

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA



**Cinética de la extracción de alcohol de la planta macha macha
(*peruvianum jancs*) por el método de fermentación.**

TESIS

PRESENTADA POR:

Apaza Choquehuanca, Lourdes Yasmin

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO QUÍMICO

PROMOCIÓN 2015-I

PUNO, PERÚ

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA

“Cinética de la extracción de alcohol de la planta macha macha (*peruvianum jancs*)
por el método de fermentación”

TESIS PRESENTADA POR:

Apaza Choquehuanca, Lourdes Yasmin

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE: INGENIERO QUÍMICO

FECHA DE SUSTENTACION: 30 DE JUNIO 2016

APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE :



Ing. M.Sc. MOISÉS PÉREZ CAPA

PRIMER MIEMBRO :



Ing. M.Sc. JANEETE ROSARIO RAMOS PINEDA

SEGUNDO MIEMBRO :



Ing. M.Sc. ROGER HUANQUI PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS :



Ph.D. WALTHER B. APARICIO ARAGÓN

AREA: PROCESOS INDUSTRIALES

TEMA: OBTENCIÓN DE PRODUCTOS

LINEA: TECNOLOGÍA INDUSTRIAL

DEDICATORIA

A DIOS, por darme la oportunidad de aun estar aquí con vida y por estar conmigo en cada paso que he dado, que doy, y que daré, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el período de estudio y de vida.

Gracias a mis padres por darme la vida, VICTOR RAUL APAZA QUISPE, GLADYS MARLENY CHOQUEHUANCA OLVEA, a mi madre por ser mi soporte mi impulso por confiar siempre en mí, a mi hermana FLOR DE ALHELI A. CH. Quien siempre fue a mi lado, quien me acompañó en todo campo.

Gracias a mis abuelos, a mis tíos, primos y demás familiares, por confiar en mí y acompañarme hasta este punto de mi camino, y a tí E.S. por todo tu apoyo incondicional, por el aliento brindado y la confianza.

Gracias a esas personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listas para brindarme toda su ayuda, ahora me toca regresar un poquito de todo lo inmenso que me han otorgado, con todo mi cariño esta tesis se las dedico a cada integrante de mi familia por el apoyo brindado.

Lourdes Yasmín Apaza Choquehuanca

AGRADECIMIENTOS

- *Primeramente gracias a ti Señor por ser nuestro guía y permitirnos llegar hasta este momento tan importante de nuestras vidas y por acompañarnos día a día para poder lograr nuestros objetivos.*
- *Al Ing. PhD. Walter B. Aparicio Aragón, por su invaluable colaboración, generosidad y confianza que me brindó para la culminación de mi trabajo de tesis, también agradecerle por acceder a ser mi director.*
- *Al Ing Alfredo Quispe Lujano, Ing. German Quille Calisaya, Ing. George Aruhuanca Cartagena, por su apoyo con sus invaluable apoyo en la redacción, realización de pruebas, demostración.*
- *A todos los Señores Catedráticos de la Facultad de Ingeniería Química, por haberme impartido sus enseñanzas y experiencias durante el largo camino del aprendizaje y constante formación profesional.*
- *A la Universidad Nacional del Altiplano, por habernos ofrecido y otorgado una profesión.*
- *A mi familia por tenerme paciencia y comprenderme en todo momento para la culminación de este trabajo de tesis.*
- *Hacemos testimonio de nuestra más sincera gratitud, a todas las personas que han colaborado en la realización de este trabajo y por causas ajenas a nuestra voluntad no fueron mencionado.*

Lourdes Yasmín Apaza Choquehuanca

| INDICE | Pág. |
|---|-------------|
| DEDICATORIA | 3 |
| AGRADECIMIENTOS | 4 |
| ÍNDICE DE TABLA | 7 |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | 8 |
| RESUMEN..... | 10 |
| INTRODUCCIÓN | 11 |
| CAPITULO I..... | 12 |
| 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 12 |
| 1.1.1. PLANTEAMIENTO | 12 |
| 1.1.2. PROBLEMAS ESPECÍFICOS | 13 |
| 1.2. ANTECEDENTES | 14 |
| 1.2.1. A nivel internacional | 14 |
| 1.2.2. A nivel nacional | 18 |
| 1.2.3. A nivel local | 20 |
| 1.3. OBJETIVOS | 21 |
| 1.3.1. OBJETIVO GENERAL | 21 |
| 1.3.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS | 21 |
| 1.4. JUSTIFICACIÓN | 22 |
| 1.4.1. JUSTIFICACIÓN AMBIENTAL | 22 |
| 1.4.2. JUSTIFICACIÓN TECNOLÓGICA | 22 |
| 1.4.3. JUSTIFICACIÓN ECONÓMICA | 22 |
| 1.4.4. JUSTIFICACIÓN SOCIAL | 23 |
| CAPITULO II | 24 |
| 2. MARCO TEÓRICO Y MARCO CONCEPTUAL..... | 24 |
| 2.1. MARCO TEÓRICO..... | 24 |
| 2.1.1. MACHA MACHA (peruvianum jancs)..... | 24 |
| 2.1.2. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA..... | 25 |
| 2.1.3. CINÉTICA DE FERMENTACIÓN..... | 33 |
| 2.1.4. MODELOS CINÉTICOS..... | 33 |
| 2.1.5. LEVADURA..... | 36 |
| 2.1.6. FERMENTACIONES..... | 41 |
| 2.1.7. TIPOS DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA | 47 |
| 2.1.8. FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN | 49 |
| 2.1.9. MATERIAS PRIMAS Y SU IMPORTANCIA PARA EL PROCESO | |

| | |
|---|-----|
| FERMENTATIVO..... | 51 |
| 2.1.10. POTENCIAL DE IONES HIDRÓGENO (pH) | 52 |
| 2.1.11. GRADOS BRIX..... | 52 |
| 2.1.12. GRADO ALCOHÓLICO..... | 53 |
| 2.1.13. DESTILACIÓN | 53 |
| 2.1.14. ALCOHOLES | 56 |
| 2.2. MARCO CONCEPTUAL | 60 |
| 2.4. HIPÓTESIS | 63 |
| 2.4.1. HIPÓTESIS GENERAL | 63 |
| 2.4.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS | 63 |
| CAPITULO III..... | 64 |
| MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES | 64 |
| 3.1. METODOLOGÍA | 64 |
| 3.1.1. ÁMBITO DE ESTUDIO..... | 64 |
| 3.1.2. LUGAR DE EJECUCIÓN | 64 |
| 3.1.3. MATERIALES Y EQUIPOS..... | 65 |
| 3.1.4. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL | 66 |
| 3.1.5. PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE PRODUCTOS | 66 |
| 3.1.6. PARÁMETROS EVALUADOS..... | 74 |
| 3.1.7. CINÉTICA DE EXTRACCIÓN | 74 |
| 3.1.8. MODELO MATEMÁTICO PARA LA INVESTIGACIÓN | 77 |
| CAPITULO IV..... | 83 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 83 |
| 4.1. BALANCE DE MATERIA EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHOLICA DE MACHA MACHA | 83 |
| 4.2. EVALUACIÓN DEL PROCESO FERMENTATIVO RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA EXPERIMENTACIÓN | 85 |
| 4.3. RESULTADOS DE LA CINÉTICA DE EXTRACCIÓN | 97 |
| 4.4. ANÁLISIS DE DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 101 |
| CONCLUSIONES | 106 |
| RECOMENDACIONES | 107 |
| BIBLIOGRAFÍA | 108 |
| ANEXOS | 109 |

ÍNDICE DE TABLA

| | |
|--|-----|
| Tabla 1: Descripción de la Macha Macha | 24 |
| Tabla 2: Propiedades de la materia prima..... | 25 |
| Tabla 3: Constituyentes normales referidas a la materia seca de levadura..... | 39 |
| Tabla 4: Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 41 |
| Tabla 5: medidas y tiempos utilizados en el experimento de la tabla..... | 78 |
| Tabla 6: Análisis del Diseño Factorial 2 ² | 80 |
| Tabla 7: Datos experimentales sobre consumo de sustrato PRUEBA N° 01 | 85 |
| Tabla 8: Resultados de corrida experimental del seguimiento de tiempo y CO ₂ | 87 |
| Tabla 9: Datos experimentales sobre consumo de sustrato PRUEBA N° 02 | 88 |
| Tabla 10: Resultados de corrida experimental del seguimiento de tiempo y CO ₂ | 90 |
| Tabla 11: Datos experimentales sobre consumo de sustrato PRUEBA N° 03 | 91 |
| Tabla 12: Resultados de corrida experimental del seguimiento de tiempo y CO ₂ | 93 |
| Tabla 13: Datos experimentales sobre consumo de sustrato PRUEBA N° 04 | 94 |
| Tabla 14: Resultados de corrida experimental del seguimiento de tiempo y CO ₂ | 96 |
| Tabla 15: Resultados experimentales del análisis para la primera prueba (30°C)..... | 97 |
| Tabla 16: RESUMEN DE RESULTADOS..... | 100 |
| Tabla 17: Tabla de diseño experimental | 101 |
| Tabla 18: Efectos estimados para grado alcohólico (°GL) | 102 |
| Tabla 19: Análisis de Varianza para grado alcohólico - cinética de la extracción | 102 |
| Tabla 20: Coef. de regresión para grado alcohólico - cinética de la extracción..... | 103 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1: Ruta bioquímica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) de glucosa hasta obtención de etanol (Alcohol etílico)..... | 30 |
| figura 2: Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (En una imagen de microscopio)..... | 40 |
| Figura 3: Reacción bioquímica de la fermentación | 44 |
| Figura 4: Recolector de datos Multilog Pro..... | 59 |
| Figura 5: Sensor de CO ₂ | 59 |
| Figura 6: Sensor de Ph..... | 60 |
| Figura 7: fermentación, controlando parámetros..... | 69 |
| Figura 8: Equipo utilizado para la destilación simple..... | 70 |
| Figura 9: Diagrama de flujo general para la obtención del alcohol (vino)..... | 72 |
| Figura 10: Diagrama de flujo para la obtención del alcohol de planta macha macha (<i>peruvianum jancs</i>)..... | 73 |
| Figura 11: Tiempo vs °Brix | 86 |
| Figura 12: Tiempo vs CO ₂ | 88 |
| Figura 13: °Brix vs Tiempo | 89 |
| Figura 14: Tiempo vs pH..... | 89 |
| Figura 15: Tiempo vs CO ₂ | 90 |
| Figura 16: °Brix vs Tiempo | 91 |
| Figura 17: Tiempo vs CO ₂ | 92 |
| Figura 18: Tiempo vs CO ₂ | 93 |
| Figura 19: °Brix vs Tiempo | 94 |
| Figura 20: Tiempo vs pH..... | 95 |
| Figura 21: Tiempo vs CO ₂ | 96 |
| Figura 22: velocidad de crecimiento de biomasa vs concentración de sustrato | 98 |
| Figura 23: Diagrama de Pareto | 103 |
| Figura 24: Variables Independientes | 104 |
| Figura 25: Superficie de respuesta estimada..... | 105 |

ABREVIATURAS

°C: Grados Celsius.

ATP: Adenosín Trifosfato.

EMP: son las siglas de EmbdenMeyerhoffParnas de la ruta metabólica de la fermentación alcohólica.

G/L: Gramo/Litro.

IR: Infrarrojo.

Kg: Kilogramo.

ml: Mililitros.

MNPC: Muy numerosas para contar.

°Bx: Grados Brix.

P/V: Peso/Volumen.

pH: Potencial de iones hidrógeno.

psi: Es una unidad de presión en el sistema anglosajón de unidades(Libras por pulgada cuadrada).

St: Estándar.

T: Temperatura. (°C).

UFC: Unidades formadoras de colonias.

V/V: Volumen /Vol

S: Sustrato.

°GL: Grados alcolicos gay lussac

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se da a conocer el estudio del comportamiento de la cinética de fermentación de la macha macha (*peruvianum jancs*), utilizando como sustrato en tres diluciones (agua – sustrato) con la levadura (*sacharomyces cerevisiae*) mediante una fermentación alcohólica.

El modelo cinético de Michelis y Menten propuesto ajusta apropiadamente a los datos experimentales, proporcionando las constantes cinéticas de reacción para cada proceso de fermentación ver tabla 16 las constantes obtenidas. Para esta primera prueba se realiza con 200 g de macha macha a 16 °Brix, 30°C y se observó que durante la fermentación la velocidad de crecimiento va en aumento conforme disminuye la concentración del sustrato, los datos son ajustados al modelo de Michaelis y Menten obteniéndose una correlación de 97.98%; donde la velocidad máxima de crecimiento fue de 0.0162 h⁻¹ y la constante de reacción $k= 39.5863$ g/L; esto indica que para una mayor concentración inicial de sustrato, que durante el proceso de evaluación de la velocidad máxima de crecimiento hay formación de etanol.

El rendimiento para la primera prueba fue de 97.98 %, segunda prueba fue de 95.81 %, tercera prueba fue de 91.82 % y cuarta prueba fue de 97.41% lo que demuestra un rendimiento aceptable para el proceso de fermentación de Macha macha (*peruvianum jancs*), lo cual indica que la primera prueba es la más significativa.

Los parámetros de °Brix, temperatura y pH que tuvieron mayor influencia para obtener el mejor porcentaje de etanol a partir de la Macha Macha (*peruvianum jancs*).

PALABRAS CLAVES: Macha Macha, Cinética De Fermentación, Destilación, Alcohol.

INTRODUCCIÓN

Los usos del etanol en la industria son amplios, por lo que se investigan nuevas alternativas de obtención de alcohol etílico, que de pasó nos da lugar al aprovechamiento de los recursos disponibles de nuestra región.

Mediante la variación de las concentraciones del sustrato en el producto es posible deducir el mecanismo cinético de las concentraciones intracelulares de estos compuestos al igual que la dirección fisiológica de la reacción. Por medio del análisis cinético es posible obtener modelos matemáticos que expliquen la reacción catalizada enzimáticamente, además de la determinación de las ecuaciones de velocidad del modelo idóneo que pueda ser probado experimentalmente.

Actualmente, el control de procesos fermentativos basada en biocatalizadores de complejidad creciente y el avance en instrumento, facilitan la incorporación de metodologías de control a un mayor número de procesos. El bioreactor discontinuo como parte principal de nuestro proceso bioquímico en el que se empleó sistemas celulares de una variedad de productos biológicos útiles (*sacharomyces cerevisiae*), permite aumentar notablemente la mayor capacidad transformadora.

En la fermentación alcohólica, además de los microorganismos (levaduras), las enzimas juegan un papel importante ya que sin estas no sería posible tan compleja operación, es un proceso anaeróbico y aeróbico, realizado por las levaduras y algunas clases de bacterias, estos microorganismos transforman el azúcar en alcohol etílico y dióxido de carbono, este proceso comienza después de que la glucosa entra en la célula de levadura, degradando al ácido pirúvico, proceso llamado glucólisis, este ácido formado luego es transformado a etanol y dióxido de carbono.

CAPITULO I

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1.1. PLANTEAMIENTO

Los productos de procedencia y contenido de alcohol que se ofrecen en el mercado, aún tienen diferencias en cuanto a la calidad nutricional y aceptación por parte del consumidor. Por tal motivo se plantea mejorar la calidad del alcohol, utilizando productos propios de la región, para así poner valor a nuestras plantas nativas, que tienen alto valor nutricional.

La macha macha (*peruvianum jancs*), tiene un alto contenido de azúcar, que son importantes para nosotros, se sabe que la macha macha (*peruvianum jancs*) en general son muy saludables para nuestro organismo por su contenido de vitaminas y otros elementos que necesitamos.

Por otro lado se tiene la reducción de población de la planta Macha Macha (*peruvianum jancs*), por parte de las familias que viven en el anillo circundante de la provincia de Moho, debido al limitado conocimiento de su estado poblacional, distribución ecológica y los parámetros de hábitat donde vive esta planta. Por tal motivo es necesario fortalecer estrategias para el aprovechamiento sostenible de la planta macha macha (*peruvianum jancs*) en la Provincia de Moho, departamento de Puno, promoción para la

conservación y aprovechamiento racional del recurso natural, como actualmente CEDEOS (centro para el desarrollo sostenible) lo está tratando de hacer. Teniendo en cuenta este apoyo las comunidades de mocho, como también en otras provincias de la región de Puno, en las alturas en las zonas roquedales, es necesario aprovechar, prestar más atención a esta planta que nos puede traer grandes impactos como: económicos sociales, académicos, medio ambientales, ciencia y tecnología.

A pesar de la evidente importancia que tiene la macha macha, existe un gran vacío de información debido a la poca y discontinuada investigación realizada sobre esta especie, es decir se tiene poca información sobre esta planta.

En este presente trabajo se extraerá el alcohol de la planta macha macha (*peruvianum jancs*) por el método de fermentación, bajo parámetros adecuados y evaluar ciertas propiedades funcionales de tal forma que se evalúa la solubilidad, y el tipo de alcohol y el grado de alcohol que nos permitirá tener. En tal sentido, no hay estudios relacionados con la cinética de la obtención de alcohol de la planta macha macha (*peruvianum jancs*), motivo por el cual se plantea el siguiente problema.

1.1.1.1. Definición de problema

¿En qué medida se podrá determinar la cinética de extracción de alcohol de la planta Macha Macha (*peruvianum jancs*), por el método de fermentación y cuál es el grado de alcohol extraído?

1.1.2. PROBLEMAS ESPECÍFICOS

- ¿Cuáles serán los parámetros de extracción del alcohol a partir de la planta Macha Macha (*peruvianum jancs*)?

- ¿En qué medida se determinara la cinética de la extracción de alcohol de la planta Macha Macha (*peruvianum jancs*)?
- ¿A partir de la cinética se puede generar el modelo matemático?

1.2. ANTECEDENTES

En nuestro departamento de Puno no se encontró ningún trabajo sobre la extracción de alcohol de la Macha Macha (*peruvianum jancs*).

A continuación se presenta en forma resumida algunas revisiones bibliográficas encontradas para la realización del presente trabajo:

1.2.1. A nivel internacional

- **FARAH AHMAD (2011)** En un artículo de investigación denominado “estudio de la cinética de crecimiento y el modelado de etanol producción por *saccharomyces cerevisiae*” la producción de etanol a partir de sustrato de glucosa se llevó a cabo. Por lotes de cepa de *saccharomyces cerevisiae* en 10L de bioreactor de tanque agitado durante 72 horas a este estudio investigado la cinética de crecimiento de *cerevisiae* a la fermentación por lotes, los parámetros cinéticos de este experimento son $\mu_{\max} 0.084 \text{ h}^{-1}$ $K_s 23.6\text{g/L}$
- **OVIEDO ET. AL. (2009)** En este artículo de investigación “levaduras autóctonas con capacidad fermentativa en la producción de etanol a partir de pulpa de excedentes de plátano Musa (AAB Simmonds) en el departamento de Córdoba, Colombia” Reporta que se evaluó la capacidad fermentativa de levaduras nativas de la zona costanera del departamento de Córdoba, Colombia, para la obtención de etanol a partir de la pulpa de excedentes de plátano Musa (AAB Simmonds), con el objetivo de encontrar cepas eficientes. Los

microorganismos utilizados correspondieron a las especies: *Kloeckera* sp, *Cándida guilliermondii*, *Cándida albicans* *Cándida guilliermondii* (nativas), y una cepa comercial de referencia, *saccharomyces cerevisiae*. La fermentación se realizó a diferentes concentraciones de sustrato, siendo la concentración del 40% la mejor; se evaluó la producción de etanol mediante el método colorímetro del dicromato de potasio utilizando un equipo espectrofotómetro. Se observó que la levadura *Cándida guilliermondii* nativa fue la más eficiente con una producción promedio promedio de 3.45% v/v de etanol a las 72 horas de fermentación; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con la producción de etanol a partir de la cepa de referencia, la cual produjo 3.59% v/v. estos resultados sugieren la existencia de levaduras nativas con capacidad para ser utilizadas en la obtención de etanol a partir de material residuo de plátano.

- **MORALES ESTHER, ET. AL. (2007).** En su trabajo sobre la “OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE NARANJA (*citrus* spp) APLICANDO OZONO” Evaluó el rendimiento en la producción de bioetanol, a partir de jugo y de cascara de naranja y jugo de piña, empleando ozono como una alternativa de pretratamiento para los materiales con compuestos lignocelulosicos.

Se prepararon 5 sistemas que se mencionan a continuación: 1) jugo de naranja (JN), 2) JN- jugo de piña (JP) (1:1 v/v), 3) JN – cáscara de naranja (CN) (1:1 m/v), 4) JN- ozonizado y 5) JN-CN-ozonizado. Todos los sistemas tuvieron un volumen de 250 ml adicionando 50 mg de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en matraces Erlen Meyer con capacidad de 1 L, durante 168 h, a una temperatura de 25°C y a un pH de 3.5 + 2. Se realizó una toma de la muestra de 10 ml en 72 y 96 h, que fue destilado con un equipo a microescala Corning, al cual se le determino índice de refracción (IR) con un refractómetro. Los sistemas

mostraron mejores resultados a las 168 h los resultados fueron: JN 44.8%, JN/ CN 46.8% y JN/ CN ozonizado 48.8%, el volumen restante fue destilado. También se identificaron otros alcoholes por cromatografía de gases (Perkin Elmer instruments) aplicando una de temperatura de inyector y del detector a 200°C y la velocidad de flujo del gas acarreador de 10psi. Para la producción del ozono se utilizó un ozonador eléctrico Pacific Ozone Technology Mod. Lab 21 utilizando aire como materia prima para la producción del gas; el equipo se operó bajo las siguientes condiciones: 80% de producción de ozono, presión de 9 psi y flujo de aire de 13 SCFH. La dosis aplicada fue de 48 8 mg L⁻¹, durante 5 minutos. **Conclusiones.** La aplicación de ozono es un tratamiento eficaz para aprovechar a los materiales con compuestos lignocelulósicos y por ende para mejorar el rendimiento en la producción de bioetanol.

- **MONSALVE F. ET.AL. (2006).** En una investigación denominada “Producción de etanol a partir de la cascara de banano y de almidón de yuca” se ajustaron los medios de fermentación para los microorganismos *Saccharomyces cerevisiae* y *zymomonas mobilis*. se caracterizó la cascara de banano, la cual posee un contenido de almidón, celulosa y hemicelulosa que representan más del 80% de la cascara ameritando el estudio de esta como fuente de carbono. Para la fermentación realizada con *Saccharomyces cerevisiae* se logra una concentración de etanol de 0.31% y no se aprecia una producción considerable de etanol (menor de 0.1 g/l) para ninguno de los medios fermentados con y *zymomonas mobilis*.
- **RAMIREZ Y MOLINA (2005).** En la “Evaluación de parámetros cinéticos para la *Saccharomyces cerevisiae* utilizando agua de coco como sustrato”, para un sistema “bach” de 2L, se encontró que al aumentar la concentración de

levaduras, a una temperatura de 28 °C, se obtuvieron algunos parámetros cinéticos, la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}) fue de 0.038 h⁻¹, la constante de saturación (Ks) fue de 1.35g/L, a una temperatura de 28°C y pH 4.5.

- **DONATO, NATALIA, BELTRÁN, ROMINA. Análisis teórico de los diferentes procesos para la obtención de etanol a partir de maíz. Facultad regional villa maría. Universidad tecnológica nacional,-** El etanol es el alcohol producido a partir de la fermentación de los azúcares que se encuentran en los productos vegetales combinados en forma de sacarosa, almidón, hemicelulosa y celulosa. Dependiendo de su fuente de obtención, su producción implica fundamentalmente molienda, fermentación y destilación de las mismas. Se puede obtener a partir de 3 principales tipos de materias primas, como: Materia rica en sacarosa (la melaza de caña de azúcar y sorgo dulce), materia rica en almidón (cereales y tubérculos), materia rica en celulosa (madera y residuos agrícolas). En la actualidad se conocen tres procesos: Molienda en húmedo; donde se remueve la máxima cantidad de almidón del grano siendo este posteriormente fermentado. Molienda en seco; el grano limpio se muele para reducir el tamaño de las partículas y se fermenta. Molienda en seco modificada; se introduce mejoras al proceso para el aprovechamiento del germen y las fibras, que son separadas y el resto del grano se envía a la fermentación. Dando mayor valor agregado a los co-productos que la molienda en seco tradicional. En este trabajo se analizarán comparativamente los principales procesos para la obtención de etanol utilizando como materia prima maíz. Examinándose los beneficios y limitaciones de cada proceso considerando requerimiento de capital, capacidad de producción, rendimientos de etanol y co-

productos, entre otros factores importantes. Este estudio es un avance parcial del trabajo en curso que realizan las autoras como proyecto final de la carrera de Ingeniería Química.

- **UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MAULE (CHILE)**, finales del año 2005 se desarrolló una investigación concerniente a la extracción de pectina para la producción de jaleas a partir de uvas (*Vitis labrusca* cv. Concord), se evaluó el efecto de dos niveles de madurez de la uva (16,6 y 22° °Brix, tres niveles de pH (2, 2,5 y 3) y dos tiempos de cocción a 90°C (45 y 60 min) sobre la extracción de pectinas y su grado de metoxilación (GM). Se recomienda cosechar con 16,6 °Brix y calentar el zumo a pH 2,5 durante 60 minutos para obtener la mejor extracción de pectinas de alto grado de metoxilo, con un rendimiento del 3,84% (base peso fresco) y un grado de metoxilo 70,48 GM, comparable con pectinas HM de alta calidad.

1.2.2. A nivel nacional

- **MARLO GARCIA ET. AL. (2012)**. En el “Estudio cinético de la fermentación alcohólica del jugo de caña de azúcar (*Saccharomyces officinarum*) proveniente de la cooperativa Laredo, sitio de Trujillo para la obtención de etanol” se usó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación alcohólica en lo cual determino las constantes cinéticas del respectivo proceso, aplicando el modelo matemático Taylor.

Las unidades experimentales utilizadas fueron a través del empleo del bioreactor operando a temperatura de 30°C y pH de 5.5 de los datos analizados se obtuvieron los valores cinéticos la constante de velocidad de consumo de

sustrato ($k, \text{día}^{-1}$) se encuentra ente 0.0922 y 0.1457 día^{-1} , a un nivel del 95% o 5% de nivel significancia LC [0.0922, $k, \text{día}^{-1}$, 0.11457], 5%.

También se determinó la ecuación que interpreta el experimento, a través d un análisis de probabilidades, mostrando como varia la concentración en función del tiempo $C=12.00 * e^{10899(t)}$.

- **ROQUE Y CABANILLAS (2008).** En un artículo denominado “producción de alcohol de los residuos lignocelulosicos – cascaras de arroz (oriza sativa)” investigación un método rentable a nivel industrial de obtención de etanol a partir de cascaras de arroz. A través de procesos químicos – biológicos obtuvieron etanol de residuos celulósicos como la cascara de arroz rica en celulosa en un 70%. El diseño de las experiencias se realizó teniendo como variables, presión y temperatura, y como constantes, la concentración de ácido y el tiempo.
Como resultado se obtuvo una concentración de alcohol del 7% a las 48 horas de fermentación, un rendimiento de 25 litros de alcohol (etanol) de 96°G.L a partir de 100.00 g. de cascaras de arroz.
- **BAUTISTA C. MARIO (2005).** Realizo un trabajo de investigación para la “obtención de alcohol a partir de polvillo de arroz”. Describe el proceso tecnológico seguido para obtener alcohol a partir del polvillo de arroz. El proceso fermentativo se produjo empleando levadura de panificación a un pH de mosto 4.5, temperatura 30°C el porcentaje de etanol fue de 37.51% obteniéndose en un tiempo óptimo de fermentación de 27 horas.

1.2.3. A nivel local

- **COILO VALERO HERCILLA Y COPA ROQUE MABY ALLISON (2010).** En la investigación “cinética de fermentación de plátano (musa cavendishi), en el equipo multilog - pro implementado con sensores de CO₂, presión, temperatura y pH” estudiaron el comportamiento de la cinética de fermentación del plátano, utilizando sustrato en tres diluciones (agua – sustrato) con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes valores de pH, y concentraciones de azúcar (°brix), los mayores rendimientos se obtuvieron con la mezcla de 21g de plátano diluido con 10 ml de agua (sustrato/agua 2:1), manteniendo la temperatura entre 30 a 35 °C, un pH de 4.15 y 15 °brix.

A partir del tratamiento cinético se encontró la velocidad de reacción ajustándose adecuadamente con la cinética de Michaelis y Menten y se determinó los parámetros cinéticos de Michaelis y Menten $K_m=2E+12$; $V_{max}=3E+08$ mol/s. L, para de esta forma tener el modelo cinético de Michaelis y Menten:
$$-r_A = \frac{3 \cdot 10^8 [S]}{2 \cdot 10^{12} + [S]}$$

- **CRUZ y C. M. (2012),** Alcohol obtenido de diferentes variedades de plátano. El presente trabajo trata de la obtención de etanol a partir de plátanos maduros (guineos) con 16 a 20 % de azúcar. Para la obtención del zumo, los frutos pelados y cortados se sulfitan y transforman en pasta, la cual es tratada con óxido de calcio. El zumo obtenido se ajusta a pH 4,5 y 16,5 °Brix. Este mosto listo para la fermentación alcohólica se somete a pasteurización a 85 °C por 5 minutos. Luego se deposita en caliente en el reactor y una vez alcanzada la temperatura de 24 °C se le agrega el inóculo preparado con la cepa de

Sacharomyces ellipsoideus, poniéndose enseguida en marcha la fermentación a 27 – 30 °C.

- **CUTIMBO QUISPE (2004)**. Realizo un trabajo de investigación sobre la “Optimización de fermentación alcohólica de frutas en estado extremal de maduración”, para lo cual uso frutas próximas a iniciar su descomposición, sometiéndolo a fermentación usando levadura *Saccharomyces cerevisiae* como biocatalizador. Del estudio cinético realizado con cuatro mezclas de frutas (papaya, piña, plátano y manzana) a diferentes proporciones en peso a partir de 1 kg de mezcla en el rango de 25 - 35°C, determino los parámetros del modelo de Monod, $\mu_m=0.2179$ y $K_s=22.3554$; con el cual se ajusta apropiadamente la cinética de este proceso microbiano.

Obtuvo la mejor mezcla (200g de papaya, 200g de piña, 400g de plátano y 200g de manzana) que tuvo el mayor rendimiento de 70% en la fermentación alcohólica a una temperatura de 35°C.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la cinética de obtención de alcohol de la planta Macha Macha (*peruvianum jancs*), por el método de fermentación y cuál es el grado de alcohol extraído.

1.3.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Determinar los parámetros de extracción del alcohol a partir de la planta Macha Macha (*peruvianum jancs*)

- Determinar la cinética de extracción de alcohol de Macha Macha (*peruvianum jancs*)
- Determinar un modelo matemático de fermentación a partir de la cinética.

1.4. JUSTIFICACIÓN

1.4.1. JUSTIFICACIÓN AMBIENTAL

La existencia de una amplia variedad de productos naturales en el Perú que son nutritivos para el ser humano, es la Macha Macha (*peruvianum jancs*) quien tiene una excelente alternativa como materia prima para la producción de subproductos, ya que se puede extraer directamente de sus órganos subterráneos sin necesidad de cualquier proceso de transformación.

Es una planta de crecimiento rápido y esta crece en una zona roquedal en las partes más altas de los cerros, se adapta fácilmente en temporada de lluvia, sobreviviendo aun en los suelos infértiles, en climas fríos y lluviosos. Por lo cual este trabajo es beneficioso para la región de Puno siendo una buena alternativa de sustitución a el alcohol comercial, obtenido de la planta Macha Macha (*peruvianum jancs*).

1.4.2. JUSTIFICACIÓN TECNOLÓGICA

La metodología usada en este proyecto es de carácter experimental que tiene como principio el de realizar una análisis cualitativo, cuantitativo y programado.

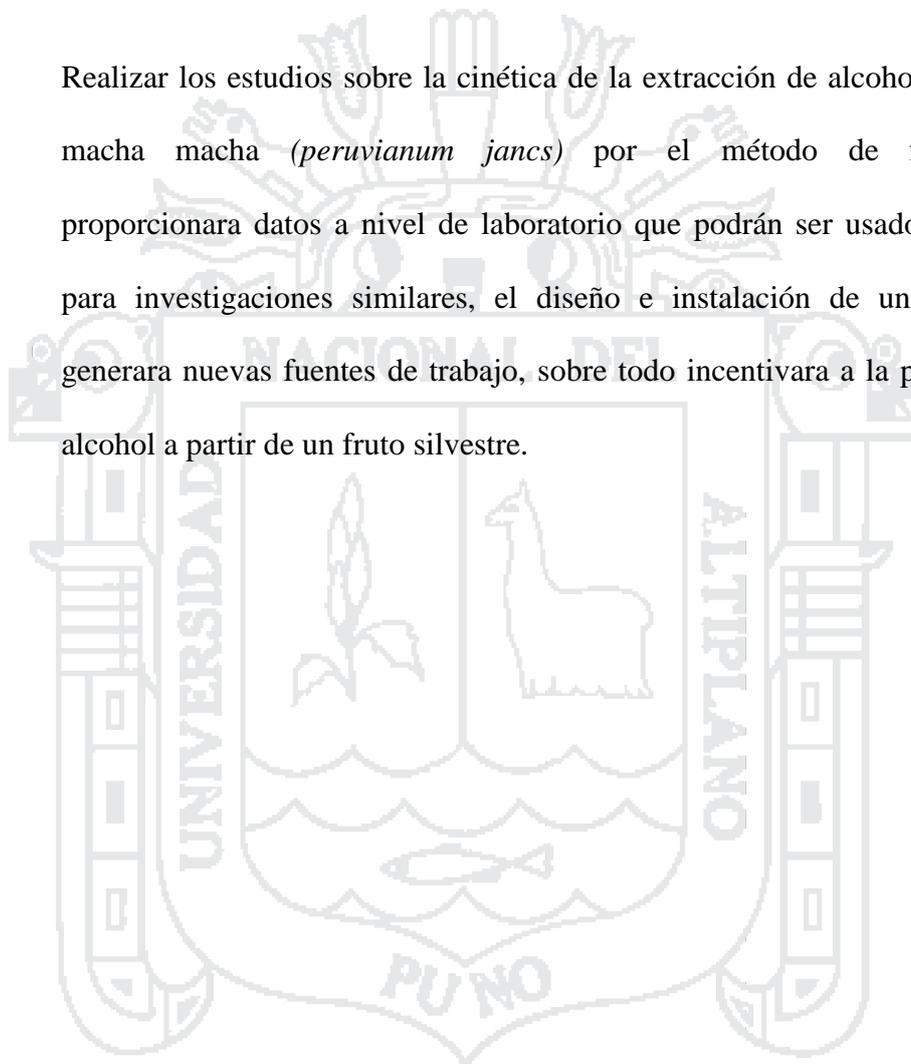
1.4.3. JUSTIFICACIÓN ECONÓMICA

Los recursos económicos no serán grandes, En este momento se cuenta con la producción de macha macha (*pruvians jancs*) en nuestro país en el

departamento de Puno, pero el procesado de este producto por el método de fermentación y destilación simple de esta dará un alcohol a un cierto porcentaje.

1.4.4. JUSTIFICACIÓN SOCIAL

Realizar los estudios sobre la cinética de la extracción de alcohol de la planta macha macha (*peruvianum jancs*) por el método de fermentación, proporcionara datos a nivel de laboratorio que podrán ser usados como base para investigaciones similares, el diseño e instalación de una planta que generara nuevas fuentes de trabajo, sobre todo incentivara a la producción de alcohol a partir de un fruto silvestre.



CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO Y MARCO CONCEPTUAL

2.1.MARCO TEÓRICO

2.1.1. MACHA MACHA (*peruvianum jancs*)

La macha macha (*peruvianum jancs*), Es una planta que crece en las alturas en zonas más altas de los cerros, en zonas rocosas y arcillosas, y la cual se ha recolectado del cerro Sohojori Distrito de Conima de la Provincia de Moho y Departamento de Puno.

Tabla 1: Descripción de la Macha Macha

| Familia | Género | Especie | Nombre común |
|-----------------|--------|-------------------|--------------|
| Grossulariaceae | Ribes | peruvianum Jancs. | macha macha |

Fuente: (JUAN PAURO R., 2011)

Dentro de las condiciones para un óptimo cultivo natural tenemos:

- **Altura:** Entre 3500 y 4000 msnm
- **Temperatura:** 12 y 15 °C, aunque entre 15 a 16 °C permite buenos rendimientos del cultivo. Si los cambios de temperatura entre el día y la noche son superiores a 8 °C se favorece la formación de la sacarosa.
- **Luminosidad adecuada:** se encuentra entre 5 a 8 horas diarias promedio de brillo solar.
- **Precipitación anual:** 1.500 a 1.750 mm.

- **Vientos:** Cálidos y secos aumentan la transpiración de la planta.
- **Suelos:** Franco arcillosos, con buen drenaje
- **Humedad relativa:** 75 – 80 %.

Tabla 2: Propiedades de la materia prima

| Energéticos (100 gramos) | | | | | | | |
|--------------------------|------|---------------|------------|-------------------|------------|------------------|--------|
| | Kcal | Proteínas (g) | Grasas (g) | Carbohidratos (g) | Fibras (g) | Azúcares (°brix) | Agua % |
| Macha macha | 44 | 0.9 | 0.2 | 11.3 | 0.9 | 16 | 71.03 |

FUENTE: (JUAN PAURO R., 2011)

2.1.2. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La fermentación es un término general, que indica la degradación aeróbica o anaeróbica de un substrato orgánico a diversos productos, por la acción de levaduras y algunas bacterias que producen enzimas para realizar dicha función y obtener energía en forma de ATP (Adenosin trifosfato). La degradación anaeróbica es quizá la más antigua, puesto que los organismos vivos aparecieron en una tierra primitiva, la cual era carente de oxígeno. (H., 1998)

Existen muchas clases de fermentaciones, dependiendo del tipo de organismo que las produce, del substrato, o incluso de las condiciones impuestas, tales como pH o el abastecimiento de oxígeno. Una de las más importantes y mejor conocidas es la fermentación alcohólica, la cual es una biorreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono mediante la siguiente reacción química:



Las principales responsables de esta degradación son las levaduras. *Saccharomyces cerevisiae*, es la especie de levadura usada con mayor frecuencia, pero existen diversos

estudios que comprueban la producción de alcohol por otros tipos de levaduras y algunas bacterias como *Zymomona mobilis*, pero su explotación a nivel industrial es mínima.

A nivel estequiométrico, esta reacción parece ser sencilla, pero la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos de dióxido de carbono es un proceso muy complejo, puesto que al mismo tiempo la levadura debe utilizar la glucosa y otros nutrientes adicionales para poder reproducirse. (OCTAVE, 1993)

El rendimiento estequiométrico teórico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de dióxido de carbono por 1 gramo de glucosa. En realidad es difícil obtener este rendimiento por que como se mencionó anteriormente la levadura utiliza glucosa para la producción de otros metabolitos indispensables para su crecimiento y desarrollo. El rendimiento experimental varía entre el 90 y el 95 % del teórico, y en la industria varia del 87 al 93 % del teórico. (frazier, 1981)

Puesto que gran cantidad de residuos que contienen carbohidratos de precio muy reducido, pueden aprovecharse en la fabricación de etanol; este tipo de fermentación a escala industrial, ha sido usada años atrás por la humanidad para la elaboración de cerveza, vinos y en general bebidas alcohólicas y en la actualidad se le está dando un valor agregado a la producción de etanol para ser utilizado como biocombustible.

La fermentación alcohólica industrial típica es esencialmente un proceso que se produce en un biorreactor, mediante el cual determinados substratos son transformadas mediante la reacción microbiana en etanol, dióxido de carbono y biomasa. Estos contenedores son

herméticos y permiten retirar mediante canalizaciones apropiadas el dióxido de carbono resultante. El éxito de una buena fermentación depende de la eficacia del tratamiento preliminar: concentración del azúcar, pH y temperatura óptimos; la adición de sustancias nutritivas al mosto, contaminación por otros microorganismos, empleo de un organismo resistente a altas concentraciones de alcohol, mantenimiento de condiciones anaerobias y la inmediata destilación del producto fermentado.

La fermentación de tipo industrial está enfocada, en aumentar la eficiencia de los biorreactores, con el fin de obtener mejores resultados en cuanto a productos, empleando teorías de control, en las variables que determinan la eficiencia del proceso, como son el calor, la temperatura, contaminaciones, pH, niveles de alcohol, concentraciones del sustrato, biomasa producida entre otras. (ERENIO, 2005)

2.1.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La fermentación alcohólica es una de las etapas principales que transforman el mosto o zumo azucarado, en un líquido con un determinado contenido de alcohol etílico (etanol). Dura, aproximadamente, una semana, a una temperatura de 20 °C, y se traduce por una disminución de la densidad del mosto. (SKOOG, 2001)

Hay materiales nutritivos como la glucosa que ya contienen oxígeno en su molécula, y este participa en la combustión. En el caso de la fermentación alcohólica, el oxígeno necesario para oxidar carbono y obtener dióxido de carbono junto con etanol está contenido en la propia molécula de glucosa, y esta conversión no requiere el concurso del oxígeno atmosférico.

En el caso concreto de la fermentación alcohólica, al descomponerse la glucosa en alcohol etílico y dióxido de carbono, se desprende solo un 7.33 % de la energía

susceptible de recuperación. Desde el punto de vista energético este rendimiento es muy bajo, pero lo compensa el hecho de que estas cortas cantidades de energía representan un verdadero capital productivo.

Los microorganismos que son capaces de producir fermentación alcohólica son *Saccharomyces* y otras especies de levaduras, *Torulopsis*, *Kloeckera*, *Candida*, ciertas especies *Mucor* y algunas

Bacterias. Sin embargo, la fermentación alcohólica más importante es producida por especies de *Saccharomyces*. Los hidratos de carbono que se pueden fermentar, por lo general son aquellos que contienen tres átomos de carbono o un múltiplo de los mismos. Los monosacáridos se pueden fermentar directamente, mientras que los di, tri y polisacáridos tienen que ser hidrolizados a hexosas antes de poder ser fermentado. (HENRY, 1998)

Se conocen cuatro hexosas fermentescibles, a saber: glucosa, fructuosa, manosa y galactosa. Las tres primeras siempre son fermentescibles, mientras que la última solo puede ser fermentada por ciertas especies de levaduras.

Los cultivos microbianos utilizados en la fermentación deben tener las siguientes características: tolerancia al etanol, a las altas temperaturas, a altas concentraciones de azúcar, rendimiento alcohólico, eficiencia en la fermentación y productividad.

2.1.2.1.1. Tolerancia al alcohol:

La tolerancia al etanol es un elemento importante en la selección de una cepa de levadura, pues de su capacidad de mantenerse activa en condiciones crecientes de concentración alcohólica en el medio dependerá el rendimiento del proceso.

2.1.2.1.2. Tolerancia a alta temperatura:

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

2.1.2.1.3. Tolerancia a alta concentración de azúcares:

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

La ecuación de Gay-Lussac, que indica que las hexosas son escindidas en partes ponderales aproximadamente iguales de anhídrido carbónico y alcohol, sólo indica el curso aproximado del proceso de fermentación. Y es que éste resulta extremadamente complicado, ya que consta de una larga serie de continuados procesos individuales, cada uno de los cuales se regula por separado por enzimas especiales.

Aproximadamente el 96% de la fermentación del etanol se lleva a cabo mediante cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o especies relacionadas, particularmente *S. uvarum*. El etanol se produce en la ruta de EmbdenMeyerhof-Parnas (fig. N° 1), en la que el piruvato producido durante la glicosilación se convierte en acetaldehído y etanol.

RUTA BIOQUÍMICA DE EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS (EMP)

Ruta bioquímica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (11)

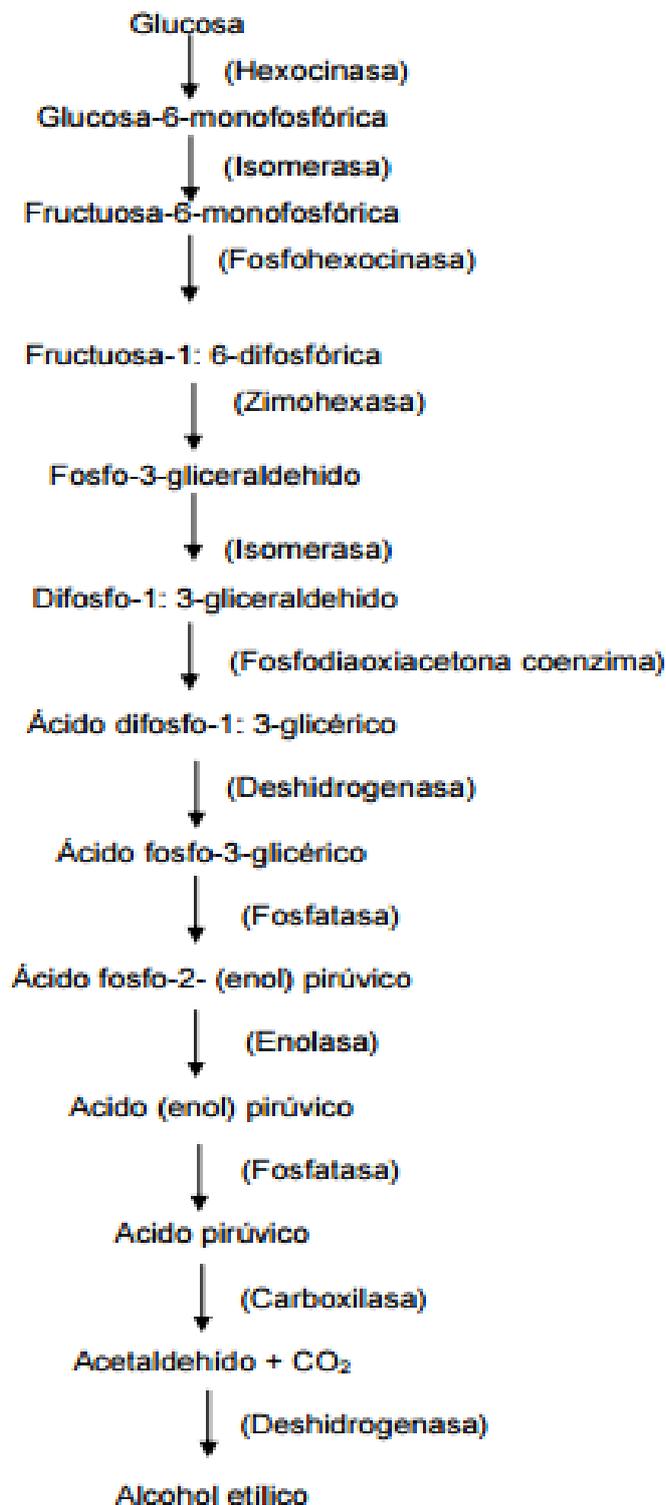


Figura 1: Ruta bioquímica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) de glucosa hasta obtención de etanol (Alcohol etílico)

2.1.2.2. CONDICIONES A MEDIR Y CONTROLAR EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN

1. **Temperatura.** La temperatura afecta de manera notable en el crecimiento microbiano, debido a que los microorganismos tienen un rango restringido de temperatura para su crecimiento. (H., 1998)
2. **pH.** El pH tiene una gran influencia en los productos finales del metabolismo anaerobio, por lo tanto es importante tener un control sobre esta variable durante el desarrollo del proceso de fermentación puesto que los microorganismos poseen un pH óptimo en el cual tienen mayor velocidad de crecimiento y rendimiento. (H., 1998)
3. **Nutrientes.** Un medio de cultivo debe de tener todos los elementos necesarios para el crecimiento microbiano, para esto se debe tener en cuenta los requerimientos nutricionales del microorganismo con el cual se va a trabajar. (H., 1998)
4. **Aireación.** La ausencia o presencia de oxígeno permite una selección tanto del microorganismo como de los productos del mismo. Cuando el cultivo se realiza en presencia de oxígeno la fermentación se denomina aeróbica y cuando este carece de oxígeno se denomina anaeróbica. Si la fermentación es anaeróbica, la mayor parte del carbono se emplea como energía y solo el 2 % se asimila como material celular. *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura que posee alta actividad metabólica, por lo que en un proceso fermentativo en fase aerobia se caracteriza por la producción de biomasa y en fase anaeróbica generalmente por la producción de etanol. (H., 1998)
5. **Productividad.** La productividad se define como la producción de biomasa por unidad de volumen, por unidad de tiempo de cultivo, dado en concentración de biomasa (g/L) en función de tiempo (h). (H., 1998)

2.1.2.3. LIMITANTES DE LA FERMENTACIÓN

1. Concentración de alcohol. Las levaduras, presentan cierta resistencia a las concentraciones de alcohol que se producen durante la fermentación, debido a que el etanol, inhibe el transporte de D-xilosa, amonio, glicina y algunos aminoácidos, así como afecta la función y estabilidad de algunas enzimas citoplasmáticas como la hexoquinasa, debido a que a concentraciones críticas de etanol, se presenta la formación de un complejo hexoquinasa-etanol el cual puede detener la reacción glucosa a glucosa-6 fosfato. En conclusión la tolerancia al alcohol depende de la habilidad de la célula para exportar el etanol del interior al medio externo, un proceso que depende de la composición de la membrana y de la fluidez de la misma.

La célula modifica la composición en ácidos grasos de la membrana para minimizar los efectos de la fluidez que produce el etanol, de la misma manera la adaptación de las levaduras al etanol también obedece a una modificación de la composición lipídica de las membranas debido básicamente a un enriquecimiento de las mismas en esteroides y ácido grasos de cadena larga, de esta manera para las levaduras poder adaptarse a altas concentraciones de alcohol debe existir un aumento del contenido de ácidos grasos insaturados con respecto a los saturados y un aumento en la longitud de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos (SKOOG, 2001)

2. Acidez del sustrato. El pH es un factor limitante en el proceso de la fermentación debido a que las levaduras se ven afectadas por el ambiente en el cual se desarrollan es decir alcalino o ácido. Las levaduras tienen rango óptimo de pH que va desde 3.5 hasta 5.5. En el proceso de fermentación, el pH tiende a disminuir debido a la producción de ácidos, formados al tomar los nitrógenos de los aminoácidos perdiendo su carácter anfótero. En los procesos industriales, se hace uso de soluciones tampón para mantener niveles óptimos de acidez.

3. **Concentración de Azúcares.** Las concentraciones altas de azúcares afectan los procesos de osmosis dentro de la membrana celular, el rango óptimo de concentración de azúcar es de 10 a 18%, puesto que a concentraciones de 22% las levaduras empiezan a tener problemas en su proceso de respiración celular.
4. **Temperatura.** Las levaduras son microorganismo mesófilos, por lo tanto su temperatura no puede sobrepasar los 50°C, puesto que a esta temperatura o temperaturas superiores se produce su muerte. Por lo tanto debido a que la fermentación es un proceso exotérmico, se debe mantener en el mismo un control de temperatura para mantener la temperatura en su valor óptimo que es de 30 °C.
(BUCHNER, 1897)

5. **Ritmo de crecimiento de las cepas.** Durante la fermentación las cepas crecen en número debido a las condiciones favorables que se presentan en el medio, esto hace que se incremente la concentración de levaduras.

2.1.3. CINÉTICA DE FERMENTACIÓN

Los microorganismos crecen en el espectro en variedad de entornos físicos y químicos, su crecimiento y otras actividades fisiológicas en el tacto de una respuesta en su entorno físico-químico. Cinética de fermentación se describe el crecimiento y formación de producto por microorganismos - no sólo el crecimiento celular activo, sino también a las actividades de descanso y la muerte de las células, ya que muchos productos de la fermentación de arco interés comercial producido tras el crecimiento se ha detenido. (H., 1998)

2.1.4. MODELOS CINÉTICOS

El modelo matemático de una reacción química está basado en los modelos cinéticos para el crecimiento de una población de microorganismos, sin embargo en nada explican los complejos mecanismos que se desarrollan a nivel celular, tampoco la influencia individual de las células sobre la población, es por lo general aconsejable manejar modelos que sean lo suficientemente expeditivos, prescindiendo de detalles demasiado complejos. Como los modelos de Monod,

Moser y de Tessier estos últimos se utilizan mucho porque se ha comprobado que son las que mejor se ajustan a los datos experimentales al principio o al final de la fermentación.

La cinética de reacción, a medida que transcurre la reacción, disminuye las concentraciones de reactantes. En general, la velocidad de reacción depende de la concentración de reactante por lo que la velocidad específica de conversión disminuye simultáneamente. La velocidad de reacción varía también con la temperatura para facilitar el estudio de los reactores microbianos, se admite frecuentemente que existe una relación constante, para un sistema microorganismo-sustrato determinados entre velocidad de consumo de sustrato y la velocidad de producción de células entre la velocidad de generación de producto metabólico.

Indica que la estequiometría del crecimiento celular es muy complejo y varía con el sistema microorganismo/nutrientes y con las condiciones del entorno como pH, temperatura y potencial redox. Esta complejidad se incrementa considerablemente cuando más de un nutriente contribuye al crecimiento celular, como suele suceder. En general la estequiometría puede ignorarse con rendimientos fraccionales que cambia con la composición. El tratamiento de este caso puede ser difícil por tanto sería deseable hacer la simplificación de que todos los valores rendimientos permanecen constantes para todas las composiciones a través de la reacción. Esta hipótesis suele ser razonable para flujo mezclado o para el periodo de crecimiento exponencial en reactores por cargas de otro modo es cuestionable. (OCTAVE, 1993)

Entre los modelos cinéticos de crecimiento específico tenemos.

2.1.4.1. Modelo cinético de Monod (H., 1998)

$$\mu = \frac{\mu_m S}{k_s + S} \quad \dots\dots\dots(1)$$

2.1.4.2. Modelo de Lineweaver-Burk Linealizado

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{max}} + \frac{K_s}{\mu_{max}} \left(\frac{1}{S}\right) \quad \dots\dots\dots(2)$$

Donde:

μ : Velocidad específica de crecimiento, (h^{-1})

$\mu_{m\acute{a}x.}$: velocidad específica máxima de crecimiento, (h^{-1})

S: concentración de sustrato limitante, (g/L)

Ks: constante de saturación, (g/L).

2.1.4.3. Modelo de Michaelis y Menten

$$\frac{d[P]}{dt} = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \dots\dots\dots(3)$$

S: concentración del sustrato (g/L)

Km: es la velocidad de formación del producto.

V_{max}: es la *velocidad máxima*. k₂ se denomina con frecuencia k_{cat}.

2.1.4.4. Modelo cinético de Tessier (H., 1998)

$$\mu = \mu_m (1 - \exp^{-Ks}) \dots\dots\dots(4)$$

Dónde: μ : velocidad de crecimiento
 μ_m : velocidad máxima de crecimiento
 Ks : constante cinética
 exp : exponencial

2.1.4.5. Modelo cinético de Contois (H., 1998)

$$\mu = \frac{\mu_m S^n}{k_{sx} X + S^n} \dots\dots\dots(4)$$

Dónde: μ : velocidad de crecimiento
 μ_m : velocidad máxima de crecimiento

K_{sx} : constante de la biomasa

S : concentración del sustrato

X : concentración de biomasa

n : constante empírica

2.1.5. LEVADURA

Las levaduras al igual que los mohos, son hongos, pero se distinguen de ellos porque su forma dominante es unicelular generalmente sus reproducciones por esporulación, gemación o fisión. El método más común es por gemación. (Frazier, 1981)

La gemación se produce cuando disponen de suficientes nutrientes para su alimentación.

Se diferencia de las algas porque no realizan fotosíntesis, tampoco son protozoos puesto que tienen una pared celular rígida, son más grandes que las bacterias, hay aproximadamente 350 especies de levaduras, separadas en 39 géneros. (LEPE, 1997)

Las levaduras aparecen casi incoloras en las suspensiones, en grandes concentraciones o prensadas, muestran una coloración blanca o amarilla pardusca. Esto también es aplicado a las levaduras de la industria, además hay algunos tipos de levaduras rojas y negras, de importancia secundaria. (BUCHNER, 1897)

Las levaduras no poseen movimiento propio pues carecen de órganos motores (cilios), se multiplican con una velocidad bastante grande. Para un buen crecimiento tienen importancia unas condiciones óptimas de vida, es decir, una temperatura y una alimentación adecuada.

Las levaduras han servido al hombre durante muchos siglos para fermentar jugos de fruta, para elaborar muchos y nutritivos alimentos.

Su importancia es mayor en la actualidad porque se ha utilizado en muchos procesos fermentativos síntesis de muchos materiales, grasas y proteínas a partir de azúcares simples y amoníaco.

Se consideran tres principales subdivisiones reconocidas:

- Las levaduras ascospóroenas y ascomicéticas
- Las levaduras basidiomicéticas
- Las levaduras que no tienen estadios perfectos (hongos imperfectos) son deuteromicetes.

Las levaduras se encuentran muy difundidas en la naturaleza y son diseminadas por los insectos y el viento. Varían considerablemente de tamaño entre 1-5 micrómetros de ancho y de 5 a 30 micrómetros o más de largo, generalmente son ovoides si bien algunos son esféricos y otros alargados, cada especie tiene su aspecto característico. Las levaduras no tienen flagelos u otros organelos de locomoción.

Las células viejas de las levaduras con paredes engrosadas, especialmente son resistentes a condiciones poco favorables de calor, luz, desecación y sustancias químicas.

Algunas especies de levaduras almacenan grandes cantidades de grasas, carbohidratos o proteínas; otras especies son fuente de glicógeno, enzimas y vitaminas, para los microorganismos y suplementos alimenticios de humanos y otros animales. (SIRIO, 2015)

Cuando se desarrollan en medio de cultivos adecuados las colonias de levaduras varían en aspecto, textura y margen. Así algunas son lisas, otras rugosas, aplanadas, otras elevadas; tienen bordes bien definidos o irregulares. Las colonias jóvenes tienen consistencia comparable a la de una pasta; la cual con el tiempo se vuelve más espesa y seca.

Como las levaduras son muy importantes en la industria por su capacidad para fermentar u oxidar sustratos y producir sustancias útiles, es conveniente usar la cepa de microorganismos que proporcionan la mayor cosecha. (LEPE, 1997)

Las levaduras también son capaces de crecer en un amplio margen de temperatura desde 0° a 47 °C, algunos no se desarrollan a más de 15 °C, aunque otros pueden hacerlo a mucho menos temperatura. La óptima para la mayor parte está entre 20 y 30 °C. En general se sostiene que las levaduras se desarrollan mejor en medios con acción ácida.

La levadura se propaga bien en presencia del aire y en ausencia de él, pero fermenta los azúcares más rápidamente cuando está ausente el aire; puesto que la asimilación es entonces más lenta y la mayor parte del azúcar es convertida en alcohol. En presencia de aire en exceso, es inhibida la fermentación y se estimula la asimilación; por esta razón se airea fuertemente la solución fermentada.

En escala de laboratorio, es conveniente airear gran número de matraces que contengan pequeñas cantidades de líquidos, agitándolos constantemente por medio de una máquina. De esta manera se consigue una aireación uniforme en cada matraz. El método de aireación más empleado es hacer burbujear aire a través del sustrato líquido.

Los constituyentes normales de las células referidas a la materia seca de levadura en cantidades porcentuales son las siguientes:

Tabla 3: Constituyentes normales referidas a la materia seca de levadura.

| COMPONENTES | PORCENTAJE EN PESO SECO (%) |
|-------------------------|-----------------------------|
| Grasas | 2.0 |
| Elementos Inorgánicos | 9.0 |
| Hidratos de Carbono | 37.0 |
| Sustancias Nitrogenadas | 50.0 |

Fuente: (frazier, 1981)

2.1.5.1. Estructura química de la levadura

Básicamente la célula de la levadura consiste de una pared celular formada por tres capas en las células sanas. Esta pared rodea al plasmalema (membrana del citoplasma) y el citoplasma, dentro del cual existen varios orgánulos, incluyendo vacuolas, mitocondrias, poli-ribosoma y gránulos. (frazier, 1981)

Existe también un núcleo en dos diferentes dimensiones ópticas; la región que es más densa óptimamente se conoce con el nombre de nucléolo y la región menos densa se llama núcleo plasma.

2.1.5.2. *Saccharomyces cerevisiae*.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiende a formar colonias de color crema, blancas y húmedas en mosto agar. En cultivos jóvenes las células presentan forma redonda, ovalada o poliforme y un tamaño de 4 a 14 micras de longitud por 3-7 micras de grueso. (Ver Figura N°1) Forma ascosporas redondas y lisas. Fermentan glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa. No utiliza nitratos, y tolera pH: 3.5-4.0.

En condiciones normales de observación en el microscopio el núcleo será invisible, el protoplasma en las células jóvenes será de apariencia suave y poco

granulado, aumentando su granulación y el tamaño de las vacuolas en las células viejas. Las células muertas presentan generalmente una apariencia más irregular, con el protoplasma rugoso y paredes celulares más gruesas. *Saccharomyces cerevisiae* esporula en forma muy difícil y para inducir la esporulación es necesario mantener la levadura en medio húmedo, con aire y sin nutrientes, excepto solo minerales, cuando se forman esporas, estas generalmente serán 2 a 4, conociéndose con el nombre de ascosporas y llamándose a la bolsa que la contiene asca. (SIRIO, 2015)

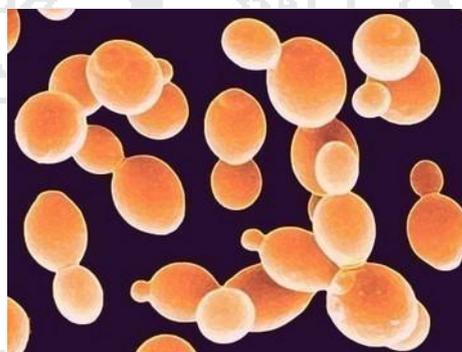


Figura 2: Levadura *Saccharomyces cerevisiae*. (En una imagen de microscopio)

La estructura de la pared celular previene físicamente la difusión dentro o fuera de la célula de compuestos con pesos moleculares mayores de 4,500. Como se mencionó anteriormente, debajo de la pared celular se encuentra la membrana citoplasmática o plasmalema, la cual consiste de manan, proteína y lípidos. Esta membrana controla el paso de iones inorgánicos, aminoácidos y azúcares; así como el paso hacia el exterior de los productos del metabolismo (alcohol, enzima, material proteico, etc.)

En el citoplasma existen mitocondrias los cuales están directamente involucrados con la síntesis de proteínas y ácido ribonucleico (RNA) y también en las reacciones del ciclo de Krebs y en los sistemas para transporte de electrones. En

las levaduras que se encuentran en condiciones aeróbicas la mitocondria puede tener forma esférica o de bastón, en tanto que en las levaduras que se encuentran en condiciones anaeróbicas o en un medio que tenga un alto contenido de glucosa se formarán mitocondrias más simples. (CONNOR, 2000)

La pared celular exterior de *Saccharomyces cerevisiae* consiste principalmente en un complejo que fosfomanan, en tanto que las zonas exteriores de las mismas, estarán formadas por manana y glucana.

Tabla 4: Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*.

| ESPECIFICACION | CLASIFICACION |
|----------------|--------------------|
| Clase | Ascomycetas. |
| Sub-clase | Hemiascomycetidae. |
| Orden | Hendomicetales. |
| Familia | Sacharomycetaceae. |
| Sub-familia | Sacharomycoideae. |
| Genero | Saccharomyces. |

Fuente: (LEPE, 1997)

2.1.6. FERMENTACIONES

2.1.6.1. Fermentación.

La fermentación alcohólica se puede considerar desde una perspectiva humana como un proceso bioquímico para la obtención de etanol, que por otras vías se ha obtenido gracias a procedimientos químicos industriales, como por ejemplo mediante la hidratación de etileno.

La fermentación alcohólica denominada también como fermentación del etanol o incluso fermentación etílica es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire oxígeno, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono por regla general azúcares: como pueden ser por ejemplo la glucosa, la fructosa, la sacarosa y el almidón. para obtener

como productos finales: un alcohol en forma de etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$), dióxido de carbono (CO_2) en forma de gas y unas moléculas de adenosintrifosfato (ATP) que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico . El etanol resultante se emplea en la elaboración de algunas bebidas alcohólicas, tales como el vino, la cerveza, la sidra, el cava, etc. Aunque en la actualidad se empieza a sintetizar también etanol mediante la fermentación a nivel industrial a gran escala para ser empleado como biocombustible. (CORCHO, 2002)

La fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta, siendo el producto final un compuesto orgánico. Estos productos finales son los que caracterizan los diversos tipos de fermentaciones. Fue descubierta por Pasteur, que la describió como la vida sin el aire. para el caso Otto Heinrich Warburg define la fermentación alcohólica como un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono , para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono CO_2 en forma de gas y unas moléculas de ATP .

La fermentación alcohólica tiene como finalidad biológica proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos unicelulares, para ello disocian las moléculas de glucosa y obtienen la energía necesaria para sobrevivir, produciendo el alcohol y CO_2 , como desechos a consecuencia de la fermentación. Una de las principales características de estos microorganismos es que viven en ambientes completamente carentes de oxígeno , máxime durante la reacción química, por esta razón se dice que la fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico. (BROCK, 2006)

La fermentación en términos generales es la descomposición de las sustancias orgánicas de origen vegetal exentas de nitrógeno, preferentemente los hidratos de carbono o sus derivados por medio de bacterias, levaduras y mohos con producción de energía. Hay fermentaciones aeróbicas, oxidantes y anaeróbicas. Tanto la fermentación anaeróbica y aeróbicas tienen ambas el mismo fin, la provisión de energía de los microorganismos causantes del fenómeno.

La fermentación es un proceso conocido desde la antigüedad y algunas de ellas constituyen hoy en día una de las ramas de producción más importantes en la industria. Existen dos tipos de fermentación: fermentación anoxidativa en la cual no hay intervención del oxígeno en el proceso y fermentación oxidativa en la cual el oxígeno está presente.

Todos los procesos fermentativos dependen de las condiciones ambientales a que se somete el microorganismo en presencia del sustrato, entre estas condiciones están: Concentración del azúcar, aeración, control de temperatura, formación de espuma. (ALFREDO, 2005)

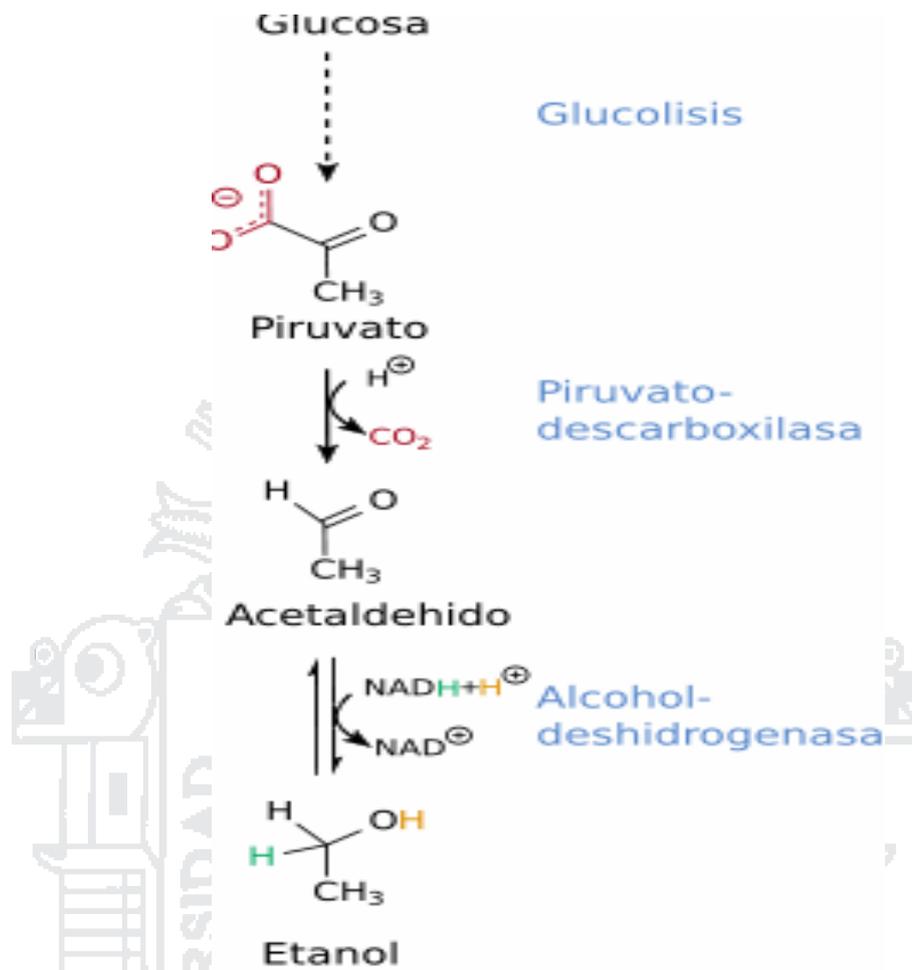


Figura 3: Reacción bioquímica de la fermentación

La glucólisis es la primera etapa de la fermentación, lo mismo que en la respiración celular, y al igual que ésta necesita de enzimas para su completo funcionamiento; a pesar de la complejidad de los procesos bioquímicos una forma esquemática de la reacción química de la fermentación alcohólica puede describirse como una glicólisis en la denominada vía Embden-Meyerhof-Parnes. (Figura N°3) de tal forma que puede verse como participa inicialmente una molécula de hexosa:



Se puede ver que la fermentación alcohólica, desde el punto de vista energético es una reacción exotérmica, se libera una cierta cantidad de energía. La

fermentación alcohólica produce gran cantidad de CO₂, que es la que provoca que el cava (al igual que el Champagne y algunos vinos) tengan burbujas. Este CO₂ (denominado en la edad media como gas vinorum) pesa más que el aire, y puede llegar a crear bolsas que desplazan el oxígeno de los recipientes donde se produce la fermentación.

Un cálculo realizado sobre la reacción química muestra que el etanol resultante es casi un 51% del peso, los rendimientos obtenidos en la industria alcanzan el 7%. Se puede ver igualmente que la presencia de fósforo (en forma de fosfatos), es importante para la evolución del proceso de fermentación.

La fermentación alcohólica se produce por regla general antes que la fermentación maloláctica, aunque existen procesos de fermentación específicos en los que ambas fermentaciones tienen lugar al mismo tiempo. La presencia de azúcares asimilables superiores a una concentración sobre los 0.16 g/L produce invariablemente la formación de alcohol etílico en proceso de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura), incluso en presencia de exceso de oxígeno (aeróbico), este es el denominado efecto Crabtree, este efecto es tenido en cuenta a la hora de estudiar y tratar de modificar la producción de etanol durante la fermentación. (frazier, 1981)

Si bien el proceso completo (vía Embden-Meyerhof-Parnes) descrito simplificado anteriormente explica los productos resultantes de la fermentación etílica de un hexano, cabe destacar que el proceso se puede detallar en una glicólisis previa gobernada por un conjunto de enzimas en la que se obtiene un piruvato tal y como se describe a continuación:



La reacción química se describe como la reducción de dos moléculas de Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) de NADH (forma reducida del NAD^+) con un balance final de dos moléculas de ADP que finalmente por la reacción general mostrada anteriormente se convierten en ATP (Adenosín Trifosfato). Otros compuestos trazados en menores proporciones que se encuentran presentes tras la fermentación son: el ácido succínico, el glicerol, el ácidofumárico.

En más detalle durante la fermentación etílica en el interior de las levaduras, la vía de la glucólisis es idéntica a la producida en el eritrocito (con la excepción del piruvato que se convierte finalmente en etanol). En primer lugar el piruvato se descarboxila mediante la acción de la piruvato descarboxilasa para dar como producto final acetaldehído liberando por ello dióxido de carbono (CO_2) a partir de iones del hidrógeno (H^+) y electrones del Dinucleótido de Nicotinamida y Adenosina (reducido) (NADH). Tras esta operación el NADH (Dinucleótido de Nicotinamida y Adenosina (reducido) sintetizado en la reacción bioquímica catalizada por el Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (GADHP) se vuelve a oxidar por el alcohol deshidrogenasa, regenerando NAD^+ NicotinamidaAdenina dinucleótido para la continuación de la glucólisis y sintetizando al mismo tiempo etanol.

Se debe considerar que el etanol va aumentando de concentración durante el proceso de fermentación y debido a que es un compuesto tóxico, cuando su concentración alcanza aproximadamente un 12% de volumen las levaduras tienden a morir. Esta es una de las razones fundamentales por las que las bebidas alcohólicas (no destiladas) no alcanzan valores superiores a los 20% de concentración de etanol.

La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico exotérmico (libera energía) y moléculas de ATP necesarias para el funcionamiento metabólico de las levaduras (seres unicelulares). Debido a las condiciones de ausencia de oxígeno durante el bioprocesos, la respiración celular de la cadena del ADP en ATP queda completamente bloqueada, siendo la única fuente de energía para las levaduras la glicólisis de la glucosa con la formación de moléculas de ATP mediante la fosforilación a nivel de sustrato. El balance a nivel molecular del proceso se puede decir que genera dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. (CORCHO, 2002)

2.1.7. TIPOS DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

2.1.7.1. FERMENTACIÓN ANAEROBIA

La fermentación anaerobia es comparativamente una operación sencilla. El medio estéril contenido en un fermentador también estéril, se inocula con el organismo apropiado, el organismo se multiplica rápidamente y la fermentación comienza. En las dos fermentaciones anaerobias más importantes, la de producción de alcohol por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y en la formación de butanol-acetona por acción de la bacteria *Clostridium acetobutylicum*, se producen cantidades substanciales de CO_2 y H_2 , respectivamente. Dicha substancias deben ser convenientemente eliminadas del fermentador y pueden recuperarse como subproductos. En las plantas de obtención de butanol los gases de un fermentador pueden ser utilizados para desplazar el oxígeno atmosférico del espacio vacío de otros de los fermentadores. (OCTAVE, 1993)

2.1.7.2. FERMENTACIÓN INDUSTRIAL

La fermentación etílica ha sufrido algunas transformaciones con el objeto de aumentar la eficiencia química del proceso, una de las mejoras más estudiadas en la industria es la posibilidad de realizar la fermentación alcohólica continua con el objeto de obtener mayores cantidades de etanol. Hoy en día el procesamiento industrial de algunas bebidas alcohólicas como puede ser el vino o la cerveza se realizan en ambientes controlados capaces de ofrecer a un ritmo apropiado de estos productos de consumo al mercado. Esta vía ofrece una amplia materia de investigación en temas de eficiencia de bioreactores , empleando para ello teoría de sistemas de control (el problema desde el punto de vista de ingeniería de sistemas es altamente no lineal y oscilatorio). Otra vía de investigación acerca de la mejora de los procesos industriales es la mejora de las cepas de levaduras (como puede ser la *Zymomonasmobilis* que ofrece ventajas en los procesos continuos de fermentación), permitiendo la convivencia de una mayor densidad de las mismas durante la producción. Una de las características de la fermentación etílica industrial es la selección adecuada de las levaduras a inocular en el proceso de fermentación con el objeto de aumentar el rendimiento de la producción. (OCTAVE, 1993)

2.1.7.3. FERMENTACIÓN INDUSTRIAL TÍPICA

Es esencialmente un proceso que se produce en un recipiente llamado fermentador o en general, biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo (levaduras) son transformadas mediante la reacción microbiana en metabolitos y biomasa. Durante el proceso los microorganismos van aumentando de concentración en el transcurso de la

reacción al mismo tiempo que el medio va modificando sus propiedades químicas y se forman productos nuevos como consecuencia de las reacciones anabólicas. (HENRY, 1998)

2.1.7.4. FERMENTACIONES NATURALES

La fermentación alcohólica con la emisión de ciertas cantidades de etanol se produce de forma espontánea en la naturaleza siempre que se encuentre un azúcar y una atmósfera pobre de oxígeno, es por esta razón que ocurre espontáneamente en el interior de algunas frutas que se puede decir sufren un proceso de maduración anaeróbica. (CORCHO, 2002)

2.1.7.5. FERMENTACIONES ESPECÍFICAS

Las fermentaciones específicas son manipuladas por el hombre con el objeto de obtener el etanol en ciertas bebidas. Para ello se emplean principalmente los azúcares de las frutas, cereales y leche. La producción de estas bebidas es en la mayoría de los casos local debido a la disponibilidad de los substratos. (CONNOR, 2000)

2.1.8. FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN

Todos los procesos fermentativos dependen de las condiciones ambientales a que se somete el microorganismo en presencia del sustrato, entre estas condiciones están:

- Concentración del azúcar.
- Control del pH del medio.
- Aeración.

- Control de temperatura.
- Formación de espuma.
- Contamination.

Concentración del azúcar: Sistema típico donde la concentración de la sustancia convertible se reduce gradualmente desde un valor inicial alto hasta un mínimo. La mitad de los azúcares totales fermenta en 8 - 10 horas Durante el período principal de fermentación de un proceso que dura de 60 a 70 horas.

Control de pH del medio: El ajuste del pH del sustrato a un valor óptimo inicial antes de la inoculación de los microorganismos es una parte de la preparación del sustrato. El pH inicial óptimo depende de la especie de organismo usado, de la reacción deseada y de las condiciones del proceso.

Aeración: En muchos procesos y si es aeróbico es conveniente la presencia del aire, en especial durante la fase de incubación, cuando el organismo prolifera rápidamente. Las levaduras crecen bien bajo condiciones aeróbicas.

Control de temperatura: La temperatura inicial óptima depende de factores análogos a los que controlan el pH. Aunque la mayoría de microorganismos toleran intervalos amplios de temperatura. Las levaduras no toleran temperaturas mayores de 470 °C y la *Saccharomyces cerevisiae* crece a 200°C.

Formación de espuma: Durante el proceso fermentativo el caldo de cultivo tiende a formar espuma, debido al movimiento acelerado de agitación y al exceso de aire propagado en el sustrato, forma espuma compuesta de caldo y levadura, quedando adherida en las paredes del fermentador.

Contaminación: algunos procesos microbianos fermentativos no pueden realizarse con éxito, debido a contaminación causada por la presencia de microorganismos como bacterias, degeneración de los microorganismos y las diferencias en los valores óptimos del pH. (HENRY, 1998)

2.1.9. MATERIAS PRIMAS Y SU IMPORTANCIA PARA EL PROCESO FERMENTATIVO.

El etanol se puede producir a partir de 3 principales tipos de materias primas:

Materias ricas en sacarosa como la caña de azúcar, plátano, la melaza y el sorgo dulce.

Materias ricas en almidón como los cereales (maíz, trigo, cebada, etc.) y los tubérculos (yuca, camote, papa, malanga, etc.).

Materias ricas en celulosa como la madera y los residuos agrícolas.

Desde el punto de vista técnico, la caña de azúcar es una de las materias primas más atractivas de biomasa. Lo anterior se debe a que los azúcares que contiene se encuentran en una forma simple de carbohidratos fermentables y además durante su procesamiento se genera el bagazo, que se usa como combustible en la producción de etanol. El principal inconveniente de la caña de azúcar son los costos de producción. Además, se requieren tierras fértiles para su cultivo las cuales podrían ser destinadas a la producción de alimentos.

Por su parte, las materias ricas en almidón contienen carbohidratos de mayor complejidad molecular que necesitan ser transformados en azúcares más simples por un proceso de conversión (sacarificación), lo que introduce un paso más en la producción con el consiguiente aumento en los costos de capital y de operación.

No obstante lo anterior, existen ciertos cultivos amiláceos como es el caso de la yuca, los cuales se pueden establecer con un mínimo de insumos y en tierras marginales en donde generalmente otras especies más exigentes no se desarrollan. (frazier, 1981)

Finalmente, las materias primas ricas en celulosa son las más abundantes, sin embargo la complejidad de sus azúcares hacen que la conversión de estos en carbohidratos fermentables sea una tarea difícil y poco rentable en la actualidad. Los procesos de hidrólisis ácida y enzimática de sustratos celulósicos se encuentran poco desarrollados a nivel industrial, sin embargo se esperan avances importantes en los próximos años.

2.1.10. POTENCIAL DE IONES HIDRÓGENO (pH)

El pH es un valor que indica el nivel de acidez del producto y se mide en una escala de 0 a 14. Un valor de 7 es neutro. Los valores menores de siete son ácidos, los mayores de siete son alcalinos. El pH puede ser medido con diferentes dispositivos que van desde papel indicador hasta equipos portátiles. (SKOOG, 2001)

2.1.11. GRADOS BRIX

Los grados Brix ($^{\circ}\text{Bx}$) indican la cantidad de sólidos solubles, es decir, la consistencia del producto. Se determina mediante el índice de refracción el cual se basa en la dirección que toma un rayo de luz cuando incide en un medio de diferente densidad que el aire. (frazier, 1981)

2.1.12. GRADO ALCOHÓLICO

El grado alcohólico es determinado en la práctica mediante un aerómetro expresamente graduado, llamado alcoholímetro, alcoholómetro o aerómetro. El más utilizado es el alcoholímetro de Gay Lussac, el cual se encuentra graduado a 15°C, y expresa el grado alcohólico en volúmenes (centímetros cúbicos de alcohol etílico en 100 centímetros cúbicos de líquido a 15°C). (OVIEDO, 2009)

2.1.13. DESTILACIÓN

La destilación es la operación de separar las distintas sustancias que componen una mezcla líquida mediante vaporización y condensación selectivas. Dichas sustancias, que pueden ser componentes líquidos, sólidos disueltos en líquidos o gases licuados, se separan aprovechando los diferentes puntos de ebullición de cada una de ellas, ya que el punto de ebullición es una propiedad intensiva de cada sustancia, es decir, no varía en función de la masa o el volumen, aunque sí en función de la presión. (H., 1998)

2.1.13.1. DESTILACIÓN SIMPLE

La destilación simple o destilación sencilla es una operación donde los vapores producidos son inmediatamente canalizados hacia un condensador, el cual los enfría (condensación) de modo que el destilado no resulta puro. Su composición será diferente a la composición de los vapores a la presión y temperatura del separador y pueden ser calculadas por la ley de Raoult. En esta operación se pueden separar sustancias con una diferencia entre 100 y 200 grados Celsius, ya que si esta diferencia es menor, se corre el riesgo de crear azeótropos. Al momento de efectuar una destilación simple se debe recordar colocar la entrada de agua por la parte de arriba del refrigerante para que de esta manera se llene

por completo. También se utiliza para separar un sólido disuelto en un líquido o 2 líquidos que tengan una diferencia mayor de 50 °C en el punto de ebullición. (H., 1998)

2.1.13.2.DESTILACIÓN FRACCIONADA

La destilación fraccionada de alcohol etílico es una variante de la destilación simple que se emplea principalmente cuando es necesario separar líquidos con puntos de ebullición cercanos.

La principal diferencia que tiene con la destilación simple es el uso de una columna de fraccionamiento. Ésta permite un mayor contacto entre los vapores que ascienden, junto con el líquido condensado que desciende, por la utilización de diferentes "platos". Esto facilita el intercambio de calor entre los vapores (que lo ceden) y los líquidos (que lo reciben). (H., 1998)

2.1.13.3.DESTILACIÓN AL VACÍO

La destilación al vacío consiste en generar un vacío parcial por dentro del sistema de destilación para destilar sustancias por debajo de su punto de ebullición normal. Este tipo de destilación se utiliza para purificar sustancias inestables por ejemplo las vitaminas.

Lo importante en esta destilación es que al crear un vacío en el sistema se puede reducir el punto de ebullición de la sustancia casi a la mitad.

En el caso de la industria del petróleo es la operación complementaria de destilación del crudo procesado en la unidad de destilación atmosférica, que no se vaporiza y sale por la parte inferior de la columna de destilación atmosférica.

El vaporizado de todo el crudo a la presión atmosférica necesitaría elevar la

temperatura por encima del umbral de descomposición química y eso, en esta fase del refino de petróleo, es indeseable.

El residuo atmosférico o crudo reducido procedente del fondo de la columna de destilación atmosférica, se bombea a la unidad de destilación a vacío, se calienta generalmente en un horno a una temperatura inferior a los 400 °C, similar a la temperatura que se alcanza en la fase de destilación atmosférica, y se introduce en la columna de destilación. Esta columna trabaja a vacío, con una presión absoluta de unos 20 mm de Hg, por lo que se vuelve a producir una vaporización de productos por efecto de la disminución de la presión, pudiendo extraerle más productos ligeros sin descomponer su estructura molecular.

En la unidad de vacío se obtienen solo tres tipos de productos:

- Gas Oil Ligero de vacío (GOL).
- Gas Oil Pesado de vacío (GOP).
- Residuo de vacío.

Los dos primeros, GOL y GOP, se utilizan como alimentación a la unidad de craqueo catalítico después de desulfurarse en una unidad de hidrodesulfuración (HDS).

El producto del fondo, residuo de vacío, se utiliza principalmente para alimentar a unidades de craqueo térmico, donde se vuelven a producir más productos ligeros y el fondo se dedica a producir fuel oil, o para alimentar a la unidad de producción decoque. Dependiendo de la naturaleza del crudo el residuo de vacío puede ser materia prima para producir asfaltos. (H., 1998)

2.1.14. ALCOHOLES

Los alcoholes son derivados de hidrocarburos (moléculas formadas por carbono e hidrógeno) y se caracterizan por tener un grupo oxidrilo (OH) unido a uno de los átomos de carbono en sus moléculas.

La mayoría de los alcoholes de bajo peso molecular son los de mayor importancia comercial.

En la gran familia de los alcoholes se encuentran el "etanol" y el "metanol" dos compuestos que mezclados con nafta se están implementando como combustible. En América del Sur más de 4 millones de automóviles funcionan con etanol como resultado de un programa gubernamental que tiene por objetivo obtener un combustible alternativo derivado de la caña de azúcar. Además es usado como un aditivo que se le añade a la gasolina para oxigenarla, llamado EthylTertiaryButylEther, ETBE, el cual ayuda a que se produzca una mejor y limpia combustión. (H., 1998)

2.1.14.1. ALCOHOL ETÍLICO O ETANOL

Los alcoholes en general, son compuestos que tienen uno, dos o tres grupos hidróxido (-OH) enlazados a sus moléculas, por lo que se clasifican en monohidroxilicos, dihidroxilicos y trihidroxilicos respectivamente. El metanol y el etanol son alcoholes se caracterizan por la gran variedad de reacciones en las que intervienen, y las más importantes es la reacción con los ácidos, en la que se forman los esteres.

Fórmula química del etanol: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ PM 46.07. Los alcoholes simples de bajo peso molecular como el etanol son incoloros, volátiles, líquidos, inflamables

y solubles en agua. Cuando el peso molecular crece, el punto de ebullición, el punto de fusión y la viscosidad crecen y la solubilidad en agua decrece. Estas propiedades físicas pueden ser alteradas por la presencia de otro grupo funcional (es un átomo o grupo de átomos unidos entre sí y al resto de las moléculas de una determinada manera estructural). (MORRISON, 1992)

2.1.14.1.1. Propiedades físico químicas del etanol

Es un líquido volátil, inflamable, incoloro, móvil, posee un olor característico, produce una sensación de quemadura en la lengua, y es el alcohol de menor toxicidad. Usos generales del etanol:

- Es usado en bebidas alcohólicas.
- Se utiliza Como desinfectante.
- Solvente en numerosas sustancias
- Actualmente su uso como combustible por su alto octanaje.
- Pruebas generales de alcoholes
- Prueba de Lucas ($ZnCl_2/HCl$)

Se basa en la diferencia de reactividad que presentan los alcoholes con los halogenuros de hidrogeno, para formar el halogenuro de alquilo correspondiente. La reacción es catalizada con cloruro de zinc anhidro.

Los alcoholes terciarios reaccionan tan rápido que se puede observar la separación de una capa de cloruro de alquilo terciario insoluble. Con los alcoholes secundarios la solución es turbia a los 5 minutos, con la formación de cloruro de alquilo secundario. Con los alcoholes primarios saturados, la solución permanece clara y, en algunos casos, se presentan con alguna turbidez, debido a la extrema lentitud de la formación de halogenuro de alquilo primario. (PEÑA, 2004)

2.1.14.1.2. Porcentaje de rendimiento

Rendimiento: Es la relación entre el alcohol producido y el azúcar puesto a disposición de la levadura. Teóricamente por 100 Kg de muestra fermentada se obtienen 33 litros de alcohol.

2.1.15. MULTILOG PRO

2.1.16. RECOLECTOR DE DATOS

Una poderosa herramienta para la investigación científica con presentación gráfica, capacidades de audio y video, el MultiLog PRO brinda nuevas posibilidades para la experimentación y recolección de datos.

El **MultiLog PRO** es la herramienta perfecta para "hacer" investigación científica y experimentación. Ayuda a estudiantes e investigadores a realizar casi cualquier tipo de medición usando una variedad de más de 65 sensores. Este recolector portátil puede usarse tanto en el laboratorio como en exteriores. El poder de tomar miles de muestras por segundo ahorra el tiempo requerido en recolectar mediciones del experimento y libera al investigador para trabajar con el análisis de datos. El análisis de las mediciones se realiza utilizando el software MultiLab, ofreciendo un módulo de video único y más de 30 funciones matemáticas y herramientas de análisis gráfico.

En el laboratorio el **MultiLog PRO** puede conectarse directamente al puerto serial del PC, trabajando como una interface rápida en-línea. El **MultiLog PRO** con su gran memoria es también la mejor elección para actividades de campo en Biología y Ciencias Ambientales. Los estudiantes pueden realizar y almacenar

hasta 100 experimentos distintos antes de tener que descargarlos al PC.

(ALLISON, 2010)



Figura 4: Recolector de datos Multilog Pro

2.1.17. ESPECIFICACIÓN DE SENSORES

• SENSOR DE CO₂

Como CO₂ absorbe luz infrarroja, el sensor CO₂ consiste de un tubo conteniendo una fuente infrarroja en un extremo y un detector infrarrojo en el otro. El detector infrarrojo detecta la luz infrarroja que no fue absorbida por CO₂ entre la fuente y el detector. Gamas de gas del CO₂. Dióxido de carbono IR-CO₂-A1 350 a 5.000 ppm.



Figura 5: Sensor de CO₂

• SENSOR DE pH

El DT016 es un sensor mide el rango de 0 a 14 pH. Consiste de un adaptador oval y un electrodo. El sensor está equipado con un sistema de compensación de temperatura debe estar conectado al Recolector de datos en adición al sensor de pH.



Figura 6: Sensor de pH

2.2. MARCO CONCEPTUAL

Cinética Química.- Trata del estudio de la velocidad de la reacción química y de los distintos factores que incluyen en ella.

Sistema Adaptativo.- Sistema de control de procesos nos indica sus características (parámetros o ley de control) de una forma automática para adaptarse a una situación cambiante en el proceso.

Modelización.- Definición de un conjunto de ecuaciones matemática que permiten describir el comportamiento de un proceso, basadas en unas formulaciones clara a partir de un concepto básico.

Simulación.- Resolución del modelo matemático para obtener predicciones de las variables más importantes de los procesos sea posible comparación con datos experimentales.

Software Multilab.- Programa integral que le provee al usuario con todos los elementos necesarios a efectos de recolectar los datos del MultiLog Pro, presentarlos en forma de gráficos, barras y tablas, analizarlos con sofisticadas herramientas de análisis y ver películas de vídeo grabadas o en línea del experimento que se lleva a cabo.

Recolector de Datos.- Dispositivo que traduce datos a partir de sensores conectados y los convierte en lecturas. Los datos son almacenados, y pueden transferirse al computador a diferencia de interfaces tipo cajas, los recolectores de datos pueden funcionar independientemente del computador.

Sensor.- Dispositivo que mide una cantidad física como ser temperatura, nivel de luz, presión, CO₂, etc.

Levaduras.- Son organismos unicelulares rodeados de pared celular núcleo distinto, se reproducen por gemación o por esporas.

Medios de cultivos.- Desde el punto de vista de la fermentación, requieren encontrarse en un medio adecuado, tanto la Temperatura y pH.

Sustrato.- Es una molécula sobre la que activa una enzima.

Fermentación.- Se define como el cambio químico que ocurre en las sustancias orgánicas producidas por la acción de las sustancias químicas.

Productividad.- Cantidad de producto o biomasa que se obtiene por unidad de volumen de reactor y tiempo. Si se expresa por unidad de biomasa se conoce como productividad específica.

Diseño Experimental.- Basadas en la estadística son particularmente útiles en el mundo de la ingeniería en lo que toca a la mejora del rendimiento de los procesos de manufactura que se investigan todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores.

ATP: compuesto con fosfato de alta energía en los organismos vivos Adenosin Trifosfato.

Coenzima: una pequeña molécula no proteica que participa en una reacción catalítica como parte de una enzima.

Crecimiento exponencial: crecimiento de un microorganismo cuyo número de células se duplica en un periodo constante de tiempo.

Dioxigenasa: enzima que cataliza la incorporación de 2 átomos de O₂ en un sustrato.

Efectores: causantes de los efectos en medios de fermentación.

Enlace glicosídico: tipo de enlace covalente que une monosacáridos para formar polisacáridos.

Enzimas: proteínas catalíticas que funcionan acelerando la reacción química.

Fase estacionaria: periodo que sigue a la fase exponencial donde la velocidad de crecimiento de la población es cero.

Fase lag: periodo anterior a la fase exponencial cuando las células pueden tener metabolismo activo pero aun no crecen.

Fosforilación: formación de ATP por transferencia directa de una molécula de fosfato.

Gemación: forma de reproducción asexual típica en sentido amplio de las levaduras.

Genotipo: constitución genética precisa de un organismo.

Glucolisis: una ruta bioquímica en el cual se fermenta la glucosa para producir (ATP), y varios productos de fermentación.

Hidrogenasa: enzima capaz de añadir o quitar H_2 ampliamente distribuida entre microorganismos anaeróbicos.

Inhibición: reducción del crecimiento microbiano por causas de alteraciones en el ambiente microbiano.

Medios de cultivo: desde el punto de vista de fermentación, requiere encontrarse en un medio adecuado, tanto de temperatura y pH como de sustancias alimenticias que se puedan asimilar.

Metabolismo: conjunto de reacciones bioquímicas de una célula.

Metabolito primario: un metabolito que se excreta en la fase logarítmica de crecimiento microbiano.

Metabolito secundario: un metabolito que se excreta al final de la fase logarítmica y fase estacionaria de crecimiento.

pH: valor negativo del logaritmo de la concentración de iones Hidrogeno (H^+), en una solución.

Piruvato: producto de la glucolisis de fermentación que finalmente por acción de las levaduras se convierten en etanol y CO_2 .

Polisacárido: un polímero de monosacáridos unidos entre sí por enlace glicosídico.

Saccharomyces cerevisiae: tipo de levadura unicelular produce la fermentación, aproximadamente el 95% de la fermentación de etanol se lleva a cabo mediante esta levadura.

2.4. HIPÓTESIS

2.4.1. HIPÓTESIS GENERAL

Conociendo la cinética de obtención de alcohol de la planta Macha Macha (*peruvianum jancs*) por el método de fermentación y evaluar el grado de alcohol extraído.

2.4.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- Alcohol a partir de la planta Macha Macha (*peruvianum jancs*) se determinan sus parámetros de extracción
- De acuerdo al alcohol obtenido de Macha Macha (*peruvianum jancs*), se conoce su cinética de extracción.
- Obteniendo el alcohol de la Macha Macha (*peruvianum jancs*), se determina su modelo matemático de fermentación.

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

3.1. METODOLOGÍA

3.1.1. ÁMBITO DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación se realizó en el ámbito geográfico del Departamento de Puno – Perú, las pruebas experimentales se desarrollaran en laboratorios de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, bajo las condiciones ambientales a una presión atmosférica de 486 mmHg, a una altitud de 3828 m.s.n.m y a una temperatura variable entre 10 a 12 °C.

3.1.2. LUGAR DE EJECUCIÓN

El trabajo de investigación experimental se realizó en los ambientes de Universidad Nacional del Altiplano UNA- Puno.

➤ Laboratorio de operaciones unitarias y procesos de la Facultad de Ingeniería Química. FIQ- UNA- PUNO.

3.1.3. MATERIALES Y EQUIPOS

3.1.3.1. MATERIA PRIMA

La Macha Macha.- Es una planta que crece en las alturas en zonas más altas de los cerros, en zonas rocosas y arcillosas, y la cual se ha recolectado del cerro Sohojori Distrito de Conima de la Provincia de Moho y Departamento de Puno.

3.1.3.2. REACTIVOS

- Solución buffer 0 - 14

3.1.3.3. MATERIALES DE VIDRIO

- Vaso de precipitados de 100ml.
- Probeta de 100ml.
- Picetas
- Matraz Erlenmeyer de 1000ml y 250 ml

3.1.3.4. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

Equipos de control, para múltiples aplicaciones, modelo MULTILOG PRO, marca ITP (Israel), recolector de datos, con conexión de USB (con sensor CO₂ y pH, interfase para computadora y software para la recuperación de datos almacenados en el recolector de datos).

- a) Reactor para la fermentación (vidrio)
- b) Potenciómetro.
- c) Balanza analítica digital.
- d) Refractómetro
- e) Sistema baño María
- f) Refractómetro.- de tipo PCE2863
- g) Destilador

- Condensador
 - Balón con 3 entradas
 - Cocinilla eléctrica
 - Malla de asbesto
 - mangeritas
- h) Balanza analítica
- i) Balanza de triple barra
- j) Termómetro de alcohol 100°C
- k) pH-metro

3.1.4. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Existen diversas formas y maneras de fermentación, se eligió el método seleccionado; realizando pruebas de lectura de diferentes parámetros (como la cantidad de levadura, la cantidad de CO₂ producido) de alcohol, presión, temperatura y pH, el que conectado al computador provee datos numéricos del comportamiento cinético que son presentados de forma gráfica en el Software Multilab+, permitiendo determinar la cinética de fermentación de la Macha Macha (*peruvianum jancs*).

3.1.5. PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE PRODUCTOS

La tecnología que se plantea en el presente proyecto es la utilización del equipo MULTILOG – PRO, entre otros materiales de laboratorio.

a) MATERIA PRIMA

La materia prima a utilizar es la Macha Macha (*peruvianum jancs*) variedad se da proveniente del Distrito de Conima, conteniendo un porcentaje de humedad de 71.03% aproximadamente madurez organoléptica, será recepcionada, almacenada y favorece al proceso cuanto más madura esté el fruto.

b) SELECCIÓN

Antes del lavado de la Macha Macha (*peruvianum jancs*) con una adecuada madurez organoléptica sin magulladuras, son seleccionados mediante inspección visual, eliminando aquellos frutos que presentan un alto grado de deterioro.

c) LAVADO

El lavado se realizó con agua potable para eliminar las impurezas que están adheridas al fruto, para garantizar una limpieza adecuada de la pulpa en el momento de licuado, para esta operación se utilizó un recipiente.

d) PESADA

Esta actividad es para registrar el peso neto de la materia prima que ingresa, utilizando una balanza analítica, reuniendo los requisitos de calidad para este proceso de fermentación.

e) PULPEADO

Se realizó con ayuda de recipientes cilíndricos (licuadora), donde se hace la recepción de la pulpa de la Macha Macha (*peruvianum jancs*), en este estado la emulsión tendrá un alto porcentaje de agua, carbohidratos, minerales y otros constituyentes que serán protagonistas en el proceso de fermentación.

f) DISOLUCIÓN DEL MOSTO

Una vez obtenida la pulpa de la Macha Macha (*peruvianum jancs*), por estar muy densa, se realiza una disolución respectiva con agua hervida a 30°C, la proporción será de 600 ml de agua por un 200g de la pulpa de la Macha Macha (*peruvianum jancs*). Por tanto, la relación en la dilución es (3:1).

g) MOSTO ACONDICIONADO Y FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Para la fermentación alcohólica se usa levadura seca liofilizada, que primero se activa, con el siguiente procedimiento:

Se reconstituye la levadura *Sacharomyces Cerevisae* variedad *Ellisoideus* con la adición de agua hervida tibia a 30 °C en un recipiente pequeño en el cual se añade 50 ml de mosto y levadura al 0.3% , luego es cubierto y dejado en reposo en un lugar a una temperatura de 30°C por espacio de 5-10 minutos, con un pH óptimo de 3.8. La activación se nota por la formación de burbujas en la superficie.

Una vez activada la levadura se inocula al fermentador que contiene el mosto corregido. Para iniciar la fermentación alcohólica es necesario realizar una agitación para homogenizar, finalmente se deja en reposo.

- **Control de la temperatura:**

La reacción es altamente exotérmica por lo que es muy importante el control de este parámetro, ya que la levadura trabaja en un rango de 30 - 40°C.

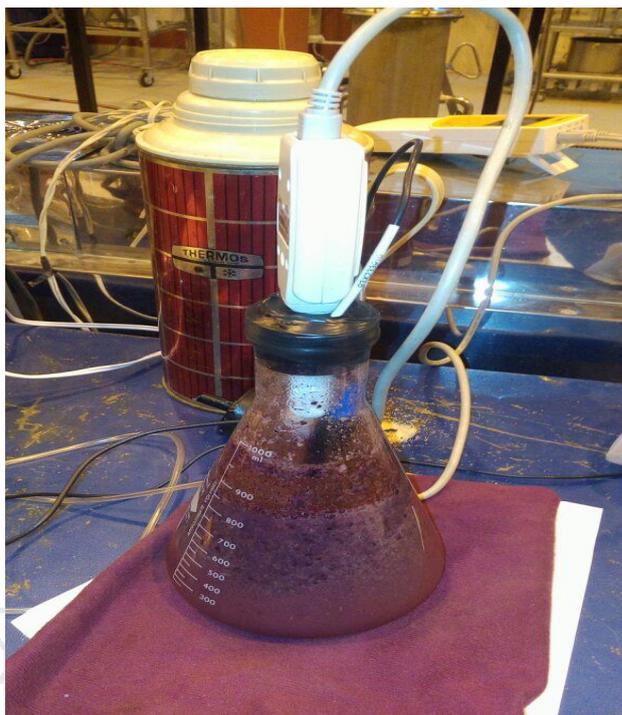


Figura 7: fermentación, controlando parámetros

Fuente: *Elaboración Propia*

h) DESCUBE

Trascurrido el tiempo óptimo de 72 horas aproximadamente de la fermentación alcohólica, se procede a separar los residuos de la levadura, los sólidos de la fruta precipitada que queda al fondo; el descube, se realizó por la parte superior del reactor, el cual será recibido en un recipiente.

i) FILTRACIÓN - TRASIEGO

Una vez que el mosto alcohólico termina su proceso de fermentación, el mosto fermentado pasa a ser filtrado mediante un trasiego por medio de un colador, una vez filtrado pasa ser medido el grado alcohólico de la muestra obtenida.

j) Destilación simple.

- Engrasar las partes esmeriladas del soporte universal.
- Colocar 250mL del fermento obtenido en el balón con tres salidas del equipo de destilación simple que esté montado como muestra la figura N° 3.1.



Figura 8: Equipo utilizado para la destilación simple.

Fuente: *Elaboración Propia*

- El calentamiento de la muestra, se deberá hacer de forma cuidadosa y controlada, controlando la temperatura.
- Balón de fondo redondo, que deberá contener pequeños trozos de material poroso (cerámica, o material similar) para evitar sobresaltos repentinos por sobrecalentamientos.
- Termómetro: El bulbo del termómetro siempre se ubica a la misma altura que la salida a la entrada del refrigerador. Para saber si la temperatura es la real, el bulbo deberá tener al menos una gota de líquido. Puede ser necesario un tapón de goma para sostener al termómetro y evitar que se escapen los gases (muy importante cuando se trabaja con líquidos inflamables).

- Tubo refrigerante. Aparato de vidrio, que se usa para condensar los vapores que se desprenden del balón de destilación, por medio de un líquido refrigerante que circula por éste.
- Entrada de agua: El líquido siempre debe entrar por la parte inferior, para que el tubo permanezca lleno con agua.
- Salida de agua: Casi siempre puede conectarse la salida de uno a la entrada de otro, porque no se calienta mucho el líquido.
- Se recoge en un balón, vaso de precipitados, u otro recipiente.
- Fuente de vacío: No es necesario para una destilación a presión atmosférica.
- Adaptador de vacío: No es necesario para una destilación a presión atmosférica.



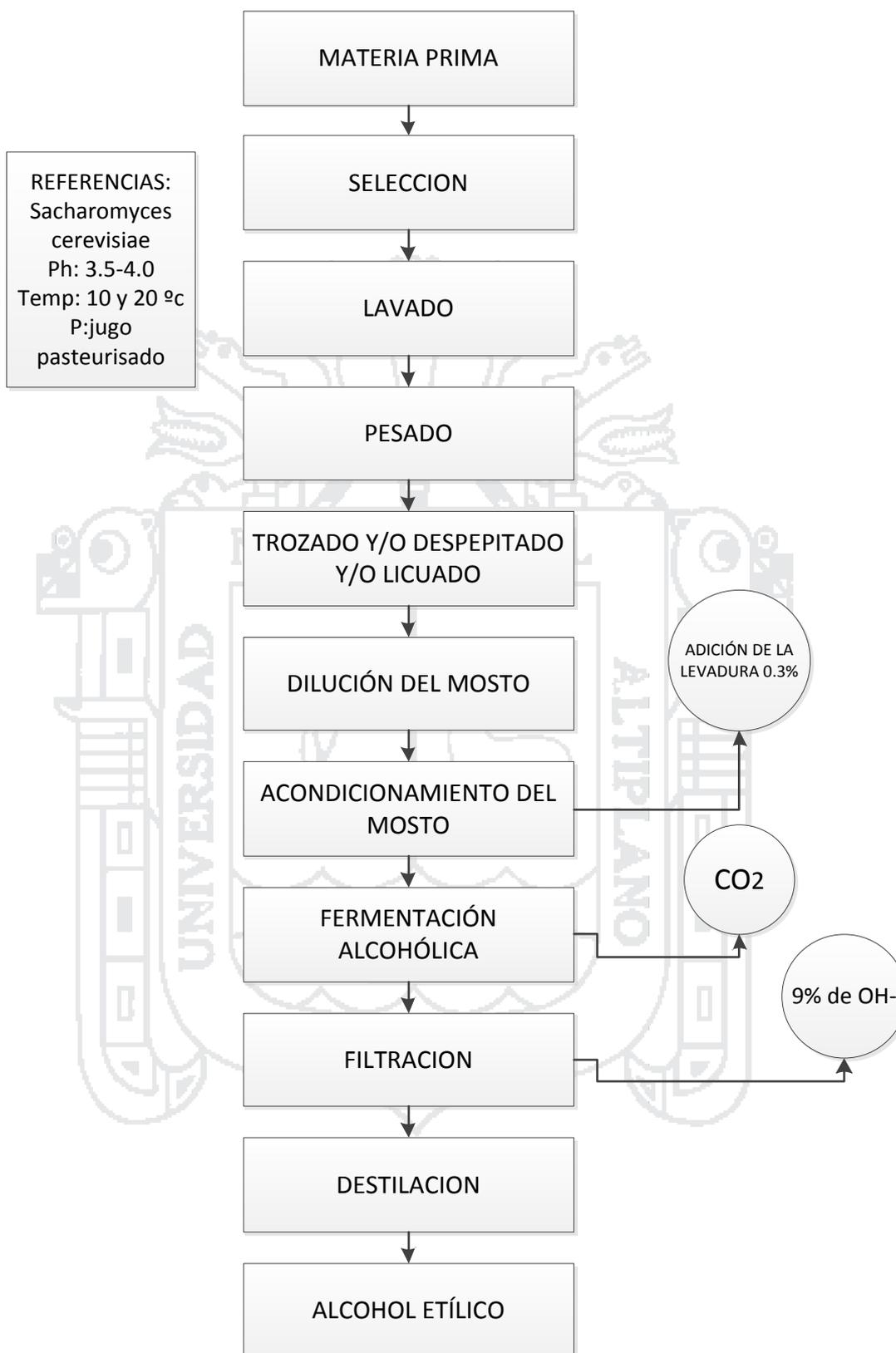


Figura 9: Diagrama de flujo general para la obtención del alcohol (vino)

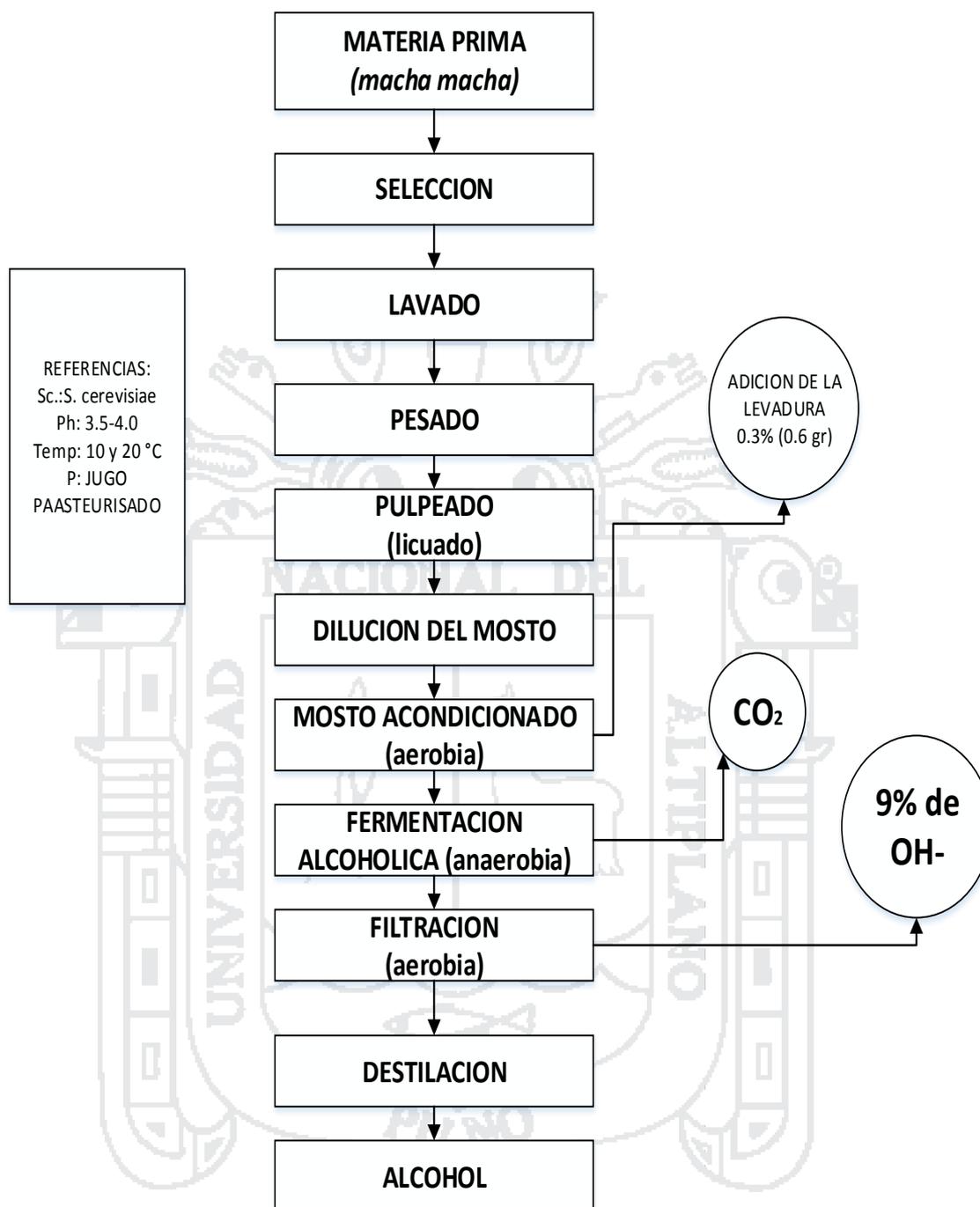


Figura 10: Diagrama de flujo para la obtención del alcohol de planta macha macha (*peruvianum jancs*)

NOTA: En este diagrama de flujo de fermentación es fermentación aeróbica debido a que se realiza en un reactor cerrado temperatura con una salida de CO₂, con el equipo de Multilog- pro para controlar la producción de CO₂, pH. Al final del proceso no se realiza una fermentación expuesta al ambiente debido a que el mosto tiende a oxidarse y aumentar el pH.

3.1.6. PARÁMETROS EVALUADOS

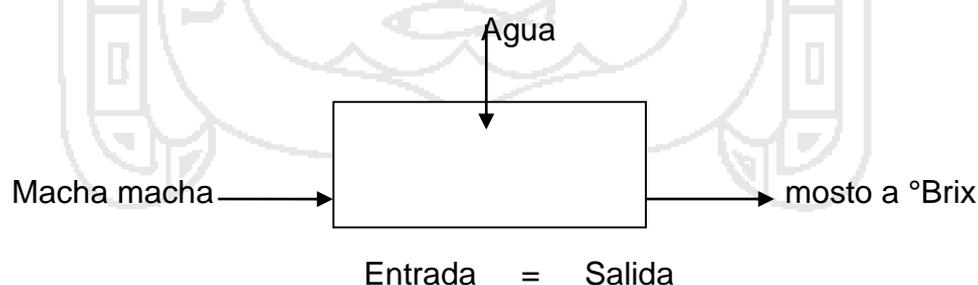
En el proceso de fermentación se han evaluado varios parámetros que sirvieron como punto de referencia para realizar la fermentación a mayor escala. En primer lugar se determinó los parámetros fisicoquímicos en el proceso de fermentación como son pH, concentración ($^{\circ}$ Brix), temperatura y tiempo.

Para la evaluación de estos parámetros cinéticos con el modelo matemático de Michaelis y Menten se adecuó la cinética de fermentación de Macha Macha para encontrar la constante de cinética.

A partir del experimento por lote.

3.1.6.1. BALANCE DE MATERIA

Balance de materia en estado estacionario.- es aquel en el que no hay transferencia de materia a través de la frontera del sistema. El balance de materia se basa en la ley de conservación de la materia, la cual, rigurosamente hablando, hay que aplicarla al conjunto materia, y no a la materia por separado.



3.1.7. CINÉTICA DE EXTRACCIÓN

Para explicar la relación se demuestra a partir de la ecuación de Michaelis y Menten observada entre la velocidad (V_0) y la concentración inicial de sustrato ($[S_0]$) propusieron que las reacciones catalizadoras enzimáticamente ocurren en dos etapas.

La primera etapa se forma el complejo enzimas sustrato y en la segunda, el complejo enzima-sustrato da lugar a la formación del producto, liberando la enzima libre.



Siguiendo la aproximación del estado estacionario que señala que la concentración del complejo enzimático-sustrato (ES) es pequeña y se mantiene casi constante a lo largo de la reacción enzimática.

$$\frac{d[ES]}{dt} = K_1 [E][S] - K_{-1} [ES] - K_2 [ES] = 0$$

$$[ES] = \frac{K_1 [E][S]}{K_{-1} - K_2} \quad \text{se define}$$

$$K_m = \frac{K_{-1} - K_2}{K_1}$$

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_s} \quad \dots \quad (I)$$

La velocidad de reacción es:

$$\frac{d[P]}{dt} = K_2 [ES]. \quad (II)$$

La concentración total de la enzima:

$$[E_o] = [E] + [ES]$$

$$[E] = [E_o] - [ES] \quad \dots \quad (III)$$

$$[ES] = \frac{([E_o] - [ES])[S]}{K_m} \quad (III) \text{ en } (I)$$

Reordenando tenemos:

$$K_s [ES] + [S][ES] = [E_o][S]$$

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_s + [S]} \dots \quad (IV)$$

Sustituyendo (IV) en (II)

$$\frac{d[P]}{dt} = K_2[E_0] \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

$$\mu = \mu_{max} \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

- E_0 es el total de enzima "cantidad total o inicial de enzima".
- $\frac{d[P]}{dt}$ o μ_0 es la velocidad de producción del producto.
- $K_2[E_0]$. O μ_{max} es la velocidad máxima.
- k_s constante de saturación g/L
- s concentración de sustrato limitante g/L

$$\frac{d[P]}{dt} = \mu_{max} \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

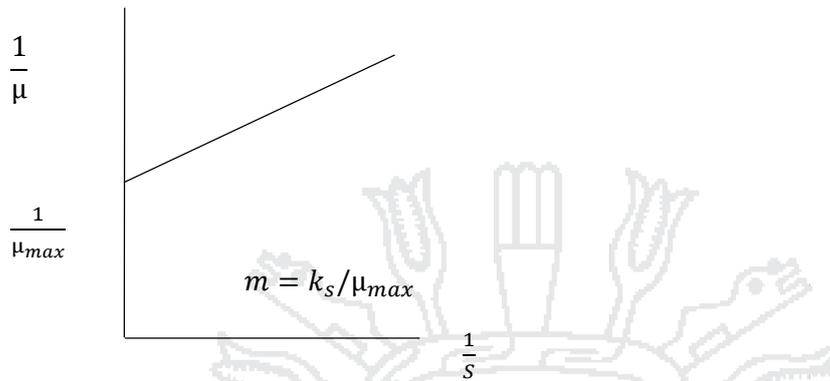
$$\mu = \frac{\mu_{max}[S]}{K_s + [S]}$$

LINEALIZACION DEL MODELO DE MICHAELIS Y MENTEN

La ecuación de Michaelis y Menten se puede linealizar tomando los recíprocos correspondientes. La ecuación resultante de la linealización es la siguiente:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{max}} + \frac{K_s}{\mu_{max}} \left(\frac{1}{S} \right)$$

Una gráfica de $1/\mu$ vs $1/S$ produce una línea recta con pendiente K_s/μ_{max} .



$$\mu = \frac{1}{S} \frac{dS}{dt}$$

$$\mu = \frac{1}{S} * \left(\frac{S - S_0}{t - t_0} \right)$$

3.1.8. MODELO MATEMÁTICO PARA LA INVESTIGACIÓN

3.1.8.1. Identificación de variables del proceso para el diseño experimental

Existen tres tipos de variables de los que depende el control de un sistema.

Las variables de entrada y salida en el proceso de degradación de materia orgánica se muestran en la ecuación siguiente:

La Ecuación es:

$$Y_1 = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2..... (a)$$

3.1.8.2. Diseño Factorial de Experimentos

Es una técnica estadística que permite planificar eficientemente la experimentación de modo que con un número mínimo de ensayos se logra determinar la significancia de cada una de las variables independientes a ser

evaluadas, el efecto de sus interacciones y se obtiene un modelo matemático empírico, que constituye la base para un proceso posterior de optimización.

El desarrollo de la presente investigación se basa en el diseño factorial de Kafarov, técnica de análisis estadístico que nos permitirá planificar y estimar adecuadamente los factores investigados.

Para nuestro caso los factores serán optimizados en experimentos factoriales generales, tomándose en cuenta tres factores con dos niveles.

$$N = 2^k$$

Donde:

N = Número total de experimentos

k = Número de variables

Por ejemplo: para nuestro caso, como hemos mencionado, se realiza un experimento que depende de tres factores y se plantea dos niveles, por lo que se requerirán:

Número de experimentos = $N^k = 2^2 = 4$ experimentos

Cuya resolución será la siguiente:

Tabla 5: medidas y tiempos utilizados en el experimento de la tabla

| Variables | Nivel -1 | Nivel +1 | y |
|-------------------------------------|----------|----------|---|
| X ₁ : sustrastro (°brix) | | | |
| X ₂ : Tiempo | | | |
| Y: °GL | | | |

Fuente: elaboración Propia

1. Transformación de variables

a) Cálculo del promedio:

$$P = \frac{Z_{j \max} + Z_{j \min}}{2}$$

Dónde:

P = Promedio

Z_{jmax} = Nivel máximo de las variables X_i

Z_{jmin} = Nivel mínimo de las variables X_i

b) Cálculo de la diferencia

$$D = \frac{Z_{j \max} - Z_{j \min}}{2}$$

Dónde:

D = Diferencia

c) Cambio de variables

2. Número y configuración de experimentos

3. Cálculo de la varianza

a) Cálculo del promedio

$$\bar{Y} = \frac{\sum Y_i}{3}$$

Dónde:

Y_i = Puntos centrales

b) Cálculo de desviaciones cuadráticas

$$SDC = (Y - Y_1)^2 + (...)$$

Dónde:

SDC = Desviaciones cuadráticas

c) Cálculo de varianza

$$S_e^2 = \frac{SDC}{(C - 1)}$$

Dónde:

C= Grados de libertad

d) Cálculo de desviación estándar

$$S_x = \sqrt{\frac{S_e^2}{N - k}}$$

Dónde:

S_e^2 = Varianza

k = Número de coeficientes de la ecuación de regresión

N = Número total de datos experimentales

4. Formulación de la tabla factorial para análisis de datos

Para el diseño factorial de dos niveles y dos factores se realizan cuatro pruebas.

Si se agrega una variable ficticia X_0 en la que todos sus elementos son +1, resulta la siguiente tabla:

Tabla 6: Análisis del Diseño Factorial 2^2

| Nº DE EXPERIMENTOS | X ₁ | X ₂ | RESPUESTA |
|--------------------|----------------|----------------|----------------|
| 1 | -1 | -1 | Y ₁ |
| 2 | +1 | -1 | Y ₂ |
| 3 | -1 | +1 | Y ₃ |
| 4 | +1 | +1 | Y ₄ |
| 5* | | | |
| 6* | | | |
| 7* | | | |

Y: las variables respuestas.

(*) Puntos centrales

FUENTE: ELABORACION PROPIA

5. Ecuación de regresión

Llegaremos al siguiente modelo de ecuación:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_1X_2 + b_5X_1X_3 + b_6X_2X_3 + b_7X_1X_2X_3$$

Dónde:

Y = Variable respuesta

X₁ = temperatura

X₂ = Tiempo

b_i = Constantes del modelo matemático (se calculará)

6. Cálculo del efecto de la curvatura

a) Promedio de los experimentos factoriales

$$\bar{Y} = \frac{\sum Y}{N}$$

b) Promedio de los puntos centrales

$$\bar{Y}_c = \frac{\sum Y}{3}$$

c) Efecto de la curvatura

$$EC = \frac{\bar{Y}_c - \bar{Y}}{3}$$

7. Bondad de ajuste

a) Cálculo de desviaciones cuadráticas entre valor experimental y valor predicho con ecuaciones de regresión.

b) Cálculo de varianza residual

$$S_r^2 = \frac{SDC}{N - L}$$

Dónde:

N = Número de pruebas

L = Número de coeficientes significativos en la ecuación de regresión

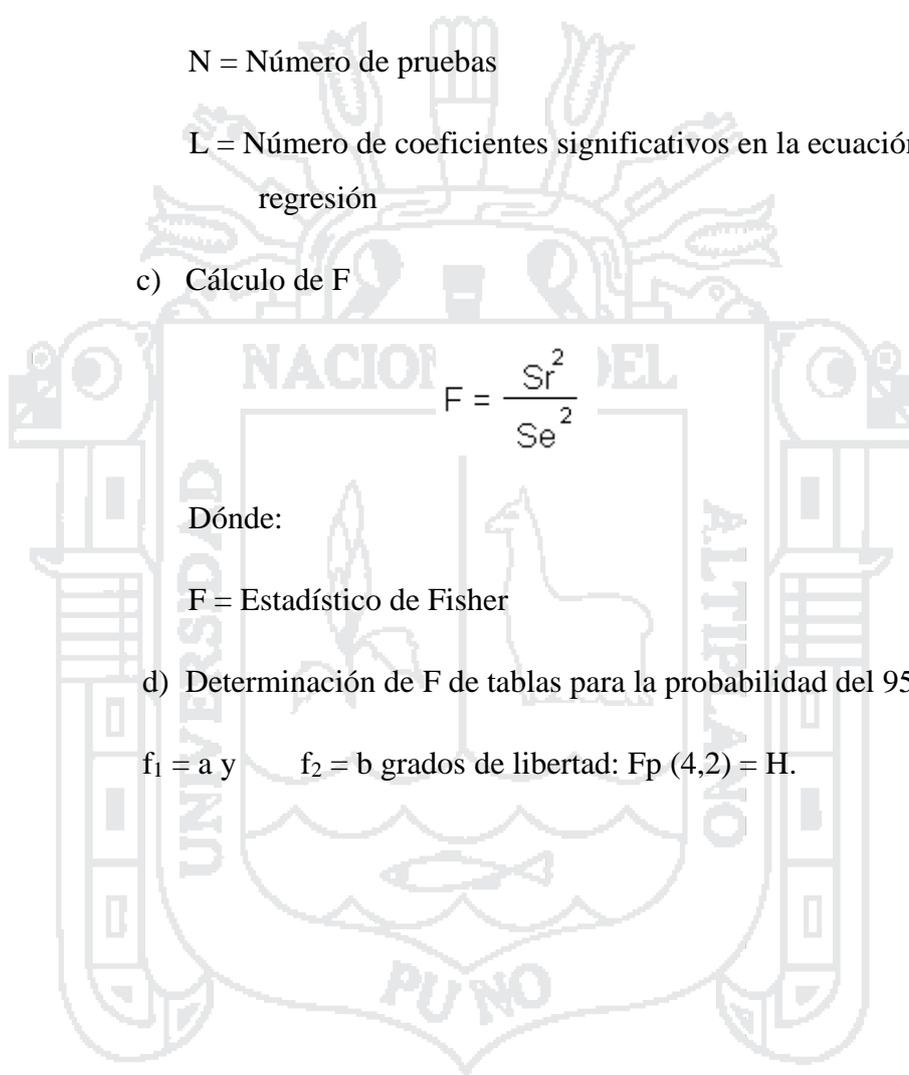
c) Cálculo de F

$$F = \frac{S_r^2}{S_e^2}$$

Dónde:

F = Estadístico de Fisher

d) Determinación de F de tablas para la probabilidad del 95 % con

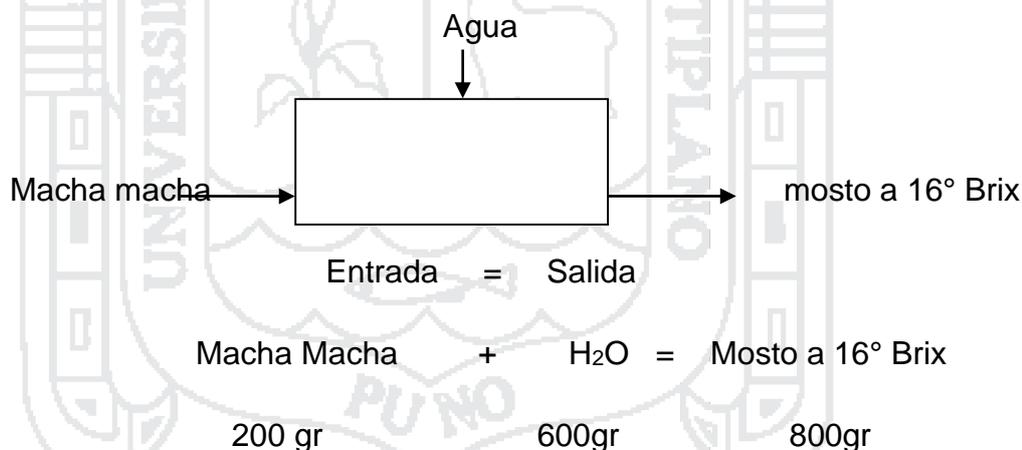
 $f_1 = a$ y $f_2 = b$ grados de libertad: $F_p(4,2) = H$.

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS

4.1. BALANCE DE MATERIA EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHOLICA DE MACHA MACHA

La cantidad de mosto que ingresa a 16°Brix se obtiene del balance en el fermentador:



La proporción de materia prima a usar para obtener 200 g de Mosto a 16° Brix es la siguiente:

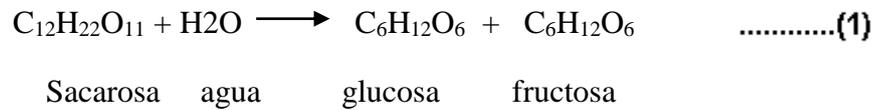
Macha Macha : 200g

Agua : 600 ml

Tomando en cuenta la densidad del agua a 15°C, se tiene un peso de 598 g de agua.

La concentración de mosto inicial es de 16° Brix:

Para obtener alcohol etílico a partir del mosto a 16°Brix, se debe llevar a cabo las siguientes reacciones.



La sacarosa se hidroliza con el enzima invertasa que se encuentra en la levadura para formar D-glucosa y D-fructosa en cantidades iguales para luego ser fermentados (Fiezer, 1985).



Según la reacción 1 mol de glucosa produce 2 moles de alcohol y 2 moles de CO₂.

Para hallar el rendimiento de la fermentación frente a valores teóricos partimos de la ecuación, pesos moleculares y gramos de glucosa en un mosto a 16° Brix



PM (C₆H₁₂O₆) = 180 g/mol

PM (C₂H₅OH) = 46 g/mol

PLANTEAMIENTO

Según la reacción

$$180 \text{ g/mol de mosto} \longrightarrow 2 \cdot 46 \text{ g/mol de alcohol}$$

$$200 \text{ g de mosto} \longrightarrow X \text{ de alcohol}$$

$$X = 102.2 \text{ g de alcohol a 100\%}$$

Para hallar el porcentaje en mililitros y posterior rendimiento usamos la tabla de densidades a 20°C

Densidad del alcohol al 100 % de pureza = 0.78934 g/ml

$$102.2 \text{ g de alcohol} * \frac{1 \text{ ml}}{0.7893 \text{ g}} = 129.5 \text{ ml de alcohol al 100\%}$$

Valor teórico obtenido de 200g de sustrato a 16° Brix

$$= 129.5 \text{ ml de alcohol al 100\%}$$

Pasamos a encontrar el rendimiento con valores obtenidos en la experimentación.

4.2. EVALUACIÓN DEL PROCESO FERMENTATIVO RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA EXPERIMENTACIÓN

Recolección de datos experimentales a una temperatura de 30°C y concentración inicial de 16°brix.

Tabla 7: Datos experimentales sobre consumo de sustrato PRUEBA N° 01

| REPORTE DE DATOS | | | |
|-------------------------|---|--------------------|-------------------------|
| Prueba Nro. 1 | Relación R₁ (200g de Macha Macha) | | Temperatura 30°C |
| Tiempo (h) | Índice de refracción | Grados Brix | pH |
| 0 | 1.3573 | 16.00 | 4.1 |
| 4 | 1.3561 | 12.3 | 4 |
| 17 | 1.3528 | 10.2 | 4 |
| 44 | 1.3467 | 8.3 | 4 |
| 53 | 1.3457 | 6.6 | 4 |
| 70 | 1.3411 | 4.6 | 3.9 |
| 72 | 1.3411 | 4.6 | 3.9 |

Tiempo de fermentación: 72 horas

Grados de alcohol: 120 ml con 50°GL.

Fuente: Elaboración Propia

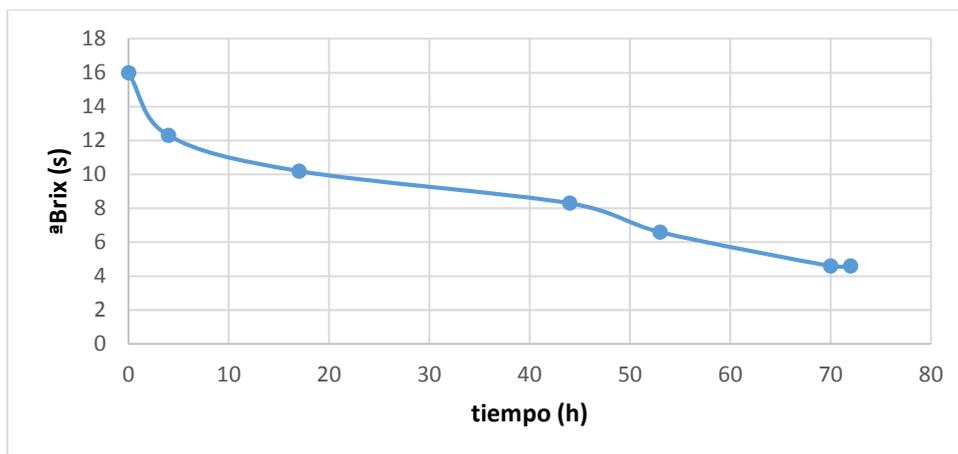


Figura 11: TIEMPO VS °BRIX

Fuente: Elaboración Propia

Interpretación de la fig.4. 1:

En el fig. N° 4.1 se observa que durante el periodo de la fermentación de la muestra N° 1 la disminución del contenido de azúcar representado por una concentración 16 °brix referido al azúcar disminuye hasta una concentración 4.6 °brix al cabo de 72 horas de tiempo de fermentación, lo que indica que la conversión del azúcar en alcohol llega a su punto de equilibrio, partir de este tiempo se mantiene constante los grados brix del mosto remanente I que indica que ya no hay formación de alcohol.

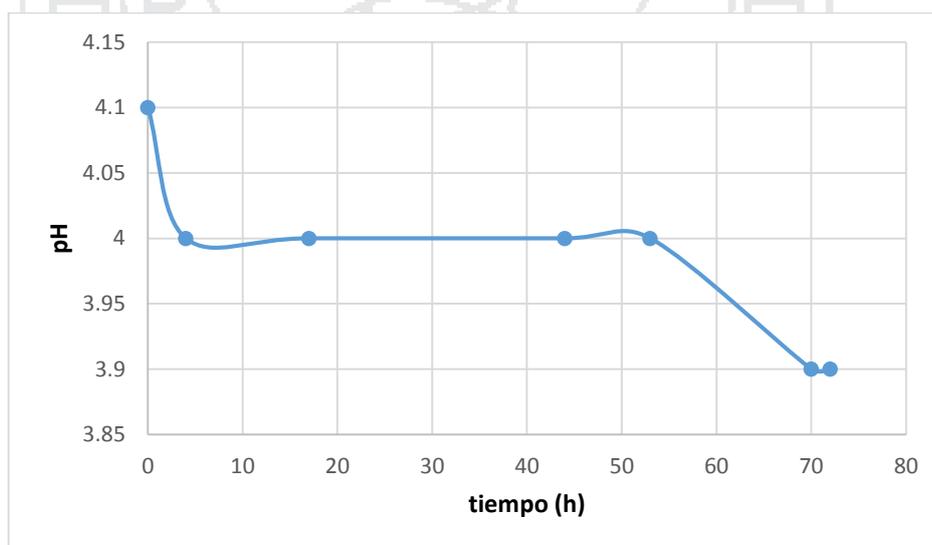


fig. 4.1: EL TIEMPO VS pH

Fuente: Elaboración Propia

Interpretación de la fig. 4.2:

En la fig. N° 4.2 se observa que durante el periodo de la fermentación de la muestra N° 2 la disminución del pH 4.1 lo que indica que el nivel de acidez aumenta a un pH de 3.9, en este punto se visualiza que se estabiliza en función al tiempo a las 66 horas se observa una disminución del pH en 3.9 estabilizándose en 94 horas, a partir de ese tiempo se mantiene constante.

Tabla 8: Resultados de corrida experimental del seguimiento de tiempo y CO₂

| tiempo (h) | CO ₂ (ppm) | tiempo (h) | CO ₂ (ppm) | tiempo (h) | CO ₂ (ppm) |
|------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------|
| 1 | 367.5 | 20 | 375.941 | 48 | 382.824 |
| 2 | 368.618 | 22 | 378.382 | 50 | 381.824 |
| 3 | 372.5 | 24 | 383.265 | 52 | 383.265 |
| 4 | 371.059 | 26 | 383.265 | 54 | 383.265 |
| 5 | 371.059 | 28 | 383.265 | 56 | 383.265 |
| 6 | 372.941 | 30 | 383.265 | 58 | 383.265 |
| 7 | 373.5 | 32 | 383.265 | 60 | 382.824 |
| 8 | 373.5 | 34 | 383.265 | 62 | 383.265 |
| 9 | 373.5 | 36 | 383.265 | 64 | 383.265 |
| 10 | 373.5 | 38 | 383.265 | 66 | 380.824 |
| 12 | 375.382 | 40 | 383.265 | 68 | 383.824 |
| 14 | 376.382 | 42 | 383.265 | 70 | 374.824 |
| 16 | 375.941 | 44 | 382.941 | 72 | 370.986 |
| 18 | 375.941 | 46 | 383.265 | | |

Fuente: Elaboración Propia (datos reportados de Multilog- pro)

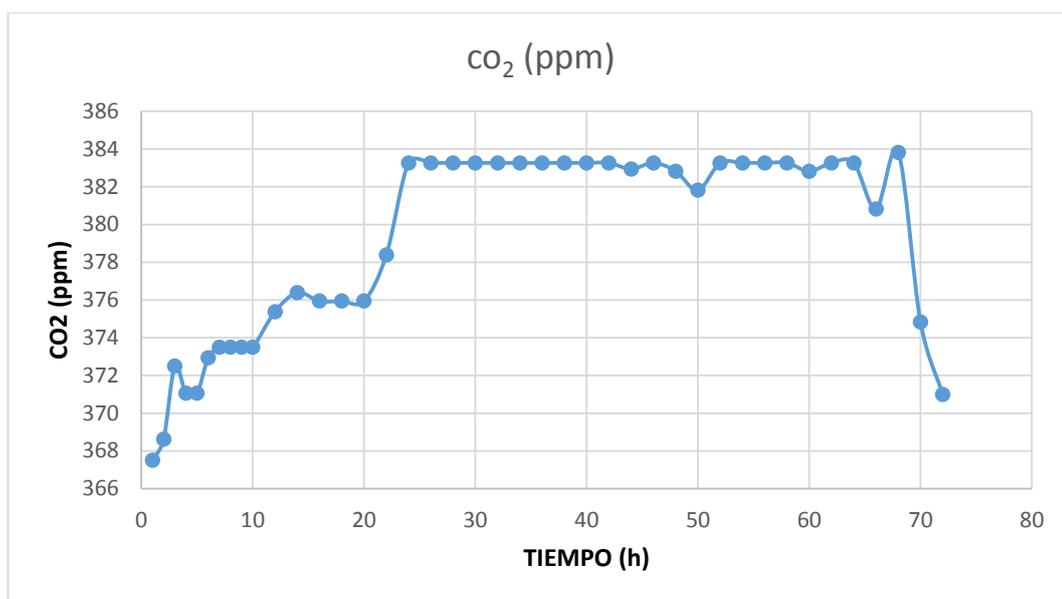


Figura 12: TIEMPO VS CO₂

Fuente: Elaboración Propia

Interpretación de la fig. 4.3:

En la fig. N° 4.3 se observa que durante el periodo de la fermentación de la muestra N° 1 un incremento de presencia de CO₂ con relación al tiempo, en 68 horas comienza a estabilizarse con una presencia de CO₂ 383 ppm. Debido a que el sustrato alcanza su mayor desarrollo poblacional en levaduras, degradando en mayor cantidad el azúcar; posteriormente disminuye hasta un valor despreciable.

Tabla 9: Datos experimentales sobre consumo de sustrato PRUEBA N° 02

| REPORTE DE DATOS | | | |
|------------------|---|-------------|------------------|
| Prueba Nro. 2 | Relación R ₂ (200g de Macha Macha) | | Temperatura 30°C |
| Tiempo (h) | Índice de refracción | Grados Brix | pH |
| 0 | 1.3573 | 16 | 4 |
| 5 | 1.3558 | 15.1 | 4.1 |
| 19 | 1.3525 | 13 | 4 |
| 44 | 1.3480 | 10.1 | 4 |
| 54 | 1.3469 | 9.4 | 4 |
| 67 | 1.3416 | 5.9 | 4 |
| 72 | 1.3404 | 4.8 | 3.9 |
| 84 | 1.3404 | 4.8 | 3.9 |
| 94 | 1.3404 | 4.8 | 3.9 |

Tiempo de fermentación: 94 horas

Grados de alcohol: 90 ml con 50°GL.

Fuente: Elaboración propia

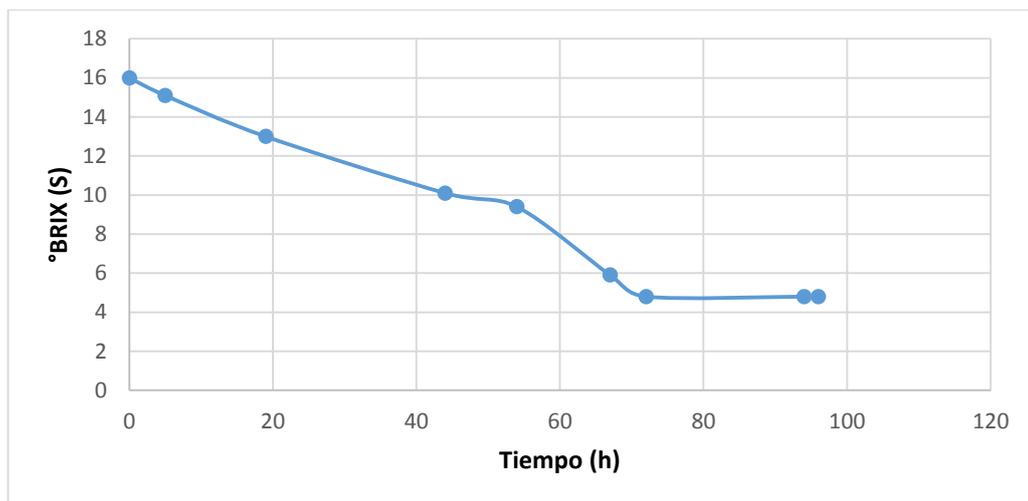


Figura 13: °BRIX vs TIEMPO

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la fig. 4.4:

En el fig. N° 4.4 se observa que durante el periodo de la fermentación de la muestra N° 2 la disminución del contenido de azúcar representado por una concentración 16 °brix referido al azúcar disminuye hasta una concentración 4.6 °brix al cabo de 72 horas se mantiene constante hasta las 94 horas del tiempo de fermentación, lo que indica que la conversión del azúcar en alcohol llega a su punto de equilibrio, partir de este tiempo se mantiene constante los grados brix del mosto remanente.

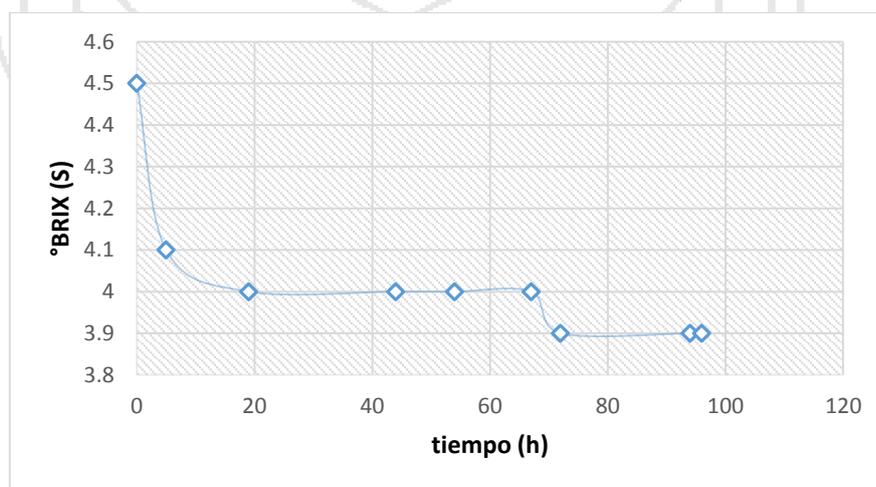


Figura 14: TIEMPO vs pH

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la fig.4.5:

En la fig. N° 4.5 se observa que durante el periodo de la fermentación de la muestra N° 2 la disminución del pH 4.5 lo que indica que el nivel de acidez aumenta a un pH de 4, en este punto se visualiza que se estabiliza en función al tiempo y a las 66 horas se observa una disminución del pH en 3.9 estabilizándose en 94 horas, a partir de ese tiempo se mantiene constante.

Tabla 10: Resultados de corrida experimental del seguimiento de tiempo y CO₂

| tiempo (h) | CO ₂ (ppm) | tiempo (h) | CO ₂ (ppm) | tiempo (h) | CO ₂ (ppm) |
|------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------|
| 1 | 367.5 | 22 | 375.941 | 61 | 382.941 |
| 2 | 368.618 | 25 | 375.941 | 64 | 383.265 |
| 3 | 372.5 | 28 | 378.382 | 67 | 382.824 |
| 4 | 371.059 | 31 | 383.265 | 70 | 381.824 |
| 5 | 371.059 | 34 | 383.265 | 73 | 380.265 |
| 6 | 372.941 | 37 | 383.265 | 76 | 379.265 |
| 7 | 373.5 | 40 | 383.275 | 79 | 378.365 |
| 8 | 372.5 | 43 | 383.265 | 82 | 377.265 |
| 9 | 373.5 | 46 | 383.365 | 85 | 376.824 |
| 10 | 373.5 | 49 | 383.265 | 88 | 375.965 |
| 13 | 375.382 | 52 | 383.265 | 91 | 375.265 |
| 16 | 376.382 | 55 | 383.465 | 94 | 374.775 |
| 19 | 375.941 | 58 | 383.365 | | |

Fuente: Elaboración Propia (datos reportados de Multilog- pro)

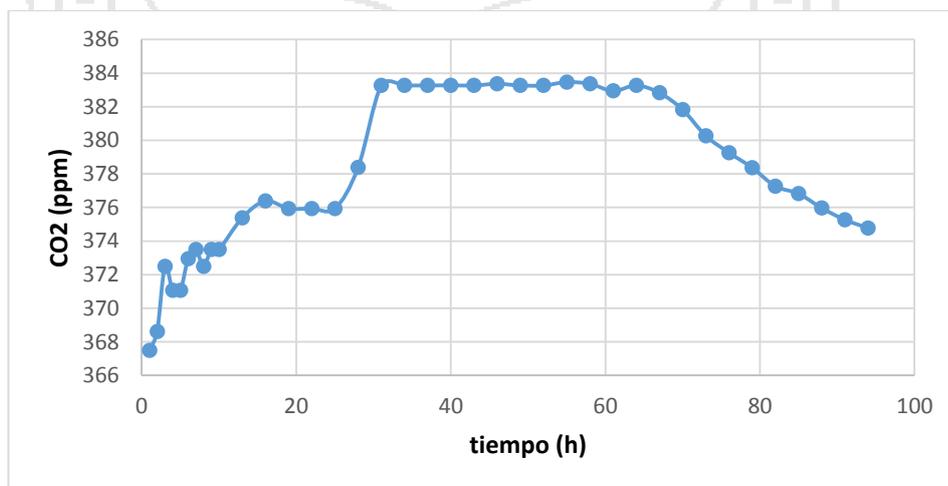


Figura 15: TIEMPO VS CO₂

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la fig.:

En la fig. N° 4.6 se observa que durante el periodo de la fermentación de la muestra N°1 un incremento de presencia de CO₂ con relación al tiempo, en 64 horas comienza a estabilizarse con una presencia de CO₂ 383.265 ppm. Debido a que el sustrato alcanza su mayor desarrollo poblacional en levaduras, degradando en mayor cantidad el azúcar; posteriormente disminuye hasta un valor despreciable.

Recolección de datos experimentales a una temperatura de 25°c y concentración inicial de 16°brix.

Tabla 11: Datos experimentales sobre consumo de sustrato PRUEBA N° 03

| REPORTE DE DATOS | | | |
|------------------|---|-------------|------------------|
| Prueba Nro. 3 | Relación R ₃ (200g de Macha Macha) | | Temperatura 25°C |
| | Índice de refracción | Grados Brix | pH |
| 0 | 1.3574 | 16.0 | 4 |
| 7 | 1.3563 | 15.4 | 4 |
| 20 | 1.3520 | 12.7 | 4 |
| 33 | 1.3473 | 9.7 | 4 |
| 48 | 1.3460 | 8.8 | 3.9 |
| 72 | 1.3410 | 5.5 | 3.7 |
| 96 | 1.3402 | 5.0 | 3.5 |

Tiempo de fermentación: 96 horas Grados de alcohol: 62 ml con 47°GL.

Fuente: Elaboración propia

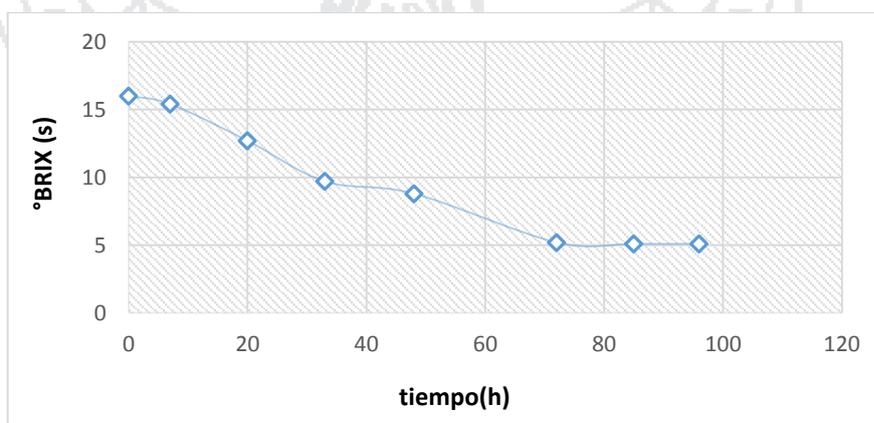
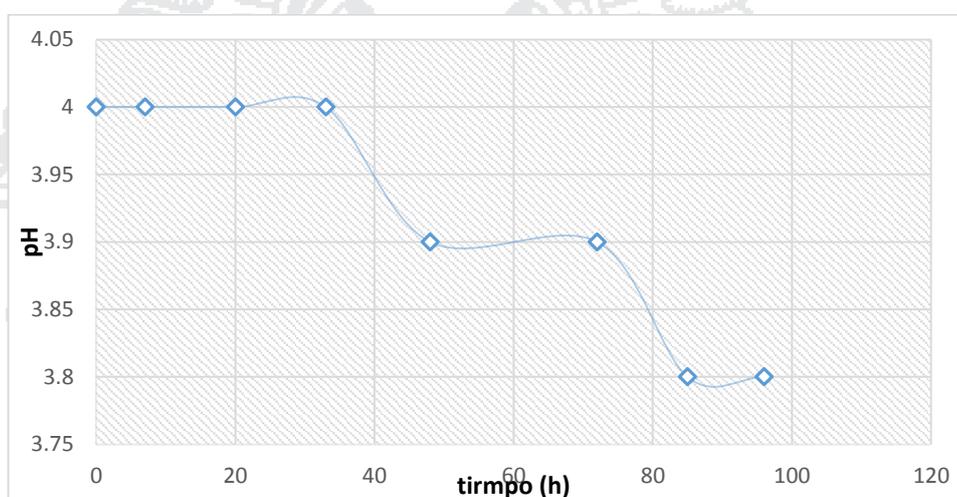


Figura 16: °BRIX VS TIEMPO

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la fig.:

En el grafico N° 4.7 se observa que durante el periodo de la fermentación de la muestra N° 3 la disminución del contenido de azúcar representado por una concentración 16 °brix referido al azúcar disminuye hasta una concentración 4.7 °brix al cabo de 72 horas se mantiene constante hasta las 96 horas del tiempo de fermentación, lo que indica que la conversión del azúcar en alcohol llega a su punto de equilibrio, partir de este tiempo se mantiene constante los grados brix del mosto remanente.

**Figura 17: TIEMPO VS pH***Fuente: Elaboración propia***Interpretación de la fig.:**

En el presente grafico N° 4.8 se observa que durante el periodo de la fermentación de la muestra N°3 la disminución del pH 4 a un pH de 3.8 en este punto se visualiza que se estabiliza en función al tiempo y a las 96 horas se observa una disminución del pH en 3.8 estabilizándose en 94 horas, a partir de ese tiempo se mantiene constante.

Tabla 12: Resultados de corrida experimental del seguimiento de tiempo y CO₂

| tiempo (h) | CO ₂ (ppm) | tiempo (h) | CO ₂ (ppm) | tiempo (h) | CO ₂ (ppm) |
|------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------|
| 1 | 367.5 | 34 | 376.382 | 67 | 383.265 |
| 4 | 368.618 | 37 | 375.941 | 70 | 383.265 |
| 7 | 372.5 | 40 | 375.941 | 73 | 383.265 |
| 10 | 371.059 | 43 | 375.941 | 76 | 382.265 |
| 13 | 371.059 | 46 | 378.382 | 79 | 381.941 |
| 16 | 372.941 | 49 | 383.265 | 82 | 379.265 |
| 19 | 373.5 | 52 | 383.265 | 85 | 378.824 |
| 22 | 373.5 | 55 | 383.265 | 88 | 377.824 |
| 25 | 373.5 | 58 | 383.265 | 91 | 376.265 |
| 28 | 373.5 | 61 | 383.265 | 94 | 375.265 |
| 31 | 375.382 | 64 | 383.265 | 96 | 374.265 |

Fuente: Elaboración Propia (datos reportados de Multilog- pro)

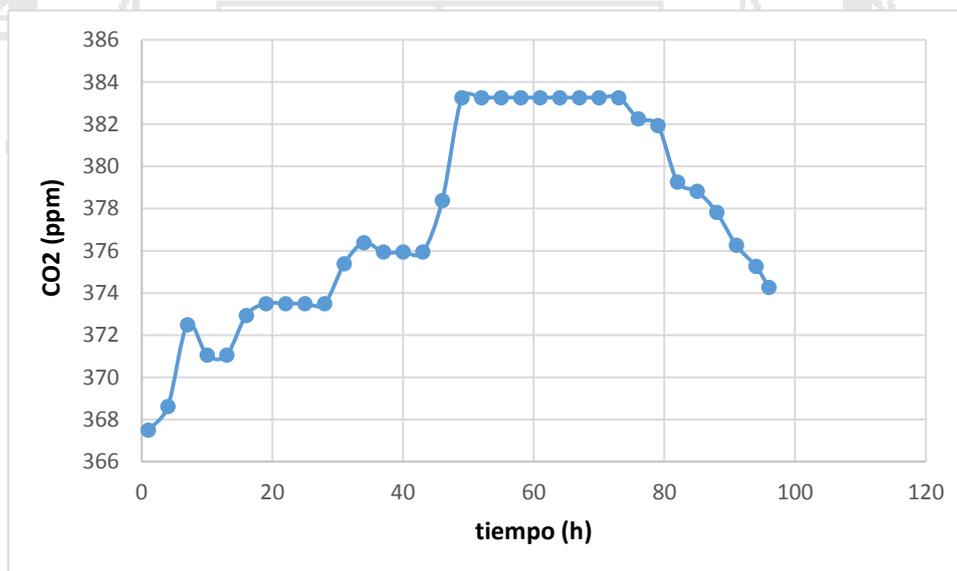


Figura 18: TIEMPO VS CO₂

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la fig.:

En el grafico N° 4.9 se observa que durante el periodo de la fermentación de la muestra N°1 un incremento de presencia de CO₂ con relación al tiempo, en 64 horas comienza a estabilizarse con una presencia de CO₂ 383.265 ppm. Debido a que el sustrato alcanza

su mayor desarrollo poblacional en levaduras, degradando en mayor cantidad el azúcar; posteriormente disminuye hasta un valor despreciable.

Tabla 13: Datos experimentales sobre consumo de sustrato PRUEBA N° 04

| REPORTE DE DATOS | | | |
|------------------|---|----------------------|------------------|
| Prueba Nro. 4 | Relación R ₄ (200g de Macha Macha) | | Temperatura 30°C |
| | Tiempo (h) | Índice de refracción | Grados Brix |
| 0 | 1.3573 | 16.0 | 4.1 |
| 14 | 1.3537 | 13.8 | 4 |
| 24 | 1.3517 | 12.5 | 4 |
| 48 | 1.3469 | 9.4 | 4 |
| 56 | 1.3460 | 8.8 | 4 |
| 72 | 1.3408 | 5.4 | 3.8 |
| 99 | 1.3400 | 4.8 | 3.6 |

Tiempo de fermentación 99 horas Grados de alcohol: 61 ml a 48°GL

Fuente: *Elaboración propia*

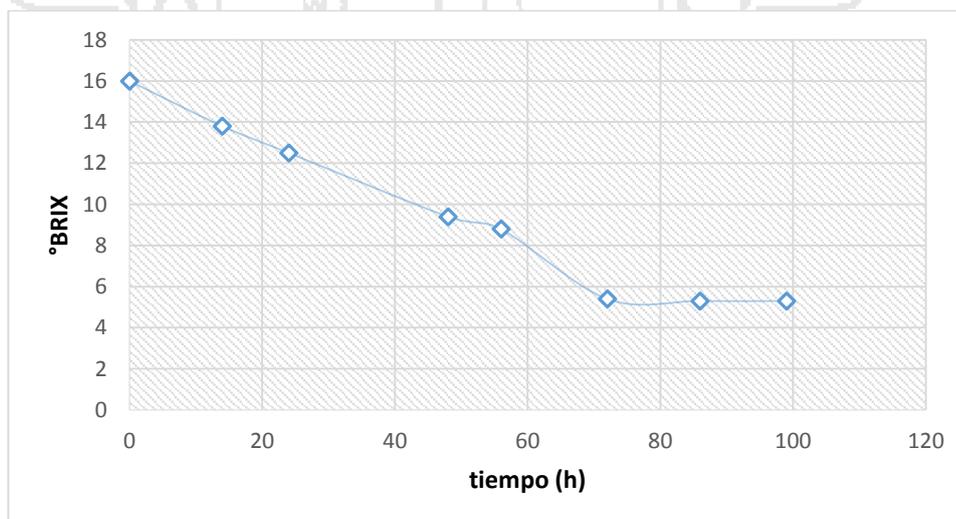


Figura 19: °BRIX VS TIEMPO

Fuente: *Elaboración propia*

Interpretación de la fig.:

En el grafico N° 4.10 se observa que durante el periodo de la fermentación de la muestra N° 4 la disminución del contenido de azúcar representado por una concentración 16 Brix referido al azúcar disminuye hasta una concentración 4.7 °brix al

cabo de 72 horas se mantiene constante hasta las 99 horas del tiempo de fermentación, lo que indica que la conversión del azúcar en alcohol llega a su punto de equilibrio, partir de este tiempo se mantiene constante los grados °brix del mosto remanente.

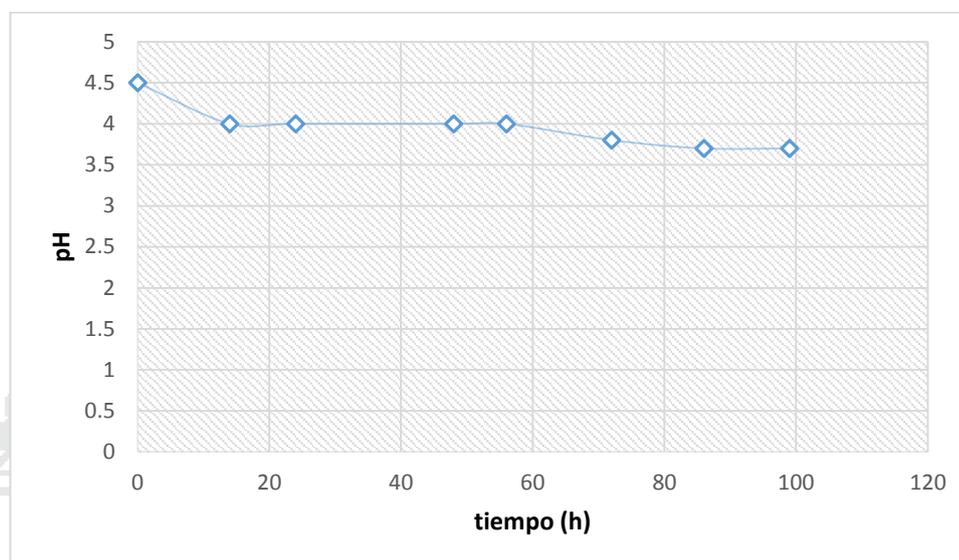


Figura 20: TIEMPO VS pH

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la fig.:

En el grafico N°4.11 se observa que durante el periodo de la fermentación de la muestra N° 4 la disminución del pH 4.5 un pH de 3.8 en este punto se visualiza en 67 horas. A las 84 horas se observa una disminución del pH en 3.6 estabilizándose en 94 horas a cabo de las 99 horas a partir de ese tiempo se mantiene constante.

Tabla 14: Resultados de corrida experimental del seguimiento de tiempo y CO₂

| tiempo (h) | CO ₂ (ppm) | tiempo (h) | CO ₂ (ppm) | tiempo (h) | CO ₂ (ppm) |
|------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------|
| 1 | 367.5 | 35 | 383.265 | 69 | 382.824 |
| 3 | 368.618 | 37 | 383.265 | 71 | 383.265 |
| 5 | 372.5 | 39 | 383.265 | 73 | 383.265 |
| 7 | 371.059 | 41 | 383.265 | 75 | 383.824 |
| 9 | 371.059 | 43 | 383.265 | 77 | 383.824 |
| 11 | 372.941 | 45 | 383.265 | 79 | 383.824 |
| 13 | 373.5 | 47 | 383.265 | 81 | 383.824 |
| 15 | 373.5 | 49 | 383.265 | 83 | 381.924 |
| 17 | 373.5 | 51 | 383.265 | 85 | 383.265 |
| 19 | 373.5 | 53 | 382.941 | 87 | 383.265 |
| 21 | 375.382 | 55 | 383.265 | 89 | 383.265 |
| 23 | 376.382 | 57 | 382.824 | 91 | 383.265 |
| 25 | 375.941 | 59 | 381.924 | 93 | 382.824 |
| 27 | 375.941 | 61 | 383.265 | 95 | 381.265 |
| 29 | 375.941 | 63 | 383.265 | 97 | 380.365 |
| 31 | 378.382 | 65 | 383.265 | 99 | 379.324 |
| 33 | 383.265 | 67 | 383.265 | 97 | 380.365 |
| | | | | 99 | 379.324 |

Fuente: Elaboración Propia (datos reportados de Multilog- pro)

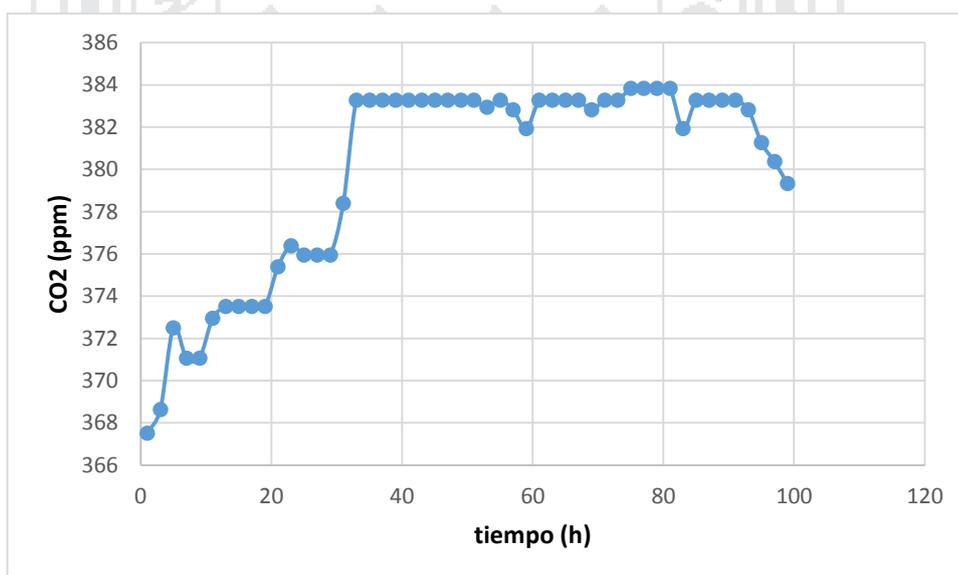


Figura 21: TIEMPO VS CO₂

Fuente: Elaboración propia

Interpretación de la fig.:

En el grafico N° 4.12 se observa que durante el periodo de la fermentación de la muestra N°1 un incremento de presencia de CO₂ con relación al tiempo, en 81 horas comienza a estabilizarse con una presencia de CO₂ 383.824 ppm. Debido a que el sustrato alcanza su mayor desarrollo poblacional en levaduras, degradando en mayor cantidad el azúcar; posteriormente disminuye hasta un valor despreciable.

4.3. RESULTADOS DE LA CINÉTICA DE EXTRACCIÓN

Los datos de la Tabla 15, parámetros tiempo y concentración en grados °brix se utiliza para preparar la tabla 15, para determinar la constante de velocidad de reacción y la constante, como calculo representativo, en base a estos datos se desarrolla la figura 13 que nos sirve para determinar estas constantes.

Tabla 15: Resultados experimentales del análisis para la primera prueba (30°C)

| Tiempo (h) | Grados Brix (S) | Δt | ΔS | $\Delta S / \Delta t$ | μ | 1/S | 1/ μ |
|------------|-----------------|------------|------------|-----------------------|--------|-------|-----------|
| 0 | 16 | 4 | 3,7 | | | 0,063 | |
| 4 | 12,3 | 13 | 2,1 | 0,162 | 0,0131 | 0,081 | 76,14286 |
| 17 | 10,2 | 27 | 1,9 | 0,070 | 0,0069 | 0,098 | 144,94737 |
| 44 | 8,3 | 9 | 1,7 | 0,189 | 0,0228 | 0,120 | 146,59870 |
| 53 | 6,6 | 17 | 2 | 0,118 | 0,0178 | 0,152 | 156,10000 |
| 70 | 4,6 | 2 | 0 | 0,000 | 0,0000 | 0,217 | |
| 72 | 4,6 | | | | 0,0000 | 0,217 | |

FUENTE: *Elaboración propia* ($\Delta S = S - S_0$) (Δ =diferencias)

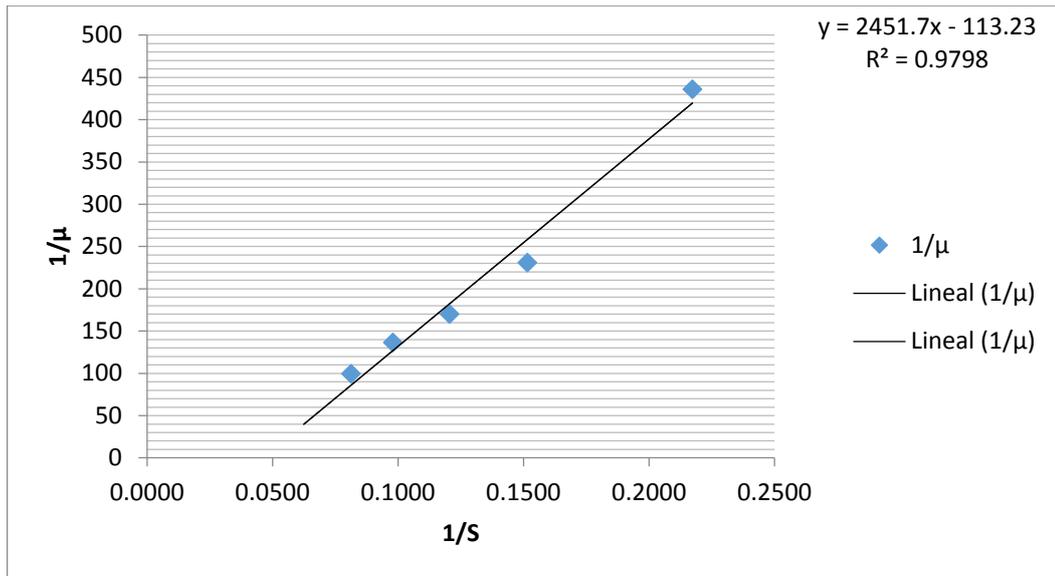


Figura 22: velocidad de crecimiento de biomasa vs concentración de sustrato

FUENTE: *Elaboración propia*

PRIMERA PRUEBA

Del grafico se tiene:

Pendiente= m = 2451.7

Intercepto= b = 113.23

De donde se obtuvieron las constantes cinéticas.

$$\mu_{max} = \frac{1}{intercepto} ; K_s = pendiente * \mu_{max}$$

$$\mu_{max} = 0.00883 h^{-1} ; K_s = 21.6523 g/L$$

$$\mu = \frac{\mu_{max}[S]}{K_s + [S]}$$

$$\mu = \frac{0.00883[S]}{21.6523 + [S]}$$

Hallando la forma lineal de la ecuación del modelo de Monod separamos las variables μ y s .

$$\mu(21.6523 + S) = 0.00883 * S$$

Obteniendo el reciproco:

$$\frac{1}{\mu(21.6523 + S)} = \frac{1}{0.00883 * S}$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{21.6523 + S}{0.00883 * S}$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{21.6523}{0.00883 * S} + \frac{S}{0.00883 * S}$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{0.00883} + \frac{21.6523}{0.00883} \left(\frac{1}{S}\right)$$

INTERPRETACIÓN:

Los resultados mostrados en la Fig.4.13 para una prueba con 200 g de macha macha diluidos a una solución de concentración referido al azúcar de 16 °Brix, manteniendo constante la temperatura a 30°C, se llevó acabo la fermentación por un tiempo de 72 horas, se observó que durante la fermentación la velocidad de crecimiento de la biomasa va aumentando conforme disminuye la concentración del sustrato, realizado el ajuste por liberalización del modelo de Michaelis y Menten se obtiene una correlación de 97.98%; encontrándose la velocidad de crecimiento ha sido 0.00883 h⁻¹ y la constante de reacción K_s = 21.6523 g/L; esto indica que para una concentración inicial de sustrato la velocidad de formación de alcohol.

COMPARANDO:

Así como para una comparación se muestra en los antecedentes (AHMAD, 2011).

“estudio de la cinética de crecimiento y el modelado de etanol producción por *saccharomyces cerevisiae*” la producción de etanol a partir de sustrato de glucosa se llevó a cabo. Por lotes de cepa de *saccharomyces cerevisiae* en 10L de bioreactor de tanque agitado durante 72 horas a este Estudio investigado la cinética de crecimiento

de *saccharomyces cerevisiae* a la fermentación por lotes , los parámetros cinéticos de este experimento son μ_{max} 0.084 h⁻¹ Ks 23.6g/L

Realizando los mismos cálculos para los tres experimentos restantes se tiene la siguiente tabla:

Tabla 16: RESUMEN DE RESULTADOS

| PRUEBA | Pendiente | Intercepto | R ² | Ks (g/L) | μ_{max} (h ⁻¹) |
|--------------|-----------|------------|-------------------------|----------------|---------------------------------|
| 1 | 2451.7 | - 113,23 | R ² = 0,9798 | 21.6523 | 0.00883 |
| 2 | 2391,2 | - 58,386 | R ² = 0,9581 | 40.9550 | 0.0171 |
| 3 | 2430,3x | - 40,84 | R ² = 0,9182 | 59.5078 | 0.0244 |
| 4 | 2460,8x | - 67,921 | R ² = 0,9741 | 36.2302 | 0.0147 |
| prom= | | | | 39.5863 | 0.0162 |

FUENTE: Elaboración propia

De donde se obtuvieron las constantes cinéticas.

$$\mu_{max} = 0.0162 \text{ h}^{-1} \quad ; \quad K_s = 39.5863 \text{ g/L}$$

Como se puede apreciar en la Tabla 4.10, los valores de la pendiente y el intercepto muestran valores cercanos casi constantes, lo que valida los resultados experimentales son concordantes con el modelo matemático de Michaelis y Menten propuesta, de lo cual se puede calcular la constante de velocidad y la constante de cinética que se muestra como promedio en la tabla 18, los cálculos matemáticos se muestran a continuación:

Reemplazando con el promedio de las constantes cinéticas tenemos:

$$\mu = \frac{\mu_{max}[S]}{K_s + [S]} \qquad \mu = \frac{0.0162[S]}{39.5863 + [S]}$$

Hallando la forma lineal de la ecuación del modelo de Michaelis y Menten separamos las variables μ y s .

$$\mu(39.5863 + S) = 0.0162 * S$$

Obteniendo el reciproco:

$$\frac{1}{\mu(39.5863 + S)} = \frac{1}{0.0162 * S}$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{39.5863 + S}{0.0162 * S}$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{39.5863}{0.0162 * S} + \frac{S}{0.0162 * S}$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{0.0162} + \frac{39.5863}{0.0162} \left(\frac{1}{S}\right)$$

4.4. ANÁLISIS DE DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental que se utilizó el paquete estadístico Statgraphiscs centurión XV, se realiza con el único objetivo de evaluar los efectos de las variables independientes sobre la variable de respuesta, es así que se realizó las pruebas de diseño experimental para la actividad de fermentación alcohólica, puesto que influye decisivamente en el tiempo y el sustrato, de acorde al planteamiento experimental que se realizó para n diseño factorial 2² con 3 puntos centrales.

Tabla 17: Tabla de diseño experimental

| | X₁= tiempo | X₂= sustrato (°brix) | Y = grado alcohólico |
|----|------------------------------|--|-----------------------------|
| 1 | 72.0 | 16.0 | 47 |
| 1* | 85.5 | 10.3 | 49 |
| 1 | 72.0 | 4.6 | 50 |
| 1 | 99.0 | 16.0 | 48 |
| 1 | 99.0 | 4.6 | 50 |
| 1* | 85.5 | 10.3 | 48 |
| 1* | 85.5 | 10.3 | 49 |

(*) **Puntos centrales**

ANALIZAR EXPERIMENTO - GRADO ALCOHÓLICO

Nombre del archivo: modelo matemático

Comentario: cinética de la extracción

Tabla 18: Efectos estimados para grado alcohólico (°GL)

| <i>Efecto</i> | <i>Estimado</i> | <i>Error Estd.</i> | <i>V.I.F.</i> |
|---------------|-----------------|--------------------|---------------|
| promedio | 48.7143 | 0.179758 | |
| A:tiempo | 0.5 | 0.475595 | 1.0 |
| B:sustrato | -2.5 | 0.475595 | 1.0 |
| AB | 0.5 | 0.475595 | 1.0 |

Fuente: elaboración propia

Errores estándar basados en el error total con 3 g.l.

El StatAdvisor

Esta tabla muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 1.0. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Tabla 19: Análisis de Varianza para grado alcohólico - cinética de la extracción

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| A:tiempo | 0.25 | 1 | 0.25 | 1.11 | 0.3703 |
| B:sustrato | 6.25 | 1 | 6.25 | 27.63 | 0.0134 |
| AB | 0.25 | 1 | 0.25 | 1.11 | 0.3703 |
| Error total | 0.678571 | 3 | 0.22619 | | |
| Total (corr.) | 7.42857 | 6 | | | |

R-cuadrada = 90.8654 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 81.7308 porciento

El StatAdvisor

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de grado alcohólico en piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este

caso, 1 efectos tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 90.8654% de la variabilidad en grado alcohólico. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 81.7308%. El error estándar de la estimada muestra que la desvía

Diagrama de Pareto Estandarizada para grado alcohólico

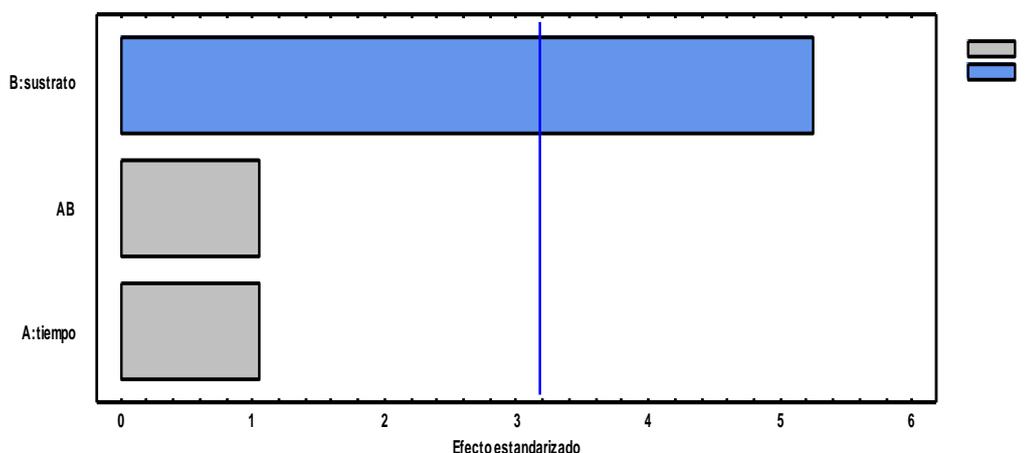


Figura 23: Diagrama de Pareto

Fuente: elaboración propia

En el diagrama de Pareto muestra todos los efectos estimados para el grado alcohólico, siendo el más importante el sustrato, luego la cantidad de tiempo.

Tabla 20: Coef. de regresión para grado alcohólico - cinética de la extracción

| Coeficiente | Estimado |
|-------------|------------|
| Constante | 52.2508 |
| A:tiempo | -0.0149448 |
| B:sustrato | -0.497076 |
| AB | 0.00324886 |

El StatAdvisor

Esta ventana despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Grado alcohólico} = 52.2508 - 0.0149448 * \text{tiempo} - 0.497076 * \text{sustrato} + 00324886 * \text{tiempo} * \text{sustrato}$$

En donde los valores de las variables están especificados en sus unidades originales. Para hacer que STATGRAPHICS evalúe esta función, seleccione Predicciones de la lista de Opciones Tabulares. Para graficar la función, seleccione Gráficas de Respuesta de la lista de Opciones Gráficas.

Optimizar Respuesta

Meta: maximizar grado alcohólico

Valor óptimo = 49.9643

| Factor | Bajo | Alto | Óptimo |
|----------|------|------|--------|
| tiempo | 72.0 | 99.0 | 72.0 |
| sustrato | 4.6 | 16.0 | 4.6 |

El StatAdvisor

Esta tabla muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual maximiza grado alcohólico sobre la región indicada. Use el cuadro de diálogo de Opciones de Ventana para indicar la región sobre la cual se llevará a cabo la optimización. Puede establecer el valor de uno o más factores a una constante, estableciendo los límites alto y bajo en ese valor.

Gráfica de Efectos Principales para grado alcohólico

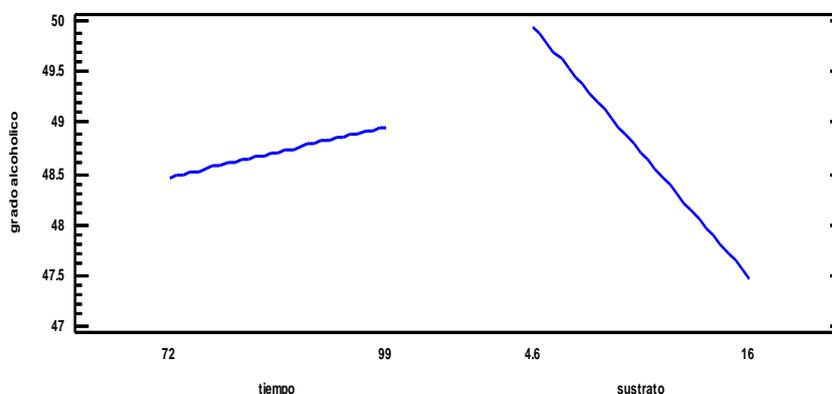


Figura 24: Variables Independientes

Fuente: elaboración propia

El gráfico de efectos principales muestra las dos variables independientes: tiempo y sustrato y como su variación afecta a la variable respuesta: el grado alcohólico.

Para el caso de tiempo se observa que un incremento también incrementa el grado alcohólico, lo contrario ocurre con la cantidad de sustrato.

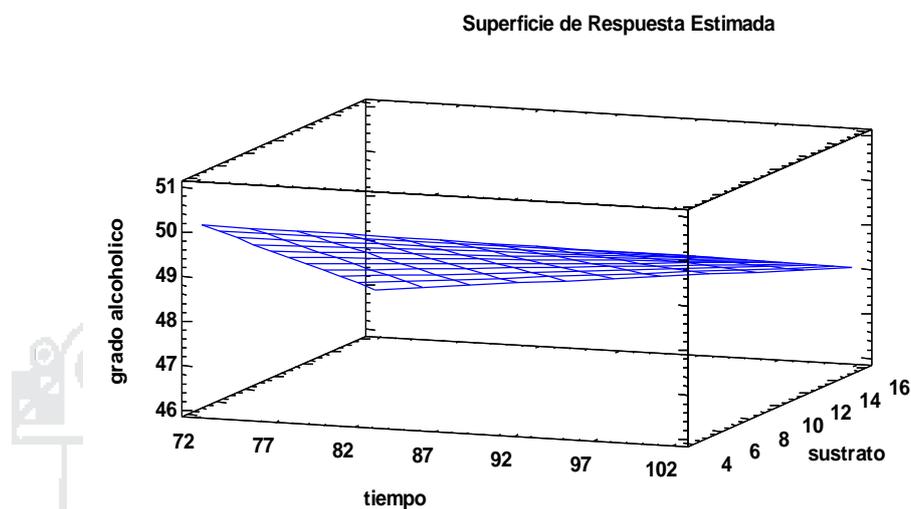


Figura 25: Superficie de respuesta estimada

Fuente: elaboración propia

El gráfico de superficie de respuesta para el rendimiento nos permite observar cómo debemos mover los parámetros de las variables independientes para obtener la respuesta esperada del proceso. Para este caso se observa para una mayor concentración de sustrato un buen rendimiento de grado alcohólico.

CONCLUSIONES

- El modelo cinético de Michelis y Menten propuesto ajusta apropiadamente a los datos experimentales, proporcionando las constantes cinéticas de reacción para cada proceso de fermentación ver tabla N° 4.9 las constantes obtenidas, Para esta primera prueba con 200 g de macha macha a 16 °Brix, 30°C se observó durante la fermentación la velocidad de crecimiento va aumentando conforme disminuye la concentración del sustrato ya que es ajustado a la liberalización del modelo de Michelis y Menten obteniéndose una correlación de 97.98%; donde la velocidad de crecimiento ha sido 39.5863 h⁻¹ y la constante de reacción k= 0.0162 g/L; esto indica que para una concentración inicial de sustrato la velocidad de crecimiento es aceptable.

Resultando la cinética como:

$$\mu = \frac{0.0162[S]}{39.5863 + [S]}$$

- El rendimiento para la primera prueba 97.98 %, segunda prueba 95.81 %, tercera prueba 91.82 % y cuarta prueba 97.41 % en todas las pruebas realizadas lo que nos demuestra un rendimiento aceptable para el proceso de fermentación de Macha macha (*peruvianum jancs*).
- Según el paquete estadístico Statgraphics se observa que a mayor concentración de sustrato mayor rendimiento de grado alcohólico una temperatura de fermentación de 30°C. También nos muestra la ecuación de la regresión que se ha ajustado a los datos de rendimiento. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Grado alcohólico} = 52.2508 - 0.0149448 * \text{tiempo} - 0.497076 * \text{sustrato} + 0.0324886 * \text{tiempo} * \text{sustrato}$$

De la ecuación de obtiene un rendimiento óptimo de 90.8654 %

- Los parámetros de °Brix, temperatura y pH que tuvieron mayor influencia para obtener el mejor porcentaje de etanol a partir de la Macha Macha.

RECOMENDACIONES

- Realizar y ampliar este trabajo de investigación con estados similares, pero aplicado a diferentes temperaturas, partiendo de diferentes valores de grados BRIX y diferentes microorganismos ya que la aplicación del uso de procesos de fermentación es escaso y su conocimiento de igual forma.
- Dar el debido tratamiento a la Macha macha (*peruvianum jancs*) para su posterior fermentación debido a que contienen agentes que impiden un buen proceso de fermentación.
- La determinación de todos los factores que intervienen en el proceso exige aplicar un diseño experimental adecuado, con el que se podría tener los datos para su estudio.
- Realizar un estudio profundo para ver las posibilidades de convertir este trabajo en un proyecto de planta piloto de obtención de etanol.

BIBLIOGRAFÍA

- AHMAD, F. (2011). *estudio de la cineica de crecimiento y el modelado de etanol produccion por saccharomyces cerevisiae*. articulo de investigacion.
- ALFREDO, P. I. (2005). *cineticas de reacciones quimicas*. lima - PERU: Prof. FQIQ UNMSM.
- ALLISON, C. V. (2010). *Cinetica de fermentacion de platano (musa cavedichi), en el equipo multilog - pro implementado con sensores de CO2, presion, temperatura, y pH*. puno: trabajo de investigacion.
- BROCK, M. T. (2006). *Biologia de microorganismos 10dcima edicion*. Madrid España: Editorial Pearson pag 120 - 125.
- BUCHNER, E. (1897). *Fermentacion alcoholica sin celulas de levadura y fermentacion de zimasa*.
- C., M. B. (2005). *Obtencion de alcohol a partir de polvillo de arroz*. trabajo de investigacion.
- CONNOR, C. (2000). *mejora de los rendimientos de etanol a traves de la suplantacion con nitrogeno asimilable en exceso*. ind. microbiologia .
- CORCHO, R. (2002). *evaluacion d las cepas de la levadura para producir alcohol a partir de jugos de caña energetica*.
- CRUGER WULF, C. A. (1993). *Biotecnologia: manual de microbiologia industrial*. Zaragoza España Cap 4 Pag. 73- 79: editorial Acribia S.A.
- CRUZ, C. Y. (2012). *Obtencion de etanol a partir de platanos maduros (guineos) con 16 a 20 % de azucar* . puno: trabajo de investigacion.
- CUTIMBO, Q. (2004). *Optimizacion de fermentacion alcoholica de frutas en estado extremal de maduracion*. puno: trabajo de investigacion.
- DONATO, N. B. (2012). *analisis teorico de los diferentes procesos para la obtencion de etanol a partir de maiz* . facultad regional de villa maria: trabajo de investigacion.
- DONATO, N. B. (s.f.). *Analisis teorico de los diferentes procesos para la obtencion de etanol a partir de maiz*. facultad regional villa maria , univerisdad nacional tecnologica.
- ERENIO, G. S. (2005). *vias para el diseño de nuevas instalaciones de la industria de procesos quimicos fermentativos y farmaceuticos*. Cuba: cientifico - tecnica.
- frazier. (1981). *microbiologia de alimentos*. editoria acribia.
- GARCIA, E. A. (2012). *Estudio cinetico de la fermentacion alcoholica del jugo de caña de azucar (saccharomyces offcinarum) proveniente de la coperativa laredo, sitio de trujillo para la obtencion de etanol*. trujillo: trabajo de investigacion.
- H., P. R. (1998). *manual del ingeniero quimico* . tomo 4 , editorial McGRAW-Hill Pag. 87-88.

- HENRY, F. Y. (1998). *introduccion a la bioquimica y tecnologia de los alimentos*. España: Acribia.
- I., M. G. (2005). *utilizacion de residuos de platano para la produccion de metabolitos secundarios por fermentacion en estado solido con el hongo lentinus crinitus*.
- JUAN PAURO R., F. G. (2011). *PLANTAS ALIMENTICIAS, MEDICINALES Y BIOCIDAS*. LIMA.
- LEPE, J. A. (1997). *levaduras vinicas*. Editorial mundi - prensa libros S.A.
- MOLINA, R. Y. (2005). *evaluacion de parametros cineticos para la saccharomyces cerevisiae utilizando agua de coco como sustrato*. trabajo de investigacion.
- MONSALVE, A. E. (2006). *prduccion de etanol a partir de la ascara de banano y de almidon de yuca*. trabajo de investigacion.
- MORALES, E. A. (2007). *obtencion de bioetanol a partir de naranja (citrus spp) aplicano ozono*. trabajo de investigacion.
- MORRISON, R. (1992). *Quimica organica*. Mexico: Iberoamericana.
- OCTAVE, L. (1993). *Ingenieria de las reacciones quimicas*. Mexico: Editorial Rverte S.A.
- OVIEDO, A. E. (2009). *levaduras autoctonas con capacidad fermentativa en la produccion de etanol a partir de la pulpa de excedentes de platano musa (AAB Simmonds)*. cordoba colombia: articulo de investigacion.
- PEÑA, A. (2004). *Bioquimica*. Mexico: Limusa.
- RAMIREZ, M. Y. (2005). *Evaluacion de parametros cineticos para la saccharomyces cerevisiae, utilizando agua de coco como sustrato*. trabajo de investigacion.
- RIOS DEL RISCO, C. A. (2005). *evaluacion de una cepa de levadura para fermentar diferentes concentraciones de miel apis mellifera*. estacion experimental apicola cuba.
- ROQUE, C. Y. (2008). *Produccion de alcohol de los residuos lignocelulosicos - cascara de arroz (oriza sativa)*. articulo .
- SIRIO, A. M. (2015). *la levadura de la cerveza*.
- SKOOG, D. A. (2001). *principios de analisis instrumental*. Mc Graw Hill . quinta edicion.



ANEXO 1 - TABLAS

TABLA A1

ÍNDICE DE REFRACCIÓN A 20°C DE LAS DISOLUCIONES DE SACAROSA

| Índice de Refracción a 20°C | % de sacarosa | Índice de Refracción a 20°C | % de sacarosa | Índice de Refracción a 20°C | % de sacarosa | Índice de Refracción a 20°C | % de sacarosa | Índice de Refracción a 20°C | % de sacarosa |
|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| 1,33880 | 4,0 | 1,35093 | 12,0 | 1,36484 | 20,6 | 1,3786 | 28,6 | 1,3935 | 36,8 |
| 1,33909 | 4,2 | 1,35124 | 12,2 | 1,36518 | 20,8 | 1,3789 | 28,8 | 1,3939 | 37,0 |
| 1,33939 | 4,4 | 1,35156 | 12,4 | 1,36551 | 21,0 | 1,3793 | 29,0 | 1,3943 | 37,2 |
| 1,33968 | 4,6 | 1,35187 | 12,6 | 1,36585 | 21,2 | 1,3797 | 29,2 | 1,3947 | 37,4 |
| 1,33998 | 4,8 | 1,35219 | 12,8 | 1,36618 | 21,4 | 1,3800 | 29,4 | 1,3950 | 37,6 |
| 1,34027 | 5,0 | 1,35250 | 13,0 | 1,36652 | 21,6 | 1,3804 | 29,6 | 1,3954 | 37,8 |
| 1,34057 | 5,2 | 1,35282 | 13,2 | 1,36685 | 21,8 | 1,3807 | 29,8 | 1,3958 | 38,0 |
| 1,34087 | 5,4 | 1,35313 | 13,4 | 1,36719 | 22,0 | 1,3811 | 30,0 | 1,3966 | 38,4 |
| 1,34116 | 5,6 | 1,35345 | 13,6 | 1,36753 | 22,2 | 1,3815 | 30,2 | 1,3970 | 38,6 |
| 1,34146 | 5,8 | 1,35376 | 13,8 | 1,36787 | 22,4 | 1,3822 | 30,6 | 1,3974 | 38,8 |
| 1,34176 | 6,0 | 1,35408 | 14,0 | 1,36820 | 22,6 | 1,3825 | 30,8 | 1,3978 | 39,0 |
| 1,34206 | 6,2 | 1,35440 | 14,2 | 1,36854 | 22,8 | 1,3829 | 31,0 | 1,3986 | 39,4 |
| 1,34236 | 6,4 | 1,35472 | 14,4 | 1,36888 | 23,0 | 1,3833 | 31,2 | 1,3989 | 39,6 |
| 1,34266 | 6,6 | 1,35503 | 14,6 | 1,36922 | 23,2 | 1,3836 | 31,4 | 1,3993 | 39,8 |
| 1,34296 | 6,8 | 1,35535 | 14,8 | 1,36956 | 23,4 | 1,3840 | 31,6 | 1,3997 | 40,0 |
| 1,34326 | 7,0 | 1,35567 | 15,0 | 1,36991 | 23,6 | 1,3843 | 31,8 | 1,4001 | 40,2 |
| 1,34356 | 7,2 | 1,35599 | 15,2 | 1,37025 | 23,8 | 1,3847 | 32,0 | 1,4005 | 40,4 |
| 1,34386 | 7,4 | 1,35631 | 15,6 | 1,37059 | 24,0 | 1,3851 | 32,2 | 1,4008 | 40,6 |
| 1,34417 | 7,6 | 1,35696 | 15,8 | 1,37090 | 24,2 | 1,3854 | 32,4 | 1,4012 | 40,8 |
| 1,34447 | 7,8 | 1,35728 | 16,0 | 1,37130 | 24,4 | 1,3858 | 32,6 | 1,4016 | 41,0 |
| 1,34477 | 8,0 | 1,35760 | 16,2 | 1,37160 | 24,6 | 1,3861 | 32,8 | 1,4020 | 41,2 |
| 1,34507 | 8,2 | 1,35793 | 16,4 | 1,37200 | 24,8 | 1,3865 | 33,0 | 1,4024 | 41,4 |
| 1,34538 | 8,4 | 1,35825 | 16,6 | 1,37230 | 25,0 | 1,3869 | 33,2 | 1,4028 | 41,6 |
| 1,34568 | 8,6 | 1,35858 | 16,8 | 1,37260 | 25,2 | 1,3872 | 33,4 | 1,4032 | 41,8 |
| 1,34599 | 8,8 | 1,35890 | 17,0 | 1,37300 | 25,4 | 1,3876 | 33,6 | 1,4036 | 42,0 |
| 1,34629 | 9,0 | 1,35923 | 17,2 | 1,37330 | 25,6 | 1,3879 | 33,8 | 1,4040 | 42,2 |
| 1,34660 | 9,2 | 1,35955 | 17,4 | 1,37370 | 25,8 | 1,3883 | 34,0 | 1,4044 | 42,4 |
| 1,34691 | 9,4 | 1,35988 | 17,6 | 1,37400 | 26,0 | 1,3887 | 34,2 | 1,4048 | 42,6 |
| 1,34721 | 9,6 | 1,36020 | 17,8 | 1,37440 | 26,2 | 1,3891 | 34,4 | 1,4052 | 42,8 |
| 1,34752 | 9,8 | 1,36053 | 18,0 | 1,37470 | 26,4 | 1,3894 | 34,6 | 1,4056 | 43,0 |
| 1,34783 | 10,0 | 1,36086 | 18,2 | 1,37510 | 26,6 | 1,3898 | 34,8 | 1,4060 | 43,2 |
| 1,34814 | 10,2 | 1,36119 | 18,4 | 1,37541 | 26,8 | 1,3902 | 35,0 | 1,4064 | 43,4 |
| 1,34845 | 10,4 | 1,36152 | 18,6 | 1,37581 | 27,0 | 1,3906 | 35,2 | 1,4068 | 43,6 |
| 1,34875 | 10,6 | 1,36185 | 18,8 | 1,37611 | 27,2 | 1,3909 | 35,4 | 1,4072 | 43,8 |
| 1,34906 | 10,8 | 1,36218 | 19,0 | 1,37650 | 27,4 | 1,3913 | 35,6 | 1,4076 | 44,0 |
| 1,34937 | 11,0 | 1,36251 | 19,2 | 1,37680 | 27,6 | 1,3916 | 35,8 | 1,4080 | 44,2 |
| 1,34968 | 11,2 | 1,36284 | 19,4 | 1,37720 | 27,8 | 1,3920 | 36,0 | 1,4084 | 44,4 |
| 1,34999 | 11,4 | 1,36384 | 20,0 | 1,37750 | 28,0 | 1,3924 | 36,2 | 1,4088 | 44,6 |
| 1,35031 | 1,6 | 1,36417 | 20,2 | 1,37790 | 28,2 | 1,3928 | 36,4 | 1,4092 | 44,8 |
| 1,35062 | 11,8 | 1,36451 | 20,4 | 1,37820 | 28,4 | 1,3931 | 36,6 | 1,4096 | 45,0 |

Fuente: (H., 1998)

TABLA A2
DENSIDADES DEL ALCOHOL ETÍLICO A DIFERENTES
TEMPERATURAS

| % de alcohol | 10°C | 15°C | 20°C | 25°C | 30°C |
|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 0 | 0.99973 | 0.99913 | 0.99823 | 0.99708 | 0.99568 |
| 1 | 785 | 725 | 636 | 520 | 379 |
| 2 | 602 | 542 | 453 | 336 | 194 |
| 3 | 426 | 362 | 157 | 157 | 014 |
| 4 | 258 | 195 | 103 | 0.98984 | 0.98839 |
| 5 | 098 | 032 | 0.98938 | 817 | 670 |
| 6 | 0.98946 | 0.98877 | 780 | 656 | 507 |
| 7 | 801 | 729 | 627 | 500 | 347 |
| 8 | 660 | 584 | 478 | 346 | 189 |
| 9 | 524 | 442 | 331 | 193 | 031 |
| 10 | 393 | 304 | 187 | 043 | 0.97875 |
| 11 | 267 | 171 | 047 | 0.97897 | 723 |
| 12 | 145 | 041 | 0.97910 | 753 | 573 |
| 13 | 026 | 0.97914 | 775 | 611 | 424 |
| 14 | 0.97911 | 790 | 643 | 472 | 278 |
| 15 | 800 | 669 | 514 | 334 | 133 |
| 16 | 692 | 552 | 387 | 199 | 0.96990 |
| 17 | 583 | 433 | 259 | 062 | 844 |
| 18 | 473 | 313 | 129 | 0.96923 | 697 |
| 19 | 363 | 191 | 0.96997 | 782 | 547 |
| 20 | 252 | 068 | 864 | 639 | 395 |
| 21 | 139 | 0.96944 | 729 | 495 | 242 |
| 22 | 024 | 818 | 592 | 348 | 087 |
| 23 | 0.96907 | 689 | 453 | 199 | 0.95929 |
| 24 | 787 | 558 | 312 | 048 | 769 |
| 25 | 665 | 424 | 168 | 0.95895 | 607 |
| 26 | 539 | 287 | 020 | 738 | 442 |
| 27 | 406 | 144 | 0.95867 | 576 | 272 |
| 28 | 268 | 0.95996 | 710 | 410 | 098 |
| 29 | 125 | 844 | 548 | 241 | 0.94922 |
| 30 | 0.95977 | 686 | 382 | 067 | 741 |
| 31 | 823 | 524 | 212 | 0.94890 | 557 |
| 32 | 665 | 357 | 038 | 709 | 370 |
| 33 | 502 | 186 | 0.94860 | 525 | 180 |
| 34 | 334 | 011 | 679 | 337 | 0.93986 |
| 35 | 162 | 0.94832 | 494 | 146 | 790 |
| 36 | 0.94986 | 650 | 306 | 0.93952 | 591 |
| 37 | 805 | 464 | 114 | 756 | 390 |
| 38 | 620 | 273 | 0.93919 | 556 | 186 |
| 39 | 431 | 079 | 720 | 353 | 0.92979 |
| 40 | 238 | 0.93882 | 518 | 148 | 770 |
| 41 | 042 | 682 | 314 | 0.92940 | 558 |
| 42 | 0.93842 | 478 | 107 | 729 | 344 |
| 43 | 639 | 271 | 0.92897 | 516 | 128 |
| 44 | 433 | 062 | 685 | 301 | 0.91910 |
| 45 | 226 | 0.92852 | 472 | 085 | 692 |
| 46 | 017 | 640 | 257 | 0.91868 | 472 |
| 47 | 0.92806 | 426 | 041 | 649 | 250 |
| 48 | 593 | 211 | 0.91823 | 429 | 028 |
| 49 | 379 | 0.91995 | 604 | 208 | 0.90805 |
| 50 | 0.92126 | 0.91776 | 0.91384 | 0.90985 | 0.90580 |

Fuente: (H., 1998)

TABLA A2-1
DENSIDADES DEL ALCOHOL ETÍLICO A DIFERENTES
TEMPERATURAS

| % de alcohol | 10°C | 15°C | 20°C | 25°C | 30°C |
|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 51 | 0.91943 | 555 | 160 | 760 | 353 |
| 52 | 723 | 333 | 0.90936 | 534 | 125 |
| 53 | 502 | 110 | 711 | 307 | 0.89896 |
| 54 | 279 | 0.90885 | 485 | 079 | 667 |
| 55 | 055 | 659 | 258 | 0.89850 | 437 |
| 56 | 0.90831 | 433 | 031 | 621 | 206 |
| 57 | 607 | 207 | 0.89803 | 392 | 0.88975 |
| 58 | 381 | 0.89980 | 574 | 162 | 744 |
| 59 | 154 | 752 | 344 | 0.88931 | 512 |
| 60 | 0.89927 | 523 | 113 | 699 | 278 |
| 61 | 698 | 293 | 0.88882 | 446 | 044 |
| 62 | 468 | 062 | 650 | 233 | 0.87809 |
| 63 | 237 | 0.88830 | 417 | 0.87998 | 574 |
| 64 | 006 | 597 | 183 | 763 | 337 |
| 65 | 0.88774 | 364 | 0.87948 | 527 | 100 |
| 66 | 541 | 130 | 713 | 291 | 0.86863 |
| 67 | 308 | 0.87895 | 477 | 054 | 625 |
| 68 | 074 | 660 | 241 | 0.86817 | 387 |
| 69 | 0.87839 | 424 | 004 | 579 | 148 |
| 70 | 602 | 187 | 0.86766 | 340 | 0.85908 |
| 71 | 365 | 0.86949 | 527 | 100 | 667 |
| 72 | 127 | 710 | 287 | 0.85859 | 426 |
| 73 | 0.86888 | 470 | 047 | 618 | 184 |
| 74 | 648 | 229 | 0.85806 | 376 | 0.84941 |
| 75 | 408 | 0.85988 | 564 | 134 | 698 |
| 76 | 168 | 747 | 322 | 0.84891 | 455 |
| 77 | 0.85927 | 505 | 079 | 647 | 211 |
| 78 | 685 | 262 | 0.84835 | 403 | 0.83966 |
| 79 | 442 | 018 | 590 | 158 | 720 |
| 80 | 197 | 0.84772 | 344 | 0.83911 | 473 |
| 81 | 0.84950 | 525 | 096 | 664 | 224 |
| 82 | 702 | 277 | 0.83848 | 415 | 0.82974 |
| 83 | 453 | 028 | 599 | 164 | 724 |
| 84 | 203 | 0.83777 | 348 | 0.82913 | 473 |
| 85 | 0.83951 | 525 | 095 | 660 | 220 |
| 86 | 697 | 271 | 0.82840 | 405 | 0.81965 |
| 87 | 441 | 014 | 583 | 148 | 708 |
| 88 | 181 | 0.82754 | 323 | 0.81888 | 448 |
| 89 | 0.82919 | 492 | 062 | 626 | 186 |
| 90 | 654 | 227 | 0.81797 | 362 | 0.80922 |
| 91 | 386 | 0.81959 | 529 | 094 | 655 |
| 92 | 114 | 688 | 257 | 0.80823 | 384 |
| 93 | 0.81839 | 413 | 0.80983 | 549 | 111 |
| 94 | 561 | 134 | 705 | 272 | 0.79835 |
| 95 | 278 | 0.80852 | 424 | 0.79991 | 555 |
| 96 | 0.80991 | 566 | 138 | 706 | 271 |
| 97 | 698 | 274 | 0.79846 | 415 | 0.78981 |
| 98 | 399 | 0.79975 | 547 | 117 | 684 |
| 99 | 0.94 | 670 | 243 | 0.78814 | 382 |
| 100 | 0.79784 | 360 | 0.78934 | 506 | 075 |

Fuente: (H., 1998)

ANEXO 2

1. Macha macha en etapa de florecimiento



2. Macha macha en etapa de maduración



3. Etapa de activación de la levadura *saccharomyces cerevisiae*



4. Controlando parámetros de la fermentación con el equipo multilog - pro



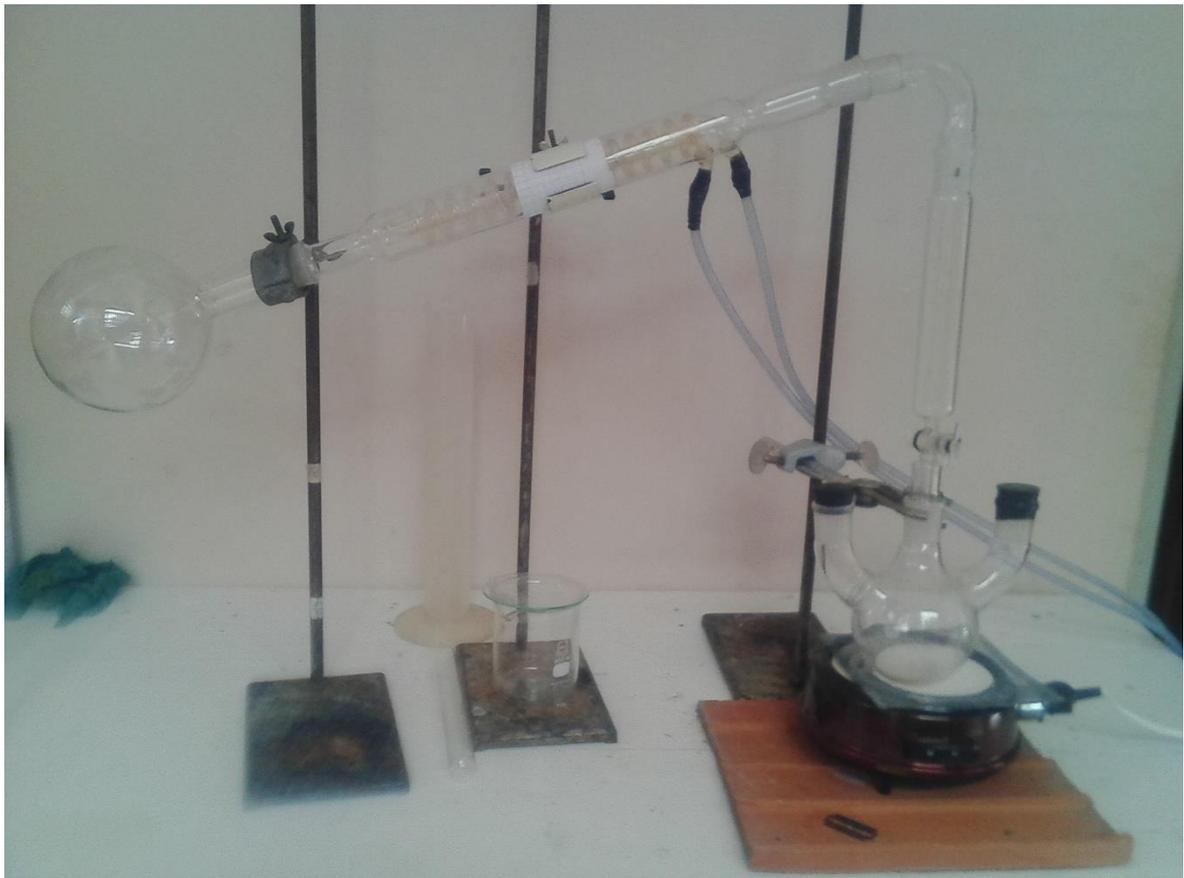
5. Iniciando la fermentación de la macha macha



6. Controlando la temperatura de reacción de la levadura



7. Equipo de destilación



8. Midiendo los grados alcohólicos después de ser destilado



ANEXO 3

FICHA TÉCNICA

RENAISSANCE YEAST

Levadura seca activa no OGM

| Ingredientes | |
|---------------------------------|-------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | > 99% |
| Emulsionante E491 | < 1% |

| Especificações produto levadura seca activa | |
|---|-------------------------------|
| Parámetro | Especificaciones |
| Humedad | < 8% |
| Células viables | $\geq 1 \times 10^{10}$ CFU/g |
| Levaduras salvages | $< 1 \times 10^5$ CFU/g |
| Mohos | $< 1 \times 10^3$ CFU/g |
| Bacterias lácticas | $< 1 \times 10^5$ CFU/g |
| Salmonella | Ausente en 25 g |
| Coliformes | < 100 CFU/g |
| Pb | < 2 mg/kg DWB |
| Hg | < 1 mg/kg DWB |
| As | < 3 mg/kg DWB |
| Cd | < 1 mg/kg DWB |

Instrucciones de almacenamiento:

Almacenar en envase original cerrado, entre 4-15 ° C en un lugar seco lejos de la luz solar. No congelar! Envases abiertos deben ser sellados y almacenados a 4 ° C y se utilizan dentro de 7 días después de la apertura. No utilice envases perforados o dañado

Dosis de inoculación:

200-350 g/1000 L

Instrucciones de rehidratación:

1. En un recipiente estéril, preparar una mezcla de agua sin cloro y mosto con un grado Brix de 6-8 y 38-42 ° C de temperatura, que es 10 veces el peso de la levadura Mezclar suavemente la levadura y reservar durante 20 minutos para permitir la rehidratación.
2. Después de la rehidratación, comience lentamente añadir el mosto a la mezcla cada 5 minutos para permitir la aclimatación. No bajar la temperatura más de 5 ° C en cada adición de mosto.
3. Cuando la temperatura de la suspensión de levadura es inferior a 10 ° C de diferencia para el mosto a ser inoculado, añadir lentamente la suspensión al tanque de fermentación.

Nota: No se recomienda añadir la levadura seca activa directamente en el mosto.

