

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



Producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 empleando un medio complejo con concentraciones variables de hidrolizado de cachaza y extracto de levadura en cultivo por lote

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO
EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORES

Bach. Segura Giraldo, Ray Omar

Bach. Santamaria Curibanco, Vania Stephanny

ASESOR

Dr. Castro Alvarado, Ángel Pablo

ORCID: 0000-0002-5984-0587

NUEVO CHIMBOTE - PERÚ

2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

Producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126
empleando un medio complejo con concentraciones variables de
hidrolizado de cachaza y extracto de levadura en cultivo por lote

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOTECNOLOGÍA

Revisado y Aprobado por el Asesor:

Dr. Castro Alvarado Ángel Pablo

DNI: 06451148

ID ORCID: 0000-0002-5984-0587

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador:



Ms. Villanueva Carlos José Manuel

PRESIDENTE

DNI: 32733772

ID ORCID: 0000-0002-5056-0001



M. Sc. Alva Muñoz Eterio Amaranto

SECRETARIO

DNI: 32406295

ID ORCID:0000-0002-4113-7981



Dr. Castro Alvarado Ángel Pablo

INTEGRANTE

DNI: 06451148

ID ORCID:0000-0002-5984-0587

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

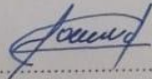
En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en la reunión en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias de la UNS, dando cumplimiento a la Resolución N° 314-2023-UNS-CFC, siendo las 12:00 horas del día 16 agosto del 2023

se reunió el Jurado Evaluador presidido por el Ms. Blgo Mblgo José Villanueva Carlos, teniendo como miembros a. M Sc Eterio Alva Muñoz. (secretario) (a) y al . Dr. Ángel Castro Alvarado (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA, realizado por él, (la), (los) tesista (as) Ray Segura Giraldo y Vania Santamaria Curibanco de la Escuela Profesional de Biotecnología .quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada: **"Producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 empleando un medio complejo con concentraciones variables de hidrolizado de cachaza y extracto de levadura en cultivo por lote"**.

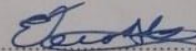
Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como **BUENO** asignándole un calificativo de Dieciocho (18) puntos. Según artículo 111° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 580-2022-CU-R-UNS)

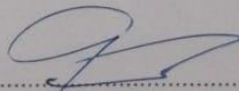
Siendo las 14:00 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad



Nombre: Ms. José Villanueva Carlos
Presidente



Nombre: M Sc Eterio Alva Muñoz
Secretario



Nombre: Dr. Ángel Castro Alvarado
Integrante

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

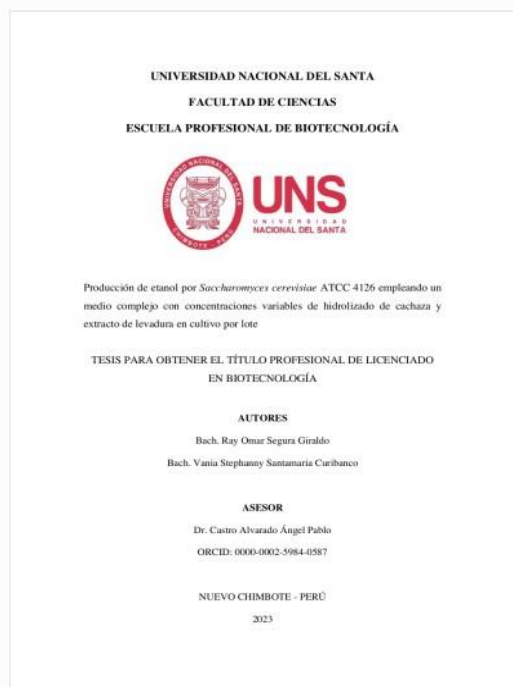


Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Ray Omar Segura Giraldo
Título del ejercicio: TESIS EGRESADOS 2023
Título de la entrega: "Producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4...
Nombre del archivo: INFORME_DE_TESIS_Ray_Vania_01.09.23.pdf
Tamaño del archivo: 1.98M
Total páginas: 72
Total de palabras: 14,427
Total de caracteres: 77,930
Fecha de entrega: 06-sept.-2023 12:15p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entre... 2159180603



“Producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 empleando un medio complejo con concentraciones variables de hidrolizado de cachaza y extracto de levadura en cultivo por lote”

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%	16%	2%	2%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	2%
2	digibuo.uniovi.es Fuente de Internet	2%
3	documents.mx Fuente de Internet	2%
4	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	bdigital.uncu.edu.ar Fuente de Internet	1%
6	www.tesis.uchile.cl Fuente de Internet	1%
7	www.scribd.com Fuente de Internet	1%
8	es.scribd.com Fuente de Internet	1%

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar hasta esta etapa de mi vida y darme salud para día a día lograr todo lo que me propuse. A mis padres por su sacrificio y esfuerzo en todo lo necesario para llegar a cumplir mis objetivos como persona y estudiante, por creer en mi capacidad, por su apoyo y amor incondicional.

A mi angelito, mi Mami Rosa que desde el cielo sigue cuidándome y guiándome, y sé que está muy orgullosa de mí por este logro.

Vania Stephanny Santamaria Curibanco

Dedico el presente informe de investigación a mis padres y hermanos por su amor, comprensión y su inmenso apoyo a mi formación académica.

Ray Omar Segura Giraldo

AGRADECIMIENTO

A nuestros padres por sus consejos, sus valores, por la constante motivación que nos ha permitido ser personas de bien y lograr todos nuestros objetivos propuestos.

A nuestro asesor el Dr. Ángel Castro Alvarado por su apoyo, sus consejos, conocimientos, excelencia y exigencia académica, confianza y su inmensurable paciencia que tiene para con nosotros.

Al Dr. Roberto Vega Paulino por los conocimientos compartidos y la exigencia académica.

INDICE

DEDICATORIA.....	1
AGRADECIMIENTO	2
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Problema	13
1.2. Objetivos	13
1.2.1. Objetivo General	13
1.2.2. Objetivos Específicos	13
1.3. Hipótesis	14
1.4. Justificación	14
II. MARCO TEÓRICO	15
2.1. Bioetanol	15
2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.3. Cachaza	18
2.4. Composición química de la cachaza	19
2.5. Producción de etanol a partir de materia lignocelulósica	21
2.6. Composición de biomasa lignocelulósica	22
2.7. Pretratamientos de materia lignocelulósica.....	23
2.7.1. Hidrólisis	24
2.7.2. Hidrólisis ácida.....	24
2.8. Inhibidores de la fermentación alcohólica	25
2.9. Desintoxicación del hidrolizado.....	26
2.10. Fermentación	27
2.11. Destilación	28
III. MÉTODOS.....	30
3.1. Población.....	30
3.2. Muestra	30
3.3. Diseño experimental	30
3.4. Procedencia de la cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4126.....	31

3.5. Mantenimiento y activación de la cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4126.....	31
3.6. Recolección, transporte y almacenamiento de la muestra de cachaza	32
3.7. Pre tratamiento de la cachaza.....	32
3.7.1. Secado de la cachaza	32
3.7.2. Pre ensayos de hidrólisis ácida.....	33
3.7.2.1. Hidrólisis ácida de la cachaza	34
3.7.2.2. Desintoxicación del hidrolizado de cachaza	35
3.8. Caracterización del hidrolizado de cachaza	36
3.8.1. Método DNS	36
3.8.2. Análisis de glucosa.....	37
3.9. Preparación del inóculo.....	37
3.10. Diseño y preparación del medio de fermentación	38
3.11. Concentración de Azúcares Reductores Totales (ART).....	39
3.12. Proceso fermentativo	39
3.13. Acondicionamiento de muestras para análisis.....	40
3.14. Determinación de biomasa	41
3.14.1. Análisis de bioetanol	42
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
4.1. Resultados de los pre ensayos de hidrólisis ácida de la cachaza.....	43
4.1.1. Liberación de Azúcares Reductores Totales	43
4.1.2. Liberación de glucosa.....	45
4.2. Tratamientos del proceso fermentativo.....	46
4.3. Comparativa de fermentación con material lignocelulósico de bajo costo y glucosa.....	50
4.4. Rendimiento de formación de biomasa $Y_{x/s}$ y velocidad específica.....	51
4.5. Comparativa de fermentación sin pre tratamiento con carbón activado	52
4.6. Conclusiones	54
4.7. Recomendaciones	55
V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
VI. ANEXO	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Glicólisis y fermentación alcohólica.....	17
Figura 2. Cachaza	18
Figura 3. Esquema del proceso de generación de bioetanol a partir de material lignocelulósico.....	21
Figura 4. Representación esquemática del proceso de pre tratamiento	23
Figura 5. Muestra de (a) cachaza húmeda y (b) después del proceso de secado.....	33
Figura 6. (a) Muestras hidrolizadas de cachaza y (b) análisis de ART por el método DNS	34
Figura 7. Frascos con 350 mL de hidrolizado de cachaza sin filtrar.	34
Figura 8. (a) Ajuste del pH del hidrolizado de cachaza, y (b) proceso de desintoxicación con carbón activado.....	35
Figura 9. Muestras de hidrolizado de cachaza con reactivo DNS sometidas a baño María	36
Figura 10. Muestras de hidrolizado de cachaza más kit enzimático sometidas a baño María a 37°C	37
Figura 11. Estrategia para la preparación del inóculo empleado en la fermentación ...	38
Figura 12. Proceso fermentativo en (a) tándem de 9 viales. En la figura (b) se aprecia en el fondo del vial biomasa de <i>S. cerevisiae</i>	40
Figura 13. Sistema para la inactivación de <i>S. cerevisiae</i>	40
Figura 15. Filtración de la muestra con filtros de jeringa con membrana de nylon de 0.45 μm de porosidad	42
Figura 16. Cinética de consumo de sustrato de acuerdo a la tabla 13.	48
Figura 17. Cinética de formación de producto de acuerdo a la tabla 13.	48
Figura 18. Cinética de formación de biomasa de acuerdo de la tabla 13.	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de la cachaza.....	20
Tabla 2. Efecto de inhibidores de la fermentación sobre la producción de etanol	26
Tabla 3. Ventajas y desventajas de los métodos de desintoxicación.....	27
Tabla 4. Diseño Experimental	31
Tabla 5. Matriz del diseño experimental	31
Tabla 6. Composición del medio de cultivo para producción de etanol.....	38
Tabla 7. Concentración de azúcares reductores de los pre ensayos de la hidrólisis ácida de cachaza.....	43
Tabla 8. Análisis de varianza de un solo factor para la liberación de ART.....	44
Tabla 9. Prueba de Tukey para para la liberación de ART.....	45
Tabla 10. Concentración de glucosa de los pre ensayos en la hidrólisis ácida de cachaza	45
Tabla 11. Análisis de varianza de un solo factor para la liberación de glucosa	46
Tabla 12. Prueba de Tukey para para la liberación de glucosa	46
Tabla 13. Datos de consumo de sustrato, formación de producto y biomasa de cada tratamiento.....	47
Tabla 14. Respuestas de rendimiento (Y_p/s) y productividad volumétrica (Q_p)	49
Tabla 15. Análisis de varianza del diseño factorial para la variable Y_p/s	49
Tabla 16. Análisis de varianza del diseño factorial para la variable Q_p	50
Tabla 17. Comparación del rendimiento Y_p/s y productividad volumétrica (Q_p) con fuente de carbono glucosa e hidrolizado de cachaza.....	50
Tabla 18. Respuestas de rendimiento (Y_x/s) y velocidad específica de crecimiento (μ).	51
Tabla 19. Datos del consumo de azucares y formación de biomasa del medio de cultivo sin desintoxicación con carbón activado.	53

TABLA DE ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio base para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	63
Anexo 2. Contenido de aminoácidos y vitaminas de algunos alimentos y levadura	64
Anexo 3. Diseño del medio de cultivo para una biomasa de 1 g/L.	65
Anexo 4. Análisis de concentración de bioetanol.....	66
Anexo 5. Diagrama de flujo del proceso para el desarrollo del proyecto de investigación.....	69
Anexo 6. Curva de calibrado para Azúcares Reductores Totales.....	70
Anexo 7. Curva de calibrado para glucosa	70
Anexo 8. Procedimiento para la determinación de bioetanol en CG.....	70
Anexo 9. Obtención de valores promedios de rendimientos Yp/s con fuente de carbono cachaza.....	71
Anexo 10. Comparación de productividad volumétrica con fuente de carbono glucosa e hidrolizado de cachaza.....	71

RESUMEN

Se investigó el efecto de la concentración de azúcares reductores totales (ART) obtenidos del proceso de hidrólisis ácida de cachaza y de extracto de levadura en la producción de bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 en cultivo por lote. Para esto se evaluó el rendimiento (Yp/s) y la productividad volumétrica (Qp) en la producción de etanol en un tándem de 9 viales incubados a 28 °C durante 16 h, cada vial contuvo 3 mL de caldo de producción con diferentes concentraciones de fuente de carbono (9.8, 12.3 y 14.7 g/L) y fuente de nitrógeno (0.7, 0.9 y 1.1 g/L), el muestreo se realizó cada 2 h; al terminar el bioproceso no se obtuvo efectos significativos en la interacción entre las concentraciones de ART y extracto de levadura, los niveles probados generaron rendimientos estadísticamente iguales. Además, se comparó la fermentación con respecto a un medio sintético con glucosa, para lo cual se obtuvo un rendimiento Yp/s 0.48 g/g y una productividad volumétrica de producto de 0.36 g/L.h, valores mayores a los obtenidos con el medio complejo con cachaza que reportó Yp/s de 0.41 g/g y Qp de 0.14 g/L.h, con lo cual se demostró que es posible obtener etanol a partir de este medio complejo con hidrolizado de cachaza y extracto de levadura.

PALABRAS CLAVES: hidrólisis ácida, bioetanol, cultivo por lote, rendimiento Yp/s, productividad volumétrica, Azúcares Reductores Totales.

ABSTRACT

The effect of the concentration of total reducing sugars (ART) obtained from the acid hydrolysis process of sugar press mud and yeast extract on the production of bioethanol by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 in batch culture was investigated. For this, the yield (Y_p/s) and volumetric productivity (Q_p) in the production of ethanol were evaluated in a tandem of 9 vials incubated at 28 °C for 16 h, each vial contained 3 mL of production broth with different concentrations of carbon source (9.8, 12.3 and 14.7 g/L) and nitrogen source (0.7, 0.9 and 1.1 g/L), the test was carried out every 2 h; at the end of the bioprocess, no significant effects were obtained in the interaction between the concentrations of ART and yeast extract, the tested levels generated statistically equal yields. In addition, the fermentation was compared with respect to a synthetic medium with glucose, for which a yield Y_p/s of 0.48 g/g and a volumetric productivity of the product of 0.36 g/L.h were obtained, values higher than those obtained with the medium complex with filter cake that reported Y_p/s of 0.41 g/g and Q_p of 0.14 g/L.h, which means that it is possible to obtain ethanol from this complex medium with filter cake hydrolyzate and yeast extract.

KEY WORDS: acid hydrolysis, bioethanol, batch culture, Y_p/s yield, volumetric productivity, Total Reducing Sugar.

I. INTRODUCCIÓN

Los combustibles fósiles, constituyen la base de la economía global y el crecimiento mundial de la población, pero también su consumo es el principal factor que genera el efecto invernadero (Ferrari, 2013), con la liberación de gases tales como CO₂, CH₄, óxidos de nitrógeno (NO_x), N₂O, monóxido de carbono (CO), compuestos orgánicos volátiles distintos del metano (COVDM) y SO₂ (GCE, sf).

Existen grandes expectativas sobre los biocombustibles líquidos y su influencia sobre la mitigación del cambio climático, en la contribución de la seguridad energética y su apoyo a los productores agrícolas. El impulso de gobiernos en la generación de cultivos diseñados para la obtención de biocombustibles líquidos genera un aumento de precios en productos agrícolas básicos (FAO, 2008), por lo que se debe maximizar el aprovechar los cultivos consumidos y sus residuos para la generación de biocombustibles líquidos.

El 90 % de los biocombustibles generados a nivel mundial corresponde al bioetanol y biodiesel, estos principales biocombustibles son de primera generación. Ambos combustibles pueden ser usados por separado de manera directa en mezclas de hasta 10 % con derivados de petróleo sin necesidad de modificar los motores tradicionales de combustión (Dufey, 2006).

En la industria azucarera, la caña de azúcar (cultivo principal para la generación de bioetanol) presenta una gran capacidad productora de materia orgánica; sin embargo, generalmente se le atribuye un valor comercial al 24% de su peso en materia seca, el restante 76%, se constituyen por los desechos agrícolas (cogollo, hojas y pajas) y de fabricación (vinazas, bagazo, melaza y cachaza) (De Castillo, 1980).

Los desechos en la fabricación de azúcar representan las principales pérdidas de este elemento en su industria (Zepeda, 2012). Los azúcares que se pierden en estos desechos ya no pueden ser recuperados en el proceso de elaboración. Vinazas y bagazos pueden ser empleados en otras industrias o procesos. La cachaza es utilizada principalmente como fertilizante agrícola, pero dicho uso, es limitado por la capacidad de los suelos en asimilarla, lo que conlleva a generación de contaminación (De Castillo, 1980).

La cachaza es un residuo generado del proceso de clarificación del jugo de caña durante la producción de azúcar (Leeson & Summers, 2000), el cual es uno de los residuos que menos importancia se le concede (Rivera, 1980). Pero en su composición química (Tabla 1), presenta sacarosa y es generalmente rica en fósforo, calcio, nitrógeno y micronutrientes derivados en un porcentaje por las partículas que van adheridas a la caña (Aguilar *et al.*, 2010), lo que la convierte en un subproducto adecuado para ser empleado como medio de cultivo para la producción de bioetanol.

Para que la cachaza pueda ser empleada como fuente de azúcares fermentables se debe eliminar la lignina y la hemicelulosa, incrementar la porosidad del residuo y disminuir la cristalinidad de la celulosa (Timung *et al.*, 2015). Se han utilizado procesos físicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos para el pre-tratamiento de este residuo de los cuales la hidrólisis ácida utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4), es uno de los pre-tratamientos más eficientes, en condiciones optimizadas, con una concentración de 1.5% (v/v) con una relación de 1:5 (g/mL) de cachaza sobre ácido sulfúrico, con un tiempo de 15 min para obtener una mayor liberación de azúcares (Nimbalkar *et al.*, 2017).

La transformación de los azúcares a bioetanol es realizado con mayor frecuencia por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual convierte las hexosas en bioetanol en condiciones anaeróbicas (Claassen *et al.*, 2011). *Saccharomyces cerevisiae*, levadura

robusta que puede soportar condiciones de estrés, ambientes ácidos, elevados niveles de etanol, temperatura, bajos niveles de oxígeno, además, presenta una eficiencia de fermentación, crecimiento y uso de azúcar elevados, parámetros fundamentales para que pueda ser empleada en la industrial (Andrietta *et al.*, 2007).

El requerimiento nutricional (Anexo 2) para que *Saccharomyces cerevisiae* lleve a cabo la fermentación alcohólica (Ferreyra *et al.*, 2014), se basa en requerimientos de macro y micro-nutrientes, los cuales pueden ser suplidos por la cachaza. Además, también requieren de la presencia de nitrógeno y vitaminas, piezas fundamentales para el desarrollo del proceso fermentativo (Ferreira *et al.*, 2011), las cuales pueden ser suplidas añadiendo extracto de levadura, debido a que esta es rica en vitaminas fundamentalmente complejo B, factores de crecimiento y aminoácidos (Neogen, 2019).

Pawar *et al* (2017), utilizaron como materia prima el hidrolizado de cachaza en una fermentación discontinua con *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632. Ellos utilizaron una concentración de inóculo de 4.5%, obteniendo como resultado 11.65 g/L de bioetanol. Esta investigación determinó la viabilidad del uso de la cachaza para la producción de bioetanol.

Ferreira *et al* (2011), reportó en su investigación sobre la producción de etanol con la cepa de la levadura *Scheffersomyces stipitis*, para producir etanol a partir de xilosa, donde se emplearon como medio de fermentación un hidrolizado hemicelulósico producido por hidrólisis ácida diluida de bagazo, donde observó la necesidad de añadir nutrientes para mejorar la fermentación, los nutrientes añadidos fueron $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, extracto de levadura y úrea. Concluyendo que los mejores resultados se obtuvieron utilizando el hidrolizado que contenía una concentración de xilosa de 30 g/L y 5 g/L

extracto de levadura. Esta investigación concluyó que al aumentar extracto de levadura como nutriente favorece la producción de etanol.

Por lo tanto, se determina que la cachaza presenta un potencial suficiente para ser materia prima en la producción de bioetanol por tener un elevado porcentaje de hemicelulosa y celulosa. En base a lo anterior mencionado, en este trabajo de investigación se empleará cachaza (sometida a un proceso de hidrólisis ácida) y extracto de levadura para obtener las concentraciones favorables para alcanzar el mayor rendimiento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 en la generación de etanol *en* cultivo por lote.

1.1. Problema

¿Cuáles son las concentraciones favorables de extracto de levadura (0.7 g/L, 0.9 g/L, 1.1 g/L) y azúcares reductores obtenidos del hidrolizado de cachaza (9.8 g/L, 12.3 g/L, 14.7 g/L) para alcanzar el mayor rendimiento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 en la producción de etanol en cultivo por lote?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Evaluar las concentraciones de extracto de levadura (0.7, 0.9 y 1.1) y azúcares reductores (9.8, 12.3 y 14.7) obtenidos del hidrolizado de cachaza para alcanzar el mayor rendimiento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 en la producción de etanol por cultivo por lote.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar la mejor concentración de extracto de levadura para la producción

de bioetanol por *S. cerevisiae* ATCC 4126 en cultivo por lote.

- Determinar la mejor concentración de azúcares obtenidos de hidrólisis ácida de cachaza para la producción de bioetanol por *S. cerevisiae* ATCC 4126 en cultivo por lote.
- Determinar el rendimiento de biomasa (Y_x/s) y del producto (Y_p/s) del proceso fermentativo.
- Determinar el rendimiento volumétrico del producto (Q_p) del proceso fermentativo.
- Determinar la velocidad específica de crecimiento de *S. cerevisiae* ATCC 4126.

1.3. Hipótesis

Se logrará alcanzar un mayor rendimiento en la producción de etanol a partir de una concentración de 12.3 g/L de azúcares reductores obtenida del hidrolizado de cachaza y 0.9 g/L de extracto de levadura en cultivo por lote.

1.4. Justificación

El bioetanol, producto de la fermentación alcohólica es el biocombustible con mayor importancia a nivel mundial debido que mejora la combustión de la gasolina reduciendo las emisiones contaminantes de esta. Debido a su importancia económica se ve la manera de producirlo empleando materias primas de bajo costo, pero con alto contenido de materia lignocelulósica.

La revalorización de material rico en lignocelulosa que se produce como desecho de diferentes industrias tales como la azucarera son útiles para generar una nueva materia prima en la producción de bioetanol, desechos tales como la cachaza el cual es un compuesto rico en material lignocelulósico y minerales podría usarse de manera exitosa

como fuente para la obtención de bioetanol.

El empleo de materia de desecho ricas en lignocelulosa para la producción de bioetanol puede generar la reducción en los costos de la gasolina y derivar recursos económicos empleados para cultivos para la producción de bioetanol ahora enfocados en cultivos de consumo humano o forraje para animales.

En miras de utilizar una fuente de carbono a bajo costo para la obtención de bioetanol, se propone aprovechar los residuos azucareros como la cachaza para la obtención de este biocombustible.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bioetanol

Es un compuesto volátil e incoloro que puede ser obtenido de la remolacha y plantas ricas en azúcares, cereales, alcohol vínico mediante una destilación (Renovetec, 2009).

Stratta (2000), define al bioetanol como el etanol generado de la fermentación de azúcares presentes en la biomasa vegetal, muchos de los cuales son generados por industrias y tienen un valor económico dentro del contexto donde son originados como también son un gran problema para el medio ambiente durante su disposición final para ser eliminados.

Los residuos vegetales contienen mezclas complejas de carbohidratos (celulosa, hemicelulosa y lignina). Para poder alcanzar los azúcares de los residuos vegetales, se debe tratar con mediante la aplicación de enzimas o ácidos con la finalidad de obtener glucosa, la cual luego es fermentada. Existen tres métodos de extracción para estos

azúcares: hidrólisis con ácidos concentrados o diluidos y la hidrólisis enzimática (Renovetec, 2009).

Las fases para la obtención de bioetanol son:

- **Dilución:** proceso en el cual se adiciona agua para ajustar la concentración de azúcares en la mezcla o la cantidad de alcohol en el producto. Es requerida porque la levadura puede que no sea viable a una concentración muy elevada de alcohol o azúcares.
- **Conversión:** proceso de convertir en azúcares fermentables el almidón/celulosa. Puede darse por un proceso químico de hidrólisis o enzimático.
- **Fermentación:** proceso anaeróbico que es llevado a cabo por levaduras, de la fermentación alcohólica son obtenidos una gran serie de productos, entre ellos el alcohol.
- **Destilación o Deshidratación:** operación de separar, mediante calor, los diferentes componentes líquidos de una mezcla (etanol/agua).

Nelson & Colx (2000), refieren que en la etapa de fermentación alcohólica la generación de etanol se representa en dos partes: la primera es donde el piruvato se descarboxila por acción del piruvato descarboxilasa hasta acetaldehído, y el segundo paso es donde el acetaldehído es reducido hasta etanol por parte del alcohol deshidrogenasa con liberación del NAD^+ , los productos obtenidos al final de la fermentación alcohólica son el etanol y CO_2 (figura 1).

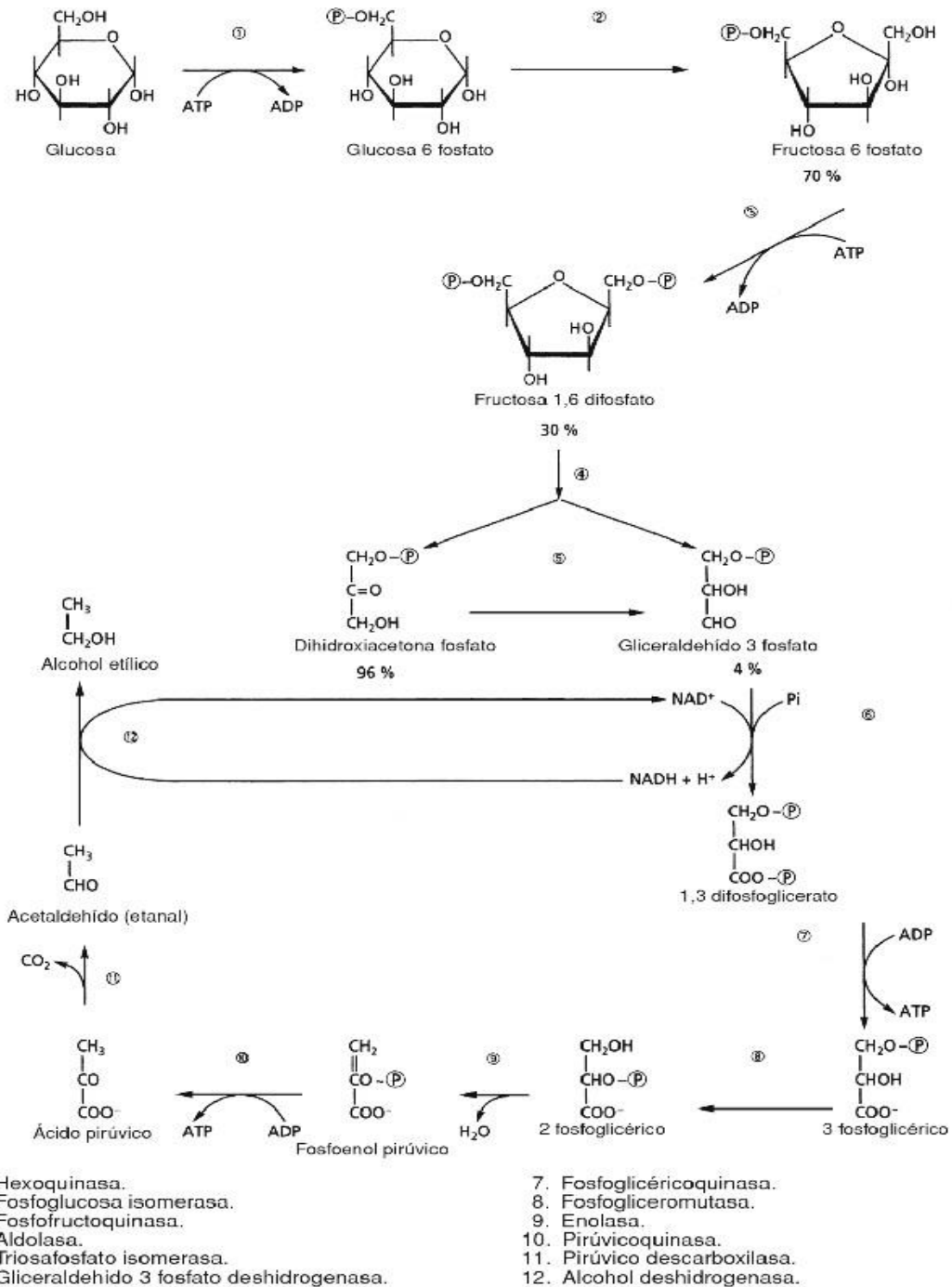


Figura 1. Glicólisis y fermentación alcohólica
 Fuente: Hidalgo, 2011.

2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Es un hongo unicelular, perteneciente al grupo de los ascomicetos, la cual metaboliza azúcares como la fructosa, glucosa y manosa. *S. cerevisiae* obtiene energía de la

fermentación de estos azúcares a etanol bajo condiciones de anaerobiosis (Hernández, 1999).

S. cerevisiae tiene cinco fases de crecimiento cuando es cultivada en caldo de cultivo con glucosa: lag, logarítmica, cambio diáuxico, post diáuxica y estacionaria (Folch, 2004).

2.3. Cachaza

La cachaza es el residuo de la filtración del jugo de caña de azúcar. Durante el proceso de clarificación se separa un jugo transparente que se eleva a la parte superior que va a la fabricación, y un barro que se acumula en la parte inferior. El lodo se filtra para separar la materia en suspensión, que incluye sales insolubles y bagazo fino. Existen tres tipos de filtros: los filtros de prensa, mecánicos y rotativos de vacío. El rendimiento de la torta de filtración es variable, de 1 a 7 kg (base húmeda) por 100 kg de caña (Zérega, 1993).



Figura 2. Cachaza
Fuente: Dotaniya et. al., 2016.

2.4. Composición química de la cachaza

La composición química de la cachaza va a variar de acuerdo a las características agroecológicas de la zona, la eficiencia de la fábrica, el método de clarificación empleado, entre otros factores. Este material contiene muchos de los compuestos coloides materia orgánica original que se encuentran dispersas en el jugo, en conjunto con aniones orgánicos e inorgánicos que precipitan durante la clarificación. Otros compuestos no azucares también se incluyen en esos precipitados; Sin embargo, por su alto contenido de humedad, por presentar olores desagradables, baja relación peso/volumen (igual a 0.375), ser fuente de criadero de moscas y otras plagas y por tomar combustión espontánea en estado seco al exponerse al sol, la mayoría de los ingenios azucareros tienen problemas de almacenamiento, transporte y manejo. Por ello, no es totalmente aprovechada en derivados y se pueden dar dificultades para su eliminación (Zerega, 1993).

Tabla 1. Composición química de la cachaza

Componente	Valor (%)	Componente	Valor (%)
Humedad	70.72	MgO	0.66
Densidad (gL-1)	180	Carbono (C)	20
P2O	3.21	Relación C/N	38.40
K2O	0.24	pH en agua	7.22
CaO	2.94	Materia orgánica	64.03
N2	0.81	SO4	0.97
S	0.27	Zn	0.51
Proteína cruda	16	Extracto en C6H6	
Sacarosa y ART	14	Bagacillo	25
Hierro (Fe)	2	Manganeso (Mn)	0.16
Magnesio (Mg)	0.7	Aluminio (Al)	0.5
Cobre (Cu)	0.04	Ceniza	12
*Acido aspártico	4.4	*Treonina	2.8
*Acido glutámico	3.7	*Metionina	0.5
*Isoleucina	2.1	*Valina	3.5
*Leucina	3.6	*Tirosina	0.6
*Fenilalanina	1.3	*Triptofano	1.2
*Histidina	2.2	*Lisina	2.1
*Arginina	0.9	**Acido valérico	1.1
**Acido caprónico	0.5	**Acido pelargónico	0.4
**Acido 3-nonanoico	2.2	**Acido cáprico	0.4
**Acido undecílico	1.5	**Acido láurico	5.0
**Acido linoléico	2.1	**Acido octacosanoico	25.6
**Acido mirístico	1.6	**Acido palmítico	18.0
**Acido azelaico	2.2	**Acido esteárico	8.1
**Acido linoleico	27.0	**Acido oleico	10.2
**n-tetracosanol	1.7	**n-hexacosanol	5.5
**n-heptacosanol	2.9	**n-octacosanol	60
**n-nonacosanol	2.9	**n-dotriacontanol	1.7
**n-tetratriacontanol	3.3	** Stigmasterol	27.5
**Fampesterol	30.0	**β-sitosterol	31.6

Fuente: Rivera, Rodríguez & Castillo, 2010

* Porcentaje en peso base seca de proteína cruda de cachaza
 ** Porcentaje en peso base seca de ceras, resinas y aceites de cachaza

2.5. Producción de etanol a partir de materia lignocelulósica

Abril & Navarro (2012), indica la importancia del empleo de materiales lignocelulósicos como materia prima para procesos de transformación que impliquen el empleo de microorganismos, esto debido a que estos materiales presentan una estructura de celulosa, hemicelulosa y lignina, además que son residuos agroindustriales de mayor abundancia y renovables, sin olvidar también el hecho que son de menor costo para la producción de etanol. La transformación de este material a bioetanol se da en dos pasos:

- Hidrólisis de compuestos de celulosa y hemicelulosa a azúcares simples o reductores.
- Fermentación de los azúcares simples o reductores a bioetanol.

De estos compuestos del material lignocelulósico, la lignina es el único que no puede ser fermentado a diferencia de la celulosa y hemicelulosa que pueden ser hidrolizados a azúcares simples para luego ser fermentados.

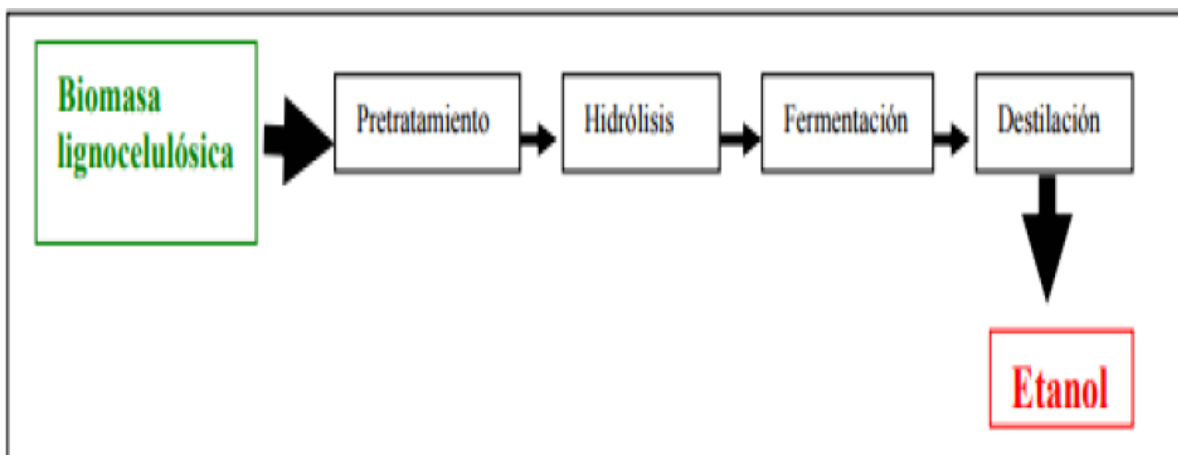


Figura 3. Esquema del proceso de generación de bioetanol a partir de material lignocelulósico
Fuente: Abril & Navarro, 2012.

2.6. Composición de biomasa lignocelulósica

Este material presenta la siguiente composición básica en base seca: hemicelulosa (15% - 35%), celulosa (20% - 50%) y lignina (10% - 30%). Cuenta también con componentes en menor porcentaje: como lípidos (1% - 5%), proteína (3% - 10%), azúcares solubles (1% - 10%) y minerales (5% - 10%) (Chundawat *et al.*, 2011).

Celulosa: Polímero lineal compuesto por monómeros de glucosa que, al hidrolizarse, libera monosacáridos fácilmente fermentables. Este polímero posee dos estructuras: una cristalina (organizada) y otra amorfa, siendo la amorfa más susceptible a las enzimas (Riaño, 2010), las regiones cristalinas, para poder ser hidrolizadas requieren ser desestabilizadas preliminarmente (Rueda y Herrera, 2006).

Hemicelulosa: Carbohidrato complejo y heterogéneo; compuesto por pentosas, hexosas y ácidos entrelazados los cuales forman una cadena lineal que presenta ramificaciones (Cortínez, 2010). Este polímero no presenta estructura cristalina y puede ser hidrolizado con facilidad (Cunningham & López, 1994). La biomasa lignocelulósica va a regir su composición de azúcares en base a su naturaleza inicial (Torres, *et al.* 2015) estos azúcares pueden clasificarse en pentosanos y hexosanos en función al porcentaje de azúcares con 5 o 6 carbonos en su estructura (Cortínez, 2010).

Lignina: Componente de índole no polisacárida el cual presenta una mayor abundancia en la pared celular vegetal. Está conformada por compuestos aromáticos que provienen de azúcares a los cuales se les ha sustraído agua de manera irreversible (Rueda & Herrera, 2006). Polímero no carbohidratado que en la naturaleza se encuentra entremezclado con la celulosa y la hemicelulosa y confiere rigidez a los materiales lignocelulósicos. Esta puede ser extraída mediante de distintos pre tratamientos con el objetivo de romper la matriz lignocelulósica y facilitar la hidrólisis de la celulosa y la

hemicelulosa (Tomás, 2009).

2.7. Pretratamientos de materia lignocelulósica

La materia lignocelulósica se compone de una estructura compleja y difícil de penetrar y atacar por agentes químicos, por lo cual, se requiere un pre tratamiento para romper esta estructura y facilitar así los siguientes procesos. Este pre tratamiento se realiza con el propósito de remover la lignina y la hemicelulosa (figura 4), disminuir la cristalinidad de la celulosa, incrementar la porosidad y área de contacto de los materiales facilitando así la hidrólisis. En este pre tratamiento de material lignocelulósico una fracción de hemicelulosa es hidrolizada (Sun & Cheng, 2002).

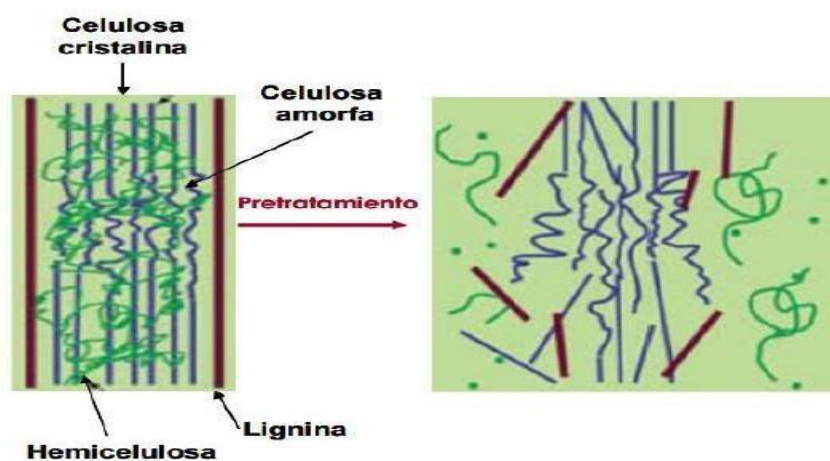


Figura 4. Representación esquemática del proceso de pre tratamiento
Fuente: Pérez,2008.

Mosier *et al.* (2005), considera que esta etapa es el más grande desafío técnico, debido a que en este periodo se producen los inhibidores que impiden tener un proceso de fermentación adecuado. Esta producción de inhibidores puede disminuirse teniendo un apropiado control tanto de la temperatura como del pH.

Jonsson & Martín (2016), indican que ácido acético y compuestos furanos como el furfural y el hidroximetilfurfural son los principales inhibidores que se producen en esta etapa. Pérez (2008), señala que en la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) se

origina el furfural y en la degradación de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa) se forma el hidroximetilfurfural

Mientras Tomás (2009), señala que el ácido acético es un producto final de reacciones de oxidación, también se forma a partir de los grupos acetilados de la hemicelulosa. La consecuencia sobre la formación de estos inhibidores en las levaduras se ve reflejada en la disminución del rendimiento de etanol y de la producción de biomasa.

2.7.1. Hidrólisis

En esta etapa del proceso del pre tratamiento, consta de romper el polímero de los polisacáridos que se encuentran en los sólidos insolubles en agua, dicho sólido está constituido por celulosa. (Margeot *et al.*, 2009).

En la hidrólisis, la glucosa se obtiene cuando la celulosa se transforma en esta, y la hemicelulosa lo hace en pentosas y hexosas (Manosa, glucosa, xilosa, etc), toda esta reacción que se da es catalizada mediante enzimas (celulasa) o ácido.

Cuando se realiza la hidrólisis empleando el material lignocelulósico sin pretratar, se obtiene un rendimiento menor al 20%, mientras que cuando se utiliza el material pretratado, el rendimiento obtenido puede ser superior al 90%. El tipo de hidrólisis utilizada puede ser ácida o enzimática (Hamelinck *et al.*, 2005).

2.7.2. Hidrólisis ácida

En este tipo de hidrólisis se utiliza ácido sulfúrico (H_2SO_4) o ácido clorhídrico (HCl), en el cual el ácido hidroliza la celulosa y parte de la hemicelulosa; también romper la matriz de lignina (Riaño, 2010).

Al emplear condiciones ácidas fuertes en la hidrólisis, se usa un rango de temperaturas

superiores a 160 °C, en los procesos comerciales se realizan las hidrólisis utilizando una temperatura por debajo de los 120 °C, con la finalidad de minimizar la degradación de la fructosa y la glucosa, los cuales se degradan a temperaturas superiores a 106°C y un pH menor a 2. Los productos de degradación son 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) (Bower *et al.*, 2008). Al realizar esta hidrólisis empleando concentraciones de ácido bajas (0,5-1,5%), se utilizan temperaturas entre 121 y 160°C (Brethauer & Wyman, 2010).

En el pre tratamiento con ácido diluido puede emplearse altas temperaturas (160°C - 200°C), y bajas cargas de sólidos (relación, sólido: líquido de 1:20 a 1:10) o a bajas temperaturas (120°C - 160°C) y alta carga de sólidos (1:10 a 4:10) (Cortínez, 2010).

2.8. Inhibidores de la fermentación alcohólica

Wang & Feng (2010), señalan que al someter bajo condiciones severas (altas temperaturas, presión elevada o ambientes ácidos) a la biomasa lignocelulósica esta tiene una mayor posibilidad de formar productos nocivos (ácidos carboxílicos, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (HMF)), compuestos fenólicos y sales inorgánicas, las cuales actuarían como sustancias nocivas para la fermentación.

Estos compuestos tienen características tóxicas en los microorganismos, como se puede observar en la tabla 2. El furfural y HMF influyen en la actividad de la enzima deshidrogenasa, la cual interfiere en el proceso de glucólisis aminorando el nivel de crecimiento celular. Por otro lado, el transporte de azúcares puede verse interferido por los compuestos fenólicos (Pienkos & Zhang, 2009).

Tabla 2. Efecto de inhibidores de la fermentación sobre la producción de etanol

	<i>E.coli</i> LY01		<i>S.cerevisiae</i>		<i>Z. mobilis</i> CP4		<i>P. stipitis</i>	
	Conc. (g/L)	Inhi. (%)	Conc. (g/L)	Inhi. (%)	Conc. (g/L)	Inhi. (%)	Conc. (g/L)	Inhi. (%)
Furfural	3.5	38	4.0	79	0.95	40	1.3	9
5-HMF	8.0	50	8.0	50	0.05	16	-	-
4-Hidroxi-Benzaldehído	1.0	-38	1.0	72	-	-	-	-
Siringaldehído	2.5	13	-	-	0.13	33	-	-
Vainillina	1.5	38	1.0	25	0.04	38	0.09	54
Ácido acético	3.0	98	1.3	50	-	-	-	-
	15.0	21	6.0	74	-	-	10.0	95
Ácido levulínico	30.0	69	-	-	-	-	10.0	29
	20.0	85	40	50	-	-	-	-
Ácido 4-hidroxibenzoico	2.5	79	1.0	30	-	-	-	-
Ácido siríngico	5.0	62	1.0	-17	0.09	9	-	-

Fuente: Adaptado de Pienkos & Zhang, 2009.

2.9. Desintoxicación del hidrolizado

El objetivo de la desintoxicación es aminorar la concentración de elementos tóxicos que se encuentran en el hidrolizado los cuales fueron formados en el pre tratamiento e hidrólisis de la materia prima, estos elementos actúan como inhibidores del proceso fermentativo. Existen tres maneras de desintoxicación (biológicos, químicos y físicos) los cuales reducen los niveles de toxicidad de estos compuestos transformándolos en otros con menor nivel, por otro lado, el método físico busca la remoción total de estos elementos (Palmqvist & Hahn, 2000).

Tabla 3. Ventajas y desventajas de los métodos de desintoxicación

MÉTODO DE DESINTOXICACIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Físicos		
Evaporación	Remueve inhibidores volátiles o inhibidores finales como furfural y ácido acético.	No es efectivo con inhibidores derivados de la lignina.
Extracción con solventes	Remueve inhibidores volátiles y no volátiles.	Se requiere una operación unitaria adicional para remover el solvente.
Tamices moleculares	Remueve inhibidores volátiles y no volátiles.	Pérdida de azúcares.
Químicos		
Ca (OH) ₂ - Overliming	Precipita una gran variedad de inhibidores.	Degradación de los azúcares presentes.
NH ₄ OH, NaOH, etc.	Neutraliza y precipita inhibidores.	Menos efectivo que El Ca (OH) ₂ .
Zeolitas	Remoción de inhibidores.	Menos efectivo que El Ca (OH) ₂ .
Tierras diatomeas	Remoción de inhibidores.	Pérdida de azúcares.
Carbón activado	Remoción de inhibidores.	Pérdida de azúcares.
Adsorbentes poliméricos	Remoción de inhibidores (alta eficiencia).	Costo y posible pérdida de azúcares.
Biológicos		
<i>S. cerevisiae</i> Modificada	Degrada inhibidores en compuestos menos tóxicos.	Costo y remoción de los compuestos menos tóxicos para su aprovechamiento.
Complejo de lacasas y peroxidasas	Degrada inhibidores fenólicos derivados de la lignina.	No degrada furanos, ni ácidos alifáticos. Tiempos largos de degradación.
Adaptación	Cepas tolerantes a inhibidores.	Manipulación y tiempos largos de tratamiento.

Fuente: Adaptado de Wang & Feng, 2010.

2.10. Fermentación

Es la tercera etapa que constituye la producción de bioetanol, se realiza luego de haber desarrollado una adecuada hidrólisis y desintoxicación, en la cual se obtienen pentosas y hexosas a partir de materia lignocelulósica (Margeot, *et al*, 2009).

Rodríguez (2016), señala que es un proceso, el cual se da bajo presencia o ausencia de oxígeno, donde la materia orgánica es degradada para obtener diversos productos. Los microorganismos que se utilizan son levaduras o bacterias, capaces de producir enzimas

que degradan la materia orgánica para obtener a través de este proceso energía en forma de ATP.

Se pueden emplear tres estrategias en la producción de etanol: fermentación por lotes, lote alimentado o continuo. En las fermentaciones donde el mosto proviene de un proceso de hidrólisis, la tasa de crecimiento celular está vinculada al pH, debido a la concentración de ácidos débiles no disociados. El ajustar el pH del hidrolizado a un valor de 4.6 ocasiona una duración aproximada de 17 h sobre la fase de adaptación de las células, mientras que a pH mayores o iguales a 5, el crecimiento celular tiene inicio inmediatamente después de ser inoculado el medio. Una opción para superar el efecto de los ácidos débiles del hidrolizado, es inocular una concentración elevadas de células con lo cual se consigue aumentar la productividad del proceso (Palmqvist & Hahn, 2000).

Sela (2015), indica controlar parámetros clave del proceso fermentativo con el objetivo de obtener un rendimiento adecuado de este. Un rango de pH entre 4-5 favorece el crecimiento de *S. cerevisiae*, al trabajar a una temperatura entre 30-35°C aumenta su actividad, la presión no debe sufrir aumento durante la fermentación debido a que disminuye la actividad de la levadura. El control sobre los requerimientos nutricionales es esencial para poder llevar un correcto proceso, siendo necesario un control sobre la concentración de los nutrientes como azúcares, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio, magnesio, vitaminas y nivel de agua.

2.11. Destilación

Es el último paso del proceso en la obtención de bioetanol, el cual tiene como objetivo separar el etanol del agua aplicando calor basándose en los diferentes puntos de ebullición (Margeot, *et al*, 2009). Los puntos de ebullición del etanol y agua son de 78.2

y 100 °C respectivamente bajo condiciones de presión atmosférica a nivel del mar. Al aplicarse el proceso de destilación sobre el medio de cultivo rico en etanol, se va obteniendo un vapor que cada vez se va concentrando con el componente de mayor volatilidad (etanol). De este modo, la fracción líquida se va enriqueciendo de manera progresiva con etanol (Barroso 2010).

III. MÉTODOS

3.1. Población

La cachaza producida de la empresa Agroindustrial Laredo S.A.A del departamento de La Libertad en el periodo de enero del 2019.

3.2. Muestra

La muestra de cachaza fue recolectada el día 18 de enero del 2019 de la Empresa Agroindustrial Laredo S.A.A, Laredo, La Libertad - Perú.

3.3. Diseño experimental

En esta investigación se realizó un diseño factorial debido que lo que se busca es determinar la interacción entre las variables de azúcares reductores (liberados de un proceso de hidrólisis ácida del residuo azucarero cachaza) y el extracto de levadura en la producción de bioetanol, obteniendo como respuesta de interés de la interacción el rendimiento de sustrato a producto (Y_p/s), biomasa (Y_x/s), productividad volumétrica (Q_p) y velocidad específica de crecimiento (μ). La importancia de usar este diseño es que permite buscar interacciones entre variables independientes, para estudiar el efecto conjunto de estas variables sobre una respuesta.

Tabla 4. Diseño Experimental

Ensayos	Valores Codificados		Respuesta Dependiente		Tipo de Ensayo
	X ₁	X ₂	Y _{p/s} (g/g)	Q _p (g/L.h)	
E1	-1	-1	---	---	Factorial
E2	-1	1	---	---	
E3	1	-1	---	---	
E4	1	1	---	---	
E5	0	0	---	---	Central
E6	0	0	---	---	
E7	0	0	---	---	

Fuente: elaboración propia.

Tabla 5. Matriz del diseño experimental

Variables Codificados	-1	0	1
(X ₁) = concentración de fuente de carbono (Azúcares reductores Totales obtenidos del hidrolizado de cachaza) g/L	9.8	12.3	14.7
(X ₂) = concentración de fuente de nitrógeno (Extracto de levadura) g/L	0.7	0.9	1.1

Fuente: elaboración propia

3.4. Procedencia de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126

La procedencia de la cepa fue del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Universidad Nacional del Santa.

3.5. Mantenimiento y activación de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126

Para el mantenimiento de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 se empleó el medio sólido YPD (Extracto de Levadura – Peptona – Dextrosa) (De Martín, 2005) que se mantuvo a 4°C (Pawar *et al.*, 2017). La activación de la cepa de *Saccharomyces*

cerevisiae ATCC 4126 se realizó en el medio extracto de malta, la cepa se incubó a 28 °C durante 24 h (De Martín, 2005).

3.6. Recolección, transporte y almacenamiento de la muestra de cachaza

La muestra de cachaza fue recolectada a la salida del filtro Oliver de la Empresa Agroindustrial Laredo, la muestra fresca se almacenó para su transporte en una caja de tecnopor la cual en su interior se encontraba forrada con papel aluminio. Sobre el papel aluminio se pusieron geles de enfriamiento, los cuales también se forraron con papel aluminio para que no entren en contacto directo con la muestra.

Este sistema se empleó con el fin de inhibir el metabolismo de la carga microbiana presente en la cachaza. La muestra fresca recolectada se mantuvo almacenada en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso en el proceso fermentativo (Pawar *et al.*, 2017).

3.7. Pre tratamiento de la cachaza

3.7.1. Secado de la cachaza

La deshidratación de la cachaza se realizó con el propósito de minimizar considerablemente la actividad microbiana debido a su alto contenido de humedad (Dissa *et al.*, 2008).

La muestra fresca de cachaza se colocó sobre una bandeja de metal, la cual fue cubierta con papel aluminio en la parte inferior, la deshidratación se realizó en una estufa a 60°C durante 24 – 36 h, la cachaza deshidratada fue molida en un mortero y tamizada empleando un tamiz N° 30 y posteriormente un tamiz N° 70 (Mejía *et al.*, 2009).



Figura 5. Muestra de (a) cachaza húmeda y (b) después del proceso de secado
Fuente: elaboración propia.

3.7.2. Pre ensayos de hidrólisis ácida

Se realizaron 7 ensayos de hidrólisis ácida empleando ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1.5 % (v/v), sobre la muestra de cachaza, cada uno con 2 réplicas genuinas, se estudiaron 7 tiempos de retención en la autoclave a una temperatura constante de $121\text{ }^\circ\text{C}$.

Los tiempos de retención fueron de 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 h, con la finalidad de encontrar el mejor tiempo de retención que genere una mayor concentración de Azúcares Reductores Totales (ART) y glucosa para la fermentación.

Se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor (tiempo) para comprobar si existen diferencias en las medias, con un nivel de significancia del 5 % ($\alpha = 0.05$) para el análisis de los resultados. Se utilizó este diseño con la finalidad de separar la variabilidad debida a los tratamientos dados y al error. Cuando los tratamientos realizados sobresalen notoriamente sobre el error, es cuando se determina que los tratamientos tienen efecto y las medias son diferentes, este diseño es importante debido que permite comparar dos o más tratamiento y considera dos fuentes de variabilidad los tratamientos y el error aleatorio.

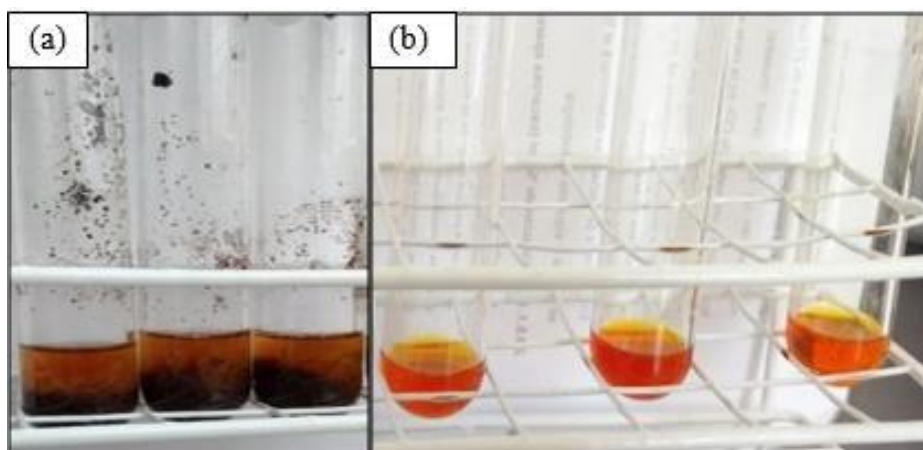


Figura 6. (a) Muestras hidrolizadas de cachaza y (b) análisis de ART por el método DNS

Fuente: elaboración propia.

3.7.2.1. Hidrólisis ácida de la cachaza

El protocolo para la hidrólisis ácida se modificó de Pawar (2017) y se llevó a cabo en frascos de 500 mL empleando ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1.5 % (v/v), con una relación de sólido-líquido de 1:11 (Se preparó 35 g cachaza en 350 mL ácido, 100 g/L de cachaza), la mezcla obtenida se sometió a un proceso térmico a $121^{\circ}C$, el tiempo del proceso de hidrólisis se obtuvo del pre ensayo, culminado el proceso se dejó enfriar la autoclave para poder retirar el matraz. El hidrolizado de cachaza fue filtrado empleado papel filtro grueso de poro pequeño, posteriormente se ajustó el pH a 5.0 con hidróxido de sodio al 5 N para dar lugar al proceso de desintoxicación del hidrolizado de cachaza con carbón activado.



Figura 7. Frascos con 350 mL de hidrolizado de cachaza sin filtrar.

Fuente: elaboración propia.

3.7.2.2. Desintoxicación del hidrolizado de cachaza

La hidrólisis ácida de biomasa lignocelulósica genera varios tipos de inhibidores para *Saccharomyces cerevisiae*, tales como furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) y fenólicos, estos compuestos son capaces de inhibir la fermentación llevada a cabo por bacterias y levaduras (Maurya, Singla & Negi, 2015), es por tal motivo que la desintoxicación del hidrolizado de cachaza es fundamental. Para la desintoxicación del hidrolizado de cachaza se aumentó gradualmente su pH hasta 5.0 utilizando perlas de NaOH. Posteriormente se añadió carbón activado al 5% (p/v) en el hidrolizado. La mezcla de hidrolizado y carbón activado se sometió durante 2 h a una temperatura de 60°C y una agitación de 200 rpm (Pawar *et al.*, 2017). El carbón activado se separó por filtración simple, el hidrolizado filtrado obtenido se centrifugó a 5 000 rpm durante 10 min para hacer precipitar todos los sólidos que se generaron por el ajuste del pH, luego se procedió a filtrar el sobrenadante, el hidrolizado filtrado se autoclavó para su uso en el proceso fermentativo.

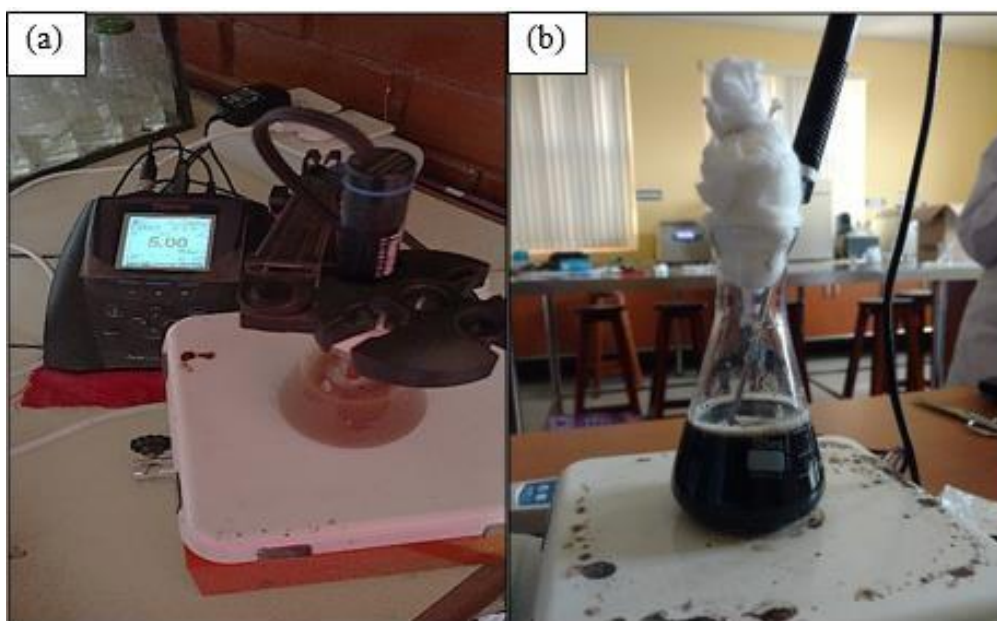


Figura 8. (a) Ajuste del pH del hidrolizado de cachaza, y (b) proceso de desintoxicación con carbón activado

Fuente: elaboración propia.

3.8. Caracterización del hidrolizado de cañaza

3.8.1. Método DNS

Para la preparación de este método se modificó el procedimiento realizado por Miller (1959); en un tubo de ensayo con tapa rosca se agregó una alícuota de 300 μL de muestra y 300 μL de reactivo DNS, se colocaron los tubos en baño maría por 5 min (figura 9) y luego en agua con hielo por 5 min. Se agregó al tubo de ensayo 3 mL de agua destilada y se dejó reposar por 20 min. Finalmente, se agitó y se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 540 nm contra un blanco que contenía agua destilada con reactivo de DNS. Este método también se empleó para analizar el consumo de ART durante los ensayos de fermentación.

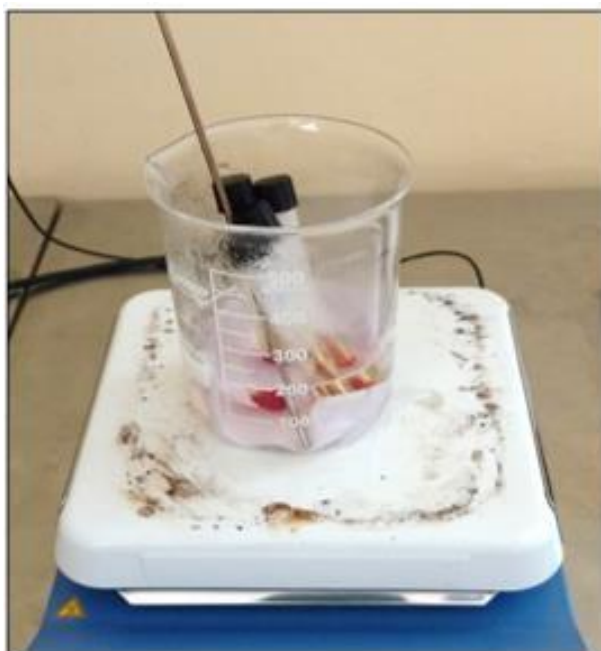


Figura 9. Muestras de hidrolizado de cañaza con reactivo DNS sometidas a baño María
Fuente: elaboración propia.

3.8.2. Análisis de glucosa

Para el análisis de glucosa se empleó el kit glicemia enzimática, se agregó 5 μ L de la muestra y 0.5 mL del kit enzimático, inmediatamente se incubó 5 min en baño maría a 37 °C (figura 10), se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 505 nm. Este método también se empleó para analizar el consumo de glucosa durante los ensayos de fermentación.



Figura 10. Muestras de hidrolizado de cachaza más kit enzimático sometidas a baño María a 37°C
Fuente: elaboración propia.

3.9. Preparación del inóculo

La preparación del inóculo se extrajo una colonia de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126, el cual se inoculó en un caldo nutritivo suplementado con glucosa y extracto de levadura a 28°C a 120 rpm durante 24 h. Luego se trasvasó una alícuota a un medio con hidrolizado de cachaza suplementado con glucosa y extracto de levadura a 28°C con una agitación de 120 rpm durante 24 h. Culminada esta última etapa se tomó un volumen que representó el 10 % del volumen total del medio de fermentación final.

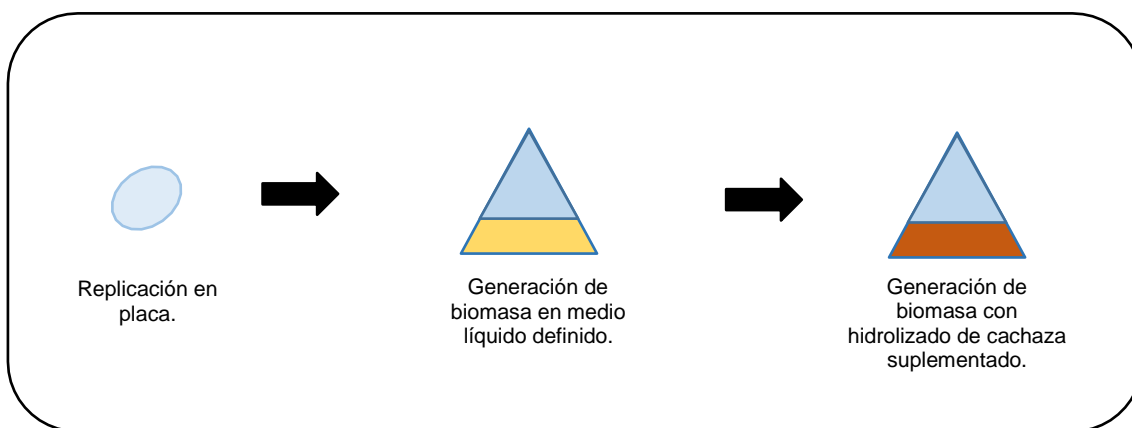


Figura 11. Estrategia para la preparación del inóculo empleado en la fermentación
Fuente: elaboración propia.

3.10. Diseño y preparación del medio de fermentación

El medio de fermentación para la producción de etanol, se diseñó en base a la composición elemental para levaduras, las cantidades requeridas en el medio fueron diseñadas para obtener una concentración celular de 1 g/L. Todos los nutrientes excepto la fuente de carbono (nutriente limitante) y nitrógeno se encontraron en una 30% de exceso. El nutriente limitante fue nuestra fuente de carbono debido a que el proceso fermentativo no debe ser interrumpido por la falta de otros nutrientes ya que se está estudiando el efecto de la interacción de esta fuente con la de nitrógeno y si la fermentación se ve limitada por otros nutrientes obtendríamos valores erróneos en los rendimientos. La tabla 6 muestra la composición del medio de cultivo junto con los valores de ART y extracto de levadura a evaluar y en el anexo 4 se muestra el diseño del medio de cultivo.

Tabla 6. Composición del medio de cultivo para producción de etanol

Componentes	Concentración (g/L)
ART	9.8-12.3-14.7
Ext. Lev.	0.7-0.9-1.1
KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.01
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.004
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.01

Fuente: elaboración propia.

3.11. Concentración de Azúcares Reductores Totales (ART)

Para lograr alcanzar la concentración de 14.7 g/L de ART se tuvo que proceder a realizar un proceso de evaporización del agua presente en el hidrolizado, para lo cual se sometió este a un proceso de ebullición en baño maría durante 30 – 1 h hasta alcanzar el volumen final de hidrolizado que presente la concentración requerida.

Para obtener el volumen de líquido a evaporar se empleó la siguiente fórmula:

$$Vol. Ev = Vi - \left(\frac{Vi * Ci}{Cf} \right)$$

Fuente: Gómez, 1994.

Donde:

Vol. Ev = Volumen a evaporar

Vi= Volumen inicial

Ci= Concentración inicial

Cf= Concentración final

3.12. Proceso fermentativo

El medio de cultivo se ajustó de acuerdo a las concentraciones de ART (9.8 g/L, 12.3 g/L y 14.7 g/L) y de extracto de levadura (0.7 g/L, 0.9 g/L, 1.1 g/L) determinadas para los ensayos, el volumen del medio de fermentación fue de 5 mL y se agregó un inóculo que representó el 10 % del medio de fermentación en condiciones asépticas. Cada ensayo se realizó con 9 viales (figura 12a, cada vial representó un punto de análisis durante la fermentación), la fermentación se realizó durante 16 h a 28 °C y el muestreo se realizó cada 2 h.

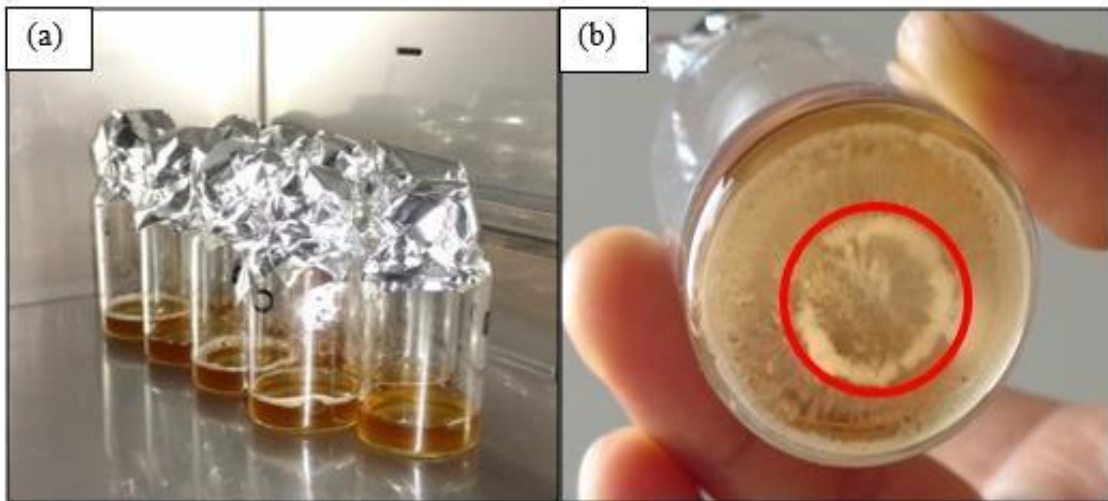


Figura 12. Proceso fermentativo en (a) tándem de 9 viales. En la figura (b) se aprecia en el fondo del vial biomasa de *S. cerevisiae*

Fuente: elaboración propia.

3.13. Acondicionamiento de muestras para análisis

Se colectaron 2 muestras de 1.5 mL por punto de monitoreo las cuales se sometieron a un shock térmico, 5 min a 60 °C, luego 5 min en agua helada para evitar el crecimiento de la levadura. Posteriormente ambas muestras se centrifugaron a 10000 rpm por 1 min (Esparza, 2002) y se almacenaron en refrigeración hasta su posterior análisis para determinar la concentración de biomasa y bioetanol, en la figura 13 se aprecia el sistema empleado para realizar la inactivación de la levadura.

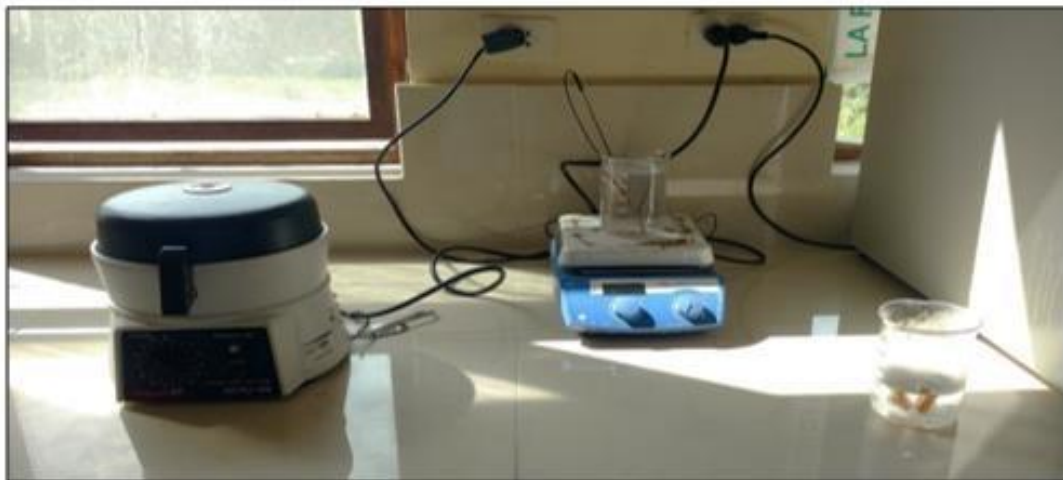


Figura 13. Sistema para la inactivación de *S. cerevisiae*

Fuente: elaboración propia.

3.14. Determinación de biomasa

Para determinar la biomasa se empleó la metodología de peso seco para lo cual se tomó una muestra de 1 mL del medio de fermentación y se colocó en un microtubo de 1.5 mL seco y previamente pesado. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm a 4°C por 6 min, finalizada la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet, el proceso de centrifugación se repitió dos veces bajo las mismas condiciones.

Finalmente, la biomasa húmeda se secó durante 3 h a 105°C, los datos obtenidos se reemplazaron en la siguiente fórmula:

$$\text{Peso seco } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{(\text{Peso del tubo} + \text{muestra seca}) - (\text{Peso inicial del tubo})}{\text{volumen de la muestra} = 0.001 L} *$$

Fuente: Gómez, 1994.

El dato se expresa en gramos de masa seca por litro, los datos de biomasa se muestran en la tabla N°13 y su cinética en la figura 18.

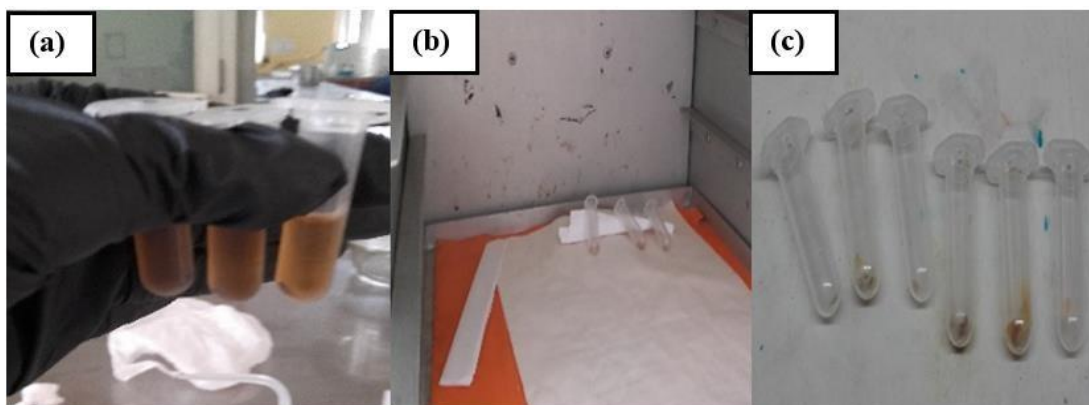


Figura 14. (a) Microtubos con 1 mL del medio de fermentación (b) Biomasa húmeda siendo secada en estufa (c) Biomasa seca obtenida.

Fuente: elaboración propia.

3.14.1. Análisis de bioetanol

La cuantificación del etanol se realizó por cromatografía de gases (CG) en el laboratorio del Instituto de Investigación Tecnológica Agroindustrial (IITA) de la Universidad Nacional del Santa. (Anexo 8).



Figura 15. Filtración de la muestra con filtros de jeringa con membrana de nylon de 0.45 μ m de porosidad

Fuente: elaboración propia.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados de los pre ensayos de hidrólisis ácida de la cachaza

4.1.1. Liberación de Azúcares Reductores Totales

El pre ensayo se realizó con la finalidad obtener la mayor liberación de ART en el menor tiempo sometido a las mismas condiciones de hidrólisis ácida. El resultado de los 7 tiempos probados (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 h) se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Concentración de azúcares reductores de los pre ensayos de la hidrólisis ácida de cachaza

Tiempo (h)	ART (g/L)			
	Tratamiento	Réplica 1	Réplica 2	Promedio
1	9.27	9.62	9.34	9.48
2	10.33	11.55	11.34	11.07
3	11.79	13.24	11.91	12.31
4	13.14	12.9	12.86	12.97
5	13.58	13.05	11.38	12.67
6	11.66	11.2	12.33	11.73
7	11.24	10.31	12.51	11.35

Fuente: elaboración propia.

El análisis de varianza de un solo factor que se muestra en la tabla 8 muestra que el factor “tiempo” tiene un efecto significativo a un nivel de significancia del 5 % (Valor $p = 0.000902 < 0.05$) en la liberación de ART, este valor de significancia del 5 % ($\alpha = 0.05$) fue hallado del análisis de varianza ANOVA. Se aplicó un análisis de diferencias significativas de Tukey para determinar con que tratamiento trabajar, del análisis se determinó trabajar a 3 h, esto debido a que trabajar con 1 y 2 h se puede indicar que estadísticamente es igual la respuesta en la liberación de ART pero trabajar a 3 h genera una diferencia significativa que se ve reflejado en el aumento de ART liberados, los tratamientos restantes no presentan diferencias significativas con respecto al tratamiento de 3 h por lo cual se empleó este tratamiento (el cual generó una media de ART liberados

de 12.3 g/L) para el diseño factorial y se determinó utilizar un paso de $\pm 20\%$ con respecto al punto central.

El porcentaje de ART que se obtuvo del tratamiento a 3 h se encuentra en el rango del 11.79 y 13.24 % (rango observado en la tabla 7 el cual es transformado a porcentaje debido a que la concentración preparada fue de 100g/L como se indica en el punto 3.7.2.1 por lo tanto la conversión de gramos por litro a porcentaje es igual) dentro del rango obtenido por Ferrer *et. al*, 2002, en su estudio sobre la cinética de la hidrólisis ácida de bagazo de caña de azúcar, en donde obtuvieron un porcentaje de ART liberados entre 2.54 y 21 % con pre y sin pre tratamiento de la materia prima, además, no obtuvieron diferencias significativas entre procesar la materia prima con o sin pre tratamiento. Con esto podemos indicar que el porcentaje de ART obtenidos de nuestro proceso de hidrólisis ácida se encuentra dentro de los valores obtenidos de hidrólisis solo de bagacillo de caña de azúcar.

Nimbalkar *et. al*, 2017, en su investigación para la obtención de biobutanol mediante hidrólisis ácida de cachaza obtuvo del proceso de hidrolisis una liberación de ART de 19.08 g/L, trabajando a una concentración de 1.5 % de ácido sulfúrico, una relación de 1:5 y un tiempo de hidrólisis de 15 min. La variación del proceso de hidrólisis que se llevó a cabo en el presente trabajo de investigación logró obtener una concentración de 12.3 g/L, 35.5 % menos en comparación de la concentración de ART obtenida por Nimbalkar.

Tabla 8. Análisis de varianza de un solo factor para la liberación de ART

Fuente	Grado de libertad	ART (g/L) SS	ART (g/L) MS	ART (g/L) F	ART (g/L) p
Tratamientos	6	25.975	4.329	7.593	0.000902
error	14	7.982	0.570		
Total	20	33.958			

Fuente: elaboración propia.

Tabla 9. Prueba de Tukey para para la liberación de ART

Número de celda	Tiempo (h)	{1} 9.4100	{2} 11.073	{3} 12.313	{4} 12.967	{5} 12.670	{6} 11.730	{7} 11.353
1	1		0.169614	0.004882	0.000868	0.001826	0.026792	0.079428
2	2	0.169614		0.449248	0.091336	0.201029	0.928512	0.999114
3	3	0.004882	0.449248		0.930062	0.996549	0.957839	0.709119
4	4	0.000868	0.091336	0.930062		0.998775	0.452164	0.192757
5	5	0.001826	0.201029	0.996549	0.998775		0.727234	0.384795
6	6	0.026792	0.928512	0.957839	0.452164	0.727234		0.995359
7	7	0.079428	0.999114	0.709119	0.192757	0.384795	0.995359	

Fuente: elaboración propia.

4.1.2. Liberación de glucosa

Del pre ensayo también se determinó la liberación de glucosa del proceso de hidrólisis ácida, los datos se muestran en la tabla 10. El Análisis de los datos se aprecia en la tabla 11, del cual se evidencia que el factor “tiempo” tiene un efecto significativo a un nivel de significancia del 5 % (Valor $p = 0.000198 < 0.05$) en la liberación de glucosa del proceso de hidrólisis ácida. Del análisis de Tukey se determinó trabajar a 3 h, tiempo que se halló para los ART, esto debido a que no existe diferencia significativa trabajar a 1, 2, 3 y 4 h más sí al trabajar a 5, 6 y 7 h, tiempos a los cuales el proceso se vuelve muy largo por lo cual presentaría un mayor consumo energético y liberación de compuestos inhibitorios para el proceso fermentativo. Por tal motivo, los datos de ART, fueron los que determinaron el tiempo de hidrólisis ácida.

Tabla 10. Concentración de glucosa de los pre ensayos en la hidrólisis ácida de cachaza

Tiempo (h)	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (g/L)			
	Tratamiento	Réplica 1	Réplica 2	Promedio
1	0.65	0.77	0.8	0.74
2	0.83	0.68	0.8	0.77
3	1.19	1.09	0.87	1.05
4	0.92	1.01	1.02	0.98
5	1.31	1.31	1.54	1.39
6	1.07	1.54	1.07	1.23
7	1.54	1.31	1.78	1.54

Fuente: elaboración propia.

Tabla 11. Análisis de varianza de un solo factor para la liberación de glucosa

Fuente	Grado de libertad	Glucosa (g/L) SS	Glucosa (g/L) MS	Glucosa (g/L) F	Glucosa (g/L) p
Tratamientos	6	1.64813	0.27469	10.1773	0.000198
error	14	0.37787	0.02699		
Total	20	2.02600			

Fuente: elaboración propia.

Tabla 12. Prueba de Tukey para para la liberación de glucosa

Número de celda	Tiempo (h)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
		.74000	.77000	1.0500	.98333	1.3867	1.2267	1.5433
1	1		0.999985	0.303769	0.560276	0.004017	0.034190	0.000641
2	2	0.999985		0.409176	0.690263	0.005958	0.051000	0.000873
3	3	0.303769	0.409176		0.998513	0.227203	0.833493	0.031249
4	4	0.560276	0.690263	0.998513		0.101887	0.560276	0.012717
5	5	0.004017	0.005958	0.227203	0.101887		0.885789	0.895013
6	6	0.034190	0.051000	0.833493	0.560276	0.885789		0.283006
7	7	0.000641	0.000873	0.031249	0.012717	0.895013	0.283006	

Fuente: elaboración propia.

4.2. Tratamientos del proceso fermentativo

Durante el proceso fermentativo se pudo observar que los ART no son consumidos en su totalidad debido a que la hidrólisis ácida no solo genera azúcares de 6 carbonos, sino también azúcares de 5 carbonos tales como la xilosa y arabinosa que *S. cerevisiae* no puede metabolizar, en la tabla 13 se muestran los datos de las cinéticas de consumo de sustrato y formación de producto en los tratamientos.

Tabla 13. Datos de consumo de sustrato, formación de producto y biomasa de cada tratamiento.

E1				E2			E3		
Tiempo (h)	ART (g/L)	Etanol (g/L)	Biomasa (g/L)	ART (g/L)	Etanol (g/L)	Biomasa (g/L)	ART (g/L)	Etanol (g/L)	Biomasa (g/L)
0	10.158	0.000	0.19	9.647	0.000	0.14	14.865	0.000	0.24
2	9.164	0.535	0.23	8.364	0.783	0.18	11.195	0.017	0.31
4	7.543	0.847	0.34	8.169	0.867	0.23	11.217	1.096	0.36
6	6.873	0.935	0.39	7.824	0.629	0.18	11.044	1.110	0.48
8	6.743	0.928	0.46	8.018	0.981	0.27	10.561	1.450	0.59
10	6.938	0.991	0.49	7.521	0.987	0.25	10.871	1.447	0.69
12	6.570	0.949	0.46	7.845	0.976	0.31	10.785	1.354	0.77
14	6.505	0.959	0.42	7.240	0.906	0.33	10.396	1.342	0.82
16	6.613	0.942	0.45	7.370	0.916	0.35	9.747	1.384	0.78

E4				E5			E6		
Tiempo (h)	ART (g/L)	Etanol (g/L)	Biomasa (g/L)	ART (g/L)	Etanol (g/L)	Biomasa (g/L)	ART (g/L)	Etanol (g/L)	Biomasa (g/L)
0	14.636	0.100	0.23	12.349	0.000	0.14	12.141	0.000	0.16
2	10.104	0.572	0.29	10.720	0.606	0.18	8.667	0.358	0.22
4	9.023	0.914	0.34	9.185	1.253	0.37	8.494	1.396	0.42
6	11.351	0.531	0.45	10.352	1.477	0.41	9.855	1.727	0.51
8	10.499	0.821	0.56	10.244	1.464	0.39	7.067	1.640	0.54
10	10.873	1.331	0.67	9.164	1.575	0.44	8.818	0.670	0.5
12	10.852	1.313	0.71	8.105	1.526	0.49	10.893	1.435	0.57
14	10.769	1.261	0.74	9.445	1.468	0.52	7.910	1.292	0.55
16	8.898	1.198	0.68	9.380	2.055	0.51	8.904	1.759	0.51

E7			
Tiempo (h)	ART (g/L)	Etanol (g/L)	Biomasa (g/L)
0	12.234	0.000	0.21
2	9.533	0.453	0.25
4	8.643	0.943	0.39
6	9.341	1.453	0.47
8	8.425	1.784	0.56
10	7.535	1.949	0.54
12	8.975	1.850	0.63
14	7.430	1.765	0.59
16	8.345	1.734	0.66

Fuente: elaboración propia.

N.D: No detectado.

Se observó un tiempo de fermentación menor debido a la activación previa de la levadura lo que ocasiona la ausencia de una etapa de adaptación lo cual se ve reflejado en el consumo de sustrato (figura 16) y formación de producto (figura 17).

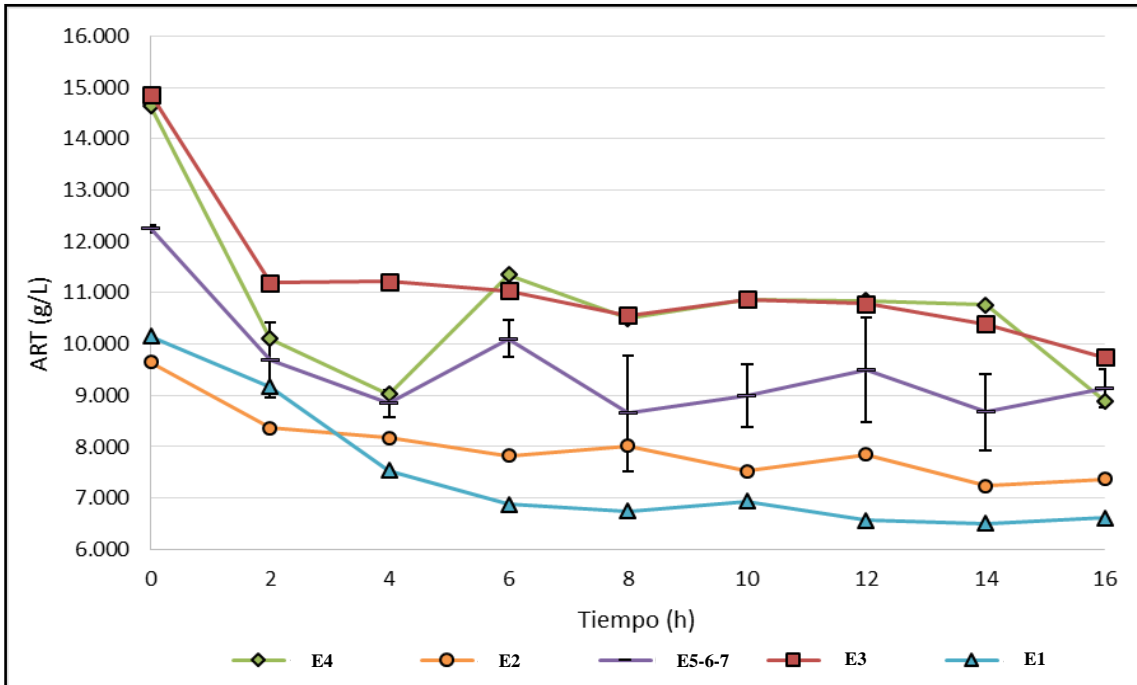


Figura 16. Cinética de consumo de sustrato de acuerdo a la tabla 13.
Fuente: elaboración propia.

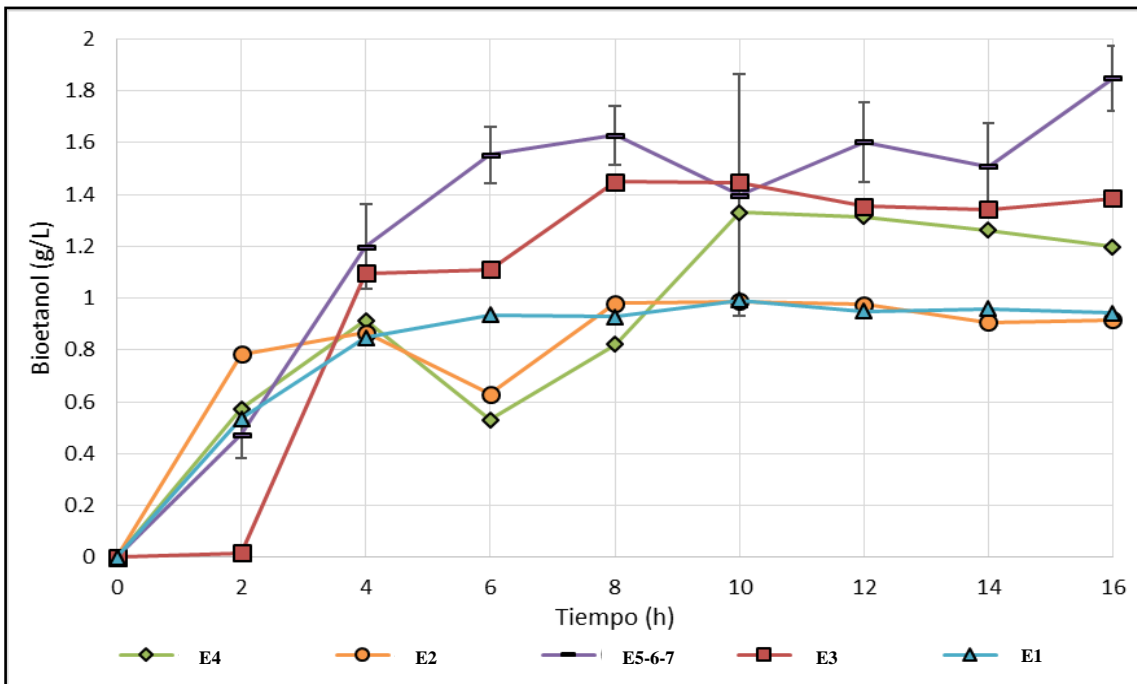


Figura 17. Cinética de formación de producto de acuerdo a la tabla 13.
Fuente: elaboración propia.

Los rendimientos obtenidos (Yp/s) y productividad volumétrica de producto (Qp) se detallan en la tabla 14. El análisis de varianza del diseño factorial reveló que la interacción de los ART y extracto de levadura no fueron significativos al 95 % de confianza para la obtención de mayores rendimientos de Yp/s y Qp (Valor p $_{Yp/s}$ = 0.422 > 0.05 g/g y Valor p $_{Qp}$ = 0.954 > 0.05 g/L.h), todas las variables probadas generaron rendimientos de sustrato a producto (Yp/s) y productividades volumétricas de producto (Qp) estadísticamente iguales.

Debido a la diversidad de nutrientes presentes en el medio de cultivo conferidos por la cachaza y el extracto de levadura, además de la eliminación de más del 90 % con carbón activado de compuestos tóxicos generados por la hidrólisis ácida, este último paso fundamental para que se pueda llevar el proceso fermentativo, se obtuvo un medio de cultivo complejo idóneo, capaz de obtener resultados de rendimientos estadísticamente iguales entre los tratamientos sin importar las variaciones de fuente de carbono y nitrógeno.

Tabla 14. Respuestas de rendimiento (Yp/s) y productividad volumétrica (Qp)

Ensayos	Variables independientes		Variables dependientes		Tipo de ensayo
	ART (g/L)	Ext. Levadura (g/L)	Yp/s (g/g)	Qp (g/L.h)	
E4	14.7	1.1	0.232	0.083	Factorial
E3	14.7	0.7	0.283	0.071	
E2	9.8	1.1	0.410	0.062	
E1	9.8	0.7	0.271	0.062	
E5	12.3	0.9	0.484	0.128	central
E6	12.3	0.9	0.347	0.110	
E7	12.3	0.9	0.406	0.195	

Fuente: elaboración propia.

Tabla 15. Análisis de varianza del diseño factorial para la variable Yp/s

Fuente	Grado de libertad	Yp/s SS	Yp/s MS	Yp/s (g/L) F	Yp/s (g/L) p
ART (g/L)	1	0.006889	0.006889	1.4588	0.350564
Ext. Lev (g/L)	1	0.001936	0.001936	0.4100	0.587552
ART * Ext. Lev	1	0.009025	0.009025	1.9111	0.300973
error	2	0.009445	0.004722		
Total	5	0.049314			

Fuente: elaboración propia.

Tabla 16. Análisis de varianza del diseño factorial para la variable Q_p

Fuente	Grado de libertad	Qp SS	Qp MS	Qp (g/L.h) F	Qp (g/L.h) p
ART (g/L)	1	0.000625	0.000625	0.31151	0.632895
Ext. Lev (g/L)	1	0.000016	0.000016	0.00797	0.936980
ART * Ext. Lev	1	0.000016	0.000016	0.00797	0.936980
error	2	0.004013	0.002006		
Total	5	0.013030			

Fuente: elaboración propia.

4.3. Comparativa de fermentación con material lignocelulósico de bajo costo y glucosa

El proceso fermentativo con glucosa se probó sólo con las concentraciones centrales (12.3 g/L) del diseño factorial, debido a que se determinó que no existen diferencias significativas para los distintos tratamientos, realizándose 3 repeticiones. Los datos que se muestran en la tabla 17, indican que el medio complejo con cachaza y extracto de levadura puede ser usado como materia prima para la producción de etanol, llegando a obtenerse un rendimiento de sustrato convertido a producto (Y_p/s) de 0.41 g/g en comparación con una fermentación que emplea glucosa como fuente de carbono que llegó a tener un rendimiento de 0.48 g/g. La productividad volumétrica que se obtuvo fue 2.57 veces menor en comparación a una fermentación con glucosa, esto debido a que los azúcares que se obtuvieron y el medio en general no es totalmente apropiado en comparación a un medio sintético con fuente de carbono glucosa pura que se metaboliza con mayor velocidad, alrededor 3 veces más rápido, como se acaba de determinar en este estudio.

Tabla 17. Comparación del rendimiento Y_p/s y productividad volumétrica (Q_p) con fuente de carbono glucosa e hidrolizado de cachaza

Repetición	Concentración de glucosa inicial (g/L)	Concentración de alcohol (g/L)	Rendimiento Y_p/s con glucosa (g/g)	Productividad volumétrica Q_p con glucosa (g/L.h)	Rendimiento (Y_p/s) con Cachaza (g/g)	Productividad volumétrica (Q_p) con cachaza (g/L.h)
I	12.3	5.737	0.47	0.35	0.484	0.128
II	12.3	5.941	0.48	0.37	0.347	0.110
III	12.3	6.142	0.49	0.38	0.406	0.195
		Promedio	0.48	0.36	0.41	0.14

Fuente: elaboración propia.

Los resultados obtenidos de rendimiento son similares a los obtenidos por Bellido et. al, (2013); la cual trabaja con *Pichia stipitis* para la producción de bioetanol con material lignocelulósico, obteniendo un rendimiento $Y_{p/s}$ de 0.45 g/g, esto debido a que este microorganismo no solo aprovecha los azúcares de 6 carbonos sino también los de 5.

Pawar, S. Chavan, P & Bankar, S (2017), obtuvieron un rendimiento $Y_{p/s}$ de 0.55 g/g en su trabajo de hidrólisis ácida de cachaza, en el que lograron liberar 21 g/L de azúcares. Además, determinaron que el proceso de desintoxicación con carbón activado removió el 95 % de compuestos fenólicos y el 98 % de furanos, es por lo cual se obtuvo un rendimiento de $Y_{p/s}$ de 0.41 g/g, debido a que los compuestos inhibitorios que se encuentran con mayor presencia después del proceso de hidrólisis fueron removidos casi en su totalidad.

4.4. Rendimiento de formación de biomasa $Y_{x/s}$ y velocidad específica

Del proceso fermentativo se obtuvo rendimientos bajos de conversión de sustrato a biomasa y velocidades de crecimiento específicas altas, esto último debido a la activación previa del inóculo de *S. cerevisiae* que se empleó en la fermentación.

Tabla 18. Respuestas de rendimiento ($Y_{x/s}$) y velocidad específica de crecimiento (μ).

Ensayos	Variables independientes		Variables dependientes		Tipo de ensayo
	ART (g/L)	Ext. Levadura (g/L)	$Y_{x/s}$ (g/g)	μ (h^{-1})	
E4	14.7	1.1	0.064	0.109	Factorial
E3	14.7	0.7	0.062	0.111	
E2	9.8	1.1	0.043	0.124	
E1	9.8	0.7	0.046	0.078	
E5	12.3	0.9	0.056	0.117	central
E6	12.3	0.9	0.063	0.095	
E7	12.3	0.9	0.053	0.087	

Fuente: elaboración propia.

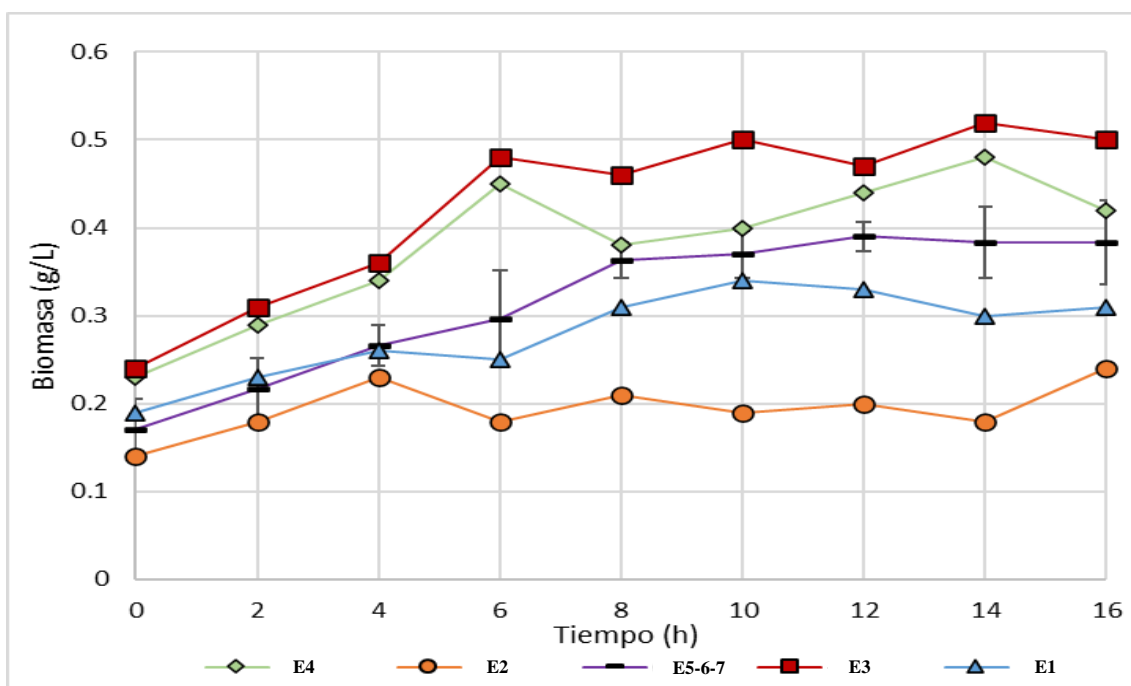


Figura 18. Cinética de formación de biomasa de acuerdo de la tabla 13.
Fuente: elaboración propia.

Hader *et. al*, 2008, en su investigación para la obtención de etanol a partir de una fermentación de almidón de yuca, obtuvo del proceso fermentativo rendimientos entre 0.007 y 0.025 g/g de biomasa, de nuestro proceso fermentativo con cachaza hidrolizada se obtuvo mayores rendimientos entre 0.043 y 0.064 g/g , esto debido a la mayor disponibilidad de ART, minerales y nutrientes en el medio, propios de las materias primas que se emplearon para la formación del medio complejo, aunque la finalidad del proceso fermentativo no es la obtención de altos rendimiento en biomasa, el resultado obtenido es favorable en comparación con el proceso de fermentación de almidón de yuca el cual es un material de fácil hidrólisis para la liberación de ART.

4.5. Comparativa de fermentación sin pre tratamiento con carbón activado

Se realizó una fermentación del medio de cultivo de hidrolizado de cachaza con extracto de levadura al cual no se le realizó el proceso de desintoxicación del medio con carbón activado, el monitoreo de esta fermentación se realizó por 24 h, un tiempo mayor al trabajado para los tratamientos.

Tabla 19. Datos del consumo de azúcares y formación de biomasa del medio de cultivo sin desintoxicación con carbón activado.

Tiempo (h)	Azúcares Reductores (g/L)	Glucosa (g/L)	Biomasa (g/L)
0	9.83	1.28	0
4	7.28	1.1	0.2
8	8.32	1.19	0.1
12	7.05	1.31	0.2
16	6.56	1.16	0.1
20	8.14	0.92	0.1
24	7.32	0.82	0.1

Fuente: elaboración propia.

El proceso de desintoxicación del medio de cultivo el cual es sometido a un proceso de hidrólisis ácida es fundamental, esto se puede apreciar en el consumo de azúcares y formación de biomasa de la tabla 19, el cual muestra una tendencia casi lineal de los datos. Nimbalkar *et. al*, 2017, en su trabajo de investigación para la producción biobutanol mediante un proceso de hidrólisis ácida de cachaza obtuvo una remoción entre 93-97 % de compuestos fenólicos y 98 % de furanos con lo cual pudo llevar a cabo con éxito su proceso fermentativo, esta efectividad del carbón activado para la remoción de compuestos inhibitorios los pudimos comprobar en la fermentación de cada tratamiento.

El proceso de remoción de compuestos inhibitorios con carbón activado secuestra azúcares del medio, pero esta remoción de azúcares no es significativa como detalla Pienkos & Zhang (2009) en su publicación sobre el papel de los procesos de pretratamiento y acondicionamiento en la toxicidad de hidrolizados de biomasa lignocelulósica con lo cual este método se vuelve muy útil y accesible para remover compuestos tóxicos después de procesos de hidrólisis ácida de material lignocelulósico.

4.6. Conclusiones

- Las concentraciones evaluadas de ART obtenidos del hidrolizado de cachaza y extracto de levadura no fueron significativas estadísticamente con lo cual se obtuvo rendimientos Y_p/s y la productividad volumétrica Q_p iguales estadísticamente.
- La mayor concentración de extracto de levadura para alcanzar un mayor rendimiento en la producción de bioetanol no se pudo determinar con los niveles de las variables de estudio, las variables empleadas brindaron un resultado no significativo para las variables de respuesta.
- La mayor concentración de azúcares obtenidos del hidrolizado de cachaza para alcanzar un mayor rendimiento en la producción de bioetanol no se pudo determinar con los niveles de las variables de estudio, las variables empleadas brindaron un resultado no significativo para las variables de respuesta.
- Los rendimientos obtenidos de Y_x/s y Y_p/s del proceso fermentativo fueron 0.057 y 0.41 g/g respectivamente.
- Se determinó el rendimiento Q_p alcanzado en la producción de etanol con hidrolizado de cachaza y extracto de levadura obteniéndose un valor de 0.14 g/L.h, valor que fue 2.92 veces menor a la fermentación con glucosa.
- La velocidad específica alcanzada por *S. cerevisiae* ATCC 4126 en el proceso fermentativo fue de 0.099 h^{-1} , velocidad reducida debido al medio no tan favorable para alcanzar mayores velocidades debido a la complejidad de metabolizar la presencia de diferentes azúcares de 6 carbonos generados del proceso de hidrólisis.

4.7. Recomendaciones

- Se recomienda realizar un análisis de compuestos inhibitorios tales como ácidos carboxílicos, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (HMF), compuestos fenólicos y sales inorgánicas; ya que pueden interferir en el proceso fermentativo y generar bajos rendimientos.
- Se sugiere realizar estudios con otros residuos azucareros con el propósito de encontrar una fuente de carbono de bajo precio, adecuada para realizar una hidrólisis ácida para la producción de bioetanol, buscando mejores rendimientos y mejor aprovechamiento de materia prima, puesto que, en nuestro país hay disponibilidad de estas materias primas.
- Se recomienda probar otros microorganismos que sean capaces de aprovechar tanto azúcares de seis y cinco carbonos, debido a que estos se obtienen del proceso de hidrólisis.
- Se recomienda aplicar métodos más modernos para poder hidrolizar el material lignocelulósico si es que no se cuenta con materiales para poder realizar un adecuado proceso de desintoxicación.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril, A. & Navarro, E. (2012). *Etanol a partir de biomasa lignocelulósica*. Aleta.
- Aguilar, N. Rivera, D. Rodríguez, A. & Castillo, A. (2010). Azúcar, coproductos y subproductos en la diversificación de la agroindustria de la caña de azúcar. *Virtual Pro*, 1(106), 1-28.
- Andrietta, M. Andrietta, S. Steckelberg, C. & Stupiello, E. (2007). Bioethanol-30 years of proálcool. *International Sugar Journal*, 109(1299), 195-200.
- Barroso, M. (2010). *Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería*. Tesis en la Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal de la Universidad Politécnica de Madrid.
- Bellido, C. Gonzales, G. Coca, M. Lucas, S. & Garcia, M. (2013). Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipites*. *Bioresource technology*, vol. 133, 51-58.
- Bower, R. Wickramasinghe, N. Nagle, J. & Schell, D. (2008). Modeling sucrose hydrolysis in dilute sulfuric acid solutions at pretreatment conditions for lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 99, 7354-62.
- Brethauer, S & Wyman, C. (2010). "Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production." *Bioresource technology*, 101(13), 4862-74.
- Chundawat, S. Beckham, G. Himmel, M. & Dale, B. (2011). Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. 2, 121-145.
- Claassen, P. Van, J. López, A. Sijtsma, L. Stams, A. De Vries, S. & Weusthuis, R. (2011). Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 5(2), 741-755.

- Cortínez, V. (2010). *Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología.
- Cunningham, R. & López, G. (1994). *Etanol de lignocelulósicos*. Universidad de Santiago de Compostela. Servicio de publicaciones e intercambio científico (Campus).
- De Castillo, A. (1980). Subproductos y derivados de la industria azucarera. *Ciencia y Sociedad*, 5(2), 225-241.
- De Martín, A. (2005). *Control del metabolismo de Saccharomyces cerevisiae en la síntesis de glutatión* (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, Granada, España.
- Dissa, A. Desmorieux, H. Bathiebo, J & Koulidiati, J. (2008). Convective drying characteristics of Amelie mango (*Mangifera Indica* L. cv. 'Amelie') with correction for shrinkage. *Journal of Food Engineering*, 88 (4), 429-437.
- Dotaniya, M. Datta, S. Biswas, D. Dotaniya, C. Meena, B. Rajendiran, S. Regar, K. & Lata, M. (2016). Use of sugarcane industrial by-products for improving sugarcane productivity and soil health. *International journal of recycling of organic waste in agriculture*. 5, 185-194.
- Dufey, A. (2006). Producción y comercio de biocombustibles y desarrollo sustentable: los grandes temas. <https://pubs.iied.org/pdfs/15504SIIED.pdf>
- Esparza, M. (2002). *Efecto de la concentración de sacarosa en la producción de goma xantana por Xanthomonas campestris en un biorreactor aireado y agitado* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.

- FAO. (2008). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación*.
<http://www.fao.org/3/i0100s/i0100s.pdf>
- Ferrari, L. (2013). Energías fósiles: diagnóstico, perspectiva e implicaciones económicas. *Revista Mexicana de física*, 59(2), 36-43.
- Ferreira, A. Mussato, S. Cadete, R. Rosa, C & Silva, S. (2011). Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. *Yeast*, 28(7), 547-554.
- Ferrer, J. Páez, G. Arenas, L. Chandler, C. Marmol, Z. & Sandoval, L. (2002). Kinetics of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse pith. *Revista Facultad de agronomía (Luz)*, 19, 23-43.
- Ferreira, M. Schwab, M. Gerard, L. Davies, C. Cayetano, M. & Leal, A. (2014). Nutritional requirements of a *Saccharomyces cerevisiae* starter culture used in the elaboration of wine from orange. *RSVM: Revista de la sociedad venezolana de microbiología*, 34(1), 38-42.
- Folch, J. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista latinoamericana de microbiología*, 46(1-2), 24-46.
- Grupo Consultivo de Expertos (GCE). (s.f). Manual del sector de la energía: Quema de combustibles.
- Hader, I. Castaño, P. Carlos, E. & Mejia, G. (2008). Producción de etanol a partir de almidón de yuca utilizando la estrategia de proceso sacarificación-fermentación simultáneas (SSF). *Revista de la facultad de química farmacéutica*, 15(2).
- Hamelinck, C. Hooijdonk, G. & Faaij, A. (2005). "Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term," *Biomass and Bioenergy*, 28 (1), 384-410.

- Hernández, D. (1999). Efecto de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en consumo, digestibilidad y variables ruminales en borregos alimentados con pasto ovillo (*Dactylis glomerata*) cosechado a dos intervalos de rebrote. Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Posgraduados, Montecillo, México.
- Hidalgo, J. (2011). *Tratado de enología*. Madrid: Mundi-prensa.
- Jonsson, L & Martin, C. (2016). *Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by products and strategies for minimizing their effects*. Rev. Bioresource Technology. 199 (1), 103-112.
- Leeson, S. & Summers, J. (2000). *Nutrición Aviar Comercial*. Santafé de Bogotá, Colombia. 47-51.
- Margeot, B. Hahn-Hagerdal, M. Edlund, M. Slade, R. & Monot, F. (2009). “New improvements for lignocellulosic Ethanol.” *Current opinion in biotechnology*. 20 (1), 372-380.
- Maurya, D. Singla, A. & Negi, S. (2015). An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech*, 5(5), 597-609.
- Mejía, L. Albán, D. Murcia, N. Cuervo, R. & Durán, J. (2009). Hidrólisis y fermentación alcohólica simultánea (HFS) del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica L*) utilizando levaduras *Saccharomyces cerevisiae* spp y cepa recombinante RH 218. *Revista Científica Guillermo de Ockham*, 7(2), 51-64.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Mosier, N. Wyman, C. Dale, B. Elander, R. Lee, Y. Holtzapple, M. & Ladisch, M. (2005) “Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.” *Bioresource technology*, 96 (1), 673-686.

- Nelson, D. & Cox, M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Third Edition. Worth Publishers.
- Neogen. (2019). Technical specification sheet. https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10007/ncm0218_ts_en-us.pdf
- Nimbalkar, R. Khedkar, A. Gaikwad, G. Chavan, V. Bankar, B. (2017). New Insight into Sugarcane Industry Waste Utilization (Press Mud) for Cleaner Biobutanol Production by Using *C. acetobutylicum* NRRL B-527. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183(3), 1008–1025.
- Palmqvist, E. & Hahn-Hagerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. 74, 17-24.
- Pawar, S. Chavan, P. & Bankar, S. (2017). Production of Bio-Ethanol from Biomass (Press Mud). *International Journal of Advance Research, Ideas and Innovations in Technology*, 3(3), 1-5.
- Pérez, J. (2008). *Estudio del pretratamiento con agua caliente en fase líquida de la paja de trigo para su conversión biológica a etanol*. Tesis doctoral de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén.
- Pienkos, P. & Zhang, M. (2009). Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. *Cellulose*. 16, 743-762.
- RENOVETEC (2009). Bioetanol. Recuperado de <http://www.plantasdebiomasa.net/bioetan.html>.
- Riaño, A. (2010). *Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos*. *Revista Tumbaga [en línea]*, 1(5). Consultado: 1 diciembre 2018. Disponible en: <http://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/view/58>.

- Rivera, A. (1980). Subproductos y derivados de la industria azucarera. *Ciencia y sociedad*, 5(2), 225-241.
- Rodríguez, I. (2016). *Pretratamiento de hidrólisis hidrotérmicas para la degradación de los carbohidratos complejos de residuos de frutas para la obtención de bioetanol*. Trabajo fin de Máster de la Facultad de Química en la Universidad de Oviedo.
- Rueda, D. & Herrera, W. (2006). *Diseño Preliminar de un proceso de obtención de etanola partir de material lignocelulósico de frutas, aplicando tecnología de hidrólisis térmica catalizada*. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas.
- Schmidt, E. (1953). Food and feed yeast in Germany. *Unasylya*, 7(4), 152-154.
- Sela, A. (2015). *Hidrólisis de residuos lignocelulósicos procedentes del comercio de frutas y hortalizas como paso previo a la producción de bioetanol*. Trabajo de fin de grado en la Escuela Politécnica de Ingeniería de Gijón de la Universidad de Oviedo.
- Stratta, J. (2000). *Biocombustibles: los aceites vegetales como constituyentes principales del biodiesel*. Disponible en: http://www.bcr.com.ar/Publicaciones/investigaciones/biocombustibles_stratta.pdf. Consultado el 29 de noviembre de 2018.
- Sun, Y. & Cheng, J. (2002). "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review." *Bioresource technology*, 83, 11-11.
- Timung, R. Mohan, M. Chilukoti, B. Sasmal, S. Banerjee, T. & Goud, V. (2015). Optimization of dilute acid and hot water pretreatment of different lignocellulosic biomass: A comparative study. *Biomass Bioenergy*, 81, 9-18.

- Tomás, M. (2009). *Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas de proceso*. Tesis doctoral de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.
- Torres, C. Chamache, P. León, J. Barragán, J. Vásquez, C. Alva, E. Pérez, L. & Polo, F. (2015). Extracción de Azúcares Reductores Totales “ART” de “coronta” de *Zea mays* “maíz amarillo duro”. *UCV-SCIENTIA*, 3(2), 214–218.
- Wang, B. & Feng, H. (2010). *Detoxification of lignocellulosic hydrolysates. Biofuels from Agricultural Wastes and Byproducts*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, Estados Unidos.
- Zepeda, R. (2012). *Propuesta de alternativas para la reducción de pérdidas de sacarosa en un ingenio azucarero* (Tesis de pregrado), Universidad del Salvador, San Salvador, El Salvador.
- Zérega, L. (1993). Manejo y uso de la cachaza en suelos cañameleros. *Caña de Azúcar* 11(2), 71-92.

VI. ANEXO

*Anexo 1. Composición del medio base para *Saccharomyces cerevisiae**

Componentes	Cantidades (g/L)
Sacarosa	4
Urea	1.3 (3.2 mL/L solución madre*)
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.8
Microelementos	1 ml solución stock 1
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.6
KCl	0.4
Na ₂ SO ₄	0.5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1
vitaminas	1 ml solución stock 2
Composición de la solución stock 1	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	15
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	5
MnSO ₄ · H ₂ O	3
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.7
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.2
Na ₂ MoO ₄ · H ₂ O	0.6
H ₃ BO ₃	0.1
KI	0.1
Ácido cítrico	50
Composición de la solución stock 2	
Niacina	12
Pentotenato de calcio	4
Piridoxina	1
Tiamina-HCL	1
Ácido fólico	1
PABA	1
Biotina	0.06
<i>m</i> - Inositol	60

Fuente: Ferreyra *et al.*, 2014

* 400 g/L de Urea

Anexo 2. Contenido de aminoácidos y vitaminas de algunos alimentos y levadura

	Huevo entero	Carne	Leche	Levadura	Guisantes	Trigo
<i>Aminoácidos esenciales</i>						
Arginina	100	+ 13	- 33	- 27	+ 39	- 30
Histidina	100	- 10	+ 20	+ 13	- 43	- 5
Isoleucina	100	- 21	- 22	- 7	- 49	- 55
Leucina	100	- 13	+ 23	- 17	- 30	- 26
Lisina	100	+ 6	+ 4	- 14	- 30	- 65
Metionina	100	- 22	- 20	- 71	- 76	- 76
Fenilalanina	100	- 27	-16	- 36	- 24	- 40
Treonina	100	+ 9	- 6	+ 2	- 20	- 39
Triptófano	100	- 20	+ 7	- 9	- 53	- 9
Valina	100	- 21	- 10	- 9	- 45	- 44
<i>Vitaminas</i>						
B ₁ , tiamina	100	+ 36	- 73	+1540	+ 446	+ 58
B ₂ , riboflavina	100	+ 3	- 39	+1680	- 21	- 25
Niacina	100	462	- 62	+1720	+ 75	+ 588
B ₆ , pirodoxina	100	- 30	- 90	+ 60	- 93	- 72
Ácido pantoténico	100	- 46	- 89	+ 36	- 75	- 64
biotina	100	- 96	- 97	+ 100	- 97	- 100

Fuente: *Schmidt, 1953*

Anexo 3. Diseño del medio de cultivo para una biomasa de 1 g/L.

Elemento	Fuente	% Elemento en la fuente	% Elemento en célula	Yx/s	So (g/L)
Carbono	C ₆ H ₁₂ O ₆	40.0	49	0.1	12.3
Nitrógeno	Ext. Lev.	10.9	7.3	1.5	0.9
Fosforo	KH ₂ PO ₄	30.9	1.7	18.2	0.1
Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	24.3	0.2	121.5	0.01
Azufre	(NH ₄) ₂ SO ₄	32.0	0.1	320.0	0.004
Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	40.0	0.2	200.0	0.01

El medio está diseñado para una concentración de biomasa de 1 g/L, el rendimiento de Yx/s para la fuente de carbono se multiplicó por un factor de 0.1 por ser un proceso anaeróbico.

Anexo 4. Análisis de concentración de bioetanol

	UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA Instituto de Investigación Tecnológica Agroindustrial	
INFORME DE ENSAYO N° 002-2019		
N° DE OFICIO	:	Memorándum N° 147-2018-UNS-VR
N° DE RECIBO DE PAGO	:	-----
CLIENTE	:	VANIA SNATAMARIA CURIBANCO (TESISTA –UNS – ESCUELA BIOTECNOLOGIA) RAY OMAR SEGURA GIRALDO TESISTA –UNS – ESCUELA BIOTECNOLOGIA)
DIRECCIÓN	:	-----
PRODUCTO DECLARADO (NOMBRE TESIS)	:	EFFECTO DE LA CONCENTRACION DEL HIDROLIZADO DE CACHAZA Y EXTRACTO DE LEVADURA EN LA OPTIMATIZACION DE LA PRODUCCION DE ETANOL POR Saccharomyces cerevisiae ATCC 4126 EN CULTIVO POR LOTE
TIPO DE ENVASE	:	VIALES DE VIDRIO
TIPO DE EMPAQUE	:	-----
INFORMACIÓN DE LA ETIQUETA:	:	Sin marca
INFORMACIÓN DEL ENSAYO		
LABORATORIO	:	NYT
FECHA DE RECEPCIÓN	:	21/02/19
FECHA DE ENSAYO	:	Inicio: 22.02.19 Término: 05.03.19
MÉTODO DE ENSAYO	:	NTP 211.035:2008 (revisada el 2014) BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Método de ensayo. Determinación de metanol y de congéneres en bebidas alcohólicas y en alcohol etílico empleado en su elaboración, mediante cromatografía de gases
	:	Instituto de Investigación Agroindustrial – Av. Universitaria S/N – Urb. Bellamar 1 etapa
RESULTADOS:		
		
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN TECNOLÓGICA AGROINDUSTRIAL		
		
<small>QUEDA ABSOLUTAMENTE PROHIBIDA TODA REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL DEL PRESENTE INFORME SIN LA AUTORIZACIÓN PREVIA Y EXPRESA DEL IITA</small>		
<small>REV: 00</small>		<small>Pág. 1/3</small>

Muestra medio nutritivo glucosa		
Código muestra	Muestra detectada	Concentración (g/L)
8	Etanol	5.73702
7		2.11643
15		5.26485
16		5.94104
23		2.65539
24		6.14172
Muestra hidrolizada de cachaza fermentada		
1	Etanol	-----
2		0.60586
3		1.25305
4		1.47742
5		1.46358
6		1.57549
7		1.52603
8		1.46785
9		2.05536
10		0.35842
11		1.39558
12		1.72706
13		1.64029
14		0.67040
15		1.43486
16		1.29235
17		1.75870
18		0.45302
19		0.94286
20		1.45339
21		1.78445
22		1.94896
23		1.85003
24		1.76509
25		1.73363
26		0.53481
27		0.84735
28		0.93450
29		0.92844
30		0.99130
31		0.94942

Nuevo Chimbote, 14 de Marzo del 2019



[Handwritten Signature]

Dr. Daniel Sánchez Vaca
Director (e) del IITA

QUEDA ABSOLUTAMENTE PROHIBIDA TODA REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL DEL PRESENTE INFORME SIN LA AUTORIZACIÓN PREVIA Y EXPRESA DEL IITA

REV: 00

Muestra hidrolizada de cachaza fermentada

Código muestra	Muestra detectada	Concentración (g/L)
32		0.95916
33		0.94173
34		0.78308
35		0.86741
36		0.62902
37		0.98084
38		0.98695
39		0.97634
40		0.90550
41		0.91644
42		0.09971
43		0.57165
44		0.91410
45		0.53059
46	Etanol	0.82143
47		1.33085
48		1.31311
49		1.26069
50		1.19840
51		0.01685
52		1.09592
53		1.11027
54		1.45040
55		1.44749
56		1.35403
57		1.34205
58		1.38360

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
TECNOLÓGICA AGROINDUSTRIAL



Nuevo Chimbote, 14 de Marzo del 2019

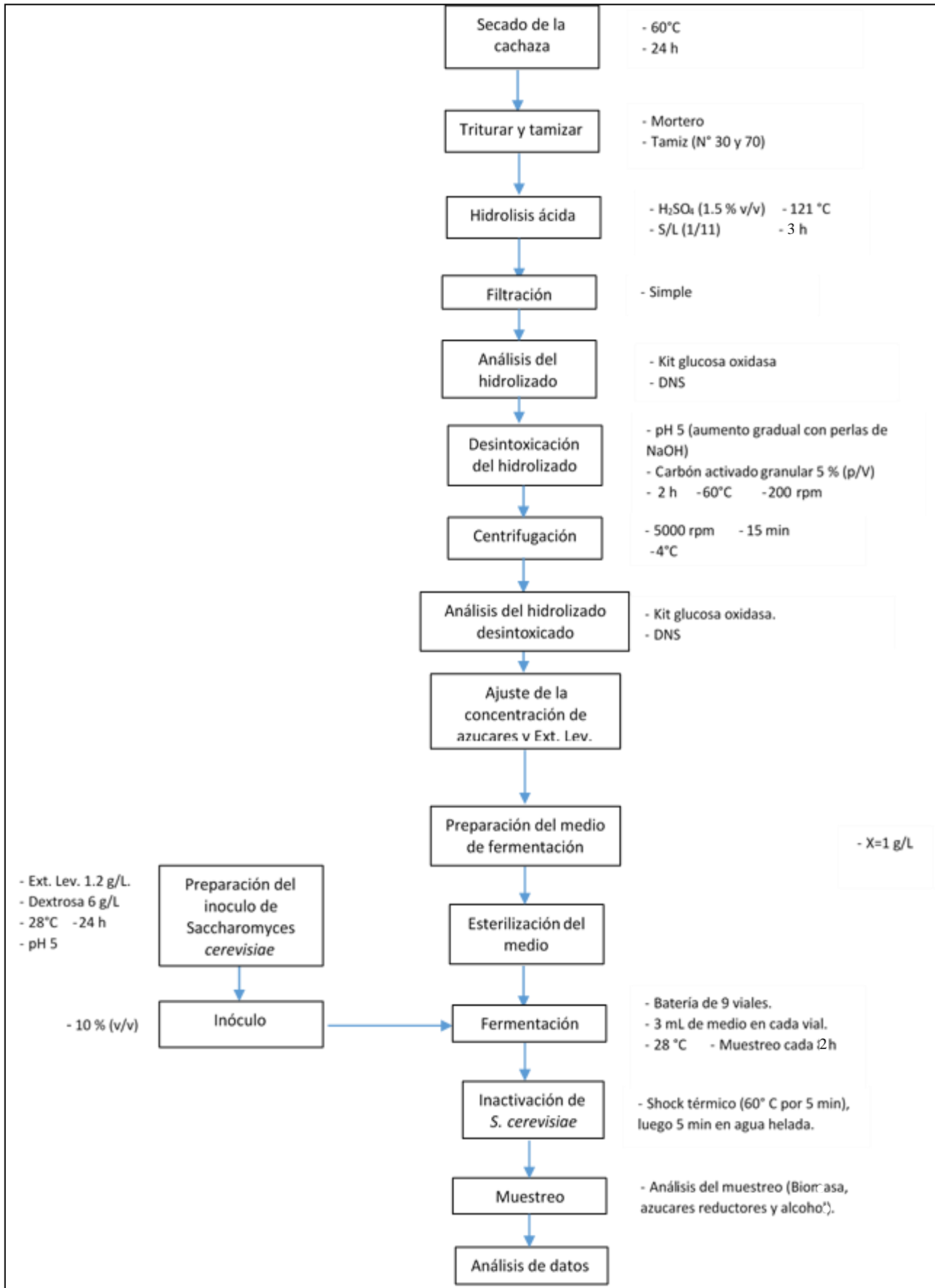
[Signature]
Dr. Daniel Sánchez Vaca
Director (e) del IITA

QUEDA ABSOLUTAMENTE PROHIBIDA TODA REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL DEL PRESENTE INFORME SIN LA AUTORIZACIÓN PREVIA Y EXPRESA DEL IITA

REV: 00

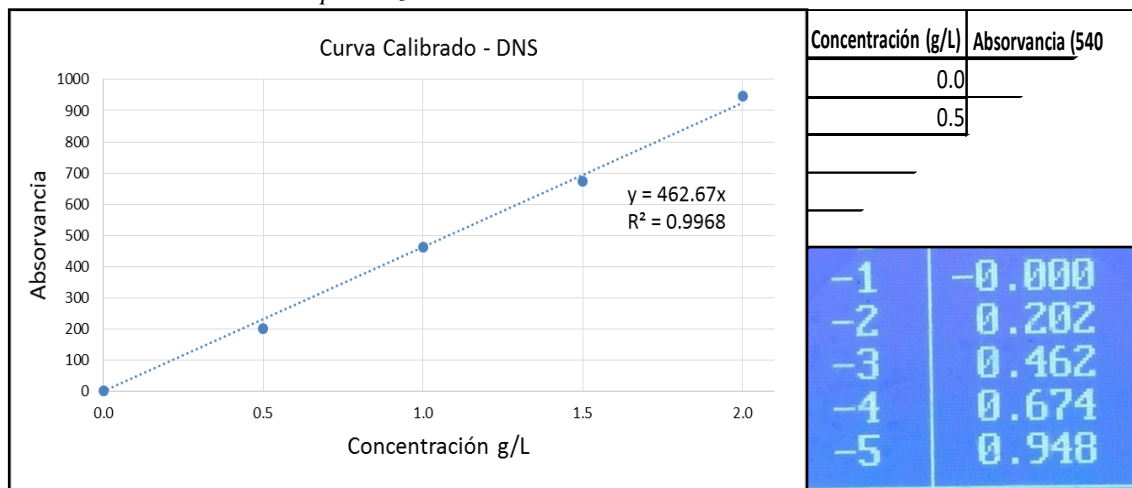
Pág. 3/3

Anexo 5. Diagrama de flujo del proceso para el desarrollo del proyecto de investigación



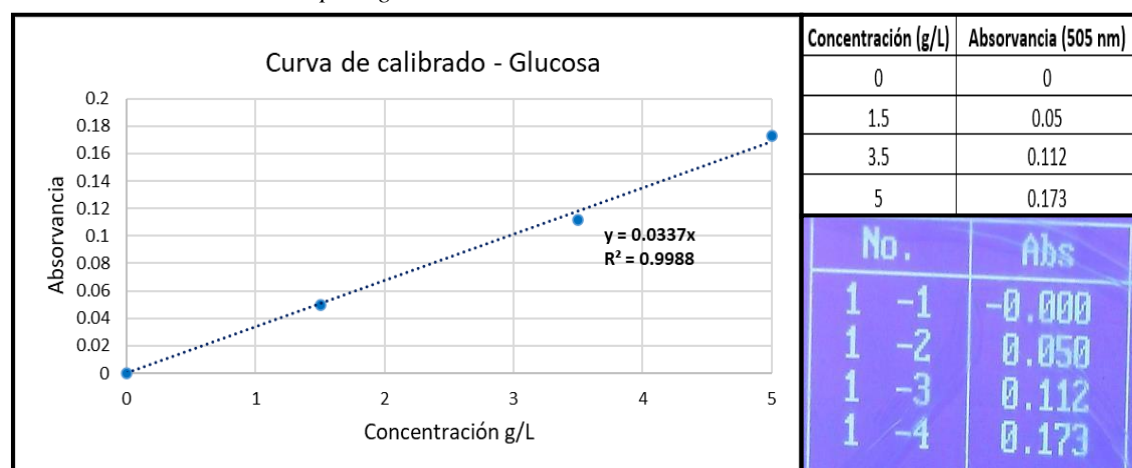
Fuente: elaboración propia.

Anexo 6. Curva de calibrado para Azúcares Reductores Totales



Fuente: elaboración propia.

Anexo 7. Curva de calibrado para glucosa



Fuente: elaboración propia.

Anexo 8. Procedimiento para la determinación de bioetanol en CG

- Las muestras fermentadas obtenidas fueron filtradas empleando un filtro de jeringa con membrana de nylon de 0.45 μm de porosidad, obteniéndose así un mínimo de 0.5 mL
- Seguidamente las muestras filtradas obtenidas fueron adicionadas en viales especiales para CG de 1.5 mL
- Posteriormente fueron analizadas mediante cromatografía de gases.

Anexo 9. Obtención de valores promedios de rendimientos Yp/s con fuente de carbono cachaza

Repetición	Concentración de glucosa inicial (g/L)	Rendimiento (Yp/s) con Cachaza (g/g)
I	12.3	0.484
II	12.3	0.347
III	12.3	0.406
		0.41

$$\text{Promedio} = \frac{0.484 + 0.347 + 0.406}{3}$$

$$\text{Promedio} = 0.41 \text{ g/g}$$

Anexo 10. Comparación de productividad volumétrica con fuente de carbono glucosa e hidrolizado de cachaza.

Repetición	Concentración de glucosa inicial (g/L)	Productividad volumétrica Qp con glucosa (g/L.h)	Productividad volumétrica (Qp) con cachaza (g/L.h)
I	12.3	0.35	0.128
II	12.3	0.37	0.110
III	12.3	0.38	0.195
	Promedio	0.36	0.14

$$Q_p = \frac{0.36}{0.14}$$

$$Q_p = 2.57$$

La productividad volumétrica que se obtuvo fue 2.57 veces menos en comparación a una fermentación con glucosa.