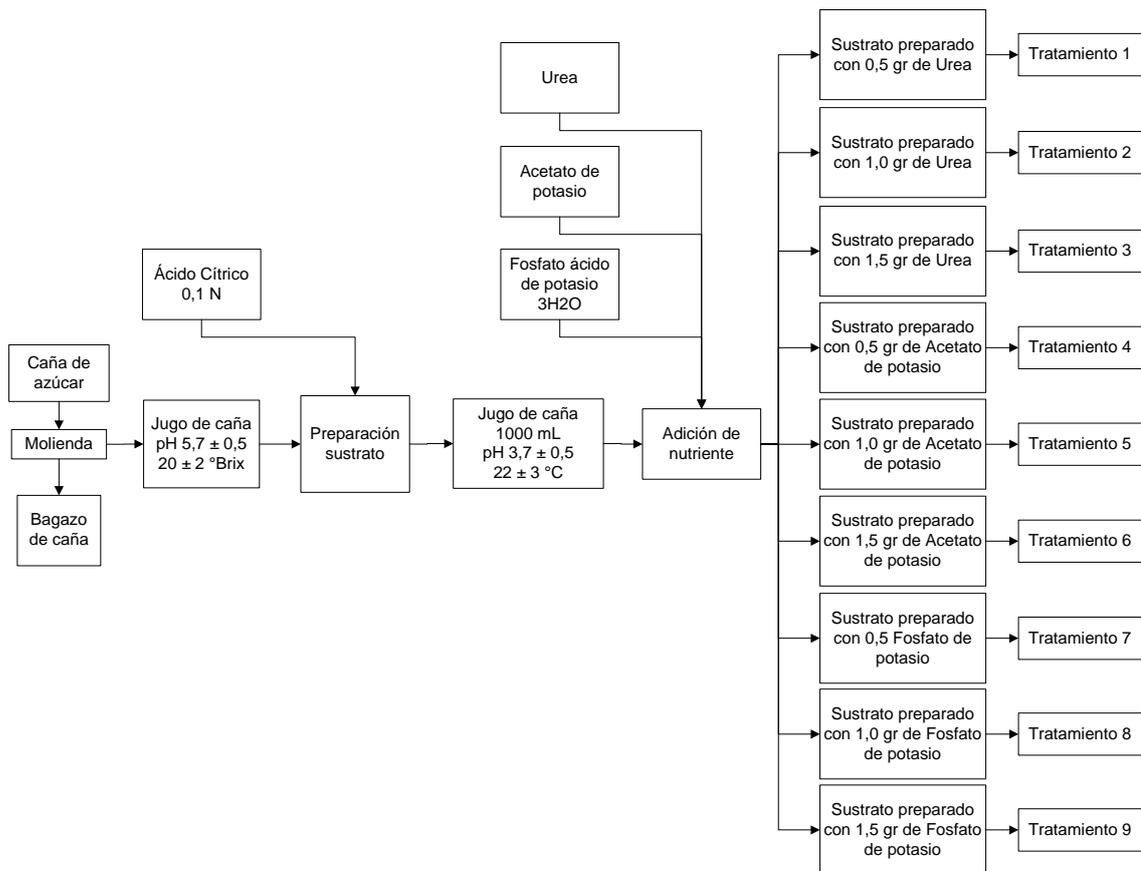


Figura 2.6 Procedimiento seguido en la preparación del sustrato.

2.6.4 Pruebas de fermentación.

Para evaluar el proceso de fermentación alcohólica con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas por la levadura activa seca (LAS) y por la levadura adaptada (LA) se utilizó un bioreactor con capacidad para 1500 mL con 1000 mL de sustrato preparado al que se le añadió 100 mL de inóculo preparado y se incubó a una temperatura de 22 °C para los 9 tratamientos. Se realizaron cuatro repeticiones por cada tratamiento en el que se analizó concentración de glucosa disminuida, °Brix reducidos y grado alcohólico al finalizar el proceso de fermentación (Figura 2.5) (Anexo E).

2.6.5 Recuperación de la levadura.

Para recuperar la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) del mosto fermentado se procedió a centrifugar en una centrifugadora manual por 5 minutos a la que se adaptó dos recipientes de plástico de 300 mL, el sobrenadante recuperado se fue destilado y el precipitado (levaduras) fue recuperado en un matraz enlenmeyer de 250 mL (Figura 2.5).

2.6.6 Conservación de la levadura.

La levadura recuperada era almacenada en un matraz enlenmeyer con jugo de caña de azúcar a pH 3,7, y °Brix de 5 a temperatura ambiente (Figura 2.5).

2.6.7 Método de destilación.

El sobrenadante que fue recuperado fue se lo sometió a destilar para lo cual se utilizó dos equipos de destilado simple, el alcohol obtenido fue recolectado en un vaso de precipitación de 250 mL. Al finalizar el proceso de destilación se procedió a determinar el grado alcohólico y la cantidad de alcohol obtenido (Figura 2.5).

2.7 Evaluación de la cantidad de inóculo por litro de sustrato en el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA).

Al evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en el proceso de fermentación alcohólica se utilizó un envase de plástico (bioreactor) con capacidad para 1500 mL con 1000 mL de jugo de caña a 3,7 de pH, 20 °Brix con 1 gr, 5 gr, 10 gr 15 gr y 20 gr de LAS en 100 mL de sustrato o 10 mL, 50 mL, 100 mL, 150 mL y 200 mL de levadura adaptada (LA) de inóculo incubada a una temperatura de 22 °C con agitación. En el que se evaluó °Brix reducido en un periodo de 8 horas y se realizó un Diseño Completo al Azar (DCA) con tres repeticiones. (Anexo C).

2.7.1 Hidratación de la levadura activa seca (LAS).

Se peso 1 gr, 5 gr, 10 gr 15 gr y 20 gr de levadura activa seca (LAS) para los tratamientos 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente que se disolvió e hidrato mediante agitación en un matraz de 250 mL que contenía 100 mL de jugo de caña a pH 3,7 con 20 °Brix a temperatura ambiente. Para darle las condiciones de pH y °Brix se utilizó ácido cítrico a una concentración de 0,1 N y 100 mL de agua destilada para disminuir 1 °Brix respectivamente (Figura 2.7).

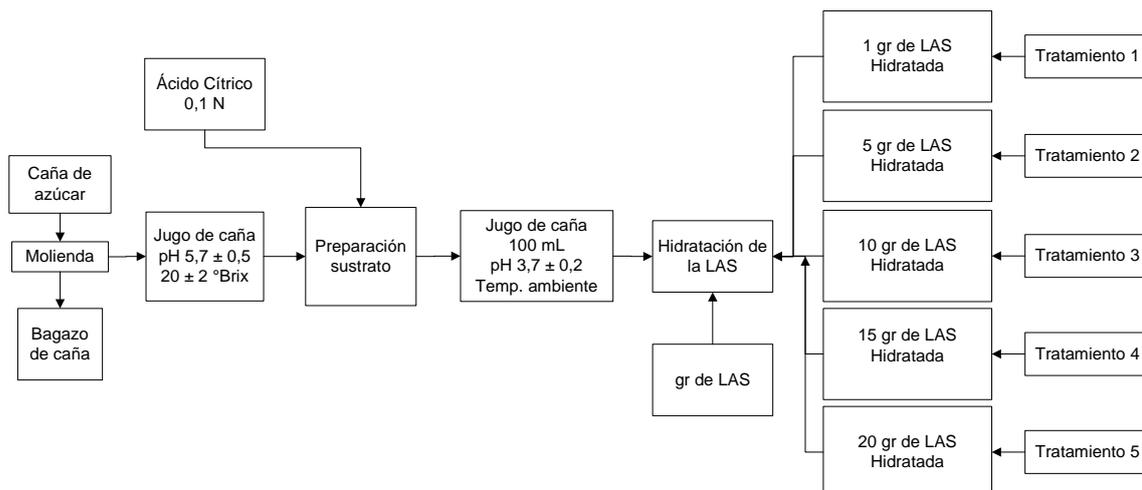


Figura 2.7 Procedimiento seguido en la hidratación de la LAS.

2.7.2 Preparación del inóculo.

Se tomo 10mL, 50 mL, 100 mL, 150 mL y 200 mL de levadura adaptada (LA) en un matraz de 250 mL al que se adiciono hidróxido de sodio a una concentración de 0,1 N para darle las condiciones 3,7 de pH (Figura 2.8).

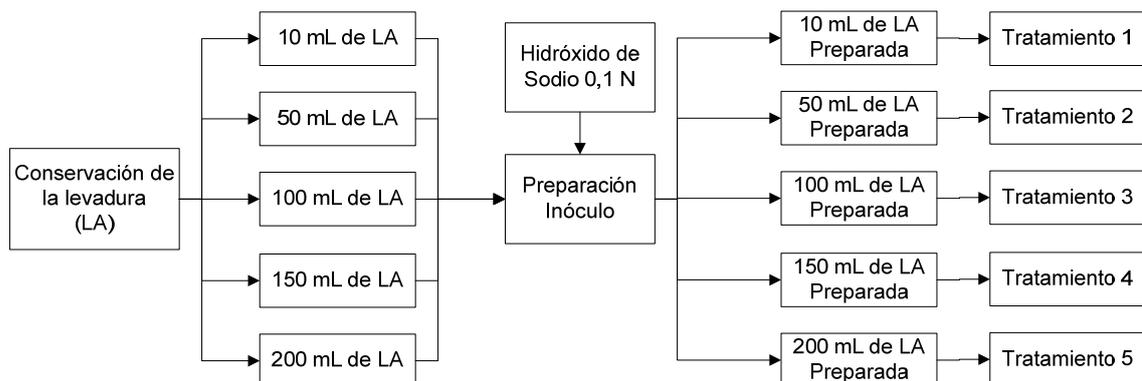


Figura 2.8 Procedimiento seguido en la preparación del inóculo

2.7.3 Preparación del sustrato.

La preparación del sustrato se realizó en un envase de plástico de 1500 mL (bioreactor) con 1000 mL de jugo de caña de azúcar recién molido a pH de 3,7 con 20 °Brix para todos los 5 tratamientos a una temperatura de 22°C. Para darle las condiciones de pH se utilizó ácido cítrico a una concentración de 0,1 N.

2.7.4 Pruebas de fermentación.

Para evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en el proceso de fermentación alcohólica se utilizó un envase de plástico (bioreactor) con capacidad para 1500 mL con 1000 mL de sustrato preparado al que se le añadió 100 mL de inóculo preparado y se incubó a una temperatura de 22 °C para los 5 tratamientos. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento en el que se analizó °Brix reducidos en un periodo de 8 horas (Figura 2.9) (Anexo F).

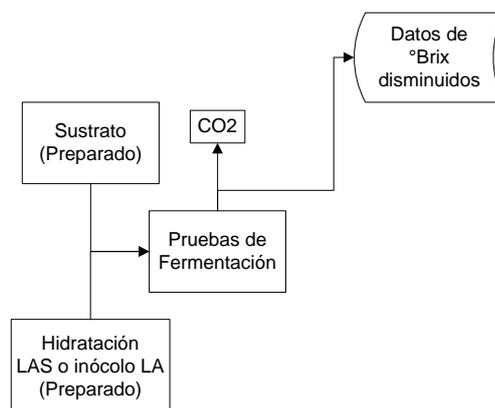


Figura 2.9 Procedimiento seguido en las pruebas de fermentación.

CAPITULO 3: RESULTADOS

3.1 Adaptación de la levadura.

3.1.1 Preparación del inóculo.

La levadura usada para preparar el inóculo se obtuvo de cada uno de los ciclos de adaptación. La relación inóculo sustrato en el ciclo 2 fue de 0,8:10 y de 0,9:10 para los ciclos 3 y 4. A partir del ciclo 5 en adelante la relación inóculo sustrato se mantuvo en 1:10.

3.1.2 Pruebas de fermentación.

Del proceso de adaptación se tomaron datos de °Brix y pH cada hora y cada dos horas respectivamente, esto durante 8 horas. Los resultados obtenidos al restar °Brix inicial - °Brix final y pH inicial - pH final de cada ciclo se esquematizan en columnas agrupadas (Figura 3.1).

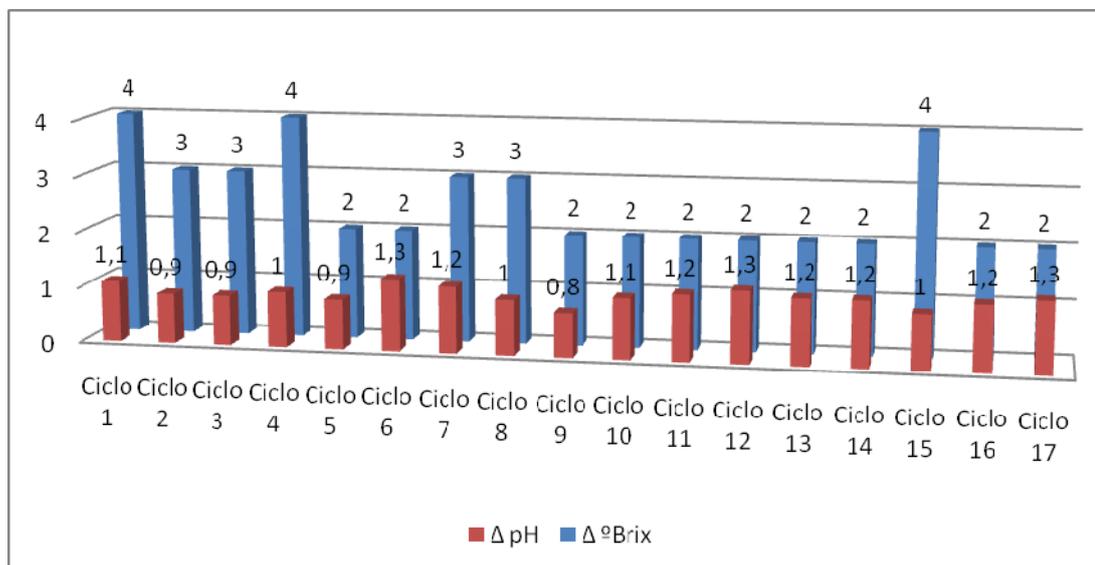


Figura 3.1 Δ °Brix y Δ pH de cada ciclo del proceso de adaptación.

El ciclo 1 presenta una disminución de 4 °Brix. Los ciclos 2 y 3 exponen una reducción de 3 °Brix, a pesar que en el ciclo 2 la relación inóculo sustrato fue menor a la del ciclo 3 en 10 mL. La reducción del °Brix en el ciclo 4 fue de 4 y al

compararle con el ciclo anterior, este ciclo 4 redujo 1 °Brix más cuando en los ciclos 3 y 4 la relación inóculo sustrato fue idéntica. En los ciclos 5 y 6 la disminución del °Brix fue de 2, menor a los cuatro primeros ciclos en un promedio de 1,5 °Brix cuando la relación inóculo sustrato fue de 1:10. En los siguientes ciclos la tendencia se mantiene y se registra en mayor proporción una disminución de 2 °Brix. En el ciclo 17 la disminución del °Brix fue de 2, este ciclo no presenta ninguna variación a pesar que se regulo el pH del sustrato con ácido cítrico.

La disminución de 2 °Brix se manifiesta en 10 ciclos del proceso de adaptación lo que representa un porcentaje del 58,82%, en cambio la disminución de 3 °Brix y 4 °Brix se muestra en 4 ciclos y en 3 ciclos del proceso lo que representa un porcentaje del 23,53% y 17,65% respectivamente (Tabla 3.1).

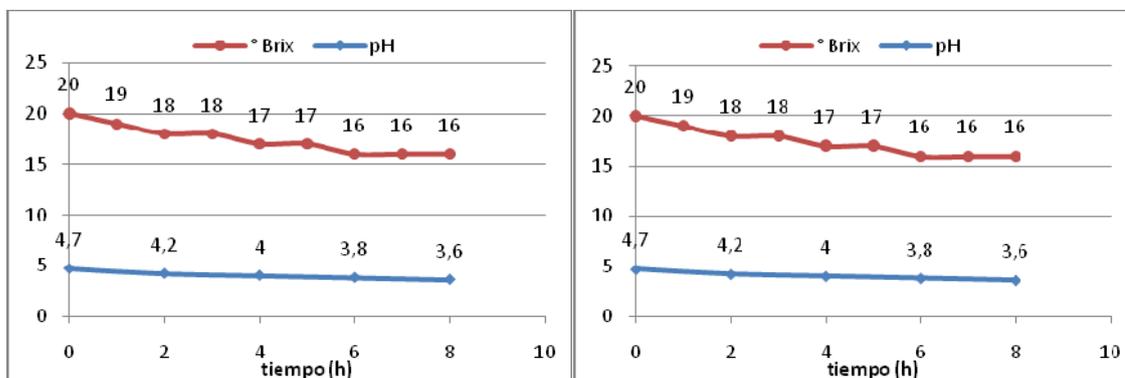
Tabla 3.1 Representación porcentual de los °Brix disminuidos en los ciclos del proceso de adaptación de la levadura.

		Ciclos de adaptación																	
Δ °Brix	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	Sumatoria	Porcentaje
4																		3	17.65 %
3																		4	23.53 %
2																		10	58.82 %
																		17	100 %

En el proceso de adaptación de la levadura el pH desciende en un rango de 0,8 - 1,3 en un periodo de 8 horas (Figura 3.1). En el ciclo 1 el pH del sustrato descendió en 1,1 es decir que bajo de 4,7 a 3,6. En los ciclos 2 y 3 el pH se redujo en 0,9 ubicándose en 3,7. La tendencia en la reducción del pH se mantiene en los ciclos siguientes (Figura 3.1). En el ciclo 17 la preparación del sustrato se realizó con ácido cítrico, este cambio de ácido no produjo ninguna diferenciación en la disminución del pH.

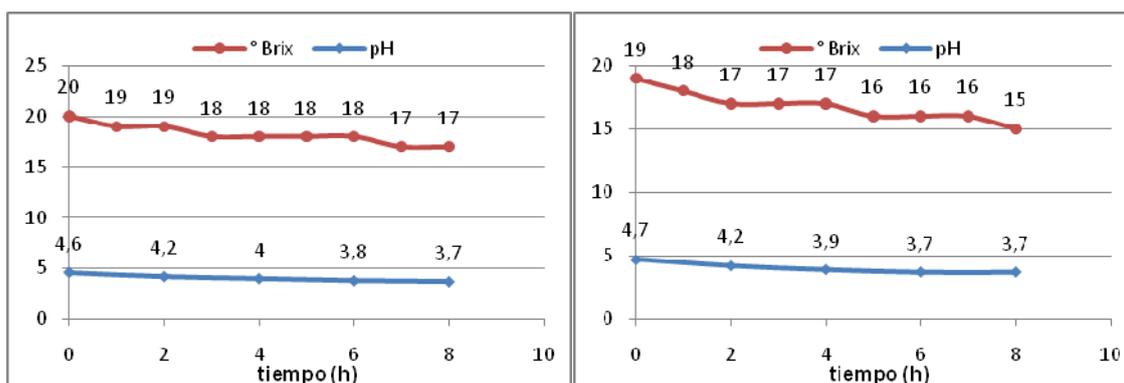
Del proceso de adaptación de la levadura al tomar los datos de pH y °Brix, se evidenció que el pH del sustrato al transcurrido 2 horas desde que se inicio el proceso de adaptación descendió de 4,7 – 4,5 a 4,2 - 3,6 (Anexo B). En la Figura 3.2 se muestra en detalle el °Brix y pH disminuido del proceso de adaptación de la levadura en todos los ciclos. Estos gráficos indican la tendencia

que tiende el pH a disminuir de manera vertiginosa en un lapso de 2 horas (Figura 3.2).



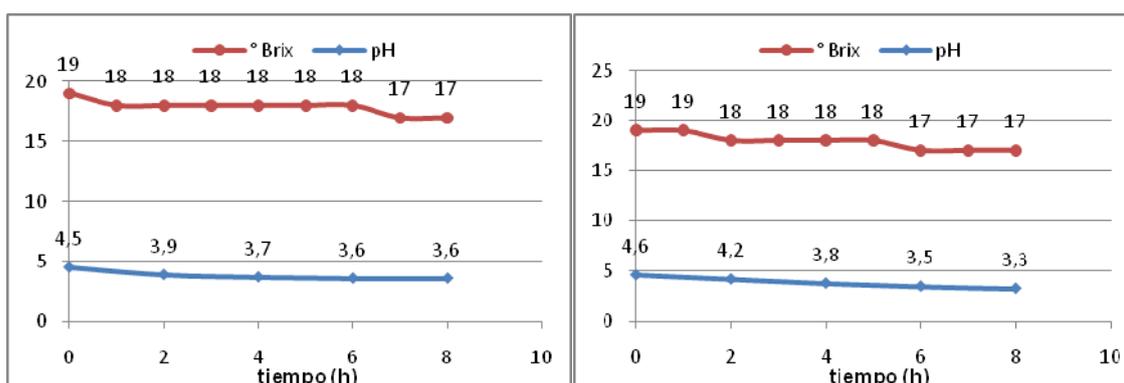
Ciclo 1

Ciclo 2



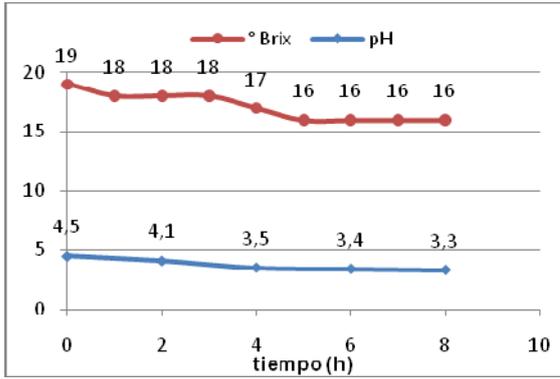
Ciclo 3

Ciclo 4

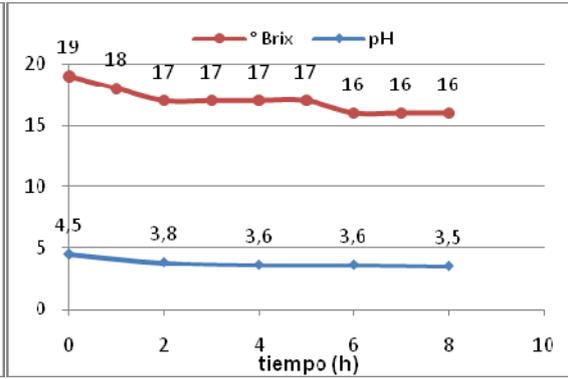


Ciclo 5

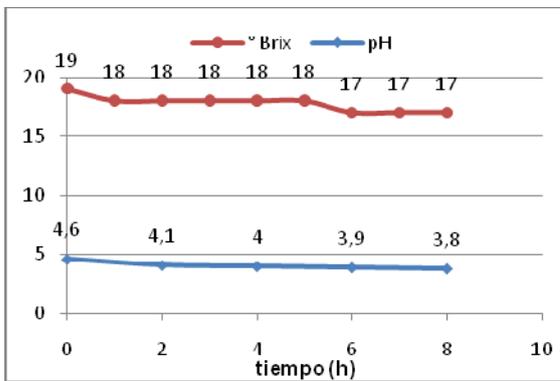
Ciclo 6



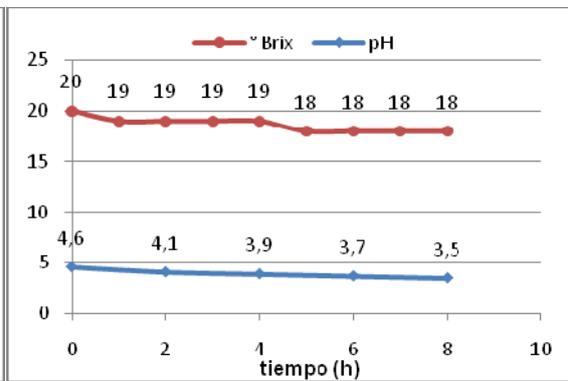
Ciclo 7



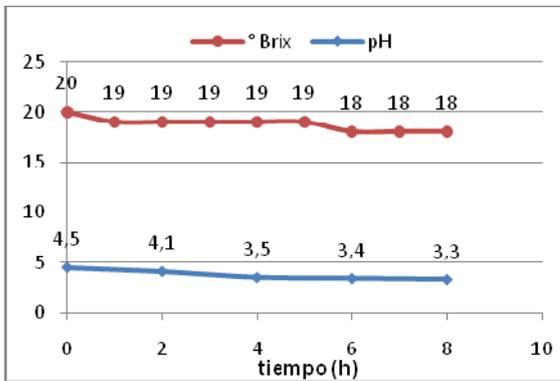
Ciclo 8



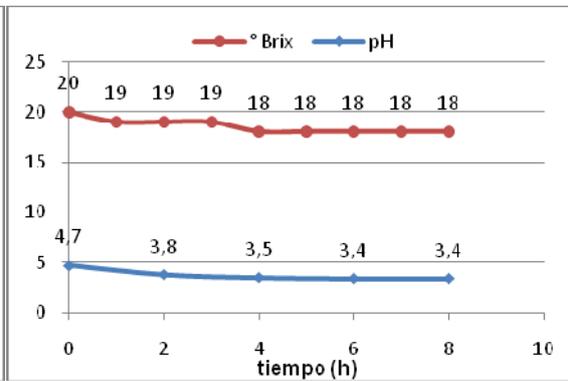
Ciclo 9



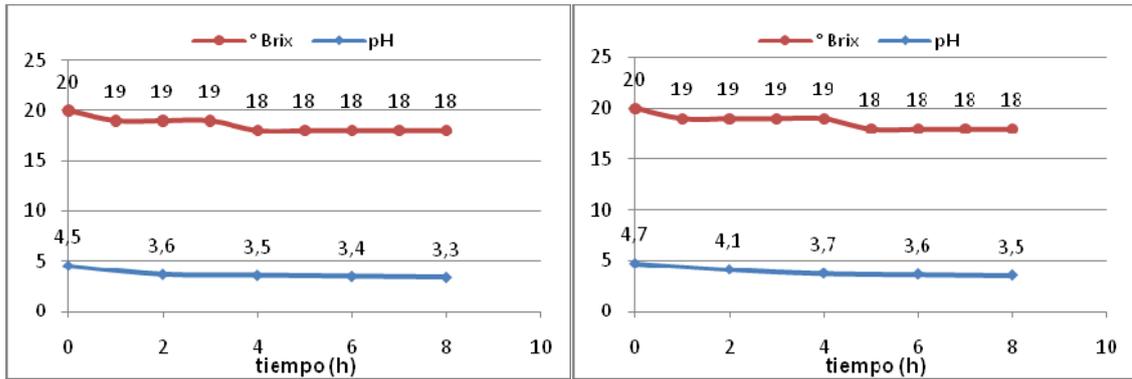
Ciclo 10



Ciclo 11

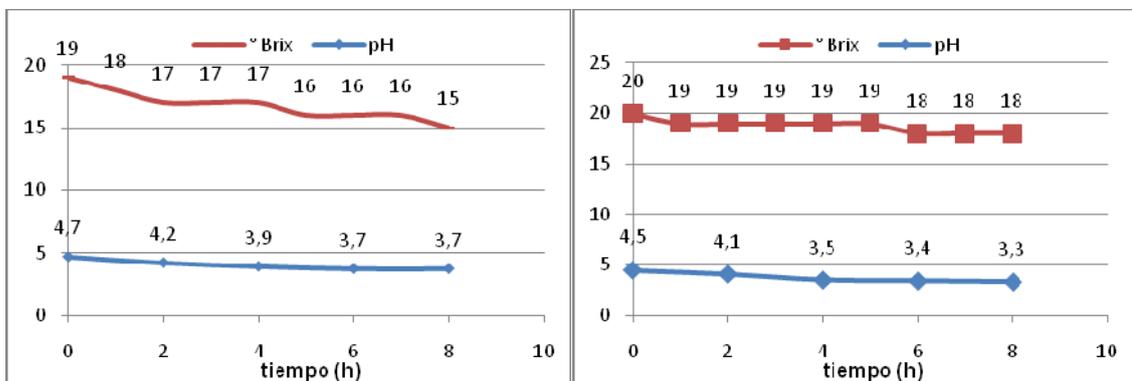


Ciclo 12



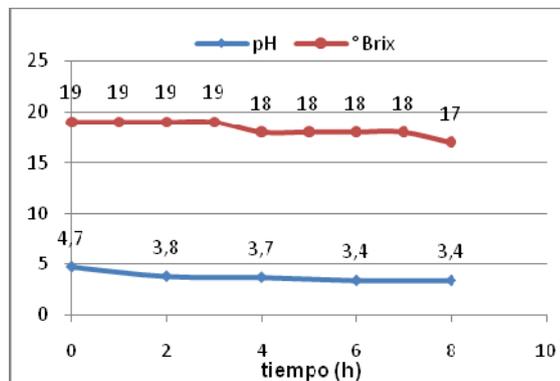
Ciclo 13

Ciclo 14



Ciclo 15

Ciclo 16



Ciclo 17

Figura 3.2 Representaciones gráficas del pH y °Brix de todos los ciclos del proceso de adaptación en un periodo de 8 horas.

3.1.3 Conservación de la levadura.

El exceso de levadura que se obtuvo del proceso de adaptación, se almaceno en jugo de caña a 4,7 de pH y a un °Brix de 19, lo que provoco que el pH y el °Brix descendiera a un rango 3,5 - 3,2 y 11 - 9 respectivamente, provocando que el medio en el que se conservo la levadura sea reemplazado constantemente.

3.2 Evaluación de las condiciones de pH, °Brix y temperatura en que se llevo la fermentación alcohólica.

En el perfil del proyecto, la evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica, se ideo realizarla con dos levaduras que se obtuvieran de un proceso de adaptación corto y largo. Al evaluar las condiciones de pH, °Brix y temperatura en que se lleva la fermentación alcohólica por las levaduras obtenidas del proceso de adaptación corto y largo los resultados obtenidos fueron similares (Anexo G); razón por la cual la evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica, se realizo con la levadura activa seca (LAS) levadura obtenida comercialmente y la levadura adaptada (LA) levadura obtenida del proceso de adaptación.

3.2.1 Preparación de soluciones amortiguadoras.

De la valoración del ácido acético 0,1 N con el acetato de potasio 0,5 M se obtuvo una curva, como resultado de medir el pH del ácido acético antes y después de añadir una alícuota de 5 ml de acetato de potasio (Figura 3.3).

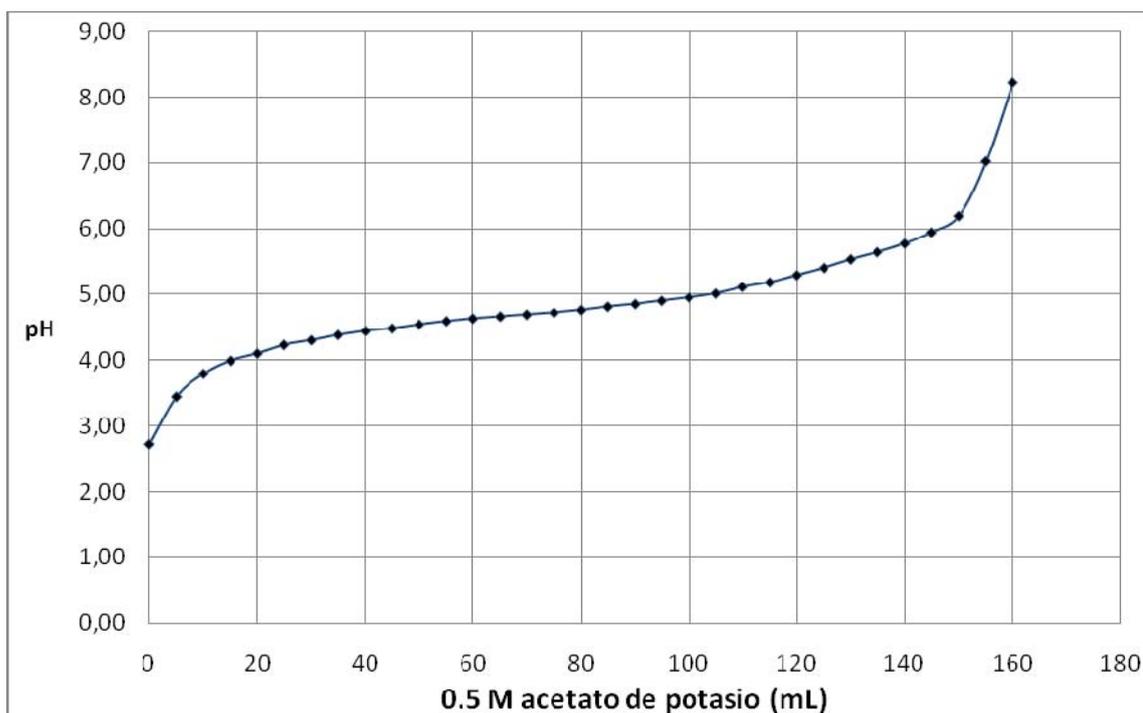


Figura 3.3 Curva de valoración del ácido acético con acetato de potasio.

Esta curva permitió conocer cuánto de acetato de potasio 0,5 M se tiene que añadir a 20 mL de ácido acético 0,1 N para tener tres soluciones amortiguadoras a pH 3,7, 4,7 y 5,7 respectivamente.

3.2.2 Determinación de azúcares reductores como glucosa.

Los resultados obtenidos al medir la absorbancia a 546 nm de glucosa a una concentración de 1 gr/L, 0,5 gr/L, 0,25 gr/L y 0,0 gr/L (blanco) se expresan a continuación (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Datos de la absorbancia a 546 nm obtenidos al medir la glucosa a una concentración de 1 gr/L, 0,5 gr/L, 0,25 gr/L y 0,0 gr/L.

Absorbancia a 546 nm	Concentración de glucosa (gr/L)
1,045	1,000
0,570	0,500
0,278	0,250
0,000	0,000

Los datos obtenidos se ilustran en un diagrama de dispersión XY (Figura 3.4).

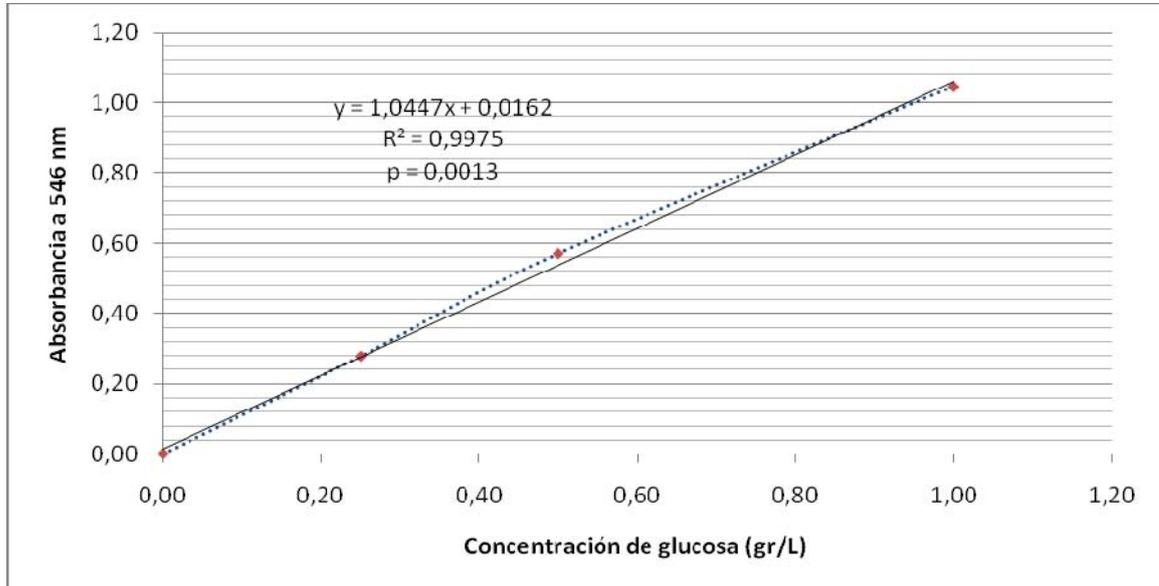


Figura 3.4 Absorbancia a 546 nm determinada al medir la glucosa a una concentración de 1 gr/L, 0,5 gr/L, 0,25 gr/L y 0,0 gr/L.

En el análisis de regresión, la probabilidad obtenida fue de 0,0013 por lo que esta curva se ajusta a un modelo lineal.

Esta curva permitió conocer la concentración de glucosa de las muestras obtenidas del proceso de fermentación alcohólica previa multiplicación con el factor de dilución.

3.2.3 Evaluación de las condiciones de pH, °Brix y temperatura en que se llevo la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA).

La fermentación alcohólica se evaluó en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña a diferentes condiciones de pH y °Brix a 24 °C, 29 °C y 34 °C. Los rangos de pH correspondieron 5,7, 4,7 y 3,7 y los rangos de °Brix concernieron 10, 15 y 20. En la evaluación se realizó tres repeticiones y se determinó la concentración de glucosa disminuida, °Brix reducidos y grado alcohólico obtenido

al finalizar el proceso de fermentación; así como, el grado alcohólico y la cantidad de alcohol obtenidos al finalizar el proceso de destilación (Anexo D).

Los tratamientos realizados se identifican a continuación: (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Identificación de los tratamientos realizados para evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la LAS y la LA.

Tratamientos	pH	°Brix	Temperatura
Tratamiento 1	5,7	10	35 °C
Tratamiento 2		15	
Tratamiento 3		20	
Tratamiento 4	4,7	10	29 °C
Tratamiento 5		15	
Tratamiento 6		20	
Tratamiento 7	3,7	10	22 °C
Tratamiento 8		15	
Tratamiento 9		20	

3.2.4 Análisis estadístico de la evaluación de las condiciones de pH, °Brix y temperatura en que se llevo la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS).

Para la presentación e interpretación de los resultados, el análisis estadístico se lo realizó mediante la Tabla de Análisis de Varianza (ADEVA) y presentaciones graficas.

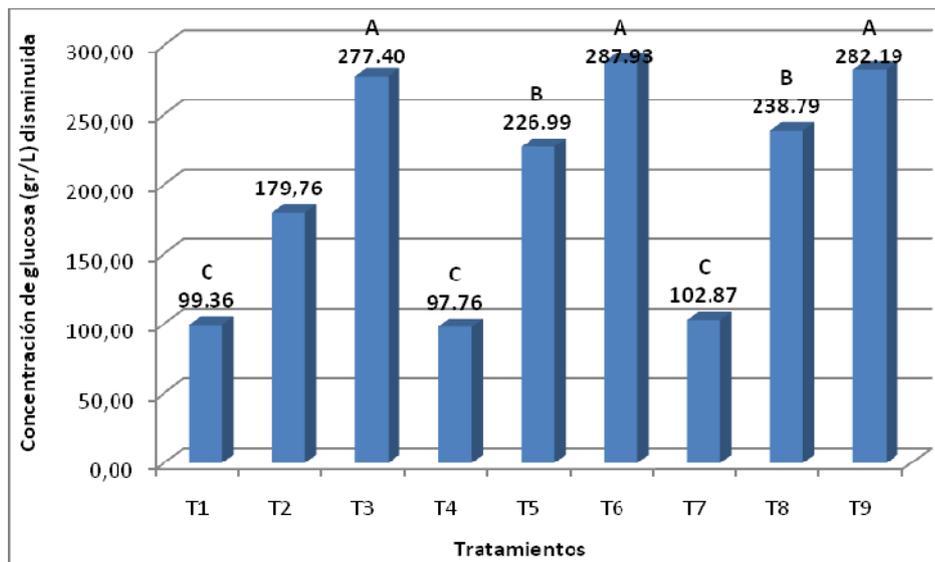


Figura 3.5 Promedio y rangos de significancia para el factor concentración de glucosa (gr/L) disminuida, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura activa seca (LAS).

Al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura, por la levadura activa seca (LAS), se observa que los tratamientos 1, 2 y 3, tratamientos evaluados a pH 5.7 y a una temperatura de 35°C la disminución en la concentración de glucosa aumenta a medida que el número de °Brix se eleva, este aumenta en la disminución de la concentración de glucosa se mantiene en los restantes tratamientos. Los tratamientos 3, 6 y 9, tratamientos que se evaluó con un °Brix de 20 pero a diferentes condiciones de pH y temperatura presentan la mayor concentración de glucosa disminuida mientras que los tratamientos 1, 4 y 7 tratamientos que se evaluó con un °Brix de 10 pero a diferentes condiciones de pH y temperatura presentan la menor concentración de glucosa disminuida. El tratamiento 6, tratamiento que se evaluó a 20 °Brix, 4.7 de pH y 29 °C presentan la mayor concentración de glucosa disminuida y el tratamiento 4, tratamiento que se evaluó a 10 °Brix 4.7 de pH y 29 °C presentan la menor concentración de glucosa disminuida.

Tukey al 5% de probabilidad para el factor concentración de glucosa disminuida, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura activa seca (LAS) se observa tres rangos de significancia (Figura 3.5), ubicándose en primer lugar o rango “A” el tratamiento 6 (4.7 pH, 20 °Brix y 29 °C) con 287.93 gr/L de glucosa disminuido, seguido del tratamiento 3 (5.7 pH, 20 °Brix y 35 °C). En segundo lugar o rango “B” el tratamiento 8 (3.7 pH, 15 °Brix y 22 °C) con 238.79 gr/L de glucosa disminuido seguido del tratamiento 5 (4.7 pH, 15 °Brix y 29 °C) y en tercer lugar o rango “C” el tratamiento 7 (3.7 pH, 10 °Brix y 22 °C) con 102.87 gr/L de glucosa disminuido seguido de los tratamientos 4 (4.7 pH, 10 °Brix y 29 °C) y 1 (5.7 pH, 10 °Brix y 35 °C). El tratamiento 2 (5.7 pH, 15 °Brix y 35 °C) no se encuentra dentro de ningún rango de significancia.

Tabla 3.4 Análisis de varianza para la concentración de glucosa disminuida, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	26.00	638795.16		
Temperatura	2.00	1436713.26	718356.63	3701.81**
°Brix	2.00	1436713.26	718356.63	3701.81**
Temp °Brix	4.00	1907070.81	476767.70	2456.86**
pH (Temp °Brix)	8.00	156785.85	19598.23	100.99**
Error Exp.	16.00	3104.89	194.06	
CV	20.98 %			

Para la variable concentración de glucosa disminuida, obtenida al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura se observa significancia estadística para el factor temperatura, °Brix, al igual que para la interacción temperatura °Brix, así como; para el factor pH que esta anidado dentro de la combinación del factor temperatura y °Brix.

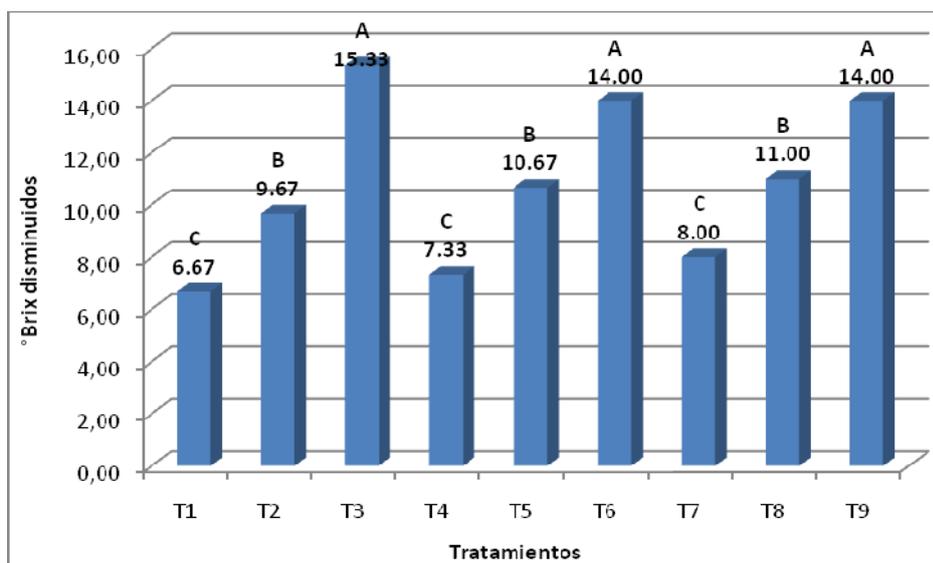


Figura 3.6 Promedio y rangos de significancia para el factor número de °Brix disminuido, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura activa seca (LAS).

Al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura activa seca (LAS) se observa que en los tratamientos 3, 6 y 9, tratamientos que se evaluó con un °Brix de 20 pero a diferentes condiciones de pH y temperatura presentan el mayor número de °Brix disminuidos mientras que los tratamientos 1, 4 y 7 tratamientos que se evaluó con un °Brix de 10 pero a diferentes condiciones de pH y temperatura presentan el menor número de °Brix disminuidos. El mejor tratamiento con el mayor número de °Brix disminuidos es el tratamiento 3, tratamiento que se evaluó a pH 5.7, 20 °Brix y a una temperatura de 35 °C. El tratamiento con el menor número de °Brix reducido es el tratamiento 1, tratamiento que se evaluó a pH 5.7, 20 °Brix y a una temperatura de 35 °C.

Tukey al 5% de probabilidad para el factor número de °Brix disminuidos, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura activa seca (LAS) se observa tres rangos de significancia (Figura 3.6), ubicándose en el primer lugar o rango "A" el tratamiento 3 (5.7 pH, 20 °Brix y 35 °C) con 15.33 °Brix disminuidos seguido de los

tratamientos 9 (3.7 pH, 20 °Brix y 22 °C) y 6 (4.7 pH, 20 °Brix y 29 °C). En segundo lugar o rango “B” el tratamiento 8 (3.7 pH, 15 °Brix y 22 °C) con 11 °Brix disminuidos seguido de los tratamientos 5 (4.7 pH, 15 °Brix y 29 °C) y 2 (5.7 pH, 15 °Brix y 35 °C) y en tercer lugar o rango “C” el tratamiento 7 (3.7 pH, 10 °Brix y 22 °C) con 8 °Brix disminuidos seguido de los tratamientos 4 (4.7 pH, 10 °Brix y 29 °C) y 1 (5.7 pH, 10 °Brix y 35 °C).

Tabla 3.5 Análisis de varianza para el número de °Brix disminuidos, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	26	1627.55		
Temperatura	2	4155.98	2077.99	6233.96**
°Brix	2	4155.98	2077.99	6233.96**
Temp °Brix	4	4866.64	1216.66	3649.98**
pH (Temp °Brix)	8	236.89	29.61	88.83**
Error Exp.	16	5.33	0.33	
CV	16.13 %			

Para la variable °Brix disminuidos, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura se observa significancia estadística para el factor temperatura, °Brix, al igual que para la interacción temperatura °Brix y para el factor pH que esta anidado en la combinación del factor temperatura y °Brix.

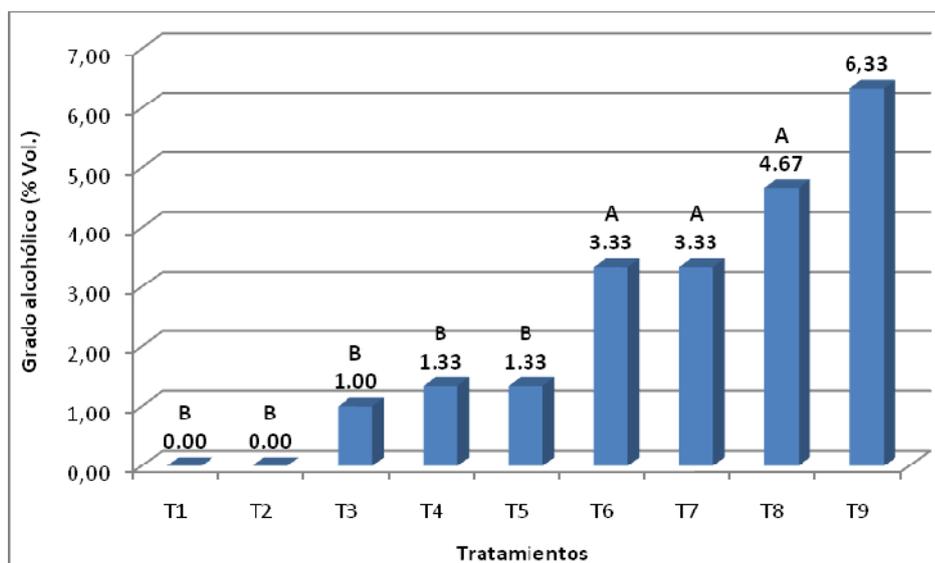


Figura 3.7 Promedio y rangos de significancia para el factor grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura activa seca (LAS).

Al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura activa seca (LAS) se observa que en los tratamientos 1 y 2, tratamientos que se evaluó con un °Brix de 10 y 15 respectivamente a pH 5.7 y temperatura de 35 °C el grado alcohólico obtenido al final del proceso de fermentación es 0, mientras que en el tratamiento 3 que se evaluó a la misma condiciones de pH y temperatura pero con un °Brix de 20 el grado alcohólico al final del proceso de fermentación es de 1. Los tratamientos 4, 5 y 6 tratamientos que se evaluó con un °Brix de 10, 15 y 20 respectivamente a 4.7 de pH y 29 °C el grado alcohólico al final del proceso de fermentación es bajo y no supera los 2 grados alcohólicos (% Vol.). En los tratamientos 7, 8 y 9, tratamientos que se evaluó con un °Brix de 10, 15 y 20 respectivamente a 3.7 de pH y a una temperatura de 22 °C el grado alcohólico al final del proceso de fermentación es mayor a medida que el °Brix aumenta. El tratamiento 9 presenta el mayor grado alcohólico que se obtuvo al final del proceso de fermentación mientras que los

tratamientos 1 y 2 presentan el menor grado alcohólico al final del proceso de fermentación.

Se realizó la prueba de Tukey al 5% de probabilidad para el factor grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final de la fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura activa seca (LAS) se observa dos rangos de significancia (Figura 3.7), ubicándose en primer lugar o rango “A” el tratamiento 8 (3.7 pH, 15 °Brix y 22 °C) con 4.67 grados de alcohol (% Vol.) seguido los tratamiento 7 (3.7 pH, 10 °Brix y 22 °C) y 6 (4.7 pH, 20 °Brix y 29 °C). En segundo lugar o rango “B” el tratamiento 5 (4.7 pH, 15 °Brix y 29 °C) y el tratamiento 4 (4.7 pH, 10 °Brix y 29 °C) con 1.33 grados de alcohol (% Vol.) seguido los tratamientos 3 (5.7 pH, 20 °Brix y 35 °C), 2 (5.7 pH, 15 °Brix y 35 °C) y el tratamiento 1 (5.7 pH, 10 °Brix y 35 °C).

Tabla 3.6 Análisis de varianza para el grado alcohólico obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	26	185.72		
Temperatura	2	474.49	237.25	948.99**
°Brix	2	474.49	237.25	948.99**
Temp °Brix	4	545.16	136.29	545.16**
pH (Temp °Brix)	8	23.56	2.94	11.78**
Error Exp.	16	4.00	0.25	
CV	63.28 %			

Para la variable grado alcohólico obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura se observa significancia estadística para el factor temperatura, °Brix, al igual que para la interacción temperatura °Brix y para el factor pH que esta anidado en la combinación del factor temperatura y °Brix.

Se obtuvo un coeficiente de varianza de 63.28 % que es alto lo que indica que existió una variabilidad.

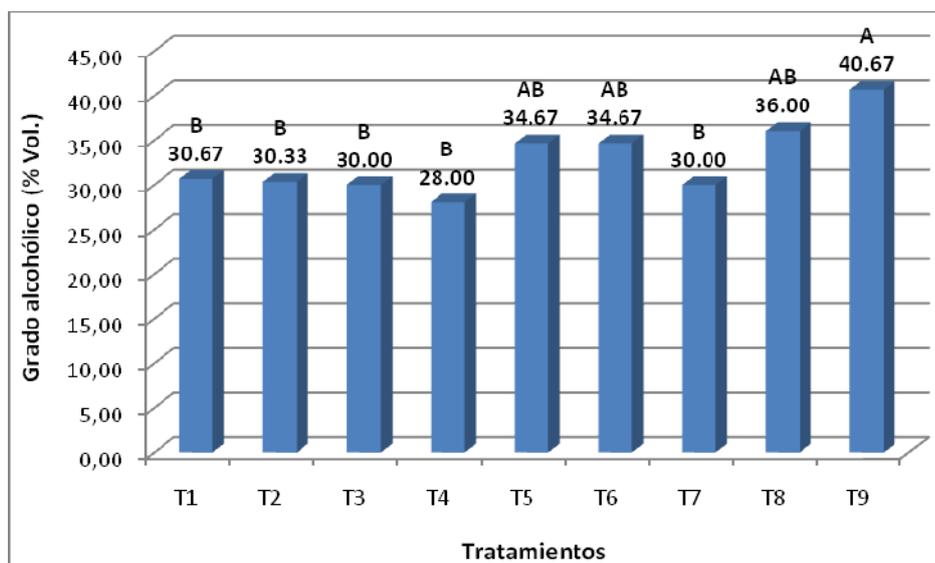


Figura 3.8 Promedio y rango de significancia para el factor el grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura activa seca (LAS).

Al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura activa seca (LAS) se observa que en los tratamientos 1, 2 y 3 tratamientos que se evaluó con un °Brix de 10, 15 y 20 respectivamente a pH de 5.7 y a una temperatura de 35 °C el grado alcohólico obtenido al final del proceso de destilación tiende a mantenerse, mientras que en los tratamientos 4, 5 y 6 tratamientos que se evaluó a un °Brix de 10, 15 y 20 respectivamente a 4.7 de pH y 29 °C el grado alcohólico al final del proceso de destilación presenta un pequeño incremento al compararle con los tres anteriores tratamientos y finalmente en los tratamientos 7, 8 y 9, tratamientos que se evaluó a un °Brix de 10, 15 y 20 respectivamente a 3.7 de pH y a una temperatura de 22 °C el grado alcohólico al final del proceso de destilación es mayor a medida que el °Brix aumenta. El tratamiento 9 presenta el mayor grado alcohólico que se obtuvo al final del proceso de destilación mientras que el tratamiento 4 presenta el menor grado alcohólico al final del proceso de destilación.

Tukey al 5% de probabilidad para el grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura se observa dos rangos de significancia (Figura 3.8), ubicándose en el primer lugar o rango “A” el tratamiento 9 (3.7 pH, 20 °Brix y 22 °C) con 40.67 grados de alcohol (% Vol.), seguido los tratamientos 8 (3.7 pH, 15 °Brix y 22 °C), 6 (4.7 pH, 20 °Brix y 29 °C) y el tratamiento 5 (4.7 pH, 15 °Brix y 29 °C). En segundo lugar o rango “B” el tratamiento 8 (3.7 pH, 15 °Brix y 22 °C) con 36 grados de alcohol (% Vol.) seguido los tratamientos 6 (4.7 pH, 20 °Brix y 29 °C), 5 (4.7 pH, 15 °Brix y 29 °C), 1 (5.7 pH, 10 °Brix y 35 °C), 2 (4.7 pH, 15 °Brix y 35 °C), 7 (3.7 pH, 10 °Brix y 22 °C), 3 (5.7 pH, 20 °Brix y 35 °C) y el tratamiento 4 (4.7 pH, 10 °Brix y 29 °C).

Tabla 3.7 Análisis de varianza para el grado alcohólico, obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	26	13427.26		
Temperatura	2	39050.44	19525.22	2091.99**
°Brix	2	39050.44	19525.22	2091.99**
Temp °Brix	4	39833.78	9958.44	1066.98**
pH (Temp °Brix)	8	261.11	32.64	3.50 ^{ns}
Error Exp.	16	149.33	9.33	
CV	27.96 %			

Para la variable grado alcohólico obtenido al final del proceso de destilación, se observa significancia estadística para el factor temperatura, °Brix, al igual que para la interacción temperatura °Brix, pero para el factor pH que esta anidado en la combinación del factor temperatura °Brix no se observa una significancia estadística.

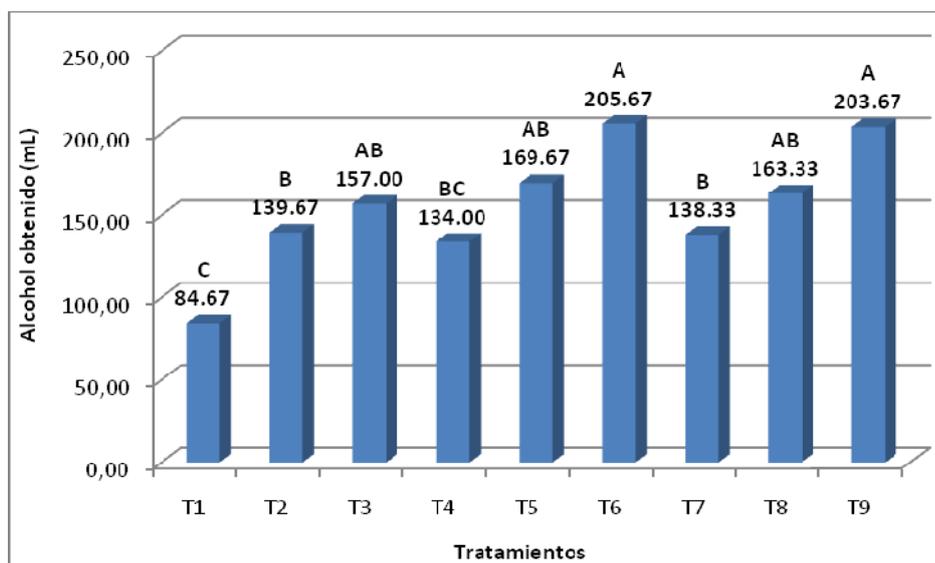


Figura 3.9 Promedio y rangos de significancia para el factor cantidad de alcohol obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura activa seca (LAS).

Al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura activa seca (LAS) se observa que los tratamientos 1, 2 y 3 tratamientos que se evaluó con un °Brix de 10, 15 y 20 respectivamente a pH 5.7 y a una temperatura de 35 °C la cantidad de alcohol obtenido al final del proceso de destilación tiende a aumentar al tener un mayor número de °Brix, esta tendencia se mantiene en los demás tratamientos. Los tratamientos 4, 5 y 6 tratamientos que se evaluó a un °Brix de 10, 15 y 20 respectivamente a 4.7 de pH y 29 °C la cantidad de alcohólico obtenido al final del proceso de destilación presenta un pequeño incremento al compararle con los tres anteriores tratamientos y los tratamientos 7, 8 y 9, tratamientos que se evaluó a un °Brix de 10, 15 y 20 respectivamente a 3.7 de pH y a una temperatura de 22 °C la cantidad de alcohol obtenida es similar a los tres anteriores tratamientos pero superior a los tres primeros tratamientos. El tratamiento 6 presenta la mayor cantidad de alcohol que se obtuvo al final del proceso de destilación mientras que

el tratamiento 1 presenta la menor cantidad de alcohólico que se obtuvo al final del proceso de destilación.

Tukey al 5% de probabilidad para el factor cantidad de alcohol obtenido (mL) al final del proceso de destilación, se observa tres rangos de significancia (Figura 3.9), ubicándose en el primer lugar o rango “A” el tratamiento 6 (4.7 pH, 20 °Brix y 29 °C) con 205.67 mL de alcohol seguido de los tratamientos 9 (3.7 pH, 20 °Brix y 22 °C), 5 (4.7 pH, 15 °Brix y 29 °C), 8 (3.7 pH, 15 °Brix y 22 °C) y el tratamiento 3 (5.7 pH, 20 °Brix y 35 °C). En segundo lugar o rango “B” el tratamiento 5 (4.7 pH, 15 °Brix y 29 °C) 169.67 mL de alcohol seguido de los tratamientos 8 (3.7 pH, 15 °Brix y 22 °C), 3 (5.7 pH, 20 °Brix y 35 °C), 2 (4.7 pH, 15 °Brix y 35 °C), 7 (3.7 pH, 10 °Brix y 22 °C) y el tratamiento 4 (4.7 pH, 10 °Brix y 29 °C) y en el tercer lugar o rango “C” el tratamiento 4 (4.7 pH, 10 °Brix y 29 °C) con 134.00 mL de alcohol y el tratamiento 1 (5.7 pH, 10 °Brix y 35 °C).

Tabla 3.8 Análisis de varianza para la cantidad de alcohólico, obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	26	327206.15		
Temperatura	2	897916.44	448958.22	1403.36**
°Brix	2	897916.44	448958.22	1403.36**
Temp °Brix	4	966262.44	241565.61	755.09**
pH (Temp °Brix)	8	22782.00	2847.75	8.90**
Error Exp.	16	5118.67	319.92	
CV	34.59 %			

Para la variable cantidad de alcohol obtenido al final del proceso de destilación, se observa significancia estadística para el factor temperatura, °Brix, al igual que para la interacción temperatura °Brix, y para el factor pH que esta anidado en la combinación del factor temperatura y °Brix.

3.2.5 Análisis estadístico de la evaluación de las condiciones de pH, °Brix y temperatura en que se llevo la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA).

Para la presentación e interpretación de los resultados el análisis estadístico se lo realizó mediante la Tabla de Análisis de Varianza (ADEVA) y presentaciones graficas.

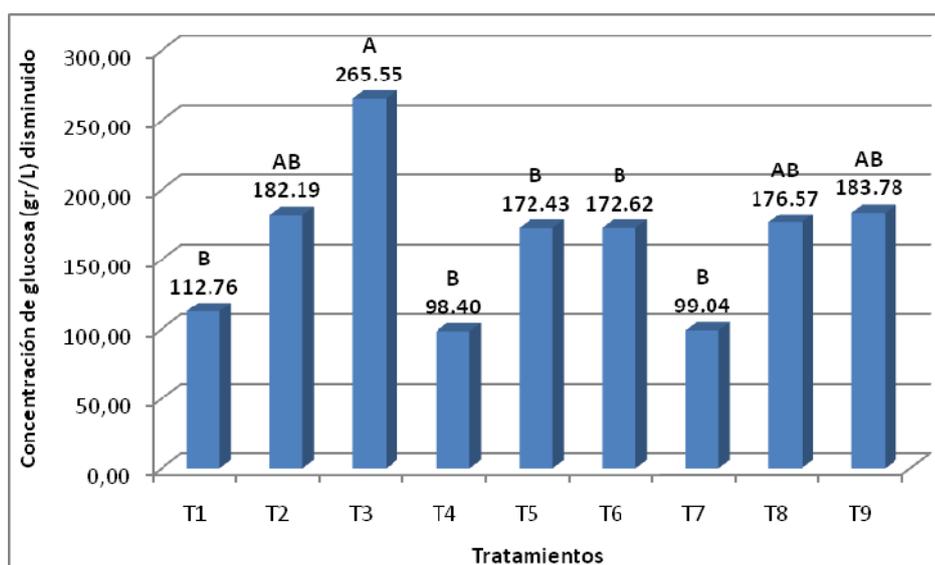


Figura 3.10 Promedio y rangos de significancia para el factor concentración de glucosa (gr/L) disminuida, al evaluar la fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura adaptada (LA).

Al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura adaptada (LA) se observa que en los tratamientos 1, 2 y 3, tratamientos evaluados a pH 5.7 y a un temperatura de 35 °C la disminución en la concentración de glucosa aumenta a medida que el número de °Brix se eleva, este aumenta en la disminución de la concentración de glucosa se mantiene en los restantes tratamientos. Los tratamientos 3, 6 y 9, tratamientos que se evaluó con un °Brix de 20 pero a diferentes condiciones de pH y temperatura presentan la mayor concentración de glucosa disminuida mientras que los tratamientos 1, 4 y 7 tratamientos que se evaluó con un °Brix de 10 pero a

diferentes condiciones de pH y temperatura presentan la menor concentración de glucosa disminuida. El mejor tratamiento con una mayor concentración de glucosa disminuida es el tratamiento 3, tratamiento que se evaluó a 5.7 de pH, 20 °Brix y a una temperatura de 35 °C. El tratamiento que presenta la menor disminución en la concentración de glucosa es el tratamiento 4, tratamiento que se evaluó a 4.7 de pH, 20 °Brix y a una temperatura de 29 °C.

Tukey al 5% de probabilidad para el factor concentración de glucosa disminuida, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura adaptada (LA) se observa dos rangos de significancia (Figura 3.10), ubicándose en primer lugar o rango "A" el tratamiento 3 (5.7 pH, 20 °Brix y 35 °C) con 265.55 gr/L de glucosa disminuida, seguido de los tratamientos 9 (3.7 pH, 20 °Brix y 22 °C), 2 (5.7 pH, 15 °Brix y 35 °C) y el tratamiento 8 (3.7 pH, 15 °Brix y 22 °C). En segundo lugar o rango "B" el tratamiento 9 (3.7 pH, 20 °Brix y 22 °C) con 183.78 gr/L de glucosa disminuido seguido de los tratamientos 2 (5.7 pH, 15 °Brix y 35 °C), 8 (3.7 pH, 15 °Brix y 22 °C), 6 (4.7 pH, 20 °Brix y 29 °C), 5 (4.7 pH, 15 °Brix y 29 °C), 1 (5.7 pH, 10 °Brix y 35 °C), 7 (3.7 pH, 10 °Brix y 22 °C) y el tratamiento 4 (4.7 pH, 10 °Brix y 29 °C).

Tabla 3.9 Análisis de varianza para la concentración de glucosa disminuida, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	26	401923.67		
Temperatura	2	975900.78	487950.39	451.93**
°Brix	2	975900.78	487950.39	451.93**
Temp °Brix	4	1153945.37	288486.34	267.19**
pH (Temp °Brix)	8	59348.20	7418.52	6.87**
Error Exp.	16	17275.21	1079.70	
CV	60.63 %			

Para la variable concentración de glucosa disminuida, obtenida al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y

temperatura se observa significancia estadística para el factor temperatura, °Brix, al igual que para la interacción temperatura °Brix, así como; para el factor pH que esta anidado dentro de la combinación del factor temperatura y °Brix.

Se obtuvo un coeficiente de varianza de 60.63 % que es alto lo que indica que existió una variabilidad.

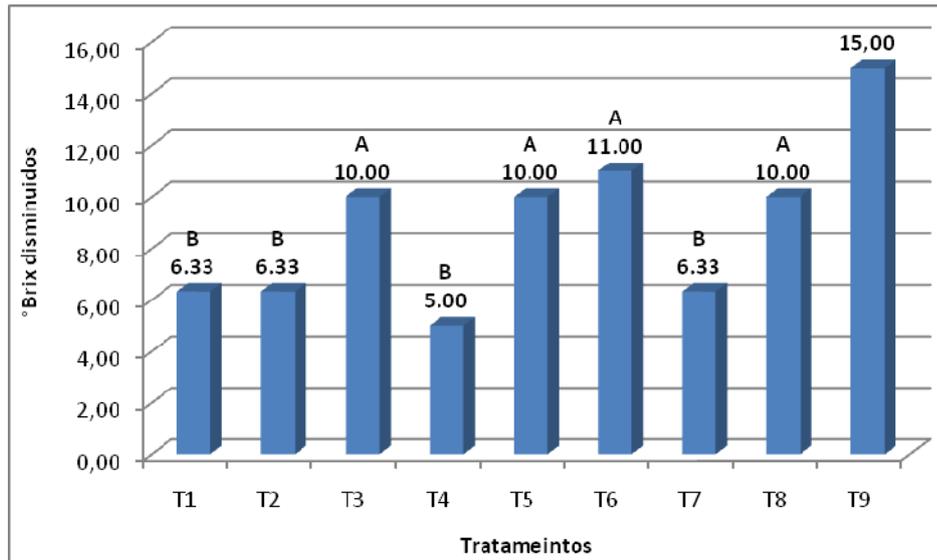


Figura 3.11 Promedio y rangos de significancia para el factor número de °Brix disminuidos, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura adaptada (LA).

Al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura adaptada (LA) se observa que los tratamientos 3, 6 y 9, tratamientos que se evaluó con un °Brix de 20 pero a diferentes condiciones de pH y temperatura presentan el mayor número de °Brix disminuidos mientras que los tratamientos 1, 4 y 7 tratamientos que se evaluó con un °Brix de 10 pero a diferentes condiciones de pH y temperatura presentan el menor número de °Brix disminuida. El mejor tratamiento que presenta el mayor número de °Brix disminuidos es el tratamiento 3 y el tratamiento que presenta el menor número de °Brix es el tratamiento 4, tratamientos que se evaluó a pH 4.7, 10 °Brix y a una temperatura de 29 °C.

Tukey al 5% de probabilidad para el número de °Brix disminuidos, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura se observa dos rangos de significancia (Figura 3.11), ubicándose en primer lugar o rango “A” el tratamiento 6 (4.7 pH, 20 °Brix y 29 °C) con 11 °Brix disminuidos, seguido de los tratamientos 8 (3.7 pH, 15 °Brix y 22 °C), 5 (4.7 pH, 15 °Brix y 29 °C) y el tratamiento 3 (5.7 pH, 20 °Brix y 35 °C). En segundo lugar o rango “B” el tratamiento 7 (3.7 pH, 10 °Brix y 22 °C) con 6.33 °Brix disminuidos, 2 (5.7 pH, 15 °Brix y 35 °C), 1 (5.7 pH, 10 °Brix y 35 °C) y el tratamiento 4 (4.7 pH, 10 °Brix y 29 °C).

Tabla 3.10 Análisis de varianza para el número de °Brix disminuidos, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	26	1196.81		
Temperatura	2	2959.11	1479.56	2959.11**
°Brix	2	2959.11	1479.56	2959.11**
Temp °Brix	4	3566.44	891.61	1783.22**
pH (Temp °Brix)	8	202.44	25.31	50.61**
Error Exp.	16	8.00	0.50	
CV	23.86 %			

Para la variable número de °Brix disminuidos, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura se observa significancia estadística para el factor temperatura, °Brix, al igual que para la interacción temperatura °Brix, así como; para el factor pH que esta anidado dentro de la combinación del factor temperatura y °Brix.

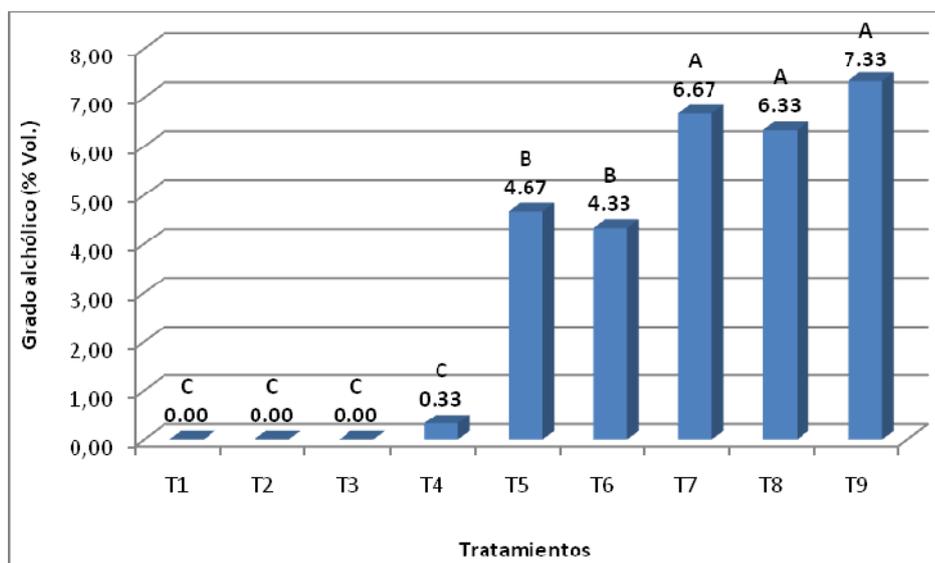


Figura 3.12 Promedio y rangos de significancia para el factor grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura.

Al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura adaptada (LA) se observa que los tratamientos 1, 2 y 3, tratamientos que se evaluó con un °Brix de 10, 15 y 20 respectivamente a pH de 5.7 y a una temperatura de 35 °C el grado alcohólico obtenido al final del proceso de fermentación es 0, mientras que el tratamiento 4 que se evaluó a un °Brix de 10, 4.7 de pH y 29 °C el grado alcohólico al final del proceso de fermentación es 0 pero en los tratamientos 5 y 6, tratamientos que se evaluó a las mismas condiciones de pH y temperatura que el tratamiento 4 pero a un °Brix de 15 y 20 respectivamente el grado alcohólico es mucho mayor y finalmente en los tratamientos 7, 8 y 9, tratamientos que se evaluó a un °Brix de 10, 15 y 20 respectivamente a 3.7 de pH y a una temperatura de 22 °C el grado alcohólico al final del proceso de fermentación se mantiene y es mucho mayor que los primeros tratamientos. El tratamiento 9 presenta el mayor grado alcohólico que se obtuvo al final del proceso de fermentación mientras que los tratamientos 1, 2 y 3 presentan el menor grado alcohólico al final del proceso de fermentación.

Tukey al 5% de probabilidad para el factor grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación alcohólica, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura se observa tres rangos de significancia (Figura 3.12), ubicándose en el primer lugar o rango “A” el tratamiento 9 (3.7 pH, 20 °Brix y 22 °C) con 7.33 grados de alcohol (% Vol.) seguido de los tratamientos 7 (3.7 pH, 10 °Brix y 22 °C) y 8 (3.7 pH, 15 °Brix y 22 °C). En segundo lugar o rango “B” el tratamiento 5 (4.7 pH, 15 °Brix y 29 °C) con 4.67 grados de alcohol (% Vol.) seguido del tratamiento 6 (4.7 pH, 20 °Brix y 29 °C) y en tercer lugar o rango “C” el tratamiento 4 (4.7 pH, 10 °Brix y 29 °C) seguido de los tratamientos 3 (5.7 pH, 20 °Brix y 35 °C), 2 (5.7 pH, 15 °Brix y 35 °C) y el tratamiento 1 (5.7 pH, 10 °Brix y 35 °C).

Tabla 3.11 Análisis de varianza para el grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	26	378.02		
Temperatura	2	1012.72	506.36	2025.43**
°Brix	2	1012.72	506.36	2025.43**
Temp °Brix	4	1122.05	280.51	1122.05**
pH (Temp °Brix)	8	36.44	4.56	18.22**
Error Exp.	16	4.00	0.25	
CV	45.51 %			

Para la variable grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura se observa significancia estadística para el factor temperatura, °Brix, al igual que para la interacción temperatura °Brix, así como; para el factor pH que esta anidado dentro de la combinación del factor temperatura y °Brix.

Se obtuvo un coeficiente de varianza de 45.51 % que es alto lo que indica que existió variabilidad con los datos de la investigación.

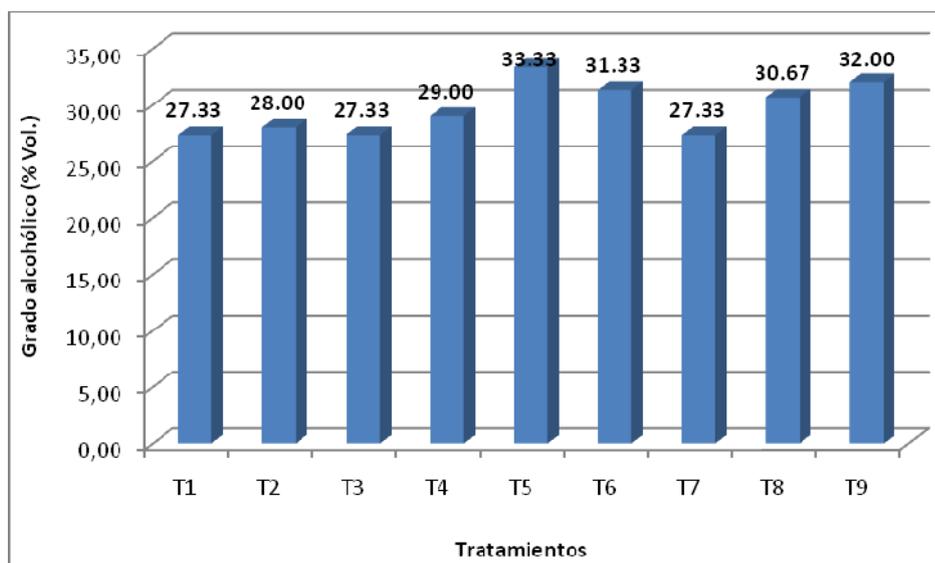


Figura 3.13 Promedio y rangos de significancia para el factor grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura adaptada (LA).

Al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura adaptada (LA) se observa que los tratamientos 1, 2 y 3 tratamientos que se evaluó con un °Brix de 10, 15 y 20 respectivamente a pH de 5.7 y a temperatura de 35 °C el grado alcohólico obtenido al final del proceso de destilación tiende a mantenerse, mientras que en los tratamientos 4, 5 y 6 tratamientos que se evaluó a un °Brix de 10, 15 y 20 respectivamente a 4.7 de pH y 29 °C el grado alcohólico al final del proceso de destilación presenta un pequeño incremento al compararle con los tres tratamientos anteriores pero no muestra una tendencia y en los tratamientos 7, 8 y 9, tratamientos que se evaluó a un °Brix de 10, 15 y 20 respectivamente a 3.7 de pH y a una temperatura de 22 °C el grado alcohólico al final del proceso de destilación es mayor a medida que el °Brix aumenta. El tratamiento 5 presenta el mayor grado alcohólico que se obtuvo al final del proceso de destilación mientras que los tratamientos 1, 3 y 7 presentan el menor grado alcohólico al final del proceso de destilación.

Tukey al 5% de probabilidad para el factor grado alcohólico obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura adaptada (LA) se observa un solo rango de significancia (Figura 3.13), ubicándose en el primer lugar o rango “A” el tratamiento 5 (4.7 pH, 15 °Brix y 29 °C) con 33.33 grados de alcohol (% Vol.) seguido de los tratamientos 9 (3.7 pH, 20 °Brix y 22 °C), 6 (4.7 pH, 20 °Brix y 29 °C), 8 (3.7 pH, 15 °Brix y 22 °C), 4 (4.7 pH, 10 °Brix y 29 °C), 2 (5.7 pH, 15 °Brix y 35 °C), 7 (3.7 pH, 10 °Brix y 22 °C), 3 (5.7 pH, 20 °Brix y 35 °C), y el tratamiento 1 (5.7 pH, 10 °Brix y 35 °C).

Tabla 3.12 Análisis de varianza para el grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	26	10771.18		
Temperatura	2	31714.20	15857.10	1865.54**
°Brix	2	31714.20	15857.10	1865.54**
Temp °Brix	4	31905.53	7976.38	938.40**
pH (Temp °Brix)	8	63.78	7.97	0.94 ^{ns}
Error Exp.	16	136.00	8.50	
CV	29.56 %			

Para la variable grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, se observa significancia estadística para el factor temperatura, °Brix, al igual que para la interacción temperatura °Brix, pero para el factor pH que esta anidado dentro de la combinación del factor temperatura y °Brix no se obtuvo una significancia estadística.

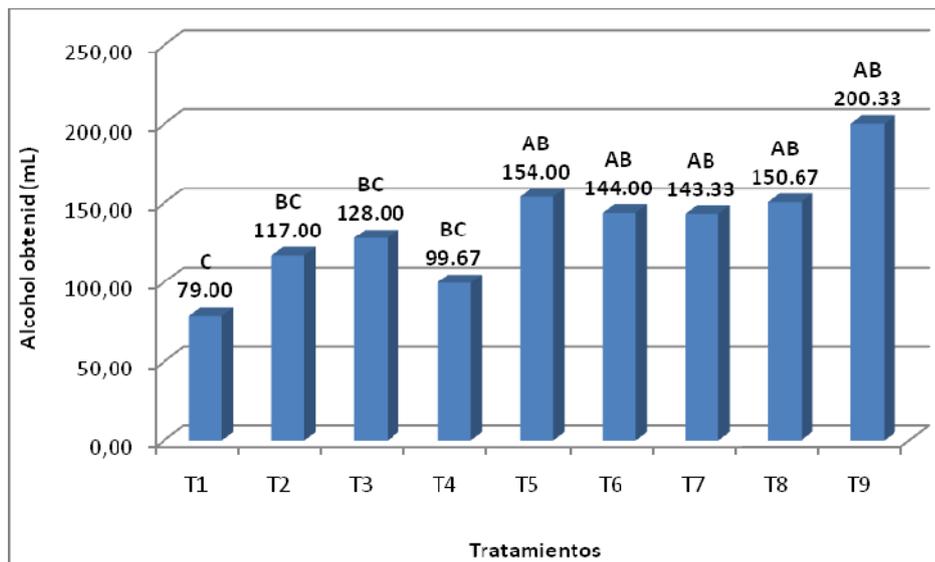


Figura 3.14 Promedio y rangos de significancia para el factor cantidad de alcohol (mL) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura.

Al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por la levadura adaptada (LA) se observa que en los tratamientos 1, 2 y 3 tratamientos que se evaluó con un °Brix de 10, 15 y 20 respectivamente a pH de 5.7 y a temperatura de 35 °C la cantidad de alcohol obtenido al final del proceso de destilación tiende a aumentar al estar presente un mayor número de °Brix. Los tratamientos 4, 5 y 6 tratamientos que se evaluó a un °Brix de 10, 15 y 20 respectivamente a 4.7 de pH y 29 °C la cantidad de alcohol obtenido al final del proceso de destilación presenta un pequeño incremento al compararle con los tres anteriores tratamientos pero estos no muestran una tendencia a incrementar a medida que el °Brix aumenta y finalmente en los tratamientos 7, 8 y 9, tratamientos que se evaluó a un °Brix de 10, 15 y 20 respectivamente a 3.7 de pH y a una temperatura de 22 °C la cantidad de alcohol obtenida es similar a los tres anteriores tratamientos pero superior a los tres primeros tratamientos. El tratamiento 9 presenta la mayor cantidad de alcohol que

se obtuvo al final del proceso de destilación mientras que el tratamiento 1 presenta la menor cantidad de alcohol que se obtuvo al final del proceso de destilación.

Tukey al 5% de probabilidad para el factor cantidad de alcohol (mL) obtenido al final del proceso de destilación, se observa tres rangos de significancia (Figura 3.14), ubicándose en el primer lugar o rango “A” el tratamiento 9 (3.7 pH, 20 °Brix y 22 °C) con 200.33 mL de alcohol seguido de los tratamientos 5 (4.7 pH, 15 °Brix y 29 °C), 8 (3.7 pH, 15 °Brix y 22 °C), 6 (4.7 pH, 20 °Brix y 29 °C) y el tratamiento 7 (3.7 pH, 10 °Brix y 22 °C). En segundo lugar o rango “B” el tratamiento 5 (4.7 pH, 15 °Brix y 29 °C) con 154 mL de alcohol seguido de los tratamientos 8 (3.7 pH, 15 °Brix y 22 °C), 6 (4.7 pH, 20 °Brix y 29 °C), 7 (3.7 pH, 10 °Brix y 22 °C), 3 (5.7 pH, 20 °Brix y 35 °C), 2 (5.7 pH, 15 °Brix y 35 °C) y el tratamiento 4 (4.7 pH, 10 °Brix y 29 °C) y en el tercer lugar o rango “C” el tratamiento 3 (5.7 pH, 20 °Brix y 35 °C) con 128 mL de alcohol seguido de los tratamientos 2 (5.7 pH, 15 °Brix y 35 °C), 4 (4.7 pH, 10 °Brix y 29 °C) y el tratamiento 1 (5.7 pH, 10 °Brix y 35 °C).

Tabla 3.13 Análisis de varianza para la cantidad de alcohol (mL) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	26	256792.81		
Temperatura	2	700965.11	350482.56	668.81**
°Brix	2	700965.11	350482.56	668.81**
Temp °Brix	4	745224.44	186306.11	355.52**
pH (Temp °Brix)	8	14753.11	1844.14	3.52 ^{ns}
Error Exp.	16	8384.67	524.04	
CV	50.83 %			

Para la variable cantidad de alcohol (mL) obtenido al final del proceso de destilación, se observa significancia estadística para el factor temperatura, °Brix, al igual que para la interacción temperatura °Brix, pero para el factor pH que esta

anidado dentro de la combinación del factor temperatura y °Brix no se obtuvo una significancia estadística.

Se obtuvo un coeficiente de varianza de 50.83 % que es alto lo que indica que existió variabilidad con los datos de la investigación.

3.3 Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas.

Al evaluar las condiciones de la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones, se determinó la concentración de glucosa disminuida, °Brix reducidos y grado alcohólico obtenido al finalizar el proceso de fermentación; así como, el grado alcohólico y la cantidad de alcohol obtenidos al finalizar el proceso de destilado (Anexo E). Los tratamientos realizados se identifican a continuación: (Tabla 3.14).

Tabla 3.14 Identificación de los tratamientos realizados para evaluar la fermentación alcohólica por la LAS y la LA con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas.

Tratamientos	Nutriente	Concentración
Tratamiento 1	Urea	0,5 gr/L
Tratamiento 2	Urea	1,0 gr/L
Tratamiento 3	Urea	1,5 gr/L
Tratamiento 4	Acetato de potasio	0,5 gr/L
Tratamiento 5	Acetato de potasio	1,0 gr/L
Tratamiento 6	Acetato de potasio	1,5 gr/L
Tratamiento 7	Fosfato ácido de potasio 3 H ₂ O	0,5 gr/L
Tratamiento 8	Fosfato ácido de potasio 3 H ₂ O	1,0 gr/L
Tratamiento 9	Fosfato ácido de potasio 3 H ₂ O	1,5 gr/L

3.3.1 Análisis estadístico de la evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas.

Para la presentación e interpretación de los resultados el análisis estadístico se lo realizó mediante la Tabla de Análisis de Varianza (ADEVA) y presentaciones graficas.

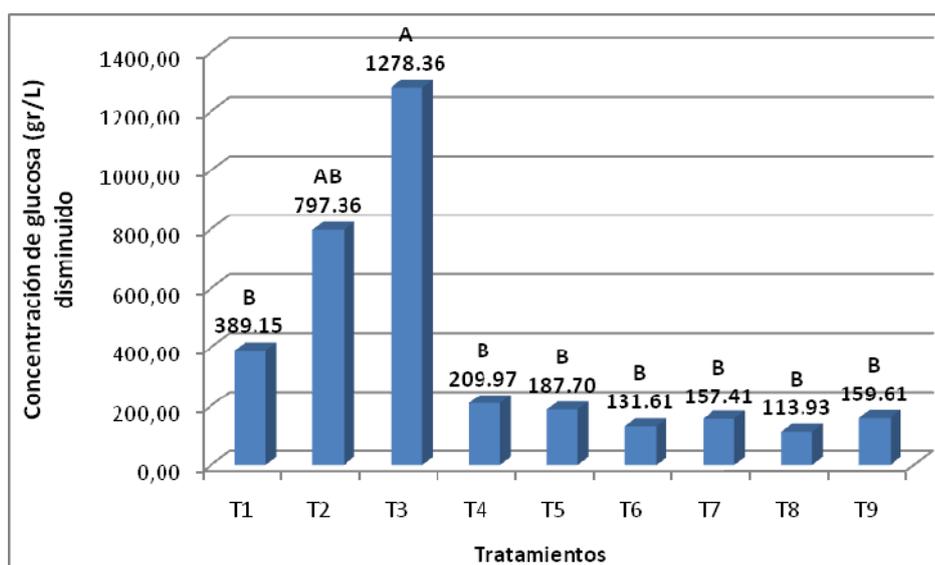


Figura 3.15 Promedio y rangos de significancia para el factor concentración de glucosa (gr/L) disminuida, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutriente a tres concentraciones distintas.

Al evaluar las condiciones de la fermentación alcohólica con la adición de urea, acetato de potasio y fosfato ácido de potasio se obtiene que la disminución en la concentración de glucosa es mayor en los 3 primeros tratamientos, tratamientos que se evaluó con urea; es así que, al aumentar la concentración de urea la disminución en la concentración de glucosa aumenta. En los tratamientos que se evaluó con acetato de potasio la reducción en la concentración de glucosa tiende a decrecer al aumentar la concentración de acetato de potasio y en los tratamientos que se evaluó con fosfato ácido de potasio el descenso en la

concentración de glucosa tiende a mantenerse y no se observa una tendencia a disminuir o aumentar.

El tratamiento 3 que se evaluó con 1,5 gr de urea muestra una mayor disminución en la concentración de glucosa, mientras que el tratamiento 8 que se evaluó con 1 gr de fosfato ácido de potasio presenta la menor disminución en la concentración de glucosa.

Tukey al 5% de probabilidad para el factor concentración de glucosa disminuida, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas se observa dos rangos de significancia (Figura 3.15), ubicándose en primer lugar o rango "A" el tratamiento 3 (1.5 gr de Urea) con 1278.36 gr/L de glucosa disminuido y el tratamiento 2 (1.0 gr de Urea). En segundo lugar o rango "B" se ubica el tratamiento 2 (1.0 gr de Urea) con 797.36 gr/L de glucosa disminuido, seguido de los tratamientos 1 (0.5 gr de Urea), 4 (0.5 gr de Acetato de Potasio), 5 (1.0 gr de Acetato de Potasio), 9 (1.5 gr de Fosfato ácido de Potasio), 7 (0.5 gr de Fosfato ácido de Potasio), 6 (1.5 gr de Acetato de Potasio) y el tratamiento 8 (1.0 gr de Fosfato ácido de Potasio).

Tabla 3.15 Análisis de varianza para la concentración de glucosa (gr/L) disminuida, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	35	7733118.70		
Tratamientos	8	5111244.06	638905.51	7.30**
Concentración	2	444341.24	222170.62	2.54 ^{ns}
Nutrientes	2	3507994.97	1753997.49	20.03**
Conc Nutri	4	1158907.84	289726.96	3.31*
Bloques	3	519939.02	173313.01	1.98 ^{ns}
E. Exp	24	2101935.63	87580.65	
CV		77.76 %		

Para la variable concentración de glucosa (gr/L) disminuida, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas, se observa significancia estadística para los factores tratamientos, nutriente al igual que para la interacción de los factores concentración nutrientes, pero para el factor concentración y bloques no se obtuvo una significancia estadística

Se obtuvo un coeficiente de varianza de 77.76 % que es muy alto lo que indica que existió una variabilidad.

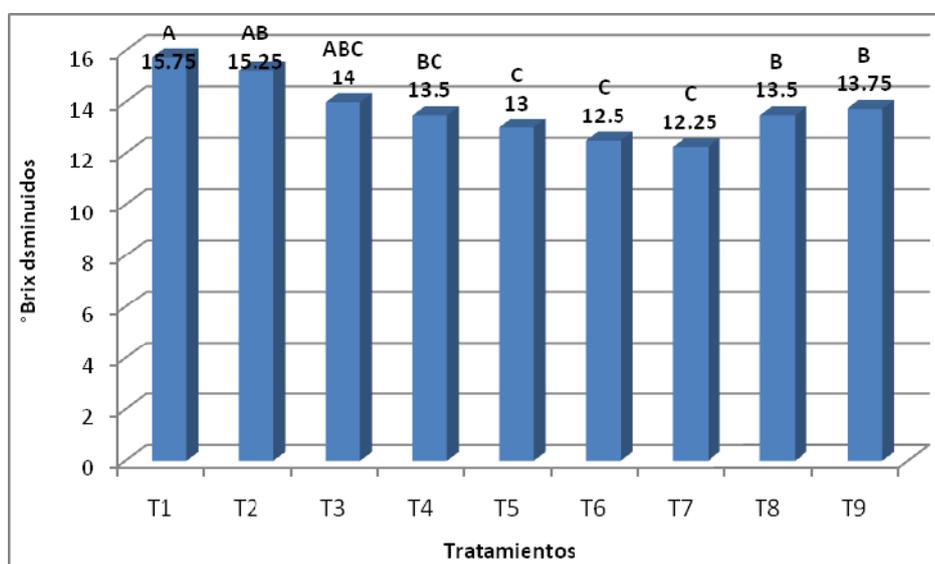


Figura 3.16 Promedio y rangos de significancia para el factor °Brix disminuido, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutriente a tres concentraciones distintas.

La disminución del °Brix es mayor en los 3 primeros tratamientos, tratamientos que se evaluó con urea y se muestra que al aumentar la concentración de este nutriente la disminución en el °Brix desciende. En los tratamientos 4, 5 y 6, tratamientos que se agregó acetato de potasio la reducción en el °Brix es mayor al tener una menor concentración del acetato de potasio, y finalmente en los tratamientos que se adiciono fosfato ácido de potasio presenta un pequeño crecimiento en el °Brix reducido al aumentar la concentración.

El tratamiento 1 que se evaluó con 0,5 gr de urea muestra la mayor disminución en el °Brix, mientras que el tratamiento 5 que se evaluó con 1 gr de acetato de potasio muestra la menor disminución en el °Brix.

Tukey al 5% de probabilidad para el factor número de °Brix disminuidos, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas se observa tres rangos de significancia (Figura 3.16), ubicándose en el primer lugar o rango “A” el tratamiento 1 (0.5 gr de Urea) con 15.75 °Brix disminuidos, seguido de los tratamientos 2 (1.0 gr de Urea) y 3 (1.5 gr de Urea). En segundo lugar o rango “B” se ubica el tratamiento 2 (1.0 gr de Urea) con 15.25 °Brix disminuidos seguido de los tratamientos 3 (1.5 gr de Urea), 9 (1.5 gr de Fosfato ácido de Potasio), 8 (1.0 gr de Fosfato ácido de Potasio) y el tratamiento 4 (0.5 gr de Acetato de Potasio). En tercer lugar o rango “C” el tratamiento 3 (1.5 gr de Urea) con 14 °Brix disminuidos seguido del tratamiento 9 (1.5 gr de Fosfato ácido de Potasio), 8 (1.0 gr de Fosfato ácido de Potasio), 4 (0.5 gr de Acetato de Potasio), 5 (1.0 gr de Acetato de Potasio), 6 (1.5 gr de Acetato de Potasio) y el tratamiento 7 (0.5 gr de Fosfato ácido de Potasio).

Tabla 3.16 Análisis de varianza para el número de °Brix disminuidos, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	35	65.22		
Tratamientos	8	43.22	5.40	8.52**
Concentración	2	1.72	0.86	1.36 ^{ns}
Nutrientes	2	29.56	14.78	23.30**
Conc Nutri	4	11.94	2.99	4.71**
Bloques	3	6.78	2.26	3.56*
E. Exp	24	15.22	0.63	
CV	5.80 %			

Para la variable número de °Brix disminuidos, obtenida al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres

tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas, se observa significancia estadística para los factores tratamientos, nutrientes al igual que para la interacción de los factores concentración nutrientes y para los bloques, pero para el factor concentración no se obtuvo una significancia estadística.

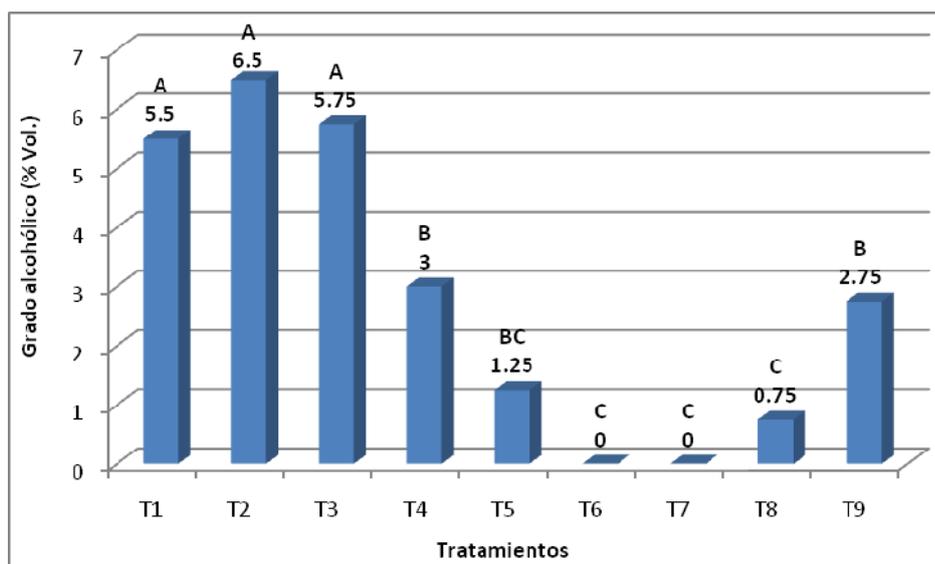


Figura 3.17 Promedio y rangos de significancia para el factor grado alcohólico (%Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas.

El grado alcohólica obtenido al final del proceso de fermentación en los tratamientos que se evaluó con urea es mayor. Estos tratamientos el grado alcohólica al finalizar el proceso de fermentación alcohólica no muestra una tendencia a acrecentar o disminuir al haber una mayor o menor concentración de urea. En los tratamientos 4, 5 y 6 tratamientos que se agregó acetato de potasio el grado alcohólico al final del proceso de fermentación tiende a disminuir al aumentar la concentración del acetato de potasio y finalmente en los tratamientos 7, 8 y 9 tratamientos que se adiciono fosfato ácido de potasio presenta un incremento en el grado alcohólico al haber un aumento en la concentración del fosfato ácido de potasio.

El tratamiento 2 que se evaluó con 1 gr de urea presenta el mayor grado alcohólico al final del proceso de fermentación y los tratamientos 6 y 7 que se evaluó con 1,5 gr de acetato de potasio y 0,5 de fosfato ácido de potasio presentan el menor grado alcohólico.

Tukey al 5% de probabilidad para el factor grado alcohólico (%Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas se observa tres rangos de significancia (Figura 3.17), ubicándose en el primer lugar o rango “A” el tratamiento 2 (1.0 gr de Urea) con 6.5 grados de alcohol (% Vol.) seguido de los tratamientos 3 (1.5 gr de Urea) y el tratamiento 1 (0.5 gr de Urea). En segundo lugar o rango “B” el tratamiento 4 (0.5 gr de Acetato de Potasio) con 3 grados de alcohol (% Vol.) seguido del tratamiento 9 (1.5 gr de Fosfato ácido de Potasio) y el tratamiento 5 (1.0 gr de Acetato de Potasio) y en tercer lugar o rango “C” el tratamiento 5 (1.5 gr de Acetato de Potasio) con 1.25 grados de alcohol (% Vol.) seguido de los tratamientos 8 (1.0 gr de Fosfato ácido de Potasio), 7 (0.5 gr de Fosfato ácido de Potasio) y el tratamiento 6 (1.5 gr de Acetato de Potasio).

Tabla 3.17 Análisis de varianza para el grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	35	225.00		
Tratamientos	8	208.00	26.00	41.29**
Concentración	2	0.00	0.00	0.00 ^{ns}
Nutrientes	2	171.50	85.75	136.19**
Conc Nutri	4	36.50	9.13	14.49**
Bloques	3	1.89	0.63	1.00 ^{ns}
E. Exp	24	15.11	0.63	
CV	28.01 %			

Para la variable grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas, se observa significancia estadística para los factores tratamientos, nutrientes al igual que para la interacción de los factores concentración nutrientes pero para el factor concentración y bloques no se obtuvo una significancia estadística.

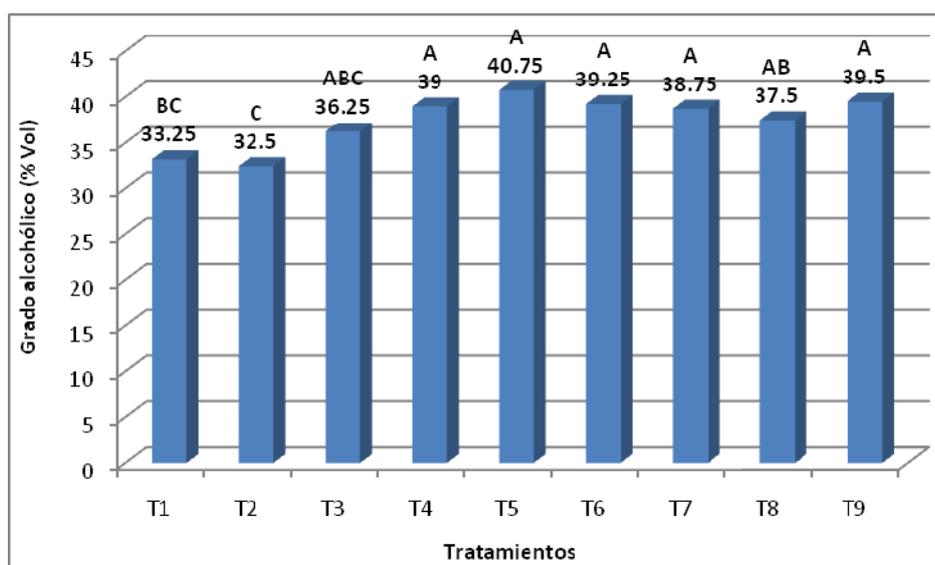


Figura 3.18 Promedio y rangos de significancia para el factor grado alcohólico (%Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutriente a tres concentraciones distintas.

El mayor grado alcohólico que obtuvo al final del proceso de destilación fue con los tratamientos 4, 5 y 6, tratamientos que se evaluó con acetato de potasio. En los tratamientos 1, 2 y 3, tratamientos que se evaluó con urea, el grado alcohólico obtenido al final del proceso de destilación fue el menor.

El tratamiento 5, tratamiento que se evaluó con 1.0 gr de acetato de potasio, es el tratamiento que presenta el mayor grado alcohólico al final del proceso de destilación y el tratamiento 2, tratamiento que se evaluó con 1.0 gr de urea presenta el menor grado alcohólico al final del primer destilado.

Tukey al 5% de probabilidad para el factor grado alcohólico (%Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas se observa tres rangos de significancia (Figura 3.18), ubicándose en el primer lugar o rango “A” el tratamiento 5 (1.0 gr de Acetato de Potasio) con 40.75 grados de alcohol (% Vol.) seguido de los tratamientos 9 (1.5 gr de Fosfato ácido de Potasio), 6 (1.5 gr de Acetato de Potasio), 4 (0.5 gr de Acetato de Potasio), 7 (0.5 gr de Fosfato ácido de Potasio), 8 (1.0 gr de Fosfato ácido de Potasio) y el tratamiento 3 (1.5 gr de Urea). En segundo lugar o rango “B” el tratamiento 8 (1.0 gr de Fosfato ácido de Potasio) con 37.50 grados de alcohol (% Vol.) seguido los tratamiento 3 (1.5 gr de Urea) y el tratamiento 1 (0.5 gr de Urea) y en el tercer lugar o rango “C” el tratamiento 3 (1.5 gr de Urea) con 36.25 grados de alcohol (% Vol.) seguido del tratamiento 1 (0.5 gr de Urea) y el tratamiento 2 (1.0 gr de Urea).

Tabla 3.18 Análisis de varianza para el grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	35	388.75		
Tratamientos	8	264.00	33.00	7.92**
Concentración	2	15.17	7.58	1.82 ^{ns}
Nutrientes	2	217.17	108.58	26.06**
Conc Nutri	4	31.67	7.92	1.90 ^{ns}
Bloques	3	24.75	8.25	1.98 ^{ns}
E. Exp	24	100.00	4.17	
CV	5.46 %			

Para la variable grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas, se observa significancia estadística para los factores tratamientos y nutrientes pero

no se observa significancia estadística para el factor concentración, la interacción de los factores concentración nutrientes y para los bloques.

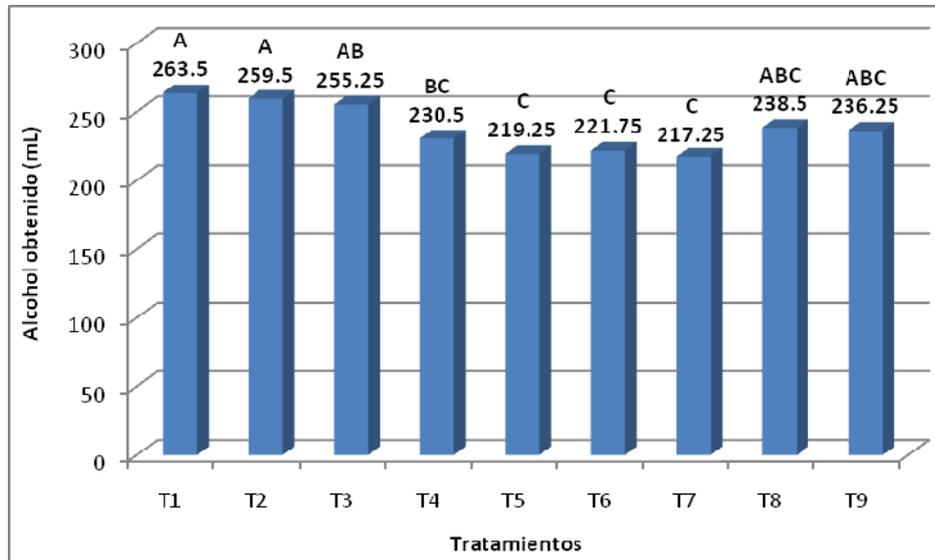


Figura 3.19 Promedio y rangos de significancia para el factor cantidad de alcohol (mL) obtenido al finalizar el proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutriente a tres concentraciones distintas.

El alcohol obtenido al finalizar el proceso de destilación en los tratamientos con urea es mayor. Estos tratamientos 1, 2 y 3 presentan un pequeño descenso en la cantidad de alcohol al haber un incremento en la concentración de urea. En los tratamientos 4, 5 y 6, tratamientos que se evaluó con acetato de potasio y fosfato ácido de potasio, el alcohol obtenido no muestra una tendencia a aumentar al haber una mayor o menor concentración.

El tratamiento 1 que se evaluó con 0,5 gr de urea presenta la mayor cantidad de alcohol obtenido y el tratamiento 5 que se evaluó con 1 gr de acetato de potasio presenta la menor cantidad de alcohol obtenido.

Se realizó el análisis de Tukey al 5% de probabilidad para la cantidad de alcohol (mL) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de

nutrientes a tres concentraciones distintas se observa tres rangos de significancia (Figura 3.19), ubicándose en el primer lugar o rango “A” el tratamiento 1 (0.5 gr de Urea) con 263.5 mL de alcohol, seguido del tratamiento 2 (1.0 gr de Urea), 3 (1.5 gr de Urea), 8 (1.0 gr de Fosfato ácido de Potasio) y el tratamiento 9 (1.5 gr de Fosfato ácido de Potasio). En segundo lugar o rango “B” el tratamiento 3 (1.5 gr de Urea) con 255.55 mL de alcohol seguido del tratamiento 8 (1.0 gr de Fosfato ácido de Potasio), 9 (1.5 gr de Fosfato ácido de Potasio) y el tratamiento 4 (0.5 gr de Acetato de Potasio) y en tercer lugar o rango “C” el tratamiento 8 (1.0 gr de Fosfato ácido de Potasio) con 238.5 mL de alcohol seguido del tratamiento 9 (1.5 gr de Fosfato ácido de Potasio), 4 (0.5 gr de Acetato de Potasio), 6 (1.5 gr de Acetato de Potasio), 5 (1.0 gr de Acetato de Potasio) y el tratamiento 7 (0.5 gr de Fosfato ácido de Potasio).

Tabla 3.19 Análisis de varianza para la cantidad de alcohol (mL) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	35	13594.97		
Tratamientos	8	10063.22	1257.90	9.13**
Concentración	2	24.89	12.44	0.09 ^{ns}
Nutrientes	2	8557.72	4278.86	31.05**
Conc Nutri	4	1480.61	370.15	2.69 ^{ns}
Bloques	3	224.53	74.84	0.54 ^{ns}
E. Exp	24	3307.22	137.80	
CV		4.93 %		

Para la variable cantidad de alcohol (mL) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas, se observa significancia estadística para los tratamientos y nutrientes pero no se observa significancia estadística para el factor concentración, la interacción de los factores concentración nutrientes y para los bloques.

3.3.2 Análisis estadístico de la evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas.

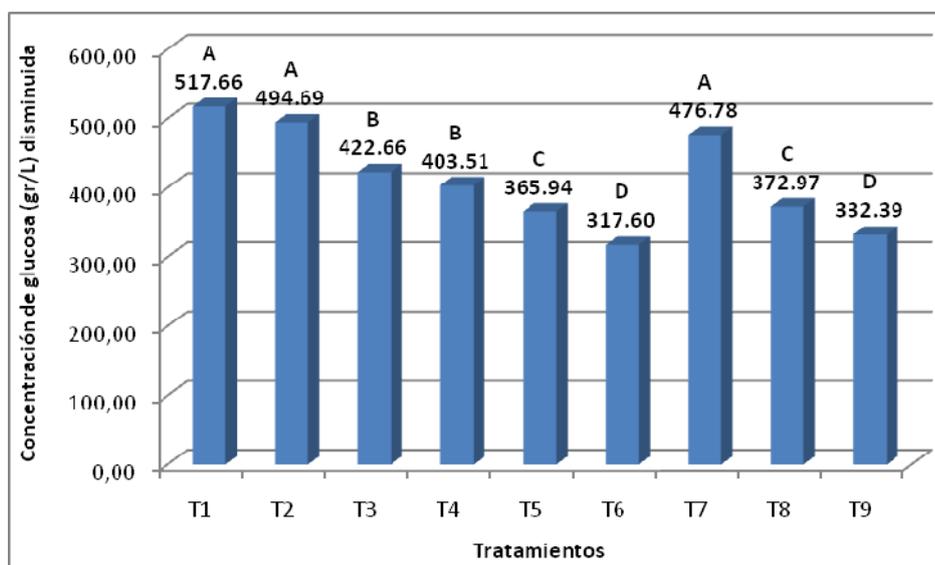


Figura 3.20 Promedio y rangos de significancia para el factor concentración de glucosa (gr/L) disminuida, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutriente a tres concentraciones distintas.

La disminución en la concentración de glucosa (gr/L) es mayor en los tratamientos 1, 2 y 3, tratamientos que se adiciono urea. Estos tratamientos que se evalúo con urea muestran una tendencia a decrecer en la concentración de glucosa al tener una mayor concentración de urea, lo mismo sucede en los tratamientos que se evalúo con acetato de potasio y fosfato ácido de potasio la reducción en la concentración de glucosa tiende a decrecer al aumentar la concentración de acetato de potasio y fosfato ácido de potasio.

El tratamiento 1 que se evalúo con 0,5 gr de urea presenta la mayor disminución en la concentración de glucosa y el tratamiento 6 que se evalúo con 1,5 gr de acetato de potasio presenta la menor disminución en la concentración de glucosa.

Scheffé para el factor concentración de glucosa (gr/L) disminuido, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas se observa cuatro rango de significancia (Figura 3.20), ubicándose en primer lugar o rango A el tratamiento 1 (0.5 gr de Urea) con 517.16 gr/L de glucosa disminuido, seguido de los tratamientos 2 (1.0 gr de Urea), 7 (0.5 gr de Fosfato ácido de Potasio), en segundo lugar o rango B el tratamiento 3 (1.5 gr de Urea) y 4 (0.5 gr de Acetato de Potasio), en tercer lugar o rango C el tratamiento 8 (1.0 gr de Fosfato ácido de Potasio) y 5 (1.0 gr de Acetato de Potasio) y en el último lugar rango D el tratamiento 9 (1.5 gr de Fosfato ácido de Potasio) y el tratamiento 6 (1.5 gr de Acetato de Potasio).

Tabla 3.20 Análisis de varianza para la concentración de glucosa (gr/L) disminuida, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	35	633136.98		
Tratamientos	8	165098.14	20637.27	1.19 ^{ns}
Concentración	2	70548.93	35274.46	2.03 ^{ns}
Nutrientes	2	86243.91	43121.96	2.48 ^{ns}
Conc Nutri	4	8305.30	2076.33	0.12 ^{ns}
Bloques	3	51460.34	17153.45	0.99 ^{ns}
E. Exp	24	416578.49	17357.44	
CV	32.01 %			

Para la variable concentración de glucosa (gr/L) disminuida, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas, no se observa significancia estadística para los tratamientos, concentración, nutrientes, interacción de los factores concentración nutrientes y para los bloques.

Se obtuvo un coeficiente de varianza de 32.01 % que es alto lo que indica que existió un variabilidad en el proceso de fermentación con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas.

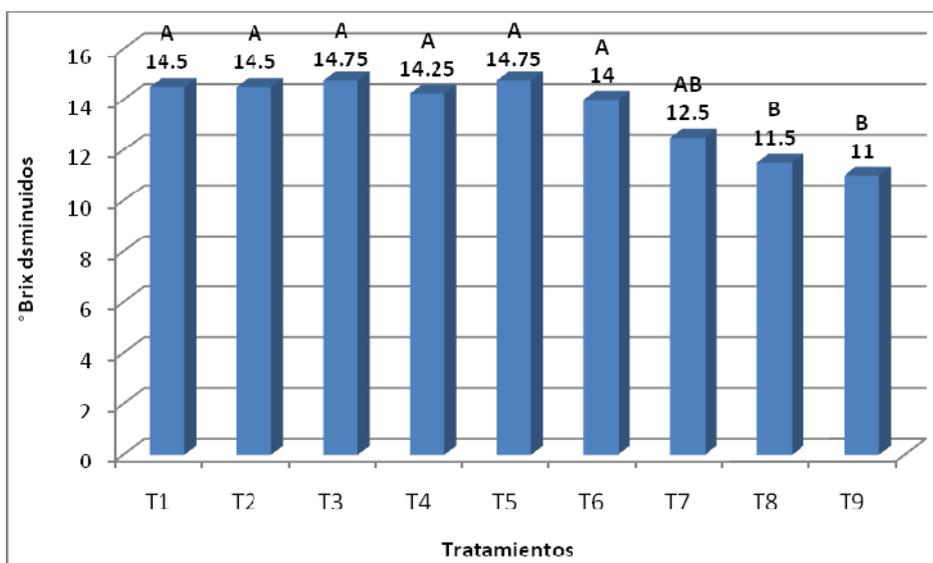


Figura 3.21 Promedio y rangos de significancia del factor °Brix disminuido, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutriente a tres concentraciones distintas.

La disminución del °Brix es mayor en los tratamientos que se adiciono urea y acetato de potasio. Estos tratamientos no muestran una tendencia a aumentar el número de °Brix disminuidos al haber una mayor o menor concentración de estos nutrientes. En los tratamientos que se evaluó con fosfato ácido de potasio el °Brix disminuido tiende a decrecer a medida que la concentración de este nutriente aumenta.

El tratamiento 3 que se evaluó con 1,5 gr de urea y el tratamiento 5 que se evaluó con 1 gr de acetato de potasio presentan el mayor número de °Brix disminuido y el tratamiento 9 que se evaluó con 1,5 gr de fosfato ácido de potasio presenta el menor número de °Brix disminuido.

Tukey al 5% de probabilidad para el factor número de °Brix disminuidos, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas se observa dos rangos de significancia (Figura 3.21), ubicándose en el primer lugar o rango "A" el tratamiento 5 (1.0 gr de Acetato de Potasio) con 14.75 °Brix disminuidos seguido de los tratamientos 3 (1.5 gr de Urea), 2 (1.0 gr de Urea), 1 (0.5 gr de Urea), 4 (0.5 gr de

Acetato de Potasio), 6 (1.5 gr de Acetato de Potasio) y el tratamiento 7 (0.5 gr de Fosfato ácido de Potasio). En el segundo lugar o rango “B” el tratamiento 7 (0.5 gr de Fosfato ácido de Potasio) con 12.5 °Brix disminuidos seguido del tratamiento 8 (1.0 gr de Fosfato ácido de Potasio) y el tratamiento 9 (1.5 gr de Fosfato ácido de Potasio).

Tabla 3.21 Análisis de varianza para el número de °Brix disminuidos, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	35	96.97		
Tratamientos	8	68.72	8.59	8.23**
Concentración	2	1.56	0.78	0.75 ^{ns}
Nutrientes	2	62.72	31.36	30.04**
Conc Nutri	4	4.44	1.11	1.06 ^{ns}
Bloques	3	3.19	1.06	1.02 ^{ns}
E. Exp	24	25.06	1.04	
CV	7.55 %			

Para la variable número de °Brix disminuidos, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas, se observa significancia estadística para los tratamientos y nutrientes, pero no se observa significancia estadística para la concentración, interacción de los factores concentración nutrientes y para los bloques.

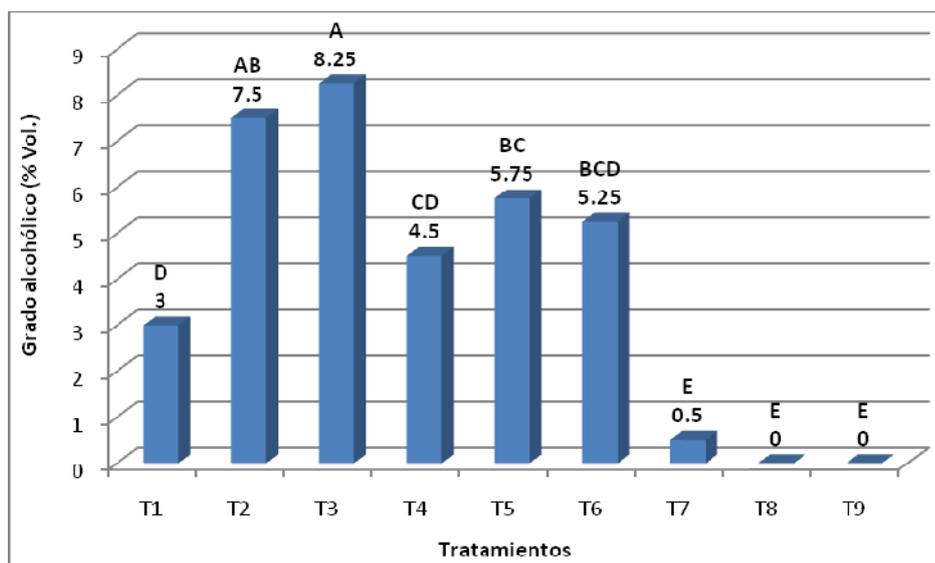


Figura 3.22 Promedio y rangos de significancia para el factor grado alcohólico (%Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutriente a tres concentraciones distintas.

El grado alcohólica obtenido al final del proceso de fermentación en los tratamientos que se evaluó con urea es mayor. Es así que el grado alcohólico en estos tratamientos muestra una tendencia a aumentar a medida que la concentración de urea aumenta. En los tratamientos que se agrego acetato de potasio el grado alcohólico no muestra una tendencia a aumentar o disminuir al haber una mayor o menor concentración de este nutriente y en los tratamientos que se adiciono fosfato ácido de potasio el grado alcohólico disminuye hasta cero al haber un aumento en la concentración.

El tratamiento 3 que se evaluó con 1,5 gr de urea presenta el mayor grado alcohólico obtenido al final del proceso de fermentación y los tratamientos 8 y 9 que se evaluó con 1 gr y 1,5 gr de fosfato ácido de potasio presentar el menor grado alcohólico al final del proceso de fermentación.

En el análisis de Tukey al 5% de probabilidad para el factor grado alcohólico obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes

a tres concentraciones distintas se observa cinco rangos de significancia (Figura 3.22), ubicándose en el primer lugar o rango “A” el tratamiento 3 (1.5 gr de Urea) con 8.25 grados de alcohol (%Vol.) y el tratamiento 2 (1.0 gr de Urea). En segundo lugar o rango “B” el tratamiento 2 (1.0 gr de Urea) con 7.5 grados de alcohol (%Vol.) seguido el tratamiento 5 (1.0 gr de Acetato de Potasio) y el tratamiento 6 (1.5 gr de Acetato de Potasio). En tercer lugar o rango “C” el tratamiento 5 (1.0 gr de Acetato de Potasio) con 5.75 grados alcohol (%Vol.) seguido el tratamiento 6 (1.5 gr de Acetato de Potasio) y el tratamiento 4 (0.5 gr de Acetato de Potasio). En el cuarto lugar o rango “D” el tratamiento 6 (1.5 gr de Acetato de Potasio) con 5.25 grados de alcohol (%Vol.) seguido del tratamiento 4 (0.5 gr de Acetato de Potasio) y el tratamiento 1 (0.5 gr de Urea) y en el quinto y ultimo lugar o rango “E” el tratamiento 7 (0.5 gr de Fosfato ácido de Potasio) con 0.5 grados de alcohol (%Vol.) seguido el tratamiento 9 (1.5 gr de Fosfato ácido de Potasio) y el tratamiento 8 (1.0 gr de Fosfato ácido de Potasio).

Tabla 3.22 Análisis de varianza para el grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	35	350.31		
Tratamientos	8	321.06	40.13	40.04**
Concentración	2	25.72	12.86	12.83**
Nutrientes	2	252.72	126.36	126.07**
Conc Nutri	4	42.61	10.65	10.63**
Bloques	3	5.19	1.73	1.73 ^{ns}
E. Exp	24	24.06	1.00	
CV	25.93 %			

Para la variable grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas, se observa significancia estadística para los tratamientos, concentración, nutrientes y

para la interacción de los factores concentración nutrientes, pero no se observa significancia estadística para los bloques.

Se obtuvo un coeficiente de varianza de 25.93 % que es alto lo que indica que existió una variabilidad en el proceso de fermentación con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas.

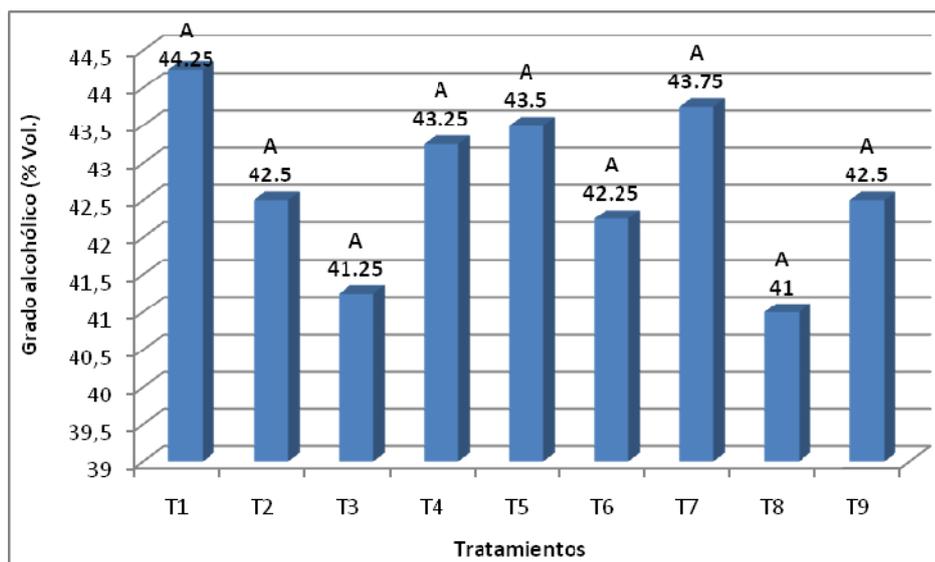


Figura 3.23 Promedio y rangos de significancia para el factor grado alcohólico (%Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutriente a tres concentraciones distintas.

El grado alcohólica obtenido al final del proceso de destilación en los tratamientos con urea es mayor. Estos tratamientos muestra una tendencia a disminuir al haber un incremento en la concentración de urea. Los tratamientos que se agrego acetato de potasio y fosfato ácido de potasio el grado alcohólico no muestra una tendencia a aumentar al tener una mayor o menor concentración del acetato de potasio y fosfato ácido de potasio.

El tratamiento 1 que se evaluó con 0,5 gr de urea presenta el mayor grado alcohólico obtenido al final del proceso de destilación y el tratamiento 8 que se

evalúo con 1 gr de fosfato ácido de potasio presenta en menor grado alcohólico obtenido al final del proceso de destilación.

Tukey al 5% de probabilidad para el factor grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas se observa un rango de significancia (Figura 3.23), ubicándose en primer lugar el tratamiento 1 (0.5 gr de Urea) con 44.25 grados de alcohol (% Vol.) seguido del tratamiento 7 (0.5 gr de Fosfato ácido de Potasio), 5 (1.0 gr de Acetato de Potasio), 4 (0.5 gr de Acetato de Potasio), 9 (1.5 gr de Fosfato ácido de Potasio), 2 (1.0 gr de Urea), 6 (1.5 gr de Acetato de Potasio), 3 (1.5 gr de Urea) y el tratamiento 8 (1.0 gr de Fosfato ácido de Potasio).

Tabla 3.23 Análisis de varianza para el grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	35	145.64		
Tratamientos	8	38.89	4.86	1.15 ^{ns}
Concentración	2	20.72	10.36	2.45 ^{ns}
Nutrientes	2	2.06	1.03	0.24 ^{ns}
Conc Nutri	4	16.11	4.03	0.95 ^{ns}
Bloques	3	5.42	1.81	0.43 ^{ns}
E. Exp	24	101.33	4.22	
CV		4.81 %		

Para la variable grado alcohólico (% Vol.) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas, no se observa significancia estadística para los tratamientos, concentración, nutrientes, interacción de los factores concentración nutrientes y para los bloques.

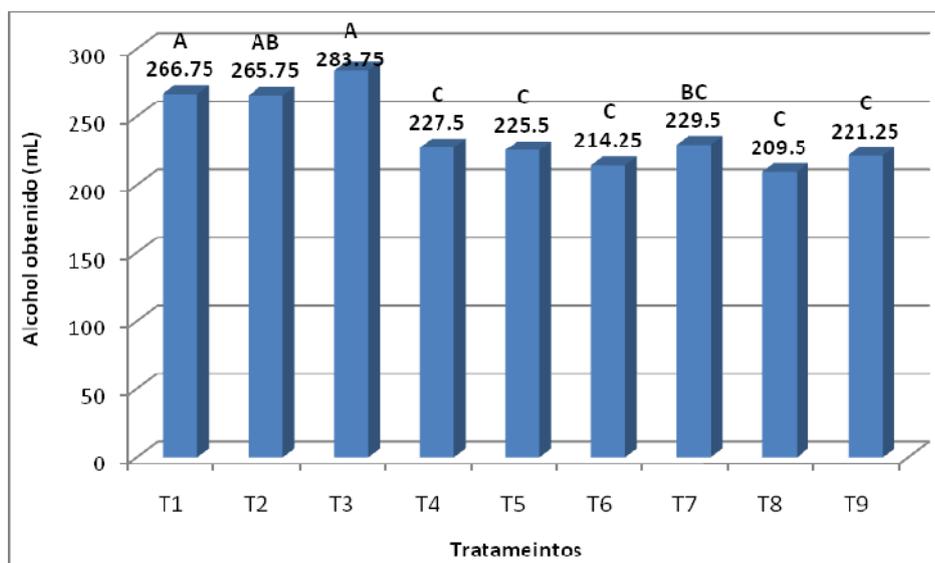


Figura 3.24 Promedio y rangos de significancia para el factor cantidad de alcohol (mL) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutriente a tres concentraciones distintas.

Se obtuvo mayor cantidad de alcohólica al final del proceso de destilación en los tratamientos con urea.

El tratamiento 3 que se evaluó con 1,5 gr de urea presenta la mayor cantidad de alcohol que se obtuvo y el tratamiento 8 que se evaluó con 1 gr de fosfato ácido de potasio presenta la menor cantidad de alcohol que se obtuvo al primer destilado.

Tukey al 5% de probabilidad para el factor cantidad de alcohol (mL) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas se observa tres rangos de significancia (Figura 3.24), ubicándose en el primer lugar o rango "A" el tratamiento 3 (1.5 gr de Urea) con 283.75 mL de alcohol seguido del tratamiento 2 (1.0 gr de Urea) y el tratamiento 1 (0.5 gr de Urea). En el segundo lugar o rango "B" el tratamiento 2 (1.0 gr de Urea) con 265.75 mL de alcohol y el tratamiento 7 (0.5 gr de Fosfato ácido de Potasio) y en el tercer lugar o rango "C" el tratamiento 7 (0.5 gr de Fosfato ácido de Potasio)

con 229.50 mL de alcohol seguido del tratamiento 4 (0.5 gr de Acetato de Potasio), 5 (1.0 gr de Acetato de Potasio), 9 (1.5 gr de Fosfato ácido de Potasio), 6 (1.5 gr de Acetato de Potasio), tratamiento 8 (1.0 gr de Fosfato ácido de Potasio).

Tabla 3.24 Análisis de varianza para la cantidad de alcohol (mL) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F. Cal
Total	35	29775.64		
Tratamientos	8	22739.89	2842.49	12.03**
Concentración	2	396.22	198.11	0.84 ^{ns}
Nutrientes	2	20704.89	10352.44	43.81**
Conc Nutri	4	1638.78	409.69	1.73 ^{ns}
Bloques	3	1363.86	454.62	1.92 ^{ns}
E. Exp	24	5671.89	236.33	
CV	6.45 %			

Para la variable cantidad de alcohol (mL) obtenido al final del proceso de destilación, al evaluar la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas, se observa significancia estadística para los tratamientos, nutrientes, pero no se observa significancia estadística para la concentración, interacción de los factores concentración nutrientes y para los bloques.

3.4 Evaluación de la cantidad de inóculo por litro de sustrato en el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA).

Para evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en el proceso de fermentación alcohólica se utilizó un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña a 3,7 de pH, 20 °Brix con 1 gr, 5 gr, 10 gr 15 gr y 20 gr de LAS en 100 mL de sustrato y 10 mL, 50 mL, 100 mL, 150 mL y 200 mL de levadura adaptada (LA) de inóculo

incubada a una temperatura de 22 °C con agitación. Se evaluó °Brix reducido en un periodo de 8 horas (Anexo C).

Los tratamientos realizados se identifican a continuación: (Tabla 3.25 y tabla 3.26).

Tabla 3.25 Identificación de los tratamientos realizados para evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS).

Tratamientos	Inóculo
Tratamiento 1	1 gr de LAS en 100 mL
tratamiento 2	5 gr de LAS en 100 mL
Tratamiento 3	10 gr de LAS en 100 mL
Tratamiento 4	15 gr de LAS en 100 mL
Tratamiento 5	20 gr de LAS en 100 mL

Tabla 3.26 Identificación de los tratamientos realizados para evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en el proceso de fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA).

Tratamientos	Inóculo
Tratamiento 1	1 mL
tratamiento 2	5 mL
Tratamiento 3	10 mL
Tratamiento 4	15 mL
Tratamiento 5	20 mL

3.4.1 Análisis estadístico para el número de °Brix disminuidos al evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS).

Para la presentación e interpretación de los resultados el análisis estadístico se lo realizó mediante la Tabla de Análisis de Varianza (ADEVA) y presentaciones graficas.

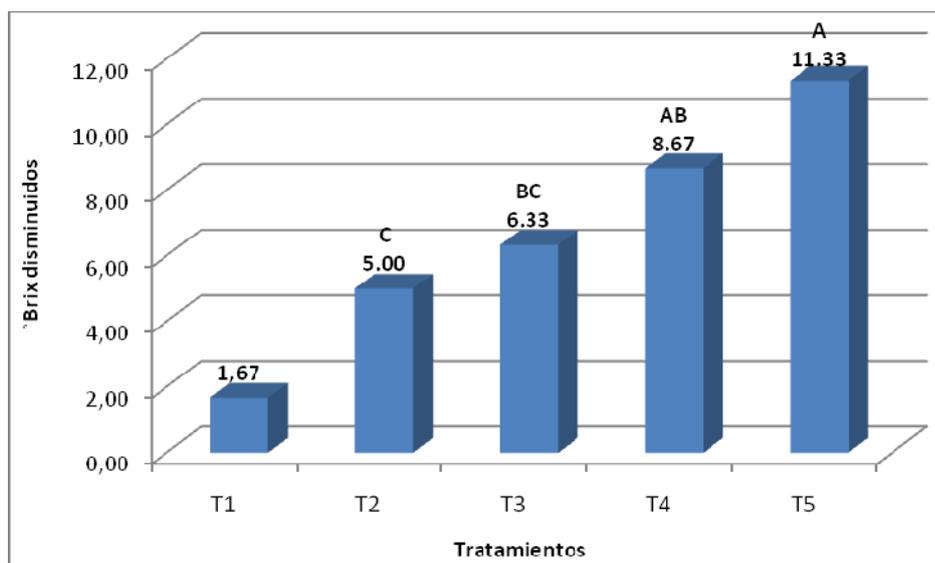


Figura 3.25 Promedio y rangos de significancia para el factor número de °Brix disminuidos en 8 horas, al evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS).

La disminución del °Brix aumenta a medida que la cantidad de inóculo es mayor. Estos tratamientos muestran una tendencia a incrementar el °Brix reducido al haber una mayor cantidad de inóculo. Es así que el tratamiento 5 en donde existe 20 gr de levadura activa seca en 100mL de sustrato el °Brix reducido es mayor que todos los tratamientos.

Tukey al 5% de probabilidad para el factor número de °Brix disminuidos, al evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) se observa tres rangos de significancia (Figura 3.25), ubicándose en el primer lugar o rango "A" el tratamiento 5 (0.2:1 inóculo sustrato) con 11.33 °Brix disminuidos seguido del tratamiento 4 (0.15:1 inóculo sustrato). En segundo lugar o rango "B" el tratamiento 4 (0.15:1 inóculo sustrato) con 8.67 °Brix disminuidos y el tratamiento 3 (0.1:1 inóculo sustrato) y en el tercer lugar o rango "C" el tratamiento 3 (0.1:1 inóculo sustrato) con 6.33 °Brix disminuidos, tratamiento 2 (0.05:1 inóculo sustrato) y el tratamiento 3 (0.1 inóculo sustrato).

Tabla 3.27 Análisis de varianza para el número de °Brix disminuidos, al evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F cal
Total	14	171,60	12,26	
Tratamientos	4	160,93	40,23	37,72**
E. Exp.	10	10,67	1,07	
C.V	15,65 %			

Para la variable número de °Brix disminuidos, al evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS), se observa significancia estadística para los tratamientos. El coeficiente de varianza es de 15,65 % que es bajo lo que indica que existió un buen manejo en el proceso de fermentación alcohólica.

3.4.2 Análisis estadístico para el número de °Brix disminuidos al evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA).

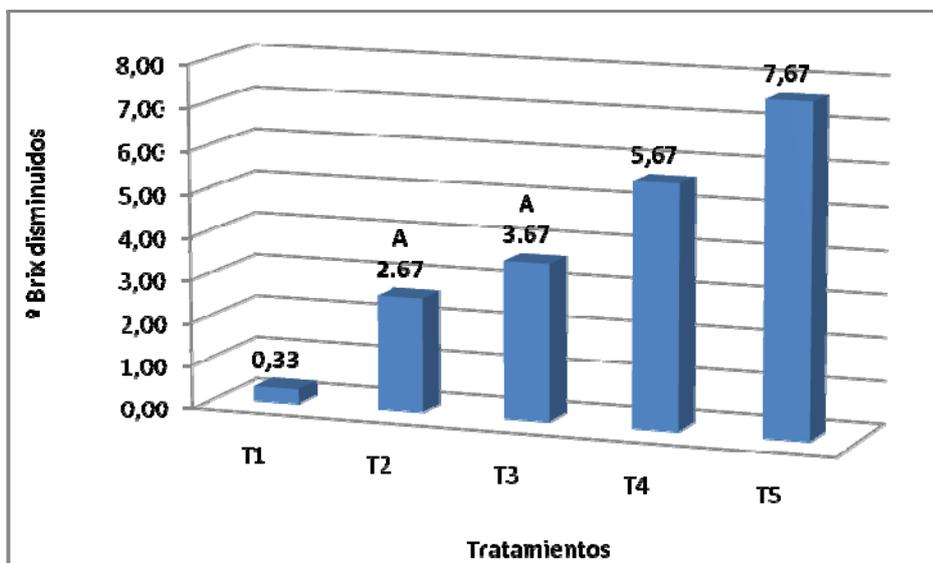


Figura 3.26 Promedio y rangos de significancia para el factor °Brix disminuido en 8 horas, al evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA).

La disminución del número de °Brix aumenta a medida que la cantidad de inóculo es mayor. Los tratamientos muestran una tendencia a incrementar el °Brix disminuido al haber una mayor cantidad de inóculo. El tratamiento 5 que se evaluó con 200 mL de inóculo es el tratamiento que disminuyó el mayor número de °Brix.

Tukey al 5% de probabilidad para el factor número de °Brix disminuidos, al evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) se observa un rango de significancia (Figura 3.26), ubicándose en el primer lugar o rango "A" el tratamiento 3 (0.1:1 inóculo sustrato) con 3.67 °Brix disminuidos y el tratamiento 2 (0.05:1 inóculo sustrato).

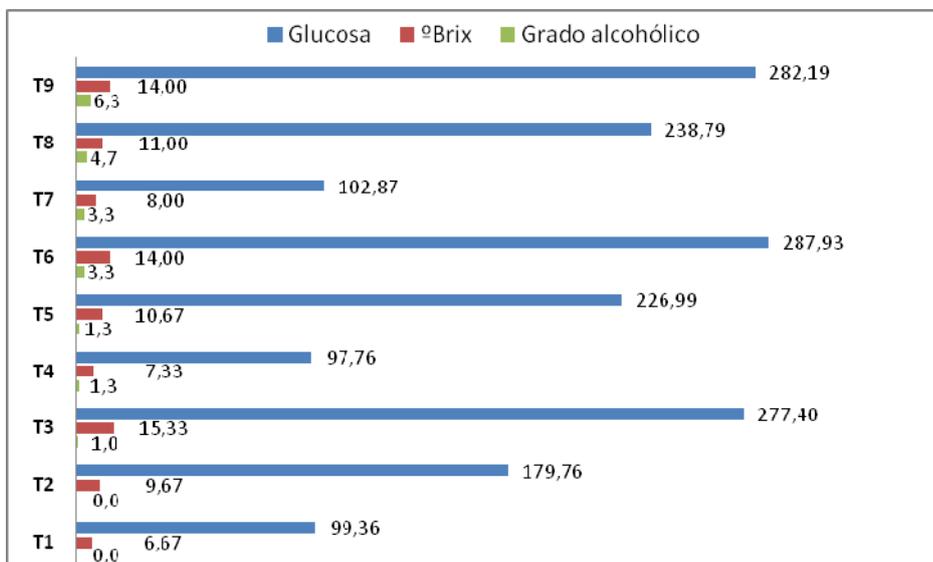
Tabla 3.28 Análisis de varianza para el número de °Brix disminuidos, al evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) en un bioreactor con 1000 mL de jugo de caña. Guaranda – Bolívar 2009.

F de V	GL	SC	CM	F cal
Total	14	100,00	7,14	
Tratamientos	4	94,67	23,67	44,38**
E. Exp.	10	5,33	0,53	
C.V	18,26 %			

Para la variable número de °Brix disminuidos, al evaluar la cantidad de inóculo por litro de sustrato en la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA), se observa significancia estadística para los tratamientos. El coeficiente de varianza es de 18,26 % que es bajo lo que indica que existió un buen manejo en el proceso de fermentación alcohólica.

Los resultados experimentales al evaluar las condiciones de la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) presentan gran diversidad en las variables evaluadas (Figura 3.27). Podemos ver en la Figura 3.27 A) que la concentración de glucosa disminuida es máxima con 287.93 gr/L al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) a 4.7 de pH, 20 °Brix y una temperatura de 29 °C y en la Figura 3.27 B) la concentración de glucosa disminuida es máxima con 265.55 gr/L al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a 5.7 de pH, 20 °Brix y a una temperatura de 35 °C. El mayor número de °Brix disminuidos fue de 15.33 al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) a 5.7 de pH, 20 °Brix y una temperatura de 35 °C (Figura 3.27 A)) y con 15 °Brix disminuidos al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a 3.7 de pH, 20 °Brix y a una temperatura de 22 °C (Figura 3.27 A)).

A)



B)

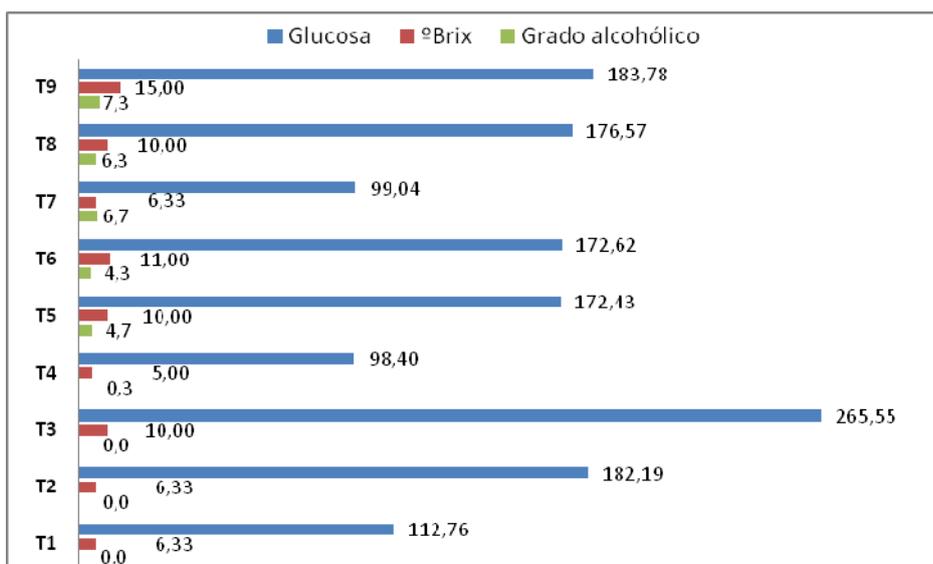


Figura 3.27 Promedio de la concentración de glucosa disminuida (gr/L), número de °Brix disminuidos y el grado alcohólico obtenido al final del proceso de fermentación al evaluar las condiciones de pH, °Brix y temperatura por: A) La levadura activa seca (LAS); B) La levadura adaptada (LA).

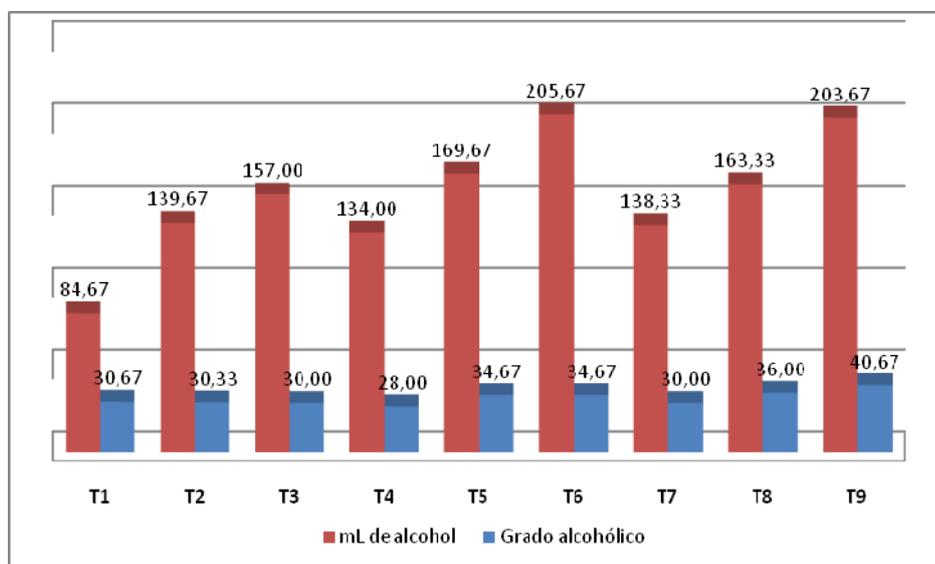
Si comparamos los resultados numéricos podemos ver que, en el control fermentativo que se realizó por el consumo de azúcares (glucosa y °Brix) presenta una alta actividad metabólica para las dos levaduras el haber evaluado el proceso

de fermentación alcohólica con una mayor concentración de azúcares, esta actividad metabólica se aceleró al evaluar el proceso de fermentación a una temperatura de 35 °C, actividad que se vio reflejada en la disminución del tiempo de fermentación

En lo que respecta al grado alcohólico podemos ver (Figura 3.27) que el mayor grado alcohólico obtenido al final del proceso de fermentación es 6.33 (% Vol.) al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) a 3.7 de pH, 20 °Brix y una temperatura de 22 °C y 7.3 (% Vol.) al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a 3.7 de pH, 20 °Brix y una temperatura de 22 °C.

Los datos que se encuentran graficados en la Figura 3.28 demuestran que la producción de etanol para las dos levaduras es menor al evaluar el proceso de fermentación a una temperatura de 35 °C, caso similar ocurre al haber una menor concentración de azúcares (°Brix).

A)



B)

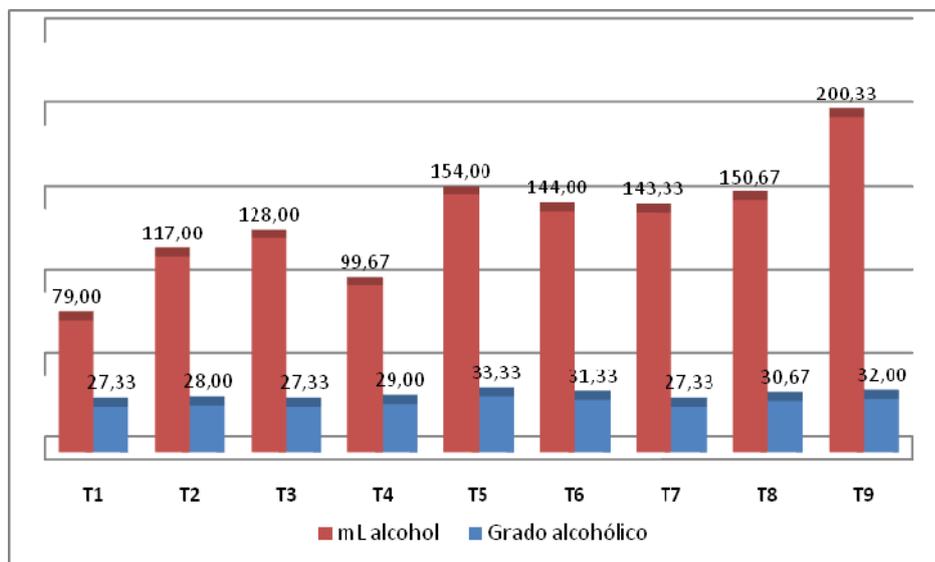
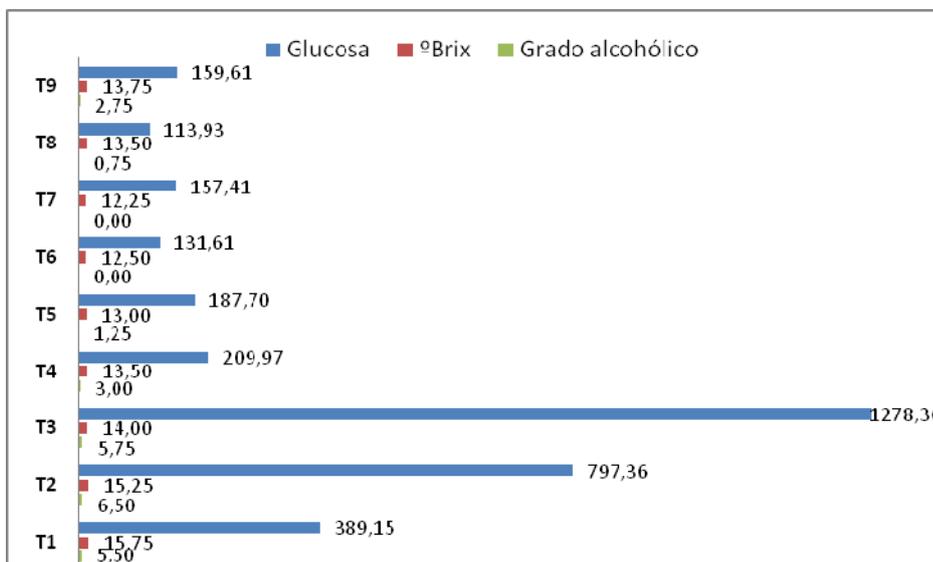


Figura 3.28 Promedio de la cantidad de alcohol y el grado alcohólico obtenido al final del proceso de destilación al evaluar la fermentación alcohólica a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura por: A) La levadura activa seca (LAS); B) La levadura adaptada (LA).

Los resultados obtenidos de la evaluación del proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas se presenta en la Figura 3.29 A) y B) respectivamente. Los ensayos realizados demuestran, que la concentración de glucosa disminuida es mayor con 1278.36 gr/L al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con una concentración de 1.5 gr/L de urea y la concentración de glucosa disminuida es máxima con 517.66 gr/L al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con una concentración de 0.5 gr/L de urea. De igual manera podemos ver (Figura 3.29 A) y B)) que el mayor número de °Brix disminuidos es 15.75 que se obtuvo al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con una concentración de 0.5 gr/L de urea y 14.75 °Brix disminuidos al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con una concentración 1.5 gr/L de urea.

A)



B)

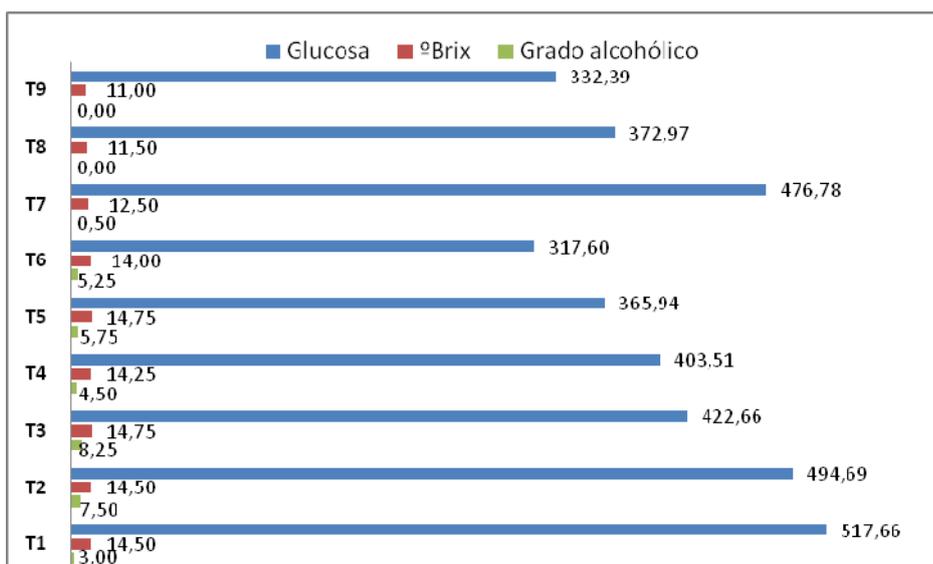


Figura 3.29 Promedio de la concentración de glucosa disminuida (gr/L), número de °Brix disminuidos y el grado alcohólico obtenido al final del proceso de fermentación al evaluar la fermentación alcohólica con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones por: A) La levadura activa seca (LAS); B) La levadura adaptada (LA).

Al comparar los resultados numéricos podemos ver (Figura 3.29) que en el control fermentativo que se realizó por el consumo de azúcares (glucosa y °Brix)

presenta una alta actividad metabólica para las dos levaduras el haber evaluado la fermentación con urea. El principal efecto al evaluar el proceso de fermentación alcohólica con la adición de urea fue, que el tiempo de fermentación se redujo a medida que la concentración de este nutriente aumentaba, este efecto se presentó al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA). Caso contrario sucedió al evaluar el proceso de fermentación alcohólica con el acetato de potasio y fosfato ácido de potasio.

Al comparar los resultados de los tratamientos evaluados por la levadura activa seca (LAS) (Figura 3.29 A) con los resultados de los tratamientos evaluados por la levadura adaptada (LA) (Figura 3.29 B) se observa que la concentración de glucosa (gr/L) disminuida por la levadura activa seca (LAS) aumenta al haber una mayor concentración de urea; mientras que, en la levadura adaptada (LA) la concentración de glucosa (gr/L) disminuida se reduce al haber un aumento en la concentración de urea.

En la evaluación del proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) con acetato de potasio y fosfato ácido de potasio, la reducción en la concentración de glucosa es menor a la que se produjo en los tratamientos que se evaluó con urea para las dos levaduras. Al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) con acetato de potasio y fosfato ácido de potasio, la concentración de glucosa (gr/L) disminuye a medida que la concentración de estos nutrientes aumenta, el mismo efecto se presenta al evaluar el proceso de fermentación en la levadura adaptada (LA). Por otro lado al comparar los resultados de la variable °Brix, se puede observar que el número de °Brix disminuidos al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) se reduce al haber un aumento en la concentración de urea, lo contrario sucede al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) en la que el número de °Brix disminuidos aumenta a medida que la concentración de urea se incrementa. Al hacer referencia a los tratamientos que se evaluó con acetato de potasio, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) se observa que el número de °Brix disminuidos decrece

al haber un aumento en la concentración de acetato de potasio y en los tratamientos que se evaluó con fosfato ácido de potasio el número de °Brix disminuidos aumenta al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) al haber un aumento en la concentración; caso contrario sucede para la levadura adaptada (LA) en la que el número de °Brix disminuidos disminuye al tener una menor concentración de fosfato ácido de potasio.

Con lo que respecta al grado alcohólico podemos ver (Figura 3.29) que el mayor grado alcohólico obtenido al final del proceso de fermentación por la levadura activa seca (LAS) es 6.50 (% Vol.) al evaluar el proceso de fermentación alcohólica con 1 gr/L de urea a 3.7 de pH, 20 °Brix y una temperatura de 22 °C. y 8.25 (% Vol.) al evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) a una concentración de 1.5 gr/L de urea a 3.7 de pH, 20 °Brix y una temperatura de 22 °C.

Al comparar los resultados obtenidos en esta etapa con los obtenidos de la etapa anterior en la que se evaluó las condiciones de pH, °Brix y temperatura en que se realizó la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) se demuestra que al estar presente la urea la disminución en la concentración de glucosa es mayor y el tiempo de fermentación se reduce, caso contrario sucede al evaluar el proceso de fermentación alcohólica con el acetato de potasio y el fosfato ácido de potasio en el que la concentración de glucosa disminuida es menor a la que se evaluó sin nutrientes y el tiempo de fermentación fue mayor. De igual manera el número de °Brix disminuidos fue mayor al evaluar las condiciones de la fermentación alcohólica con urea lo que indica que este nutriente posiblemente esta ayudando a fermentar el azúcar residual, lo contrario se presento al evaluar las condiciones de la fermentación alcohólica con acetato de potasio y fosfato ácido de potasio en el que el número de °Brix disminuido es menor al que se redujo al evaluar las condiciones de pH, °Brix y temperatura.

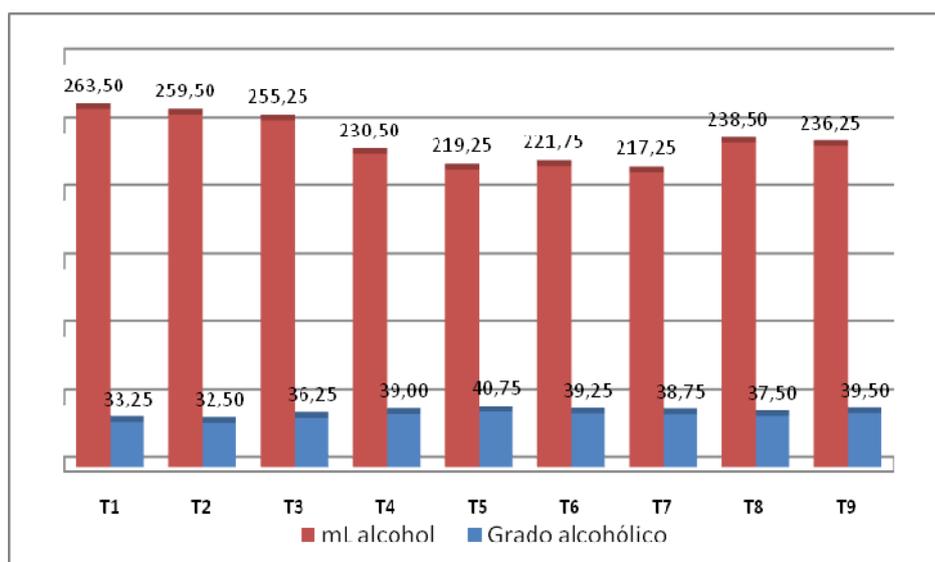
Al realizar la misma comparación de los resultados obtenidos de la evaluación de la fermentación alcohólica por la levadura adaptada (LA) con nutrientes y los obtenidos en la etapa anterior, la concentración de glucosa

disminuida al evaluar el proceso de fermentación alcohólica con urea, acetato de potasio y fosfato ácido de potasio es mayor a la concentración de glucosa disminuida al evaluar las condiciones de la fermentación alcohólica sin nutrientes a 3.7 de pH, 20 °Brix y a una temperatura de 22 °C. Para el caso de la variable °Brix, el mayor número de °Brix disminuido fue el que se obtuvo al evaluar el proceso de fermentación alcohólica sin nutriente.

Al comparar los resultados obtenidos en la variable grado alcohólico obtenido al final del proceso de fermentación, al evaluar las condiciones de la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS), se demuestra que el mayor grado alcohólico obtenido al final del proceso de fermentación fue el que se evaluó con urea, el mismo resultado se obtuvo para la levadura adaptada (LA).

En la Figura 3.30 A y B se observa que la efectividad de la adición de nutriente varía dependiendo de que nutriente se uso y cuanto se añadió, siendo la urea el que presenta una mayor activación fermentativa. El acetato de potasio y el fosfato ácido de potasio, en cambio; son los nutrientes que produjeron una baja en la activación de la fermentación, pero al comparar con los resultados obtenidos en la etapa anterior se observa, que la adición de nutrientes independiente del tipo de nutriente que se uso mejoro la capacidad de transformación de los azucares a etanol, ya que se obtuvo más alcohol a un grado alcohólico mayor.

A)



B)

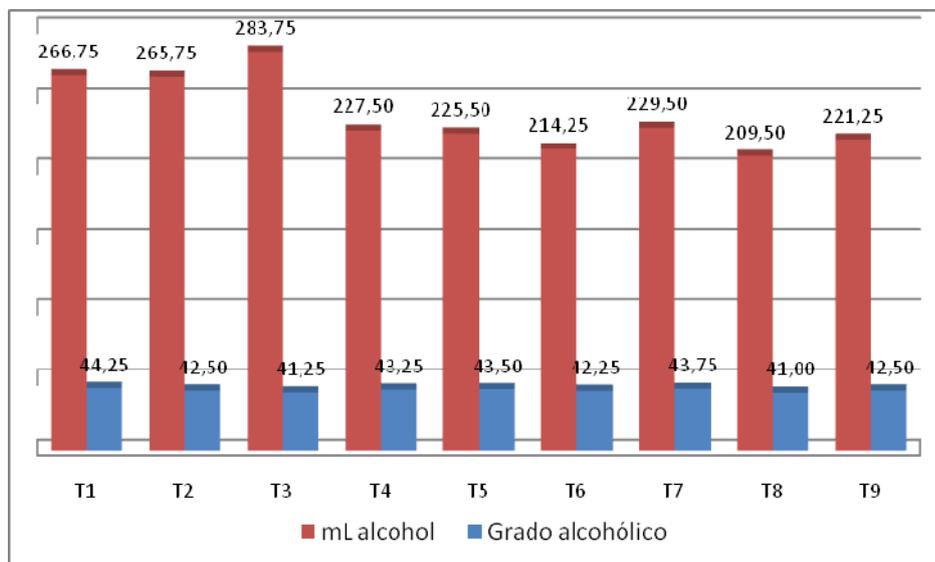


Figura 3.30 Promedio de la cantidad de alcohol y el grado alcohólico obtenido al final del proceso de destilación al evaluar el proceso de fermentación alcohólica con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones por: A) La levadura activa seca (LAS); B) La levadura adaptada (LA).

La levadura con la cual se obtuvo una mayor cantidad de alcohol así como un mayor grado alcohólico al evaluar el proceso de fermentación alcohólica con la adición de nutrientes a tres concentraciones distintas es la levadura adaptada al evaluar el proceso de fermentación alcohólica con urea.

Además de evaluar las condiciones de la fermentación alcohólica con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones diferentes se evaluó la cantidad de inóculo en el proceso de fermentación alcohólica para reducir el tiempo de fermentación. En la Figura 3.31 se presenta el número de °Brix disminuidos por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) en un periodo de 8 horas.

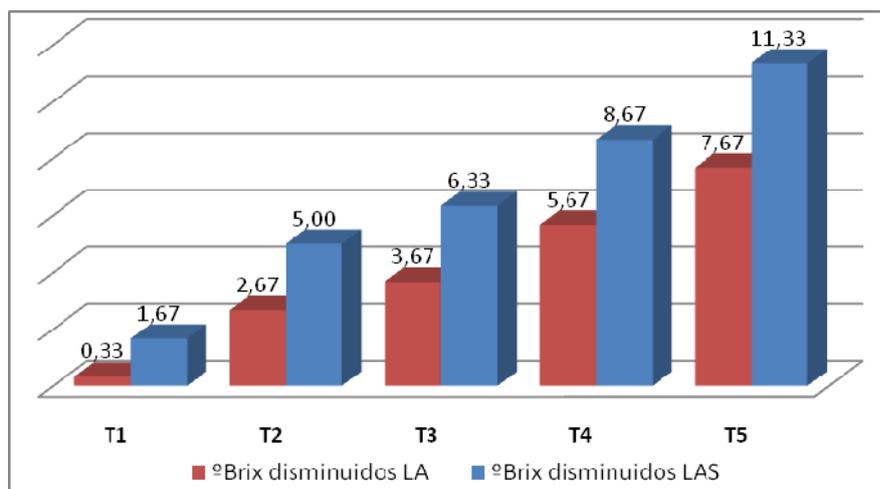


Figura 3.31 Promedio del número de °Brix disminuidos al evaluar el proceso de fermentación alcohólica con la adición de cinco diferentes cantidades de inóculo por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA).

Como podemos observar (Figura 3.31) la cantidad de inóculo agregado determina el número de °Brix disminuido en un periodo de 8 horas, a mayor cantidad de inóculo mayor es el número de °Brix disminuidos. En cuanto al rendimiento en el proceso fermentativo, este presenta diferencias al utilizar distintas tasas de inoculación, en el caso de la levadura adaptada al utilizar 10 mL de inóculo en 1000 mL de sustrato, el número de °Brix disminuidos es menor a 1, esto demuestra que el rendimiento de la fermentación es muy lento con esa cantidad de inóculo, caso contrario sucede al utilizar 200 mL de inóculo en 1000 mL de sustrato, el número de °Brix disminuidos es 6.67. Este resultado se expresa tanto para la levadura adaptada (LA) como para la levadura activa seca (LAS).

La levadura que presenta el mayor número de °Brix disminuidos en un periodo de 8 horas al evaluar el proceso de fermentación alcohólica con la adición de cinco cantidades de inóculo es la levadura activa seca (LAS) con 11.33 °Brix disminuidos.

CAPITULO 4: DISCUSIÓN

Las levaduras que han venido de un proceso de adaptación, se han utilizado con excelentes resultados en diferentes procedimientos, obteniendo productos de calidad (Torija, 2002). El producto final depende de la naturaleza específica de la levadura que se desarrolla durante el proceso de adaptación o de la fermentación del mosto.

A pesar que existen levaduras comerciales que se pudieron utilizar para evaluar el procesos de fermentación, se utilizo levaduras que descendieron de un proceso de adaptación de la zona donde se utilizó, lo que según Fleet & Heard, (1993) lo conocen como levaduras locales seleccionadas, ya que se entiende que las levaduras que vienen de un proceso de adaptación son: específicas del área, adaptadas a las condiciones climáticas de la zona como a la materia prima, acopladas a las condiciones del mostos con alto o bajo contenido en azúcares, así como; al grado alcohólico, temperatura de fermentación, etc. (Martini & Martini, 1999).

Los resultados expuestos en la primera fase, revelan que el proceso de adaptación que se utilizo fue adecuado para esta investigación, a pesar que existen otros procesos de adaptación más complejos y costosos. El objetivo principal de la adaptación, fue que la levadura comercial se acople al mosto por fermentar, así como; hacer que la levadura crezca dentro de un medio líquido bajo condiciones controladas.

Al iniciarse el proceso de adaptación, se comprobó que el pH del sustrato descendía del rango 4.7 – 4.5 a 4.2 – 3.6 en dos horas, este descenso del pH influye en el crecimiento y fisiología de las levaduras. *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo que crece en un rango amplio de pH, pero esta capacidad de adaptación a cambios en el pH extracelular, puede deberse a la capacidad eficiente para mantener la homeostasis de pH intracelular o a que posee un sistema de regulación génica capaz de controlar la síntesis de enzimas extracelulares, permeasas y metabolitos que son secretadas al medio. Dicho sistema entra en funcionamiento en respuesta a variaciones en el pH, lo cual asegura que solo se produzca las proteínas en las condiciones de pH ambiental existente (Serrano, 2006).

Este descenso en el pH, posiblemente es consecuencia del uso del ácido sulfúrico en la preparación del sustrato y que la capacidad iónica de este ácido afecta al pH del medio, pero en el ciclo 17 la preparación del sustrato se realizó con ácido cítrico, este cambio de ácido no produjo ninguna variación en el descenso del pH, a pesar que la capacidad iónica es menor a la del ácido sulfúrico.

La adición de ácido sulfúrico en los procesos de fermentación alcohólica, reducen la población de levaduras silvestres en el mosto y de esta manera favorecen la predominancia de *Saccharomyces cerevisiae* (García et al. 1995).

El trabajo experimental del proceso de adaptación y los datos que se pudieron extraer de esto, demuestran que la levadura ante una exposición a un medio ligeramente ácido, la levadura, bacterias y otros microorganismos presentes en el mosto, ponen en marcha toda una serie de mecanismos para poder sobrellevar los inconvenientes de la “alcalinización”. Los posibles mecanismos según Serrano (2006) que utiliza la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para regular el pH siendo el principal microorganismo presente en el proceso de adaptación son: 1) Regular la salida de la ATPasas de protón de membrana plasmática Pma1 para acelerar la salida de protones al medio, 2) degradar polifosfatos, lo que genera la liberación de fosfato generando a su vez protones y 3) acelerar la degradación de los azúcares para generar compuestos de naturaleza ácida.

En la adaptación de la levadura, el control fermentativo se realizó por el consumo de azúcares (°Brix), la disminución del °Brix en los ciclos del proceso de adaptación no son regulares, esto según Paulino et al, (2005) expresan que existe otras variables que afectan al proceso de adaptación como: transporte de los nutrientes al interior de la célula, actividad y eficiencia de las diferentes vías metabólicas implicadas en la fermentación, etc.

La temperatura fue otro factor que se tomó en cuenta en el proceso de adaptación. La temperatura a la cual se trabajó fue de 28 °C (temperatura considerada óptima), ya que tiene influencia tanto en el desarrollo de los microorganismos como en el producto final (Nagel & Herrick, 1989). Esta temperatura influye 1) en el crecimiento de las levaduras, 2) en la importancia

de unas determinadas especies respecto a otras, y 3) en las reacciones bioquímicas del metabolismo de las levaduras (Fleet & Heard, 1993).

El siguiente paso tras un proceso de adaptación fue estudiar la fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) a diferentes condiciones de pH, °Brix y temperatura.

Del proceso de adaptación se comprobó que el pH del sustrato descendía en un rango 0.5 – 0.9 en un lapso de dos horas, este descenso en el pH creo la necesidad de preparar soluciones amortiguadoras, con el propósito de controlar esta reducción, para lo cual se utilizo ácido acético y acetato de potasio.

En el proceso de evaluación de las condiciones de pH, °Brix y temperatura el aumento en la velocidad de fermentación se debe a la disminución de la fase de latencia al haber un incremento en la temperatura. (Ribéreaun-Gayon et al., 2000). Así como aumenta la velocidad de consumo de azúcares por la temperatura, el tiempo de fermentación también es menor al tener una menor concentración de azucares (°Brix). Los procesos de fermentación evaluados a temperaturas bajas, presentan ventajas al tener un mayor control del proceso, pero pueden presentar paradas de fermentación. Las paradas de fermentación tienen lugar cuando existe un consumo más lento del azúcar del mosto que esta fermentado. Esta caída en el consumo de azúcares indica que existen condiciones fisiológicas o ambientales adversas. Según algunos autores esta baja en el consumo de azucares se debe a muchos factores:

- Altas concentraciones de etanol
- Temperaturas extremas
- Residuos de pesticidas
- Deficiencia de algún tipo de nutriente
- Toxicidad de ácidos grasos
- Falta de agitación
- Falta de oxigenación
- Altas concentraciones de SO₂, etc (Bisson, 1999; Watson, 1987; Ribéreaun-Gayon et al., 2000).

La combinación de algunos de estos factores, provocan una mayor inhibición del crecimiento y por tanto, de la fermentación (Watson, 1987).

La temperatura tiene influencia directa en el proceso de fermentación, ya que afecta la fluidez de la membrana plasmática y por tanto al transporte (Watson, 1987). Las bajas temperaturas reducen la fluidez y restringen el transporte, mientras que las temperaturas altas provocan lo contrario, es decir aumentan la fluidez lo que puede resultar en una excesiva disociación de las estructuras y un menor control de la permeabilidad de los sustratos por parte de la membrana (Bisson, 1999).

La temperatura y el pH tiene gran efecto en las levaduras, que son los que llevan a cabo la fermentación como en el producto final que se puede obtener, lo cual explica que al medir el grado alcohólico al final del proceso de fermentación la densidad de los productos que se formaron en lugar del etanol afectan al proceso de medición del grado alcohólico. Además cuando la riqueza alcohólica aumenta, la probación de las levaduras mueren y se van sustituyendo por poblaciones dominantes de *Saccharomyces cerevisiae* particularmente del tipo *ellipsoideus*, *chevalieri* y *T. delbrueckii* que esta última es la que presenta más resistencia. Al terminarse la fermentación alcohólica predominan las cepas altamente resistentes al alcohol como *S. bayanus* y cepas de *S. cerevisiae*. Este patrón de sucesión esta influenciado por las condiciones en que se lleva la fermentación alcohólica como son la temperatura y el pH; por ejemplo, a una temperatura de 25 °C y un pH de 3.0 – 3.5 las cepas *Saccharomyces cerevisiae* domina la fermentación, mientras que a 20 °C algunas especies de *S. cerevisiae* y *K. apiculata* sobreviven hasta el final de la fermentación (Garcia et al., 1995).

La baja producción de etanol al evaluar el proceso de fermentación alcohólica a una temperatura de 35 °C, puede deberse sobre todo porque las altas temperaturas activan el metabolismo de las levaduras y por lo tanto aceleran la glucólisis, lo que aporta a una mayor producción de piruvato. Este piruvato al inicio de la fermentación alcohólica no puede ser transformado a etanol porque las células presentan una actividad muy baja de las enzimas piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa y porque el acetaldehído formado se combina con el anhídrido sulfúrico, por lo que se forman otros

productos en lugar del etanol. Estos suelen ser los procedentes de la fermentación gliceropirúvico (Boulton, 1996).

Las bajas temperaturas favorecen a una mayor concentración de etanol, debido a que las vías metabólicas a temperaturas bajas funcionan a una velocidad menor y por tanto, el proceso metabólico no se satura en las primeras fases de la fermentación como ocurre a altas temperaturas (Boulton, 1996).

La levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) tienen una mejor capacidad fermentativa a 3.7 de pH, 20 °Brix y a una temperatura de 22 °C. Al comparar el proceso de fermentación alcohólica entre estas dos levaduras, la levadura activa seca (LAS) es la que mejor fermenta porque del proceso de fermentación que realizó se obtuvo un mayor grado alcohólico así como una mayor cantidad de alcohol.

El paso siguiente tras un proceso de evaluación de las condiciones de pH, °Brix y temperatura, fue evaluar el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) con la adición de tres tipos de nutrientes a tres concentraciones distintas. Esta etapa del proyecto de investigación se desarrolló para conocer el efecto que tienen en el desarrollo de la fermentación alcohólica la fuente de nutriente y la concentración. En la evaluación del proceso de fermentación alcohólica, se utilizó: urea como fuente de nitrógeno, acetato de potasio como fuente de potasio y fosfato ácido de potasio como fuente de fósforo. Con el objeto de intentar discernir el efecto de estos nutrientes en la fermentación alcohólica se realizaron fermentaciones a diferentes concentraciones.

La velocidad de las fermentaciones con nutrientes dependió de la concentración de urea, acetato de potasio y fosfato ácido de potasio extracelular que se adicionó. Este aumento en la velocidad de la fermentación para el caso de la urea se debió a un efecto favorable para las levaduras pero para el caso del ácido acético y fosfato ácido de potasio se debió a un efecto negativo, lo que se vio reflejado en la disminución de la velocidad de la fermentación lo que según Torija (2002) se debe a un retardo en la fase de latencia.

Numeroso factores condicionan la asimilación de los nutrientes por la levadura: la temperatura, concentración de azúcares que cuando mas azúcares esta presente en el mosto mayor es la demanda de nutriente (Flanzy. 2003).

La adición de dosis de fosfato disminuye el consumo y la degradación de la arginina así como la disminución de poliaminas. Estos compuestos son perjudiciales para la salud (Flanzy. 2003).

La levadura puede obtener para sus reacciones el nitrógeno que necesita de una gran cantidad de fuentes, tanto de origen orgánico como inorgánico. Esta amplia gama de fuentes de nitrógeno no siempre garantizan la correcta nutrición de la levadura durante la fermentación (Granes et al., 2006). Los niveles de las fuentes de nitrógeno orgánicos en el mosto dependen de varios factores, como la temperatura, el cultivo, mosto que esta fermentando, etc. La tasa de absorción de las fuentes de nitrógeno depende del tipo de nutriente que se trata, ya que algunos son metabolizados antes que otros. Esta tasa depende del contenido de nitrógeno inorgánico presente en el mosto, pues las levaduras según Flanzy. (2003) muestran una tendencia a hacer uso de el por sobre el nitrógeno orgánico.

El empleo de urea como fuente de nitrógeno, si bien puede ser metabolizado por las levaduras tiene un gran inconveniente de ser el precursor en la formación de etil-carbonato o uretano (Flanzy. 2003).

El nitrógeno afecta muy significativamente a la evolución de la fermentación en forma cualitativa como cuantitativa (Gonzalo. 1988). Cabe señalar que las paradas fermentativas, así como la producción de compuestos azufrados, carbonato de etilo son procesos estrechamente vinculados a la composición nitrogenada del mosto por fermentar. El nitrógeno facilita el desarrollo de los microorganismos al suministrar los elementos necesarios para la síntesis de las proteínas y ácidos nucleicos. De hecho un adecuado suministro de este nutriente favorece un aumento en la tasa de crecimiento y a la vez estimula la fermentación. La presencia de elevadas concentraciones de nitrógeno no mejora la calidad de los productos, se debe partir de una concentración de nutriente mínima con el propósito de que esta sea asimilable según la calidad de azúcar fermentable. La fracción de nitrógeno asimilable interviene en la formación de alcoholes superiores que se forma a partir de los correspondientes aminoácidos y la síntesis de los esteres etílicos de los ácidos

grasos esta ligada a la producción de alcohol y a la demanda de ácidos grasos que a su vez esta ligada al contenido de nitrógeno del mosto. Por otro lado cuando se produce un déficit de nitrógeno durante la fermentación la formación de sulfuros se estimula, este fenómeno se incrementa si en el mosto existen sulfitos (García et al., 1995).

El potasio juega un papel primordial en las levaduras ya que el contenido de potasio en los mostos es mayor que el de los otros minerales y es quien ayuda en la regulación de los flujos de intercambio de otros iones en las células de levaduras (Palacios et al., 2005).

El nitrógeno es un macronutriente básico para el desarrollo de las levaduras. Los sistemas de transporte se basan en la presencia de enzimas, las cuales dependen de la presencia de nitrógeno en el mosto por fermentar. El nitrógeno participa en el crecimiento de las levaduras, en la velocidad de transporte de los azúcares durante el desarrollo de la fermentación así como en la continuación de la fermentación cuando el crecimiento a cesado así como en la protección de las levaduras al estrés osmótico y de la toxicidad causada por el alcohol como producto de la fermentación. La concentración de nitrógeno afecta a la formación del producto según trabajos realizados Rapp & Versini trabajo que fue citado por Paladino et al., (2004) indica que cuando un mosto es adicionado con $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ se produce un aumento en el contenido de esteroides y una disminución de los alcoholes superiores, mejorando la característica aromática del producto. La baja concentración de nitrógeno en los mostos se asocia con fermentaciones lentas, mayor duración de la fermentación, baja velocidad de fermentación y desarrollo de olores desagradables.

Una inadecuada concentración de nitrógeno limita la fermentación reduciendo el crecimiento, esto trae como consecuencia la disminución de la glicolisis. Esta reducción en la glicolisis se expresa en una disminución del transporte de los azúcares en la célula lo que ocasiona que las enzimas que intervienen en el transporte tienen un tiempo de vida media de 6 horas y su síntesis se detiene con poca concentración de nitrógeno. El exceso de nitrógeno genera cantidades elevadas de nitrógeno residual, lo que implica inestabilidad microbiana del producto y elevadas concentraciones de carbonato

de etilo, que es un potencial carcinógeno cuando se administra en dosis elevadas (Paladino et al., 2004)

La levadura suele encontrar en el mosto los compuestos nitrogenados suficientes para el desarrollo. En un medio que contiene nitrógeno mineral, los aminoácidos no son necesarios para la levadura, ya que estos pueden ser sintetizados. En realidad, su presencia permite una mayor multiplicación de la levadura, lo que garantiza un buen desarrollo de la fermentación alcohólica (Mangas. 1998).

La cantidad de inóculo en el proceso de fermentación alcohólica es un punto de control porque determina el tiempo de fermentación y con ello la calidad del producto.

CAPITULO 5: CONCLUSIONES

Utilizando el método de adaptación se consiguió que la levadura crezca y se adapte al jugo de la caña de azúcar. La conservación de la levadura se alcanzo utilizando jugo de caña de azúcar a un °Brix menor a 5, pH 3.1 – 3.7 y en refrigeración.

El efecto del pH, °Brix y de la temperatura sobre el proceso de fermentación alcohólica que realizó la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) se comprobó que los mejores resultados se obtuvieron a 3.7 de pH, 20 °Brix y a una temperatura de 22 °C.

La temperatura y el pH de fermentación tienen gran efecto en el proceso de fermentación alcohólica, como en la cantidad del producto final obtenido, lo cual demuestra que estas variables son importantes en el desarrollo de la fermentación alcohólica.

El °Brix influye en la cantidad de alcohol, es decir que a un mayor °Brix mayor es la cantidad de alcohol que se obtiene existiendo una relación proporcional.

La efectividad de la adición de nutrientes en el proceso de fermentación alcohólica varia dependiendo de que nutriente se añadió y cuanto se añadió, siendo la urea el que presenta una mayor activación de la fermentación. El acetato de potasio y el fosfato ácido de potasio, en cambio, son los nutrientes que produjeron una reducción en la activación de la fermentación.

La fuente de nitrógeno adicionada influye decisivamente en el desarrollo de la fermentación alcohólica realizada por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA). La adición de urea produjo un aumento en la capacidad fermentativa de la levadura, ya que logro consumir más azúcares y produjo un incremento de etanol, además que el tiempo que tardo la fermentación alcohólica se redujo.

El tamaño en peso y volumen del inóculo influye decisivamente en el tiempo que demora la fermentación. Si el tamaño del inóculo es del orden 1-10% del volumen total del sustrato el tiempo de fermentación es mayor, debido a un incremento en el periodo de latencia y si el volumen del inóculo es del orden 10 - 20% del volumen total del sustrato, el tiempo de fermentación se reduce.

Si el tamaño del inóculo es superior al orden del 10-20% del volumen total del sustrato la preparación del inóculo demanda recursos, tiempo y dinero razón por la cual se recomienda trabajar con un volumen de inóculo del orden del 10% o menor sin que el tiempo que demora la fermentación se afecte.

CAPITULO 6: RECOMENDACIONES

Es necesario realizar un estudio más exhaustivo de las vías metabólicas implicadas en la fermentación alcohólica a diferentes condiciones de temperaturas y pH que permitan conocer que productos se generan a lo largo de la fermentación alcohólica.

Estudiar la acumulación de metabolitos secundarios, derivados del catabolismo del carbono, como consecuencia de las diferencias existentes en el metabolismo de las levaduras, cuando se realizan fermentaciones a distintas temperaturas y pH.

El nitrógeno como fuente de nutriente tiene una gran importancia en el desarrollo de la fermentación alcohólica y por tanto en las levaduras, para lo cual se recomienda realizar estudios de las fermentaciones llevadas a cabo con otras fuentes de nitrógeno.

La caña apropiada para la obtención de etanol debe estar en estado maduro, para lo cual se recomienda tomar en cuenta las manifestaciones externas del cultivo, expresadas en la coloración amarillenta del tallo así como en las manifestaciones internas manifestadas en el °Brix.

Se recomienda utilizar para futuras investigaciones otros métodos de adaptación de levadura o microorganismos, que pueden mejorar el procedimiento de adaptabilidad al proceso que desea aplicar.

Es recomendable realizar estudios con cromatografía de gases de los productos generados en la fermentación alcohólica para conocer que sustancias se están generando como producto final de la fermentación alcohólica.

Es necesario realizar una caracterización microbiológica de los microorganismos que están presentes en el inóculo de la levadura adaptada, con el propósito de conocer que otros microorganismos están presentes, para lo cual se recomienda utilizar técnicas modernas basadas en el ADN microbiano, que permita diferenciar de forma rápida y segura distintas cepas de una misma especie.

Se recomienda evaluar el proceso de fermentación alcohólica con mostos pasteurizados para conseguir una fermentación más limpia.

CAPITULO 7: BIBLIOGRAFIA

- Anaparo, J. (1973). Introducción a la bioquímica. (E. C. Barga, Trad.) Madrid, España. Imprenta Heroes S.A.
- Bisson, L. (1999). Stuck and sluggish fermentations. Am. Enol. 50, 107-119.
- Boulton, R. (1996). Principles and practices of yeast. Chapman and Hall. 43, 102-108.
- Brizuela, G. (2003). Guía técnica para el cultivo de la caña de azúcar. Santa Tecla, El Salvador. Talleres gráficos de la editorial EUNED.
- Brock, T. Madigan, M. (1982). Microbiología Sexta Edición. (M. C. Idalgo & Mandrango, Trad) Printice Hall Hispanoamerica S.A.
- Burdon, K. Willians R. (1971). Microbiología. Primera Edición en Español. Mexico, DF. Publicaciones culturales S.A.
- Carballo, F. (2000). Microbiología Industrial. Madrid, España. Editorial Acribia.
- Carpenter, P. (1969). Microbiología Segunda Edición. (J. R. Blengio, Trad.) Mexico, DF. Editorial Interamerica, S.A.
- Chávez, M. (2004). La caña de azúcar como materia prima para la producción de alcohol carburante. San José, Costa Rica. Extraída el 8 de octubre de 2007. <http://infoagro.go.cr/Agricola/tecnologia/ALCOHOLCARBURANTE.pdf>
- Del Pozo, G. (2008). Agricultura orgánica en el trópico y subtrópico – Caña de azúcar. Primera Edición. Graficas Cobo.

- Doran, P. (1998). Principios de ingeniería de los bioprocesos. Zaragoza, España. Editorial Acribia, S.A.
- Estorla, R. Yantorno, R. Migmone, C. (2006). A los lectores. Extraído el 15 de Mayo, 2008. http://science.org/simbio/mbio_ind/all_mi.pdf.
- Fajardo, E. Sarmiento, S. (2007). Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de grado para la obtención del título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Microbiología Industrial. Extraído en 17 de Noviembre de 2008, del sitio Web de Pontificia Universidad Javeriana. <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis26.pdf>.
- Flanzky, C. (2003). Enología: Fundamentos técnicos y científicos. Segunda Edición. Madrid, España. Ediciones Mundi Prensa S.A.
- Fleet, G. Heard, G. (1993). Yeast growth during fermentation. In: Wine Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers, 23, 37-54.
- Gamazo, C. López, I. Díaz, R. (2005). Microbiología. Tercera edición. Barcelona España. Masson S.A.
- Garcia, G. Quintero, R. López, M. Biotecnología Alimentaria. México, DF. Grupo Noriega Editores Banderas.
- Gonzalo, A. (1988). Biotecnología: ¿Una salida para la crisis alimentaria?. Primera edición. Co-edición Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco. Editorial Plaza y Valdez.
- Granes, D. Médina, E. Bletyron, L. Romero, C. Bru, E. Roux, C. Bonnefond, C. Piperno, A. Rouanet, M. Oiu, T. Montpellier, I. (2006). Francia Flash info Vendanges. Revista internet de enología y viticultura.

Extraído el 3 de junio de 2009.

<http://www.infowine.com/default.asp?scheda=8753>

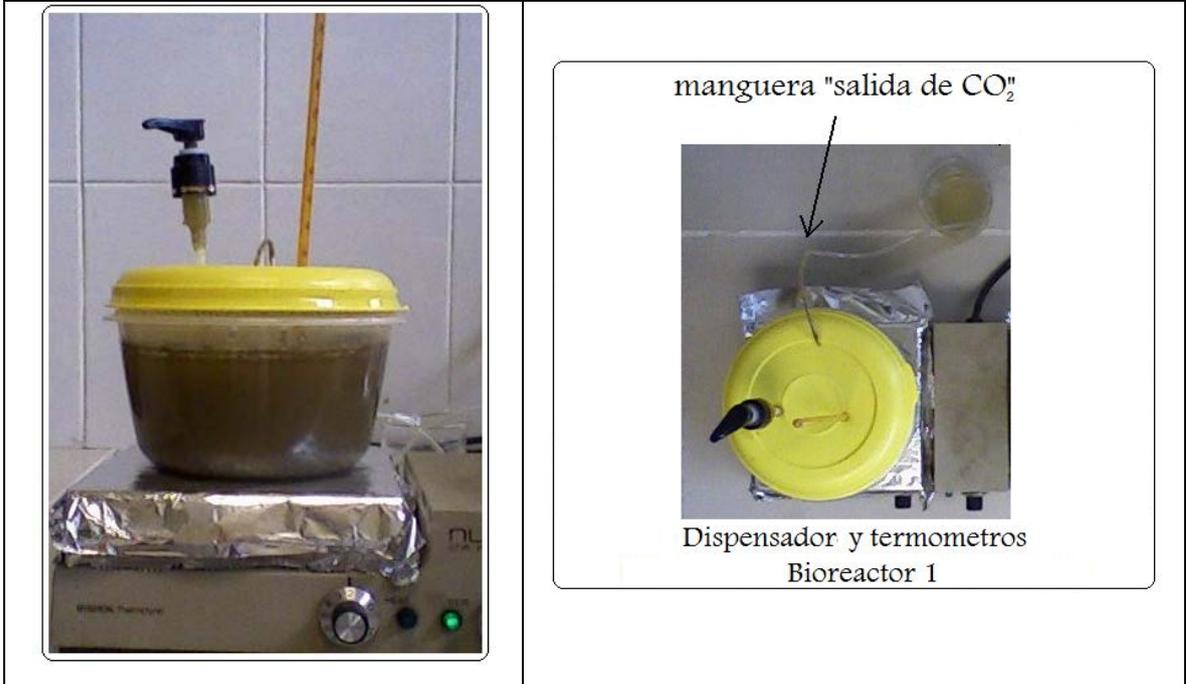
- Herdoisa, G. (2001). Biología general de las levaduras. Obtenida el 8 de Octubre del 2008.
http://www.med.uchile.cl/apuntes/archivo/2007/medicina/biología_genera_l_de_los_hongos.pdf
- Hicks, J. (2001). Bioquímica. Mexico, DF. Interamericana Editores S. A.
- Journal Oil & Power. (2008, Abril). Sustitución de los combustibles tradicionales, 34, 9.
- Lombeida, G. (2007). La industria de los derivados de la caña de azúcar. Primera Edición. Grafiti Ofsset.
- Mangas, J. (1998). CIATA. Tecnología agroalimentaria. El nitrógeno en la sidra. Extraído el 15 de junio del 2009.
<http://www.serida.org/pdfs/98.pdf>.
- Martini, A. Martini, A.V. (1999). Grape must fermentation past and present. In: Yeast technology. Springer Overflag, Belin, 34, 105-123.
- Nagel, C. Herrick, I. (1989). Efectos de la temperatura en la concentración intracelular de los azúcares y ácidos orgánicos. Am. J. Enol. Vitec. 40, 81-84.
- Osorio, G. (2007). Manual técnico: Buenas practicas agrícolas BPA y buenas practicas de manufactura BPM en la producción de la caña y panela. Primera Edición. Medellin, Colombia. CTP Print Ltda. Extraída el 14 de febrero de 2008.
http://corpoica.org.co/SitioWeb/Archivos/Publicaciones/Manual_caña_y_panela_FAO_MANA_2007.pdf

- Palacios, A. Santiago, L. Macias, C. Racines, G. Navascués, E. Rodriguez, P. (2005). Influencia de los micronutrientes en la levadura de tipo *Saccharomyces cerevisiae* CEG. Extraída el 15 de marzo del 2009. <http://www.agrovin.com/pdf/publicaciones/2912.pdf>
- Paulino, G. Esterovich, J. Viscarra, S. Garmendaria, G. Vero, S. (2005). Selección de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de cidra. Universidad DE la República. Comité académico agroalimentario. Extraída el 8 de enero de 2009. <http://www.cori.unicamp.br/jornadas/completos/UDELAR/CA3003-PAOLINO.doc>
- Ribéreau-Gayon, J. Peynaud, E. Ribéreau-Gayon, P. y Sundraud, P. (1975). Science and technology of the wine. 2, 78-81.
- Serrano, R. (2006). Mecanismo de adaptación de la *Saccharomyces cerevisiae* a la alcalinidad ambiental. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de bioquímica y biología molecular. Barcelona, España. Obtenida el 4 de diciembre de 2008. http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-1219106-163252//rsc1de1.pdf
- Torija, M. (2002). Ecología de las levaduras. Selección y adaptación a fermentaciones vínicas. Trabajo de grado para la obtención del título doctorado en bioquímica. Universitat Rovira I Virgili. Departamento de bioquímica y biotecnología. Facultad de Enología. Taragona, España. Extraída el 23 de Noviembre de 2008. http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_URV/AVAILABLE/TDX-0621102-115207//Tesismjt.pdf

- Watson, K. (1987). Temperature relations: Yeast and environmental. Academic Press Limited. 50, 41-32.

ANEXO

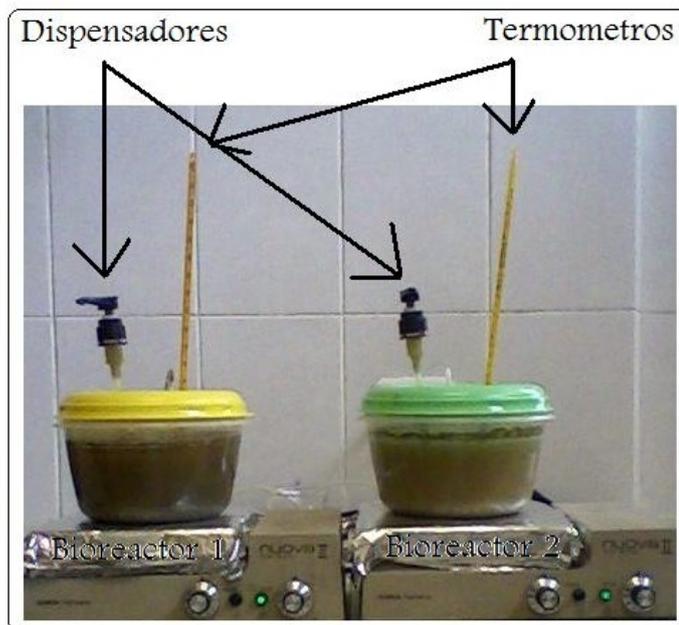
Anexo A Bioreactor 1 con su dispensador y termómetro



Anexo B Datos de pH y ° Brix del proceso de adaptación de la levadura

Parámetros	Levadura	Levadura													
	Parámetros controlados	° Brix										pH			
	Tiempo (h)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	0	2	4	6	8
Ciclos de adaptación	Ciclo 1	20	19	18	18	17	17	16	16	16	4.7	4.2	4.0	3.8	3.6
	Ciclo 2	19	18	18	18	17	17	16	16	16	4.6	4.2	3.9	3.7	3.7
	Ciclo 3	20	19	19	18	18	18	18	17	17	4.6	4.2	4.0	3.8	3.7
	Ciclo 4	19	18	17	17	17	16	16	16	15	4.7	4.2	3.9	3.7	3.7
	Ciclo 5	19	18	18	18	18	18	18	17	17	4.5	3.9	3.7	3.6	3.6
	Ciclo 6	19	19	18	18	18	18	17	17	17	4.6	4.2	3.8	3.5	3.3
	Ciclo 7	19	18	18	18	17	16	16	16	16	4.5	4.1	3.5	3.4	3.3
	Ciclo 8	19	18	17	17	17	17	16	16	16	4.5	3.8	3.6	3.6	3.5
	Ciclo 9	19	18	18	18	18	18	17	17	17	4.6	4.1	4.0	3.9	3.8
	Ciclo 10	20	19	19	19	19	18	18	18	18	4.6	4.1	3.9	3.7	3.5
	Ciclo 11	20	19	19	19	19	19	18	18	18	4.5	4.1	3.5	3.4	3.3
	Ciclo 12	20	19	19	19	18	18	18	18	18	4.7	3.8	3.5	3.4	3.4
	Ciclo 13	20	19	19	19	18	18	18	18	18	4.5	3.6	3.5	3.4	3.3
	Ciclo 14	20	19	19	19	19	18	18	18	18	4.7	4.1	3.7	3.6	3.5
	Ciclo 15	19	18	17	17	17	16	16	16	15	4.7	4.2	3.9	3.7	3.7
	Ciclo 16	20	19	19	19	19	19	18	18	18	4.5	4.1	3.5	3.4	3.3
	Ciclo 17 (adición cítrico)	19	19	19	19	18	18	18	18	17	4.7	3.8	3.7	3.4	3.4

Anexo C Bioreactor 1 y 2 con sus dispensadores, termómetros y mangueras para eliminar el CO₂.



Anexo D Glucosa en gr/L que se consumió, ° Brix disminuido, grado alcohólico al finalizar el proceso de fermentación (% Vol. 1), grado alcohólico obtenido al finalizar el proceso de destilado simple (% Vol. 2) y cantidad de alcohol obtenido en ml al terminar el destilado simple todos los datos para la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) respectivamente.

		Glucosa (gr/L) consumida		° Brix disminuidos		% Vol 1. de alcohol		% Vol 2. de alcohol		Alcohol obtenido (mL)	
		LAS	LA	LAS	LA	LAS	LA	LAS	LA	LAS	LA
T 1	R 1	115,18	112,54	7	6	0	0	31	26	90	65
	R 2	100,26	123,95	6	7	0	0	29	29	80	90
	R 3	106,40	122,19	7	6	0	0	32	27	84	82
T 2	R 1	197,63	171,93	10	6	0	0	31	30	142	110
	R 2	163,42	142,98	9	7	0	0	30	26	135	122
	R 3	181,84	185,96	10	6	0	0	30	28	142	119
T 3	R 1	264,30	256,50	15	10	1	0	29	26	159	131
	R 2	278,33	252,88	16	11	1	0	31	28	160	125
	R 3	268,68	268,87	15	9	1	0	30	28	152	128
T 4	R 1	107,28	106,40	7	5	1	0	30	27	115	103
	R 2	109,04	109,91	8	5	2	0	30	29	119	101
	R 3	101,14	102,89	7	5	1	1	24	31	168	95
T 5	R 1	204,65	159,04	10	9	1	4	32	30	187	135
	R 2	248,51	157,28	11	10	2	5	37	36	164	156
	R 3	219,56	206,40	11	11	1	5	35	34	158	171
T 6	R 1	273,07	163,16	14	11	3	4	34	30	205	142
	R 2	285,35	156,14	14	11	4	4	36	32	212	141
	R 3	281,84	155,26	14	11	3	5	34	32	200	149
T 7	R 1	101,14	112,54	7	6	3	7	24	20	178	210
	R 2	107,28	108,16	8	7	4	7	34	32	109	112
	R 3	123,07	100,26	9	6	3	6	32	30	128	108
T 8	R 1	237,11	260,79	11	11	5	7	39	31	159	168
	R 2	222,19	133,60	11	10	4	6	33	31	162	139
	R 3	245,88	139,74	11	9	5	6	36	30	169	145
T 9	R 1	274,82	138,60	14	15	6	7	38	30	206	208
	R 2	266,05	180,70	14	15	6	7	39	32	210	198
	R 3	283,60	185,96	14	15	7	8	45	34	195	195

Anexo E Glucosa en gr/L que se consumió, ° Brix disminuido, grado alcohólico al finalizar el proceso de fermentación (% Vol. 1), grado alcohólico obtenido al finalizar el proceso de destilado simple (% Vol. 2) y cantidad de alcohol obtenido en ml al terminar el destilado simple todos los datos para la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) respectivamente.

		Glucosa (gr/L) consumida		° Brix disminuidos		% Vol 1. de alcohol		% Vol 2. de alcohol		Alcohol obtenido (mL)	
		LAS	LA	LAS	LA	LAS	LAS	LA	LAS	LA	LAS
T 1	R 1	268.79	627.74	16	14	5	3	31	42	277	300
	R 2	591.37	483.20	15	14	6	2	36	47	250	235
	R 3	283.14	325.26	17	16	5	3	34	43	243	275
	R 4	413.32	634.44	15	14	6	4	32	45	284	257
T 2	R 1	352.25	634.44	15	15	6	8	26	40	253	297
	R 2	562.84	613.38	15	15	7	9	36	44	258	268
	R 3	917.01	248.68	16	14	6	4	32	41	273	243
	R 4	1357.33	482.24	15	14	7	9	36	45	254	255
T 3	R 1	1146.74	393.22	15	14	6	8	36	41	253	301
	R 2	917.01	480.33	13	15	6	9	35	42	258	278
	R 3	2400.69	331.00	14	15	5	7	38	43	251	269
	R 4	648.99	486.07	14	15	6	9	36	39	259	287
T 4	R 1	267.52	363.55	14	14	2	5	38	45	225	220
	R 2	99.50	259.21	12	13	2	4	39	42	232	227
	R 3	342.88	628.70	14	15	3	4	38	43	243	231
	R 4	129.99	362.59	14	15	5	5	41	43	222	232
T 5	R 1	94.97	531.06	12	15	1	4	39	42	218	232
	R 2	140.25	368.34	13	14	2	7	42	42	232	230
	R 3	345.48	247.73	13	15	2	6	41	47	222	215
	R 4	170.12	316.65	14	15	sin lectura	6	41	43	205	225
T 6	R 1	135.46	459.27	13	15	sin lectura	5	39	43	204	198
	R 2	65.68	232.41	12	13	sin lectura	6	39	43	224	218
	R 3	242.29	347.28	13	16	sin lectura	5	38	41	242	231
	R 4	83.01	231.45	12	12	sin lectura	5	41	42	217	210
T 7	R 1	94.21	246.00	13	11	sin lectura	sin lectura	41	41	207	250
	R 2	81.86	526.49	11	13	sin lectura	1	38	47	236	204

	R 3	168.78	514.62	12	13	sin lectura	1	40	45	218	218
	R 4	284.79	620.01	13	13	sin lectura	sin lectura	36	42	208	246
T 8	R 1	2.22	501.58	12	11	sin lectura	sin lectura	36	44	237	205
	R 2	75.83	386.64	14	12	2	sin lectura	38	39	238	218
	R 3	259.23	362.52	15	12	1	sin lectura	38	40	242	206
	R 4	118.43	241.14	13	11	sin lectura	sin lectura	38	41	237	209
T 9	R 1	74.78	399.16	13	10	3	sin lectura	38	43	238	232
	R 2	157.96	354.17	13	13	2	sin lectura	40	44	235	218
	R 3	244.01	192.40	15	10	2	sin lectura	41	41	230	215
	R 4	161.69	383.84	14	11	4	sin lectura	39	42	242	220

Anexo F ° Brix disminuido en un periodo de 8 horas al evaluar la cantidad de inòculo por litro de sustrato en el proceso de fermentación alcohólica por la levadura activa seca (LAS) y la levadura adaptada (LA) respectivamente.

		°Brix disminuidos	
		LAS	LA
T 1	R 1	2.00	0.00
	R 2	1.00	1.00
	R 3	2.00	0.00
T 2	R 1	6.00	2.00
	R 2	4.00	3.00
	R 3	5.00	3.00
T 3	R 1	6.00	3.00
	R 2	6.00	3.00
	R 3	7.00	5.00
T 4	R 1	8.00	5.00
	R 2	10.00	6.00
	R 3	8.00	6.00
T 5	R 1	11.00	7.00
	R 2	10.00	8.00
	R 3	13.00	8.00

Anexo G Glucosa en gr/L que se consumió, ° Brix disminuido, grado alcohólico al finalizar el proceso de fermentación (% Vol. 1), grado alcohólico obtenido al finalizar el proceso de destilado simple (% Vol. 2) y cantidad de alcohol obtenido en mL al terminar el destilado simple todos los datos para la levadura activa ciclo corto (Lev. 1) y la levadura adaptada ciclo largo (Lev 2).

		Glucosa (gr/L) consumida		° Brix disminuidos		% Vol 1. de alcohol		% Vol 2. de alcohol		Alcohol obtenido (mL)	
		Lev. 1	Lev. 2	Lev. 1	Lev. 2	Lev. 1	Lev. 2	Lev. 1	Lev. 2	Lev. 1	Lev. 2
T 1	R 1										
	R 2										
	R 3										
T 2	R 1										
	R 2										
	R 3										
T 3	R 1	256.53	262.36	11	10	0	0	28	26	110	131
	R 2	271.91	258.42	11	11	1	0	32	28	108	125
	R 3	284.39	275.87	10	9	0	0	29	28	120	128
T 4	R 1										
	R 2										
	R 3										
T 5	R 1										
	R 2										
	R 3										
T 6	R 1	182.83	178.04	11	11	4	4	28	30	162	142
	R 2	191.44	170.38	13	11	3	4	30	32	130	141
	R 3	179.00	169.43	11	11	4	5	31	32	135	149
T 7	R 1										
	R 2										
	R 3										
T 8	R 1	214.22	266.87	11	11	5	7	30	31	157	168
	R 2	190.29	128.08	9	10	6	6	33	31	125	139
	R 3	209.44	134.78	10	9	7	6	33	30	129	145
T 9	R 1										
	R 2										
	R 3										