



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado  
Facultad de Química e Ingeniería Química  
Unidad de Posgrado

**Condiciones óptimas del proceso de fermentación  
alcohólica del jugo de la Cabuya Azul (*Agave  
Americana*), empleando cepas de levadura  
*Saccharomyces cerevisiae***

**TESIS**

Para optar el Grado de Magíster en Ingeniería Química

**AUTOR**

Bach. Roberto ROBLES CALDERÓN

**ASESOR**

Mg. Julio Javier ARMIJO CARRANZA

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Robles, R. (2021). *Condiciones óptimas del proceso de fermentación alcohólica del jugo de la Cabuya Azul (Agave Americana), empleando cepas de levadura Saccharomyces cerevisiae*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

<b>Datos de autor</b>	
Nombres y apellidos	Roberto Robles Calderón
DNI	06078749
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0002-7077-5085">https://orcid.org/0000-0002-7077-5085</a>
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	Julio Javier Armijo Carranza
DNI	09240586
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0002-7071-5971">https://orcid.org/0000-0002-7071-5971</a>
<b>Datos de investigación</b>	
Línea de investigación	A.1.2. Biotecnología
Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima - Callao Calle: Calle Germán Amézaga N° 375 Latitud: -12.05498 Longitud: -77.08643
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Marzo 2016 - septiembre 2019
URL de disciplinas OCDE	Biología Industrial <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.09.02">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.09.02</a>  Ingeniería Química <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.04.01">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.04.01</a>



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú. Decana de América  
FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA  
VICEDECANATO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
UNIDAD DE POSGRADO  
"Año del Bicentenario del Perú: 200 Años de Independencia"

**UNIDAD DE POSGRADO**  
**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS NO PRESENCIAL**  
**GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER**

A los veinticinco días del mes de junio del año dos mil veinti uno, a las 10:00 horas mediante la plataforma Google/Meet, se reunió el Jurado de Tesis presidido por el Dr. Waldir Desiderio Estela Escalante, el Dr. Ángel Natividad Bardales, el Mg. Juan Carlos Woolcott Hurtado y el Mg. Julio Javier Armijo Carranza, para calificar la sustentación de la tesis titulada: **“CONDICIONES ÓPTIMAS DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DEL JUGO DE LA CABUYA AZUL (Agave Americana), EMPLEANDO CEPAS DE LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*”**, presentado por el Ing. Roberto Robles Calderón, para optar el Grado Académico de Magister en Ingeniería Química.

Hecha la exposición y absueltas las preguntas formuladas por el jurado, éste acordó la siguiente calificación de acuerdo a lo establecido por el Art. 61 del Reglamento General de Estudios de Posgrado, aprobado por R.R. N° 05360-R-18 del 03 de setiembre del 2018:

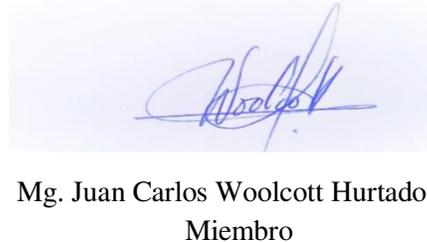
DIECINUEVE (19) Excelente

Habiendo sido aprobada la sustentación de la tesis, el Jurado recomendó que la Facultad proponga que se le otorgue el Grado Académico de Magister en Ingeniería Química, al **Ing. Roberto Robles Calderón**.

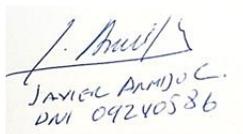
El acto académico de sustentación concluyó a las: 11:45 horas.



Dr. Ángel Natividad Bardales  
Miembro



Mg. Juan Carlos Woolcott Hurtado  
Miembro



JAVIER ARMJO C.  
DNI 09240536

Mg. Julio Javier Armijo Carranza  
Asesor



Firmado digitalmente por ESTELA  
ESCALANTE Waldir Desiderio FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 27.06.2021 10:27:12 -05:00

Dr. Waldir Desiderio Estela Escalante  
Presidente

## ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Situación problemática .....	1
1.2 Formulación del problema.....	2
1.3 Justificación teórica.....	2
1.4 Justificación práctica .....	4
1.5 Objetivos .....	5
1.5.1 Objetivo general .....	5
1.5.2 Objetivos específicos.....	5
 CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....	 6
2.1 Antecedentes de la investigación.....	6
2.2 Bases teóricas .....	17
2.2.1 Cabuya azul ( <i>Agave americana</i> Linneo) .....	17
2.2.2 Saponinas.....	18
2.2.3 Fructanos .....	18
2.2.4. Levaduras: generalidades .....	19
2.2.5. Fermentación alcohólica .....	21
2.2.6. Efecto de las variables del proceso sobre el rendimiento de la fermentación .....	22
2.2.7 Metabisulfito de potasio ( $K_2S_2O_5$ ).....	25
 CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES .....	 26
3.1 Hipótesis de la investigación .....	26
3.2 Variables.....	26
 CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA .....	 28
4.1 Tipo y diseño de la investigación .....	28
4.1.1 Diseño del experimento de hidrólisis de polisacáridos (principalmente, fructanos) presentes en el jugo de cabuya.....	28
4.1.2 Diseño experimental de la fermentación alcohólica del jugo de cabuya azul .....	29
4.2. Población y muestra de la investigación .....	31
4.2.1. Población .....	31
4.2.2. Muestra .....	31



5.1.8 Tratamiento estadístico de los resultados del proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul.....	66
5.1.8.1 Tratamiento estadístico del proceso de hidrólisis de fructanos presentes en el jugo de cabuya azul.....	66
5.1.8.2 Tratamiento estadístico del proceso de hidrólisis de la sacarosa presente en el jugo de cabuya azul .....	68
5.1.8.3 Tratamiento estadístico del incremento de glucosa en el proceso de Hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul ..	69
5.1.8.4 Tratamiento estadístico del incremento de fructosa en el proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul ...	71
5.1.8.5 Tratamiento estadístico del incremento de azúcares reductores directos (ARD) en la hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul .....	73
5.1.8.6 Tratamiento estadístico del rendimiento del proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul .....	74
5.2 Resultados del proceso de fermentación alcohólica de la primera etapa .....	76
5.2.1 Rendimiento de biomasa y etanol de las pruebas experimentales de la primera etapa.....	76
5.2.2 Pruebas experimentales de la segunda etapa de la fermentación alcohólica con el fin de determinar la concentración óptima de sustrato para obtener el máximo rendimiento de etanol.....	106
5.2.3 Comparación del consumo de AR, producción de biomasa y etanol, en las pruebas experimentales del proceso de fermentación alcohólica, a concentraciones de AR de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L.....	111
5.2.4 Formación de biomasa, CO <sub>2</sub> , consumo de O <sub>2</sub> y el pH del mosto durante el proceso de fermentación alcohólica, para concentraciones iniciales de AR de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L.....	115
5.2.5 Modelo matemático del proceso de fermentación alcohólica en lote, para concentración de AR de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L .....	125
5.2.6 Balance de materia, cálculo de rendimientos máximos de biomasa y etanol .....	131
5.2.7 Tiempo de generación <b><i>td</i></b> .....	133
5.2.8 Eficiencia de la fermentación.....	134
5.2.9 Productividad de la fermentación .....	134
5.2.10 Determinación de los compuestos volátiles de la bebida alcohólica obtenida por destilación del mosto de cabuya azul, en destilador de vidrio de torre rellena .....	134
5.2.11 Tratamiento estadístico del proceso de fermentación alcohólica para concentración de sustrato de 90 g/L.....	135
5.2.11.1 Tratamiento estadístico de producción de etanol .....	135
5.2.11.2 Tratamiento estadístico de producción de CO <sub>2</sub> para concentración de sustrato de 90 g/L.....	137

5.3 Discusión de resultados .....	139
5.3.1 Análisis e interpretación de resultados .....	139
5.4 Prueba de hipótesis .....	149
5.4.1 Hipótesis específica I .....	149
5.4.2 Hipótesis específica II .....	150
CONCLUSIONES .....	151
RECOMENDACIONES .....	153
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	154
ANEXO 1.....	160
1. Tratamiento estadístico del proceso de hidrólisis de fructanos presentes en el jugo de cabuya azul .....	160
2. Tratamiento estadístico del proceso de hidrólisis de la sacarosa presente en el jugo de cabuya azul .....	162
3. Tratamiento estadístico del incremento de glucosa en el proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul .....	166
4. Tratamiento estadístico del incremento de fructosa en el proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul .....	169
5. Tratamiento estadístico del incremento de azúcares reductores directos (ARD) en el proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya ... ..	173
6. Tratamiento estadístico del rendimiento del proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul.....	174
7. Tratamiento estadístico del proceso de fermentación alcohólica de la segunda etapa, para concentración de sustrato de 90 g/L .....	177
8. Tratamiento estadístico de producción de CO <sub>2</sub> durante la fermentación alcohólica, para concentración de sustrato de 90 g/L .....	180
9. Tratamiento estadístico de producción de CO <sub>2</sub> acumulado en la fermentación alcohólica, para concentración de sustrato de 90 g/L .....	181
ANEXO 2.....	183
ANEXO 3.....	193
1. Reporte de los ensayos fisicoquímicos del licor del mosto de cabuya Azul, destilado en un destilador de vidrio de torre rellena.....	193

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i> Gráfica del modelo matemático de fermentación del mosto con concentración inicial de azúcares reductores de 90 g/L. Datos experimentales dados por (■) Biomasa, (◆) Sustrato y (▲) Etanol. (Herrera et al. 2009). .....	15
<i>Figura 2:</i> La inulina tiene una cadena lineal de fructosilo $\beta$ (1-2) unida al residuo de fructosilo del iniciador de sacarosa. (Ritsema y Smeekensy, 2003). .....	19
<i>Figura 3:</i> Funciones clave de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la producción de bebidas fermentadas. (Walker y Stewart, 2016). .....	20
<i>Figura 4:</i> Curva de crecimiento celular. (Carcano, 2010). .....	21
<i>Figura 5:</i> Reacción de la fermentación alcohólica. (Mathews y Van Holde, 1998). ...	22
<i>Figura 6:</i> Curva de calibración para determinar azúcares reductores directos y azúcares reductores totales. ....	38
<i>Figura 7:</i> Curva de calibración para la determinación de azúcares totales. ....	40
<i>Figura 8:</i> Curva de calibración para la determinación de fructanos (inulina-FOS). ....	41
<i>Figura 9:</i> Curva de calibración para determinar la concentración de etanol en g/mL. ...	44
<i>Figura 10:</i> Curva de calibración para determinar la concentración de etanol en % en peso. ....	45
<i>Figura 11:</i> Comparación del proceso de hidrólisis de fructanos a temperatura de 90 °C, 100 °C, 110 °C y a pH 2,5; 4,5; y 5,5 (-- 2,5; -- 4,5; -- 5,5). .....	51
<i>Figura 12:</i> Comparación del proceso de hidrólisis de sacarosa a temperatura de 90 °C, 100 °C, 110 °C y a pH 2,5; 4,5; y 5,5 (-- 2,5; -- 4,5; -- 5,5). .....	53
<i>Figura 13:</i> Comparación de incremento de glucosa a temperatura de 90 °C, 100 °C, 110 °C y a pH 2,5; 4,5; y 5,5 (-- 2,5; -- 4,5; -- 5,5). .....	55
<i>Figura 14:</i> Comparación de incrementos de fructosa a temperatura de 110 °C y a diferentes condiciones de pH 2,5; 4,5; y 5,5 (-- 2,5; -- 4,5; -- 5,5). .....	58
<i>Figura 15:</i> Comparación de incrementos de azúcares reductores directos a temperatura de 90 °C, 100 °C, 110 °C y pH 2,5; 4,5; y 5,5 (-- 2,5; -- 4,5; -- 5,5). .....	60
<i>Figura 16:</i> Comparación de rendimiento del proceso de hidrólisis de polisacáridos en % a 90 °C, 100 °C, 110 °C, y a pH 2,5; 4,5; y 5,5 (-- 2,5; -- 4,5; -- 5,5). .....	62
<i>Figura 17:</i> Gráfica de $\ln C_A$ vs. tiempo a pH 2,5 y temperatura de 90 °C. ....	64
<i>Figura 18:</i> Gráfica de $\ln C_A$ vs. tiempo a pH 2,5 y temperatura de 100 °C. ....	64
<i>Figura 19:</i> Gráfica de $\ln C_A$ vs. tiempo a pH 2,5 y temperatura de 110 °C. ....	65
<i>Figura 20:</i> Gráfica de $\ln K$ vs. $1/T$ a pH 2,5 y temperaturas de 90 °C, 100 °C y 110 °C. ....	66
<i>Figura 21:</i> Gráfico de superficie de respuesta del proceso de hidrólisis de fructanos. 68	
<i>Figura 22:</i> Diagrama de superficie de respuesta del proceso de hidrólisis de sacarosa. ....	69
<i>Figura 23:</i> Diagrama de superficie de respuesta del incremento de glucosa. ....	71

<i>Figura 24:</i> Diagrama de superficie de respuesta del incremento de fructosa en el proceso de hidrólisis. ....	72
<i>Figura 25:</i> Diagrama de superficie de respuesta del incremento de ARD en el proceso de hidrólisis. ....	74
<i>Figura 26:</i> Diagrama de superficie de respuesta del rendimiento de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul. ....	76
<i>Figura 27:</i> Concentraciones de: AR, biomasa y etanol durante el proceso de fermentación (prueba 1).....	78
<i>Figura 28:</i> Variación de la concentración de AR, biomasa y etanol durante el proceso de fermentación de la segunda prueba. ....	79
<i>Figura 29:</i> Concentración de AR, biomasa y etanol vs. tiempo de los datos de la tabla 23. ....	80
<i>Figura 30:</i> Variación de las concentraciones de AR, biomasa y etanol durante el proceso de fermentación de la cuarta prueba. ....	82
<i>Figura 31:</i> Consumo de AR, producción de biomasa y etanol durante el proceso de fermentación de la prueba 5.....	83
<i>Figura 32:</i> Concentración de biomasa, AR y etanol vs. tiempo de los datos de la prueba 6. ....	84
<i>Figura 33:</i> Producción de etanol, biomasa y consumo de AR de la prueba 7 .....	86
<i>Figura 34:</i> Consumo de AR, concentraciones de biomasa y etanol durante el proceso de fermentación de la prueba 8.....	87
<i>Figura 35:</i> Gráfica del consumo de AR y concentraciones de biomasa y etanol durante el proceso de fermentación de la prueba 9. ....	88
<i>Figura 36:</i> Concentraciones de AR, biomasa y etanol durante el proceso de fermentación de la prueba 10. ....	89
<i>Figura 37:</i> Producción de biomasa, etanol y consumo de AR en la fermentación de la prueba 11. ....	91
<i>Figura 38:</i> Consumo de AR, concentraciones de biomasa y etanol durante la fermentación de la prueba 12.....	92
<i>Figura 39:</i> Producción de biomasa en las pruebas experimentales de la primera etapa del proceso de fermentación alcohólica. ....	94
<i>Figura 40:</i> Cinética microbiana de las pruebas experimentales de la primera etapa de la fermentación alcohólica. ....	96
<i>Figura 41.</i> Obtención de $\mu$ de las pruebas experimentales del proceso de fermentación: (41a) Curva de crecimiento microbiano de la prueba 8, y (41b) Pendiente de la fase exponencial de la prueba 8 ( $\mu = 0.2461$ (1/h)). ....	97
<i>Figura 42:</i> Crecimiento microbiano de las pruebas experimentales realizadas en la fermentación alcohólica de la primera etapa.....	99
<i>Figura 43:</i> LN de las UFC/mL vs. tiempo (h), (cinética de crecimiento microbiano de las pruebas experimentales de la primera etapa de la fermentación alcohólica). ....	101
<i>Figura 44:</i> Consumo de azúcares reductores de las pruebas de la primera etapa de la fermentación alcohólica. ....	103

<i>Figura 45:</i> Producción de etanol durante las pruebas experimentales realizadas en la primera etapa del proceso de fermentación alcohólica. ....	105
<i>Figura 46:</i> Consumo de AR, producción de biomasa y etanol, para concentración de AR de 10 g/L. ....	107
<i>Figura 47:</i> Consumo de AR, producción de biomasa y etanol, para la concentración de AR de 30 g/L. ....	108
<i>Figura 48:</i> Datos graficados de consumo sustrato, producción de biomasa y etanol, para concentración de AR inicial de 60 g/L. ....	110
<i>Figura 49:</i> Consumo de AR, formación de biomasa y etanol, para concentración inicial de AR de 90 g/L. ....	111
<i>Figura 50:</i> Producción de biomasa en el proceso de fermentación alcohólica para concentraciones de AR de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L. ....	112
<i>Figura 51:</i> Consumo de AR a concentración de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L, durante el proceso de fermentación alcohólica. ....	114
<i>Figura 52:</i> Producción de etanol de la segunda etapa del proceso de fermentación alcohólica, para concentraciones de AR de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L. ....	115
<i>Figura 53:</i> Producción de biomasa y CO <sub>2</sub> , para concentración de AR de 10 g/L, durante la fermentación alcohólica. ....	116
<i>Figura 54:</i> Producción de biomasa y CO <sub>2</sub> acumulado, para concentración de AR de 10 g/L, en la fermentación alcohólica. ....	117
<i>Figura 55:</i> Producción de biomasa, concentración de O <sub>2</sub> y el pH durante el proceso de fermentación alcohólica, para concentración de AR de 10 g/L. ....	117
<i>Figura 56:</i> Producción de biomasa y CO <sub>2</sub> durante el proceso de fermentación alcohólica, para concentración de AR de 30 g/L. ....	119
<i>Figura 57:</i> Producción de biomasa y CO <sub>2</sub> acumulado, durante el proceso de la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 30 g/L. ....	119
<i>Figura 58:</i> Producción de biomasa, concentración de O <sub>2</sub> y el pH durante la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 30 g/L. ....	120
<i>Figura 59:</i> Producción de biomasa y CO <sub>2</sub> , para concentración de AR de 60 g/L, durante el proceso de fermentación alcohólica. ....	121
<i>Figura 60:</i> Producción de biomasa y CO <sub>2</sub> acumulado, para concentración de AR de 60 g/L, durante el proceso de fermentación alcohólica. ....	122
<i>Figura 61:</i> Producción de biomasa, concentración de O <sub>2</sub> y el pH durante el proceso de la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 60 g/L. ....	122
<i>Figura 62:</i> Producción de biomasa y CO <sub>2</sub> , para concentración de AR de 90 g/L, durante el proceso de fermentación alcohólica. ....	124
<i>Figura 63:</i> Producción de biomasa y CO <sub>2</sub> acumulado, para concentración de AR de 90 g/L, durante el proceso de fermentación alcohólica. ....	124
<i>Figura 64:</i> Producción de biomasa, concentración de O <sub>2</sub> y el pH, en el proceso de fermentación alcohólica, para concentración de AR de 90 g/L. ....	125
<i>Figura 65:</i> Modelo matemático de la fermentación alcohólica en lote del jugo de cabuya, para concentración de AR de 10 g/L. ○ Biomasa, ○ Sustrato y Δ Etanol. ....	127

- Figura 66:* Modelo matemático de la fermentación alcohólica en lote, para concentración de AR de 30 g/L. ○ Biomasa, ○ Sustrato y Δ Etanol. .... 128
- Figura 67:* Modelo matemático de la fermentación alcohólica en lote, del jugo de cabuya azul, para concentración de AR de 60 g/L. (○) Biomasa, (○) Sustrato y (Δ) Etanol. . 129
- Figura 68:* Modelo matemático de la fermentación alcohólica en lote, del jugo de cabuya azul, para concentración de AR de 90 g/L. (○) Biomasa, (○) Sustrato y (Δ) Etanol. . 130
- Figura 69:* Diagrama de superficie de respuesta de rendimiento de etanol para concentración de sustrato de 90 g/L. .... 136
- Figura 70:* Diagrama de superficie de respuesta de producción de CO<sub>2</sub> para concentración de AR de 90 g/L. .... 138

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	
<i>Composición química de las diferentes fracciones del Agave tequilana azul</i> .....	7
Tabla 2	
<i>Propiedades físico-químicas del jugo de cabuya azul</i> .....	7
Tabla 3	
<i>Parámetros del modelo de fermentación en lote y continuo</i> .....	15
Tabla 4	
<i>Comparación de compuestos volátiles mayoritarios contenidos en el “Tequila blanco” elaborado a nivel industrial, con dos levaduras distintas; Kluyveromycetes marxianus UMPe-1 y Saccharomyces cerevisiae Pan1</i> .....	16
Tabla 5	
<i>Taxonomía del Agave americana L.</i> .....	18
Tabla 6	
<i>Matriz experimental del proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul</i> .....	29
Tabla 7	
<i>Diseño experimental de la primera etapa de la fermentación alcohólica del jugo de cabuya azul, a concentración de sustrato de 60 g/L</i> .....	30
Tabla 8 .....	31
<i>Diseño experimental de la segunda etapa del proceso de fermentación alcohólica a concentraciones de AR de 10 g/L, 30 g/L y 90 g/L (a condiciones de temperatura y pH de la primera etapa, en la que se obtiene el mayor rendimiento de producto)</i> .....	31
Tabla 9	
<i>Métodos de análisis de azúcares y fructanos presentes en el jugo de cabuya azul</i> .....	35
Tabla 10	
<i>Propiedades físico-químicas del jugo de cabuya azul</i> .....	37
Tabla 11	
<i>Absorbancia y concentración de glucosa para la determinación de azúcares reductores directos y azúcares reductores totales</i> .....	38
Tabla 12	
<i>Absorbancia y concentración de azúcares totales para obtener la curva de calibración, para determinar azúcares totales</i> .....	39
Tabla 13	
<i>Absorbancia y concentración de fructosa para hallar la curva de calibración, para la determinación de fructanos (inulina – FOS)</i> .....	40
Tabla 14	

<i>Absorbancia y concentraciones de alcohol etílico (en g/mL y en % en peso)</i> .....	44
Tabla 15	
<i>Datos del proceso de hidrólisis de fructanos (valores en mg/mL)</i> .....	49
Tabla 16	
<i>Datos del proceso de hidrólisis de sacarosa (mg/mL)</i> .....	51
Tabla 17	
<i>Incremento de glucosa en el proceso de hidrólisis (mg/mL)</i> .....	54
Tabla 18	
<i>Incremento de fructosa durante el proceso de hidrólisis (mg/mL)</i> .....	56
Tabla 19	
<i>Incremento de azúcares reductores directos en el proceso de hidrólisis (mg/mL)</i> .....	58
Tabla 20	
<i>Rendimiento del proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya (mg/mL)</i> .....	61
Tabla 21	
<i>Prueba 1: A las condiciones de pH 4,5; temperatura de 28 °C y concentración de (DAP) de 1 g/L</i> .....	77
Tabla 22	
<i>Prueba 2: pH 4,5; temperatura de 28 °C y concentración de DAP de 2 g/L</i> .....	78
Tabla 23	
<i>Prueba 3 a las condiciones de: pH 4,5; temperatura de 32 °C y concentración de DAP de 1 g/L</i> .....	79
Tabla 24	
<i>Prueba 4: pH 4,5; temperatura de 32 °C y concentración de DAP de 2 g/L</i> .....	81
Tabla 25	
<i>Prueba 5: pH 3,5; temperatura de 28 °C y concentración de DAP de 1 g/L</i> .....	82
Tabla 26	
<i>Prueba 6: pH 3,5; temperatura de 32 °C y concentración de DAP de 2 g/L</i> .....	83
Tabla 27	
<i>Prueba 7: pH 3,5; temperatura de 32 °C y concentración de DAP de 1 g/L</i> .....	85
Tabla 28	
<i>Prueba 8: pH 3,5; temperatura de 28 °C y concentración de DAP de 2 g/L</i> .....	86
Tabla 29	
<i>Prueba 9: pH 3,5; temperatura de 24 °C y concentración de DAP de 1 g/L</i> .....	87
Tabla 30	
<i>Prueba 10: pH 3,5; temperatura de 24 °C y concentración de DAP de 2 g/L</i> .....	89

Tabla 31	
<i>Prueba 11: pH 4,5; temperatura de 24 °C y concentración de DAP de 1 g/L</i> .....	90
Tabla 32	
<i>Prueba 12: pH 4,5; temperatura de 24 °C y concentración de DAP de 2 g/L</i> .....	91
Tabla 33	
<i>Producción de biomasa de las pruebas experimentales realizadas en la primera etapa de la fermentación alcohólica. Se observa que en la prueba 8, a condiciones de temperatura de 28 °C, pH 3,5 y concentración de DAP de 2 g/L, se obtiene el mayor rendimiento de biomasa <math>Y_{x/s} = 0,161</math></i> .....	93
Tabla 34	
<i>Logaritmo Neperiano de la Biomasa, para determinar la cinética microbiana de las pruebas experimentales de la primera etapa de la fermentación alcohólica. También se indican los valores de velocidad media de crecimiento: <math>\mu</math> (1/h)</i> .....	95
Tabla 35	
<i>Unidad formadora de colonia (UFC/mL <math>\times 10^7</math>), de las pruebas experimentales realizadas en la primera etapa de la fermentación alcohólica</i> .....	98
Tabla 36	
<i>Ln de las UFC/mL, de las pruebas experimentales realizadas en la primera etapa de la fermentación alcohólica</i> .....	100
Tabla 37	
<i>Consumo de AR de las pruebas experimentales realizadas en la primera etapa de la fermentación alcohólica. Se aprecia una mayor rapidez de consumo de AR para la prueba 8.</i> .....	102
Tabla 38	
<i>Producción de etanol en las pruebas experimentales realizadas en la primera etapa del proceso de la fermentación alcohólica</i> .....	104
Tabla 39	
<i>Consumo de sustrato, producción de biomasa, etanol, rendimiento de biomasa y etanol, a concentración de AR de 10 g/L en la fermentación alcohólica</i> .....	106
Tabla 40	
<i>Datos experimentales de las concentraciones de AR, biomasa y etanol; rendimiento de biomasa y etanol, para concentración de AR de 30 g/L durante la fermentación</i> .....	107
Tabla 41	
<i>Concentración de AR, biomasa, etanol y los respectivos rendimientos de biomasa y etanol durante la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 60 g/L</i> .....	109
Tabla 42	
<i>Valores de las concentraciones de AR, biomasa, etanol y los rendimientos de biomasa y etanol en el proceso de fermentación alcohólica, para concentración de AR de 90 g/L</i> .....	110
Tabla 43	

<i>Producción de biomasa para concentraciones de AR de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L, en la fermentación alcohólica</i> .....	112
Tabla 44	
<i>Consumo de AR en la segunda etapa del proceso de fermentación alcohólica para concentraciones de AR de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L</i> .....	113
Tabla 45	
<i>Producción de alcohol etílico para concentraciones de AR de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L, durante el proceso de fermentación alcohólica</i> .....	114
Tabla 46	
<i>Producción de biomasa, CO<sub>2</sub>, concentración de O<sub>2</sub> y el pH, en la segunda etapa del proceso de fermentación alcohólica, para concentración de AR de 10 g/L</i> .....	115
Tabla 47	
<i>Producción de biomasa, CO<sub>2</sub>, concentración de O<sub>2</sub> y el pH durante el proceso de fermentación alcohólica, para concentración de AR de 30 g/L</i> .....	118
Tabla 48	
<i>Producción de biomasa, CO<sub>2</sub>, concentración de O<sub>2</sub> y el pH durante la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 60 g/L</i> .....	120
Tabla 49	
<i>Producción de biomasa, CO<sub>2</sub>, concentración de O<sub>2</sub> y el pH durante la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 90 g/L</i> .....	123
Tabla 50	
<i>Parámetros del modelo matemático del proceso de fermentación alcohólica en lote</i> 130	
Tabla 51	
<i>Compuestos volátiles del licor de cabuya obtenido por destilación en un destilador de torre rellena</i> .....	135
Tabla 52	
<i>Resumen del incremento de glucosa y fructosa, a temperatura de 90 °C, 100 °C y 110 °C y a pH de 2,5; 4,5 y 5,5; en el proceso de hidrólisis de polisacáridos del jugo de cabuya azul</i> .....	142
Tabla 53	
<i>Producción de biomasa, etanol y rendimiento del producto, a concentración de sustrato (AR) de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L</i> .....	146
Tabla 54	
<i>Parámetros del modelo matemático del proceso de fermentación alcohólica en lote obtenidos en la investigación y por Herrera et al. (2009)</i> .....	147
Tabla 55	
<i>Compuestos volátiles del destilado de las pruebas experimentales y los obtenidos por López et al. 2012</i> .....	149

## **DEDICATORIA**

A la memoria de mis padres Teófilo y Victoria.

A mis hermanos, por el apoyo moral que me brindaron para lograr terminar la tesis.

A los profesores de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a las personas que, de alguna u otra forma, me apoyaron en la elaboración de la tesis.

## AGRADECIMIENTOS

A mis hermanos Mirtha, Teófilo y Cristóbal, por el apoyo incondicional para el logro de la tesis.

A mi *alma mater*, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por darme la oportunidad de elaborar la tesis.

Al Mg. Javier Armijo Carranza, por su apoyo incondicional, consejos y comprensión como mi asesor de tesis.

Al Dr. Abad, de la Facultad de Ciencias Biológicas; al Mg. Osiris Feliciano M., de la Facultad de Ingeniería Industrial; y a los profesores de la Facultad Química e Ingeniería Química: Mg. Juan C. Woolcott, Dr. Waldir Estela, Mg. Scila Reátegui, Química Elizabeth Espinoza y al Ingeniero Raúl Pizarro, por el apoyo que me brindaron en el desarrollo de la tesis.

También deseo agradecer de forma muy especial a don Víctor Toro, por su ayuda en la obtención del jugo de cabuya en el distrito de La Merced, provincia de Churcampa, departamento de Huancavelica—, así como al biólogo Alejandro Patiño y a la Química Laida Vilca Calderón.

## RESUMEN

Debido a las diferentes condiciones climáticas y a la composición de los terrenos de los valles interandinos del Perú, la cabuya azul (*Agave americana* L.) crece de forma silvestre en grandes extensiones de terrenos rurales. A pesar de contar con esta importante disponibilidad, no se explota industrialmente, pues no existe tradición ni experiencia tecnológica en su desarrollo industrial. La presente investigación se realizó en dos etapas: en la primera, se determinaron los valores de las variables de temperatura, pH y tiempo para obtener el máximo rendimiento de azúcares reductores en el proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya. En la segunda etapa, se determinaron los valores de las variables de temperatura, pH y concentración del nutriente fosfato diamónico para obtener el mayor rendimiento de alcohol etílico en el proceso de fermentación alcohólica del jugo de la cabuya azul (*Agave americana* L.), empleando cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (D 47, de la marca LALVIN – Canadá) para obtener el mayor rendimiento de etanol. Los experimentos se realizaron en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La materia prima (jugo de cabuya) se obtuvo en el distrito de La Merced de la provincia de Churcampa, departamento de Huancavelica. El resultado de los experimentos fue un rendimiento de azúcares reductores del 91,06 % en el proceso de hidrólisis, en condiciones de temperatura de 110 °C, pH 2,5 y en un tiempo de 10 horas (h); respecto al proceso de fermentación alcohólica, el rendimiento de etanol fue del 47,96 %, en una concentración de sustrato de 90 g/L, temperatura de 28 °C, pH 3,5 y concentración del nutriente fosfato diamónico de 2 g/L; el proceso de fermentación fue de 26 h.

### **Palabras claves:**

Fructanos, inulina, hidrólisis, nutrientes, azúcares reductores.

## SUMMARY

Due to the different climatic conditions and the composition of the terrain of the inter-Andean valleys of Peru, the blue cabuya (*Agave americana* L.) grows wild in large extensions of rural lands. Despite having this important availability, is not exploited industrially, since there is no tradition or technological experience in its industrial development. The present research was carried out in two stages: in the first, the values of the variables of temperature, pH and time were determined to obtain the maximum yield of reducing sugars in the hydrolysis process of the polysaccharides present in the cabuya juice. In the second stage, the values of the variables of temperature, pH and concentration of the nutrient diammonium phosphate were determined to obtain the highest yield of ethyl alcohol in the process of alcoholic fermentation of the juice of the blue cabuya (*Agave americana* L.), using *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains (D 47, from LALVIN - Canada) to obtain the highest ethanol yield. The experiments were carried out in the laboratories of the Faculty of Biological Sciences and the Faculty of Chemistry and Chemical Engineering of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). The raw material (cabuya juice) was obtained in La Merced district of the Churcampa province, Huancavelica department. The result of the experiments was a yield of reducing sugars of 91.06 % in the hydrolysis process, under conditions of temperature of 110 °C, pH 2.5 and in a time of 10 hours (h). Regarding the alcoholic fermentation process, the ethanol yield was 47,96 %, at a substrate concentration of 90 g/L, a temperature of 28 °C, pH 3.5 and a concentration of the nutrient diammonium phosphate of 2 g/L; the fermentation process lasted 26 h.

### **Keywords:**

Fructans, inulin, Hydrolysis, nutrients, Reducing sugars.



# **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

## **1.1. Situación problemática**

En el Perú, debido a la diversidad de ecosistemas y a la composición de los terrenos de los valles interandinos, la cabuya azul (*Agave americana*) crece en forma silvestre en grandes extensiones de terreno, en las zonas rurales de los departamentos de Cajamarca, Huancavelica, Huánuco y Ayacucho. A pesar de contar con esta importante disponibilidad, la cabuya azul no se explota industrialmente y se desperdicia el aprovechamiento de esta materia prima. En los departamentos del sur del país, principalmente en Huancavelica, en donde abunda esta planta, los pobladores aprovechan el jugo de cabuya para el procesamiento artesanal de chancaca.

Contrariamente a lo que ocurre en México, donde se cultiva la cabuya azul de forma intensiva para la producción de tequila (60 000 ha, en la región de San Luis Potosí), en el Perú, esta especie no es explotada industrialmente por falta de una tecnología adecuada para realizar los procesos de fermentación y destilación con el fin de obtener un licor derivado de este producto.

La producción a escala industrial o piloto del destilado de la fermentación alcohólica del jugo de cabuya constituiría un proceso innovador en nuestro país, donde no existe ni tradición ni experiencia tecnológica en su desarrollo industrial. De igual manera, no se han publicado investigaciones científicas que aborden el estudio de este proceso, por lo cual, no se dispone de información científica de las propiedades físico-químicas y de las condiciones que influyen en la calidad y rendimiento del producto de la fermentación del jugo de la cabuya azul obtenido de la planta, a diferentes condiciones de clima, altitud y composición de los terrenos de las diferentes zonas del Perú, lo que dificulta su explotación a escala industrial.

## 1.2 Formulación del problema

### Problema general

¿Cuáles serían las condiciones óptimas para lograr el máximo rendimiento en la fermentación alcohólica del jugo de cabuya azul (*Agave americana L.*) que crece de forma silvestre en el Perú, empleando cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*?

### Problemas específicos

1. ¿Cuál sería la temperatura y el pH óptimos del proceso de hidrólisis de los polisacáridos (fructanos) presentes en el mosto de la cabuya azul?
2. ¿Cuál sería la temperatura y el pH óptimos del proceso de fermentación del jugo de cabuya azul para lograr el máximo rendimiento?
3. ¿Cuál sería la concentración óptima del nutriente fosfato diamónico que se empleará en el proceso de fermentación del mosto?
4. ¿Cuál sería el rendimiento máximo que se puede lograr en el proceso de fermentación del mosto del jugo de cabuya azul en condiciones óptimas de operación?

## 1.3 Justificación teórica

Considerando que no existen investigaciones científicas publicadas en nuestro país sobre el tema planteado, la presente investigación se propone contribuir con el acervo científico desarrollado por la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), al establecer las condiciones de hidrólisis térmica del jugo en autoclaves, de los fructanos presentes en las cabezas de agave para liberar los azúcares fermentables, principalmente fructosa, glucosa, xilosa y maltosa (Michel-Cuello, Juárez-Flores, Aguirre y Pinos-Rodríguez, 2008), así como de las condiciones de temperatura, pH, concentración de nutrientes y tiempo, para lograr el máximo rendimiento en la fermentación alcohólica del jugo de cabuya azul que crece de forma silvestre en el Perú, empleando cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Los resultados de esta investigación proporcionarían la base para realizar estudios posteriores sobre las propiedades fisico-químicas del jugo obtenido del *Agave americana* en diferentes altitudes, condiciones de clima y atendiendo a la composición de los terrenos de las diferentes zonas del país; además, se aplicarán otros métodos de hidrólisis de los fructanos, estudio de aplicación de levaduras aisladas del jugo y variedades de nutrientes en el rendimiento de la fermentación, determinación de tipos de fructanos presentes en el jugo, determinación de compuestos de la oxidación e hidrólisis de azúcares y de compuestos de la fermentación que juegan un importante rol en el aroma del producto final, etcétera. De esta manera, se profundizarán los conocimientos científicos y tecnológicos sobre esta materia prima con el fin de aplicarlos en la incipiente industria del licor de cabuya en el Perú.

El clima templado, de 18 °C a 26 °C, de los valles interandinos de la sierra del país son ideales para el desarrollo del *Agave americana*. Esto, unido a las condiciones favorables de la composición de nutrientes orgánicos y de compuestos de origen mineral de los terrenos, logra que el tiempo de maduración de esta planta fluctúe entre los cinco y diez años, periodo mucho menor que los siete a nueve años requeridos para la maduración de la misma variedad mexicana. Considerando dicha ventaja y estableciendo una política de cultivo conforme al uso de las plantaciones silvestres en la actualidad, se evitarían problemas en cuanto a la disponibilidad de materia prima y no se causaría depredación ni erosión de los suelos.

De esta manera, económicamente, se justificaría la investigación, pues propondrá las condiciones adecuadas para la elaboración de un producto nuevo en el país (licor de cabuya) a partir de una materia prima oriunda y con grandes posibilidades de disponibilidad inmediata, a mediano y largo plazo. Además, los resultados de la investigación facilitarían la implementación de centros de producción a pequeña o mediana escala, que podrían ser creados con recursos provenientes de la inversión pública o privada. Estos centros de producción tendrían una incidencia positiva en las zonas donde abunda esta materia prima, ya que se aprovecharía este recurso natural (que actualmente se desperdicia) y se crearían fuentes de trabajo, lo cual contribuiría al desarrollo económico y social de la agroindustria y de la población rural, además de mejorar los ingresos económicos y la calidad de vida de tal población.

## 1.4 Justificación práctica

Por los múltiples productos que se obtienen de la cabuya azul (licor tipo tequila, jarabes con alto contenido de fructosa, inulina, fibras, etcétera) y la importancia que adquiere desde el punto de vista socioeconómico y agroecológico a partir de los beneficios que generaría a los habitantes y al medio ambiente de las zonas donde se desarrolla, es importante promover el cultivo de esta planta, principalmente, en las zonas eriazas y en las laderas de las montañas de los valles interandinos del Perú. De esta manera, se podría ampliar la frontera agrícola, lo cual constituiría un renglón de gran importancia para lograr un desarrollo sostenible. Con la difusión del aprovechamiento de esta planta para la obtención de diferentes productos derivados, se incentivaría el cultivo de tierras eriazas que no se aprovechan con ningún tipo de cultivo.

El cultivo de la cabuya azul, además, tiene la particularidad de evitar la erosión del suelo, ayuda a retener el agua y crear así un ecosistema favorable para el cultivo de otras plantas, lo que ayudaría a mejorar el microclima de la zona.

Mientras que en México, debido a la producción industrial del tequila a gran escala, el jugo se obtiene de la piña o cabeza de la planta; en el Perú, principalmente en el departamento de Huancavelica, el jugo se obtiene mediante una técnica ancestral, que permite recolectar 9 litros (L) de jugo al día por planta (recolección de 3 veces al día) durante dos a tres meses, según el tamaño de la planta y las condiciones climáticas en la que crece, lo que lleva a recolectar aproximadamente 270 L de jugo al mes.

Con los conocimientos científicos y tecnológicos adquiridos mediante investigación, ligados a las características de la materia prima con la que se ha trabajado, la tecnología ha sido adaptada para trabajar con dicha materia prima, con lo que se obtiene un licor similar al tequila mexicano. Esta tecnología es novedosa, ya que no se conoce en el país la producción de licor de cabuya con respaldo técnico.

Los resultados de la investigación propuesta contribuirían a facilitar la implementación de centros de producción a escala piloto, lo cual constituiría un proceso innovador en nuestro país.

En la figura 1 (del anexo 2), se muestran plantas de cabuya azul que crecen en diferentes zonas del Perú. En la figura 1a, se muestran plantas de cabuya azul que crecen de forma silvestre en la provincia de Ambo, departamento de Huánuco; y en la figura 1b, se ven plantas de cabuya azul que crecen en las zonas rurales del distrito de La Merced, provincia de Churcampa, departamento de Huancavelica.

## **1.5 Objetivos**

### **1.5.1 Objetivo general**

Determinar las condiciones óptimas para lograr el máximo rendimiento en la fermentación alcohólica del jugo de cabuya azul (*Agave americana L.*) —planta que crece de forma silvestre en el Perú— empleando cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

1. Determinar la temperatura y el pH óptimos del proceso de hidrólisis de los polisacáridos (fructanos) presentes en el mosto de la cabuya azul.
2. Determinar la temperatura y el pH óptimos del proceso de fermentación del mosto del jugo de cabuya azul para lograr el máximo rendimiento.
3. Determinar la concentración óptima del nutriente fosfato diamónico que se empleará en el proceso de fermentación del mosto.
4. Determinar el rendimiento máximo que se pueda lograr en el proceso de fermentación del mosto del jugo de cabuya azul, en las condiciones óptimas de operación.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### Marco filosófico y epistemológico de la investigación

#### 2.1 Antecedentes de la investigación

Gil-Vega, Díaz, Nava-Cedillo y Simpson (2006) compararon nueve genotipos de diferentes variedades de *Agave tequilana* Weber, utilizando marcadores AFLP (análisis de marcado con fluorescencia). Además, estudiaron las variedades del *Agave tequilana* Weber variedad azul presentes en las plantaciones del estado de Guanajuato, en México. Nueve de estas variedades: “azul”, “sigüin”, “chato”, “bermejo”, “pata de mula”, “hoja delgada”, “manso”, “moraleño” y “azul listado”, se obtuvieron de diferentes lugares en los estados de Guanajuato y Jalisco. Para la producción de tequila solo se utiliza el *Agave tequilana* Weber variedad azul. (p.905).

Montañez, Venegas, Vivar y Ramos (2011) caracterizaron y cuantificaron “los fructanos presentes en la cabeza y en las hojas del *Agave tequilana* Weber azul” (p. 199). La parte aérea de la planta está integrada por hojas y tallo. El tallo, conocido como “cabeza” o “piña”, posee un alto contenido de fructanos y se utiliza para la producción de tequila (Díaz-Teres, Sanjuán, Anzaldo y Rowell, 2001).

“Para la caracterización y cuantificación de los carbohidratos se determinaron los azúcares reductores directos (ARD) y azúcares reductores totales (ART) Miller (1959); también se determinó el contenido de glucosa (G) Trinder (1969) y la fructosa (F) se determinó como:  $F = \text{ARD} - G$ ” (Montañez, et al., 2011, p. 200-201).

La tabla 1 muestra los carbohidratos presentes en las diferentes partes de la planta de *Agave tequilana* Weber variedad azul.

Tabla 1

*Composición química de las diferentes fracciones del Agave tequilana azul*

Fracción	Componente (% base seca)			
	ARD	FOS	Inulina	ART
Punta de hoja	17,81	6,24	2,25	26,30
Base de hoja	18,18	13,66	24,52	56,36
Cabeza	12,00	24,96	43,24	80,20

ARD: azúcares reductores directos; FOS: fructoolisacáridos; ART: azúcares reductores totales (Montañez-Soto et al., 2011).

Lavado, Robles y Yenque (2015) estudiaron las propiedades físico-químicas del jugo de cabuya azul obtenido en el distrito de Huanca Huanca, provincia de Angaraes, departamento de Huancavelica, zona en la cual se elabora chancaca de manera artesanal a partir del mencionado jugo. En la tabla 2, se muestran las propiedades físico-químicas del jugo de cabuya azul.

Tabla 2

*Propiedades físico-químicas del jugo de cabuya azul*

Inulina (g/100 g jugo)	°Brix	Densidad (g/mL)	Viscosidad (cp)
56,60	14,00	1,27	1,56

Fuente: Lavado, Robles y Yenque (2015).

Waleckx et al. (2008) estudiaron la hidrólisis de los polisacáridos (fructanos) presentes en el *Agave tequilana* Weber variedad azul durante la etapa de cocción en un proceso tradicional de elaboración de tequila. En este proceso, las cabezas de la planta son cocinadas en hornos de ladrillo durante 36 horas (en adelante, h) aproximadamente para hidrolizar el contenido de los fructanos y liberar los azúcares fermentables. Recientemente, algunas destilerías de tequila han reemplazado sus hornos de ladrillo por autoclaves con el fin de reducir el tiempo de cocción (p. 40).

El contenido de carbohidratos solubles en agua (WSC) de las de cabezas de agave fueron de:  $28,3 \pm 0,1$  % g/100 g (peso fresco) y  $86,7 \pm 1,3$  % g/100 g (peso seco)

(Waleckx, et al., 2008, p. 43). Estos valores altos están de acuerdo con reportes previos realizados por Cedeño (2003), Mancilla-Margalli y López (2006).

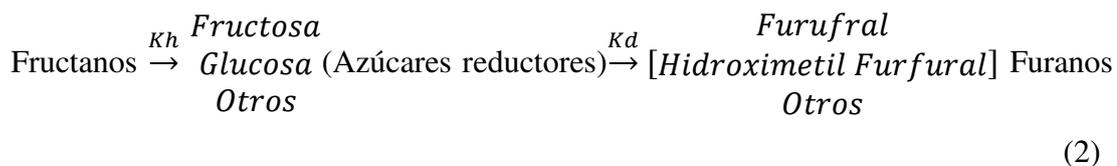
Michel-Cuello, Gallegos, Maldonado y Aguilar (2015) analizaron “los fructanos contenidos en el jugo de maguey mezcalero potosino (*Agave salmiana*)”, los cuales fueron caracterizados y sometidos a un proceso de hidrólisis térmica” (p. 615).

En la hidrólisis de los fructanos se utiliza el método tradicional de hacer tequila o mezcal, en el cual, las cabezas o piñas, enteras o cortadas por la mitad, se cocinan en hornos de ladrillo durante 36 h a 48 h o en autoclaves durante 12 h (González-Hernández, Pérez, Damián y Chavez-Parga, 2012), alcanzando en ambos casos temperaturas de proceso por encima de 100 °C. La eficiencia de la hidrólisis es muy baja; además, en estas condiciones, los fenómenos desfavorables de la cocción como las reacciones de Maillard y la formación de compuestos, tales como fenoles, furfural e hidroximetilflufural, se favorecen de la degradación térmica de pentosas y hexosas (Mancilla-Margalli y López, 2002; Waleckx Gschaedler, Colonna-Cecaldi y Monsan et al., 2008).

“Las pruebas preliminares permitieron establecer un diseño factorial completo considerando tres temperaturas diferentes (90 °C, 100 °C y 110 °C) y tres valores de pH (2,5; 4,6 y 5,5). El proceso de hidrólisis se controló para cuantificar azúcares como fructosa, glucosa y fructanos residuales mediante el método de HPLC” (Michel-Cuello et al., 2015, p. 617).

“La ecuación base para la formulación de este modelo fue establecida por Seaman (1945) y se basa en la hidrólisis y sacarificación de la madera Eq. (1). Esta ecuación muestra el proceso de hidrólisis de celulosa liberando glucosa y la transformación libre a productos de degradación parcial posteriores” (Michel-Cuello et al., 2015, p. 618). Sin embargo, este modelo es aplicable a otros sistemas y fue adaptado por García-Soto et al. (2011) para la hidrólisis de fructanos Eq. (2).





Donde los fructanos (P) se hidrolizan y liberan monómeros de azúcar reductores (M), estos pueden sufrir una degradación parcial y producir furanos (D); también se observan en la constante de velocidad de hidrólisis ( $K_h$ ) y la velocidad de degradación ( $K_d$ ), donde el modelo, la hidrólisis y la degradación son procesos irreversibles. A partir de estas ecuaciones, el modelo matemático establecido para las velocidades de reacción se define como (Michel-Cuello et al., 2015, p. 618):

$$\frac{d[P]}{dt} = -K_h [P] \quad (3)$$

Para las condiciones iniciales ( $t = 0$ )

$$[P] = P_0 \quad (4)$$

El modelo descrito en las ecuaciones 3 y 4 se resolvió analíticamente, de modo que se obtiene la siguiente expresión:

$$[P] = P_0 e^{-k_h t} \quad (5)$$

El valor de la constante cinética ( $k_h$ ) se obtiene mediante la aplicación del método programado integral Scilab 5.2.1 (Le Chesnay Cedex, Francia).

La temperatura y el pH de la muestra ejercen efectos significativos en las cinéticas. El principal producto de hidrólisis de fructanos es la fructosa y el grado de hidrólisis varió entre 27 %, 28 % y 92,10 %.

“El pH tiene efecto en la velocidad inicial de degradación del sustrato, ya que las muestras de jugo con pH 2,5 muestran una mayor velocidad de hidrólisis” (Michel-Cuello et al., 2015, p. 619). Las muestras de jugo a una temperatura de 110 °C tienen una hidrólisis más eficiente, resultados que concuerdan con los de García-Soto et al. (2011), quienes encontraron que la mayor eficiencia térmica de hidrólisis de fructanos de agave está en un rango de temperatura de 106 °C a 116 °C.

Bautista, García Oropeza, Barboza-Corona y Parra Negrete (2001) estudiaron “el *Agave tequilana* Weber variedad azul y la producción de tequila, bebida que se obtiene de esta planta, mejor conocida como *agave azul*” (p. 33). El número de plantas cultivadas por hectárea es de aproximadamente entre 2500 plantas y 2800 plantas, alcanzando la madurez en un período de seis a diez años, dependiendo de las condiciones climáticas (Guzmán, 1997).

“La calidad de las piñas es alta cuando presentan un alto contenido de ART que es del 25 % al 30 %.” (Bautista, et al., 2001, p. 37). El peso de las cabezas oscila entre 25 y 45 kg (Nobel, 1998).

Durante la hidrólisis ocurren cambios químicos en la materia prima que permiten la fermentación, lo cual influyen en las características sensoriales del tequila. Sin embargo, no siempre estos cambios son benéficos, y cuando no existe un control estricto en el cocimiento y en la calidad de la materia prima, se producen algunos compuestos no deseables tales como fenoles, furfural e hidroximetilfurfural, entre otros (Téllez, 1998).

En la etapa de fermentación, se forman alcoholes y compuestos volátiles, los factores que influyen en la producción de estos compuestos son la concentración y composición del mosto, temperatura, la variedad de las cepas de levadura, la concentración del inóculo, el flujo de aire y la concentración de  $CO_2$  formado (Pinal y Gschaedler, 1998).

Godínez (2012) estudió “las variables que influyen en el proceso de fermentación alcohólica tales como: temperatura, grados Brix ( $^{\circ}$ Brix), consumo de azúcares fermentables AF (fructosa y glucosa), concentración de biomasa, concentración de nitrógeno y producción de alcohol etílico” (p. 1).

Para el apropiado inicio de la fermentación alcohólica a condiciones aerobias es importante que las células de levadura dispongan de iones amonio para su adecuada velocidad de reproducción y crecimiento; por ello, se utiliza como fuente de nitrógeno el fosfato diamónico ( $(NH_4)_2HPO_4$ ) (Russell, 2003; Jiménez y Lí, 2008). Walker (1998) menciona que a condiciones aerobias, las células de levadura utilizan el

nitrógeno para la síntesis de proteínas, enzimas, aminoácidos, vitaminas, y la producción de alcoholes superiores, ácidos orgánicos, etcétera (Godinez 2012, p. 58).

Morán-Marroquín, Córdoba, Estarrón, y Díaz-Montaña (2009) estudiaron el efecto del pH y el flujo del aire sobre producción de biomasa, etanol y la síntesis de compuestos aromáticos, el consumo de azúcares reductores, los rendimientos y velocidades de producción de biomasa y alcohol etílico de dos cepas tequileras de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas en continuo (p. 1).

El tequila es una bebida destilada, elaborada a partir de la fermentación de jugo de *Agave*. Dependiendo de la industria tequilera, la fermentación puede ser espontánea llevada a cabo por las levaduras naturales del jugo o inoculadas con levaduras comerciales, principalmente *Saccharomyces cerevisiae* (Díaz-Montaña, Délia, Estarrón y Strehaiano, 2008).

Morán-Marroquín, Córdoba, Valle, Estarrón y Díaz-Montaña (2011) examinaron “el efecto de la velocidad de dilución y la adición de nutrientes sobre la fermentación y síntesis de compuestos volátiles de dos géneros nativos de *Saccharomyces cerevisiae*: S1 y S2, en cultivos continuos alimentados con jugo de *Agave tequilana*” (p. 87).

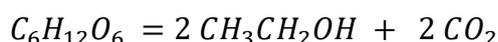
La fermentación es una de las etapas más importantes en el proceso de elaboración del tequila, en la que los azúcares (principalmente, fructosa) se transforman en etanol y CO<sub>2</sub>, y en una gran variedad de productos secundarios, como los compuestos volátiles involucrados en el aroma del tequila (Lappe et al., 2008). Benn y Peppard (1996) analizaron los perfiles aromáticos del tequila e identificaron más de 175 compuestos volátiles en los tres tipos de tequila: blanco, reposado y añejado. La mayoría de estos compuestos son sintetizados por la levadura; por tanto, es importante identificar los factores que influyen en el crecimiento de la levadura y la síntesis de metabolitos durante la fermentación. Estos factores incluyen: factores de crecimiento, fuentes de nitrógeno y fósforo, oxígeno y minerales; toxicidad del etanol, ácidos orgánicos y ácidos grasos, temperaturas extremas (Bisson, 1999).

El jugo de *Agave tequilana* es deficiente en fuentes de nitrógeno, con aminoácidos como fuente de nitrógeno; la concentración natural de 0.02 mg  $N_2/L$  no es suficiente para el crecimiento equilibrado de la levadura y para completar la fermentación de los azúcares reductores (Valle-Rodríguez, Córdoba, Hernández, Estarrón y Díaz-Montaña, 2011). Se eligió el fosfato de amonio (AP) como fuente de nitrógeno, ya que altas cantidades de sulfato de amonio podrían estimular la formación de indeseables compuestos de azufre, afectando las características sensoriales de la bebida.

La falta de oxígeno es un factor limitante principal para la fermentación (Bisson, 1999), ya que las levaduras requieren bajas cantidades de oxígeno para sintetizar algunos lípidos esenciales para asegurar la integridad de la membrana celular (Mauricio et al., 1997).

Leal, Tarantino, Hernández y Moran (2014) estudiaron el efecto de las variables de temperatura y pH en el rendimiento de la fermentación alcohólica del mosto de *Agave cocui*. Primero estudiaron la temperatura: 27 °C, 31 °C, 33 °C, 35 °C y 37 °C; a pH constante. Luego, evaluaron el pH: 3,0; 4,0 y 5,0; a temperatura constante. Los resultados obtenidos indicaron que el máximo rendimiento de la fermentación alcohólica es a temperatura de 33 °C y pH de 4,0; con una productividad de etanol de 1,14 g/L\*h y rendimiento del 81,5 %. (p.376).

El rendimiento de la fermentación alcohólica se calculó según la ecuación:



Herrera et al. (2009) proponen “un modelo matemático de la fermentación alcohólica del jugo de *Agave tequilana* para la obtención de tequila, teniendo en cuenta la inhibición del proceso por: la concentración de sustrato y formación de alcohol etílico” (p. 1). “A pesar de las ventajas potenciales del uso de los sistemas en continuo, son escasos los estudios reportados en el proceso de producción del tequila” (Díaz, 2004).

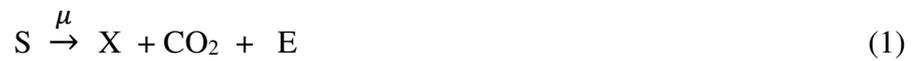
Las ventajas que presenta el uso de un modelo matemático en la fermentación alcohólica son simulación del proceso, disminuyendo los costos de investigaciones industriales (Volesky y Votruba, 1992); optimización matemática de producción de metabolitos de interés (Modak, Lim y Tayeb, 1986); control del proceso de

fermentación (Kuhlmann, Bogle y Chalabi, 1998; y Smets, Claes, November, Bastin y Van Impe, 2004), (Herrera et al., 2009, p. 1).

En ese trabajo se propone un modelo dinámico para un cultivo por lote del proceso fermentativo del tequila. Este modelo toma en cuenta inhibición por sustrato y producto.

### Modelo matemático

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en ausencia de oxígeno, consume los sustratos (S) del medio del cultivo para formar mediante una reacción reductiva etanol (E), biomasa (X) y bióxido de carbono ( $CO_2$ ) tal como se muestra en la siguiente reacción. (Herrera et al., 2009, p. 2).



El modelo no lineal de un cultivo en continuo para la producción de etanol se puede representar por el siguiente conjunto de ecuaciones diferenciales.

$$\dot{x}_1 = (\mu - D) x_1 \quad (2)$$

$$\dot{x}_2 = - (Y_{xs} + Y_{ps}) \mu x_1 - m_s x_1 - (-S_0 + x_2) D \quad (3)$$

$$\dot{x}_3 = \alpha \mu x_1 - D x_3 \quad (4)$$

donde  $x_1$  es biomasa (g/L),  $x_2$  es sustrato (g/L),  $x_3$  es etanol (g/L),  $Y_{xs}$  (g X/g S) y  $Y_{ps}$  (g P/g S) son factores de rendimiento de biomasa y producto a partir del sustrato,  $S_0$  (g/L) es la concentración de sustrato de alimentación,  $m_s$  (g/L) es el coeficiente de mantenimiento celular,  $\alpha$  es un término asociado al crecimiento y  $D$  ( $h^{-1}$ ) es la tasa de dilución. En este caso,  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) es la velocidad específica de crecimiento que depende del sustrato y el etanol presente en el medio del cultivo (Herrera et al., 2009, p. 2).

$$\mu (x_2 + x_3) = \frac{\mu_{max} x_2}{k_s + x_2 + x_2^2 k_i} (1 - x_3 k_p) \quad (5)$$

Donde:  $k_s$  (g/L) es un término de saturación de sustrato,  $k_i$  (g/L) y  $k_p$  (g/L) son parámetros de inhibición por sustrato y producto respectivamente. Cuando en el sistema (2-4)  $D = 0$  se obtiene un cultivo por lote (Herrera et al., 2009, p. 2).

Podemos definir a  $x = (x_1, x_2, x_3)^T$  como un vector de estados en  $\mathfrak{R}^3$ , asimismo  $\dot{x} = f(x)$  es el conjunto de ecuaciones diferenciales lineales donde  $f(x) = [f_1(x), f_2(x), f_3(x)]$  representa el campo vectorial cuyas componentes están dadas por la parte derecha de (ecuaciones 2 - 4). Los puntos de equilibrio de  $\dot{x} = f(x)$  se pueden obtener haciendo  $f(x) = 0$  y solucionando el sistema, con lo que se obtiene (Herrera et al., 2009, p. 2):

$$x_{1\_Ieq} = \frac{D(-x_2 + S_0)}{YD + m_s} \quad (6)$$

$$x_{2\_Ieq} = \frac{-\gamma \pm \sqrt{\gamma^2 - 4\varphi}}{2K} \quad (7)$$

$$x_{3\_Ieq} = \frac{-D(k_s + x_2 + x_2^2 k_i)}{\mu x_2 k_p} \quad (8)$$

Donde:

$$\gamma = \mu_{max} m_s + (\mu_{max} (Y - \alpha k_p S_0) - DY + m_s) D$$

$$\varphi = D^2 k_s (\Psi Y + k_i m_s^2 - \alpha \mu_{max} k_p m_s)$$

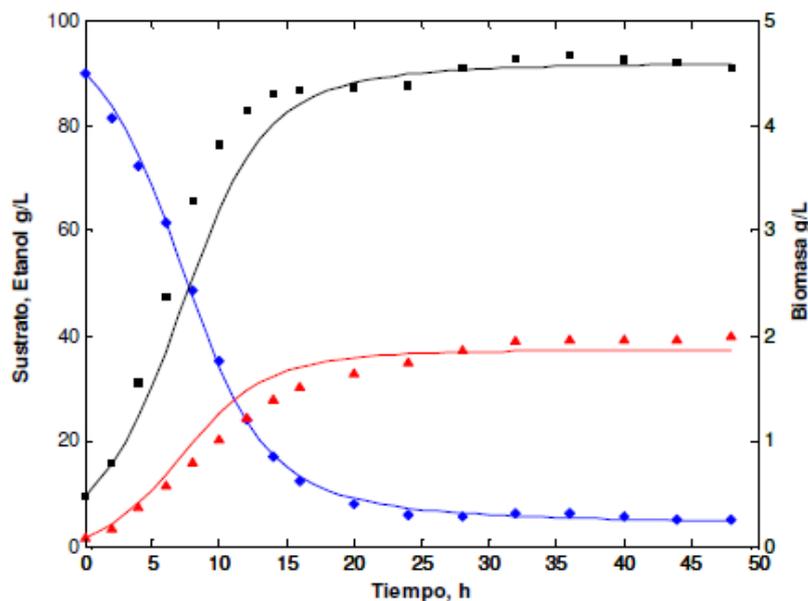
$$K = D\alpha \mu_{max} k_p - D^2 k_i Y - D k_i m_s$$

Además:

$$\Psi = -D\alpha \mu_{max} k_p + D^2 k_i + 2D k_i m_s$$

$$Y = Y_{xs} + Y_{ps}$$

En la figura 1, se aprecia el gráfico del modelo matemático de simulación de fermentación en lote para concentración de sustrato inicial es de 90 g/L.



**Figura 1:** Gráfica del modelo matemático de fermentación del mosto con concentración inicial de azúcares reductores de 90 g/L. Datos experimentales dados por (■) Biomasa, (◆) Sustrato y (▲) Etanol. (Herrera et al., 2009).

La tabla 3 muestra los valores de rendimientos y parámetros del modelo matemático aplicado a la fermentación alcohólica en lote, con concentraciones iniciales de azúcares reductores de: 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L.

Tabla 3

*Parámetros del modelo de fermentación en lote y continuo*

Parámetro	Lote 30 (g/L)	Lote (90 g/L)	Continuo
$\mu_{max}$	0,2717	0,5372	0,2735
$K_s$	98,414	204,131	92,891
$k_i^*$	0,0058	0,0089	0,0029
$k_p^*$	0,1054	0,02669	0,0179
$Y_{xs}^*$	14,080	17,980	11,700
$Y_{ps}^*$	2,630	2,540	47,125
$m_s$	-0,0126	0,0053	0,0017
$\alpha$	6,160	87,053	75,498

Nota: los parámetros ( $Y_{ps}^{-1}$ ,  $Y_{xs}^{-1}$ ,  $K_i^{-1}$  y  $K_p^{-1}$ ) fueron representados en el modelo (2 -5) como  $Y_{ps}$ ,  $Y_{xs}$ ,  $K_p$  y  $K_i$  por conveniencia algebraica (Herrera et al., 2009).

López-Álvarez, Díaz-Pérez y Campos-García (2012) realizaron análisis comparativos “de rendimiento de alcohol etílico y compuestos volátiles durante la fermentación de mostos de *Agave* utilizando cepas de levadura *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 y cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* Pan1” (p. 614).

La concentración de sólidos solubles del mosto de *Agave tequilana* Weber utilizada en la fermentación fue de 14 °Brix, los mostos contenidos en los tanques de fermentación fueron inoculados con cepas de levadura a la concentración de  $145 \times 10^6$  células/mL, la fermentación se realizó a temperatura ambiente entre los 20 °C y 28 °C, durante 90 h de proceso (Lopez et al., 2012, p. 615).

El contenido de compuestos mayoritarios y volátiles minoritarios en la bebida destilada (tabla 4), se determinó por cromatografía de gases (GC). La cuantificación de los compuestos mayoritarios se basó en curvas de calibración para acetaldehído, acetato de etilo, metanol, n-propanol, alcohol isoamílico, isobutanol, n-butanol y 2-fenil etanol como estándares y usando el estándar interno 2-pentanol como factor de corrección (De León-Rodríguez et al., 2006; Lopez et al., 2012, p. 617).

Tabla 4

*Comparación de compuestos volátiles mayoritarios contenidos en el “Tequila blanco” elaborado a nivel industrial, con dos levaduras distintas; Kluyveromtces marxianus UMPe-1 y Saccharomyces cerevisiae Pan1*

	Compuesto mg/100 mL		
	<i>K marxianus</i> UMPe - 1	<i>S. cerevisiae</i> Pan 1	Aumento/disminución Veces**
Etanol	NC	Nc	0
N - Propanol	75	20	3.7
Isobutanol	115	30	3.8
Alcohol Isoamílico	306	50	6.1
2 - Pentanol*	76	10	7.6
Metanol	314	350	-0.1
Acetaldehido	7.4	10	-0.25
N - Butanol	2	12	-6
Acetato de etilo	2.6	15	-5.7
Lactato de etilo	3	20	-6.6

Los datos fueron obtenidos por inyección de 1 µl del destilado tequila blanco, obtenido a 55° Alc. Vol., en un cromatógrafo de gases. \* Estándar interno usado como factor de corrección en la cuantificación. \*\* Signo negativo indica disminución en UMPe-1 respecto a Pan1. NC, no cuantificado (López et al., 2012).

## 2.2 Bases teóricas

### 2.2.1 Cabuya azul (*Agave americana* Linneo)

El nombre “agave” proviene de la palabra griega *Agavos*, propuesto por el naturalista sueco Carlos Linneo en 1753, plantas oriundas de América con hojas suculentas, arregladas en espiral alrededor del tallo corto, en cuyos bordes se encuentran espinas marginales y una terminal en el ápice (García-Mendoza, 2012).

Estas plantas se pueden encontrar en diversos hábitats, soportan bien las sequías y crecen en suelos eriazos de poca disponibilidad de agua. Se desarrollan mejor en climas templados de los valles y laderas de las montañas interandinas, se extienden hasta los 3500 metros sobre el nivel del mar.

“Existen unas 210 especies, de las cuales, el 75 % es originario de México. Algunas de estas especies se cultivan en grandes extensiones de terreno para su explotación industrial a gran escala” (García-Mendoza, 2012).

“El *Agave tequilana* Weber variedad azul pertenece a la familia de las Agaváceas. Sus principales características son las hojas largas, fibrosas, de forma lanceolada y color azul. La parte aprovechable para elaborar tequila es la piña o cabeza” (Ibarra, Botero y Cortés, 2010).

El ciclo biológico del cultivo de agave oscila entre los seis y ocho años. Durante ese tiempo, al crecer, la piña o cabeza llega a pesar entre 35 kg y 120 kg, aunque algunas alcanzan hasta los 150 kg, dependiendo del cuidado dado por el agricultor. La madurez de la planta se manifiesta con la aparición del llamado “quiote”, pero este debe ser cortado rápidamente, pues su permanencia en la planta consume los azúcares acumulados durante años (Ibarra et al., 2010). En la tabla 5, se describe la taxonomía de la variedad de cabuya azul existente en el Perú.

Tabla 5  
*Taxonomía del Agave americana L.*

Taxonomía	
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Liliidae
Orden	Liliales
Familia	Agavaceae
Género	Agave
Especie	Agave americana L
Subespecie	Americana

Fuente: Cervantes L. y Cuya S. Tesis, *Elaboración de Miel de Cabuya y Estudio de Prefactibilidad de una Planta en el Distrito de huanca Huanca, Provincia de Angaraes, Departamento de Huancavelica*. 2015.

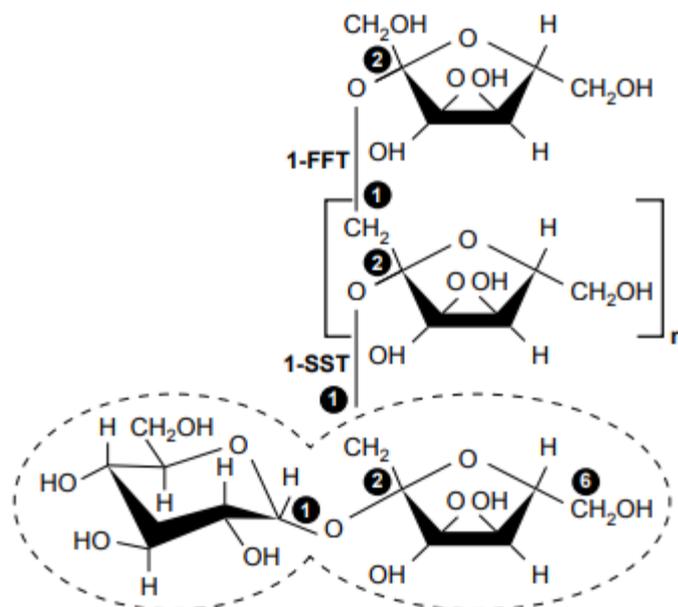
### 2.2.2 Saponinas

Las saponinas son compuestos naturales con propiedades detergentes debido a su estructura formada por una parte terminal esteroidal, hidrofóbica y la otra parte terminal hidrofílica, constituida por moléculas de monosacáridos (Hernández et al., 2005). Nobel (1998) y Herrera et al. (2007) afirman que se encuentran presentes en concentraciones altas en jugos de cabuya verdes, actuando como inhibidores (por su contenido de ácidos grasos) de la fermentación alcohólica al romper las paredes celulares de las levaduras.

### 2.2.3 Fructanos

Los fructanos de agave tequilana (ATF) son polímeros de fructosa con un residuo de glucosilo interno o externo. Las estructuras ramificadas complejas combinan restos de fructosa unidos por enlaces  $\beta$  (2  $\rightarrow$  1) y  $\beta$  (2  $\rightarrow$  6). El grado de polimerización varía de 3 a 29 unidades de fructosa (Lopez et al., 2003). La proporción de fructosa libre y polimerizada, así como el grado de ramificación de ATF, cambia en función de la edad de la planta (Arrizon et al., 2010). Los ATF son muy importantes para la agroindustria

mexicana ya que constituyen la principal materia prima para la producción de tequila (Arrizon et al., 2010; Arrizon et al., 2012, p. 560).



**Figura 2:** La inulina tiene una cadena lineal de fructosilo  $\beta$  (1-2) unida al residuo de fructosilo del iniciador de sacarosa. (Ritsema y Smeekensy, 2003).

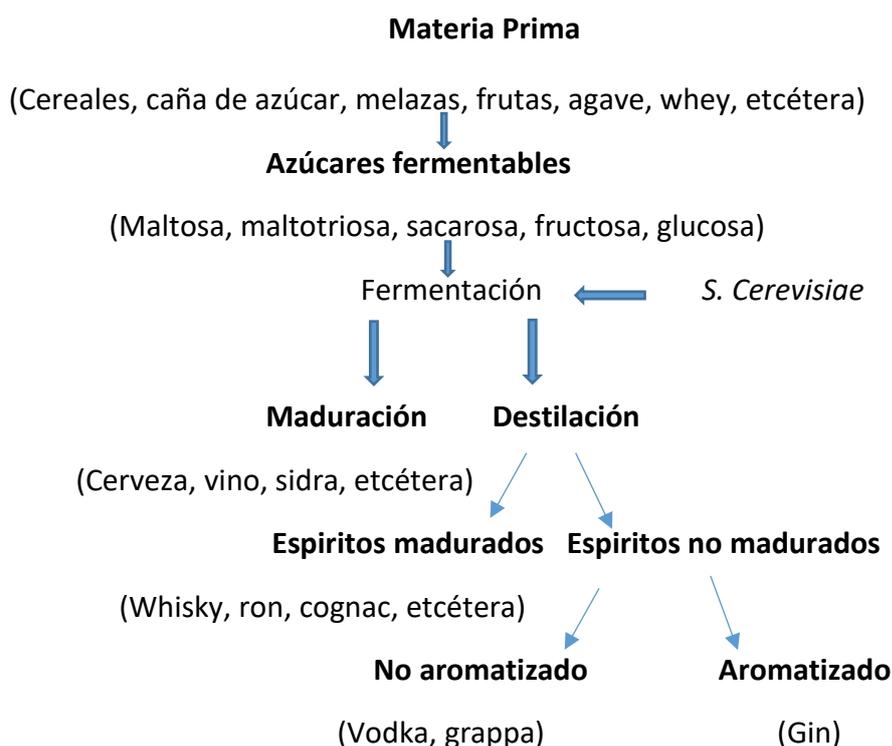
#### 2.2.4. Levaduras: generalidades

Las levaduras son organismos eucariotas de gran diversidad de tamaño, forma y color. Se las considera como hongos unicelulares y, generalmente, sus células son ovaladas, pero también pueden encontrarse en forma esférica, cilíndrica o elíptica. Son de mayor tamaño que las bacterias y alcanzan un diámetro máximo de entre cuatro y cinco  $\mu\text{m}$ . Se reproducen por fisión binaria o gemación y algunas pueden ser dimórficas o bifásicas, y crecen como micelio bajo condiciones ambientales especiales (Ochoa y Vásquez, 2004; Pérez, 2007).

#### *Saccharomyces cerevisiae*: características generales

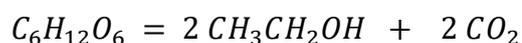
La levadura desempeña un papel vital en la producción de las bebidas alcohólicas (figura 3). La selección de cepas de levadura adecuadas es esencial no solo para

maximizar el rendimiento de alcohol, sino también para mantener la calidad sensorial de la bebida. La *Saccharomyces cerevisiae*, generalmente, tiene una forma elipsoidal con un gran diámetro de 5 a 10  $\mu\text{m}$ . Todas las levaduras son hongos unicelulares que tienen características de ultraestructura similares a las de las células eucariotas superiores (Walker y Stewart, 2016).



**Figura 3: Funciones clave de *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de bebidas fermentadas. (Walker y Stewart, 2016).**

Conversión estequiométrica del etanol a partir de glucosa:



Glucosa                      Etanol                      Dióxido de carbono

Por cada kilogramo de glucosa fermentada, se produce, en teoría, 500 g de etanol aproximadamente. Sin embargo, en las fermentaciones industriales, los mejores rendimientos llegan a solo el 90 % de la conversión teórica debido a que un poco de carbón fermentable se desvía a biomasa nueva y para la biosíntesis de metabolitos de la fermentación (compuestos aromatizantes, etcétera).

### Curva de crecimiento celular

La curva que representa la concentración celular en el cultivo como una función del tiempo se llama “curva de crecimiento” (figura 4).

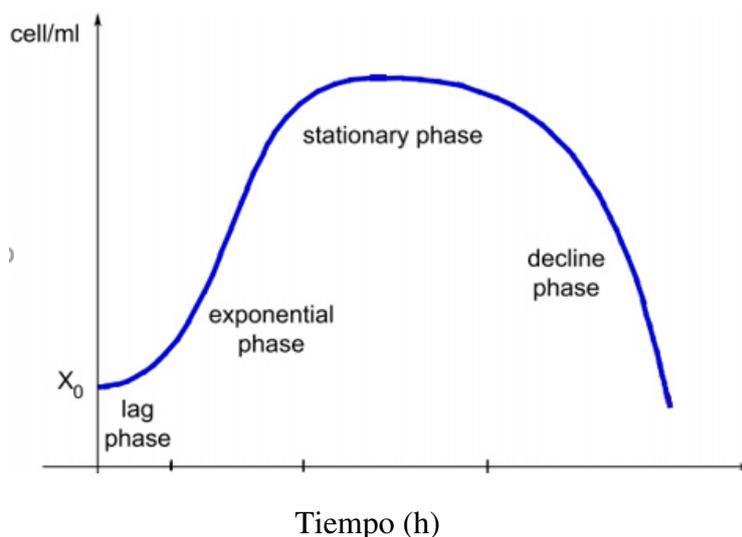


Figura 4: Curva de crecimiento celular. (Carcano, 2010).

#### 2.2.5. Fermentación alcohólica

La fermentación se define en microbiología como el tipo de metabolismo de una fuente de carbono en el que se genera energía mediante la fosforilación a nivel de sustrato y en el que las moléculas orgánicas funcionan como aceptor final de electrones (o como aceptores de los equivalentes reductores) generados durante la descomposición de compuestos que contienen carbono o catabolismo. Como es bien sabido, cuando el aceptor final es un compuesto inorgánico, el proceso se denomina respiración. La respiración se denomina aeróbica si el aceptor final es oxígeno y anaeróbica cuando es algún otro compuesto inorgánico fuera del oxígeno, por ejemplo, sulfato o nitrato. (Nduka Okafor, Modern Industrial Microbiology and Biotechnology, Science Publisbers, 2007, p. 10).

La conversión de piruvato a etanol (Figura 5) como el principal producto metabólico de la levadura, se obtiene mediante dos pasos después de la obtención de piruvato por

vía glucolítica. En primer lugar, se produce la descarboxilación del piruvato a acetaldehído, catalizada por el piruvato descarboxilasa; esta reacción va seguida por la reducción del acetaldehído a etanol, catalizada por el alcohol deshidrogenasa (Mathews y Van Holde, 1998).

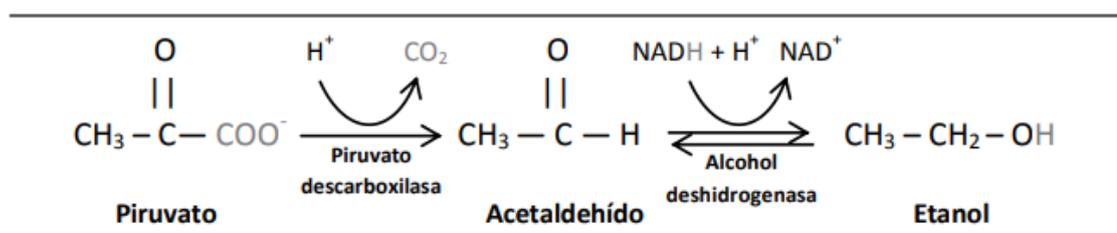


Figura 5: Reacción de la fermentación alcohólica. (Mathews y Van Holde, 1998).

### 2.2.6. Efecto de las variables del proceso sobre el rendimiento de la fermentación

Las interacciones entre la velocidad de lanzamiento de la levadura, la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto en la fermentación son complejas. Influyen en la eficiencia de la fermentación, medida tanto como el tiempo de residencia en el recipiente como el equilibrio entre el rendimiento de etanol y el crecimiento de la levadura. Además, aunque la composición del mosto y la cepa de levadura son determinantes importantes del sabor de la cerveza, influyen en la formación de metabolitos activos del sabor. La elección de valores apropiados para temperatura, presión, velocidad de lanzamiento y concentración de oxígeno del mosto implica cierto compromiso (Chris Boulton & David Quain, *Brewing Yeast and Fermentation*, Blackwell Science Ltd, 2001, p. 423).

#### 2.2.6.1. Influencia de la concentración de sustrato S.

El modelo de tasa de crecimiento específico analítico más extendido es sin duda la “ley de Michaelis-Menten”, también llamada a menudo la “ley de Monod”, que expresa la dependencia de  $\mu$  de la concentración de sustrato S de la siguiente manera (G. Bastin & D. Dochain, *On-Line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors*, Elsevier Science Publishers, 1990, p. 1):

$$\mu(S) = \frac{\mu^* S}{K_M + S}$$

Donde  $\mu^*$  es la velocidad máxima de crecimiento

$K_M$  es la constante de Michaelis – Menten

#### **2.2.6.2. Requerimiento de oxígeno.**

La falta de suministro de oxígeno al inicio de la fermentación da como resultado una velocidad de fermentación lenta, una atenuación incompleta y un crecimiento deficiente de la levadura. Se requiere oxígeno en la fermentación para permitir que la levadura sintetice esteroides y ácidos grasos insaturados. Estos lípidos son componentes esenciales de las membranas (Parks, 1978; Brenner, 1984; Weete, 1989; Nes et al., 1993). Por tanto, *S. cerevisiae* es capaz de crecer en condiciones estrictamente anaeróbicas solo cuando existe un suministro exógeno de esteroides y ácidos grasos no saturados (Andreason y Stier, 1953, 1954). En condiciones aeróbicas, los esteroides y los ácidos grasos insaturados pueden sintetizarse a partir de carbohidratos (Chris Boulton & David Quain, *Brewing Yeast and Fermentation*, Blackwell Science Ltd, 2001).

#### **2.2.6.3. Temperatura.**

La temperatura tiene un efecto, principalmente, sobre la velocidad de fermentación por medio de su efecto sobre el crecimiento de la levadura y la tasa metabólica. La mayoría de las cepas de levadura tiene una temperatura máxima de crecimiento dentro del rango de 30°C a 35 °C, lo que sugiere que se podrían lograr fermentaciones muy rápidas. De hecho, varios factores impiden el uso de temperaturas muy altas. Alguna pérdida de componentes volátiles del sabor y etanol por la extracción de gas es inevitable en todas las fermentaciones (Chris Boulton & David Quain, *Brewing Yeast and Fermentation*, Blackwell Science Ltd, 2001, p. 424).

#### **2.2.6.4. Tasa de inoculación de levadura.**

Las fermentaciones se inoculan dentro del rango de  $5 \times 10^6$  células/ml. En términos de peso, estas tasas equivalen a 1,5 g /L a 6,0 g /L peso húmedo (0,3-1,2 g/L peso

seco). La tasa de inoculación debe basarse en la gravedad del mosto y debe producir una fermentación lo más rápida posible sin comprometer la calidad de la cerveza o el tamaño de la cosecha de levadura. La tasa de inoculación influye tanto en la velocidad de fermentación como en el grado de crecimiento de la levadura (Chris Boulton & David Quain, *Brewing Yeast and Fermentation*, Blackwell Science Ltd, 2001, p. 424).

#### **2.2.6.5. Presión.**

Durante la fermentación, los efectos de la presión pueden manifestarse de tres formas. Todos tienen el potencial de influir en el rendimiento. Primero, hay una presión hidrostática debido a la altura del recipiente de fermentación. En segundo lugar, las células de levadura están sujetas a una presión osmótica, o actividad de agua variable, que está relacionada con la composición del mosto. En tercer lugar, en recipientes cerrados es posible restringir la salida de dióxido de carbono y permitir que el fermentador se presurice. Los extremos de presión tienen el potencial de ejercer efectos nocivos sobre las células de levadura. Sin embargo, las fermentaciones pueden realizarse bajo una presión superior moderada sin ningún efecto sobre la levadura (Chris Boulton & David Quain, *Brewing Yeast and Fermentation*, Blackwell Science Ltd, 2001, p. 430).

#### **2.2.6.6. Concentración del producto de síntesis $P$ .**

Es un hecho bien conocido que, en particular las fermentaciones, el producto de síntesis también puede inhibir el crecimiento de biomasa. Ejemplos típicos son las fermentaciones alcohólicas o etanólicas sobre glucosa para las que se han sugerido los siguientes modelos (G. Bastin and D. Dochain, *On-Line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors*, Elsevier Science Publishers, 1990, p. 15):

$$\mu(P) = \frac{K_P}{K_P + P}$$

$$\mu(P) = \exp(-K_P P)$$

Con  $K_P$  constante

### 2.2.6.7. pH.

El crecimiento de la biomasa solo puede tener lugar realmente si el pH y la temperatura se encuentran dentro de rangos (generalmente pequeños) de valores admisibles. En la digestión anaeróbica, por ejemplo, se sabe que el proceso funciona correctamente solo para pH casi neutro (= 7). Para este proceso, Rozzi propone tratar la influencia del pH mediante una ley parabólica derivada de datos experimentales (G. Bastin and D. Dochain, On-Line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors, Elsevier Science Publishers, 1990, p. 15).

$$\mu(pH) = a pH^2 + b pH + c$$

Con a, b, c constantes.

### 2.2.7 Metabisulfito de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)

El sulfito es usado para proteger el deterioro del mosto contra las levaduras malas y bacterias. El oxígeno del aire causa una reacción enzimática con las oxidasas (polifenoloxidasas), por lo cual se produce la oxidación de compuestos aromáticos y pigmentos.

El SO<sub>2</sub> es muy reactivo y se encuentra en el mosto tanto en forma libre como en forma combinada: la forma libre es el SO<sub>2</sub> molecular o no ionizado, y las formas combinadas están bajo las formas del anión bisulfito y anión sulfito. Las proporciones de cada una de estas tres formas dependen del pH del mosto: en mostos más ácidos, hay más SO<sub>2</sub> no disociado, la cual es la más germicida. El SO<sub>2</sub> es la forma más específica del dióxido de azufre libre que provee el efecto antioxidante y preservante. Se ha determinado que la concentración molecular de SO<sub>2</sub> de 0,8 g/L provee una adecuada protección. La efectividad de la concentración molecular del SO<sub>2</sub>, sin embargo, es afectada por la concentración de SO<sub>2</sub> libre y por el pH; así, para obtener 0,8 g/L de SO<sub>2</sub> molecular, se necesitarán diversas cantidades de SO<sub>2</sub> libre con diferentes valores de pH.

## CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES

### 3.1 Hipótesis de la investigación

#### Hipótesis I

Es posible lograr rendimientos mayores al 90 % del valor teórico, en el proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de la cabuya azul (*Agave americana* L.), si el mismo se realiza en un rango de temperatura de 90 °C a 110 °C y pH de 2,5 a 5,5, durante un periodo de 2 h a 10 h.

#### Hipótesis II

Es posible lograr rendimientos mayores a 90 % del valor teórico del proceso de fermentación alcohólica del jugo de cabuya azul (*Agave americana* L.), empleando cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, D 47 – Lalvin, y si este se realiza en condiciones de temperatura de 24 °C, 28 °C, 32 °C; a concentraciones de nutriente fosfato diamónico (DAP) de 1 g/L y 2,0 g/L; a pH de 3,5 y 4,5 y concentraciones de sustrato de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L durante un tiempo de proceso de 26 h.

### 3.2 Variables

En la siguiente tabla, se presentan las variables dependientes e independientes consideradas para la investigación.

Variables Independientes del Proceso de Hidrólisis				
N°		Definición	Indicadores	Instrumentos
1	Temperatura	Influencia de temperatura en hidrólisis de polisacáridos	°C	Autoclave con control de T, P y tiempo

2	pH	Influencia de acidez en hidrólisis de polisacáridos		Potenciómetro
---	----	---	--	---------------

3	Tiempo	Variación hidrólisis con el tiempo	h	Control automático
---	--------	------------------------------------	---	--------------------

#### **Variables independientes del proceso de fermentación alcohólica**

1	Temperatura	Influencia de temperatura en fermentación alcohólica	°C	Biorreactor con control automático de temperatura
---	-------------	--	----	---

2	pH	Influencia de acidez en fermentación		Potenciómetro
---	----	--------------------------------------	--	---------------

3	Nutriente	Influencia de fosfato diamónico (DAP) en fermentación	g	Balanza analítica
---	-----------	---	---	-------------------

4	Sustrato	Influencia de concentración azúcares reductores (AR)	mg/mL	Espectrofotómetro UV
---	----------	--	-------	----------------------

5	Tiempo	Variación fermentación con el tiempo	h	Control automático
---	--------	--------------------------------------	---	--------------------

#### **Variables dependientes del proceso de hidrólisis**

1	Concentración de AR	Variación de AR con el tiempo	mg/mL	Espectrofotómetro UV
---	---------------------	-------------------------------	-------	----------------------

#### **Variables dependientes del proceso de fermentación alcohólica**

1	Concentración levadura <i>S. cerevisiae</i>	Influencia conc. levadura en fermentación	g	Centrífuga alta velocidad, estufa, balanza analítica
---	---	---	---	--

2	Concentración de etanol	Variación conc. etanol con el tiempo	mg/mL	Espectrofotómetro UV
---	-------------------------	--------------------------------------	-------	----------------------

## **CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA**

### **4.1 Tipo y diseño de la investigación**

Según la clasificación propuesta por Hernández Sampieri, Fernández y Baptista (2014), la presente investigación es de tipo descriptiva-explicativa. Su diseño experimental comprende dos etapas: la primera etapa es la hidrólisis térmica de los polisacáridos (principalmente, fructanos) presentes en el jugo de cabuya y la segunda es la fermentación alcohólica del jugo de cabuya hidrolizado.

#### **4.1.1 Diseño del experimento de hidrólisis de polisacáridos (principalmente, fructanos) presentes en el jugo de cabuya**

El diseño del experimento es factorial de  $3^2$

Pruebas experimentales realizadas con dos repeticiones

Factores: temperatura, pH

Niveles: temperatura: 90 °C, 100 °C y 110 °C

pH: 2,5, 4,5 y 5,5

Variables de respuesta: fructosa, glucosa, azúcares reductores

En la tabla 6, se aprecia el diseño experimental del proceso de hidrólisis térmico de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul, en las condiciones mencionadas.

Tabla 6

*Matriz experimental del proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul*

Temperatura (°C)	pH	Tiempo de hidrólisis
90	2,5	10 h
	4,5	
	5,5	
100	2,5	Muestreo de las propiedades del jugo a: 2, 4, 6, 8 y 10 h de hidrólisis, para cada una de las 9 pruebas experimentales.
	4,5	
	5,5	
110	2,5	
	4,5	
	5,5	

#### 4.1.2 Diseño experimental de la fermentación alcohólica del jugo de cabuya azul

El diseño experimental se va a realizar en dos etapas:

##### Primera etapa

El diseño experimental con arreglo factorial de 3 x 2 x 2

Pruebas experimentales realizadas con dos repeticiones

Factores: pH y concentración de nutriente

Temperatura con tres niveles: 24 °C, 28 °C y 32 °C

pH con dos niveles: 3,5 y 4,5

Concentración de nutriente con dos niveles: 1 g/L y 2 g/L

Variables de respuesta: etanol

En la tabla 7, se muestra el diseño experimental de la primera etapa del proceso de fermentación alcohólica del jugo de cabuya azul, a diferentes condiciones de temperaturas, pH y concentración de nutriente (fosfato diamónico, DAP), para concentración de sustrato de 60 g/L, según lo publicado por Arellano et al. (2007).

Tabla 7

*Diseño experimental de la primera etapa de la fermentación alcohólica del jugo de cabuya azul, a concentración de sustrato de 60 g/L*

Temperatura (°C)	pH	Nutriente DAP (g/L)	Conc. Etanol en la fermentación
24	3,5	1	Muestreo para medir la
		2	concentración de etanol en el
	4,5	1	mosto, cada:
		2	2, 4, 6, 8, 10
28	3,5	1	12, 14, 16, 18, 20
		2	22, 24, y 26 h de
	4,5	1	fermentación
		2	alcohólica, para cada una de las
32	3,5	2	12 pruebas
	4,5	2	experimentales

### Segunda etapa

Diseño experimental completamente aleatorizado de un factor con tres niveles

Pruebas experimentales con dos repeticiones

Factor: concentración de sustrato

Niveles: 10 g/L, 30 g/L, y 90 g/L

Temperatura 28 °C, pH 3,5 y concentración de nutriente de 2 g/L son constantes

Variable de respuesta: etanol

En la tabla 8, se muestra el diseño experimental de la segunda etapa de la fermentación, a condiciones de la primera etapa, en la que se obtiene el máximo rendimiento de producto, y a concentraciones de sustrato de 10 g/L, 30 g/L y 90 g/L.

Tabla 8

*Diseño experimental de la segunda etapa del proceso de fermentación alcohólica a concentraciones de AR de 10 g/L, 30 g/L y 90 g/L (a condiciones de temperatura y pH de la primera etapa, en la que se obtiene el mayor rendimiento de producto)*

Sustrato (AR), (g/L)	Temperatura (°C)	pH	Nutriente DAP (g/L)	Conc. de etanol en la fermentación alcohólica
10	T <sub>1</sub>	pH <sub>1</sub>	N <sub>1</sub>	Muestreo de las propiedades del mosto a: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, y 26 h de fermentación alcohólica, para cada una de las 4 corridas experimentales
30	T <sub>1</sub>	pH <sub>1</sub>	N <sub>1</sub>	
90	T <sub>1</sub>	pH <sub>1</sub>	N <sub>1</sub>	

## 4.2. Población y muestra de la investigación

### 4.2.1. Población

Población es la colección de unidades experimentales (unidad experimental: Planta de agave americana); por tanto, la población es la colección de plantas de agave americana.

### 4.2.2. Muestra

La muestra es un subconjunto de unidades experimentales (plantas de agave americana), que son sometidas al proceso de fermentación alcohólica, mediante el proceso de hidrólisis de los fructanos bajo condiciones experimentales.

## 4.3. Procedimiento experimental

### 4.3.1. Obtención del jugo de cabuya

Los pobladores del distrito de La Merced, provincia de Churcampa, departamento de Huancavelica, se dedican a la producción artesanal de chancaca a partir del jugo de cabuya azul; por ello, tienen experiencia en determinar cuándo la planta está madura y apta para la extracción del jugo. La elaboración artesanal de chancaca a partir de jugo de la cabuya azul se observa en la figura 7 (del anexo 2): figura 7a: ollas utilizadas en el proceso, calentadas con fogatas a leña; figura 7b: jugo concentrado; y figura 7c: muestra el producto obtenido.

Como sucede con la mayoría de los productos vegetales, el desarrollo de las propiedades organolépticas —como dulzor, acidez, aromas, sabores, etcétera— tiene lugar en el estado de completa madurez; por tanto, es importante realizar la extracción del jugo cuando la planta se encuentra en el estado de óptima madurez. Una característica distintiva de la planta de cabuya es que después de florecer, cumple su ciclo de vida; entonces, hay que realizar la extracción del jugo de la planta, antes de que le salga el escapo floral (García-Herrera, Méndez y Talavera, 2010).

A continuación, se describen algunas características físicas que indican que la planta se encuentra madura según García Herrera et al. (2010) y según la experiencia y conocimientos ancestrales de los pobladores del distrito de Chincho y de la provincia de Angaraes, ambas provincias pertenecientes al departamento de Huancavelica:

- Las hojas de la planta se vuelven más gruesas.
- Las hojas externas de la planta se inclinan hacia abajo.
- El tronco de la planta es más voluminoso.
- Las hojas que hay alrededor de la parte superior del tronco son más delgadas y erguidas.

En la figura 8 (del anexo 2), se comparan plantas de cabuya azul, completamente maduras y sin madurar. En la figura 8a, se aprecia la planta madura con las hojas más gruesas e inclinadas hacia abajo (provincia de Huánuco, departamento de Huánuco), y en la figura 8b, se muestran plantas aún no maduras, con las hojas delgadas y orientadas hacia arriba (distrito de La Merced, provincia de Churcampa, departamento de Huancavelica).

Seleccionada la planta madura, se cortan las hojas externas, de tal manera, que se tenga acceso libre al tronco, dejando el resto de este con sus respectivas hojas. Luego, se hace un hoyo en la parte superior de la piña o tronco (Ávila, Galicia, Rodríguez, Olvera y López, 2011) de, aproximadamente, 30 centímetros (cm) de profundidad y de 20 cm a 25 cm de diámetro, para acumular el jugo.

Según el tamaño de las plantas maduras, la recolección del jugo se realiza durante dos a tres meses, siendo mayor el tiempo de recolección en las plantas más grandes. La recolección se efectúa dos a tres veces al día, según el tamaño de la planta: la primera extracción se realiza entre las 4 y 5 de la mañana; la segunda, al mediodía; y la tercera extracción, entre las 3 y 5 de la tarde. En cada extracción, se obtiene unos tres litros. Después de cada extracción de jugo, se raspan las paredes del hoyo para que no se sellen y no se impida el flujo del jugo de la planta hacia el interior del hoyo, a la vez que se lo limpia para que el jugo no se fermente.

En la figura 9 (del anexo 2), se aprecia la preparación del hoyo en la parte superior del troco de la planta. En la figura 9a, se muestra el corte de las hojas externas para acceder al tronco y hacer el hoyo, y en la figura 9b, se muestra el hoyo hecho en la parte superior del tronco de la planta, para acumular el jugo.

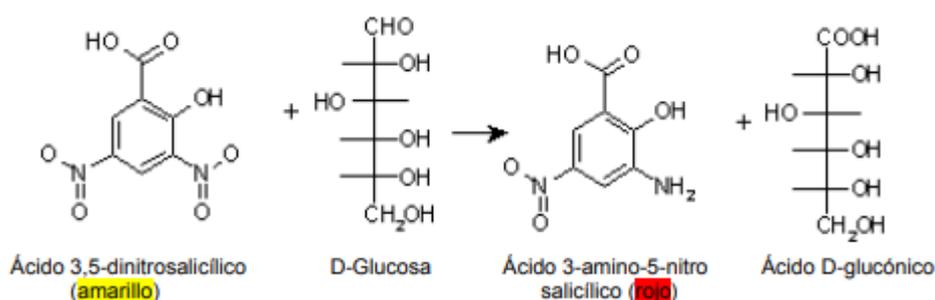
#### **4.3.2. Determinación de las propiedades físico-químicas del jugo de cabuya azul**

Se analizaron las siguientes propiedades físico-químicas del jugo: °Brix, densidad, pH y viscosidad, con los siguientes instrumentos de análisis: portable refractómetro, serie X0015RURCN; picnómetro; potenciómetro marca Milwaukee, MW 102, pH/Meter, USA, y viscosímetro QUIMIS, Brasil, respectivamente.

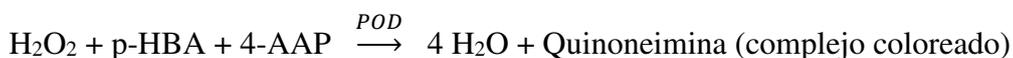
#### **4.3.3. Métodos de análisis de azúcares**

Las mediciones de los diferentes carbohidratos que se encuentran en el jugo de la cabuya azul se realizaron mediante el espectrofotómetro ultravioleta visible 6 posiciones, marca Thermo Modelo GENESYS™ 10S UV/Vis, cuantificando las

concentraciones de los azúcares por medio de una curva de calibración y utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), el cual se basa en la reducción del DNS (color amarillo) en presencia de calor debido a los azúcares reductores que entran en contacto con este, a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, desarrollándose un cambio de color parecido al café (con variaciones de amarillo hasta café). El cambio de color puede, entonces, determinarse por lecturas leídas por espectrofotometría a 540 nm (Miller, 1959).



Para la determinación de glucosa, se usó el método enzimático, GLUCOSA (GOD – PAP), el cual es un reactivo líquido utilizado para la determinación fotométrica de glucosa (Trinder, 1969).



**Determinación de azúcares totales:** se empleó el método fenol-sulfúrico para la determinación de carbohidratos totales (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers y Smith, 1956).

**Determinación de sacarosa:** este ensayo pone de manifiesto la presencia de azúcares reductores (aldosas: glucosa, ribosa, eritrosa, etcétera). Para dichos análisis, se utilizó la Norma técnica peruana, NTP 211.045).

**Determinación de fructanos tipo inulina-FOS:** tanto la inulina como las oligofructanos, bajo condiciones ácidas, pueden hidrolizarse liberando moléculas de fructuosa a pH bajos. (Madrigal y Sangronis, 2007; Franck y Levecke, 2012).

La determinación de FOS e inulina se realizan a partir de la hidrólisis enzimática y/o ácida, y se cuantifica determinando la cantidad de glucosa y fructosa liberada (Barclay, Ginic, Cooper y Petrovsky, 2010).

En la figura 10 (del anexo 2), se presentan el espectrofotómetro y las muestras con DNS para la determinación de azúcares reductores. La figura 10a muestra el espectrofotómetro ultravioleta visible 6 posiciones, marca Thermo Modelo GENESYS™ 10S UV/Vis, utilizado para la determinación de azúcares reductores presentes en el jugo de cabuya azul (Laboratorio de Investigación 523 A, Departamento de Química Analítica – Facultad de Química e Ingeniería Química – UNMSM). La figura 10b, se presentan las muestras tratadas con DNS para su respectiva lectura en el espectrofotómetro.

En la tabla 9, se resumen los diferentes métodos de análisis de azúcares y fructanos presentes en el jugo de cabuya azul.

Tabla 9

*Métodos de análisis de azúcares y fructanos presentes en el jugo de cabuya azul*

Compuesto	Método analítico
Azúcares reductores directos	Método de Miller (1959)
Glucosa	Método enzimático, glucosa (GOD –PAP) kit reactivo líquido para la determinación espectrofotométrica de glucosa.

Trinder (1969).	
Azúcares totales	Método fenol – sulfúrico para la determinación de carbohidratos totales. Dubois et al. (1956)
Sacarosa	Norma técnica peruana, NTP 211.045;
Fructanos (Inulina–FOS),	Combinación de técnicas de Franck y Levecke (2012) y de Barclay et al. (2010).

#### 4.4. Proceso de hidrólisis térmica

El proceso de hidrólisis de los polisacáridos que se hallan en el jugo de la cabuya azul (sacarosa y fructanos) se efectuó por el método de hidrólisis térmica, a diferentes condiciones de temperatura, 90 °C, 100 °C y 110 °C y a valores de pH de 2,5; 4,5 y 5,5, durante 10 h de proceso, tomando muestras cada 2 h (tabla 6).

El pH del jugo de cabuya azul, en condiciones normales, es de  $4,5 \pm 0,1$ . Para llevar a cabo la prueba experimental a diferentes pH, se procedió de la siguiente manera: para pH de 2,5, a 1 L de jugo se le agregó 1,2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 9,4 M, para evitar diluir la concentración de azúcares de la muestra. De igual manera, para llevar el pH a 5,5, a 1 L de jugo de cabuya, se agregó 1 mL de NaOH 0,1 N.

Las pruebas experimentales de hidrólisis se realizaron de la siguiente manera: 100 mL de la muestra con pH 2,5 se agregó a cada uno de los cinco frascos pírrex; luego, se procedió a taparlos herméticamente y se aplicó el tratamiento térmico de 90 °C en un equipo esterilizador marca Fagor – USA, durante 10 h, retirando un frasco cada 2 h para su respectivo análisis de azúcares reductores. Luego, al mismo pH de 2,5, se realizó el tratamiento térmico a temperaturas de 100 °C y 110 °C. De igual manera, se procedió con las muestras a pH de 4,5 y 5,5.

En la figura 11 (del anexo 2), se presenta el esterilizador y las muestras utilizadas en el proceso de hidrólisis de los polisacáridos que se encuentran en el jugo de cabuya azul. La figura 11a muestra la autoclave utilizada para la hidrólisis de los polisacáridos del jugo de cabuya azul, y en la figura 11b, se aprecian los frascos pírrex con el jugo que se iba a hidrolizar.

#### 4.5. Mediciones realizadas durante el proceso de hidrólisis

##### 4.5.1. Propiedades físico-químicas del jugo de cabuya azul

Las propiedades físico-químicas del jugo de cabuya azul del distrito de La Merced, medidas con los instrumentos indicados en el acápite 4.3.2 se presentan en la tabla 10.

Tabla 10

*Propiedades físico-químicas del jugo de cabuya azul*

Fructanos (mg/mL)	°Brix (g/100 mL sol.)	Densidad (g/mL)	Viscosidad (cp)
37,34	14,4	1,29	1,58

La figura 12 (del anexo 2) muestra la medición de la densidad del jugo de cabuya azul, utilizando un densímetro de triple uso: densidad, % de azúcar y temperatura en °C.

##### 4.5.2. Curvas de calibración para la determinación de azúcares

###### *4.5.2.1 Determinación de azúcares reductores directos y azúcares reductores totales.*

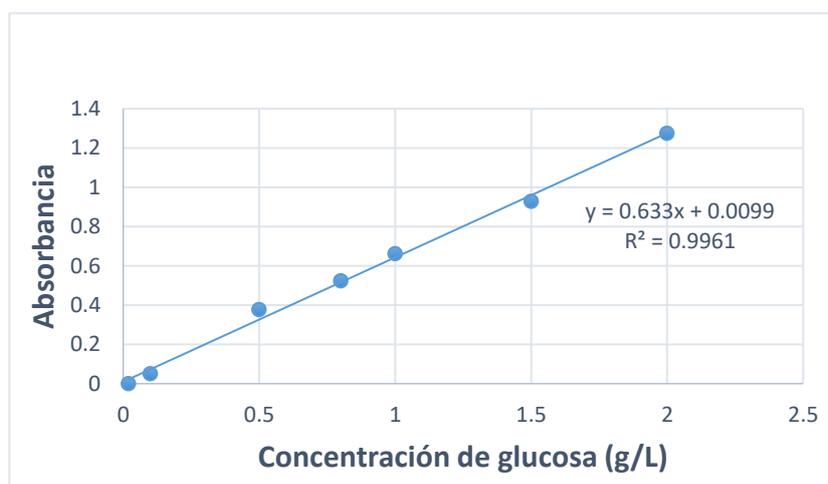
El promedio de tres mediciones de absorbancia para determinar las concentraciones iniciales de glucosa (antes del proceso de hidrólisis) en el jugo de cabuya azul,

utilizando para su medición el espectrofotómetro GENESYS™ 10S UV/Vis, a 540 nm de longitud de onda, se aprecia en la tabla 11. En la figura 6, se observa la gráfica con los valores de absorbancia versus concentración de glucosa para obtener la concentración de azúcares reductores directos y azúcares reductores totales.

Tabla 11

*Absorbancia y concentración de glucosa para la determinación de azúcares reductores directos y azúcares reductores totales*

Concentración glucosa (g/L)	% Error	Absorbancia	% Error
0,02 ± 0,0002	1,00	0,000 ± 0,000	0,00
0,10 ± 0,001	1,00	0,050 ± 0,001	2,00
0,50 ± 0,002	0,40	0,377 ± 0,001	0,26
0,80 ± 0,001	0,12	0,524 ± 0,001	0,19
1,00 ± 0,01	1,00	0,662 ± 0,003	0,45
1,50 ± 0,02	1,30	0,929 ± 0,002	0,22
2,00 ± 0,03	1,50	1,275 ± 0,003	0,24



**Figura 6: Curva de calibración para determinar azúcares reductores directos y azúcares reductores totales.**

En la figura 14 (del anexo 2), se observa la preparación de las muestras para los análisis de azúcares reductores que se hallan en el jugo de cabuya azul. En la figura 14a, se aprecia la adición de DNS, para los análisis de azúcares reductores; la figura 14b

muestra las soluciones hidrolizadas tratadas con DNS para los análisis de azúcares reductores en el espectrofotómetro UV/Vis.

#### 4.5.2.2 Determinación de azúcares totales.

En la tabla 12, se indica el promedio de tres mediciones de absorbancia para determinar las concentraciones de azúcares totales durante el proceso de hidrolisis, mediciones realizadas con un máximo de absorción de 490 nm, en el espectrofotómetro UV/Vis. En la figura 7, se muestra un gráfico de los valores de absorbancia versus concentración de azúcares totales con el fin de obtener la curva de calibración para la determinación de azúcares totales.

Tabla 12

*Absorbancia y concentración de azúcares totales para obtener la curva de calibración, para determinar azúcares totales*

<b>Concentración Azúcares Totales g/L</b>	<b>% Error</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>% Error</b>
0,02 ± 0,001	5,00	0,203 ± 0,001	0,50
0,05 ± 0,001	2,00	0,281 ± 0,001	0,40
0,10 ± 0,001	1,00	0,255 ± 0,001	0,40
0,20 ± 0,001	0,50	0,345 ± 0,002	0,60
0,30 ± 0,002	0,70	0,354 ± 0,001	0,30
0,40 ± 0,002	0,50	0,460 ± 0,002	0,40
0,60 ± 0,003	0,50	0,507 ± 0,001	0,20
0,80 ± 0,003	0,40	0,577 ± 0,002	0,40
1,00 ± 0,003	0,30	0,655 ± 0,002	0,30
2,00 ± 0,01	0,50	1,087 ± 0,003	0,30
5,00 ± 0,02	0,40	2,366 ± 0,004	0,20

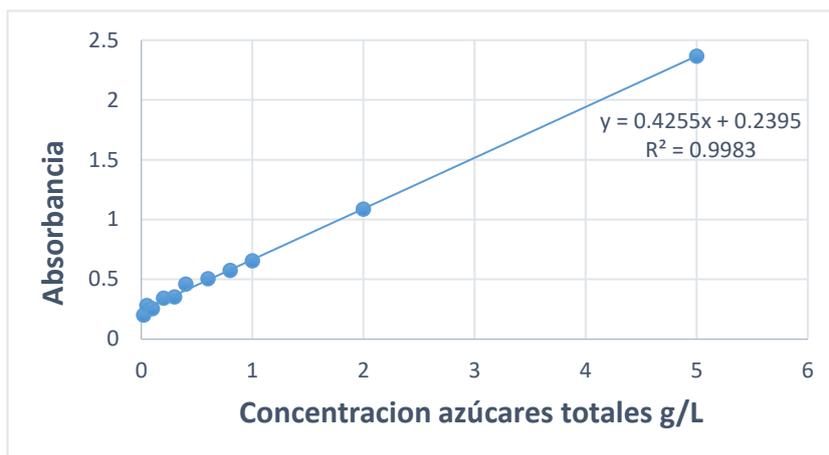


Figura 7: Curva de calibración para la determinación de azúcares totales.

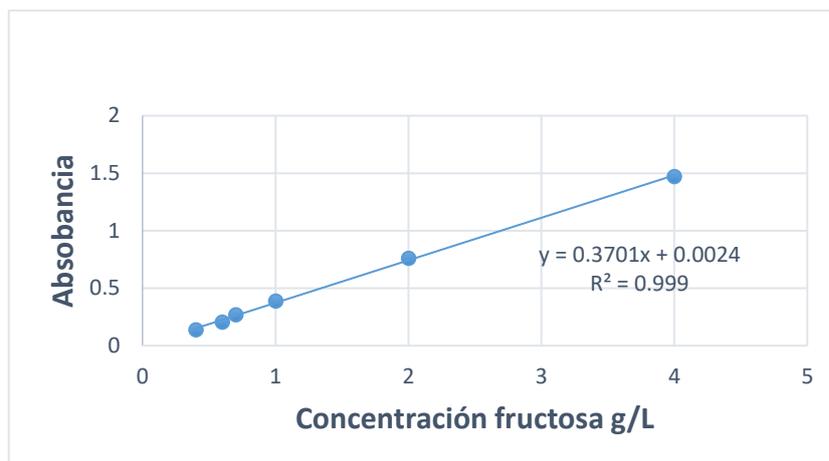
#### 4.5.2.3 Determinación de fructanos tipo inulina-FOS.

La tabla 13, expone el promedio de tres mediciones de absorbancia para determinar las concentraciones de fructanos. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. La figura 8 muestra la gráfica de la absorbancia versus concentración de fructosa para determinar fructanos (inulina-FOS).

Tabla 13

*Absorbancia y concentración de fructosa para hallar la curva de calibración, para la determinación de fructanos (inulina – FOS)*

Fructosa (g/L)	% Error	Absorbancia	% Error
4,0 ± 0,03	0,75	1,472 ± 0,002	0,14
2,0 ± 0,01	0,50	0,762 ± 0,003	0,40
1,0 ± 0,01	1,00	0,388 ± 0,001	0,26
0,7 ± 0,01	0,14	0,268 ± 0,001	0,37
0,6 ± 0,01	1,70	0,204 ± 0,001	0,50
0,4 ± 0,01	2,50	0,140 ± 0,001	0,70



**Figura 8: Curva de calibración para la determinación de fructanos (inulina-FOS).**

#### **4.5.2.4 Determinación de sacarosa por el método de Fehling (Norma Técnica Peruana, NTP 211.045).**

El método de análisis denota la presencia de azúcares reductores (glucosa, fructosa, aldosas, etcétera) y consiste en una reacción redox, en la que el grupo aldehído (reductor) de los azúcares es oxidado a grupo ácido por el  $\text{Cu}^{2+}$ , que se reduce a  $\text{Cu}^+$  (en presencia de solución de Fehling A y Fehling B).

Determinación del factor estándar: (Norma técnica peruana, NTP 211.045)

$$F_s = 25 \times 10^{-5} \times V_t$$

Donde:

$F_s$  : factor estándar equivalente a gramos de glucosa que reacciona con 1 mL de solución Fehling

$V_t$  : volumen de solución de azúcar hidrolizada gastado en la titulación

Determinación de azúcares reductores directos, de la muestra inicial antes de ser hidrolizada:

$$\text{G de sacarosa (expresados en g/L de producto)} = \frac{F_s \times F_s \times 20 \times F_d}{V_t \times g} \times 1000 \times \frac{342}{360}$$

$F_S$  : factor estándar en g/mL de la solución de Fehling

20: volumen en mL de la solución de Fehling A + B

$F_d$  : factor de dilución de la muestra en g/mL

$V_t$  : volumen en mL de muestra utilizado en la titulación.

g: peso de la muestra en g

342 y 360 son los pesos moleculares de la sacarosa y de la glucosa, respectivamente, para convertir el resultado obtenido como azúcares invertidos en sacarosa.

Para la muestra hidrolizada, se utilizó el mismo procedimiento e igual fórmula para la determinación de azúcares reductores totales.

## **4.6 Proceso de fermentación alcohólica**

### **4.6.1. Métodos de análisis de biomasa, azúcares reductores y etanol**

En la figura 17 (del anexo 2), se aprecia el biorreactor utilizado en la fermentación alcohólica del jugo de cabuya azul. En la figura 17a, se observa el biorreactor de 120 L; la figura 17b muestra el control automático de temperatura del biorreactor; la figura 17c muestra la toma de muestra del biorreactor para los diferentes controles del proceso de fermentación alcohólica y la figura 17d muestra 20 L de jugo de cabuya azul, cantidad mínima con la que opera el biorreactor de 120 L.

#### ***4.6.1.1 Medición de la producción de biomasa.***

La medición de la reproducción de las levaduras durante la etapa de fermentación alcohólica se realiza deshidratando a sequedad, de la siguiente manera: se centrifuga 10 mL del caldo de crecimiento a 4000 rpm durante 15 minutos. El sedimento se deposita en un crisol y se agrega 10 mL de solución alcalina de NaCl al 0,85 % w/v; luego, esta solución se deshidrata en la estufa a temperatura de 80 °C, durante 6 h hasta alcanzar un peso constante. La cantidad de biomasa se determina por diferencia de peso entre el crisol con biomasa seca y el crisol sin muestra.

En la figura 18 (del anexo 2), se ve la secuencia del proceso para la determinación de la cantidad de biomasa. La figura 18a muestra la centrífuga utilizada para la separación de biomasa de la solución (mosto). En la figura 18b, se aprecia la biomasa centrifugada, la figura 18c muestra la estufa con control automático de temperatura y tiempo, mientras que la figura 18d presenta la biomasa deshidratada para su determinación por peso seco.

#### ***4.6.1.2 Determinación de azúcares reductores (AR).***

Se evaluaron mediante el método de Miller con uso del ácido 3,5-Dinitro Salicílico (DNS). Un mL de muestra (el sobrenadante de la solución centrifugada para el análisis de biomasa) se coloca en un tubo de prueba y se agrega 1 mL del reactivo DNS; luego, se calienta a 100 °C durante 10 minutos, se enfría a temperatura ambiente en baño con hielo, se adiciona 10 mL de agua destilada, y se mide las concentraciones de azúcares a absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro UV/Vis.

En la figura 19 (del anexo 2), se observa el tratamiento del líquido sobrenadante de la solución centrifugada para el análisis de biomasa, En la figura 19a, se aprecia la preparación del líquido sobrenadante para su tratamiento con DNS, y en la figura 19b, se presentan las muestras tratadas con DNS para el análisis de azúcares reductores en el espectrofotómetro UV/Vis.

#### ***4.6.1.3 Determinación de alcohol etílico.***

La determinación de alcohol etílico se realizó por espectrofotometría utilizando dicromato de potasio, el cual es un agente oxidante de color anaranjado, que es reducido por el alcohol y se transforma en sulfato de cromo de color verde azulado. Este puede cuantificarse en el espectrofotómetro mencionado anteriormente, a longitud de onda máxima de 580 nm. A continuación, se muestra la reacción química que ocurre entre el alcohol etílico con el dicromato de potasio en medio ácido:



Anaranjado

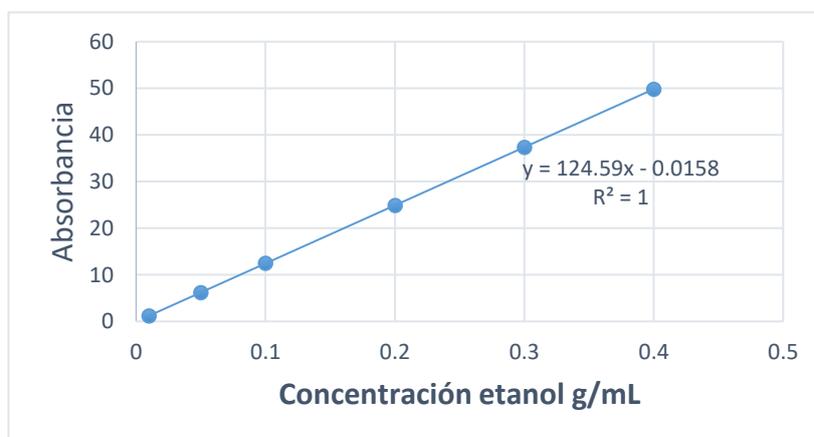
Verde azulado

En la tabla 14, se indican los datos de absorbancia con sus respectivas concentraciones de alcohol etílico (en g/mL y en % en peso). En las figuras 9 y 10, se grafican estos valores para hallar las concentraciones de alcohol etílico.

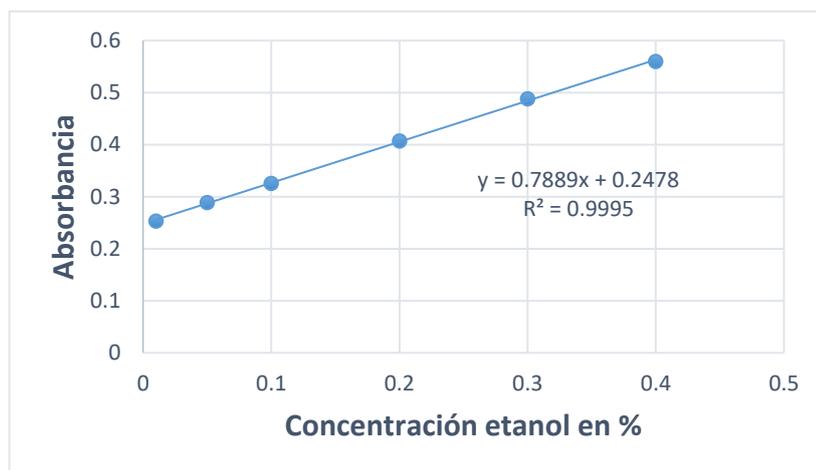
Tabla 14

*Absorbancia y concentraciones de alcohol etílico (en g/mL y en % en peso)*

<b>Conc. alcohol (g/mL)</b>	<b>Conc. alcohol (% en peso)</b>	<b>Absorbancia</b>
0,01	1,20	0,253
0,05	6,20	0,289
0,10	12,50	0,326
0,20	24,90	0,407
0,30	37,36	0,488
0,40	49,81	0,560



*Figura 9: Curva de calibración para determinar la concentración de etanol en g/mL.*



**Figura 10: Curva de calibración para determinar la concentración de etanol en % en peso.**

#### **4.6.1.4 Obtención del inóculo.**

Para llevar a cabo el proceso de fermentación alcohólica, se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* variedad *Ellipsoideus*, D 47 – LALVIN – Canadá. Esta levadura se encuentra en estado deshidratado y viene en sobres de 5 g, por lo que fue necesario su reproducción hasta la concentración necesaria para inocular los 20 L de jugo de cabuya utilizado en las pruebas experimentales.

El procedimiento para obtener el inóculo fue el siguiente: a 3 L de jugo de cabuya azul, se adicionó 6 g de fosfato diamónico (DAP) como nutriente para llegar a una concentración de 2 g DAP/L de jugo. Posteriormente, se esterilizó la solución a 110 °C, y se trasvasó a un matraz de 5 L, al cual se instaló el sistema de aireación. La solución se enfrió a la temperatura de incubación de 24 °C, se le agregó las cepas de levadura *S. cerevisiae* D-47 y se le suministró aire estéril a un flujo de 1 vvm durante 24 h, hasta llegar a la concentración de 1,15 g de biomasa/L. Esta concentración de biomasa equivale a  $2,875 \times 10^7$  células/mL. Según Godínez (2012), la concentración es de  $2,0 \times 10^7$  a  $3,0 \times 10^7$  células de levaduras/mL y, según Fermentis by Lesaffre (2017), 1,0 g de células  $\cong 1,4 \times 10^7$  células, se encuentran en el rango de cantidad de células/mL para la producción de tequila.

La figura 22 (del anexo 2) muestra la imagen de los insumos utilizados en la fermentación alcohólica. La figura 22a muestra el nutriente DAP utilizado en la investigación, y en la 22b, se observa la levadura *S. cerevisiae* D 47.

La figura 23 (del anexo 2) muestra la secuencia de cultivo del inóculo de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. La figura 23a muestra un momento de preparación del jugo de cabuya para el cultivo del inóculo, y en la figura 23b, se observa el suministro de aire estéril al inóculo.

#### **4.6.2 Proceso de fermentación alcohólica**

Las pruebas experimentales de fermentación alcohólica se llevaron a cabo en el laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM. Se utilizó un biorreactor de 120 L con las siguientes características de funcionamiento: control automático de temperatura, velocidad del agitador de 90 RPM, motor de 0,5 HP, con una alimentación de aire estéril con flujo volumétrico variable de 20 L/min. a 60 L/min.

Para cada prueba experimental se utilizaron 20 L de jugo de cabuya (cantidad mínima de operación del biorreactor). La figura 24 (del anexo 2) muestra el biorreactor utilizado en las pruebas experimentales del proceso de fermentación alcohólica.

La fermentación alcohólica del jugo de la cabuya es la etapa más importante de la investigación, pues durante esta, se va a estudiar cómo influyen en el proceso la temperatura, el pH y la concentración de DAP para obtener el máximo rendimiento de alcohol etílico.

Antes de llevar a cabo las pruebas experimentales del proceso de fermentación alcohólica a diferentes condiciones de temperatura, pH y concentración de DAP, se esterilizó el jugo de cabuya a 110 °C en el biorreactor. El estudio del proceso de fermentación se realizó en dos etapas:

**Primera etapa:** el objetivo fue determinar el mayor rendimiento de etanol y biomasa a diferentes condiciones experimentales de temperatura, pH y concentración de nutriente (DAP). En la tabla 7, se ha presentado el diseño experimental de la primera etapa de la fermentación alcohólica del jugo de cabuya azul, a concentración de sustrato (AR) de 60 g/L, según Arellano et al. (2007).

**Segunda etapa:** la finalidad fue determinar el mayor rendimiento de alcohol etílico a diferentes concentraciones de AR: 10 g/L, 30 g/L y 90 g/L (tabla 8), manteniendo constantes las condiciones experimentales de la prueba con mayor rendimiento de etanol y biomasa de la primera etapa.

**Procedimiento de fermentación alcohólica aplicado en la primera etapa:** las diferentes pruebas experimentales de esta etapa se llevaron a cabo a concentración de AR de 60 g/L, pH de 3,5 y 4,5; según lo publicado por Liu et al. (2015), Bautista et al. (2001) y Moran-Marroquín et al. (2009); a temperatura de 24 °C, 28 °C y 32 °C, así como a concentración de DAP de 1 g/L y 2 g/L.

Se utilizó 20 L de jugo de cabuya, previamente esterilizado, al cual se adicionó el inóculo de levadura *S. cerevisiae* D 47 a una concentración de 1,15 g/L (base seca). Se suministró aire estéril al flujo de 1vvm durante las primeras 8 h del proceso, la velocidad de agitación fue de 90 rpm. El proceso se monitoreó tomando muestras cada 2 h, durante 26 h para los respectivos análisis de producción de biomasa, consumo de azúcares y producción de etanol.

En la figura 25 (del anexo 2), se aprecia la inoculación de los 20 L de jugo de cabuya con la levadura *S. cerevisiae*, para iniciar el proceso de fermentación alcohólica.

Según el estudio experimental realizado en la primera etapa del proceso de fermentación alcohólica, la prueba 8 fue la de mayor rendimiento de biomasa y etanol, a condiciones de: temperatura de 28 °C, pH 3,5, concentración de DAP de 2 g/L y concentración de AR de 60 g/L.

**Procedimiento aplicado para la segunda etapa de fermentación alcohólica:** a las condiciones de la prueba 8, en la que se obtuvo el mayor rendimiento de biomasa y

etanol (temperatura de 28 °C, pH 3,5; concentración de DAP de 2 g/L y concentración de AR de 60 g/L), se realizó el estudio experimental variando las concentraciones de sustrato (AR), de 10 g/L, 30 g/L y 90 g/L, de acuerdo con lo publicado por Arellano et al. (2007) y Herrera et al. (2009), y como se indica en la tabla 8.

En las pruebas experimentales, se utilizaron 20 L de jugo de cabuya, previamente esterilizado, al cual se adicionó el inóculo de levadura *S. cerevisiae* D 47 a la concentración de 1,15 g/L. Se le suministró aire estéril al flujo de 1vvm durante las primeras 8 h del proceso, la velocidad de agitación fue de 90 rpm. El proceso de fermentación se monitoreó tomando muestras cada 2 h, durante la 26 h para los respectivos análisis de producción de biomasa, consumo de azúcares y producción de etanol, así como el consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub>.

## CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Resultados del proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul

A continuación, se detallan los resultados del proceso de hidrólisis a diferentes condiciones de los diferentes azúcares presentes en el jugo de cabuya: temperatura, 90 °C, 100 °C y 110 °C; pH 2,5, 4,5 y 5,5; y tiempo de proceso de 10 h.

#### 5.1.1 Proceso de hidrólisis de fructanos

La tabla 15 presenta el promedio de las mediciones realizadas por duplicado en el proceso de hidrólisis de fructanos a diferentes condiciones, a temperatura de 90 °C, 100 °C y 110 °C; pH 2,5, 4,5, y 5,5; durante 10 h de proceso. Se observa una mayor hidrólisis de fructanos del 90,55 %, a pH de 2,5, temperatura de 110 °C, durante 10 h de proceso (la concentración inicial de fructanos para las diferentes condiciones experimentales de temperatura y pH es igual a 37,342 mg/mL).

Tabla 15

*Datos del proceso de hidrólisis de fructanos (valores en mg/mL)*

Tiempo		Temperatura		Fructanos	Fructanos	Fructanos	Fructanos	%Hidrólisis
h	pH	°C	Inicial	Final	Hidrolizados	hidrolizado	acumulado	Fructanos
2	2,5	90	37,342	30,773	6,570	6,570		17,59
4	2,5	90	30,773	23,768	7,004	13,574		36,35
6	2,5	90	23,768	17,684	6,084	19,658		52,64
8	2,5	90	17,684	11,681	6,004	25,662		68,72
10	2,5	90	11,601	7,413	4,188	29,850		79,93

2	4,5	90	37,342	32,352	4,990	4,990	13,36
4	4,5	90	32,352	26,010	6,342	11,332	30,35
6	4,5	90	26,010	20,156	5,854	17,186	46,02
8	4,5	90	20,156	14,603	5,554	22,740	60,90
10	4,5	90	14,603	10,121	4,482	27,222	72,90
2	5,5	90	37,342	33,291	4,052	4,052	10,85
4	5,5	90	33,291	27,766	5,525	9,577	25,65
6	5,5	90	27,766	22,826	4,940	14,517	38,88
8	5,5	90	22,826	17,988	4,838	19,355	51,83
10	5,5	90	17,988	14,734	3,254	22,609	60,54
2	2,5	100	37,342	29,451	7,892	7,892	21,13
4	2,5	100	29,451	21,510	7,940	15,832	42,40
6	2,5	100	21,510	14,705	6,805	22,637	60,62
8	2,5	100	14,705	8,253	6,452	29,089	77,90
10	2,5	100	8,253	3,872	4,381	33,471	89,63
2	4,5	100	37,342	31,088	6,254	6,254	16,75
4	4,5	100	31,088	24,520	6,569	12,823	34,34
6	4,5	100	24,520	17,879	6,640	19,463	52,12
8	4,5	100	17,879	11,867	6,012	25,475	68,22
10	4,5	100	11,867	8,381	3,486	28,961	77,56
2	5,5	100	37,342	32,705	4,638	4,638	12,42
4	5,5	100	32,705	25,300	7,404	12,042	32,25
6	5,5	100	25,300	21,265	4,035	16,078	43,05
8	5,5	100	21,265	18,225	3,040	19,118	51,20
10	5,5	100	18,225	12,603	4,622	23,740	63,57
2	2,5	110	37,342	27,921	9,421	9,421	25,23
4	2,5	110	27,921	20,045	7,876	17,297	46,32
6	2,5	110	20,045	13,398	6,647	23,944	64,12
8	2,5	110	13,398	6,749	6,649	30,593	81,93
10	2,5	110	6,749	3,527	3,222	33,815	90,55
2	4,5	110	37,342	30,471	6,871	6,871	18,40
4	4,5	110	30,471	23,806	6,665	13,537	36,25
6	4,5	110	23,806	16,703	7,102	20,639	55,27
8	4,5	110	16,703	9,747	6,957	27,596	73,90
10	4,5	110	9,747	6,724	3,022	30,618	81,99
2	5,5	110	37,342	32,280	5,062	5,062	13,56
4	5,5	110	32,280	24,173	8,107	13,169	35,27
6	5,5	110	24,173	18,533	5,641	18,810	50,37

8	5,5	110	18,533	14,092	4,440	23,250	62,26
10	5,5	110	14,092	10,990	3,102	26,353	70,57

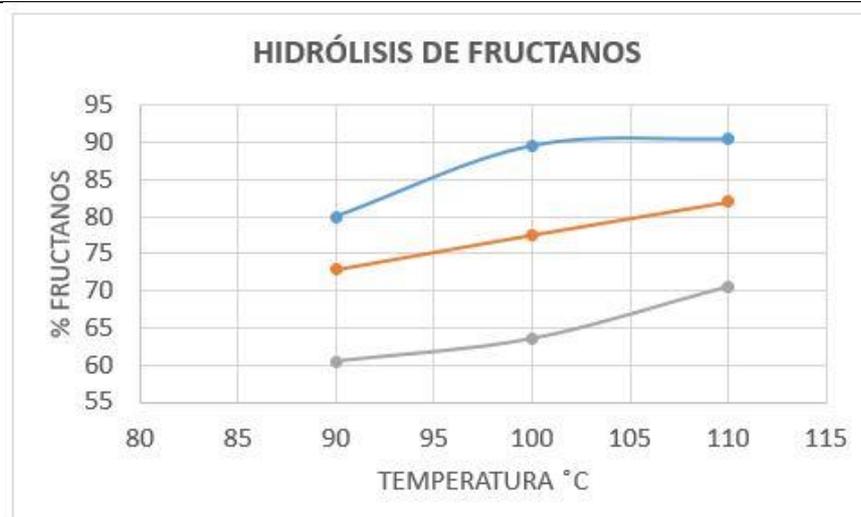


Figura 11: Comparación del proceso de hidrólisis de fructanos a temperatura de 90 °C, 100 °C, 110 °C y a pH 2,5; 4,5; y 5,5 (-- 2,5; -- 4,5; -- 5,5).

### 5.1.2 Proceso de hidrólisis de la sacarosa presente en el jugo de cabuya azul

En la tabla 16, se aprecian los datos de las mediciones realizadas por duplicado en el proceso de hidrólisis de sacarosa a diferentes condiciones de: temperatura de 90 °C, 100 °C y 110 °C; pH 2,5, 4,5, y 5,5 durante 10 h de proceso. Se observa un mayor grado de hidrólisis de la sacarosa igual al 90,04 %, a pH de 2,5 y temperatura de 110 °C, durante 10 h de proceso (la concentración inicial de sacarosa para las diferentes condiciones experimentales de temperatura y pH es igual a 9,294 mg/mL).

Tabla 16

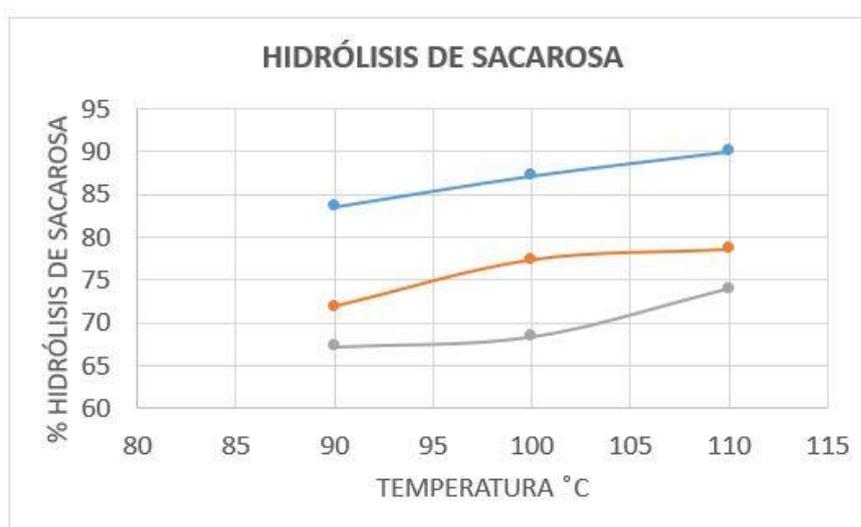
*Datos del proceso de hidrólisis de sacarosa (mg/mL)*

Tiempo h	pH	Temperatura °C	Sacarosa Inicial	Sacarosa final	Sacarosa hidrolizada	Sacarosa hidrolizada acumulada	% Hidrólisis sacarosa
2	2,5	90	9,294	6,791	2,503	2,503	26,93
4	2,5	90	6,791	4,820	1,970	4,473	48,13
6	2,5	90	4,820	3,565	1,256	5,729	61,64
8	2,5	90	3,565	2,409	1,156	6,885	74,08
10	2,5	90	2,409	1,530	0,879	7,764	83,54
2	4,5	90	9,294	7,115	2,179	2,179	23,44

4	4,5	90	7,115	5,592	1,523	3,702	39,83
6	4,5	90	5,592	4,219	1,372	5,074	54,60
8	4,5	90	4,219	3,215	1,004	6,078	65,40
10	4,5	90	3,215	2,616	0,599	6,677	71,85
2	5,5	90	9,294	7,568	1,726	1,726	18,57
4	5,5	90	7,568	6,024	1,544	3,269	35,18
6	5,5	90	6,024	4,955	1,069	4,339	46,68
8	5,5	90	4,955	3,990	0,965	5,304	57,07
10	5,5	90	3,990	3,049	0,941	6,244	67,19
2	2,5	100	9,294	6,685	2,609	2,609	28,07
4	2,5	100	6,685	5,049	1,636	4,245	45,67
6	2,5	100	5,049	3,613	1,436	5,680	61,12
8	2,5	100	3,613	2,354	1,260	6,940	74,67
10	2,5	100	2,354	1,377	0,976	7,916	85,18
2	4,5	100	9,294	7,497	1,796	1,796	19,33
4	4,5	100	7,497	5,597	1,900	3,697	39,78
6	4,5	100	5,597	4,112	1,485	5,182	55,76
8	4,5	100	4,112	2,844	1,267	6,449	69,39
10	4,5	100	2,844	1,822	1,023	7,472	80,40
2	5,5	100	9,294	7,562	1,732	1,732	18,63
4	5,5	100	7,562	5,629	1,932	3,664	39,43
6	5,5	100	5,629	4,350	1,279	4,944	53,19
8	5,5	100	4,350	3,498	0,852	5,796	62,36
10	5,5	100	3,498	2,942	0,556	6,352	68,35
2	2,5	110	9,294	6,055	3,239	3,239	34,85
4	2,5	110	6,055	4,560	1,496	4,734	50,94
6	2,5	110	4,560	2,986	1,574	6,308	67,87
8	2,5	110	2,986	1,584	1,402	7,710	82,96
10	2,5	110	1,584	0,926	0,658	8,368	90,04
2	4,5	110	9,294	6,945	2,349	2,349	25,28
4	4,5	110	6,945	5,167	1,777	4,126	44,40
6	4,5	110	5,167	4,065	1,102	5,228	56,26
8	4,5	110	4,065	2,965	1,100	6,329	68,10
10	4,5	110	2,965	1,986	0,979	7,307	78,63
2	5,5	110	9,294	7,471	1,822	1,822	19,61
4	5,5	110	7,471	5,346	2,125	3,947	42,47
6	5,5	110	5,346	4,194	1,153	5,100	54,88
8	5,5	110	4,194	3,172	1,021	6,121	65,87

10	5,5	110	3,172	2,420	0,753	6,874	73,96
----	-----	-----	-------	-------	-------	-------	-------

La figura 12 muestra la comparación de los procesos de hidrólisis de la sacarosa, a temperatura de 90 °C, 100 °C y 110 °C, durante 10 h de proceso y a pH de 2,5, 4,5 y 5,5; logrando el 90,04 % de hidrólisis de sacarosa a pH de 2,5 y temperatura de 110 °C (datos de la tabla 16).



*Figura 12:* Comparación del proceso de hidrólisis de sacarosa a temperatura de 90 °C, 100 °C, 110 °C y a pH 2,5; 4,5; y 5,5 (--- 2,5; --- 4,5; --- 5,5).

### 5.1.3 Incremento de glucosa en el proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul

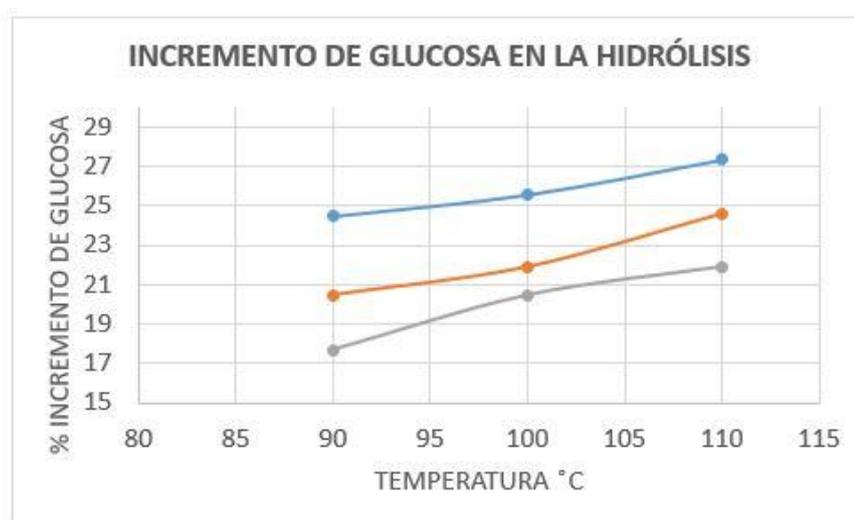
La tabla 17 presenta los datos de las mediciones por duplicado del incremento de glucosa en el jugo de cabuya, a temperatura de 90 °C, 100 °C y 110 °C; pH 2,5; 4,5 y 5,5; durante el tiempo de proceso de 10 h. Observándose un mayor incremento de glucosa del 27,36 %, a pH de 2,5, temperatura de 110 °C y tiempo de proceso de 10 h (la concentración inicial de glucosa para las diferentes condiciones experimentales de temperatura y pH es igual a 16,108 mg/mL).

Tabla 17  
*Incremento de glucosa en el proceso de hidrólisis (mg/mL)*

Tiempo h	pH	Temperatura	Glucosa inicial	Glucosa final	Incremento glucosa	Incremento glucosa acumulada	% Incremento glucosa
2	2,5	90 °C	16,108	17,016	0,907	0,907	5.63
4	2,5	90 °C	17,016	17,913	0,897	1,805	11.20
6	2,5	90 °C	17,913	18,647	0,734	2,538	15.76
8	2,5	90 °C	18,647	19,565	0,918	3,457	21.46
10	2,5	90 °C	19,565	20,046	0,481	3,938	24.45
2	4,5	90 °C	16,108	16,825	0,717	0,717	4.45
4	4,5	90 °C	16,825	17,612	0,786	1,503	9.33
6	4,5	90 °C	17,612	18,334	0,722	2,226	13.82
8	4,5	90 °C	18,334	18,890	0,556	2,781	17.27
10	4,5	90 °C	18,890	19,405	0,515	3,296	20.46
2	5,5	90 °C	16,108	16,686	0,578	0,578	3.58
4	5,5	90 °C	16,686	17,393	0,707	1,285	7.97
6	5,5	90 °C	17,393	17,994	0,601	1,886	11.70
8	5,5	90 °C	17,994	18,622	0,628	2,513	15.60
10	5,5	90 °C	18,622	18,958	0,336	2,850	17.69
2	2,5	100 °C	16,108	17,158	1,050	1,050	6,52
4	2,5	100 °C	17,158	18,116	0,958	2,008	12,46
6	2,5	100 °C	18,116	18,760	0,644	2,652	16,46
8	2,5	100 °C	18,760	19,358	0,598	3,249	20,17
10	2,5	100°C	19,358	19,903	0,545	3,794	23,56
2	4,5	100 °C	16,108	16,914	0,805	0,805	5,00
4	4,5	100 °C	16,914	17,760	0,847	1,652	10,26
6	4,5	100 °C	17,760	18,573	0,813	2,465	15,30
8	4,5	100 °C	18,573	19,195	0,622	3,087	19,16
10	4,5	100°C	19,195	19,634	0,439	3,526	21,89
2	5,5	100 °C	16,108	16,745	0,637	0,637	3,95
4	5,5	100 °C	16,745	17,679	0,934	1,571	9,75
6	5,5	100 °C	17,679	18,591	0,912	2,483	15,41
8	5,5	100 °C	18,591	19,092	0,500	2,983	18,52
10	5,5	100 °C	19,092	19,404	0,312	3,295	20,46
2	2,5	110 °C	16,108	17,374	1,266	1,266	7.86
4	2,5	110 °C	17,374	18,312	0,938	2,204	13.68

6	2,5	110 °C	18,312	19,230	0,918	3,122	19.38
8	2,5	110 °C	19,230	20,128	0,898	4,020	24.96
10	2,5	110 °C	20,128	20,516	0,388	4,408	27.36
2	4,5	110 °C	16,108	17,030	0,922	0,922	5,72
4	4,5	110 °C	17,030	17,875	0,844	1,766	10,96
6	4,5	110 °C	17,875	18,859	0,984	2,750	17,07
8	4,5	110 °C	18,859	19,774	0,916	3,666	22,76
10	4,5	110 °C	19,774	20,071	0,297	3,963	24,60
2	5,5	110 °C	16,108	16,797	0,688	0,688	4,27
4	5,5	110 °C	16,797	17,820	1,023	1,712	10,63
6	5,5	110 °C	17,820	18,705	0,885	2,596	16,12
8	5,5	110 °C	18,705	19,251	0,546	3,143	19,51
10	5,5	110	19,251	19,637	0,386	3,528	21,90

La figura 13 presenta los datos de incremento de glucosa (tabla 17): se observa el mayor incremento de glucosa del 27,36 %, a pH de 2,5 y temperatura de 110 °C.



**Figura 13:** Comparación de incremento de glucosa a temperatura de 90 °C, 100 °C, 110 °C y a pH 2,5; 4,5; y 5,5 (--- 2,5; --- 4,5; --- 5,5).

#### 5.1.4 Incremento de fructosa en el proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul

Los datos de incremento de fructosa en el jugo de cabuya azul durante el proceso de hidrólisis se muestran en la tabla 18, a temperatura de 90 °C, 100 °C y 110 °C; pH 2,5; 4,5 y 5,5; durante 10 h de proceso. Se observa un mayor incremento de fructosa, del 66,48 %, a pH 2,5, temperatura de 110 °C y tiempo de proceso de 10 h (la concentración inicial de fructosa para las diferentes condiciones experimentales de temperatura y pH es igual a 54,713 mg/mL).

Tabla 18

*Incremento de fructosa durante el proceso de hidrólisis (mg/mL)*

Tiempo h	pH	Temperatura °C	Fructosa inicial	Fructosa final	Incremento de fructosa	fructosa acumulado	% rendimiento fructosa
2	2,5	90 °C	54,713	62,878	8,165	8,165	14,92
4	2,5	90 °C	62,878	70,956	8,077	16,243	19,69
6	2,5	90 °C	70,956	77,561	6,606	22,848	41,43
8	2,5	90 °C	77,561	83,802	6,241	29,089	53,17
10	2,5	90 °C	83,802	88,133	4,330	33,420	61,08
2	4,5	90 °C	54,713	61,165	6,452	6,452	11,79
4	4,5	90 °C	61,165	68,244	7,079	13,531	24,73
6	4,5	90 °C	68,244	74,747	6,503	20,034	36,62
8	4,5	90 °C	74,747	80,750	6,002	26,037	47,59
10	4,5	90 °C	80,750	85,015	4,266	30,303	55,38
2	5,5	90 °C	54,713	59,912	5,199	5,199	9,50
4	5,5	90 °C	59,912	66,275	6,362	11,562	21,13
6	5,5	90 °C	66,275	71,683	5,408	16,970	31,02
8	5,5	90 °C	71,683	76,858	5,175	22,145	40,48
10	5,5	90 °C	76,858	80,615	3,756	25,902	47,34
2	2,5	100 °C	54,713	64,164	9,451	9,451	17,27
4	2,5	100 °C	64,164	72,782	8,618	18,069	33,02
6	2,5	100 °C	72,782	80,379	7,597	25,666	46,91
8	2,5	100 °C	80,379	87,493	7,114	32,780	59,91
10	2,5	100 °C	87,493	92,306	4,813	37,593	68,71
2	4,5	100 °C	54,713	61,958	7,245	7,245	13,24
4	4,5	100 °C	61,958	69,581	7,622	14,868	27,17
6	4,5	100 °C	69,581	76,893	7,313	22,180	40,54

8	4,5	100 °C	76,893	83,551	6,657	28,838	52,71
10	4,5	100 °C	83,551	87,620	4,070	32,907	60,14
2	5,5	100 °C	54,713	60,445	5,732	5,732	10,48
4	5,5	100 °C	60,445	68,848	8,403	14,135	25,84
6	5,5	100 °C	68,848	73,251	4,403	18,538	33,88
8	5,5	100 °C	73,251	76,643	3,392	21,930	40,08
10	5,5	100 °C	76,643	81,510	4,866	26,796	48,98
2	2,5	110 °C	54,713	66,107	11,394	11,394	20,82
4	2,5	110 °C	66,107	74,541	8,434	19,828	36,24
6	2,5	110 °C	74,541	81,844	7,303	27,131	49,59
8	2,5	110 °C	81,844	86,897	5,053	32,184	58,82
10	2,5	110 °C	86,897	91,089	4,192	36,376	66,48
2	4,5	110 °C	54,713	63,011	8,298	8,298	15,17
4	4,5	110 °C	63,011	70,610	7,598	15,897	29,05
6	4,5	110 °C	70,610	77,830	7,220	23,117	42,25
8	4,5	110 °C	77,830	84,972	7,142	30,259	55,30
10	4,5	110 °C	84,972	88,676	3,704	33,962	62,07
2	5,5	110 °C	54,713	60,909	6,196	6,196	11,32
4	5,5	110 °C	60,909	70,118	9,208	15,405	28,16
6	5,5	110 °C	70,118	76,026	5,909	21,314	38,96
8	5,5	110 °C	76,026	80,942	4,916	26,229	47,94
10	5,5	110 °C	80,942	84,412	3,469	29,698	54,28

La comparación de los incrementos de fructosa se muestra en la figura 14, también se observa un mayor incremento del 66,48 %, a pH de 2,5 y temperatura de 110 °C.

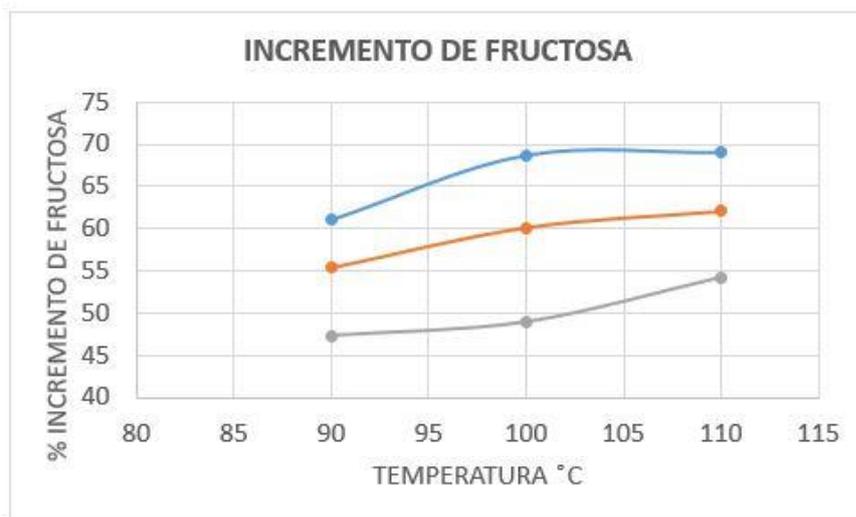


Figura 14: Comparación de incrementos de fructosa a temperatura de 110 °C y a diferentes condiciones de pH 2,5; 4,5; y 5,5 (--- 2,5; --- 4,5; --- 5,5).

### 5.1.5 Incremento de azúcares reductores directos (ARD) en el proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul

La tabla 19, presenta los datos por duplicado de los resultados del incremento de azúcares reductores directos (ARD) de la hidrólisis, a temperaturas de 90 °C, 100 °C y 110 °C; pH 2,5; 4,5 y 5,5; durante 10 h de proceso. Se observa un mayor incremento de ARD del 119,13 %, a pH 2,5; temperatura de 110 °C y tiempo de proceso de 10 h (la concentración inicial de azúcares reductores directos para las diferentes condiciones experimentales de temperatura y pH es igual a 70,822 mg/mL).

Tabla 19

*Incremento de azúcares reductores directos en el proceso de hidrólisis (mg/mL)*

Tiempo h	pH	T	ARD inicial	ART final	ART - ARD	ARD hidrolizado acumulado	% rendimiento ARD
2	2,5	90 °C	70.822	88.968	18.146	18.146	25.62
4	2,5	90 °C	88.968	106.918	17.950	36.096	50.97
6	2,5	90 °C	109.421	124.100	14.679	50.774	71.69
8	2,5	90 °C	128.573	142.892	14.319	65.093	91.91
10	2,5	90 °C	148.763	158.641	9.878	74.972	105.86
2	4,5	90 °C	70.822	85.160	14.338	14.338	20.24

4	4,5	90 °C	85.160	100.891	15.731	30.069	42.46
6	4,5	90 °C	103.069	117.521	14.452	44.521	62.86
8	4,5	90 °C	121.223	134.339	13.116	57.636	81.38
10	4,5	90 °C	139.413	149.274	9.861	67.497	95.30
2	5,5	90 °C	70.822	82.376	11.554	11.554	16.31
4	5,5	90 °C	82.376	96.514	14.138	25.692	36.28
6	5,5	90 °C	98.240	110.258	12.018	37.711	53.25
8	5,5	90 °C	113.528	125.134	11.606	49.317	69.64
10	5,5	90 °C	129.473	137.760	8.287	57.604	81.34
2	2,5	100 °C	70.822	91.823	21.002	21.002	29.65
4	2,5	100 °C	91.823	110.975	19.152	40.154	56.70
6	2,5	100 °C	110.975	127.456	16.481	56.635	79.97
8	2,5	100 °C	127.456	142.880	15.424	72.059	101.75
10	2,5	100 °C	142.880	153.596	10.716	82.775	116.88
2	4,5	100 °C	70.822	86.923	16.101	16.101	22.73
4	4,5	100 °C	86.923	103.861	16.938	33.039	46.65
6	4,5	100 °C	103.861	120.112	16.251	49.290	69.60
8	4,5	100 °C	120.112	134.671	14.559	63.849	90.15
10	4,5	100 °C	134.671	143.688	9.017	72.866	102.89
2	5,5	100 °C	70.822	83.560	12.739	12.739	17.99
4	5,5	100 °C	83.560	102.234	18.674	31.413	44.35
6	5,5	100 °C	102.234	112.864	10.630	42.043	59.36
8	5,5	100 °C	112.864	120.649	7.785	49.827	70.36
10	5,5	100 °C	120.649	131.006	10.357	60.184	84.98
2	2,5	110 °C	70.822	96.142	25.320	25.320	35.75
4	2,5	110 °C	96.142	114.884	18.742	44.062	62.22
6	2,5	110 °C	114.884	131.327	16.443	60.506	85.43
8	2,5	110 °C	131.327	147.428	16.101	76.606	108.17
10	2,5	110 °C	147.428	155.189	7.761	84.367	119.13
2	4,5	110 °C	70.822	89.263	18.441	18.441	26.04
4	4,5	110 °C	89.263	106.149	16.886	35.327	49.88
6	4,5	110 °C	106.149	122.558	16.409	51.735	73.05
8	4,5	110 °C	122.558	138.672	16.114	67.850	95.80
10	4,5	110 °C	138.672	146.673	8.001	75.851	107.10
2	5,5	110 °C	70.822	84.592	13.770	13.770	19.44
4	5,5	110 °C	84.592	105.055	20.463	34.233	48.34
6	5,5	110 °C	105.055	118.642	13.587	47.820	67.52

8	5,5	110 °C	118.642	129.566	10.924	58.744	82.95
10	5,5	110 °C	129.566	137.276	7.710	66.454	93.83

En la figura 15, se comparan los datos de incremento de azúcares reductores directos de la tabla 19 y se observa un mayor rendimiento del 59,56 %, a pH de 2,5 y temperatura de 110 °C.

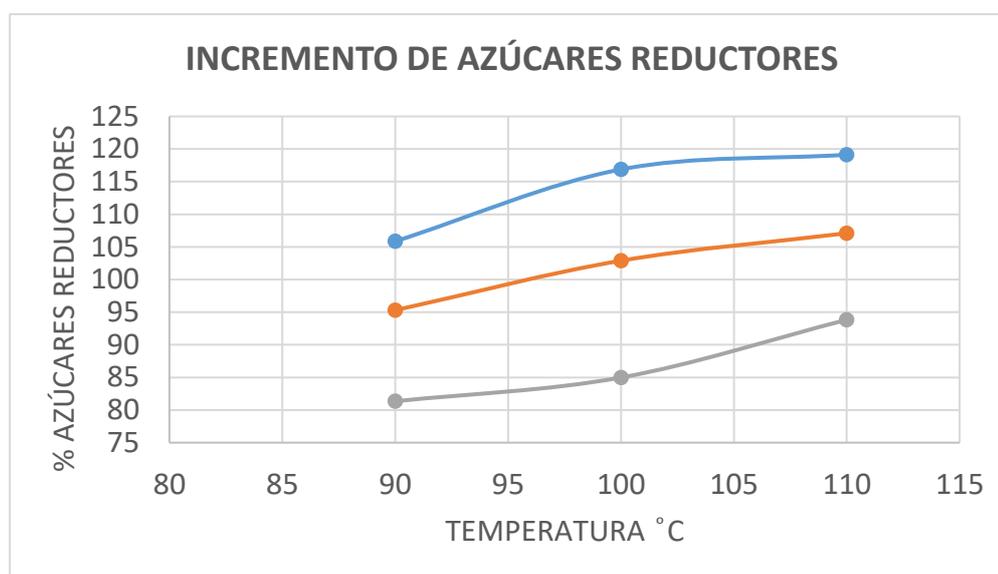


Figura 15: Comparación de incrementos de azúcares reductores directos a temperatura de 90 °C, 100 °C, 110 °C y pH 2,5; 4,5; y 5,5 (— 2,5; - - 4,5; -- 5,5).

### 5.1.6 Rendimiento del proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul

Los rendimientos del proceso de hidrólisis de los polisacáridos que se hallan en el jugo de cabuya se presentan en la tabla 19, a temperaturas de 90 °C, 100 °C y 110 °C; pH 3,5; 4,5 y 5,5, durante 10 h de proceso.

$$\text{Rendimiento Hidrólisis} = \frac{(\text{Sacarosa} + \text{Fructano})_o - (\text{Sacarosa} + \text{Fructano})_f}{(\text{Sacarosa} + \text{Fructano})_o} \times 100$$

Como se observa en la tabla 20, se obtiene un rendimiento de hidrólisis del 90,45 %, a temperatura de 110 °C y pH de 2,5, durante 10 h de proceso (la concentración inicial

de polisacáridos para las diferentes condiciones experimentales de temperatura y pH es igual a 46,6361 mg/mL).

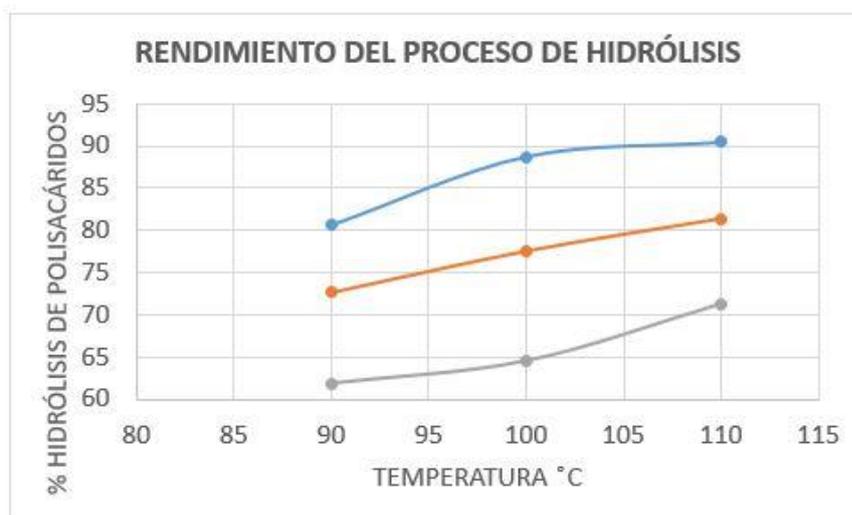
Tabla 20

*Rendimiento del proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya (mg/mL)*

Tiempo (h)	pH	Temperatura °C	Sacarosa inicial + Fructano inicial	Sacarosa final + Fructano final	Hidrólisis	Hidrólisis Acumulado	% Hidrólisis
2	2.5	90	46,6361	37,5633	9,0728	9,073	19,45
4	2.5	90	37,5633	28,5884	8,9749	18,048	38,70
6	2.5	90	28,5884	21,2489	7,3395	25,387	54,44
8	2.5	90	21,2489	14,0895	7,1594	32,546	69,79
10	2.5	90	14,0095	8,9425	5,0671	37,614	80,65
2	4.5	90	46,6361	39,4671	7,1690	7,169	15,37
4	4.5	90	39,4671	31,6017	7,8654	15,034	32,24
6	4.5	90	31,6017	24,3758	7,2259	22,260	47,73
8	4.5	90	24,3758	17,8179	6,5579	28,818	61,79
10	4.5	90	17,8179	12,7374	5,0806	33,899	72,69
2	5.5	90	46,6361	40,8589	5,7772	5,777	12,39
4	5.5	90	40,8589	33,7897	7,0691	12,846	27,54
6	5.5	90	33,7897	27,7806	6,0091	18,855	40,43
8	5.5	90	27,7806	21,9774	5,8032	24,658	52,87
10	5.5	90	21,9774	17,7829	4,1945	28,853	61,87
2	2.5	100	46,6361	36,1353	10,5008	10,500	22,52
4	2.5	100	36,1353	26,5593	9,5760	20,077	43,05
6	2.5	100	26,5593	18,3186	8,2407	28,318	60,72
8	2.5	100	18,3186	10,6068	7,7118	36,029	77,26
10	2.5	100	10,6068	5,2490	5,3578	41,387	88,74
2	4.5	100	46,6361	38,5855	8,0506	8,050	17,26
4	4.5	100	38,5855	30,1164	8,4691	16,520	35,42
6	4.5	100	30,1165	21,9912	8,1253	24,645	52,84
8	4.5	100	21,9912	14,7117	7,2795	31,924	68,45
10	4.5	100	14,7117	10,2032	4,5085	36,433	78,12
2	5.5	100	46,6361	40,2669	6,3692	6,369	13,66
4	5.5	100	40,2669	30,9300	9,3369	15,706	33,68
6	5.5	100	30,9299	25,6150	5,3149	21,021	45,07
8	5.5	100	25,6150	21,7226	3,8924	24,913	53,42
10	5.5	100	21,7226	16,5441	5,1785	30,092	64,52
2	2.5	110	46,6361	33,9761	12,6600	12,660	27,15
4	2.5	110	33,9761	24,6049	9,3711	22,031	47,24
6	2.5	110	24,6050	16,3833	8,2217	30,253	64,87
8	2.5	110	16,3833	8,3330	8,0503	38,303	82,13

10	2.5	110	8,3330	4,4527	3,8803	42,183	90,45
2	4.5	110	46,6361	37,4158	9,2203	9,220	19,77
4	4.5	110	37,4158	28,9730	8,4428	17,663	37,87
6	4.5	110	28,9730	20,7686	8,2044	25,868	55,47
8	4.5	110	20,7686	12,7114	8,0572	33,925	72,74
10	4.5	110	12,7114	8,7107	4,0007	37,925	81,32
2	5.5	110	46,6361	39,7513	6,8848	6,885	14,76
4	5.5	110	39,7513	29,5197	10,2317	17,116	36,70
6	5.5	110	29,5196	22,7262	6,7934	23,910	51,27
8	5.5	110	22,7262	17,2643	5,4619	29,372	62,98
10	5.5	110	17,2643	13,4095	3,8548	33,226	71,25

Los rendimientos totales del proceso de hidrólisis se aprecian en la figura 16, a temperatura de 90 °C, 100 °C y 110 °C, y pH 2,5; 4,5 y 5,5; durante 10 h de proceso. Se observa el mayor rendimiento total de hidrólisis del 90,45 %, a pH 2,5 y temperatura de 110 °C (datos de la tabla 20).

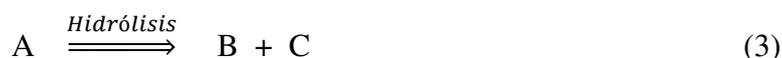


**Figura 16:** Comparación de rendimiento del proceso de hidrólisis de polisacáridos en % a 90 °C, 100 °C, 110°C, y a pH 2,5; 4,5; y 5,5 (— 2,5; - - 4,5; - - 5,5).

### 5.1.7 Cinética del proceso de hidrólisis de los polisacáridos del jugo de cabuya

Según el modelo matemático utilizado por Michel-Cuello et al. (2015) para la cinética de hidrólisis de fructanos, la reacción es de primer orden; por tanto, el tratamiento de

los datos de la tabla 20 (columnas 1 y 4) son para una cinética de primer orden con la finalidad de hallar el coeficiente de velocidad del proceso de hidrólisis de los polisacáridos.



Donde:

A = (Polisacáridos + sacarosa), B = Fructosa y C = Glucosa.

Para una reacción de primer orden:

$$r_A = K_1 C_A \quad (4)$$

$$\frac{d C_A}{dt} = - K_1 C_A$$

$$\int \frac{d C_A}{C_A} = \int - K_1 dt$$

$$\ln C_A = \ln C_{A0} - K_1 t \quad (5)$$

Graficando  $\ln C_A$  vs  $t$  se obtiene una línea recta con pendiente  $m = - K_1$ , la línea recta indica que el proceso de hidrólisis es una reacción de primer orden.

Las figuras 17, 18 y 19 presentan gráficas que indican los valores de  $K_1 = 0,1487$ ,  $K_2 = 0,1821$  y  $K_3 = 0,2087$ , a pH 2,5; a temperatura de 90 °C, 100 °C y 110 °C respectivamente. Siendo la ecuación cinética para la temperatura de 110 °C la siguiente:

$$r_A = K_1 C_A = 0,2087 C_A$$

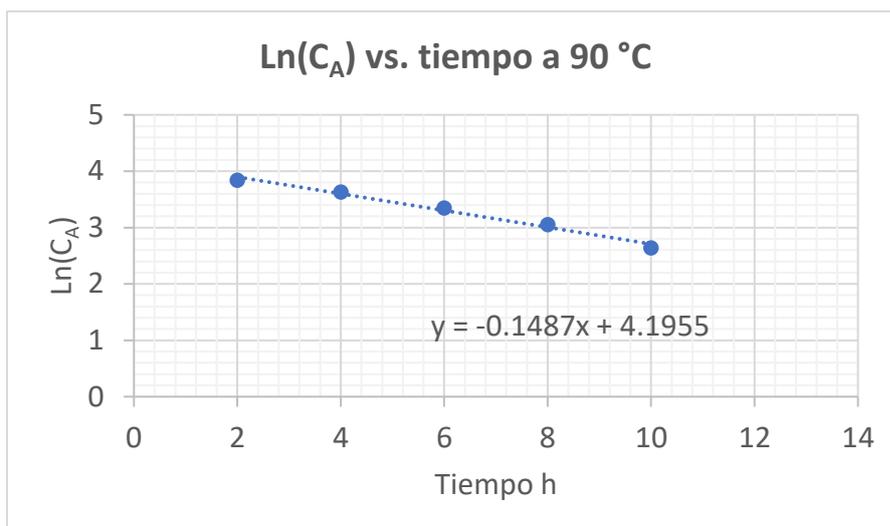


Figura 17: Gráfica de  $\text{Ln } C_A$  vs. tiempo a pH 2,5 y temperatura de  $90\text{ °C}$ .

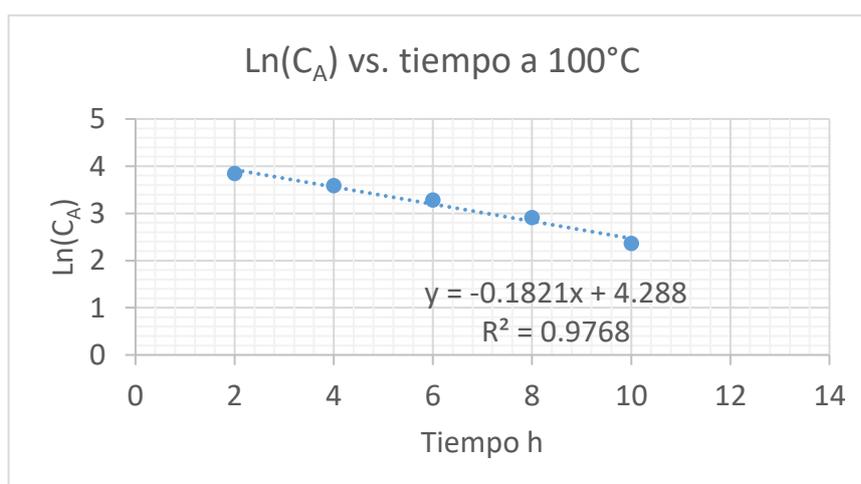


Figura 18: Gráfica de  $\text{Ln } C_A$  vs. tiempo a pH 2,5 y temperatura de  $100\text{ °C}$ .

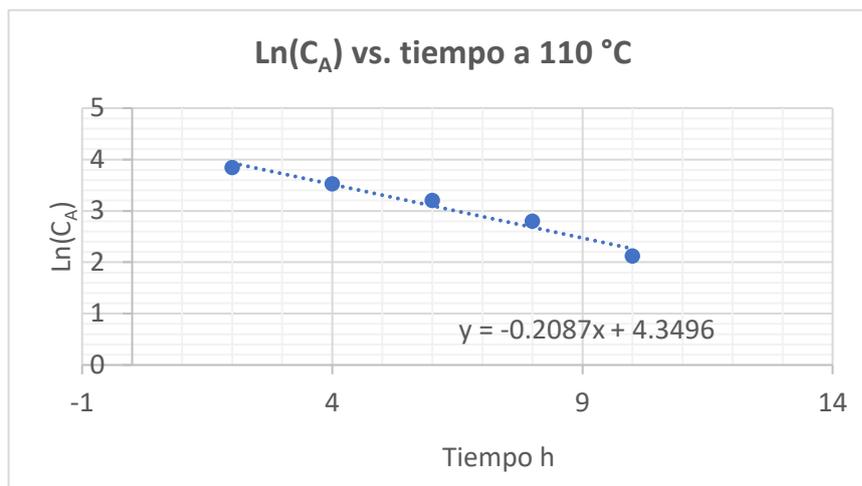


Figura 19: Gráfica de Ln C<sub>A</sub> vs. tiempo a pH 2,5 y temperatura de 110 °C.

Obtenidos los valores de K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> y K<sub>3</sub> a las respectivas concentraciones de polisacáridos y temperatura, se halló la constante de Arrhenius o Factor de frecuencia y la energía de activación de la ecuación de Arrhenius.

$$K = A e^{-E/RT}$$

$$\text{Ln } K = \text{Ln } A - \frac{E}{RT}$$

Graficando Ln K vs. 1/T se obtiene una línea recta con una pendiente  $m = -E/R$ .

De la gráfica (figura 35, Ln K vs. 1/T):

$$m = \frac{-E}{R} = -2361.8$$

$$E = 8.314 \frac{\text{J}}{\text{mol K}} \times 2361.8 \text{ K} = 1,963 \times 10^4 \frac{\text{J}}{\text{mol}} = 19,63 \frac{\text{KJ}}{\text{mol}}$$

$$\text{Ln } A = 4,607$$

$$A = 100,18$$

Ecuación de Arrhenius:

$$K = 100,18 e^{-19,63/RT}$$

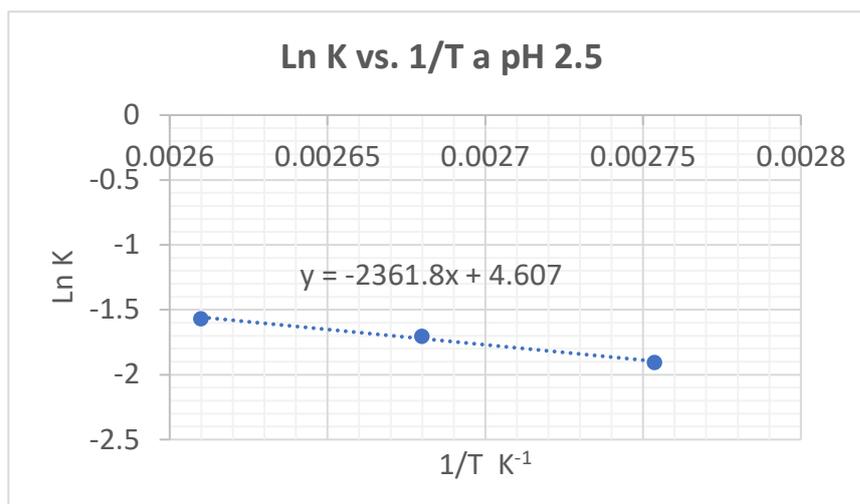


Figura 20: Gráfica de Ln K vs. 1/T a pH 2,5 y temperaturas de 90 °C, 100 °C y 110 °C.

### 5.1.8 Tratamiento estadístico de los resultados del proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos en las pruebas experimentales del proceso de hidrólisis, se realizó mediante el *software* Statgraphics Centurion XVI, Versión 16.1.15 (32 - bits).

#### 5.1.8.1 Tratamiento estadístico del proceso de hidrólisis de fructanos presentes en el jugo de cabuya azul.

A continuación, se presenta los análisis de varianza de hidrólisis de fructanos.

Tabla A.

Parámetro	Estimación	Error Estándar	Estadístico T	Valor-P
CONSTANTE	-45.625	26.7734	-1.70412	0.0998
TEMP (°C)	0.510941	0.279702	1.82673	<b>0.0788</b>
TIEMP (h)	7.34577	0.494448	14.8565	0.0000

Tabla B. Análisis de varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	13146.3	2	6573.14	112.03	<b>0.0000</b>
Residuo	1584.23	27	58.675		
Total (Corr.)	14730.5	29			

R-cuadrada = 89.2453 %

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 88.4486 %

De la tabla B

Ho: Todos los coeficientes son iguales a cero. Versus, H1: por lo menos algunos de los coeficientes son cero. Es decir, la temperatura y/o el tiempo influye en % Hidrólisis de fructanos.

*Si  $\alpha \leq p - \text{valor}$  , entonces, no rechazo  $H_o$*

*Si  $\alpha > p - \text{valor}$  , entonces, Rechazar  $H_o$*

De la tabla A

Ho: La temperatura no influye al % Hidrólisis de fructanos

H1: La temperatura influye al % Hidrólisis de fructanos

El valor de 0.0787 comparado con alfa  $\rightarrow$  no hay evidencia para rechazar Ho, no es posible concluir que la temperatura no influye en el % Hidrólisis de fructanos

Asimismo,

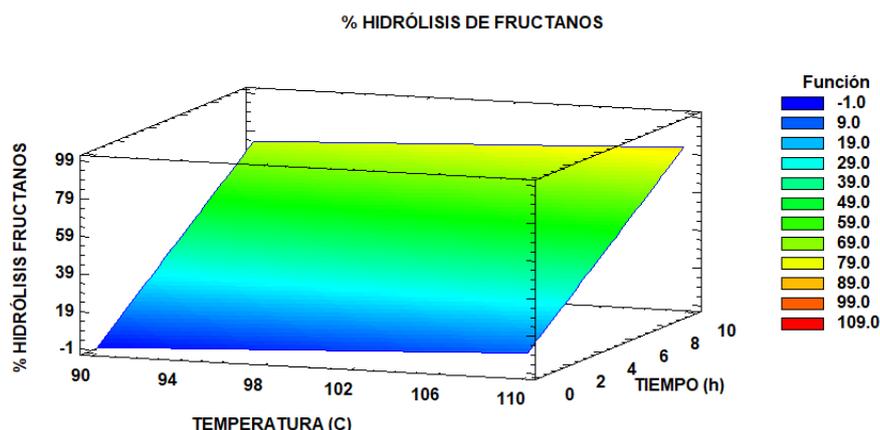
Ho: El tiempo no influye al % Hidrólisis de fructanos

H1: El tiempo influye al % Hidrólisis de fructanos

El valor 0.0000 comparado al alfa 0.05- $\rightarrow$  rechazar Ho, esto para concluir que el tiempo influye al % Hidrólisis de fructanos

La ecuación del modelo ajustado de regresión lineal múltiple para describir la relación entre % **hidrólisis de fructanos** y dos variables independientes es:

$$\% \text{ HIDRÓLISIS} = - 45.625 + 0.510941 * \text{temperatura } (^{\circ}\text{C}) + 7.34577 * \text{tiempo (h)}$$



**Figura 21:** Gráfico de superficie de respuesta del proceso de hidrólisis de fructanos.

### 5.1.8.2 Tratamiento estadístico del proceso de hidrólisis de la sacarosa presente en el jugo de cabuya azul.

Los análisis de varianza de hidrólisis de sacarosa se presentan a continuación.

Tabla A

Parámetro	Estimación	Error Estándar	Estadístico T	Valor-P
CONSTANTE	-13.3817	12.1407	-1.10222	0.2766
TEMP (°C)	0.273195	0.119241	2.29112	<b>0.0270</b>
TIEMPO (h)	6.68288	0.344219	19.4146	0.0000

Tabla B. Análisis de varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	16301.8	2	8150.91	191.09	<b>0.0000</b>
Residuo	1791.52	42	42.6553		
Total (Corr.)	18093.3	44			

R-cuadrada = **90.0985 %**

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = **89.627 %**

De la tabla B

Ho: Todos los coeficientes son iguales a cero. Versus, H1: por lo menos algunos de los coeficientes son cero. Es decir, la temperatura y/o el tiempo influye en % Hidrólisis de sacarosa

De la tabla A

Ho: La temperatura no influye al % Hidrólisis de sacarosa

H1: La temperatura influye al % Hidrólisis de sacarosa

El valor 0.0270 comparado al alfa  $\rightarrow$  rechazar Ho, se concluye que la temperatura influye en el % Hidrólisis de sacarosa

Asimismo,

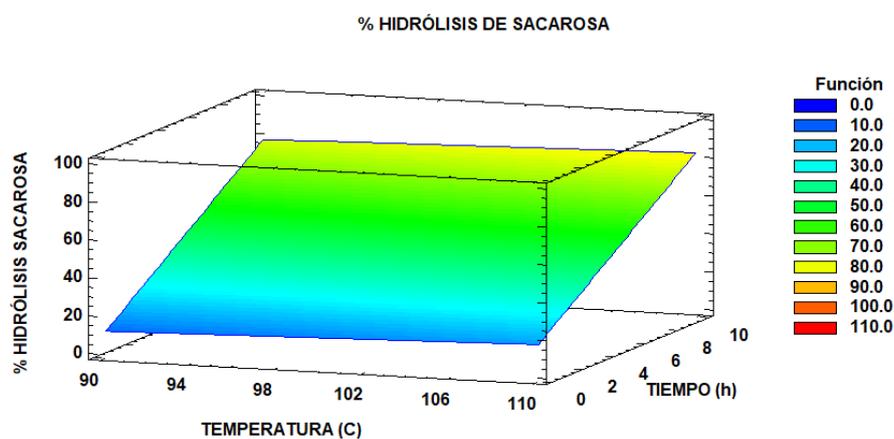
Ho: El tiempo no influye al % Hidrólisis de sacarosa

H1: El tiempo influye al % Hidrólisis de sacarosa

El valor 0.0000 comparado al alfa 0.05- $\rightarrow$  rechazar Ho, esto para concluir que el tiempo influye al % Hidrólisis de sacarosa

La ecuación del modelo de regresión lineal múltiple que describe la relación entre **hidrólisis de sacarosa** y las dos variables independientes es:

$$\text{HIDROL SAC} = -13.3817 + 0.273195 * \text{temperatura } (^{\circ}\text{C}) + 6.68288 * \text{tiempo (h)}$$



*Figura 22: Diagrama de superficie de respuesta del proceso de hidrólisis de sacarosa.*

### *5.1.8.3 Tratamiento estadístico del incremento de glucosa en el proceso de Hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul.*

A continuación, se presenta los análisis de varianza del incremento de glucosa.

Tabla A

Parámetro	Error		Estadístico	
	Estimación	Estándar	T	Valor-P
CONSTANTE	-13.7896	3.62922	-3.79961	0.0005
TEMP	0.154609	0.0356446	4.33752	0.0001
TIEMPO	2.18825	0.102897	21.2664	0.0000

Tabla B; *Análisis de varianza*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1795.54	2	897.772	235.54	0.0000
Residuo	160.088	42	3.81161		
Total (Corr.)	1955.63	44			

R-cuadrada = 91.814 %

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 91.4242 %

De la tabla B

Ho: Todos los coeficientes son iguales a cero. Versus, H1: por lo menos algunos de los coeficientes son cero. Es decir, la temperatura y/o el tiempo influye en % Incremento de glucosa

De la tabla A

Ho: La temperatura no influye al % Incremento de glucosa

H1: La temperatura influye al % Incremento de glucosa

El valor 0.0001 comparado al alfa  $\rightarrow$  rechazar Ho, se concluye que la temperatura influye en el % Incremento de glucosa

Asimismo,

Ho: El tiempo no influye al % Incremento de glucosa

H1: El tiempo influye al % Incremento de glucosa

El valor 0.0000 comparado al alfa 0.05- $\rightarrow$  rechazar Ho, esto para concluir que el tiempo influye al % Incremento de glucosa

La ecuación del modelo ajustado de regresión lineal múltiple para describir la relación entre el **incremento de glucosa** y dos variables independientes es:

$$\text{INC GLUC} = -13.7896 + 0.154609 \cdot \text{temperatura } (^{\circ}\text{C}) + 2.18825 \cdot \text{tiempo (h)}$$

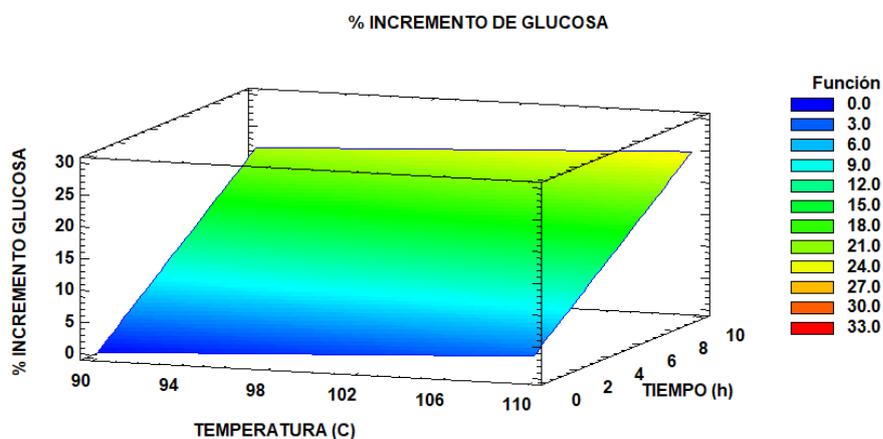


Figura 23: Diagrama de superficie de respuesta del incremento de glucosa.

#### 5.1.8.4 Tratamiento estadístico del incremento de fructosa en el proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul.

Datos de análisis de varianza del incremento de fructosa.

Tabla A

Parámetro	Estimación	Error Estándar	Estadístico T	Valor-P
CONSTANTE	-27.6015	10.5253	-2.62238	0.0121
TEMP ( $^{\circ}\text{C}$ )	0.323327	0.103375	3.1277	0.0032
TIEMPO	5.61008	0.298419	18.7994	0.0000

Tabla B. Análisis de varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	11643.9	2	5821.96	181.60	0.0000
Residuo	1346.49	42	32.0593		
Total (Corr.)	12990.4	44			

R-cuadrada = 89.6347 %

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 89.1411 %

De la tabla B

Ho: Todos los coeficientes son iguales a cero. Versus, H1: por lo menos algunos de los coeficientes son cero. Es decir, la temperatura y/o el tiempo influyen en % Incremento de fructosa

De la tabla A

Ho: La temperatura no influye al % Incremento de fructosa

H1: La temperatura influye al % Incremento de fructosa

El valor de 0.0032 comparado al alfa  $\rightarrow$  rechazar Ho, es posible concluir que la temperatura influye en el % Incremento de fructosa

Asimismo,

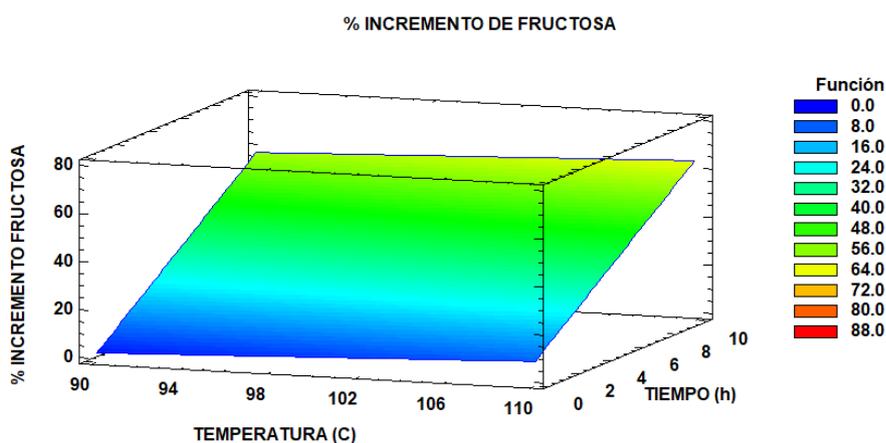
Ho: El tiempo no influye al % Incremento de fructosa

H1: El tiempo influye al % Incremento de fructosa

El valor 0.0000 comparado al alfa 0.05  $\rightarrow$  rechazar Ho, esto para concluir que el tiempo influye al % Incremento de fructosa

La ecuación del modelo que describe la relación entre el **incremento de fructosa** y las dos variables independientes es la siguiente:

$$\text{INC DE FRUCT} = -27.6015 + 0.323327 * (\text{temperatura } ^\circ\text{C}) + 5.61008 * \text{tiempo (h)}$$



**Figura 24: Diagrama de superficie de respuesta del incremento de fructosa en el proceso de hidrólisis.**

**5.1.8.5 Tratamiento estadístico del incremento de azúcares reductores directos (ARD) en la hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul.**

**Análisis de regresión: % incremento AR vs. tiempo h; temperatura °C**

**Análisis de varianza**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Regresión	5	35124.6	7024.93	81.87	0.000
TIEMPO h	1	248.3	248.28	2.89	0.097
TEMP °C	1	1.9	1.86	0.02	0.884
TIEMPO h*TIEMPO h	1	431.8	431.83	5.03	0.031
TEMP °C*TEMP °C	1	0.8	0.76	0.01	0.926
TIEMPO h*TEMP °C	1	42.1	42.10	0.49	0.488
Error	39	3346.5	85.81		
Falta de ajuste	9	33.6	3.73	0.03	1.000
Error puro	30	3313.0	110.43		
Total	44	38471.2			

**Resumen del modelo**

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
9.26329	91.30%	90.19%	88.35%

Ho: Todos los coeficientes son iguales a cero. Versus, H1: por lo menos algunos de los coeficientes son cero. Es decir, la temperatura y/o el tiempo influye en % Incremento de azúcares reductores directos.

Ho: El tiempo no influye al % Incremento de azúcares reductores directos

H1: El tiempo influye al % Incremento de azúcares reductores directos

El valor 0.097 comparado con alfa 0.05-→ no hay evidencia para rechazar Ho, no es posible concluir que el tiempo no influye al % Incremento de ARD.

La ecuación de regresión lineal múltiple que describe la relación entre el RENDIMIENTO ARD y las dos variables independientes es:

## Ecuación de regresión

$$\text{INCREMENTO} = -64 + 11.04 \text{ TIEMPO h} + 0.86 \text{ TEMP } ^\circ\text{C} - 0.463 \text{ TIEMPO h} * \text{TIEMPO h} - 0.0028 \text{ TEMP } ^\circ\text{C} * \text{TEMP } ^\circ\text{C} + 0.0419 \text{ TIEMPO h} * \text{TEMP } ^\circ\text{C}$$

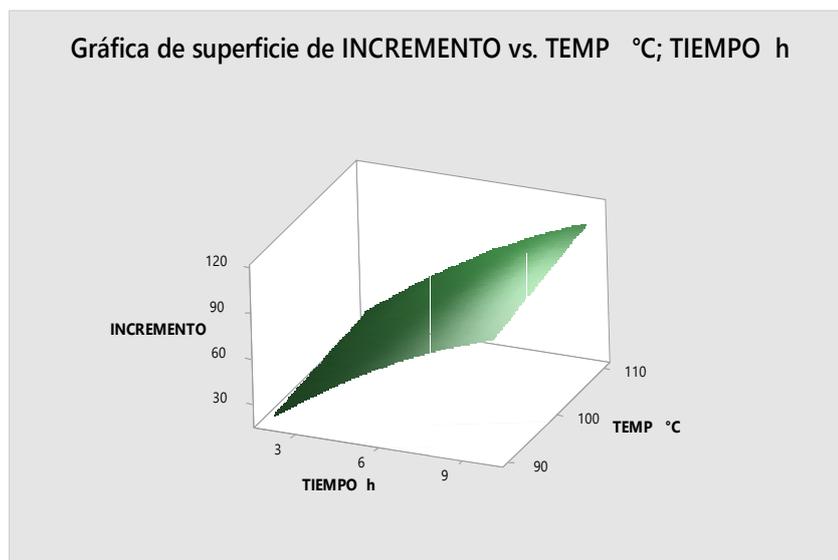


Figura 25: Diagrama de superficie de respuesta del incremento de ARD en el proceso de hidrólisis.

### 5.1.8.6 Tratamiento estadístico del rendimiento del proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul.

Datos del análisis de varianza de hidrólisis de polisacáridos.

Tabla A

Parámetro	Estimación	Error Estadístico		
		Estándar	T	Valor-P
CONSTANTE	-36.598	13.4575	-2.71953	0.0095
Temp °C	0.426719	0.132173	3.22848	0.0024
Tiempo h	7.35321	0.381552	19.2719	0.0000

Tabla B. Análisis de varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	20011.3	2	10005.7	190.91	0.0000
Residuo	2201.19	42	52.4094		
Total (Corr.)	22212.5	44			

R-cuadrada = 90.0903 %

R-cuadrado (ajustado para g. l.) = 89.6184 %

De la tabla B

Ho: Todos los coeficientes son iguales a cero. Versus, H1: por lo menos algunos de los coeficientes son cero. Es decir, la temperatura y/o el tiempo influye en % Hidrólisis de polisacáridos

De la tabla A

Ho: La temperatura no influye al % Hidrólisis de polisacáridos

H1: La temperatura influye al % Hidrólisis de polisacáridos

El valor de 0.0024 comparado al alfa → rechazar Ho, es posible concluir que la temperatura influye en el % Hidrólisis de polisacáridos

Asimismo,

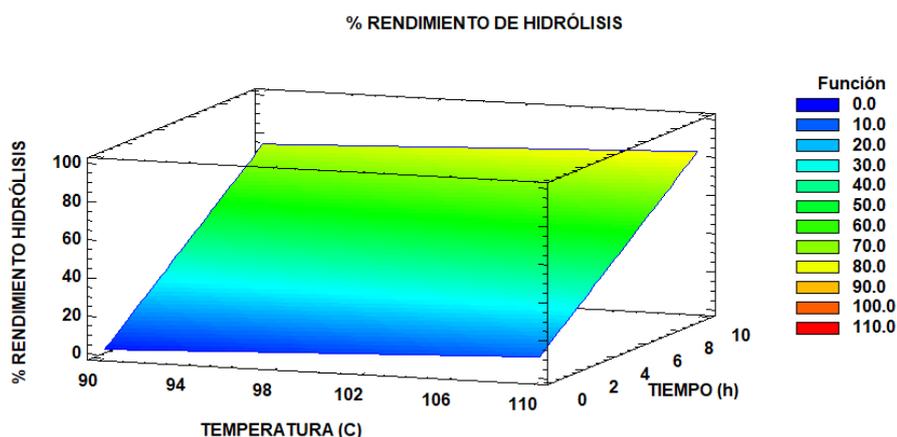
Ho: El tiempo no influye al % Hidrólisis de polisacáridos

H1: El tiempo influye al % Hidrólisis de polisacáridos

El valor 0.0000 comparado al alfa 0.05-→ rechazar Ho, esto para concluir que el tiempo influye al % Hidrólisis de polisacáridos

La ecuación del modelo ajustado de regresión lineal múltiple para describir la relación entre % **rendimiento total de hidrólisis** y dos variables independientes es:

$$\% \text{ HIDROL} = -36.598 + 0.426719 * \text{temperatura } (^\circ\text{C}) + 7.35321 * \text{tiempo (h)}$$



**Figura 26: Diagrama de superficie de respuesta del rendimiento de hidr3lisis de los polisac3ridos presentes en el jugo de cabuya azul.**

## **5.2 Resultados del proceso de fermentaci3n alcoh3lica de la primera etapa**

Seg3n los estudios experimentales, se concluy3 que la prueba 8, realizada a temperatura de 28 3C, pH 3,5; concentraci3n de nutriente fosfato diam3nico (DAP) de 2 g/L y concentraci3n de sustrato (AR) de 60 g/L proporcion3 el mayor rendimiento de etanol y biomasa,  $Y_{p|s} = 0,4739$  y  $Y_{x|s} = 0,166$  respectivamente.

### **5.2.1 Rendimiento de biomasa y etanol de las pruebas experimentales de la primera etapa**

Los valores de las concentraciones de biomasa y alcohol et3lico, as3 como los respectivos rendimientos durante el proceso de fermentaci3n alcoh3lica (prueba 1), a condiciones de pH 4,5; temperatura de 28 3C y a la concentraci3n de nutriente difosfato am3nico (DAP) de 1 g/L, se presentan en la tabla 21. Se obtuvieron rendimientos totales de biomasa y etanol de,  $Y_{x/s} = 0,1224$  y  $Y_{p/s} = 0,4555$  respectivamente.

Tabla 21

*Prueba 1: A las condiciones de pH 4,5; temperatura de 28 °C y concentración de (DAP) de 1 g/L*

<b>Prueba 1</b>					
<b>Horas</b>	<b>Biomasa</b> g/L	<b>AR</b> g/L	<b>Etanol</b> g/L	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
0	1,14	58,560	0,000	0,0178	0,5591
2	1,27	51,272	4,075	0,1202	0,4475
4	2,64	39,876	9,176	0,1104	0,4387
6	3,75	29,820	13,583	0,1206	0,4279
8	4,82	20,948	17,384	0,1414	0,4600
10	6,94	5,953	24,282	0,1265	0,4667
12	7,13	4,451	24,983	0,1057	0,5095
14	7,18	3,978	25,224	0,1222	0,4928
16	7,24	3,487	25,466	0,0889	0,4200
18	7,28	3,037	25,655	0,1060	0,4275
20	7,34	2,471	25,897	0,1143	0,4457
22	7,36	2,296	25,975	0,1144	0,4493
24	7,43	1,684	26,25	0,1224	0,4555
26	7,61	0,213	26,92		

$$Y_{x/s} = 0.1224$$

$$Y_{p/s} = 0,4555$$

La figura 27 muestra el gráfico de los datos de la tabla 21. Se observan producciones de biomasa y etanol de 7,6 g/L y 26,92 g/L respectivamente.

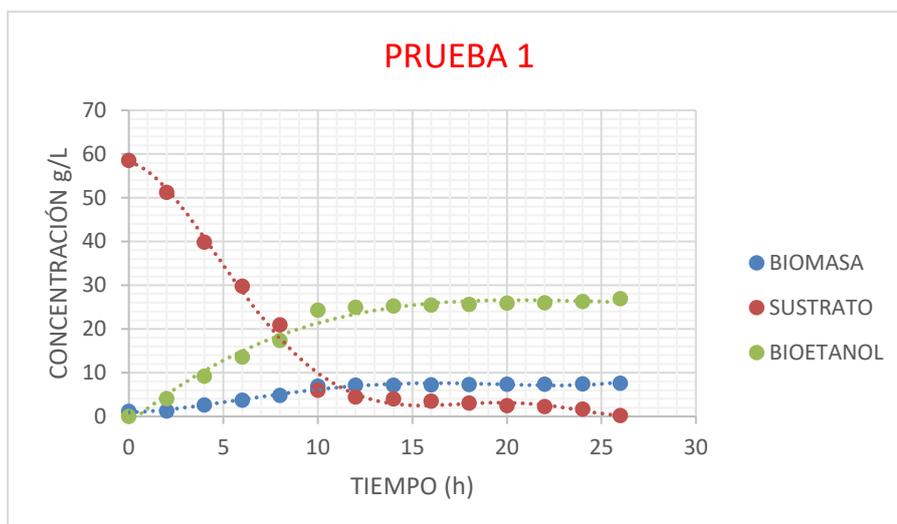


Figura 27: Concentraciones de: AR, biomasa y etanol durante el proceso de fermentación (prueba 1)

En la tabla 22, se muestran los valores de concentración de biomasa y concentración de etanol, así como los respectivos rendimientos de biomasa y etanol, en el proceso de fermentación alcohólica, a condiciones de pH 4,5; temperatura de 28 °C y concentración de DAP de 2 g/L (prueba 2). Se obtuvieron rendimientos totales de biomasa y etanol de,  $Y_{x/s} = 0,1124$  y  $Y_{p/s} = 0,4337$ , respectivamente.

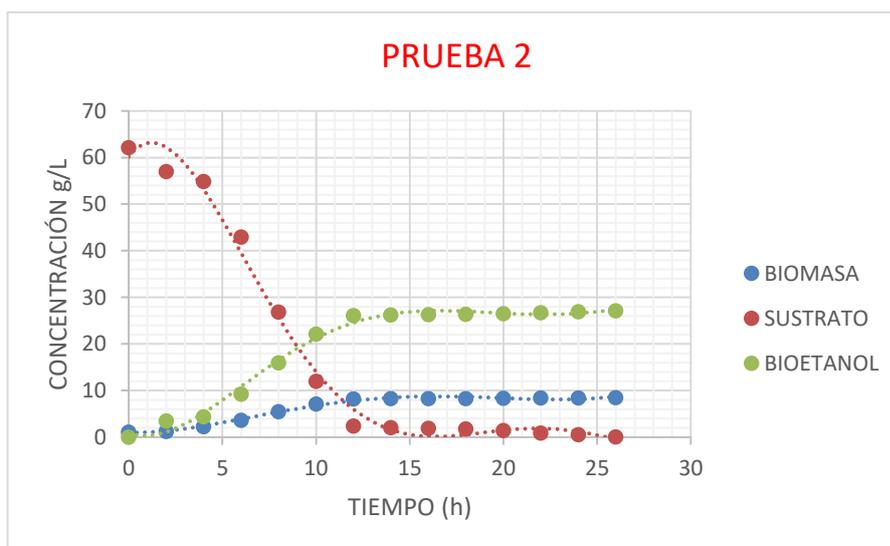
Tabla 22

Prueba 2: pH 4,5; temperatura de 28 °C y concentración de DAP de 2 g/L

Prueba 2					
Horas	Biomasa g/L	AR g/L	Etanol g/L	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
0	1,15	62,140	0,000	0,0254	0,6826
2	1,28	57,020	3,495	0,4601	0,4354
4	2,26	54,890	4,422	0,1158	0,4094
6	3,64	42,980	9,299	0,1135	0,4134
8	5,47	26,860	15,964	0,1142	0,4138
10	7,17	11,980	22,122	0,1154	0,4201
12	8,27	2,444	26,128	0,1153	0,4149
14	8,31	2,097	26,272	0,1093	0,4207
16	8,33	1,914	26,349	0,1172	0,4220
18	8,34	1,829	26,385	0,1150	0,4227
20	8,38	1,481	26,532	0,1084	0,4318
22	8,44	0,928	26,771	0,1103	0,4303
24	8,48	0,565	26,927	0,1124	0,4337
26	8,53	0,120	27,120		

$$Y_{x/s} = 0.119 \quad Y_{p/s} = 0.4337$$

Los rendimientos de biomasa de 8,53 g/L y etanol de 27,12 g/L se grafican en la figura 28 (datos de la tabla 22).



**Figura 28: Variación de la concentración de AR, biomasa y etanol durante el proceso de fermentación de la segunda prueba.**

La tabla 23, presenta la concentración de biomasa, etanol y los respectivos rendimientos durante el proceso de fermentación alcohólica (prueba 3), a condiciones de pH 4,5; temperatura de 32 °C y concentración de DAP de 1 g/L. Se obtuvieron los respectivos rendimientos totales de  $Y_{x/s} = 0,1149$  y  $Y_{p/s} = 0,4437$ .

Tabla 23

*Prueba 3 a las condiciones de: pH 4,5; temperatura de 32 °C y concentración de DAP de 1 g/L*

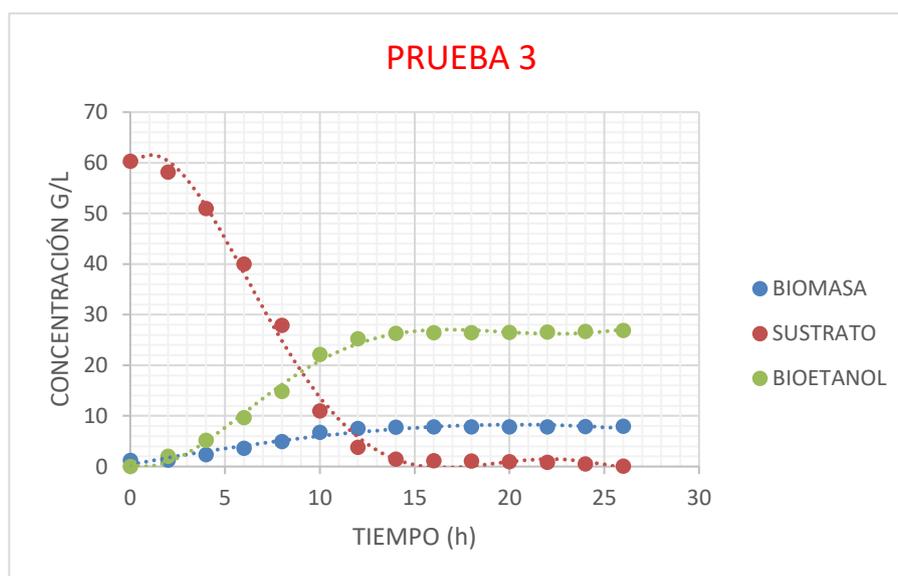
<b>Prueba 3</b>					
Horas	Biomasa g/L	AR g/L	Etanol g/L	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
0	1,17	60,300	0,000	0,0368	0,9277
2	1,25	58,127	2,016	0,1553	0,4420
4	2,36	50,982	5,174	0,1127	0,4043
6	3,60	39,985	9,620	0,1087	0,4289

8	4,92	27,846	14,827	0,1068	0,4329
10	6,72	10,998	22,121	0,1108	0,4331
12	7,52	3,776	25,249	0,1108	0,4352
14	7,78	1,430	26,270	0,1071	0,4357
16	7,81	1,150	26,392	0,1111	0,4333
18	7,82	1,060	26,431	0,1099	0,4395
20	7,83	0,969	26,471	0,1169	0,4386
22	7,85	0,798	26,546	0,1099	0,4432
24	7,88	0,525	26,667	0,1149	0,4437
26	7,93	0,090	26,860		

$$Y_{x/s} = 0,1149$$

$$Y_{p/s} = 0,4437$$

En la figura 29, se grafican la producción de biomasa y etanol, cuyos valores son 7,93 g/L y 26,86 g/L respectivamente (datos de la tabla 23).



**Figura 29: Concentración de AR, biomasa y etanol vs. tiempo de los datos de la tabla 23.**

En la tabla 24, se aprecian los valores de las concentraciones de: biomasa, AR y etanol, y los rendimientos de biomasa y etanol en la fermentación alcohólica (prueba

4), a condiciones de pH 4,5; temperatura 32 °C y concentración de DAP de 2 g/L. Los rendimientos obtenidos fueron:  $Y_{x/s} = 0,1099$  y  $Y_{p/s} = 0,4359$ .

Tabla 24

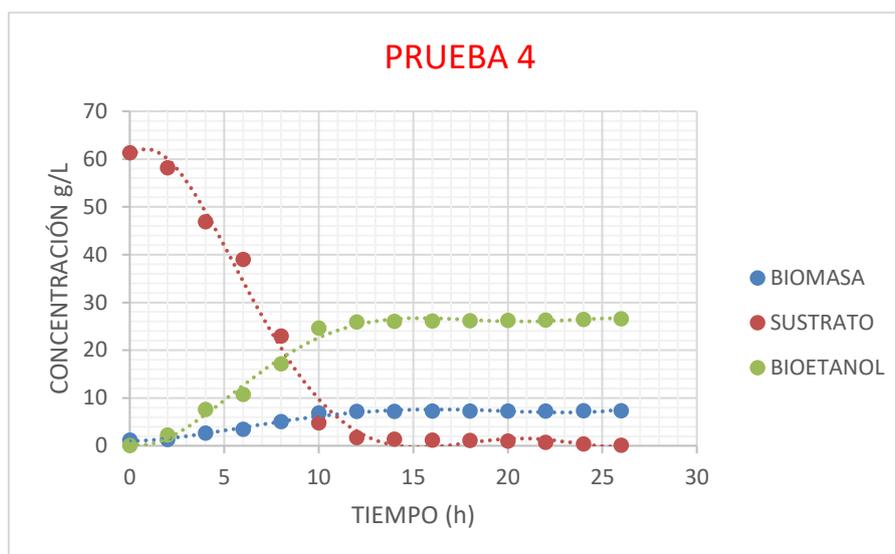
*Prueba 4: pH 4,5; temperatura de 32 °C y concentración de DAP de 2 g/L*

Prueba 4					
Horas	Biomasa g/L	AR g/L	Etanol g/L	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
0	1,14	61,340	0,000	0,0571	0,7013
2	1,32	58,186	2,212	0,1169	0,4736
4	2,64	46,897	7,559	0,1037	0,3998
6	3,46	38,992	10,720	0,0968	0,4020
8	5,01	22,978	17,158	0,1020	0,4105
10	6,87	4,747	24,643	0,1016	0,4107
12	7,18	1,696	25,896	0,0974	0,4188
14	7,21	1,388	26,025	0,0990	0,4208
16	7,23	1,186	26,110	0,0926	0,4259
18	7,24	1,078	26,156	0,1010	0,4242
20	7,25	0,979	26,198	0,1027	0,4315
22	7,28	0,687	26,324	0,1024	0,4334
24	7,31	0,394	26,451	0,1099	0,4359
26	7,34	0,121	26,570		

$$Y_{x/s} = 0,1099$$

$$Y_{p/s} = 0,4359$$

La gráfica de concentración (biomasa, sustrato y etanol) vs. tiempo de los datos de la tabla 24, se representan en la figura 30. Se observó una producción de biomasa y etanol de 7,34 g/L y 26,57 g/L respectivamente.



**Figura 30: Variación de las concentraciones de AR, biomasa y etanol durante el proceso de fermentación de la cuarta prueba.**

La tabla 25, indica la variación de biomasa, etanol y los rendimientos respectivos durante el proceso de fermentación alcohólica (prueba 5), a condiciones de pH 3,5; temperatura de 28 °C y concentración de DAP de 1 g/L. Se obtuvieron rendimientos totales de:  $Y_{x/s} = 0,1036$  y  $Y_{p/s} = 0,4197$ .

Tabla 25

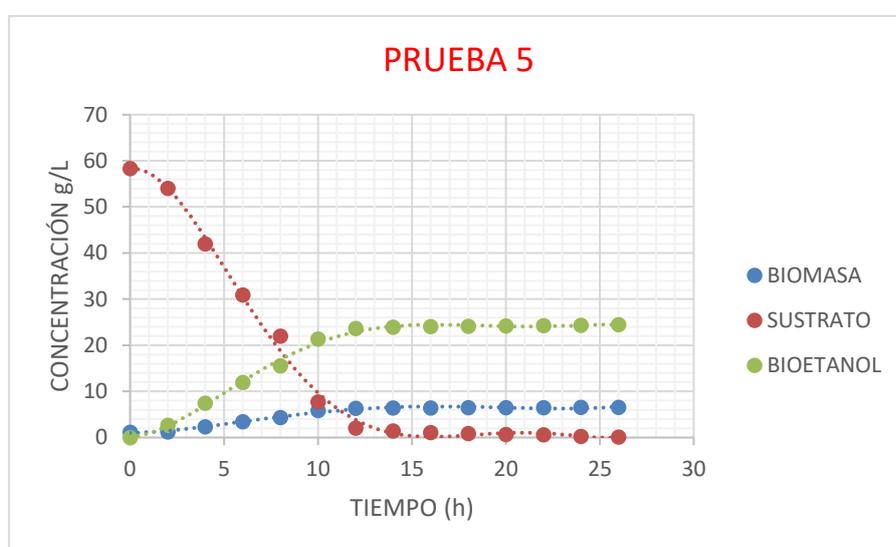
*Prueba 5: pH 3,5; temperatura de 28 °C y concentración de DAP de 1 g/L*

Prueba 5					
Horas	Biomasa g/L	AR g/L	Etanol g/L	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
0	1,15	58,360	0,000	0,0231	0,6247
2	1,25	54,030	2,705	0,0922	0,3982
4	2,36	41,997	7,497	0,0978	0,4042
6	3,44	30,960	11,958	0,0979	0,4020
8	4,32	21,970	15,572	0,1080	0,4084
10	5,86	7,715	21,394	0,0903	0,4007
12	6,37	2,067	23,657	0,0914	0,4039
14	6,43	1,411	23,922	0,0968	0,4097
16	6,46	1,101	24,049	0,0990	0,4109
18	6,48	0,899	24,132	0,1015	0,4112
20	6,50	0,702	24,213	0,0971	0,4077
22	6,51	0,599	24,255	0,0993	0,4106
24	6,54	0,297	24,379	0,1036	0,4197
26	6,56	0,104	24,460		

$$Y_{x/s} = 0,1036$$

$$Y_{p/s} = 0,4197$$

La figura 31, muestra la producción de biomasa y etanol, siendo estos valores de: 6,56 g/L y 24,46 g/L respectivamente (datos de la tabla 25).



**Figura 31: Consumo de AR, producción de biomasa y etanol durante el proceso de fermentación de la prueba 5.**

La producción de biomasa, etanol y el consumo de sustrato y los rendimientos de biomasa y etanol se muestran en la tabla 26, a condiciones de pH 3,5; temperatura de 32 °C y concentración de DAP de 2 g/L. Siendo los rendimientos de biomasa  $Y_{x/s} = 0,1245$  y etanol de  $Y_{p/s} = 0,4509$ .

Tabla 26

*Prueba 6: pH 3,5; temperatura de 32 °C y concentración de DAP de 2 g/L*

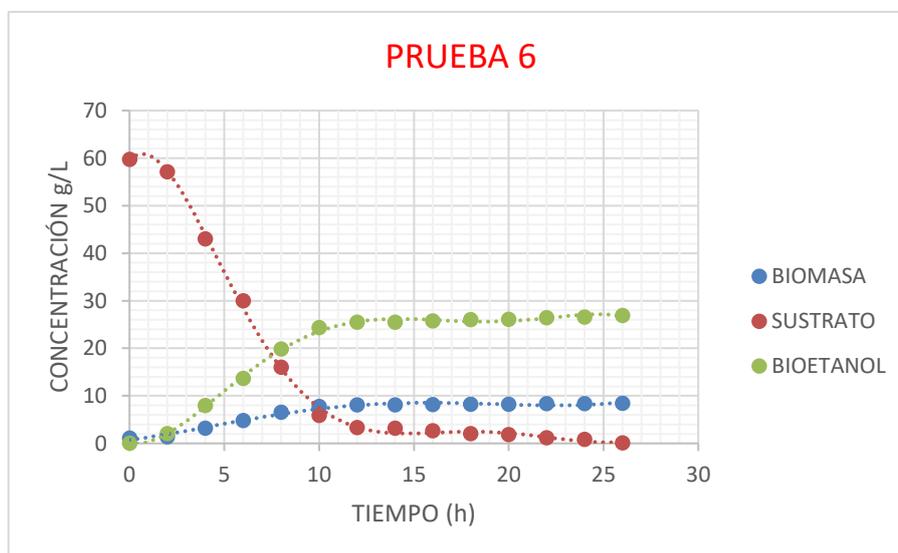
Prueba 6					
Horas	Biomasa g/L	AR g/L	Etanol g/L	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
0	1,13	59,740	0,000	0,0880	0,7714

2	1,36	57,128	2,015	0,1266	0,4195
4	3,15	42,991	7,946	0,1283	0,4405
6	4,82	29,980	13,677	0,1237	0,4406
8	6,55	16,001	19,836	0,1194	0,4409
10	7,76	5,866	24,305	0,1201	0,4450
12	8,07	3,284	25,454	0,1205	0,4458
14	8,08	3,201	25,491	0,1207	0,4431
16	8,15	2,621	25,748	0,1153	0,4448
18	8,22	2,014	26,018	0,1183	0,4497
20	8,24	1,845	26,094	0,1199	0,4498
22	8,32	1,178	26,394	0,1201	0,4504
24	8,36	0,845	26,544	0,1245	0,4509
26	8,45	0,122	26,870		

$$Y_{x/s} = 0,1245$$

$$Y_{p/s} = 0,4509$$

En la figura 32, se muestra el gráfico de los datos de la tabla 26. Se observa una producción de biomasa y etanol de 8,45 g/L y 26,87 g/L respectivamente.



**Figura 32: Concentración de biomasa, AR y etanol vs. tiempo de los datos de la prueba 6.**

La tabla 27 presenta las concentraciones de biomasa, etanol y rendimientos respectivos en el proceso de fermentación alcohólica para la prueba 7, a condiciones de pH 3,5;

temperatura de 32 °C y concentración de DAP de 1 g/L. Se obtuvieron rendimientos totales de:  $Y_{x/s} = 0,1242$  y  $Y_{p/s} = 0,4534$ .

Tabla 27

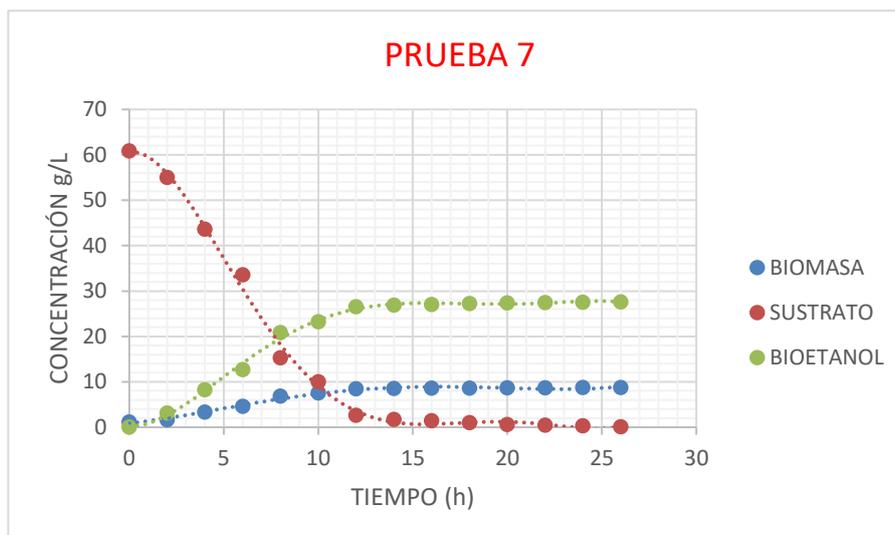
*Prueba 7: pH 3,5; temperatura de 32 °C y concentración de DAP de 1 g/L*

Prueba 7					
Horas	Biomasa g/L	AR g/L	Etanol g/L	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
0	1,12	60,860	0,000	0,0838	0,5342
2	1,61	55,012	3,124	0,1514	0,4451
4	3,34	43,587	8,209	0,1218	0,4460
6	4,56	33,571	12,676	0,1247	0,4464
8	6,84	15,287	20,838	0,1248	0,4449
10	7,50	10,000	23,191	0,1254	0,4452
12	8,43	2,581	26,493	0,1203	0,4452
14	8,54	1,667	26,900	0,1205	0,4458
16	8,57	1,418	27,011	0,1213	0,4490
18	8,62	1,006	27,196	0,1219	0,4512
20	8,67	0,596	27,381	0,1227	0,4478
22	8,69	0,433	27,454	0,1234	0,4506
24	8,71	0,271	27,527	0,1242	0,4534
26	8,73	0,110	27,600		

$$Y_{x/s} = 0,1242$$

$$Y_{p/s} = 0,4534$$

La producción de etanol de 27,60 g/L, producción de biomasa de 8,73 g/L, y el consumo de sustrato de la prueba 7 se observa en la figura 33 (datos de la tabla 27).



**Figura 33: Producción de etanol, biomasa y consumo de AR de la prueba 7.**

A continuación, se presenta en la tabla 28, las concentraciones de biomasa, etanol y sus rendimientos respectivos de biomasa y etanol durante el proceso de fermentación alcohólica (prueba 8), a condiciones de pH 3,5; temperatura de 28 °C y concentración de DAP 2 g/L. Se obtuvieron rendimientos totales de:  $Y_{x/s} = 0,1606$  y  $Y_{p/s} = 0,4739$ .

Tabla 28

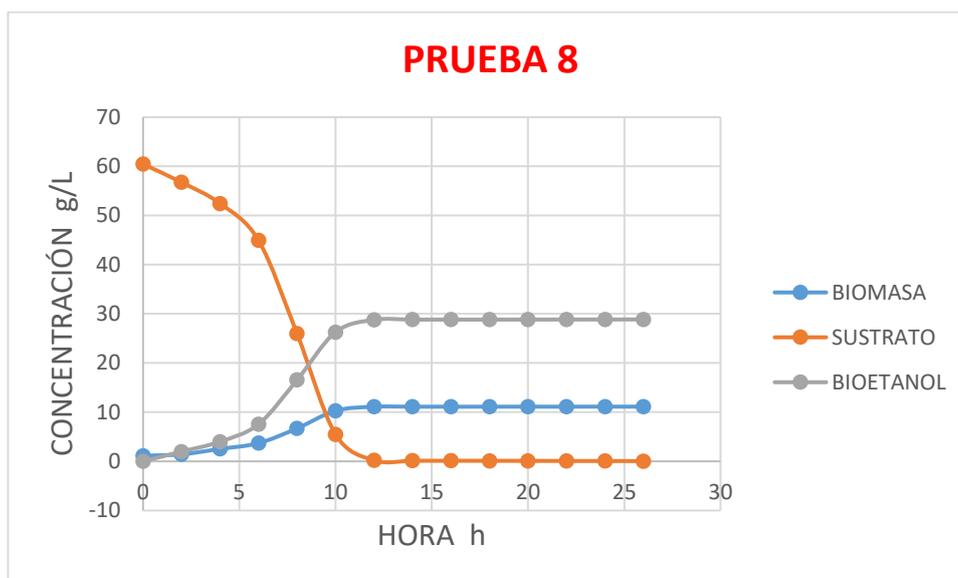
*Prueba 8: pH 3,5; temperatura de 28 °C y concentración de DAP de 2 g/L*

Prueba 8					
Horas	Biomasa g/L	AR g/L	Etanol g/L	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
0	1,126	60,450	0,000	0,0826	0,5374
2	1,431	56,756	1,985	0,2530	0,4676
4	2,520	52,451	3,998	0,1571	0,4746
6	3,699	44,944	7,561	0,1581	0,4738
8	6,697	25,976	16,548	0,1753	0,4747
10	10,289	5,482	26,276	0,1533	0,4757
12	11,100	0,192	28,792	0,1547	0,4613
14	11,111	0,121	28,825	0,1538	0,4615
16	11,112	0,114	28,828	0,1562	0,4688
18	11,113	0,108	28,831	0,1600	0,4720
20	11,115	0,096	28,837	0,1579	0,4737
22	11,118	0,076	28,846	0,1587	0,4762
24	11,120	0,064	28,852	0,1606	0,4739
26	11,124	0,039	28,864		

$$Y_{x/s} = 0,1606$$

$$Y_{p/s} = 0,4739$$

La producción de biomasa y etanol de 11,12 g/L y 28,86 g/L, respectivamente, se grafican en la figura 34 (datos de la tabla 28).



**Figura 34: Consumo de AR, concentraciones de biomasa y etanol durante el proceso de fermentación de la prueba 8.**

Las concentraciones de biomasa, etanol y los rendimientos respectivos de biomasa y etanol durante la fermentación alcohólica de la prueba 9, se muestran en la tabla 29, a condiciones de pH 3,5; temperatura de 24 °C y concentración de DAP de 1 g/L. El rendimiento de biomasa es de  $Y_{x/s} = 0,081$  y el de etanol fue de  $Y_{p/s} = 0,324$ .

Tabla 29

*Prueba 9: pH 3,5; temperatura de 24 °C y concentración de DAP de 1 g/L*

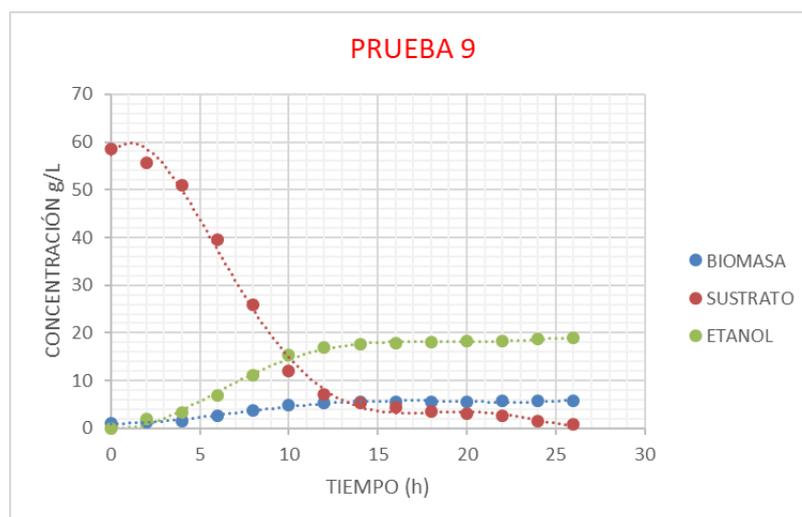
Prueba 9					
Horas	Biomasa g/L	AR g/L	Etanol g/L	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
0	1,14	58,530	0,000	0,0439	0,6655
2	1,27	55,567	1,972	0,0809	0,3050
4	1,64	50,997	3,366	0,0963	0,3153

6	2,75	39,467	7,001	0,0795	0,3015
8	3,82	26,002	11,061	0,0798	0,3108
10	4,94	11,975	15,421	0,0801	0,3115
12	5,33	7,108	16,937	0,0802	0,3198
14	5,48	5,238	17,535	0,0807	0,3203
16	5,54	4,495	17,773	0,0793	0,3205
18	5,61	3,612	18,056	0,0808	0,3212
20	5,65	3,117	18,215	0,0800	0,3240
22	5,69	2,617	18,377	0,0802	0,3250
24	5,77	1,620	18,701	0,0814	0,3244
26	5,84	0,760	18,980		

$$Y_{x/s} = 0,081$$

$$Y_{p/s} = 0,3244$$

En la figura 35, se muestra el gráfico de los datos de la tabla 29. Se observa una producción de biomasa y etanol de 5,84 g/L y 18,98 g/L respectivamente.



**Figura 35: Gráfica del consumo de AR y concentraciones de biomasa y etanol durante el proceso de fermentación de la prueba 9.**

En la tabla 30 se aprecian los valores de concentraciones de biomasa, etanol y los rendimientos de biomasa y etanol en el proceso de fermentación alcohólica para la prueba 10, a condiciones de pH 3,5; temperatura de 24 °C y concentración de DAP de 2 g/L. Se obtuvo rendimientos totales de:  $Y_{x/s} = 0,0999$  y  $Y_{p/s} = 0,3374$ .

Tabla 30

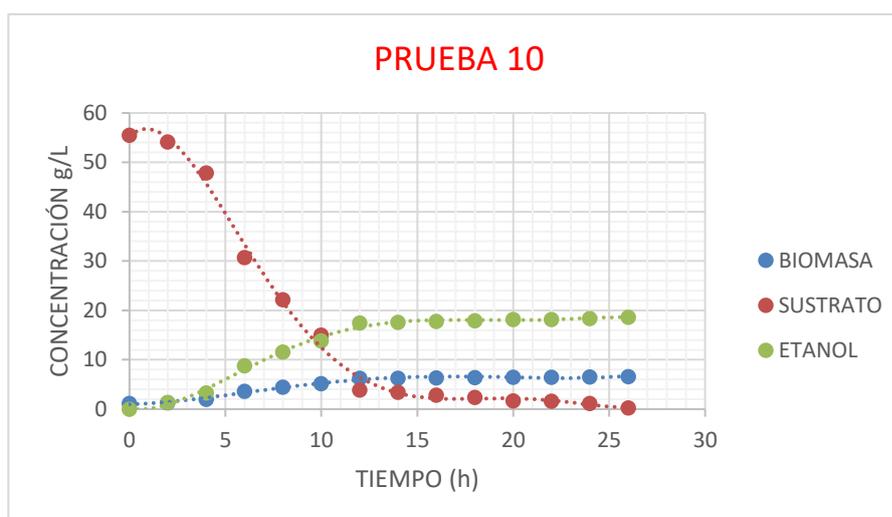
*Prueba 10: pH 3,5; temperatura de 24 °C y concentración de DAP de 2 g/L*

Prueba 10					
Horas	Biomasa g/L	AR g/L	Etanol g/L	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
0	1,15	55,480	0,000	0,0966	0,9926
2	1,28	54,134	1,336	0,1113	0,3160
4	1,98	47,847	3,323	0,0969	0,3211
6	3,64	30,724	8,822	0,0970	0,3208
8	4,47	22,171	11,566	0,0975	0,3212
10	5,17	14,996	13,871	0,0988	0,3224
12	6,27	3,860	17,461	0,0964	0,3277
14	6,31	3,445	17,597	0,0969	0,3295
16	6,37	2,826	17,801	0,0971	0,3301
18	6,41	2,414	17,937	0,0979	0,3370
20	6,48	1,699	18,178	0,0980	0,3235
22	6,49	1,597	18,211	0,0985	0,3325
24	6,53	1,191	18,346	0,0999	0,3374
26	6,62	0,290	18,650		

$$Y_{x/s} = 0,0999$$

$$Y_{p/s} = 0,3374$$

La producción de biomasa de 6,62 g/L y etanol de 18,65 g/L se grafican en la figura 36 (datos de la tabla 30).



**Figura 36: Concentraciones de AR, biomasa y etanol durante el proceso de fermentación de la prueba 10.**

Las concentraciones de células de levadura, etanol y sus respectivos rendimientos durante el proceso de fermentación alcohólica para la prueba 11, se muestran en la tabla 31, a condiciones de pH 4,5; temperatura de 24 °C y concentración de DAP de 1 g/L. Se obtuvo rendimientos totales de:  $Y_{x/s} = 0,085$  y  $Y_{p/s} = 0,3345$ .

Tabla 31

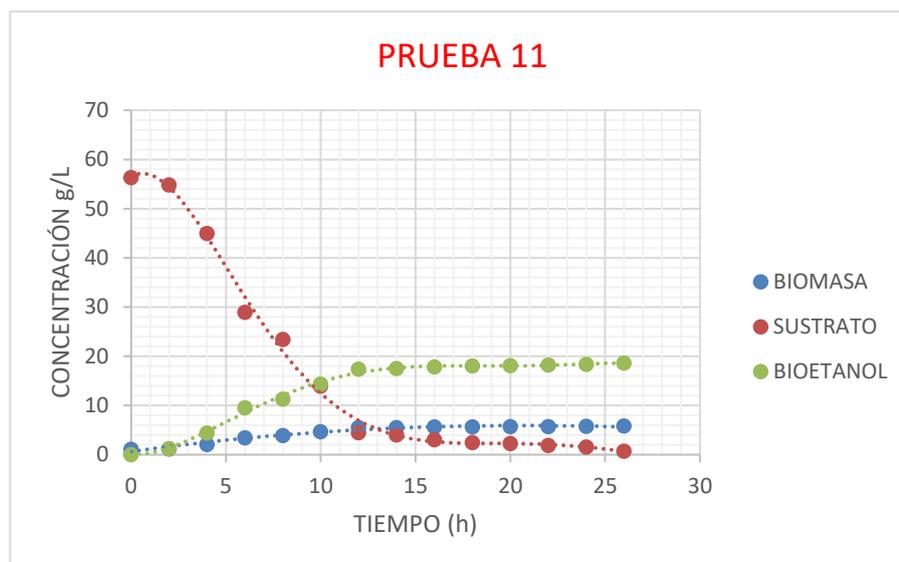
*Prueba 11: pH 4,5; temperatura de 24 °C y concentración de DAP de 1 g/L*

Prueba 11					
Horas	Biomasa g/L	AR g/L	Bioetanol g/L	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
0	1,12	56,330	0,000	0,0273	0,8560
2	1,16	54,865	1,254	0,0961	0,3203
4	2,11	44,976	4,422	0,0841	0,3206
6	3,46	28,929	9,567	0,0841	0,3201
8	3,92	23,462	11,317	0,0844	0,3204
10	4,72	13,989	14,352	0,0845	0,3209
12	5,52	4,520	17,391	0,0844	0,3228
14	5,56	4,046	17,544	0,0846	0,3196
16	5,64	3,101	17,846	0,0839	0,3204
18	5,69	2,505	18,037	0,0837	0,3222
20	5,71	2,266	18,114	0,0838	0,3324
22	5,74	1,908	18,233	0,0840	0,3333
24	5,77	1,551	18,352	0,0842	0,3345
26	5,84	0,720	18,630		

$$Y_{x/s} = 0,085$$

$$Y_{p/s} = 0,3345$$

En la figura 37, se muestra la gráfica de los datos de la tabla 31. Se puede apreciar la producción de biomasa y etanol de 5,84 g/L y 18,63 g/L respectivamente.



**Figura 37: Producción de biomasa, etanol y consumo de AR en la fermentación de la prueba 11.**

La tabla 32 muestra las concentraciones de biomasa, etanol y sus respectivos rendimientos en la fermentación alcohólica para la prueba 12, a condiciones de pH 4,5; temperatura de 24 °C y concentración de DAP de 2 g/L. Se obtuvo rendimientos totales de:  $Y_{x/s} = 0,079$  y  $Y_{p/s} = 0,3166$ .

Tabla 32

*Prueba 12: pH 4,5; temperatura de 24 °C y concentración de DAP de 2 g/L*

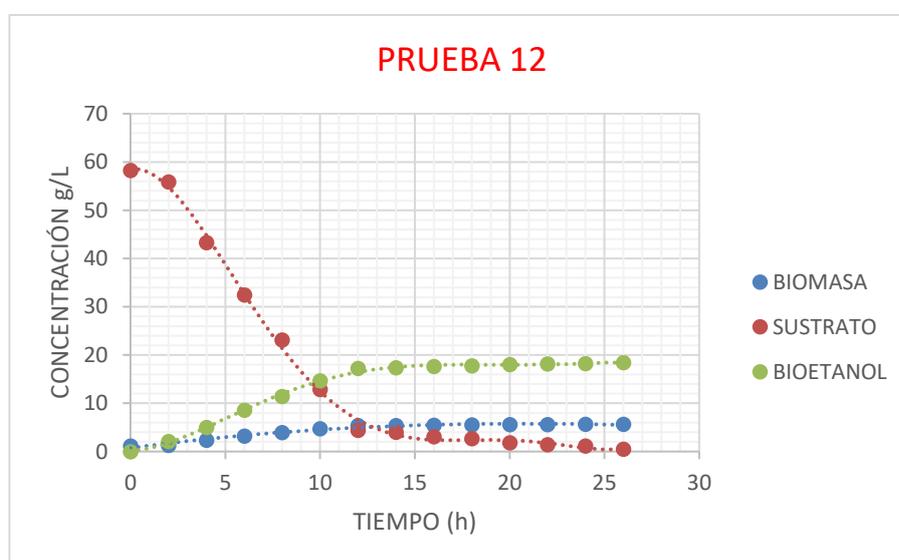
Prueba 12					
Horas	Biomasa g/L	AR g/L	Bioetanol g/L	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
0	1,14	58,250	0,000	0,0592	0,8929
2	1,28	55,887	2,110	0,0858	0,2287
4	2,36	43,308	4,987	0,0772	0,3269
6	3,20	32,423	8,546	0,0772	0,3103
8	3,92	23,101	11,439	0,0779	0,3105
10	4,72	12,841	14,625	0,0779	0,3107
12	5,38	4,368	17,258	0,0779	0,3117
14	5,41	3,983	17,378	0,0780	0,3121
16	5,48	3,086	17,658	0,0781	0,3125
18	5,51	2,702	17,778	0,0782	0,3128
20	5,58	1,807	18,058	0,0783	0,3133
22	5,61	1,424	18,178	0,0781	0,3125

24	5,63	1,168	18,258	0,0784	0,3166
26	5,68	0,530	18,460		

$$Y_{x/s} = 0,0784$$

$$Y_{p/s} = 0,3166$$

En la figura 38, se observa la gráfica de los datos de la tabla 32. Se aprecia una producción de biomasa y etanol de 5,68 g/L y 18,46 g/L respectivamente.



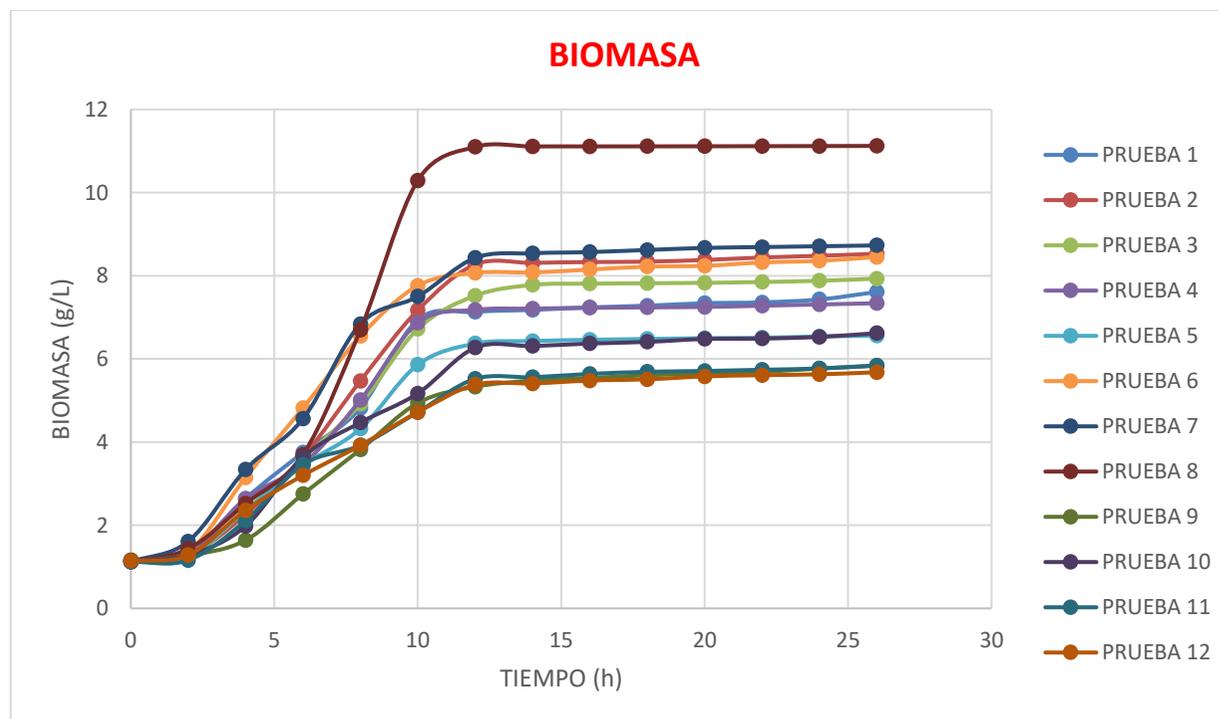
**Figura 38: Consumo de AR, concentraciones de biomasa y etanol durante la fermentación de la prueba 12.**

Tabla 33

*Producción de biomasa de las pruebas experimentales realizadas en la primera etapa de la fermentación alcohólica. Se observa que en la prueba 8, a condiciones de temperatura de 28 °C, pH 3,5 y concentración de DAP de 2 g/L, se obtiene el mayor rendimiento de biomasa  $Y_{x/s} = 0,161$*

		<b>BIOMASA (g/L)</b>											
		<b>PRUEBAS</b>											
<b>Horas</b>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0		1,14	1,15	1,17	1,14	1,15	1,13	1,12	1,120	1,14	1,15	1,12	1,14
2		1,27	1,28	1,25	1,32	1,25	1,36	1,61	1,430	1,27	1,28	1,16	1,28
4		2,64	2,26	2,36	2,64	2,36	3,15	3,34	2,520	1,64	1,98	2,11	2,36
6		3,75	3,64	3,60	3,46	3,44	4,82	4,56	3,700	2,75	3,64	3,46	3,20
8		4,82	5,47	4,92	5,01	4,32	6,55	6,84	6,697	3,82	4,47	3,92	3,92
10		6,94	7,17	6,72	6,87	5,86	7,76	7,50	10,289	4,94	5,17	4,72	4,72
12		7,13	8,27	7,52	7,18	6,37	8,07	8,43	11,100	5,33	6,27	5,52	5,38
14		7,18	8,31	7,78	7,21	6,43	8,08	8,54	11,111	5,48	6,31	5,56	5,41
16		7,24	8,33	7,81	7,23	6,46	8,15	8,57	11,112	5,54	6,37	5,64	5,48
18		7,28	8,34	7,82	7,24	6,48	8,22	8,62	11,113	5,61	6,41	5,69	5,51
20		7,34	8,38	7,83	7,25	6,50	8,24	8,67	11,115	5,65	6,48	5,71	5,58
22		7,36	8,44	7,85	7,28	6,51	8,32	8,69	11,118	5,69	6,49	5,74	5,61
24		7,43	8,48	7,88	7,31	6,54	8,36	8,71	11,120	5,77	6,53	5,77	5,63
26		7,61	8,53	7,93	7,34	6,56	8,45	8,73	11,124	5,84	6,62	5,84	5,68
$Y_{x/s}$		0.112	0.112	0.115	0.109	0.105	0.124	0.124	0.161	0.081	0.099	0.085	0.078

El rendimiento de biomasa durante la fermentación alcohólica se muestra en la figura 39. Se observa que, a condiciones de la prueba 8, se obtiene la concentración más alta de biomasa de 11,124 g/L (datos de la tabla 33).



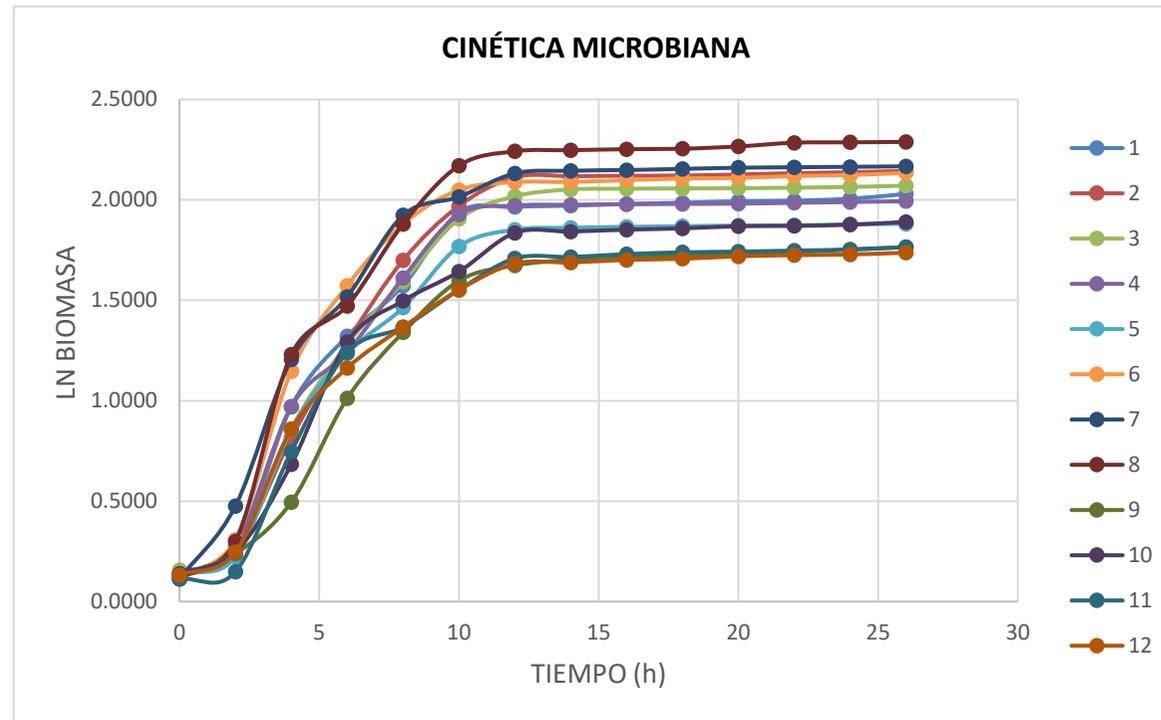
*Figura 39: Producción de biomasa en las pruebas experimentales de la primera etapa del proceso de fermentación alcohólica.*

Tabla 34

*Logaritmo Neperiano de la Biomasa, para determinar la cinética microbiana de las pruebas experimentales de la primera etapa de la fermentación alcohólica. También se indican los valores de velocidad media de crecimiento:  $\mu$  (1/h)*

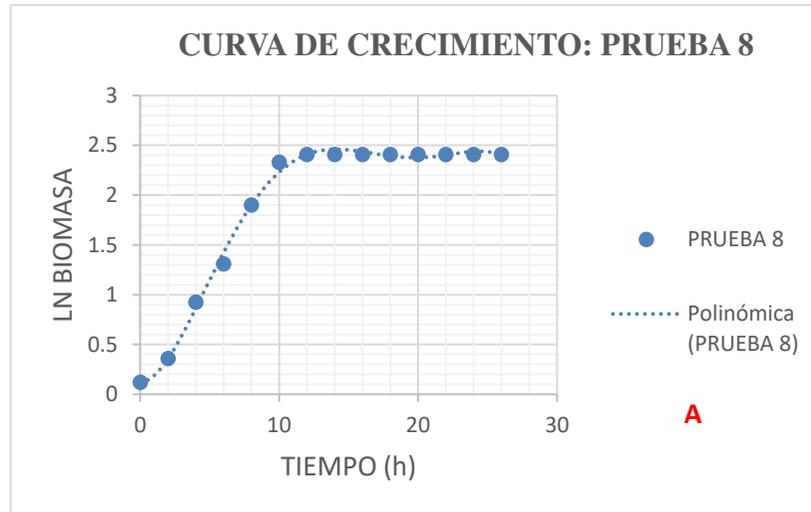
<b>LN DE LA BIOMASA PARA DETERMINAR LA CINÉTICA MICROBIANA</b>												
<b>PRUEBAS</b>												
<b>Horas</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
0	0,1310	0,1398	0,1570	0,1310	0,1398	0,1222	0,1133	0,1187	0,1310	0,1398	0,1133	0,1310
2	0,2390	0,2469	0,2231	0,2776	0,2231	0,3075	0,4762	0,3584	0,2390	0,2469	0,1484	0,2469
4	0,9708	0,8154	0,8587	0,9708	0,8587	1,1474	1,2060	0,9243	0,4947	0,6831	0,7467	0,8587
6	1,3218	1,2920	1,2809	1,2413	1,2355	1,5728	1,5173	1,3081	1,0116	1,2920	1,2413	1,1632
8	1,5728	1,6993	1,5933	1,6114	1,4633	1,8795	1,9228	1,9017	1,3403	1,4974	1,3661	1,3661
10	1,9373	1,9699	1,9051	1,9272	1,7681	2,0490	2,0149	2,3311	1,5974	1,6429	1,5518	1,5518
12	1,9643	2,1126	2,0176	1,9713	1,8516	2,0882	2,1318	2,4069	1,6734	1,8358	1,7084	1,6827
14	1,9713	2,1175	2,0516	1,9755	1,8610	2,0894	2,1448	2,4079	1,7011	1,8421	1,7156	1,6882
16	1,9796	2,1199	2,0554	1,9782	1,8656	2,0980	2,1483	2,4080	1,7120	1,8516	1,7299	1,7011
18	1,9851	2,1211	2,0567	1,9796	1,8687	2,1066	2,1541	2,4081	1,7246	1,8579	1,7387	1,7066
20	1,9933	2,1258	2,0580	1,9810	1,8718	2,1090	2,1599	2,4083	1,7317	1,8687	1,7422	1,7192
22	1,9961	2,1330	2,0605	1,9851	1,8733	2,1187	2,1622	2,4086	1,7387	1,8703	1,7475	1,7246
24	2,0055	2,1377	2,0643	1,9892	1,8779	2,1235	2,1645	2,4087	1,7527	1,8764	1,7527	1,7281
26	2,0295	2,1436	2,0707	1,9933	1,8810	2,1342	2,1668	2,4091	1,7647	1,8901	1,7647	1,7370

En la figura 40, se aprecia la cinética microbiana de las pruebas experimentales de la primera etapa de la fermentación alcohólica (datos de la tabla 34). Se observa que la cinética es mayor, para las condiciones de temperatura de 28 °C, pH 3,5 y concentración de DAP de 2 g/L (prueba 8).

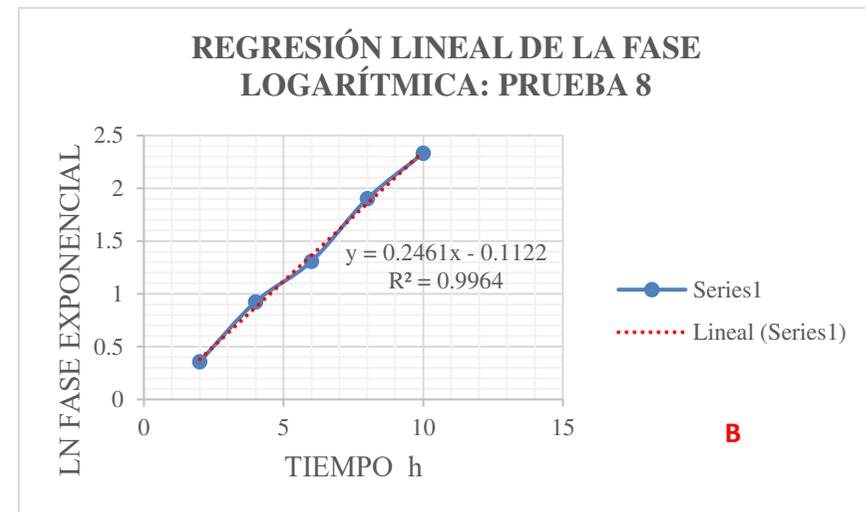


*Figura 40:* Cinética microbiana de las pruebas experimentales de la primera etapa de la fermentación alcohólica.

La velocidad media de crecimiento de la biomasa ( $\mu$ ) se observa en la figura 41. La figura 41a, muestra la curva de crecimiento microbiano de la prueba 8 (tabla 28). La figura 41b, representa la pendiente de la fase exponencial, en la cual  $\mu = 0.2461$  (1/h).



(41a)



(41b)

**Figura 41. Obtención de  $\mu$  de las pruebas experimentales del proceso de fermentación: (41a) Curva de crecimiento microbiano de la prueba 8, y (41b) Pendiente de la fase exponencial de la prueba 8 ( $\mu = 0.2461$  (1/h)).**

Valores de  $\mu$  de las pruebas de la primera etapa del proceso de fermentación alcohólica.

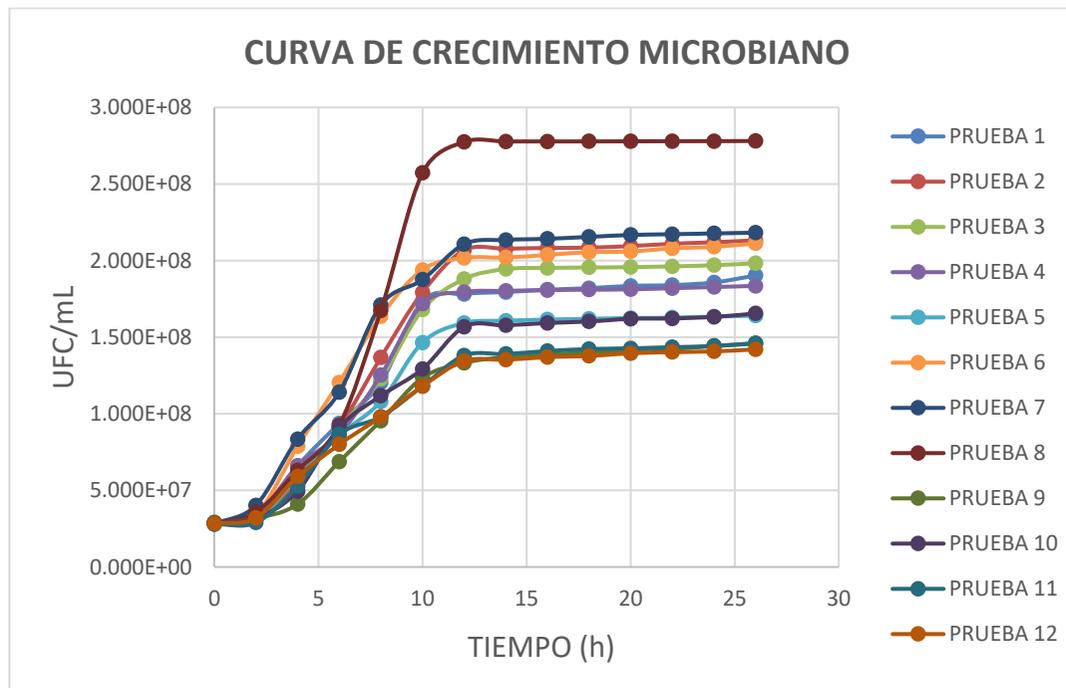
$\mu =$       0.1999    0.2165    0.2049    0.187    0.1847    0.2108    0.1897    0.2461    0.1781    0.1803    0.1713    0.1559

Tabla 35

*Unidad formadora de colonia (UFC/mL x 10<sup>7</sup>), de las pruebas experimentales realizadas en la primera etapa de la fermentación alcohólica*

Horas	UNIDAD FORMADORA DE COLONIA (UFC/mL) * E+07											
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Prueba 5	Prueba 6	Prueba 7	Prueba 8	Prueba 9	Prueba 10	Prueba 11	Prueba 12
0	2,850	2,875	2,925	2,850	2,875	2,825	2,800	2,815	2,850	2,875	2,800	2,850
2	3,175	3,200	3,125	3,300	3,125	3,400	4,025	3,578	3,175	3,200	2,900	3,200
4	6,600	5,650	5,900	6,600	5,900	7,875	8,350	6,300	4,100	4,950	5,275	5,900
6	9,375	9,100	9,000	8,650	8,600	12,050	11,400	9,248	6,875	9,100	8,650	8,000
8	12,050	13,675	12,300	12,525	10,800	16,375	17,100	16,742	9,550	11,175	9,800	9,800
10	17,350	17,925	16,800	17,175	14,650	19,400	18,750	25,722	12,350	12,925	11,800	11,800
12	17,825	20,675	18,800	17,950	15,925	20,175	21,075	27,750	13,325	15,675	13,800	13,450
14	17,950	20,775	19,450	18,025	16,075	20,200	21,350	27,778	13,700	15,775	13,900	13,525
16	18,100	20,825	19,525	18,075	16,150	20,375	21,425	27,780	13,850	15,925	14,100	13,700
18	18,200	20,850	19,550	18,100	16,200	20,550	21,550	27,782	14,025	16,025	14,225	13,775
20	18,350	20,950	19,575	18,125	16,250	20,600	21,675	27,788	14,125	16,200	14,275	13,950
22	18,400	21,100	19,625	18,200	16,275	20,800	21,725	27,795	14,225	16,225	14,350	14,025
24	18,575	21,200	19,700	18,275	16,350	20,900	21,775	27,800	14,425	16,325	14,425	14,075
26	19,025	21,325	19,825	18,350	16,400	21,125	21,825	27,810	14,600	16,550	14,600	14,200

En la figura 42, se aprecia el gráfico de los valores de la tabla 35 (Curva de crecimiento microbiano), de las pruebas experimentales de la primera etapa de la fermentación, se observa que la UFC/mL es mayor a condiciones de temperatura de 28 °C, pH 3,5 y concentración de DAP 2 g/L (prueba 8).



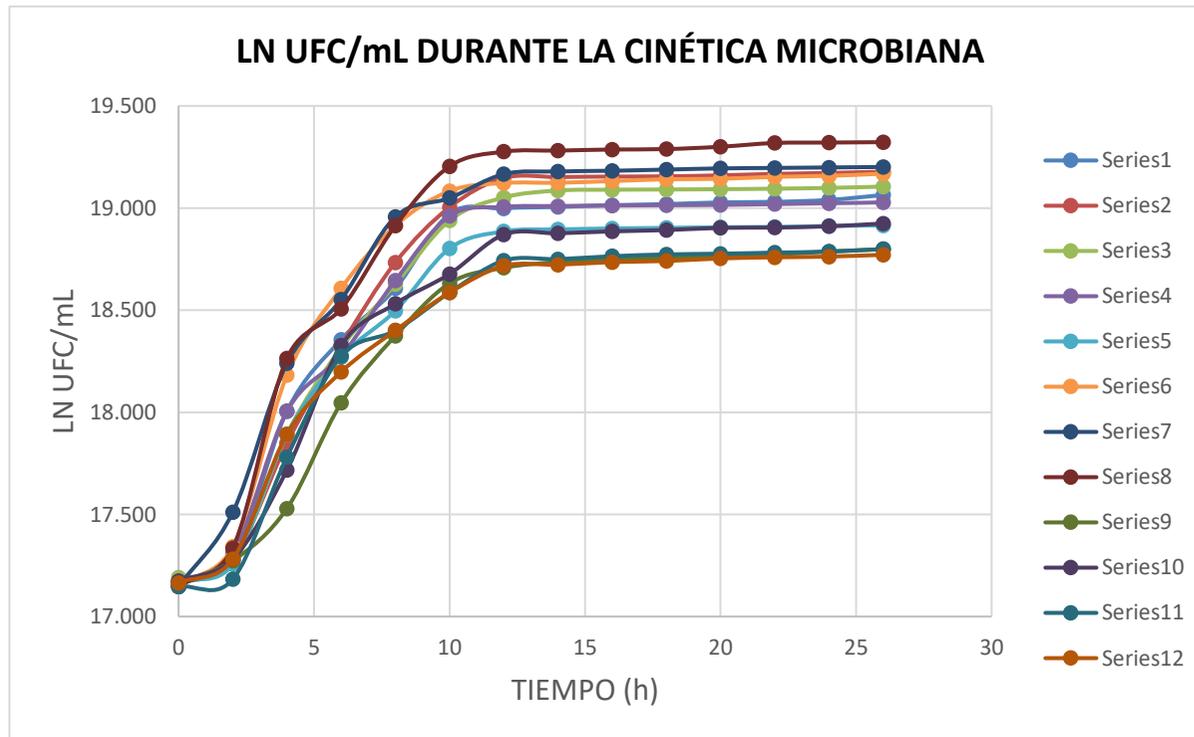
*Figura 42:* Crecimiento microbiano de las pruebas experimentales realizadas en la fermentación alcohólica de la primera etapa.

Tabla 36

*Ln de las UFC/mL, de las pruebas experimentales realizadas en la primera etapa de la fermentación alcohólica*

Horas	LN de UFC/mL											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	17,1654	17,1741	17,1914	17,1654	17,1741	17,1566	17,1477	17,153	17,1654	17,1741	17,1477	17,1654
2	17,2734	17,2812	17,2575	17,3120	17,2575	17,3419	17,5106	17,393	17,2734	17,2812	17,1828	17,2812
4	18,0052	17,8498	17,8930	18,0052	17,8930	18,1818	18,2404	17,959	17,5291	17,7175	17,7811	17,8930
6	18,3561	18,3264	18,3153	18,2757	18,2699	18,6072	18,5517	18,342	18,0460	18,3264	18,2757	18,1975
8	18,6072	18,7337	18,6277	18,6458	18,4976	18,9139	18,9572	18,936	18,3746	18,5318	18,4005	18,4005
10	18,9717	19,0043	18,9395	18,9616	18,8025	19,0834	19,0493	19,365	18,6318	18,6773	18,5862	18,5862
12	18,9987	19,1470	19,0520	19,0057	18,8860	19,1225	19,1662	19,441	18,7077	18,8702	18,7428	18,7171
14	19,0057	19,1518	19,0859	19,0099	18,8954	19,1238	19,1791	19,442	18,7355	18,8765	18,7500	18,7226
16	19,0140	19,1542	19,0898	19,0126	18,9000	19,1324	19,1827	19,442	18,7464	18,8860	18,7643	18,7355
18	19,0195	19,1554	19,0911	19,0140	18,9031	19,1410	19,1885	19,443	18,7589	18,8922	18,7731	18,7410
20	19,0277	19,1602	19,0923	19,0154	18,9062	19,1434	19,1943	19,443	18,7660	18,9031	18,7766	18,7536
22	19,0304	19,1674	19,0949	19,0195	18,9077	19,1530	19,1966	19,443	18,7731	18,9046	18,7818	18,7589
24	19,0399	19,1721	19,0987	19,0236	18,9123	19,1578	19,1989	19,443	18,7871	18,9108	18,7871	18,7625
26	19,0638	19,1780	19,1050	19,0277	18,9154	19,1686	19,2012	19,443	18,7991	18,9245	18,7991	18,7713

La figura 43 muestra la gráfica de los valores de la tabla 36, de las pruebas experimentales de la primera etapa de la fermentación alcohólica. Se observa que la cinética de crecimiento microbiano es mayor a condiciones de temperatura de 28 °C, pH 3,5 y concentración de DAP de 2 g/L.



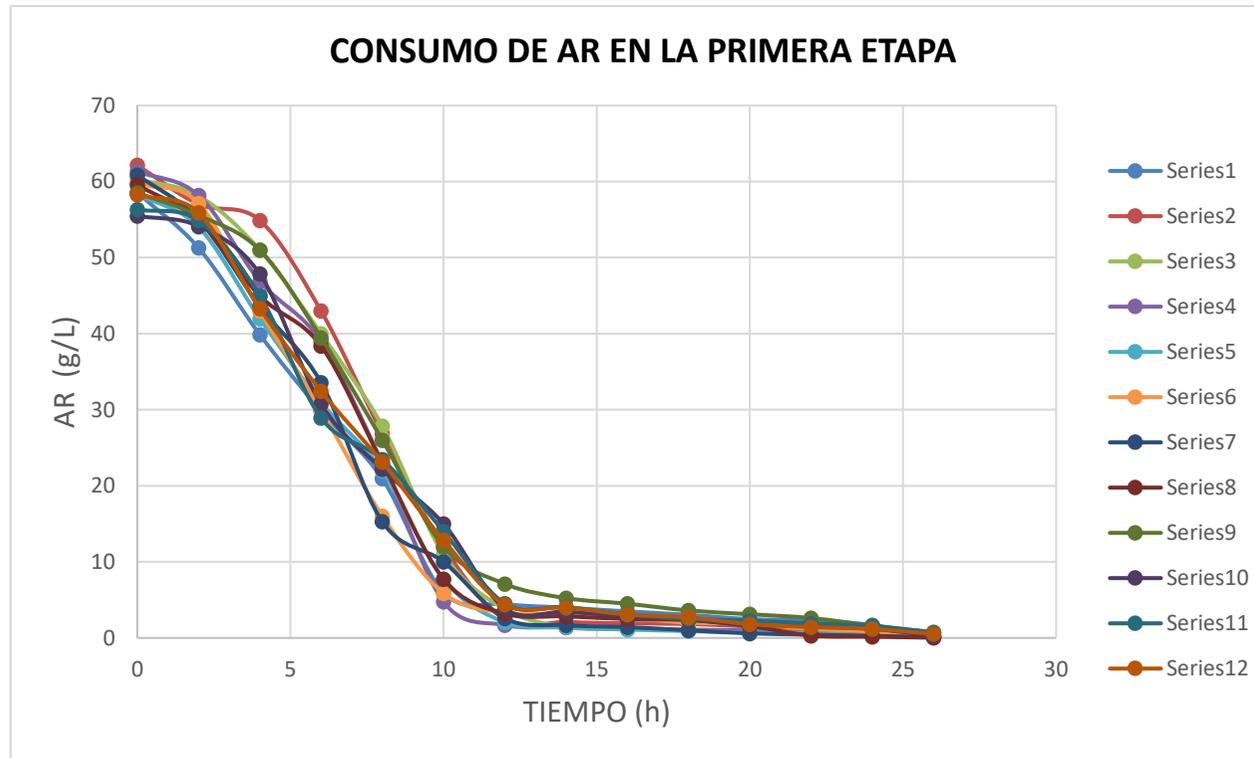
**Figura 43:** LN de las UFC/mL vs. tiempo (h), (cinética de crecimiento microbiano de las pruebas experimentales de la primera etapa de la fermentación alcohólica).

Tabla 37

*Consumo de AR de las pruebas experimentales realizadas en la primera etapa de la fermentación alcohólica. Se aprecia una mayor rapidez de consumo de AR para la prueba 8.*

<b>CONSUMO DE AZÚCARES REDUCTORES</b>												
<b>PRUEBAS</b>												
<b>Horas</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
	<b>g/L</b>											
0	58,560	62,140	60,300	61,340	58,360	59,740	60,860	60,450	58,530	55,480	56,330	58,250
2	51,272	57,020	58,127	58,186	54,030	57,128	55,012	56,756	55,567	54,134	54,865	55,887
4	39,876	54,890	50,982	46,897	41,997	42,991	43,587	52,451	50,997	47,847	44,976	43,308
6	29,820	42,980	39,985	38,992	30,960	29,980	33,571	44,944	39,467	30,724	28,929	32,423
8	20,948	26,860	27,846	22,978	21,970	16,001	15,287	25,976	26,002	22,171	23,462	23,101
10	5,953	11,980	10,998	4,747	7,715	5,866	9,998	5,482	11,975	14,996	13,989	12,841
12	4,451	2,444	3,776	1,696	2,067	3,284	2,581	0,192	7,108	3,860	4,520	4,368
14	3,978	2,097	1,430	1,388	1,411	3,201	1,667	0,121	5,238	3,445	4,046	3,983
16	3,487	1,914	1,150	1,186	1,101	2,621	1,418	0,114	4,495	2,826	3,101	3,086
18	3,037	1,829	1,060	1,078	0,899	2,014	1,006	0,108	3,612	2,414	2,505	2,702
20	2,471	1,481	0,969	0,979	0,702	1,845	0,596	0,096	3,117	1,699	2,266	1,807
22	2,296	0,928	0,798	0,687	0,599	1,178	0,433	0,076	2,617	1,597	1,908	1,424
24	1,684	0,565	0,525	0,394	0,297	0,845	0,271	0,064	1,620	1,191	1,551	1,168
26	0,213	0,120	0,090	0,121	0,104	0,122	0,110	0,039	0,760	0,290	0,720	0,530

El consumo de AR de las pruebas experimentales de la fermentación alcohólica se aprecia en la figura 44. Se observa que la velocidad de consumo de AR es mayor a condiciones de la prueba 8 (datos de la tabla 37).



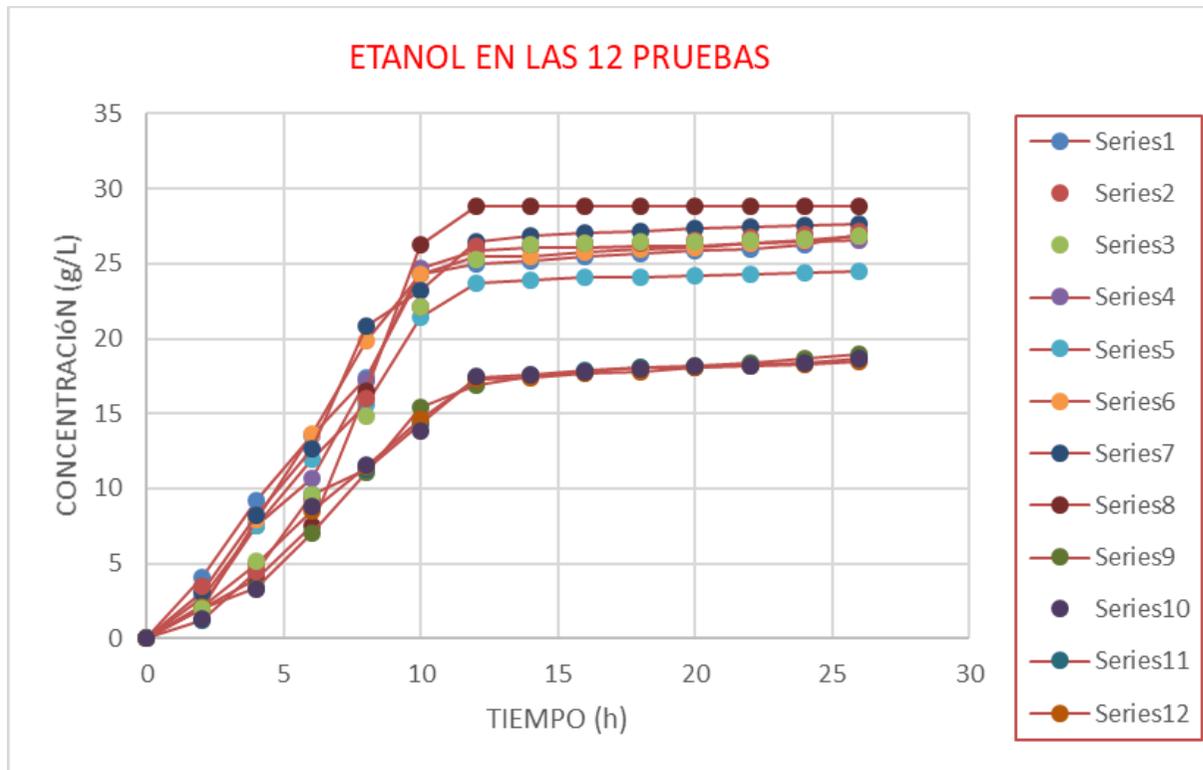
*Figura 44:* Consumo de azúcares reductores de las pruebas de la primera etapa de la fermentación alcohólica.

Tabla 38

*Producción de etanol en las pruebas experimentales realizadas en la primera etapa del proceso de la fermentación alcohólica*

<b>PRODUCCIÓN DE ETANOL (g/L)</b>												
<b>PRUEBAS</b>												
<b>Horas</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	4,075	3,495	2,016	2,212	2,705	2,015	3,124	1,985	1,972	1,336	1,254	2,110
4	9,176	4,422	5,174	7,559	7,497	7,946	8,209	3,998	3,366	3,323	4,422	4,987
6	13,587	9,299	9,620	10,720	11,958	13,677	12,676	7,561	7,001	8,822	9,567	8,546
8	17,384	15,964	14,827	17,158	15,572	19,836	20,838	16,548	11,061	11,566	11,317	11,439
10	24,282	22,122	22,121	24,643	21,394	24,305	23,191	26,276	15,421	13,871	14,352	14,625
12	24,983	26,128	25,249	25,896	23,657	25,454	26,493	28,792	16,937	17,461	17,391	17,258
14	25,224	26,272	26,270	26,025	23,922	25,491	26,900	28,825	17,535	17,597	17,544	17,378
16	25,466	26,349	26,392	26,110	24,049	25,748	27,011	28,828	17,773	17,801	17,846	17,658
18	25,655	26,385	26,431	26,156	24,132	26,018	27,196	28,831	18,056	17,937	18,037	17,778
20	25,897	26,532	26,471	26,198	24,213	26,094	27,381	28,837	18,215	18,178	18,114	18,058
22	25,975	26,771	26,546	26,324	24,255	26,394	27,454	28,846	18,377	18,211	18,233	18,178
24	26,250	26,927	26,667	26,451	24,379	26,544	27,527	28,852	18,701	18,346	18,352	18,258
26	26,920	27,120	26,860	26,570	24,460	26,870	27,600	28,864	18,980	18,650	18,630	18,460

En la figura 45, se aprecian los valores de la tabla 38, de las pruebas experimentales de la primera etapa de la fermentación alcohólica. Se logra la mayor concentración de etanol a condiciones de la prueba 8



**Figura 45: Producción de etanol durante las pruebas experimentales realizadas en la primera etapa del proceso de fermentación alcohólica.**

### 5.2.2 Pruebas experimentales de la segunda etapa de la fermentación alcohólica con el fin de determinar la concentración óptima de sustrato para obtener el máximo rendimiento de etanol

Según el estudio experimental de la primera etapa, se concluyó que la prueba realizada a condiciones de temperatura de 28 °C, pH 3,5, concentración de DAP de 2 g/L y concentración de sustrato de 60 g/L (prueba 8) proporcionó el mayor rendimiento de etanol:  $Y_{p/s} = 0,477$  y biomasa,  $Y_{x/s} = 0,165$ .

A las condiciones mencionadas en el párrafo anterior, se realizaron pruebas experimentales para determinar el máximo rendimiento de alcohol etílico a las concentraciones de AR de: 10 g/L, 30 g/L, y 90 g/L.

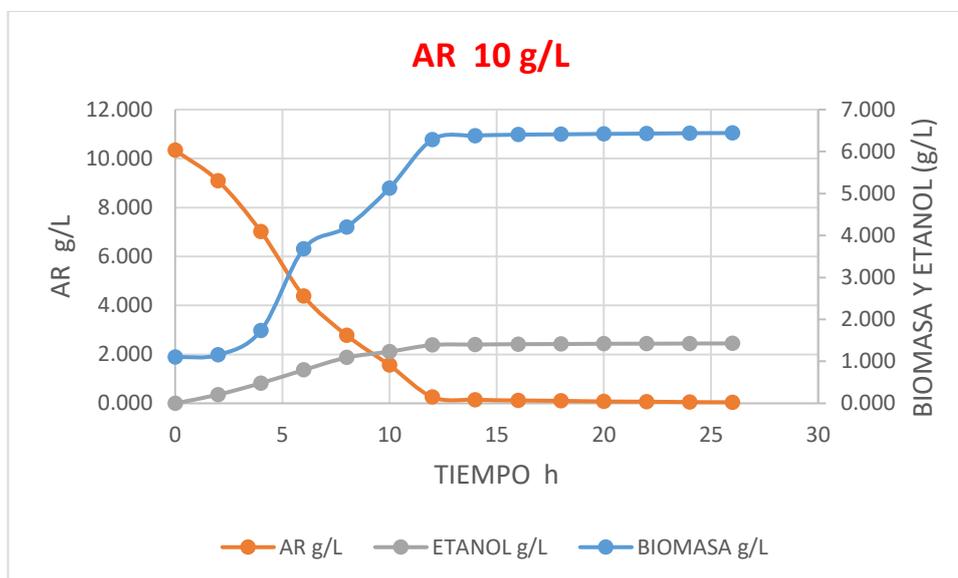
La tabla 39, muestra las concentraciones de células de levadura, AR y alcohol etílico a concentración de sustrato de 10 g/L, a condiciones de temperatura de 28 °C; pH 3,5 y concentración de DAP de 2 g/L. El rendimiento de etanol fue de  $Y_{p/s} = 0,429$

Tabla 39

*Consumo de sustrato, producción de biomasa, etanol, rendimiento de biomasa y etanol, a concentración de AR de 10 g/L en la fermentación alcohólica*

TIEMPO h	BIOMASA g/L	AR g/L	ETANOL g/L	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
0	1,099	10,340	0,000	0,042	0,283
2	1,152	9,090	0,354	0,280	0,227
4	1,732	7,015	0,825	0,740	0,203
6	3,685	4,375	1,362	0,324	0,319
8	4,201	2,781	1,871	0,760	0,197
10	5,130	1,558	2,112	0,888	0,207
12	6,285	0,258	2,381	0,846	0,178
14	6,378	0,148	2,401	0,797	0,545
16	6,402	0,118	2,417	0,533	0,333
18	6,410	0,103	2,422	0,407	0,407
20	6,421	0,076	2,433	0,875	0,375
22	6,428	0,068	2,436	0,529	0,412
24	6,437	0,051	2,443	0,714	0,429
26	6,442	0,044	2,446		
		$Y_{x/s} = 0,714$		$Y_{p/s} = 0,429$	

La figura 46 muestra los valores de la tabla 39. Se observa que la producción de biomasa es de 9,5 g/L y la de etanol es de 5,5 g/L.



**Figura 46: Consumo de AR, producción de biomasa y etanol, para concentración de AR de 10 g/L.**

Las variaciones de las concentraciones de biomasa, AR y etanol en la fermentación alcohólica, se indica en la tabla 40, para la concentración de AR de 30 g/L, a condiciones de temperatura de 28 °C, pH 3,5 y concentración de DAP de 2 g/L. Obteniéndose un rendimiento de etanol de  $Y_{p/s} = 0,4769$ .

Tabla 40

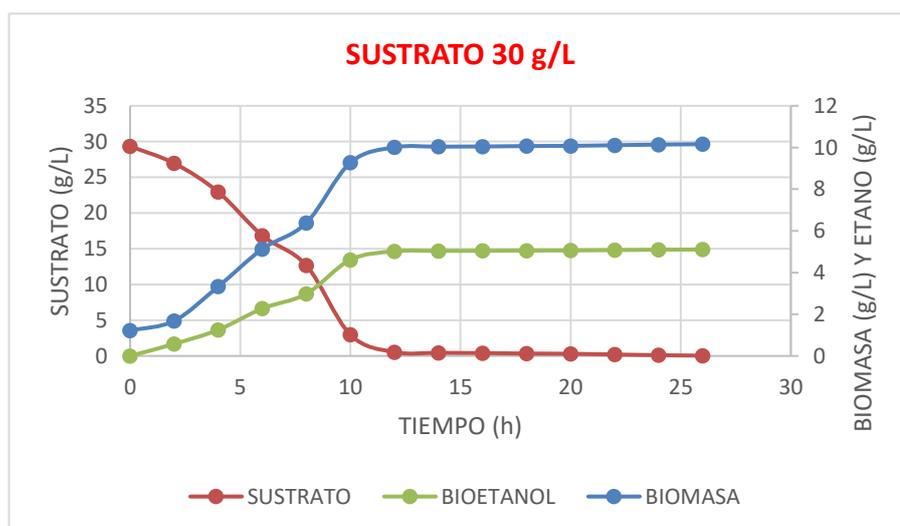
*Datos experimentales de las concentraciones de AR, biomasa y etanol; rendimiento de biomasa y etanol, para concentración de AR de 30 g/L durante la fermentación*

TIEMPO h	AR 30 g/L			$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
	BIOMASA g/L	AR g/L	ETANOL g/L		
0	1,216	29,340	0,000	0,1962	0,7063
2	1,683	26,960	1,681	0,4097	0,4900
4	3,330	22,940	3,651	0,2955	0,4904
6	5,130	16,849	6,638	0,2993	0,4908
8	6,380	12,673	8,687	0,2981	0,4911

10	9,270	2,978	13,449	0,3033	0,4913
12	10,010	0,538	14,648	0,2970	0,4921
14	10,040	0,437	14,697	0,2941	0,4912
16	10,050	0,403	14,714	0,2985	0,4925
18	10,070	0,336	14,747	0,2941	0,5000
20	10,080	0,302	14,764	0,3030	0,5051
22	10,110	0,203	14,814	0,3061	0,5000
24	10,140	0,105	14,863	0,3077	0,5077
26	10,160	0,040	14896		

$$Y_{x/s} = 0,305 \quad Y_{p/s} = 0,508$$

La figura 47 muestra los valores de la tabla 40. Se puede observar que la producción de biomasa es de 10,16 g/L y la de etanol es de 14,896 g/L.



**Figura 47: Consumo de AR, producción de biomasa y etanol, para la concentración de AR de 30 g/L.**

En la tabla 41, se presentan las concentraciones de biomasa, AR, etanol, de la prueba 8, en la primera etapa del proceso fermentación alcohólica, para la concentración de AR de 60 g/L, a condiciones de temperatura de 28 °C, pH 3,5 y concentración de DAP de 2 g/L. Se obtuvo un rendimiento total de etanol de  $Y_{p/s}$  0,508.

Tabla 41

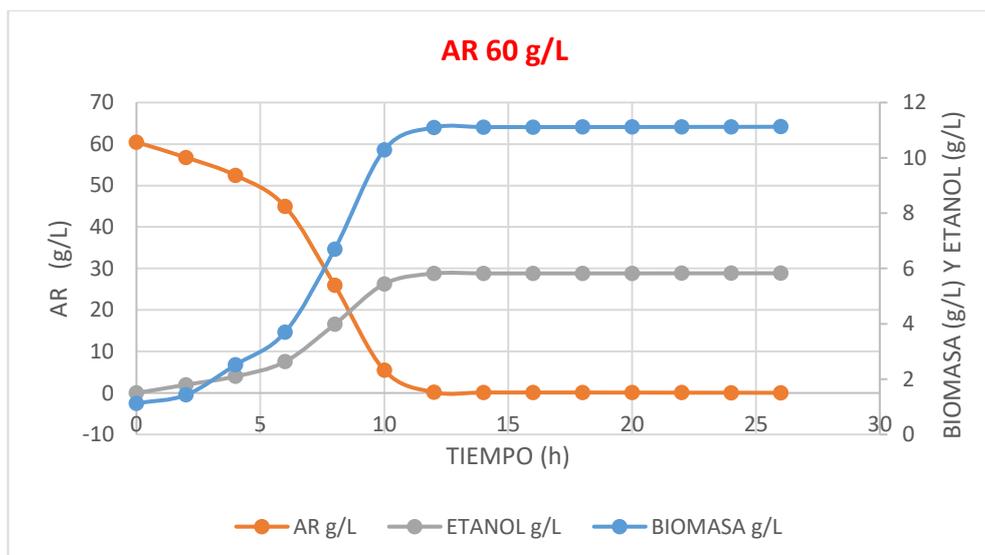
*Concentración de AR, biomasa, etanol y los respectivos rendimientos de biomasa y etanol durante la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 60 g/L*

AR 60 g/L					
Horas	Biomasa g/L	AR g/L	Etanol g/L	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
0	1,126	60,450	0,000	0,0826	0,5374
2	1,431	56,756	1,985	0,2530	0,4676
4	2,520	52,451	3,998	0,1571	0,4746
6	3,699	44,944	7,561	0,1581	0,4738
8	6,697	25,976	16,548	0,1753	0,4747
10	10,289	5,482	26,276	0,1533	0,4757
12	11,100	0,192	28,792	0,1547	0,4613
14	11,111	0,121	28,825	0,1538	0,4615
16	11,112	0,114	28,828	0,1562	0,4688
18	11,113	0,108	28,831	0,1600	0,4720
20	11,115	0,096	28,837	0,1579	0,4737
22	11,118	0,076	28,846	0,1587	0,4762
24	11,120	0,064	28,852	0,1606	0,4739
26	11,124	0,039	28,864		

$$Y_{x/s} = 0,1606$$

$$Y_{p/s} = 0,4739$$

En la figura 48, se muestra el gráfico de los valores de la tabla 41. Se observa que la producción de biomasa es de 11,12 g/L y la de etanol, de 28,86 g/L.



**Figura 48: Datos graficados de consumo sustrato, producción de biomasa y etanol, para concentración de AR inicial de 60 g/L.**

En la tabla 42 aprecian las variaciones de las concentraciones de biomasa, AR, etanol, los rendimientos de biomasa y etanol en el proceso de fermentación alcohólica, para la concentración de AR de 90 g/L, a condiciones de temperatura 28 °C, pH 3,5 y concentración de DAP de 2 g/L. Obteniéndose un rendimiento total de etanol de  $Y_{p/s}$  0,4779.

Tabla 42

*Valores de las concentraciones de AR, biomasa, etanol y los rendimientos de biomasa y etanol en el proceso de fermentación alcohólica, para concentración de AR de 90 g/L*

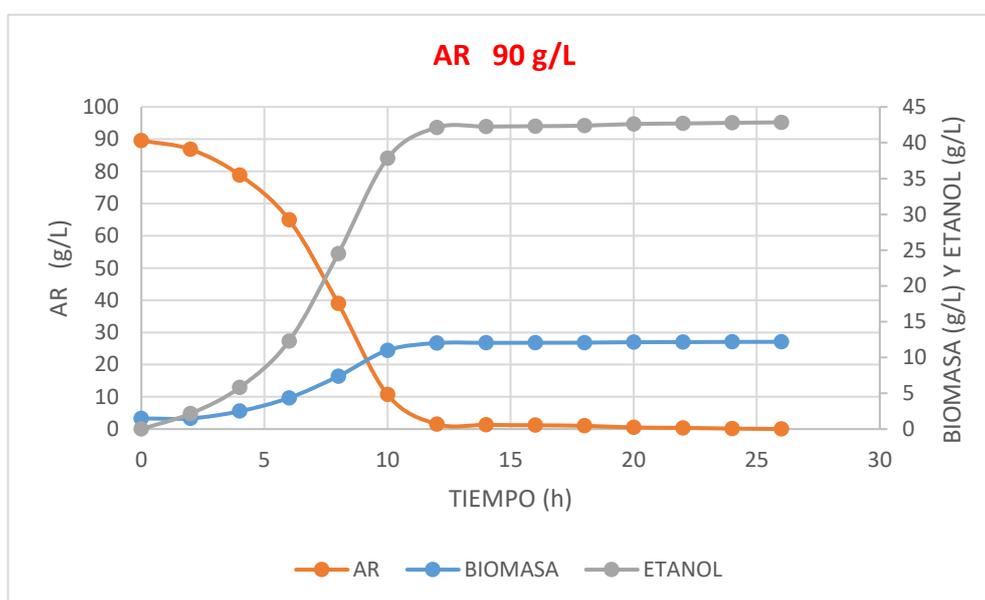
AR 90 g/L					
Horas	Biomasa g/L	AR g/L	Etanol g/L	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
0	1,486	89,560	0,000	0,0007	0,7930
2	1,488	86,830	2,165	0,1261	0,4577
4	2,493	78,860	5,813	0,1340	0,4670
6	4,353	64,978	12,296	0,1164	0,4699
8	7,377	38,989	24,509	0,1280	0,4707
10	11,000	10,689	37,829	0,1109	0,4711
12	12,012	1,563	42,128	0,1124	0,4719
14	12,042	1,296	42,254	0,1120	0,4720
16	12,056	1,171	42,313	0,1132	0,4654
18	12,074	1,012	42,387	0,1142	0,4626
20	12,132	0,504	42,622	0,1151	0,4676
22	12,148	0,365	42,687	0,1154	0,4712

24	12,172	0,157	42,785	0,1176	0,4779
26	12,188	0,021	42,850		

$$Y_{x/s} = 0,1176$$

$$Y_{p/s} = 0,4779$$

La producción de biomasa (12,19 g/L) y la producción de etanol (42,85 g/L), se observan en la figura 49 (datos de la tabla 42).



**Figura 49: Consumo de AR, formación de biomasa y etanol, para concentración inicial de AR de 90 g/L.**

### 5.2.3 Comparación del consumo de AR, producción de biomasa y etanol, en las pruebas experimentales del proceso de fermentación alcohólica, a concentraciones de AR de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L

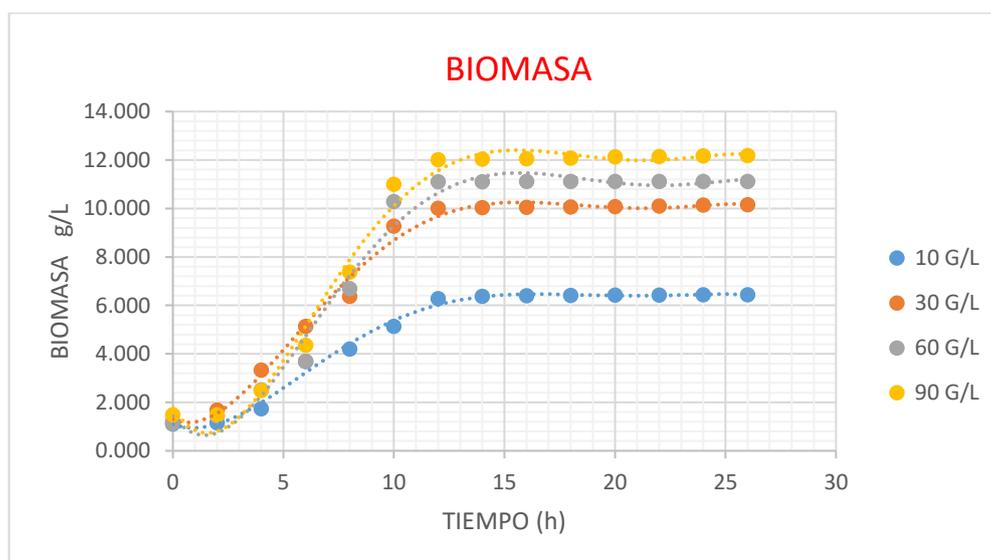
La producción de biomasa para concentraciones de AR de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L se indica en la tabla 43, a condiciones de temperatura de 28 °C, pH, 3,5 y concentración de DAP de 2 g/L. Se observa una mayor producción de biomasa de 12,188 g/L, para concentración de AR de 90 g/L.

Tabla 43

*Producción de biomasa para concentraciones de AR de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L, en la fermentación alcohólica*

HORAS	BIOMASA			
	10 G/L	30 G/L	60 G/L	90 G/L
0	1,099	1,216	1,126	1,486
2	1,152	1,683	1,431	1,488
4	1,732	3,330	2,520	2,493
6	3,685	5,130	3,699	4,353
8	4,201	6,380	6,697	7,377
10	5,130	9,270	10,289	11,000
12	6,285	10,010	11,100	12,012
14	6,378	10,040	11,111	12,042
16	6,402	10,050	11,112	12,056
18	6,410	10,070	11,113	12,074
20	6,421	10,080	11,115	12,132
22	6,428	10,110	11,118	12,148
24	6,437	10,140	11,120	12,172
26	6,442	10,160	11,124	12,188

La mayor producción de biomasa de 12,18 g/L a concentración de AR de 90 g/L se observa en la figura 50 (datos de la tabla 43).



**Figura 50: Producción de biomasa en el proceso de fermentación alcohólica para concentraciones de AR de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L.**

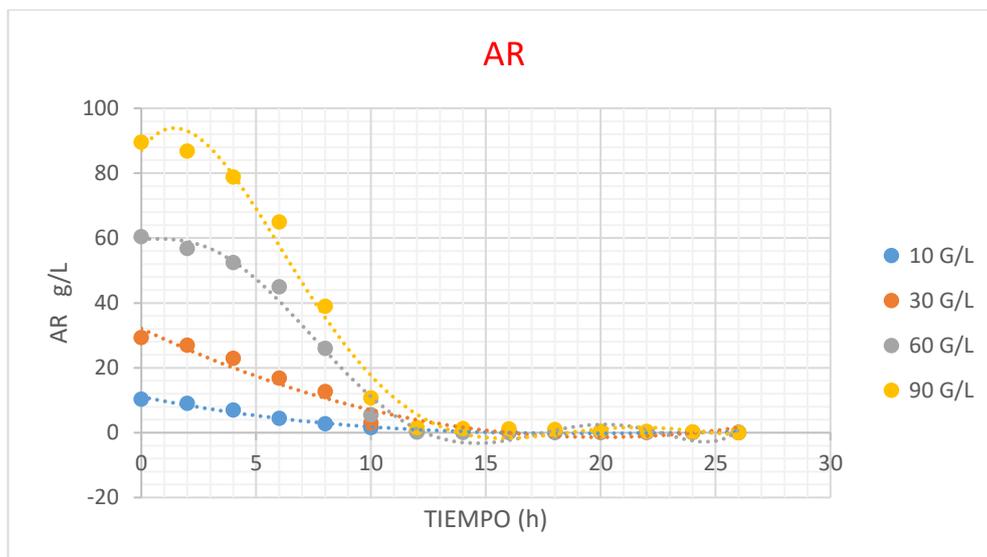
El consumo de AR a concentraciones de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L, se muestran en la tabla 44, a condiciones de temperatura de 28 °C, pH 3,5 y concentración de DAP de 2 g/L. Se observa una mayor rapidez de consumo de AR para la concentración de 90 g/L.

Tabla 44

*Consumo de AR en la segunda etapa del proceso de fermentación alcohólica para concentraciones de AR de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L*

HORAS	AR			
	10 G/L	30 G/L	60 G/L	90 G/L
0	10,340	29,340	60,450	89,560
2	9,090	26,960	56,756	86,830
4	7,015	22,940	52,451	78,860
6	4,375	16,849	44,944	64,978
8	2,781	12,673	25,976	38,989
10	1,558	2,978	5,482	10,689
12	0,258	0,538	0,192	1,563
14	0,148	0,437	0,121	1,296
16	0,118	0,403	0,114	1,171
18	0,103	0,336	0,108	1,012
20	0,076	0,302	0,096	0,504
22	0,068	0,203	0,076	0,365
24	0,051	0,105	0,064	0,157
26	0,044	0,040	0,039	0,021

En la figura 51, se aprecian los valores de la tabla 44, del consumo de AR. Se aprecia una mayor rapidez de consumo de AR a concentración de 90 g/L.



**Figura 51: Consumo de AR a concentración de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L, durante el proceso de fermentación alcohólica.**

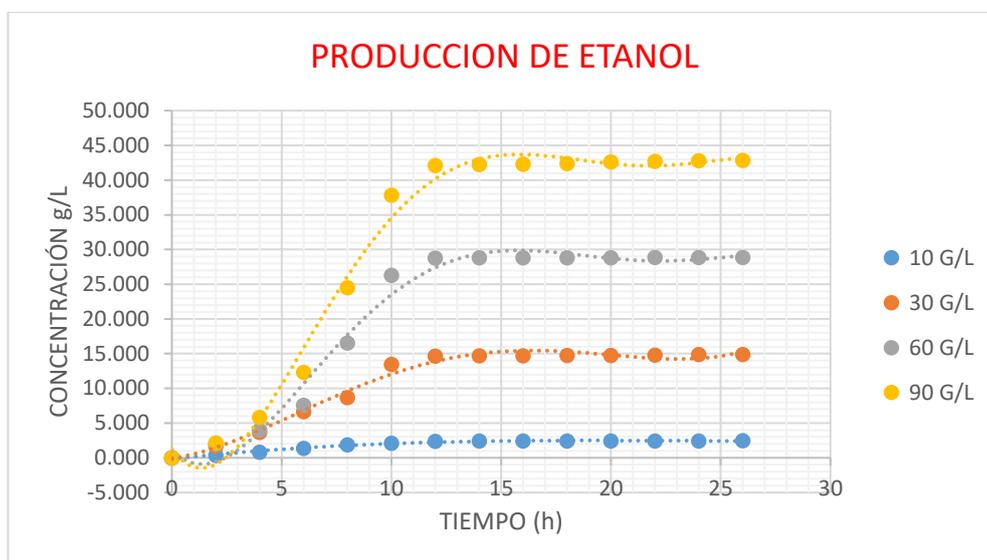
La producción de etanol en la fermentación alcohólica a concentraciones de AR de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L y a condiciones de temperatura de 28 °C; pH, 3,5 y concentración de DAP de 2 g/L, se aprecia en la tabla 45. Se observa una mayor producción de etanol de 42,85 g/L a concentración de AR de 90 g/L.

Tabla 45

*Producción de alcohol etílico para concentraciones de AR de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L, durante el proceso de fermentación alcohólica*

HORAS	ETANOL			
	10 G/L	30 G/L	60 G/L	90 G/L
0	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0,354	1,681	1,985	2,165
4	0,825	3,651	3,998	5,813
6	1,362	6,638	7,561	12,296
8	1,871	8,687	16,548	24,509
10	2,112	13,449	26,276	37,829
12	2,381	14,648	28,793	42,128
14	2,401	14,697	28,825	42,254
16	2,417	14,714	28,828	42,313
18	2,422	14,747	28,831	42,387
20	2,433	14,764	28,837	42,622
22	2,436	14,814	28,846	42,687
24	2,443	14,863	28,852	42,785
26	2,446	14,896	28,864	42,850

En la figura 52, se aprecian los valores de producción de etanol en la segunda etapa del proceso de fermentación alcohólica (datos de la tabla 45). Se obtiene una mayor producción de etanol de 42,85 g/L para una concentración inicial de AR de 90 g/L.



**Figura 52: Producción de etanol de la segunda etapa del proceso de fermentación alcohólica, para concentraciones de AR de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L.**

#### 5.2.4 Formación de biomasa, CO<sub>2</sub>, consumo de O<sub>2</sub> y el pH del mosto durante el proceso de fermentación alcohólica, para concentraciones iniciales de AR de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L

La tabla 46, muestra la producción de biomasa, CO<sub>2</sub>, concentración de O<sub>2</sub> y el pH durante la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 10 g/L. Las mediciones de O<sub>2</sub> se realizaron con el medidor de la marca Milwaukee MW600 Dissolved Oxygen DO Meter with 5 Membrane Caps y la concentración de CO<sub>2</sub>, con el medidor Thermo-Higro-NDIR CO<sub>2</sub> Meter TES-1370.

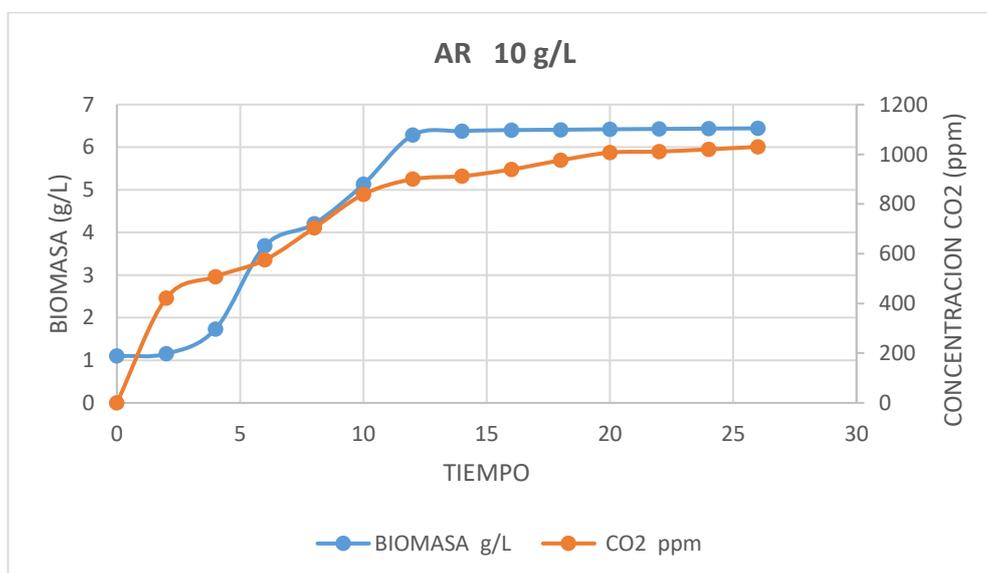
Tabla 46

*Producción de biomasa, CO<sub>2</sub>, concentración de O<sub>2</sub> y el pH, en la segunda etapa del proceso de fermentación alcohólica, para concentración de AR de 10 g/L*

SUSTRATO 10 g/L					
HORAS	BIOMASA	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> Acum	O <sub>2</sub>	pH

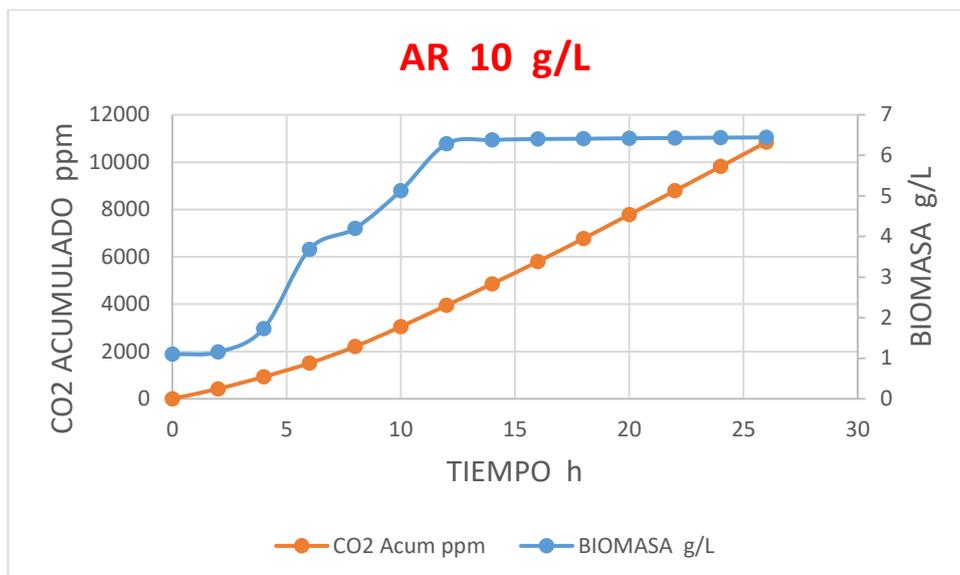
	g/L	ppm	ppm	%	
0	1,099	0	0	98,450	3,5
2	1,152	421	421	95,470	3,4
4	1,732	508	929	75,430	3,4
6	3,685	575	1504	44,260	3,2
8	4,201	704	2208	17,530	3,3
10	5,130	839	3047	4,630	3,0
12	6,285	900	3947	0,650	3,1
14	6,378	912	4859	0,315	3,2
16	6,402	939	5798	0,264	3,3
18	6,410	976	6774	0,232	3,4
20	6,421	1007	7781	0,135	3,3
22	6,428	1011	8792	0,126	3,2
24	6,437	1020	9812	0,123	3,4
26	6,442	1030	10842	0,107	3,3

La producción de Biomasa y CO<sub>2</sub>, en la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 10 g/L se grafica en la figura 53 (datos de la tabla 46).



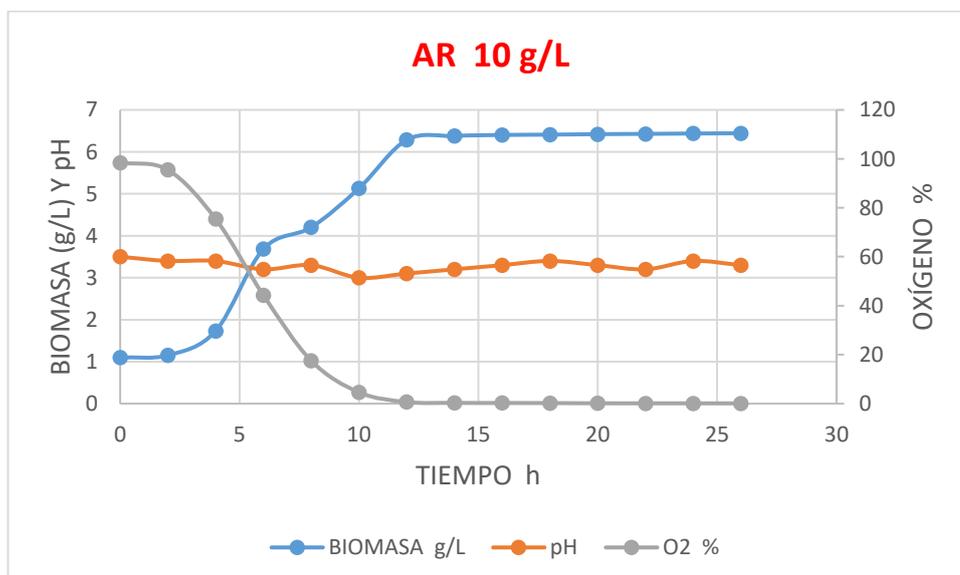
**Figura 53: Producción de biomasa y CO<sub>2</sub>, para concentración de AR de 10 g/L, durante la fermentación alcohólica.**

La producción de biomasa y CO<sub>2</sub> acumulado, durante la fermentación alcohólica a concentración de AR de 10 g/L se aprecia en la figura 54 (datos de la tabla 46).



**Figura 54: Producción de biomasa y CO<sub>2</sub> acumulado, para concentración de AR de 10 g/L, en la fermentación alcohólica.**

La figura 55 muestra la producción de biomasa, concentración de O<sub>2</sub> y el pH del mosto en el proceso de fermentación alcohólica, para concentración de AR de 10 g/L (datos de la tabla 46).



**Figura 55: Producción de biomasa, concentración de O<sub>2</sub> y el pH durante el proceso de fermentación alcohólica, para concentración de AR de 10 g/L.**

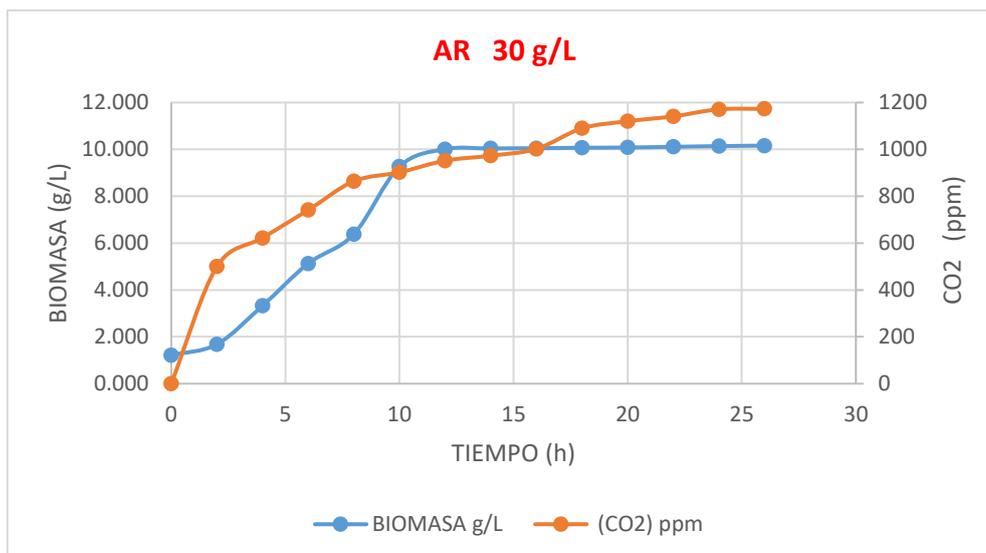
En la tabla 47, se presentan la producción de biomasa, CO<sub>2</sub>, concentración de O<sub>2</sub> y el pH durante la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 30 g/L.

Tabla 47

*Producción de biomasa, CO<sub>2</sub>, concentración de O<sub>2</sub> y el pH durante el proceso de fermentación alcohólica, para concentración de AR de 30 g/L*

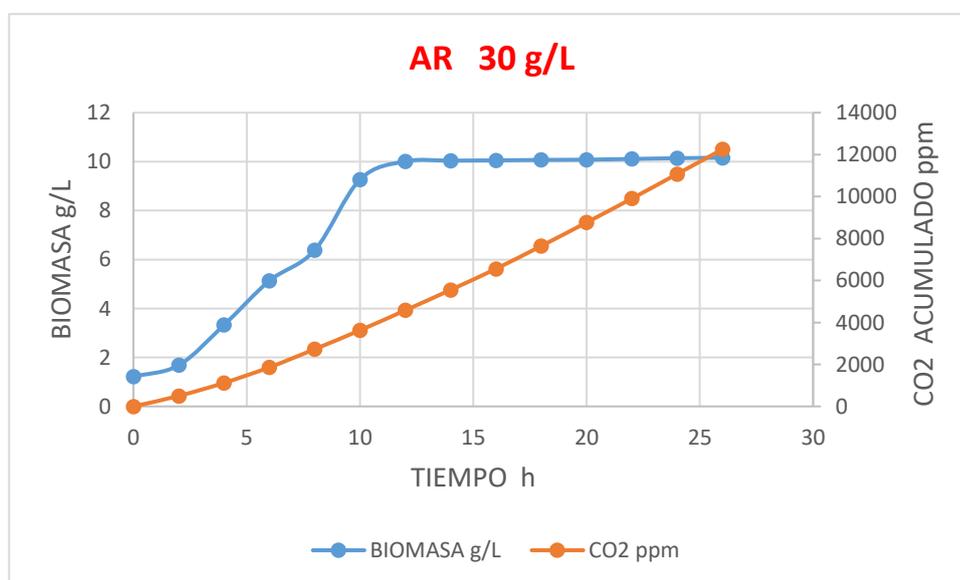
AR 30 g/L					
Horas	Biomasa g/L	CO <sub>2</sub> ppm	CO <sub>2</sub> acum. Ppm	O <sub>2</sub> %	pH
0	1,22	0	0	96,27	3,5
2	1,68	500	500	91,42	3,5
4	3,33	622	1122	52,34	3,4
6	5,13	741	1863	40,42	3,4
8	6,38	864	2727	26,13	3,3
10	9,27	902	3629	12,34	3,0
12	10,01	952	4581	0,76	3,3
14	10,04	973	5554	0,40	3,4
16	10,05	1002	6556	0,24	3,3
18	10,07	1090	7646	0,14	3,4
20	10,08	1120	8766	0,13	3,3
22	10,11	1141	9907	0,12	3,4
24	10,14	1171	11078	0,12	3,3
26	10,16	1173	12251	0,11	3,3

En la figura 56, se aprecian los valores de la tabla 47, de producción de biomasa y CO<sub>2</sub> en la fermentación alcohólica, para concentración de sustrato de 30 g/L.



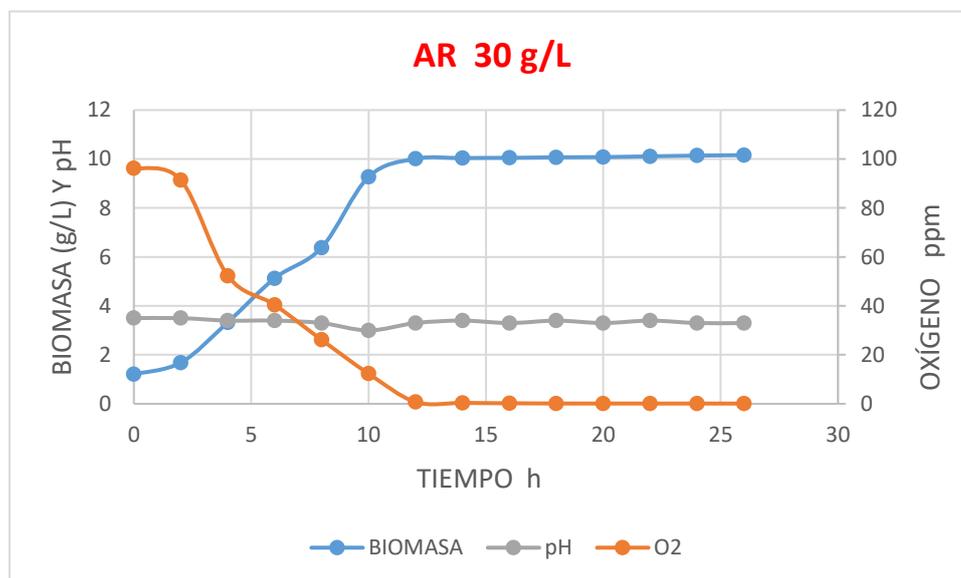
**Figura 56: Producción de biomasa y CO<sub>2</sub> durante el proceso de fermentación alcohólica, para concentración de AR de 30 g/L.**

Los valores de la tabla 47, de producción de biomasa y CO<sub>2</sub> acumulado, durante la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 30 g/L se indican en la figura 57.



**Figura 57: Producción de biomasa y CO<sub>2</sub> acumulado, durante el proceso de la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 30 g/L**

La gráfica de los datos de la tabla 47, de producción de biomasa, concentración de O<sub>2</sub> y el pH del mosto en la fermentación alcohólica se aprecia en la figura 58.



**Figura 58: Producción de biomasa, concentración de O<sub>2</sub> y el pH durante la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 30 g/L.**

En la tabla 48 se muestra los datos de producción de biomasa, CO<sub>2</sub>, concentración de O<sub>2</sub> y el pH durante la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 60 g/L

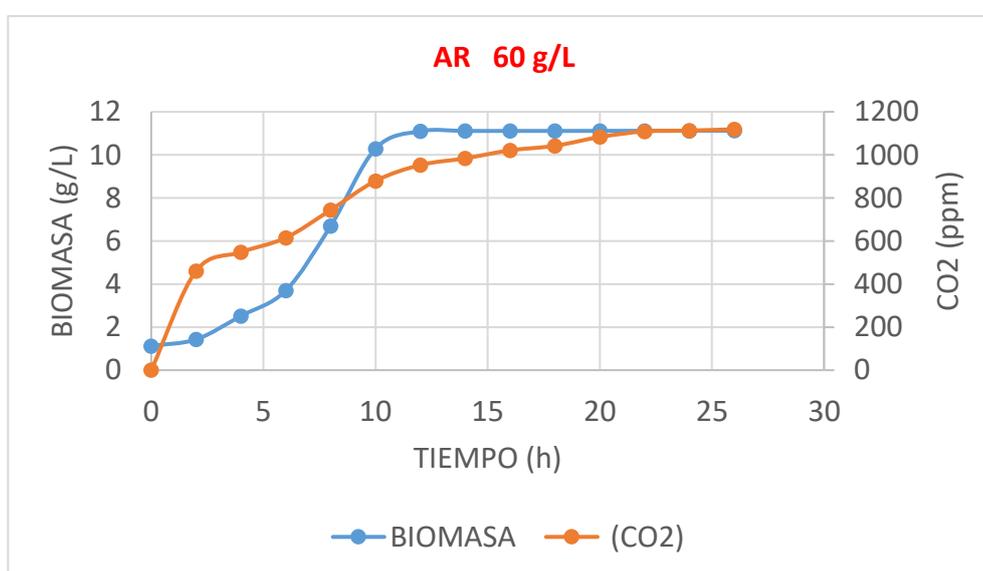
**Tabla 48**

*Producción de biomasa, CO<sub>2</sub>, concentración de O<sub>2</sub> y el pH durante la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 60 g/L*

Horas	AR 60 g/L				
	Biomasa g/L	CO <sub>2</sub> ppm	CO <sub>2</sub> acum. ppm	O <sub>2</sub> %	pH
0	1,126	0	0	98,450	3,5
2	1,431	461	461	95,470	3,4
4	2,520	548	1009	75,430	3,4
6	3,699	615	1624	44,260	3,2
8	6,697	744	2368	27,530	3,3
10	10,289	879	3247	4,630	3,0
12	11,100	953	4200	0,650	3,1
14	11,111	984	5184	0,315	3,2
16	11,112	1021	6205	0,264	3,3

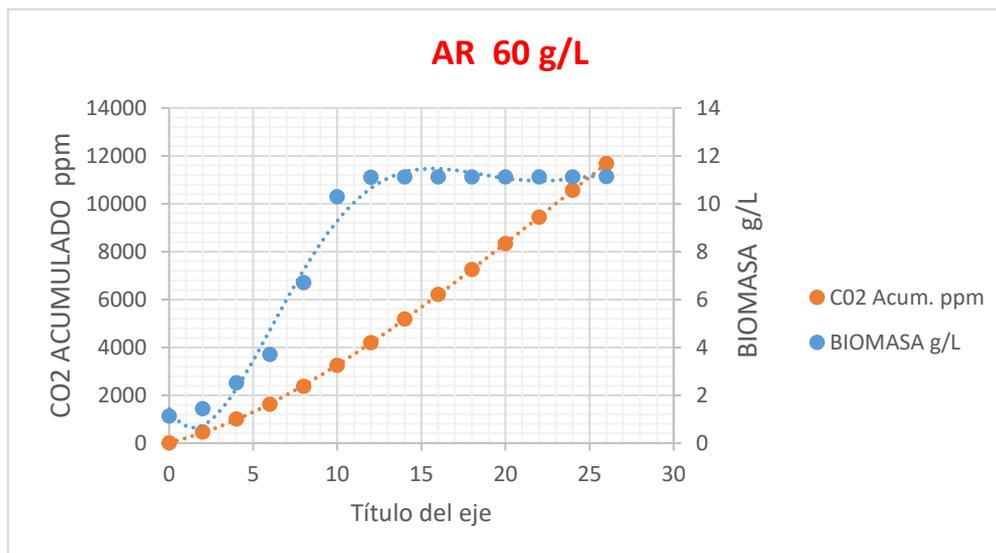
18	11,113	1042	7247	0,232	3,4
20	11,115	1083	8330	0,135	3,3
22	11,118	1109	9439	0,131	3,2
24	11,120	1113	10552	0,127	3,4
26	11,124	1119	11671	0,118	3,3

La producción de biomasa y CO<sub>2</sub>, para concentración de AR de 60 g/L, en la segunda etapa de fermentación alcohólica se observa en la figura 59 (datos de la tabla 48).



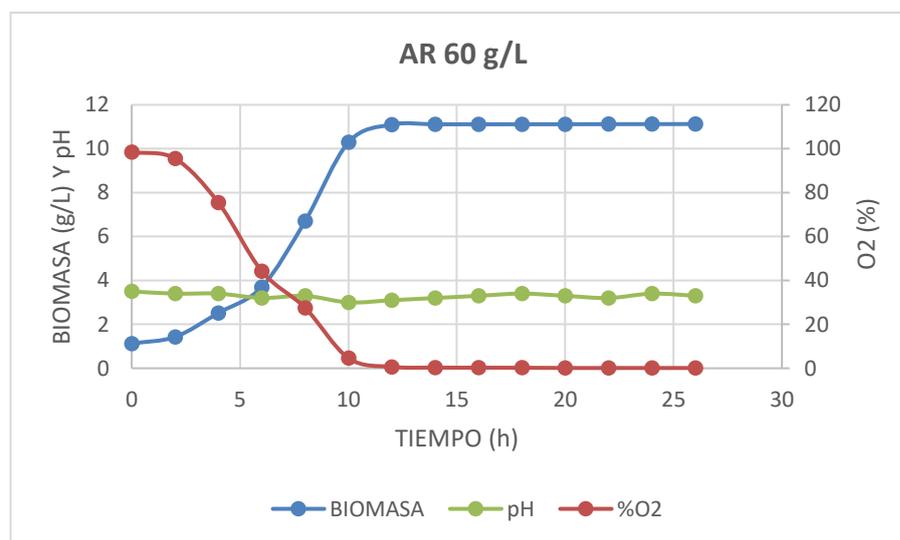
**Figura 59: Producción de biomasa y CO<sub>2</sub>, para concentración de AR de 60 g/L, durante el proceso de fermentación alcohólica.**

La figura 60, muestra la gráfica de concentración de biomasa y CO<sub>2</sub> acumulado, para concentración de AR de 60 g/L, en el proceso de fermentación alcohólica (datos de la tabla 48)



**Figura 60: Producción de biomasa y CO<sub>2</sub> acumulado, para concentración de AR de 60 g/L, durante el proceso de fermentación alcohólica.**

Los datos de la tabla 48, de concentración de biomasa, concentración de O<sub>2</sub> y el pH, durante la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 60 g/L. se grafican en la figura 61.



**Figura 61: Producción de biomasa, concentración de O<sub>2</sub> y el pH durante el proceso de la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 60 g/L.**

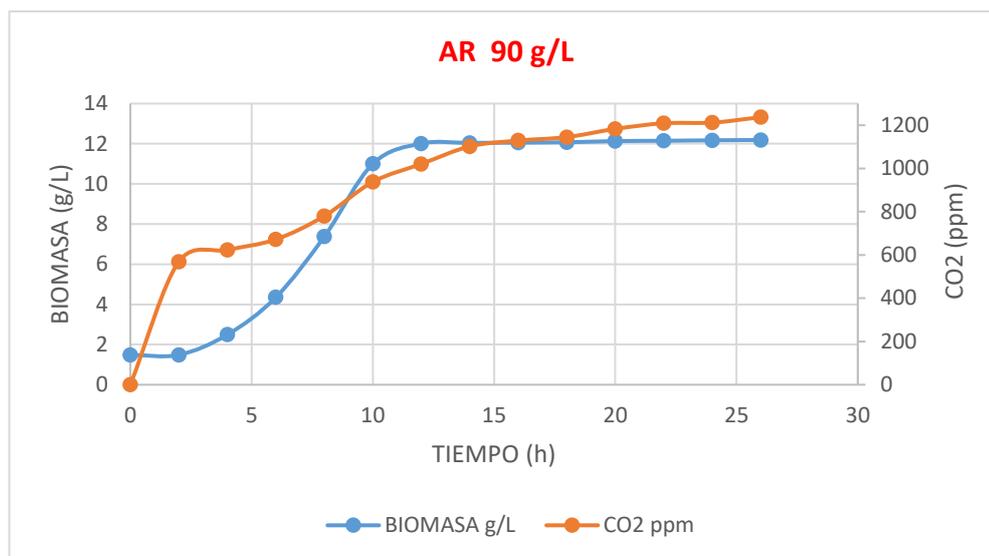
En la tabla 49, se aprecia la producción de biomasa, CO<sub>2</sub>, concentración de O<sub>2</sub> y el pH del mosto durante la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 90 g/L.

Tabla 49

*Producción de biomasa, CO<sub>2</sub>, concentración de O<sub>2</sub> y el pH durante la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 90 g/L*

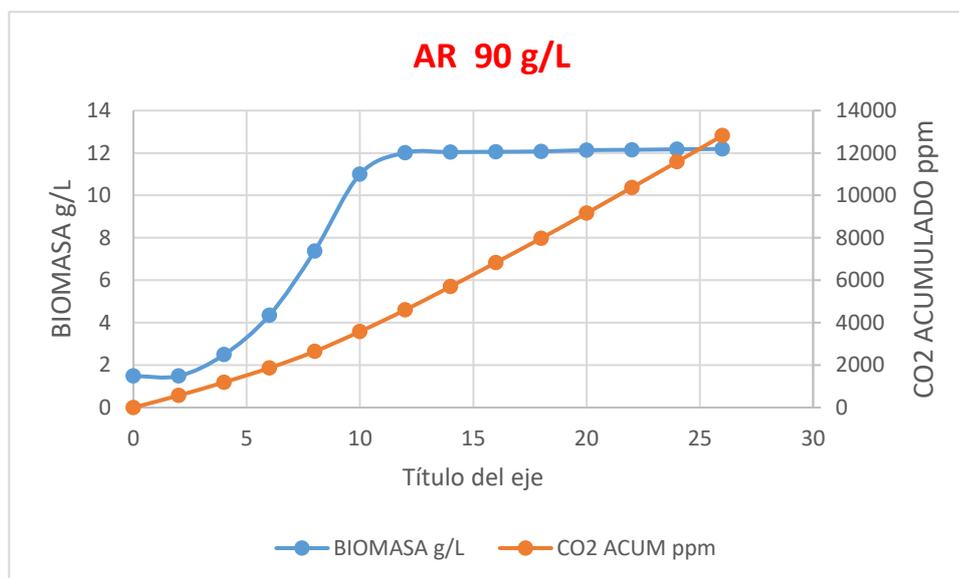
Horas	Biomasa g/L	AR 90 g/L		O <sub>2</sub> %	pH
		CO <sub>2</sub> ppm	CO <sub>2</sub> acum. ppm		
0	1,486	0	0	96,790	3,5
2	1,488	569	569	95,340	3,4
4	2,493	623	1192	83,430	3,4
6	4,353	672	1864	62,320	3,5
8	7,377	780	2644	15,340	3,3
10	11,000	938	3582	5,340	3,3
12	12,012	1021	4603	0,670	3,1
14	12,042	1102	5705	0,316	3,2
16	12,056	1129	6834	0,307	3,3
18	12,074	1145	7979	0,267	3,4
20	12,132	1183	9162	0,113	3,5
22	12,148	1209	10371	0,019	3,5
24	12,172	1212	11583	0,015	3,5
26	12,188	1237	12820	0,011	3,3

En la figura 62, se muestran los valores de la tabla 49, de producción de biomasa y CO<sub>2</sub>, para concentración de AR de 90 g/L, durante el proceso de fermentación alcohólica.



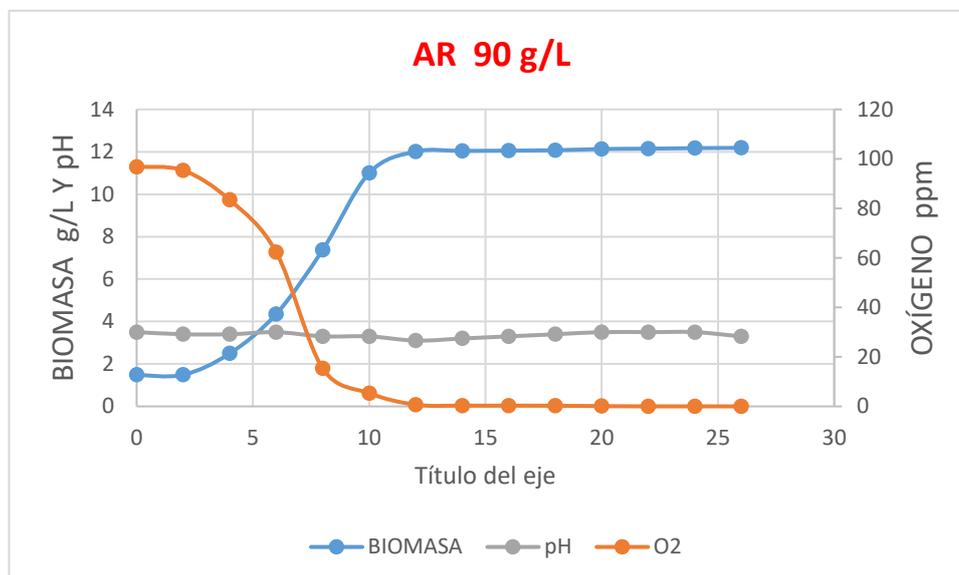
**Figura 62: Producción de biomasa y CO<sub>2</sub>, para concentración de AR de 90 g/L, durante el proceso de fermentación alcohólica.**

Los datos de la tabla 49, de concentración de biomasa y CO<sub>2</sub> acumulado, para concentración inicial de AR de 90 g/L, en la fermentación alcohólica se aprecian en la figura 63.



**Figura 63: Producción de biomasa y CO<sub>2</sub> acumulado, para concentración de AR de 90 g/L, durante el proceso de fermentación alcohólica.**

La figura 64 muestra la concentración de biomasa, concentración de O<sub>2</sub> y el pH, durante la fermentación alcohólica, para concentración de AR de 90 g/L (tabla 49).

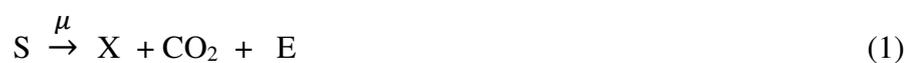


**Figura 64: Producción de biomasa, concentración de O<sub>2</sub> y el pH, en el proceso de fermentación alcohólica, para concentración de AR de 90 g/L.**

### 5.2.5 Modelo matemático del proceso de fermentación alcohólica en lote, para concentración de AR de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L

A continuación, se presentan las gráficas obtenidas empleando el Software MAT LAB (licenciado – UNMSM) para desarrollar el modelo matemático de un cultivo en lote del proceso de fermentación alcohólica del jugo del jugo de cabuya azul para la producción de tequila, propuesto por Herrera et al. (2009), dicho modelo considera la inhibición por sustrato y por la formación del producto.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en ausencia de oxígeno, consume los sustratos (S) del medio del cultivo para formar mediante una reacción reductiva etanol (E), biomasa (X) y bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) tal como se muestra en la siguiente reacción. (Herrera, et al., 2009, p. 2).



El modelo no lineal de un cultivo en continuo para la producción de etanol se puede representar por el siguiente conjunto de ecuaciones diferenciales.

$$\dot{x}_1 = (\mu - D) x_1 \quad (2)$$

$$\dot{x}_2 = - (Y_{xs} + Y_{ps}) \mu x_1 - m_s x_1 - (-S_0 + x_2) D \quad (3)$$

$$\dot{x}_3 = \alpha \mu x_1 - D x_3 \quad (4)$$

donde  $x_1$  es biomasa (g/L),  $x_2$  es sustrato (g/L),  $x_3$  es etanol (g/L),  $Y_{xs}$  (g X/g S) y  $Y_{ps}$  (g P/g S) son factores de rendimiento de biomasa y producto a partir del sustrato,  $S_0$  (g/L) es la concentración de sustrato de alimentación,  $m_s$  (g/L) es el coeficiente de mantenimiento celular,  $\alpha$  es un término asociado al crecimiento y  $D$  ( $h^{-1}$ ) es la tasa de dilución. En este caso  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) es la velocidad específica de crecimiento que depende del sustrato y el etanol presente en el medio del cultivo. (Herrera, et al., 2009, p. 2).

$$\mu (x_2 + x_3) = \frac{\mu_{max} x_2}{k_s + x_2 + x_2^2 k_i} (1 - x_3 k_p) \quad (5)$$

donde  $k_s$  (g/L) es un término de saturación de sustrato,  $k_i$  (g/L) y  $k_p$  (g/L) son parámetros de inhibición por sustrato y producto respectivamente. Cuando en el sistema (2-4)  $D = 0$  se obtiene un cultivo por lote. (Herrera, et al., 2009, p. 2).

Podemos definir a  $x = (x_1, x_2, x_3)^T$  como un vector de estados en  $\mathfrak{R}^3$ , asimismo  $\dot{x} = f(x)$  es el conjunto de ecuaciones diferenciales lineales donde  $f(x) = [f_1(x), f_2(x), f_3(x)]$  representa el campo vectorial cuyas componentes están dadas por la parte derecha de (ecuaciones 2 - 4). Los puntos de equilibrio de  $\dot{x} = f(x)$  se pueden obtener haciendo  $f(x) = 0$  y solucionando el sistema, con lo que se obtiene. (Herrera, et al., 2009, p. 2).

$$x_{1\_Ieq} = \frac{D(-x_2 + S_0)}{YD + m_s} \quad (6)$$

$$x_{2\_Ieq} = \frac{-\gamma \pm \sqrt{\gamma^2 - 4\varphi}}{2K} \quad (7)$$

$$x_{3\_Ieq} = \frac{-D(k_s + x_2 + x_2^2 k_i)}{\mu x_2 k_p} \quad (8)$$

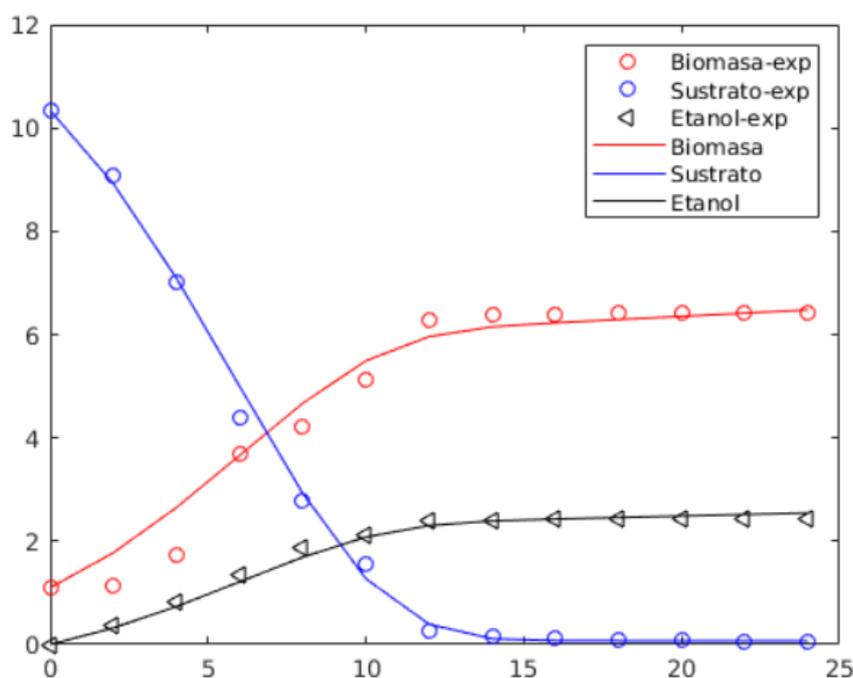
Donde:

$$\gamma = \mu_{max} m_s + (\mu_{max} (Y - \alpha k_p S_0) - DY + m_s) D$$

$$\varphi = D^2 k_s (\Psi Y + k_i m_s^2 - \alpha \mu_{max} k_p m_s)$$

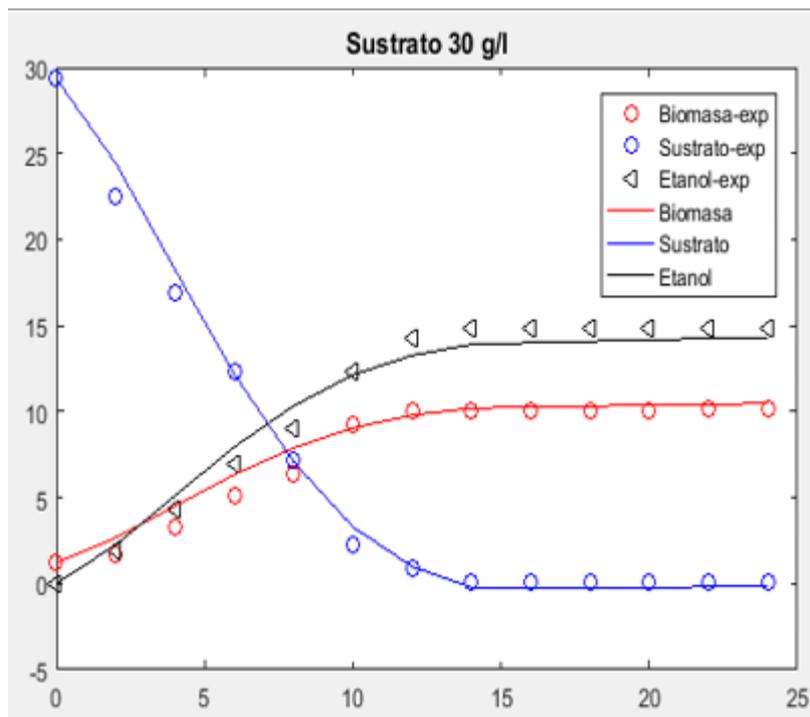
$$K = D\alpha \mu_{max} k_p - D^2 k_i Y - D k_i m_s$$

En la figura 65, se muestra la gráfica del modelo matemático del proceso de fermentación alcohólica en lote del jugo de cabuya azul, para concentración de AR de 10 g/L (datos de la tabla 39)



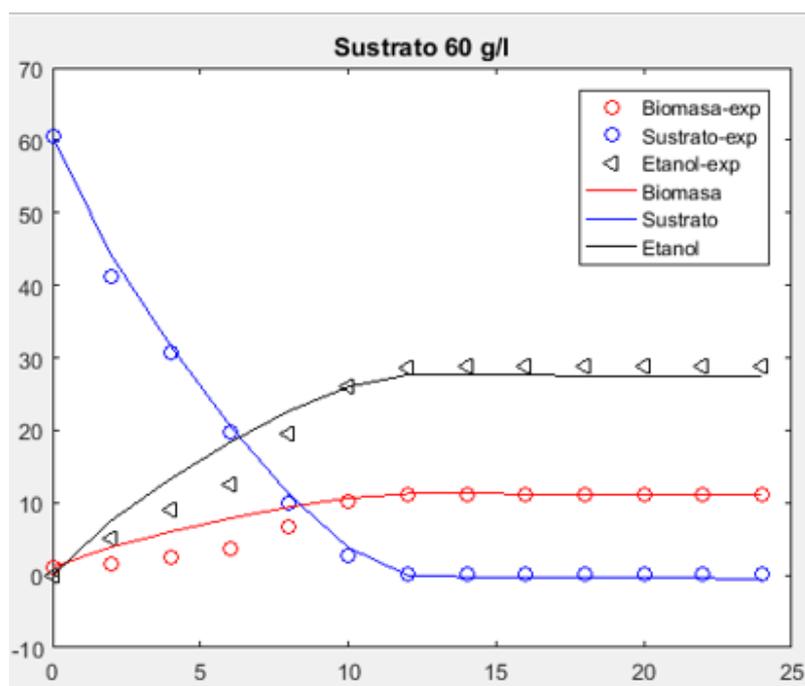
**Figura 65: Modelo matemático de la fermentación alcohólica en lote del jugo de cabuya, para concentración de AR de 10 g/L. ○ Biomasa, ○ Sustrato y Δ Etanol.**

La gráfica del modelo matemático de la fermentación alcohólica en lote del jugo de cabuya azul, para concentración de AR de 30 g/L se presenta en la figura 66.



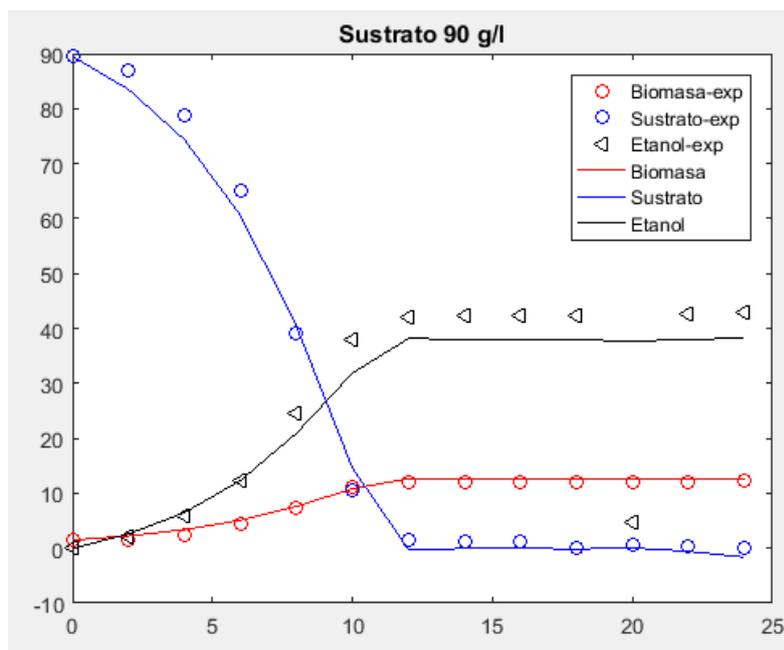
*Figura 66: Modelo matemático de la fermentación alcohólica en lote, para concentración de AR de 30 g/L.  $\circ$  Biomasa,  $\circ$  Sustrato y  $\Delta$  Etanol.*

La figura 67 muestra el modelo matemático de la fermentación alcohólica en lote, del jugo de cabuya azul, para concentración de AR de 60 g/L (datos de la tabla 41).



**Figura 67: Modelo matemático de la fermentación alcohólica en lote, del jugo de cabuya azul, para concentración de AR de 60 g/L. (○) Biomasa, (○) Sustrato y (Δ) Etanol.**

El modelo matemático del proceso de fermentación alcohólica en lote, del jugo de cabuya azul, para la concentración de AR de 90 g/L (datos de la tabla 42), se aprecia en la figura 68.



**Figura 68: Modelo matemático de la fermentación alcohólica en lote, del jugo de cabuya azul, para concentración de AR de 90 g/L. (○) Biomasa, (○) Sustrato y (Δ) Etanol.**

En la tabla 50, se indican los valores de los parámetros del modelo matemático de la fermentación alcohólica en lote, del jugo de cabuya azul, para concentraciones de AR de: 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L. En donde  $\mu_{\max}$  ( $h^{-1}$ ) es la velocidad específica de crecimiento máximo;  $K_S$  (g/L) es un término de saturación de sustrato,  $K_i$  (g/L) parámetro de inhibición por sustrato,  $K_p$  (g/L) parámetro de inhibición por producto,  $m_s$  (g/L) coeficiente de mantenimiento celular,  $\alpha$  es un término asociado al crecimiento y  $R$  es el coeficiente de determinación.

**Tabla 50**

*Parámetros del modelo matemático del proceso de fermentación alcohólica en lote*

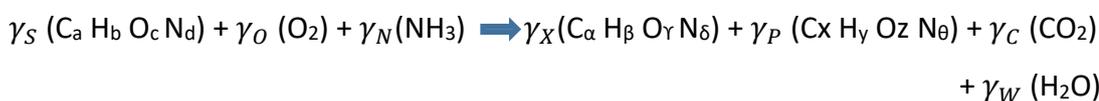
Parámetro	Lote 10 g/L	Lote 30 g/L	Lote 60 g/L	Lote 90 g/L
$\mu_{\max}$	0,180	0,558	0,626	0,588
$K_s$	2,261	6,442	234,228	16,007
$K_i$	-0,051	0,040	-0,015	0,019
$K_p$	0,047	0,040	-0,184	0,014
$Y_{x/s}$	-20,956	10,270	-14,857	5,539
$Y_{p/s}$	23,116	-7,002	21,078	2,447
$m_s$	-0,010	0,004	-0,016	0,007

$\alpha$	0,474	1,678	2,888	3,413
R2	0,992	0,996	0,999	0,945

Nota: los parámetros ( $Y_{ps}^{-1}$ ,  $Y_{xs}^{-1}$ ,  $K_i^{-1}$  y  $K_p^{-1}$ ) fueron representados en el modelo (2 -5) como  $Y_{ps}$ ,  $Y_{xs}$ ,  $K_p$  y  $K_i$  por conveniencia algebraica (Herrera et al., 2009).

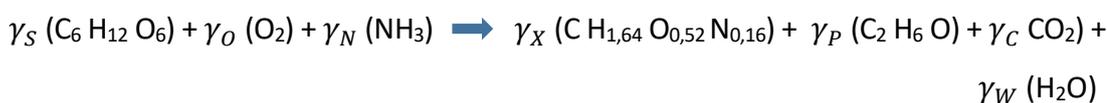
### 5.2.6 Balance de materia, cálculo de rendimientos máximos de biomasa y etanol

Las actividades de las células microbianas en biorreactores también pueden expresarse mediante la ecuación de equilibrio para los elementos químicos, considerando la conservación de las especies atómicas (carbono: C, hidrógeno: H, oxígeno: O, nitrógeno: N), (Moser, 1988).



Ec. (1)

Considerando el sustrato como glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) y como la formación del producto extracelular al etanol [ $C_2H_5OH$ , ( $C_2H_6O$ )] durante el crecimiento celular (cepas de levadura *S. cerevisiae*), se tiene la Ec. (2), (Doran, 1995).



Ec. (2)

Cálculo del peso molecular de la levadura:

$$PM_X = \frac{12 + 1,64 + 0,52 \times 16 + 0,16 \times 14}{0,95} = 25,47$$

Rendimiento experimental (tabla 42):

$$Y_{x/s} \text{ exp.} = 0,1176 \text{ g biomasa/g glucosa}$$

$$Y_{p/s} \text{ exp.} = 0,4779 \text{ g etanol/ g glucosa}$$

Concentración de CO<sub>2</sub>,  $\gamma_C$ :

Solubilidad de CO<sub>2</sub> a 28 °C es de 7,75 mg/L (Bain y Stevenson, 1999),

concentración en 20 L mosto = 0,16 g CO<sub>2</sub>

Conc. CO<sub>2</sub> = 12820 ppm = 1282 g CO<sub>2</sub> + 0,16 g CO<sub>2</sub> = 1282,16 g CO<sub>2</sub>

$$\gamma_C = \frac{1282,16 \text{ g CO}_2}{44 \text{ g CO}_2/\text{mol}} = 29,14 \text{ moles CO}_2$$

Moles de glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>):

$$\frac{90 \text{ g glucosa}}{\text{L mosto}} \times 20 \text{ L mosto} \times \frac{\text{mol glucosa}}{180 \text{ g glucosa}} = 10 \text{ moles glucosa}$$

Sobre la base de la ecuación estequiométrica general del crecimiento microbiano, dada en la Ec. (2), se pueden escribir las siguientes ecuaciones de balance para cada uno de los elementos principales [C, H, O, N, ignorando S, P y ceniza], (Moser, 1988):

$$\text{g atom. C: } 6 \gamma_S = \gamma_X + 2 \gamma_P + \gamma_C$$

$$\text{g atm. H: } 12 \gamma_S + 3 \gamma_N = 1,64 \gamma_X + 6 \gamma_P + 2 \gamma_W$$

$$\text{g atm. O: } 6 \gamma_S + 2 \gamma_O = 0,52 \gamma_X + \gamma_P + 2 \gamma_C + \gamma_W$$

$$\text{g atm. N: } \gamma_N = 0,16 \gamma_X$$

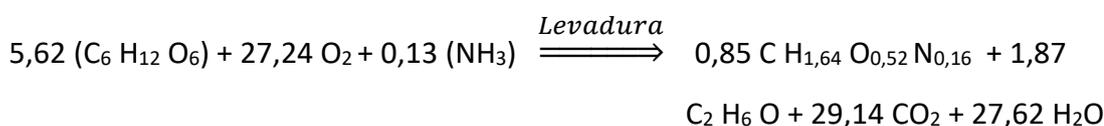
Del rendimiento de biomasa:

$$\gamma_x = \frac{(PM \text{ Sustrato}) \gamma_{x/s}}{PM \text{ célula}} = \frac{180 \times 0,1176}{25,47} = 0,831$$

Del rendimiento del producto:

$$\gamma_p = \frac{(PM \text{ Sustrato}) \gamma_{p/s}}{PM \text{ producto}} = \frac{180 \times 0,4779}{46} = 1,87$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones se tiene:



Cálculo del grado de reducción  $\gamma$  del sustrato, biomasa y producto (El grado de reducción,  $\gamma$ , es el número de equivalentes de electrones disponibles en esa cantidad de material que contiene 1 g de átomo de carbono).

$$\gamma_s = (4(6) + 1(12) - 2(6)) / 6 = 4$$

$$\gamma_x = (4(1) + 1(1,64) - 2(0,52) - 3(0,16)) = 4,12$$

$$\gamma_p = (4(2) + 1(6) - 2(1)) / 2 = 6$$

$$\gamma_{max} = \frac{a \gamma_s}{\gamma_x} = \frac{6 \times 4}{4,12} = 5,82$$

$$Y_{x/s} \max = \frac{5,82 \times 25,47}{180} = 0,82$$

$$\gamma_O \max = \frac{1}{4} = (a \gamma_s - z \gamma_x) = \frac{1}{4} (6 \times 4 - 0,78 \times 4,12) = 5,19 \frac{\text{moles de } O_2 \text{ consumido}}{\text{moles sustrato consumido}}$$

$$\gamma_P \max = \frac{a \gamma_s}{h \gamma_p} = \frac{6 \times 4}{2 \times 6} = 2$$

$$Y_{P/s} \max = \frac{6 \times 4 \times 46}{2 \times 6 \times 180} = 0,51$$

$$Y_{O_2/s} = \frac{PM_s}{6 PM_{O_2}} Y_{x/s} = \frac{180}{6 \times 32} \times 0,120 = 0,1125$$

$$Y_{O_2/s} = \gamma_O \times \frac{PM_{O_2}}{PM_s}$$

$$\gamma_O = 0,1125 \frac{180}{32} = 0,63 \frac{\text{mol } O_2}{\text{mol sustrato}}$$

El valor obtenido de rendimiento máximo de etanol de 0,51 g etanol/g glucosa coincide con el valor dado por Shou Hu (2017).

### 5.2.7 Tiempo de generación $t_d$

$$\mu_x = 0,588 \text{ (Tabla 50)}$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_x} = \frac{0,693}{0,588 \text{ h}^{-1}} = 1,195 \text{ h}$$

### 5.2.8 Eficiencia de la fermentación

$$e = \frac{Y_{P/S} (\text{experimental})}{Y_{P/S} (\text{teórico})} \times 100$$

$$e = \frac{0,479}{0,511} \times 100 = 93,7 \%$$

### 5.2.9 Productividad de la fermentación

Producción de etanol:  $42,8 \frac{\text{g etanol}}{\text{L}}$  (de la gráfica 64 para 90 g AR)

$$\text{Productividad} = \frac{42,8 \text{ g etanol/L}}{26 \text{ h}} = \frac{1,64 \text{ g etanol}}{\text{L} \cdot \text{h}}$$

### 5.2.10 Determinación de los compuestos volátiles de la bebida alcohólica obtenida por destilación del mosto de cabuya azul, en destilador de vidrio de torre rellena

A continuación, se detallan los compuestos volátiles mayoritarios presentes en el licor de cabuya azul, obtenido por destilación del mosto de jugo de cabuya en un destilador de vidrio, de torre rellena. El proceso de destilación se realizó en el laboratorio del ambiente N° 124 de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM.

En la figura 84 (del anexo 2), se muestra el destilador de vidrio de torre rellena, empleado en el proceso de destilación. En la figura 84a, se aprecia el destilador de vidrio de torre de rellena y en la figura 84b, se muestra el relleno de vidrio utilizado.

En el anexo (3) se presenta el informe de los análisis de los compuestos volátiles característicos del licor obtenido, realizado por La Molina Calidad Total Laboratorios – Instituto de Certificación, Inspección y Ensayos - Universidad Nacional Agraria La Molina. En la tabla 51 se presenta los principales compuestos volátiles analizados por La Molina Calidad Total Laboratorios.

Tabla 51

*Compuestos volátiles del licor de cabuya obtenido por destilación en un destilador de torre rellena*

Compuestos volátiles	Cantidad
Grado alcohólico	41,5 % v/v a 20 °C/20 °C
Acidez volátil (expresado como ácido acético)	5,7 mg/100 mL alcohol anhidro
Metanol	74,1 mg/100 mL alcohol anhidro
Alcoholes superiores totales	292,4 mg/100 mL alcohol anhidro
Acetaldehído	56,6 mg/100 mL alcohol anhidro
Ésteres (como acetato de etilo)	41,8 mg/100 mL alcohol anhidro
Extracto	0,8 g/L muestra original
Furfural	0,8 mg/100 mL alcohol anhidro
Acetato de iso Amilo	No detectable
Formiato de etilo	0,6 mg/100 mL alcohol anhidro
Iso Teramílico	216,0 mg/100 mL alcohol anhidro
Butanol	3,0 mg/100 mL alcohol anhidro
Iso Butanol	No detectable
Iso Propanol	No detectable
Propanol	73,4 mg/100 mL alcohol anhidro

### **5.2.11 Tratamiento estadístico del proceso de fermentación alcohólica para concentración de sustrato de 90 g/L**

El tratamiento estadístico del proceso de fermentación alcohólica de la segunda etapa se realizó mediante el *software* Statgraphics Centurion XVI, Versión 16.1.15 (32 - bits).

#### ***5.2.11.1 Tratamiento estadístico de producción de etanol.***

A continuación, se presenta el análisis estadístico del proceso de fermentación alcohólica para la concentración de AR de 90 g/L.

## Análisis de regresión: ETANOL(g/L) vs. BIOMASA(g/L); SUSTRATO(g/L)

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Regresión	2	3915.18	1957.59	141568.71	0.000
BIOMASA(g/L)	1	0.32	0.32	23.04	0.001
SUSTRATO(g/L)	1	2.93	2.93	211.55	0.000
Error	11	0.15	0.01		
Total	13	3915.33			

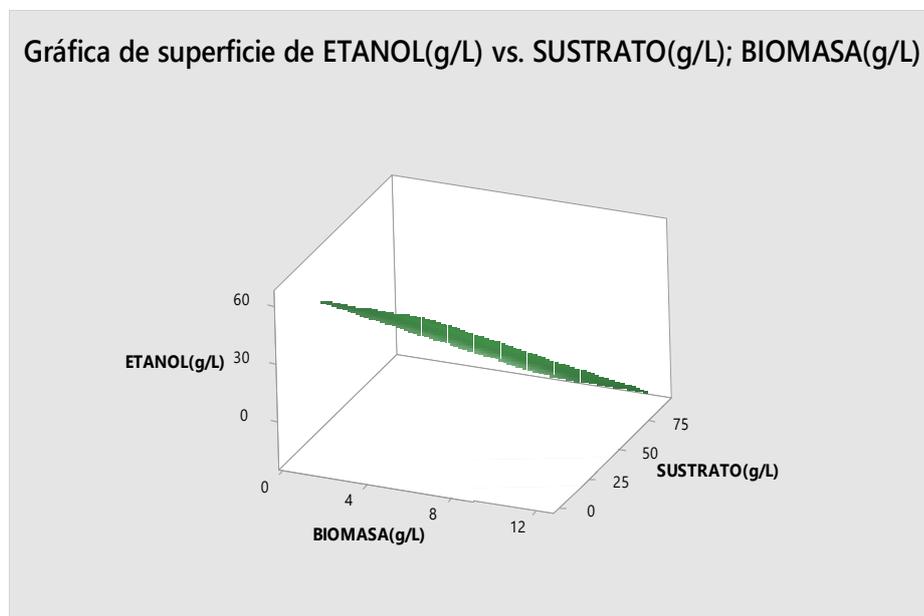
### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.117592	100.00%	100.00%	99.98%

### Ecuación de regresión

$$\text{ETANOL(g/L)} = 66.18 - 1.910 \text{ BIOMASA(g/L)} - 0.7050 \text{ SUSTRATO(g/L)}$$

Gráfica de superficie de ETANOL(g/L) vs. SUSTRATO(g/L); BIOMASA(g/L)



**Figura 69: Diagrama de superficie de respuesta de rendimiento de etanol para concentración de sustrato de 90 g/L.**

De la tabla anterior, Ho: Todos los coeficientes son iguales a 0,00; Versus, H1: por lo menos algunos de los coeficientes son cero. Es decir, el sustrato y/o la biomasa influyen en la producción de etanol

De la tabla

Ho: El sustrato no influye en la producción de etanol

H1: El sustrato influye en la producción de etanol

El valor de 0.000 comparado con alfa  $\rightarrow$  rechazar Ho, es posible concluir que el sustrato influye en la producción de etanol

Asimismo,

Ho: La biomasa no influye en la producción de etanol

H1: La biomasa influye en la producción de etanol

El valor 0.001 comparado con alfa 0.05- $\rightarrow$  rechazar Ho, esto para concluir que la biomasa influye en la producción de etanol.

### ***5.2.11.2 Tratamiento estadístico de producción de CO<sub>2</sub> para concentración de sustrato de 90 g/L.***

#### **Análisis de regresión de producción de CO<sub>2</sub>(ppm) vs. biomasa(g/L); sustrato(g/L)**

#### **Análisis de Varianza**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Regresión	2	1528161	764081	96.73	0.000
BIOMASA(g/L)	1	160462	160462	20.31	0.001
SUSTRATO(g/L)	1	178024	178024	22.54	0.001
Error	11	86893	7899		
Total	13	1615055			

#### **Resumen del modelo**

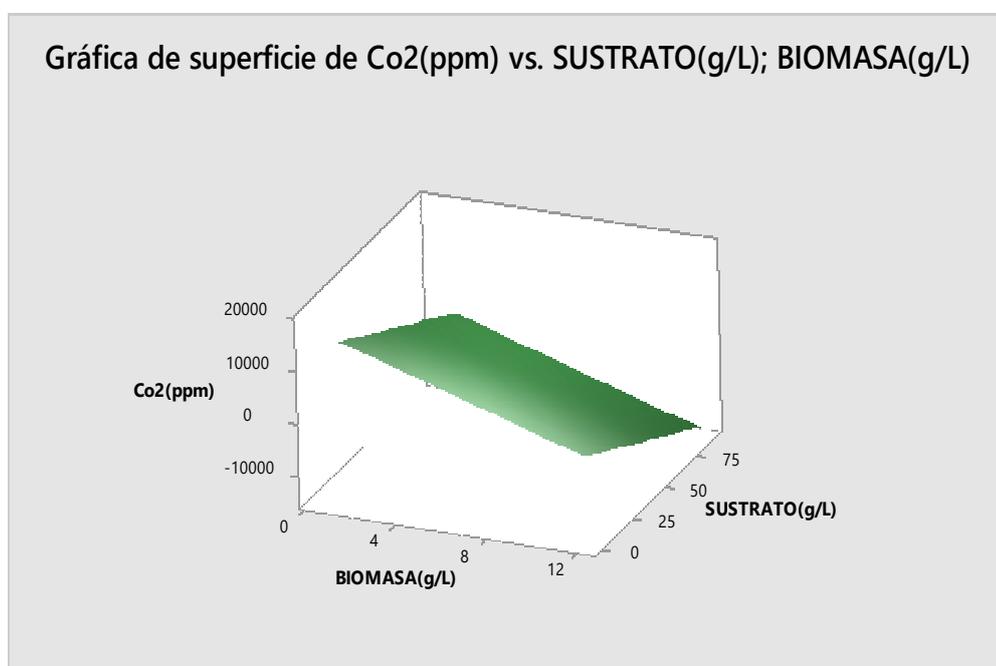
S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
88.8786	94.62%	93.64%	84.99%

#### **Coefficientes**

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	17689	3669	4.82	0.001	
BIOMASA(g/L)	-1355	301	-4.51	0.001	2981.15
SUSTRATO(g/L)	-173.9	36.6	-4.75	0.001	2981.15

### Ecuación de regresión

$$\text{CO}_2 \text{ (ppm)} = 17689 - 1355 \text{ biomasa (g/L)} - 173.9 \text{ sustrato (g/L)}$$



**Figura 70: Diagrama de superficie de respuesta de producción de CO<sub>2</sub> para concentración de AR de 90 g/L.**

Ho: Todos los coeficientes son iguales a cero. Versus, H1: por lo menos algunos de los coeficientes son cero. Es decir, el sustrato y/o biomasa influye en la producción de CO<sub>2</sub>

Ho: El sustrato no influye en la producción de CO<sub>2</sub>

H1: El sustrato influye al en la producción de CO<sub>2</sub>

El valor de 0.001 comparado al alfa  $\rightarrow$  rechazar  $H_0$ , es posible concluir que el sustrato influye en la producción de  $CO_2$

Asimismo,

$H_0$ : La biomasa no influye en la producción de  $CO_2$

$H_1$ : La biomasa influye en la producción de  $CO_2$

El valor 0.001 comparado al alfa 0.05  $\rightarrow$  rechazar  $H_0$ , esto para concluir que la biomasa influye en la producción de  $CO_2$ .

### 5.3 Discusión de resultados

#### 5.3.1 Análisis e interpretación de resultados

1. En Tamaulipas, México se han identificado veinte especies de agave, y gran parte de la superficie cosechada corresponde a especies del grupo de las Americanae; de las cuales la mayor parte se aprovechan para la producción de bebidas alcohólicas, principalmente tequila, que tiene denominación de origen (García-Herrera et al., 2010).

Entre las pocas variedades de cabuya existentes en el Perú, solo dos crecen en grandes extensiones de terrenos rurales: la cabuya azul (*Agave americana* L., figura 88a, anexo 2), la cual se distingue por la forma y color verde azulado de sus hojas, y es utilizada principalmente para la producción de chancaca; y la otra variedad es el lineño (cabuya verde), que pertenece al complejo *A. angustifolia* Haw (figura 88b, anexo 2) y se emplea mayormente en la fabricación de sogas en las zonas rurales, mientras que en México es aprovechada para producir una bebida destilada que pertenece a la familia del mezcal (Rodríguez, 2007).

2. A pesar de que la cabuya azul crece de forma silvestre en grandes extensiones de terrenos en los valles interandinos con climas templados, (departamentos de Cajamarca y Huánuco), no se aprovecha este recurso por desconocimiento en

lo que respecta a su explotación. En los departamentos del sur del país, como Huancavelica, Ayacucho y Apurímac, se aprovecha para la producción artesanal de chancaca y el comercio del jugo como bebida. Mientras que, en México, se cultivan en forma intensiva unas 120 000 hectáreas de agave azul (Montañez-Soto et al., 2011), con un promedio de 2500 a 2800 plantas por hectárea (Bautista et al., 2001), y en el año 2018, según el Consejo Regulador del Tequila (CRT), se utilizaron 1 138 800 toneladas de cabuya tequilana para producir 309,1 millones de litros de tequila al 40 % en volumen de alcohol.

3. Debido a las diferencias climáticas, composición de los terrenos y la ubicación geográfica en la que crece la cabuya azul en el Perú, las propiedades físico-químicas, fisiológicas, metabólicas y morfológicas de esta planta difieren de las de las plantas mexicanas. Una de las principales diferencias es el tiempo de maduración de la planta: en nuestro país, demora de 5 a 10 años, madurando en menor tiempo en los valles interandinos con climas templados y lluviosos, que se encuentran entre 1500 a 2200 metros sobre el nivel del mar. En México, la planta madura en un promedio de 8 años (Gil et al., 2006). Por tanto, este menor tiempo de maduración de la cabuya azul es una ventaja para su explotación agroindustrial en nuestro país.
4. En México, la cabuya tequilana se explota a gran escala, por lo que la piña de la planta es tratada generalmente en hornos para la hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo (Waleckx et al., 2008), agregando luego agua para la extracción del jugo en la molienda, a la relación de 1 L a 2,5 L por kg de pulpa de piña, para obtener unos 120 L jugo por piña.

Mientras que la explotación del jugo de cabuya azul en el Perú se realiza de forma artesanal, en la cual, el jugo se extrae tres veces al día, en un promedio de 3 L a 4 L por cada recolección, durante dos a tres meses, según el tamaño de la planta; por lo que se recolecta un promedio de 270 L de jugo al mes por planta, Constituyendo una ventaja para su explotación a pequeña escala para la producción de licor tipo tequila.

5. El diseño experimental del proceso de hidrólisis es factorial de  $3^2$  la cual es un diseño factorial cuadrática en la que la temperatura central de 100 °C coincide con el diseño factorial, y el pH central según el diseño debería ser de 4,0; pero se trabajó con el pH central de 4,5 por el pH natural del jugo de cabuya azul.
6. Para hidrolizar los fructanos, muchas compañías utilizan el método tradicional de elaboración de tequila o mezcal, en la que las piñas, enteras o cortadas, se cocinan en hornos de ladrillos durante 36 h a 48 h o en autoclaves durante 12 h (González-Hernández et al., 2012). En ambos casos, se alcanzan temperaturas de proceso por encima de los 100 °C.

La eficiencia de la hidrólisis en hornos es muy baja, ya que la transferencia de calor no es uniforme, por lo que algunas partes de la piña se carbonizan, mientras que, en otras, la hidrólisis es incompleta; además, se ha encontrado que, a estas condiciones, los fenómenos desfavorables de la cocción —reacciones de Maillard o formación de compuestos como fenoles, furfural e hidroximetilfurfural— se benefician con la degradación térmica de pentosas y hexosas (Mancilla-Margalli y López, 2002; Waleckx et al., 2008).

7. Una alternativa para mejorar el proceso de hidrólisis y obtener óptimos rendimientos de azúcares reductores es aumentar la eficiencia de la transferencia de calor y el control de la acidez del medio en el que se realiza la hidrólisis térmica. Por ello, para investigar el efecto de la temperatura y el pH en la hidrólisis de los fructanos del jugo de cabuya azul, se tomó como referencia el estudio realizado por Michel-Cuello et al. (2015), quien comparó el efecto de la temperatura: 90 °C, 100 °C y 110 °C; a pH: 2,5, 4,5 y 5,5; durante 10 h de proceso, para la hidrólisis de fructanos.
8. En la figura 16 y en la tabla 20, se observa el rendimiento total de hidrólisis igual a 90,45 % a las condiciones de: pH 2,5 y temperatura de 110 °C. Resultado que concuerda con lo obtenido por García-Soto et al. (2011), quienes encontraron que la mayor eficiencia térmica de la hidrólisis de fructanos de agave está en un rango de temperatura de 106 °C a 116 °C. El mayor rendimiento también se puede explicar debido a que los ácidos funcionan como

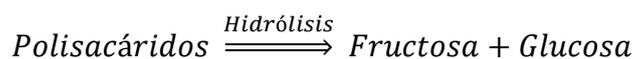
catalizadores en la hidrólisis de polímeros y que tienen la capacidad de romper los enlaces de los monómeros heterocíclicos en las cadenas de polímeros (Saeman, 1945; Laopaiboon, P., Thani, Leelavatcharamas y Laopaiboon, L., 2010). La tabla 52, presenta el resumen de los rendimientos de glucosa y fructosa en la hidrólisis de los polisacáridos que se encuentran en el jugo de cabuya azul.

Tabla 52

*Resumen del incremento de glucosa y fructosa, a temperatura de 90 °C, 100 °C y 110 °C y a pH de 2,5; 4,5 y 5,5; en el proceso de hidrólisis de polisacáridos del jugo de cabuya azul*

Temperatura °C	pH	Incremento glucosa %	Incremento fructosa %	Incremento total %
90	2,5	24,45	61,08	52,75
90	4,5	20,46	55,38	47,44
90	5,5	17,69	47,34	40,60
100	2,5	23,56	68,71	58,44
100	4,5	21,89	60,14	51,44
100	5,5	20,46	48,98	42,49
110	2,5	27,36	69,04	59,56
110	4,5	24,60	62,07	53,55
110	5,5	21,90	54,28	46,92

9. Al graficar  $\ln C_A$  vs  $t$ , (datos de la tabla 20), se obtiene una línea recta con pendiente  $m = -K$  ( $K_1 = 0,1487$ ,  $K_2 = 0,1821$  y  $K_3 = 0,2087$ ). La línea recta indica que el proceso de hidrólisis es una reacción de primer orden, concordando con lo reportado por Michel-Cuello et al. (2015), quienes determinaron que la reacción de hidrólisis de los fructanos es un proceso irreversible de primer orden:



Siendo la ecuación cinética de primer orden a 110 °C y pH 2,5 la siguiente:

$$r_A = K_1 C_A = 0,2087 C_A$$

La influencia de la temperatura sobre la velocidad de reacción se determinó mediante la ecuación de Arrhenius; con los valores  $K_i$ , de la gráfica  $\ln K$  vs.  $1/T$  (figura 20) se halla la constante de Arrhenius o Factor de frecuencia y la energía de activación para la temperatura de 110 °C.

$$K = 100,18 e^{-19,63/RT}$$

10. Los valores P del rendimiento de hidrólisis indican la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que cinco valores P son menores que 0,05; estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento de hidrólisis con un 95,0 % de nivel de confianza con valores de  $P = 0,0348$  para la relación temperatura – tiempo y de  $P = 0.000$  para la relación temperatura – pH, y un valor de  $R^2$  (ajustado) = 89,62 %. El análisis estadístico indica también que el máximo rendimiento del proceso de hidrólisis es de aproximadamente 90,00 %, a las condiciones de 110 °C y pH 2,5 durante 10 h.

El rendimiento obtenido en la investigación es del 90,45 %, mientras que el rendimiento en el estudio de Michel-Cuello et al. (2015) es del 92,1 %; esta diferencia se debe a muchos factores, una de la más importante es que Michel-Cuello hidrolizó el jugo del Agave “Salmiana”, mientras que en el presente estudio se hidrolizó el jugo de cabuya azul, con propiedades físico-químicas diferentes.

11. Las industrias que elaboran bebidas alcohólicas se basan en el hecho de que, bajo condiciones adecuadas de fermentación, el azúcar se transforma en alcohol. La característica organoléptica del producto terminado depende de la materia prima que proporciona el azúcar y de las condiciones de transformación del azúcar en alcohol.

En la investigación, se examinaron los factores que afectan el proceso de fermentación alcohólica del jugo de cabuya azul, proceso que se realizó en dos etapas: la primera etapa tuvo como finalidad determinar a concentración

constante de sustrato de 60 g/L, las condiciones de temperatura, pH y concentración de fosfato diamónico en la que se obtiene el mayor rendimiento de etanol. Para ello, se realizaron pruebas experimentales a temperatura de 24 °C, 28 °C y 32 °C; pH 3,5 y 4,5, y concentración de nutriente de 1 g/L y 2 g/L, durante 26 h de proceso, con suministro de aire con flujo de 1 vvm, durante las primeras 8 h del proceso.

En la segunda etapa, a las condiciones de la prueba de la primera etapa (prueba 8, tabla 28) en la que se obtuvo el mayor rendimiento de etanol (28,86 g etanol/L, a temperatura de 28 °C, pH 3,5 y concentración de DAP de 2 g/L), se procedió a investigar el efecto de la concentración de nutriente en el rendimiento de etanol (10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L); durante 26 h de proceso, con suministro de aire de 1 vvm durante las primeras 8 h del proceso de fermentación.

El tiempo del proceso de fermentación alcohólica concuerda con lo planteado por García, Suarez, Domenech, Blanco, y Santiesteban (2000) y el estudio de los factores, con los estudios de Agu, Bringham, Brosnan y Jack (2008), Arrizon y Gschaedler (2002), CIATEJ (2004), Shuler y Kargi (2001).

El proceso de fermentación alcohólica se realizó inoculando al mosto cepas de levadura *S. cerevisiae*, género D 47 – Lalvin, a concentración de 1,15 g/L ( $4,3 \times 10^7$  células/mL), esta concentración de levaduras se encuentra en el rango de la cantidad de células/mL para la producción de tequila ( $2,0 \times 10^7$  a  $3,0 \times 10^7$  levaduras/mL) según lo especificado por Godínez (2012). Se utilizó este género de levadura por su propiedad de fermentar mostos blancos y tintos, además de tener buen rendimiento a temperaturas de fermentación bajas y altas.

Para la presente investigación, se tomó como referencia el modelo matemático del cultivo en lote de fermentación del tequila llevado a cabo por Herrera et al. (2009).

12. Se observa en las pruebas experimentales de la primera y segunda etapa de la fermentación alcohólica que no se cumple el balance de materia, esto se debe en parte a que no se determinó la cantidad formada de glicerina y también a que el

medio de fermentación es un ambiente cambiante y hostil que requiere una readaptación continua para las nuevas condiciones, con cada aminoácido que toma la levadura, también toma un ión de hidrógeno ( $H^+$ ). La concentración de iones de hidrógeno en un medio dado está relacionada con el pH del medio. El mosto tiene un pH de 3,5; el interior de una célula de levadura tiene un pH de 6-7. Para que la levadura funcione correctamente durante la fermentación, debe permanecer en este pH. Como resultado del aumento de las concentraciones de etanol, la membrana de la célula de levadura se vuelve cada vez más permeable a los iones  $H^+$ , es decir, tiene "fugas". En términos prácticos, se vuelve muy exigente desde el punto de vista energético que las células de levadura mantengan el pH interno correcto. Cuando el grado alcohólico aumenta, se produce una entrada de protones masiva a favor de gradiente, y las ATPasas de membrana deben trabajar a pleno rendimiento para evitar la acidificación del medio e implica gasto de energía. Este gasto de energía para mantener el pH de la célula explicaría en parte el desbalance de materia en los procesos de fermentación de las diferentes pruebas experimentales realizadas.

13. La prueba 8 de la primera etapa del proceso de fermentación (temperatura de 28 °C, pH 3,5 y concentración de sustrato de 2 g/L) es la que da el mayor rendimiento de etanol (28,86 g/L, tabla 28 y figura 34, tabla 38 y figura 45).

En la tabla 34 y la figura 40, se aprecia que la cinética microbiana es mayor para la prueba 8. También se observa en la tabla 37 y la figura 44, que la velocidad de consumo de azúcares reductores es mayor para la prueba 8. Estos valores nos indican que la prueba 8 tiene el mayor rendimiento de biomasa y etanol:  $Y_{x/s} = 0,106$  y  $Y_{p/s} = 0,4739$  (92,72 %) respectivamente.

14. A las condiciones de la prueba 8, para la cual se obtuvo el mayor rendimiento de etanol (temperatura de 28 °C, pH 3,5 y concentración de DAP de 2 g/L); se procedió a realizar la segunda etapa de las pruebas experimentales del proceso de fermentación alcohólica, a diferentes concentraciones de sustrato: 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L para determinar el máximo rendimiento total de etanol.

Se obtuvo el mayor rendimiento de etanol de 47,779 % (42,85 g/L) a la concentración de sustrato de 90 g/L (tabla 42 y figura 49). En la tabla 44 y figura 51, se aprecia la mayor rapidez de consumo de azúcares a concentración de sustrato de 90 g/L.

De acuerdo con los datos experimentales obtenidos, el mayor rendimiento de producto se logra en las siguientes condiciones: concentración de sustrato de 90 g/L, temperatura de 28 °C, pH 3,5 y concentración de nutriente DAP de 2 g/L. En la tabla 53, se muestran los rendimientos  $Y_{P/S}$  para las concentraciones de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L.

Tabla 53

*Producción de biomasa, etanol y rendimiento del producto, a concentración de sustrato (AR) de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L*

Sustrato g/L	Biomasa g/L	Etanol g/L	$Y_{P/S}$
10	6,44	2,45	0,4290
30	10,16	14,88	0,4769
60	11,12	28,86	0,4739
90	12,19	42,85	0,4779

La cantidad de etanol obtenida es de 42,85 g/L, con rendimiento  $Y_{P/S} = 0,4779$  (93,50 %).

15. En la tabla 54 se aprecian los parámetros del modelo matemático del proceso de fermentación alcohólica en lote obtenidos por Herrera et al. (2009) (tabla 3), y los parámetros experimentales hallados, aplicando el mismo modelo al proceso de fermentación alcohólica en lote del jugo de cabuya azul (modelo aplicado a los datos de la tabla 42, para concentración de sustrato de 90 g/L).

Se observa que el valor experimental de la velocidad específica de 0,588 es ligeramente superior al valor teórico de 0,537. La constante de saturación experimental  $k_s = 16,007$  es un poco menor del valor teórico de  $k_s = 20,413$ . El valor experimental de la constante de inhibición por sustrato  $k_i = 0,019$ , es ligeramente superior al valor teórico de 0,0089. El valor experimental de constante

de inhibición por el producto  $k_p = 0,014$ , es ligeramente inferior al valor teórico de 0,0267. El valor experimental de rendimiento de biomasa  $Y_{x/s} = 5,539$  difiere del valor teórico  $Y_{x/s} = 17,98$ ; el valor experimental del rendimiento de producto  $Y_{p/s} = 2,447$  es casi igual al valor teórico de  $Y_{p/s} = 2,54$ .

La diferencia de valores de  $K_i$  y  $Y_{p/s}$  podría ser a diversos factores: un factor podría ser que al inicio de la fermentación se suministró aire durante más tiempo (8 h con flujo de aire de 1 vvm), dado que en la fermentación aerobia desarrolla mayor biomasa; otro factor importante es la diferencia de propiedades físico-químicas entre el jugo de cabuya azul experimental y el empleado en el estudio que se tomó como referencia. El coeficiente de correlación del modelo matemático es de  $R^2 = 94,50 \%$ , lo que indica que los errores en las mediciones son bajos. En la tabla 53, se comparan los parámetros del modelo matemático del proceso de fermentación alcohólica en lote, obtenidos por Herrera et al. (2009) y los valores experimentales de la investigación.

Tabla 54

*Parámetros del modelo matemático del proceso de fermentación alcohólica en lote obtenidos en la investigación y por Herrera et al. (2009)*

Parámetro	Lote 90 g/L (valores experimentales)	Lote 90 g/L (Herrera et al. 2009)
$\mu_{max}$	0,588	0,5372
$K_s$	16,007	20,4131
$K_i$	0,019	0,0089
$K_p$	0,014	0,0267
$Y_{x/s}$	5,539	17,9800
$Y_{p/s}$	2,447	2,5400
$m_s$	0,007	0,0053
$\alpha$	3,413	8,7053
$R^2$	0,945	

Nota: los parámetros ( $Y_{p/s}^{-1}$ ,  $Y_{x/s}^{-1}$ ,  $K_i^{-1}$ ,  $K_p^{-1}$ ) fueron representados en el modelo (2 -5) como  $Y_{p/s}$ ,  $Y_{x/s}$ ,  $K_p$ , y  $K_i$  por conveniencia algebraica.

En las figuras 65, 66, 67 y 68 se graficó el modelo matemático del proceso de fermentación alcohólica en lote del jugo de cabuya, mediante el programa MATLAB, para las concentraciones de sustrato de 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L y 90 g/L. Se obtuvo una tendencia parecida a la del modelo matemático aplicado por Herrera et al. (2009), y el mayor rendimiento de etanol a concentración de sustrato de 90 g/L.

16. Los valores-P de producción de etanol y  $CO_2$  en la tabla ANOVA son menores que 0,05, indica que hay una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 100,0 % para la producción de etanol y del 94,62 % para la producción de  $CO_2$ . A continuación, se presentan las ecuaciones de los modelos de regresión lineal múltiple de producción de alcohol etílico y  $CO_2$ , respectivamente:

$$\text{ETANOL(g/L)} = 66.18 - 1.910 \text{ BIOMASA(g/L)} - 0.7050 \text{ SUSTRATO(g/L)}$$

$$\text{CO}_2(\text{ppm}) = 17689 - 1355 \text{ BIOMASA(g/L)} - 173.9 \text{ SUSTRATO(g/L)}$$

17. En la tabla 55, se aprecian algunos compuestos volátiles principales del licor obtenido en la investigación (análisis realizados por La Molina Calidad Total Laboratorios, ver anexo 3), los resultados sugieren que el destilado obtenido posee menor cantidad de compuestos volátiles que le atribuyen al licor características organolépticas poco deseables: Tenemos que el isobutanol no es detectable comparado con los 30 mg obtenido por López et al. 2012; el metanol obtenido es de 74,1 mg, mientras que el obtenido por López es de 314,9 mg; el butanol obtenido es de 3,0 mg, mientras que el obtenido por López es de 12,0 mg; también se aprecia que la cantidad de furfural en el licor es bajo con un valor de 0,8 mg; mientras que el compuesto iso teramílico, relacionado con destilados ricos en aromas y consistencia agradable tiene un valor relativamente alto, con lo que se puede afirmar que el licor obtenido en la investigación es de buena calidad y apta para el consumo humano.

*Compuestos volátiles del destilado de las pruebas experimentales y los obtenidos por López et al. 2012*

Compuestos volátiles	Compuestos experimentales	Compuestos según Lopez et al. (2012)
Alcohol etílico	41,5 % v/v	---
Metanol	74.1 mg/100 mL alc anhid.	314,0 mg/100 mL
Iso teramílico	216 mg/100mL	
Butanol	3 mg/100 mL	12 mg/100 mL
Iso Butanol	No detectable	30 mg/mL
Acetato de Etilo	41,3 mg/100 mL	15 mg/100 mL
Propanol	73,4 mg/100 mL	20 mg/100 mL

## 5.4 Prueba de hipótesis

### 5.4.1 Hipótesis específica I

El rendimiento experimental del proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul es del 90,45 % a condiciones de 110 °C y pH 2,5 durante 10 h de proceso (tabla 20 y figura 16). Por tanto, la hipótesis propuesta es correcta.

La cinética del proceso de hidrólisis de los fructanos presentes en el jugo de cabuya azul, es una reacción de primer orden siendo el coeficiente de velocidad igual a  $K_3 = 0,2087$ , a las condiciones de pH 2,5 y temperatura de 110 °C, obteniéndose la siguiente ecuación cinética:

$$r_A = K_1 C_A = 0,2087 C_A$$

Concordando con la determinación de Michel et al. (2015), en la que la hidrólisis de fructanos es una reacción irreversible de primer orden.

Los cinco valores-P de la tabla ANOVA son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el **rendimiento del proceso de hidrólisis**, con un 95,0 % de nivel de confianza. Con un valor de  $R^2 = 90,09\%$  a condiciones de temperatura de 110°C y pH 2,5 durante 10 h de proceso.

### 5.4.2 Hipótesis específica II

A las condiciones experimentales de operación: concentración de sustrato de 90 g/L, temperatura de 28 °C, pH 3,5; concentración de nutriente de 2 g/L y tiempo de proceso de 26 h, se logra un rendimiento de etanol de  $Y_{P/S} = 0,4779$  (93,50 %), por lo que se demuestra que la hipótesis propuesta es correcta.

El modelo matemático aplicado al proceso de fermentación alcohólica en lote con concentración inicial de sustrato de 90 g/L proporciona los siguientes valores experimentales:  $\mu_{max} = 0,588$ ,  $K_S = 16,007$ ,  $K_i = 0,019$ ,  $K_P = 0,014$ ,  $Y_{P/S} = 2,447$  y  $R^2 = 94,49$  % (ver tabla 50 y figura 68). Estos valores se aproximan a los obtenidos según el modelo matemático propuesto por Herrera et al. (2009) (tabla 3 y figura 1). El valor-P obtenido de la tabla ANOVA es menor que 0.05, indicando una relación estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 100 % entre las variables: sustrato, biomasa y rendimiento de etanol.

## CONCLUSIONES

- En el proceso de hidrólisis de los polisacáridos se logró un rendimiento del 90,45 %, mientras que el rendimiento obtenido por Michel et al. (2015) fue de 92,1 %. Esta diferencia se debe principalmente a que en la investigación se empleó como materia prima jugo de cabuya azul (*Agave tequilana* Weber var. azul) a pH 2,5 y Michel-Cuello et al. (2015) empleó *Agave salmiana* a pH 4,6. La hidrolisis es catalizada por el medio ácido que tiene la capacidad de romper los enlaces de los polímeros formado por los monómeros heterocíclicos (Saeman, 1945; Laopaiboon et al., 2010). Debido al cambio climático atribuido a muchos factores, como el uso de insumos químicos, estaría bien realizar estudios de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya utilizando enzimas para degradar dichos polisacáridos, evitando el tratamiento drástico con ácido para bajar el pH a 2,5.
- La cinética de la reacción del proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul es de primer orden y concuerda con el estudio de Michel-Cuello et al. (2015). Las constantes de velocidad halladas son:  $K_1 = 0,1487$ ,  $K_2 = 0,1821$  y  $K_3 = 0,2087$ ; a temperatura de 90 °C, 100 °C y 110 °C respectivamente.
- El rendimiento de etanol en el proceso de fermentación alcohólica del jugo de cabuya azul es del 47,8 %, y según Shou Hu (2017), el rendimiento máximo teórico de una fermentación alcohólica es del 51,0 %. Entonces, como el rendimiento mínimo que exige una industria de fermentación es del 45,0 %, el rendimiento obtenido en la investigación es aceptable.
- El modelo matemático aplicado para la concentración de sustrato de 90 g/L y temperatura de 28 °C, da un coeficiente de correlación de 0,945 y un rendimiento de 40,87 %, siendo el valor experimental de 47,80 %. El modelo matemático difiere poco de los valores experimentales, lo cual se debe a que

las propiedades del jugo de cabuya azul (composición del terreno, temperatura del medio ambiente, nivel del mar de la zona en el cual se desarrolla, etcétera) utilizado en el experimento difieren de las propiedades de la cabuya azul mexicana; por ello, este modelo puede ser similar al del proceso de fermentación alcohólica del tequila, pero será necesario tener en cuenta posteriormente mejorar el modelo matemático utilizando otros modelos cinéticos.

Los tratamientos de fermentación para la primera etapa es que se realizaron para ver el mayor rendimiento a las condiciones de pH, temperatura y concentración de DAP para concentración constante de AR de 60 g/L y en la segunda etapa, una vez determinada los parámetros de mayor rendimiento de etanol de etanol, se realizaron pruebas a estas condiciones variando las concentraciones de AR (10 g/L, 30 g/L y 90 g/L), obteniéndose el mayor rendimiento para la concentración de AR de 90 g/L,  $Y_{P/S} = 47,79$ .

## RECOMENDACIONES

1. Debido a los múltiples productos que se puede obtener de la cabuya azul y la trascendencia que puede adquirir desde el punto de vista socioeconómico y agroecológico por los beneficios que generaría a las poblaciones rurales donde crece, se recomienda difundir los conocimientos técnicos para su cultivo y explotación a nivel piloto: semiindustrial e industrial.
2. Se recomienda investigar el método de hidrólisis enzimática de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul.
3. Se debe realizar investigaciones del proceso de fermentación alcohólica con otras cepas de levadura, como con levaduras nativas aisladas del jugo de cabuya azul de la zona en donde crece esta planta, así como el de utilizar diferentes tipos de nutrientes y momentos de agregarlos.
4. Se recomienda realizar tratamientos químicos de neutralización de la vinaza para su aprovechamiento como abono debido a los componentes orgánicos que tiene y como riego para el cultivo agrícola.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agu, R., Bringham, T., Brosnan, J., & Jack, F. (2008). Effect of Process Conditions on Alcohol Yield of Wheat, Maize, and other Cereals. *Journal of The Institute Brew.* 114(1), 39-44.
- Arellano, M., Herrera, E., Díaz-Montaña, D., Moran, A., & Ramirez, J. (2007). Unstructured Kinetic Model for Tequila Batch Fermentation. *International Journal of Mathematics and Computers in Simulation*, Vol. 1, 1-6.
- Arrizon, J., & Gschaedler, A. (2002). Increasing fermentation efficiency at high sugar concentration by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of tequila fermentation process. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(11), 965-970.
- Arrizon, J., Concetta, F., Acosta, G., Romano, P., & Gschaedler, A. (Enero de 2006). Fermentation behaviour and volatile compound production by agave and grape must yeasts in high sugar *Agave tequilana* and grape must fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*, 89(1), 181-189.
- Ávila, A., Galicia, N., Rodríguez, M., Olvera, C., & López, A. (2011). Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans. *Food Chemistry*, 129(2), 380-386.
- Bain, M., & Stevenson N. (1999). *Aquatic Habitat Assessment, Common Methods*. American Fisheries society, Bethesda Maryland, USA.
- Barclay, T., Ginic, M., Cooper, P., & Petrovsky, N. (2010). Inulin - A versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *Journal Excipients and Food Chemicals*, 1(3), 27-50.
- Bastin G. and D. Dochain, *On-Line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors*, Elsevier Science Publishers, 1990
- Bautista- J, M., García-Oropeza, L., Barboza-Corona, J., & Parra Negrete, L. (agosto de 2001). El *Agave tequilana* Weber y la producción de tequila. *Acta Universitaria*, Vol. 11, Nº 2, 26-34. Guanajuato, México.
- Benn, S., & Peppard, T. (1996). Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(2), 557-566.
- Bisson, L. F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 107-119.
- Boulton c. & David Quain, *Brewing Yeast and Fermentation*, Blackwell Science Ltd, 2001
- Carcano, S. (2010). *A Model for Cell Growth in Batch Bioreactors*. Tesis de Grado. Politecnico Di Milano. Facolta Di Ingegneria Dei Sistemi. Anno accademico, Milán, Italia.

- Cedeño, M. (1995). Tequila production. *Crit. Rev. Biotechnol*, 15, 1-11.
- Cedeño, M. (2003). Tequila production from agave: Historical influences and contemporary processes. En K. A. Jacques, T. P. Lyons, & D. R. Kelsall (Eds.). *The alcohol textbook* (4th ed.), (pp. 223-245). Nottingham: Nottingham University Press.
- CIATEJ. (2004). *Ciencia y tecnología del tequila. Avances y perspectivas*. Guadalajara.
- Consejo Regulador del Tequila (CRT). (2018). Información estadística. México.
- De León-Rodríguez, A., González, L., Barba de la Rosa, A., Escalante, P., & López, M. (2006). Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *J. Agric. Food Chem.*, 54(14), 1337-1341.
- Díaz-Montaño, D. (2004). *Estudio fisiológico y cinético de dos cepas de levaduras involucradas en la etapa fermentativa de la elaboración de tequila* (tesis doctoral). Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México - Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, France.
- Díaz-Montaño, D., Délia, M., Estarrón, M., & Strehaiano, P. (Junio de 2008). Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from *Agave tequilana* Weber juice. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol 42(7), 608-616. Guadalajara, México.
- Doran, P. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*. Elsevier Science & technology books.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem.*, 28(3), 350-356. DOI 10.1021/ac60111a017
- Fermentis by Lesaffre for beverages. (2017). Levadura activa seca para producción de tequila y mezcal. *Technical Data Sheet SP\_L\_ES\_Safteq Silver Rev.*
- Franck, A., & Levecke, B. (2012). Inulin. En *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 19 (pp.425-435). ORAFTI, Tienen, Belgium.
- García, J., Suarez, M., Domenech, F., Blanco, G., & Santiesteban, C. (2000). a Levadura *Saccharomyces*. En *Manual de los derivados de la caña de azúcar* (3.<sup>a</sup> ed.). Capítulo 4.1 (pp.197-201).
- García Herrera, E., Méndez, S. de J., & Talavera, D. (2010). El género *Agave* spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición. Edición Especial*, 5(1), 109-129.
- García Mendoza, A. (2002). Distribution of *Agave* (Agavaceae) en México. *Cactus and Succulent Journal (USA)*, 74(4), 177-187.
- García Mendoza, A. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*, 87, 14-23.

- García Mendoza, A. (febrero de 2012). México, país de magueyes. *La Jornada del Campo*, 53.
- García-Soto, M., Jiménez-Islas, H., Navarrete-Bolaños, J. L., Rico-Martínez, R., Miranda López, R., & Botello-Alvarez, J. E. (2011). Kinetic study of the thermal hydrolysis of Agave salmiana for mezcal production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7333- 7340.
- Gil, K., Díaz, C., Nava, A., & Simpson, J. (2006). AFLP analysis of Agave tequilana varieties. *Plant Science*, 170(4), 904-909.
- Godínez, C. I. (2012). *Caracterización de la fermentación alcohólica en la fábrica de mezcal de la ex hacienda "Laguna Seca"*. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales, Universidad Autónoma de San Luis de Potosí. San Luis de Potosí, México.
- González-Hernández, J. C., Pérez, E., Damián, R., & Chavez-Parga, M. (diciembre de 2012). Isolation, molecular and fermentative characterization of a yeast used in ethanol production during mezcal elaboration. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(3), 389-400.
- Guzmán, P. M. (1997). Aguardientes de México: tequila, mezcal, charanda, bacanora, sotol. *Bebidas Mexicanas*, 6(4), 37-40.
- Hernández, P., Ibarz, M. J., Cacho, J., & Ferreira, V. (2005). Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. *Food Chem*, 89(2), 163-174.
- Hernández Sampieri, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación* (6.<sup>a</sup> ed.). México: Mc Graw-Hill / Interamericana Editores, S. A.
- Herrera, A., Martínez, M. D., Hernández, M., Lopez, E. O., Rodríguez, A. V., Álvarez, L., Marquina, S., Navarro, V. M., & Tortoriello, J. (2007). Mycological and electron microscopic study of Solanum chrysotrichum saponin SC-2 antifungal activity on candida species of medical significance. *Planta Medica*, 73(15), 1568-1573.
- Herrera, E., Hernández, G., Moran A., Flores, M., Córdoba, J., Femat, R., & Díaz-Montaño, D. (2009). Modelado Matemático del Cultivo en Lote y Continuo del Proceso Fermentativo del Tequila. *Congreso Anual 2009 de la Asociación de México de Control Automático. Zacatecas, México*.
- Ibarra, B., Botero, F., & Cortés, C. (2010). Operaciones unitarias en la producción de tequila. En Grupo Ingeniería Institucional (Ed.), *Ingeniería de tequilas* (1.<sup>a</sup> ed.) (pp. 17-37). Universidad Nacional de Colombia.
- Jiménez, E., & Lí del Olmo, M. (marzo de 2008). Addition of ammonia or amino acids to a nitrogen-depleted medium affects gene expression patterns in yeast cells during alcoholic fermentation. *Federation of European Microbiological Societies*, 8(2), 245-256.

- Kuhlmann, Ch., Bogle, I., & Chalabi, Z. (1998). Robust operation of fed-batch fermenters. *Bioprocess Engineering*, 19, 53-59.
- Laopaiboon, P., Thani, A., Leelavatcharamas, V., & Laopaiboon, L. (2010). Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. *Bioresource Technology*, 101(3), 1036-1043.
- Lappe, P., Moreno, R., Arrizón, J., Herrera, T., García, A., & Gschaedler, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1037-1052.
- Lavado, A., Robles, R., & Yenque, J. (2015). Análisis Fisicoquímico de la Cabuya Azul. *Revista de Investigación Industrial Data. Facultad de Ingeniería Industrial – UNMSM*, Vol. 18, N° 1, 98-100. Lima, Perú.
- Leal, I., Tarantino, G., Hernández, R., & Morán, H. (2014). Efecto de la temperatura y el pH en la fermentación del mosto de *Agave cocui*. *Multiciencias*, 1414(4), 375-381.
- López, A., Díaz, A., Soza, C., Macías, L., & Campos, J. (Mayo de 2012). Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 113, N° 5, 614-618. 2012.
- Madrigal, L., & Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 57, 387-396.
- Mancilla-Margalli, N. A., M. L. Martínez y M. G. López. (1999). Maillard compounds generated during thermal process of *Agave tequilana* L. Weber var. azul. Consultado en internet: <http://www.confex2.com/ift/99annual/abstracts/3839.htm>
- Mancilla-Margalli, N. A., & López, M. G. (2002). Generation of Maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber Var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 806–812.
- Mancilla-Margalli N. A., & López, M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *dasyliro* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7832-7839.
- Mauricio, J. C., Moreno, J., Zea, L., Ortega, J. M., & Medina, M. (1997). The effects of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and esters formed by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 75, 155-160.
- Michel-Cuello, C., Juárez-Flores, B., Aguirre, J. R., & Pinos-Rodríguez, J. (agosto de 2008). Quantitative characterization of nonstructural carbohydrates of mezcal agave (*Agave salmiana* Otto ex *salm-dick*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5753-5757.

- Michel-Cuello, C., Gallegos, G., Maldonado, E., & Aguilar, N. (2015). Efecto de la Temperatura y el pH del medio en la hidrólisis de fructanos de maguey para la obtención de jarabes fructosados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(3), 615-622.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, N° 3, 426-428, march 1959.
- Modak, J., Lim, H., & Tayeb, Y. (1986). General characteristics of optimal feed rate profiles for various fed-batch fermentation processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 1396-1407.
- Montañez-Soto, J., Venegas-González, J., Vivar-Vera, M., & Ramos-Ramírez, E. (septiembre-diciembre 2011). Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas *Agave tequilana* Weber azul. *Bioagro*, 23(3), 199-206.
- Moran-Marroquín, G., Córdoba, J., Estarrón, M., & Díaz-Moantaño, D. (2009). Efecto del pH y de la aireación sobre las capacidades fermentativas y aromáticas de dos cepas tequileras de *S. cerevisiae* cultivadas en continuo.
- Moran- Marroquín, G., Córdoba, J., Valle, J., Estarrón, M., & Díaz-Moantaño, D. (2011). Effect of dilution rate and nutrients addition on the fermentative capability and synthesis of aromatic compounds of two indigenous strains of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous cultures fed with *Agave tequilana* juice. *International Journal of Food Microbiology*, 151(1), 87-92.
- Moser, A. (1988). *Bioprocess technology*. Springer-Verlag New York Inc.
- Nobel, P. S. (1998). *Los incomparables agaves y cactus*. (1.<sup>a</sup> ed.). México: Editorial Trillas, S. A. (pp. 37, 39, 46-49).
- Nduka Okafor, *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*, Science Publisbers, 2007
- Ochoa, J., & Vázquez, R. (2004). Las levaduras marinas como herramientas científicas y biotecnológicas. *Universidad y Ciencia*, Número Especial I, 39-50.
- Palomino, G., Dolezel, J., Méndez, I., & Rubluo, A. (2003). Nuclear genome size analysis of *Agave tequilana* Weber. *Caryologia*, 56(1), 37-46.
- Pérez, H., Chávez, Ma., Gonzáles, J. (2007). Evaluación y selección de cepas de levaduras con características probióticas para uso como aditivo alimentario (tesis de maestría en Ciencias Microbiológicas, mención en Fermentaciones).
- Pinal, Z. L., & Gschaedler, M. (1998). La etapa de fermentación y la generación de compuestos organolépticos. *Bebidas Mexicanas*, 7(1), 10-12.
- Prescott, S. & Dunn, C. (1962). *Microbiología industrial* (3.<sup>a</sup> ed.). Madrid: Editorial Aguilar.
- Ritsema, T., & Smeekensy, S. (Junio de 2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 223-230.

- Rodríguez, G. (mayo de 2007). La denominación de origen del tequila: pugnas de poder y la construcción de la especificidad sociocultural del agave azul. *Nueva Antropología*, 20(67), 141-161.
- Russell, I. (2003). Understanding yeast fundamentals. En K. A. Jacques., T. P. Lyons & D. R. Kelsall. *The alcohol textbook* (4.<sup>a</sup> ed.) (pp. 85-119). Nottingham University Press. England.
- Saeman, J. F. (1945). Kinetics of Wood Saccharification: Hydrolysis of Cellulose and Decomposition of Sugar in Dilute Acid at High Temperature. *Industrial & Engineering Chemistry*, 37, 43-52.
- Shou Hu, W. (2017). *Engineering Principles in Biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd.
- Shuler, M., & Kargi, F. (2001). *Bioprocess Engineering. Basic Concepts*. New Jersey: Prentice Hall.
- Smets, I., Claes, J., November, E., Bastin, G., & Van Impe, J. (2004). Optimal adaptive control of biochemical reactors: past, present and future. *Journal of Process Control*, 14, 795-805.
- Téllez, M. P. (1998). El cocimiento, una etapa importante en la producción del tequila. *Bebidas Mexicanas*, 7(1), 19-20.
- Trinder, P. (1969). Enzymatic and colorimetric method for determination of glucose. *Annals of Clinical Biochemistry*, (6), 24-26.
- Valle-Rodríguez, J., Córdova, J., Hernández, G., Estarrón, M., & Díaz-Montaña, D., (2011). Effect of the amino-acids supplementation on the *Agave tequilana* juice fermentation by *Kloeckera africana* in batch and continuous cultures. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101(2), 195-204. doi: 10.1007/s10482-011-9622-x.
- Volesky B., & Votruba, J. (1992). *Modeling and Optimization of Fermentation Processes*. Elsevier. The Netherlands.
- Waleckx, E., Gschaedler, A., Colonna-Ceccaldi, B., & Monsan, P. (Mayo de 2008). Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. *Food Chemistry*, 108(1), 40-48.
- Walker, G. (1998). *Yeast physiology and biotechnology* (1.<sup>a</sup> ed.). England: Wiley.
- Walker, G., & Stewart, G. (Noviembre de 2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages* 2016, 2, 30; doi: 10.3390/beverages 2040030, 1-12.

## ANEXO 1

### 1. Tratamiento estadístico del proceso de hidrólisis de fructanos presentes en el jugo de cabuya azul

#### ANOVA Multifactorial – HIDRÓLISIS DE FRUCTANOS

Variable dependiente: HIDRÓLISIS DE FRUCTANOS (%)

Factores:

TEMPERATURA (°C)

pH

TIEMPO (h)

Número de casos completos: 45

La siguiente tabla indica el análisis de varianza del proceso de hidrólisis de los fructanos presentes en el jugo de cabuya azul.

#### *Análisis de varianza para hidrólisis de fructanos - Suma de cuadrados tipo III*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: TEMPERATURA	1105.9	2	552.951	13.79	0.0003
B: pH	1256.45	2	628.223	15.66	0.0002
C: TIEMPO	19368.2	4	4842.05	120.73	0.0000
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	261.871	4	65.4678	1.63	0.2147
AC	415.645	8	51.9556	1.30	0.3128
BC	351.615	8	43.9519	1.10	0.4146
RESIDUOS	641.719	16	40.1074		
TOTAL (CORREGIDO)	23401.4	44			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de **hidrólisis de fructanos** en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que tres valores-P son menores que 0,05, estos

factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre **hidrólisis de fructanos** con un 95,0 % de nivel de confianza.

### Regresión Múltiple - % HIDRÓLISIS DE FRUCTANOS

Variable dependiente: % Hidrólisis de fructanos

VARIABLES INDEPENDIENTES:

TEMP °C

TIEMP (h)

Tabla A

<i>Parámetro</i>	<i>Estimación</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Estadístico T</i>	<i>Valor-P</i>
CONSTANTE	-45.625	26.7734	-1.70412	0.0998
TEMP (°C)	0.510941	0.279702	1.82673	<b>0.0788</b>
TIEMP (h)	7.34577	0.494448	14.8565	0.0000

Tabla B. Análisis de varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	13146.3	2	6573.14	112.03	<b>0.0000</b>
Residuo	1584.23	27	58.675		
Total (Corr.)	14730.5	29			

R-cuadrada = **89.2453 %**

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = **88.4486 %**

Error estándar del est. = **7.65996**

Error absoluto medio = **5.83734**

Estadístico Durbin-Watson = 0.512229 (P=**0.0000**)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.667446

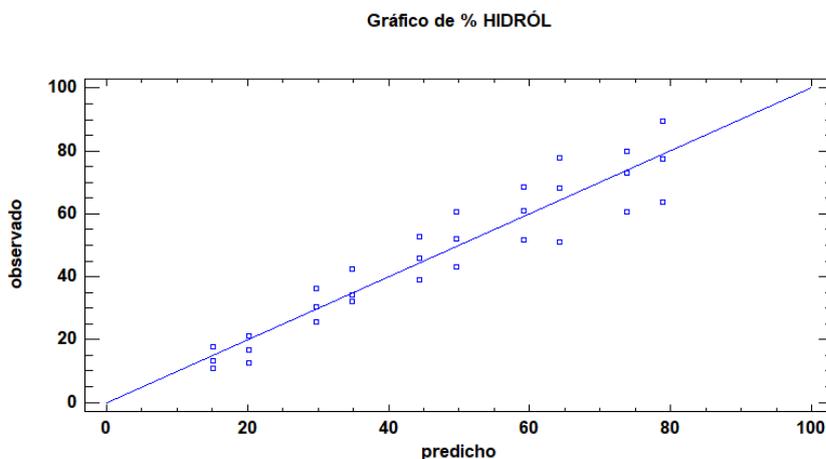
### **El StatAdvisor**

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo de regresión lineal múltiple para describir la relación entre % **hidrólisis de fructanos** y dos variables independientes.

La ecuación del modelo ajustado es la siguiente:

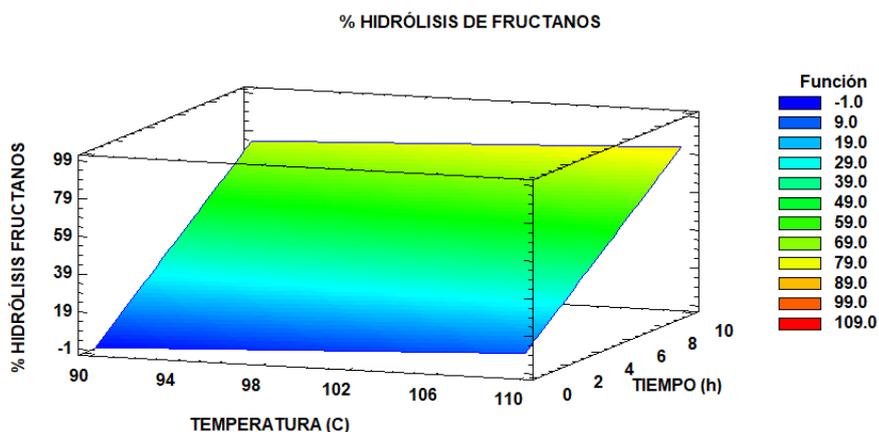
$$\% \text{ HIDRÓLISIS} = -45.625 + 0.510941 * \text{TEMPERATURA (°C)} + 7.34577 * \text{TIEMPO (h)}$$

La siguiente figura muestra la relación múltiple del proceso de hidrólisis de fructanos.



**Gráfico de relación múltiple del proceso de hidrólisis de fructanos.**

En la siguiente figura, se presenta el gráfico de superficie de respuesta y de contorno respectivamente, del proceso de hidrólisis de fructanos.



**Gráfico de superficie de respuesta del proceso de hidrólisis de fructanos.**

## 2. Tratamiento estadístico del proceso de hidrólisis de la sacarosa presente en el jugo de cabuya azul

### Atributos del Diseño Multifactor Categórico

Clase de diseño: Multifactor categórico

Nombre del archivo: HIDRÓLISIS DE SACAROSA

#### **Diseño Base**

Número de factores experimentales: 3

Número de respuestas: 1

Número de corridas: 45

Grados de libertad para el error: 16

Aleatorizar: Sí

<i>Factores</i>	<i>Niveles</i>	<i>Unidades</i>
TEMPERATURA	3	°C
pH	3	
TIEMPO	5	h

<i>Respuestas</i>	<i>Unidades</i>
HIDRÓLISIS SACAROSA	PORCENTAJE

### ANOVA Multifactorial - HIDRÓLISIS SACAROSA

Variable dependiente: HIDRÓLISIS SACAROSA (%)

Factores:

TEMPERATURA (°C)

Ph

TIEMPO (h)

Número de casos completos: 45

En la siguiente tabla se indica el análisis de varianza del proceso de hidrólisis de la sacarosa.

#### Análisis de varianza para la hidrólisis de sacarosa – Suma de cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TEMPERATURA	232.343	2	116.172	27.49	0.0000
B:Ph	1264.86	2	632.429	149.66	0.0000
C:TIEMPO	16407.2	4	4101.79	970.68	0.0000

INTERACCIONES					
AB	39.3578	4	9.83944	2.33	0.1005
AC	25.0567	8	3.13209	0.74	0.6558
BC	57.0262	8	7.12827	1.69	0.1776
RESIDUOS	67.6112	16	4.2257		
TOTAL (CORREGIDO)	18093.4	44			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de **hidrólisis de sacarosa** en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que tres valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre **hidrólisis de sacarosa** con un 95,0 % de nivel de confianza.

### Regresión Múltiple – HIDRÓLISIS DE SACAROSA

Variable dependiente: HIDRÓLISIS DE SACAROSA

Variabes independientes:

TEMP C

TIEMPO

Tabla A

Parámetro	Estimación	Error Estadístico		Valor-P
		Estándar	T	
CONSTANTE	-13.3817	12.1407	-1.10222	0.2766
TEMP (°C)	0.273195	0.119241	2.29112	<b>0.0270</b>
TIEMPO (h)	6.68288	0.344219	19.4146	0.0000

Tabla B. Análisis de varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	16301.8	2	8150.91	191.09	<b>0.0000</b>
Residuo	1791.52	42	42.6553		
Total (Corr.)	18093.3	44			

R-cuadrada = **90.0985** %

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 89.627 %

Error estándar del est. = 6.5311

Error absoluto medio = 5.14726

Estadístico Durbin-Watson = 0.829877 (P=0.0000)

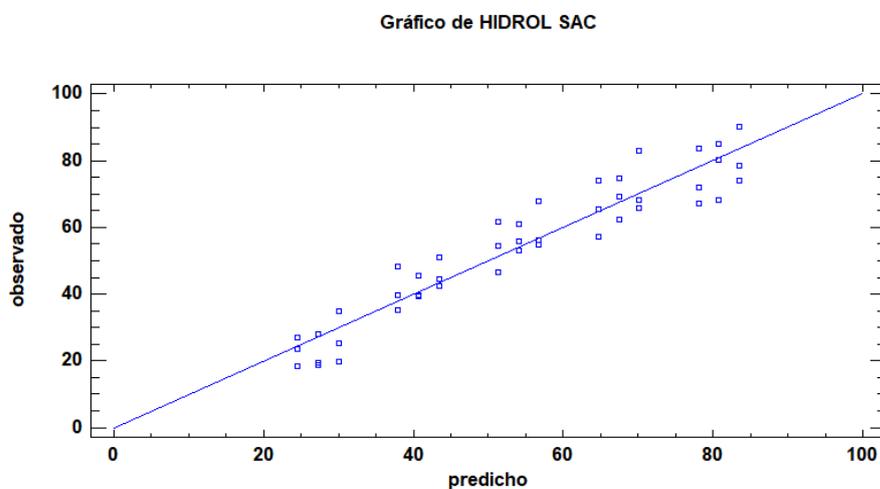
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.558138

### El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo de regresión lineal múltiple para describir la relación entre **hidrólisis de sacarosa** y dos variables independientes. La ecuación del modelo ajustado es la siguiente:

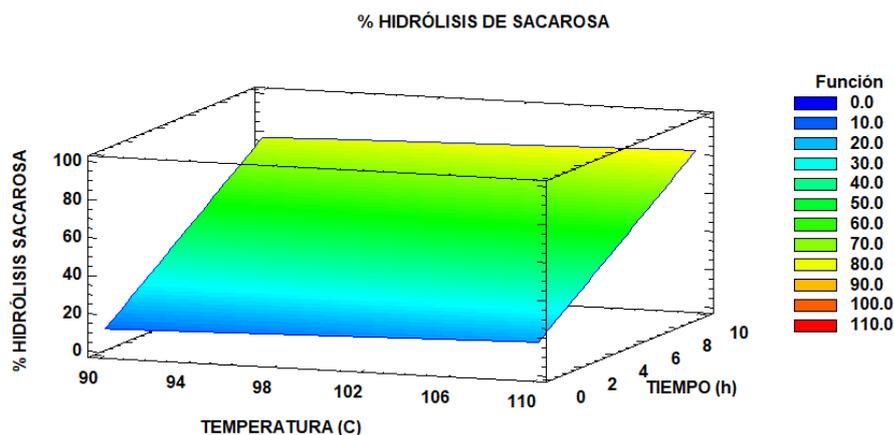
$$\text{HIDROL SAC} = -13.3817 + 0.273195 \cdot \text{TEMPERATURA } (^\circ\text{C}) + 6.68288 \cdot \text{TIEMPO (h)}$$

En la siguiente figura, se muestra el gráfico de correlación múltiple del proceso de hidrólisis de sacarosa.



**Gráfico de correlación múltiple del proceso de hidrólisis de sacarosa.**

A continuación, se presenta el gráfico de superficie de respuesta y de contorno, respectivamente, del proceso de hidrólisis de sacarosa.



**Gráfico de superficie de respuesta del proceso de hidrólisis de sacarosa.**

### **3. Tratamiento estadístico del incremento de glucosa en el proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul**

#### **Atributos del Diseño Multi-factor Categórico**

Clase de diseño: Multi-factor Categórico

Nombre del archivo: INCREMENTO DE GLUCOSA

#### **Diseño Base**

Número de factores experimentales: 3

Número de respuestas: 1

Número de corridas: 45

Grados de libertad para el error: 16

Aleatorizar: Sí

<i>Factores</i>	<i>Niveles</i>	<i>Unidades</i>
TEMPERATURA	3	°C
pH	3	
TIEMPO	5	H

<i>Respuestas</i>	<i>Unidades</i>
INCREMENTO GLUCOSA	PORCENTAJE

#### **ANOVA Multifactorial - INCREMENTO DE GLUCOSA**

Variable dependiente: INCREMENTO DE GLUCOSA (%)

Factores:

TEMPERATURA (°C)

pH

TIEMPO (h)

Número de casos completos: 45

En la siguiente tabla, se muestra análisis de varianza del incremento de glucosa en el proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul.

*Análisis de varianza para el incremento de glucosa - Suma de cuadrados tipo III*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: TEMPERATURA	110.584	2	55.292	0.86	0.4438
B: pH	82.1933	2	41.0967	0.64	0.5425
C: TIEMPO	99.2829	4	24.8207	0.38	0.8170
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	31.5855	4	7.89638	0.12	0.9725
AC	266.004	8	33.2505	0.51	0.8287
BC	331.361	8	41.4201	0.64	0.7335
RESIDUOS	1034.64	16	64.6653		
TOTAL (CORREGIDO)	1955.65	44			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de **incremento de glucosa**, en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0,05, ninguno de los factores o interacciones tiene un efecto estadísticamente significativo sobre **incremento de glucosa** con un 95,0 % de nivel de confianza.

### **Regresión Múltiple – INCREMENTO DE GLUCOSA**

Variable dependiente: INCREMENTO DE GLUCOSA

Variabes independientes:

TEMPERATURA

TIEMPO

Tabla A

Parámetro	Estimación	Error		Valor-P
		Estándar	Estadístico T	
CONSTANTE	-13.7896	3.62922	-3.79961	0.0005
TEMP	0.154609	0.0356446	4.33752	<b>0.0001</b>
TIEMPO	2.18825	0.102897	21.2664	0.0000

Tabla B. Análisis de varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1795.54	2	897.772	235.54	<b>0.0000</b>
Residuo	160.088	42	3.81161		
Total (Corr.)	1955.63	44			

R-cuadrada = **91.814 %**

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = **91.4242 %**

Error estándar del est. = **1.95233**

Error absoluto medio = **1.50111**

Estadístico Durbin-Watson = 0.819713 (P=**0.0000**)

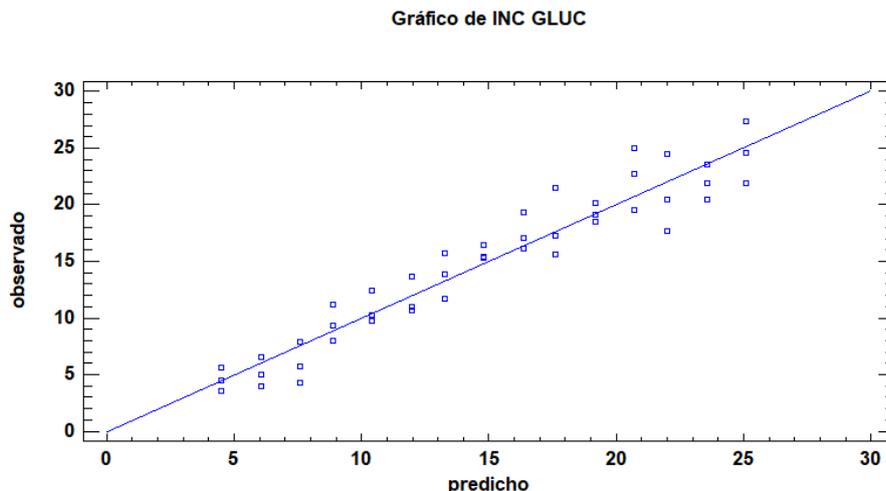
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.554214

### El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo de regresión lineal múltiple para describir la relación entre **incremento de glucosa** y dos variables independientes. La ecuación del modelo ajustado es la siguiente:

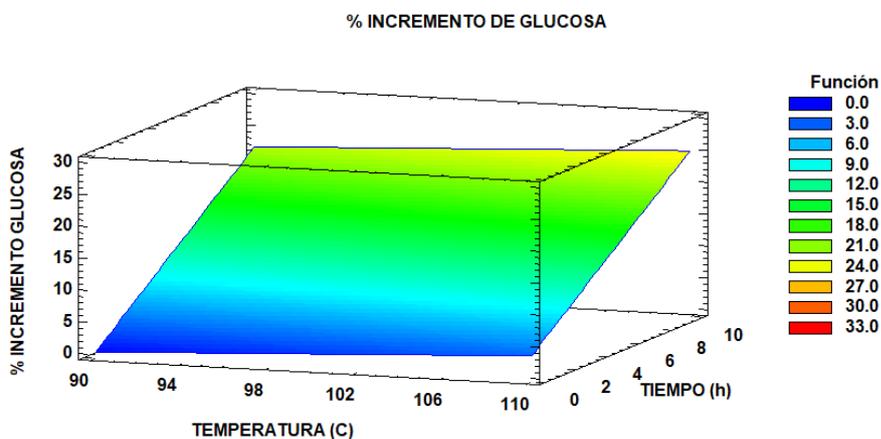
$$\text{INC GLUC} = -13.7896 + 0.154609 \cdot \text{TEMPERATURA} + 2.18825 \cdot \text{TIEMPO}$$

En la siguiente figura, se muestra el gráfico de correlación múltiple del incremento de glucosa en el proceso de hidrólisis.



**Gráfico de correlación múltiple del incremento de glucosa.**

A continuación, se presenta el gráfico de superficie de respuesta y de contorno respectivamente, del incremento de glucosa en el proceso de hidrólisis.



**Gráfico de superficie de respuesta del incremento de glucosa.**

**4. Tratamiento estadístico del incremento de fructosa en el proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul**

**Atributos del Diseño Multifactor Categórico**

Clase de diseño: Multifactor Categórico

Nombre del archivo: INCREMENTO DE FRUCTOSA

### Diseño Base

Número de factores experimentales: 3

Número de respuestas: 1

Número de corridas: 45

Grados de libertad para el error: 16

Aleatorizar: Sí

<i>Factores</i>	<i>Niveles</i>	<i>Unidades</i>
TEMPERATURA	3	°C
pH	3	
TIEMPO	5	h

<i>Respuestas</i>	<i>Unidades</i>
INCREMENTO FRUCTOSA	PORCENTAJE

### ANOVA Multifactorial – INCREMENTO DE FRUCTOSA

Variable dependiente: INCREMENTO DE FRUCTOSA (%)

Factores:

TEMPERATURA (°C)

pH

TIEMPO (h)

Número de casos completos: 45

En la tabla siguiente se observa el análisis de varianza del incremento de fructosa en el proceso de hidrólisis de los polisacáridos presente en el jugo de cabuya azul.

#### *Análisis de varianza para incremento de fructosa - Suma de cuadrados tipo III*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TEMPERATURA	314.53	2	157.265	117.65	0.0000
B:pH	1022.44	2	511.221	382.45	0.0000
C:TIEMPO	11476.2	4	2869.06	2146.35	0.0000
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	16.7233	4	4.18082	3.13	0.0444

AC	20.8757	8	2.60946	1.95	0.1213
BC	118.194	8	14.7742	11.05	0.0000
RESIDUOS	21.3874	16	1.33671		
TOTAL (CORREGIDO)	12990.4	44			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de **incremento de fructosa** en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que cinco valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre **incremento de fructosa** con un 95,0 % de nivel de confianza.

### Regresión Múltiple – INCREMENTO DE FRUCTOSA

Variable dependiente: INCREMENTO DE FRUCTOSA

Variables independientes:

TEMPERATURA (°C)

TIEMPO

Tabla A

Parámetro	Estimación	Error Estadístico		Valor-P
		Estándar	T	
CONSTANTE	-27.6015	10.5253	-2.62238	0.0121
TEMP (°C)	0.323327	0.103375	3.1277	0.0032
TIEMPO	5.61008	0.298419	18.7994	0.0000

Tabla B. Análisis de varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	11643.9	2	5821.96	181.60	0.0000
Residuo	1346.49	42	32.0593		
Total (Corr.)	12990.4	44			

R-cuadrada = 89.6347 %

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 89.1411 %

Error estándar del est. = 5.6621

Error absoluto medio = 4.46194

Estadístico Durbin-Watson = 0.679917 (P=0.0000)

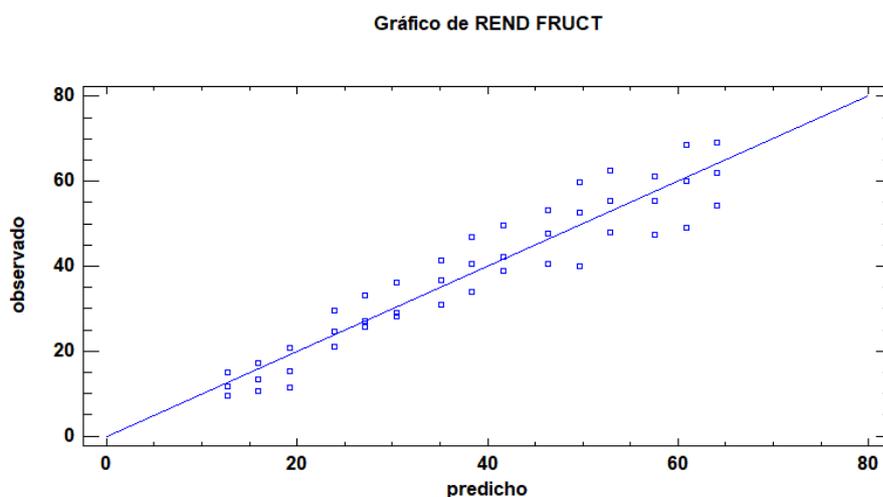
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.622682

### El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo de regresión lineal múltiple para describir la relación entre **Incremento de fructosa** y 2 variables independientes. La ecuación del modelo ajustado es la siguiente:

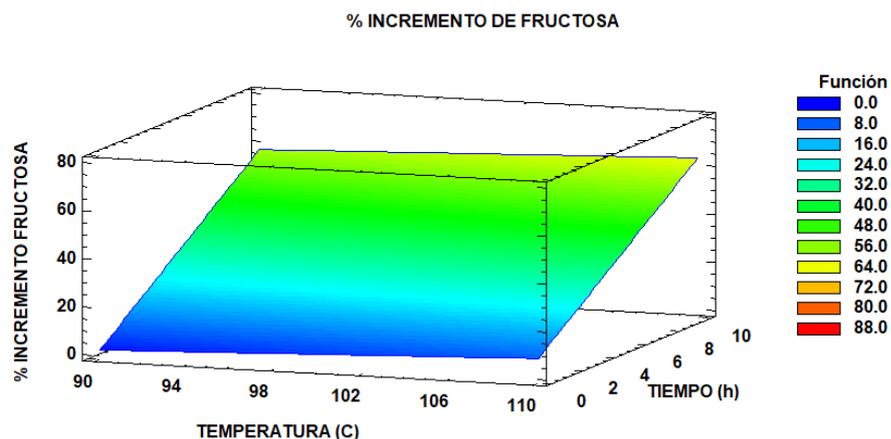
$$\text{INC DE FRUCT} = -27.6015 + 0.323327 * \text{TEMPERATURA} + 5.61008 * \text{TIEMPO}$$

En la siguiente figura, se observa el gráfico de correlación múltiple del incremento de fructosa en el proceso de hidrólisis.



**Gráfico del incremento de fructosa en el proceso de hidrólisis.**

La siguiente figura muestra el gráfico de superficie de respuesta y de contorno respectivamente, del incremento de fructosa en el proceso de hidrólisis.



**Gráfico de superficie de respuesta del incremento de fructosa en el proceso de hidrólisis.**

## 5. Tratamiento estadístico del incremento de azúcares reductores directos (ARD) en el proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya

**Análisis de regresión: % incremento AR vs. tiempo h; temperatura °C**

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Regresión	5	35124.6	7024.93	81.87	0.000
TIEMPO h	1	248.3	248.28	2.89	0.097
TEMP °C	1	1.9	1.86	0.02	0.884
TIEMPO h*TIEMPO h	1	431.8	431.83	5.03	0.031
TEMP °C*TEMP °C	1	0.8	0.76	0.01	0.926
TIEMPO h*TEMP °C	1	42.1	42.10	0.49	0.488
Error	39	3346.5	85.81		
Falta de ajuste	9	33.6	3.73	0.03	1.000
Error puro	30	3313.0	110.43		
Total	44	38471.2			

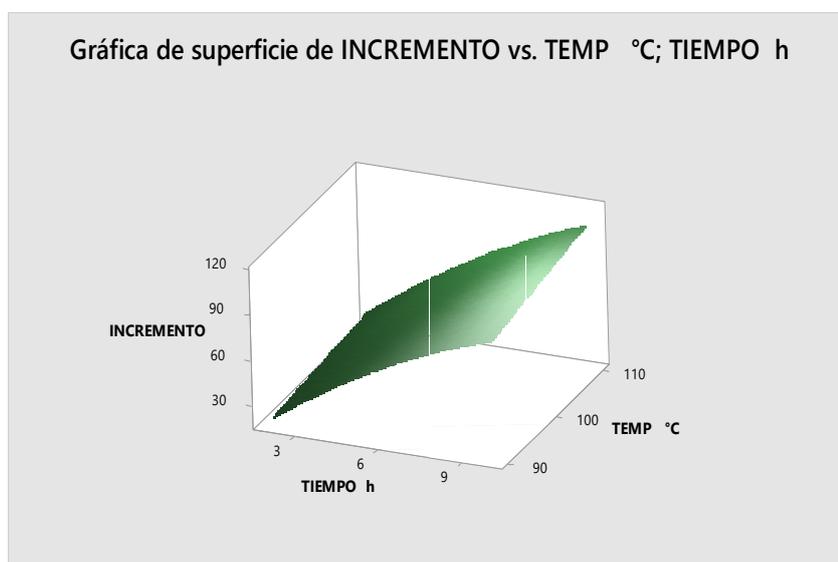
### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
9.26329	91.30%	90.19%	88.35%

La ecuación de regresión lineal múltiple que describe la relación entre el RENDIMIENTO ARD y las dos variables independientes es:

### Ecuación de regresión

$$\text{INCREMENTO} = -64 + 11.04 \text{ TIEMPO h} + 0.86 \text{ TEMP } ^\circ\text{C} - 0.463 \text{ TIEMPO h} * \text{TIEMPO h} \\ - 0.0028 \text{ TEMP } ^\circ\text{C} * \text{TEMP } ^\circ\text{C} + 0.0419 \text{ TIEMPO h} * \text{TEMP } ^\circ\text{C}$$



**Diagrama de superficie de respuesta del incremento de ARD en el proceso de hidrólisis.**

## 6. Tratamiento estadístico del rendimiento del proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul

### ANOVA Multifactorial - RENDIMIENTO DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS

Variable dependiente: % RENDIMIENTO DE HIDRÓLISIS

Factores:

temperatura (°C)

pH

Tiempo (h)

Número de casos completos: 45

En la tabla siguiente se observa el análisis de varianza del rendimiento total de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul.

*Análisis de varianza para el rendimiento del proceso de hidrólisis - Suma de Cuadrados tipo III*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:temperatura	546.596	2	273.298	165.88	0.0000
B:pH	1684.96	2	842.482	511.35	0.0000
C:Tiempo	19714.8	4	4928.7	2991.53	0.0000
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	15.4904	4	3.87259	2.35	0.0981
AC	37.7652	8	4.72065	2.87	0.0348
BC	186.588	8	23.3235	14.16	0.0000
RESIDUOS	26.3608	16	1.64755		
TOTAL (CORREGIDO)	22212.6	44			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de **rendimiento total de hidrólisis** en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que cinco valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre **rendimiento total de hidrólisis** con un 95,0 % de nivel de confianza.

### **Regresión Múltiple - % Hidrólisis Total**

Variable dependiente: % Rendimiento total de hidrólisis

Variables independientes:

Temperatura (°C)

Tiempo (h)

Tabla A

<i>Parámetro</i>	<i>Estimación</i>	<i>Error</i>		<i>Estadístico T</i>	<i>Valor-P</i>
		<i>Estándar</i>			
CONSTANTE	-36.598	13.4575		-2.71953	0.0095
Temp °C	0.426719	0.132173		3.22848	0.0024
Tiempo h	7.35321	0.381552		19.2719	0.0000

Tabla B. Análisis de varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	20011.3	2	10005.7	190.91	0.0000
Residuo	2201.19	42	52.4094		
Total (Corr.)	22212.5	44			

R-cuadrada = 90.0903 %

R-cuadrado (ajustado para g. l.) = 89.6184 %

Error estándar del est. = 7.23943

Error absoluto medio = 5.73507

Estadístico Durbin-Watson = 0.684718 (P=0.0000)

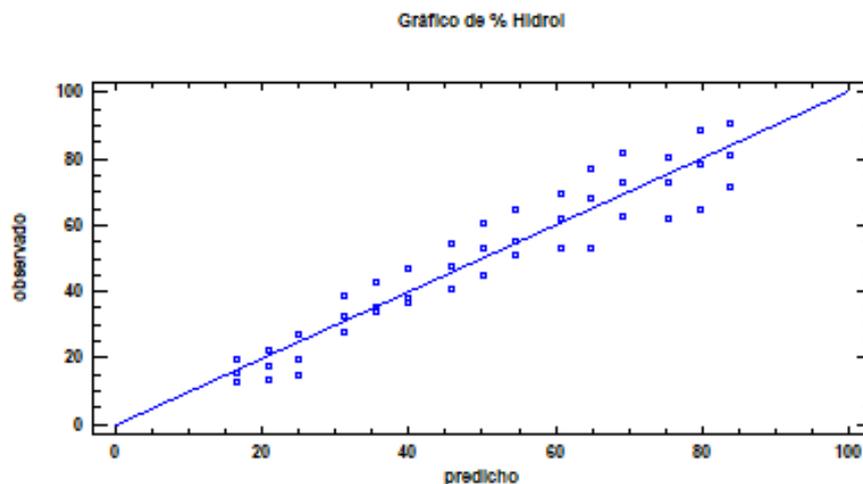
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.61946

### El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo de regresión lineal múltiple para describir la relación entre % **rendimiento total de hidrólisis** y dos variables independientes. La ecuación del modelo ajustado es la siguiente:

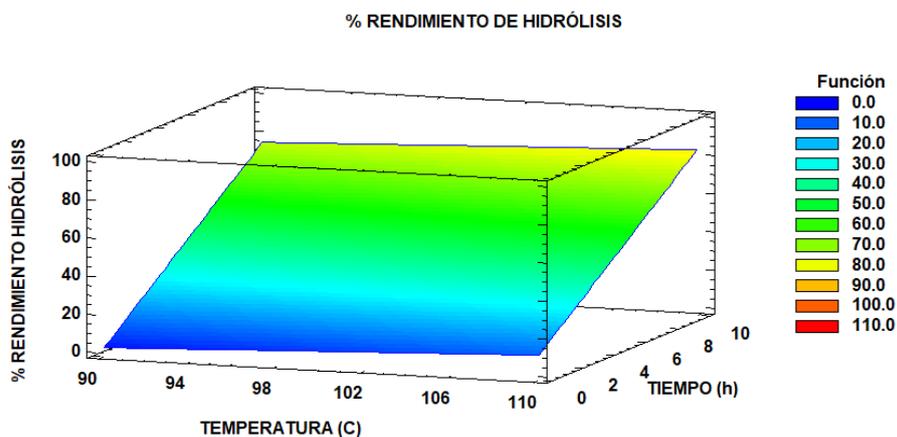
$$\% \text{ Hidrol} = -36.598 + 0.426719 * \text{Temperatura } (^\circ\text{C}) + 7.35321 * \text{Tiempo (h)}$$

A continuación, se muestra el gráfico de correlación múltiple del rendimiento total del proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul.



**Gráfico de correlación múltiple del % de rendimiento del proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul.**

Las siguientes figuras muestran la superficie de respuesta y de contorno del rendimiento del proceso de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul.



**Gráfico de superficie de respuesta del rendimiento de hidrólisis de los polisacáridos presentes en el jugo de cabuya azul.**

## 7. Tratamiento estadístico del proceso de fermentación alcohólica de la segunda etapa, para concentración de sustrato de 90 g/L

El tratamiento estadístico del proceso de fermentación alcohólica de la segunda etapa, se realizó mediante el software Minitab (licenciado – UNMSM)

### Análisis de regresión: etanol(g/L) vs. biomasa(g/L); sustrato(g/L)

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Regresión	2	3915.18	1957.59	141568.71	0.000
BIOMASA(g/L)	1	0.32	0.32	23.04	0.001
SUSTRATO(g/L)	1	2.93	2.93	211.55	0.000
Error	11	0.15	0.01		
Total	13	3915.33			

#### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.117592	100.00%	100.00%	99.98%

#### Coeficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	66.18	4.85	13.63	0.000	
BIOMASA(g/L)	-1.910	0.398	-4.80	0.001	2981.15
SUSTRATO(g/L)	-0.7050	0.0485	-14.54	0.000	2981.15

#### Ecuación de regresión

$$\text{ETANOL(g/L)} = 66.18 - 1.910 \text{ BIOMASA(g/L)} - 0.7050 \text{ SUSTRATO(g/L)}$$

Gráfica de superficie de ETANOL(g/L) vs. SUSTRATO(g/L); BIOMASA(g/L)

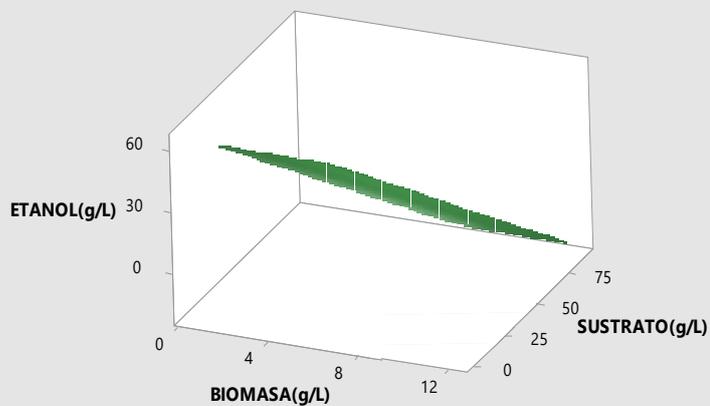


Gráfico de superficie de respuesta del rendimiento de etanol del proceso de fermentación alcohólica de la segunda etapa.

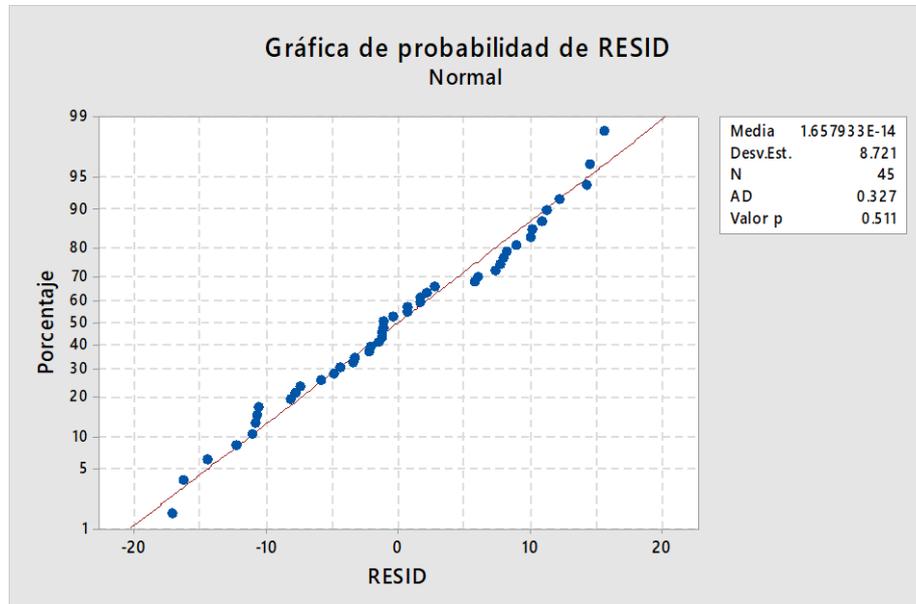


Gráfico de probabilidades de residuales de la fermentación alcohólica para concentración de AR de 90 g/L

## 8. Tratamiento estadístico de producción de CO<sub>2</sub> durante la fermentación alcohólica, para concentración de sustrato de 90 g/L

Análisis de regresión de producción de CO<sub>2</sub>(ppm) vs. biomasa(g/L); sustrato(g/L)

### Análisis de varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Regresión	2	1528161	764081	96.73	0.000
BIOMASA(g/L)	1	160462	160462	20.31	0.001
SUSTRATO(g/L)	1	178024	178024	22.54	0.001
Error	11	86893	7899		
Total	13	1615055			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
88.8786	94.62%	93.64%	84.99%

### Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	17689	3669	4.82	0.001	
BIOMASA(g/L)	-1355	301	-4.51	0.001	2981.15
SUSTRATO(g/L)	-173.9	36.6	-4.75	0.001	2981.15

### Ecuación de regresión

$$\text{Co}_2(\text{ppm}) = 17689 - 1355 \text{ BIOMASA}(\text{g/L}) - 173.9 \text{ SUSTRATO}(\text{g/L})$$

Gráfica de superficie de Co2(ppm) vs. SUSTRATO(g/L); BIOMASA(g/L)

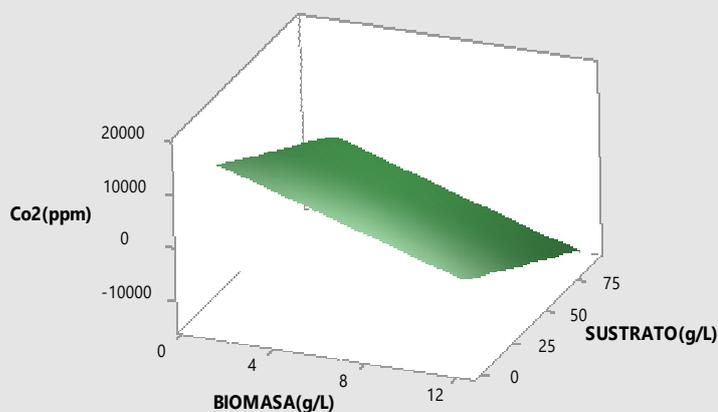


Gráfico de superficie de respuesta de producción de CO<sub>2</sub> en el proceso de fermentación alcohólica de la segunda etapa.

## 9. Tratamiento estadístico de producción de CO<sub>2</sub> acumulado en la fermentación alcohólica, para concentración de sustrato de 90 g/L

Análisis de regresión de producción de CO<sub>2</sub>acum vs. biomasa(g/L); sustrato(g/L)

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Regresión	2	161360873	80680436	12.15	0.002
Biomasa(g/L)	1	1991017	1991017	0.30	0.595
Sustrato(g/L)	1	2696196	2696196	0.41	0.537
Error	11	73052480	6641135		
Total	13	234413353			

### Resumen del modelo

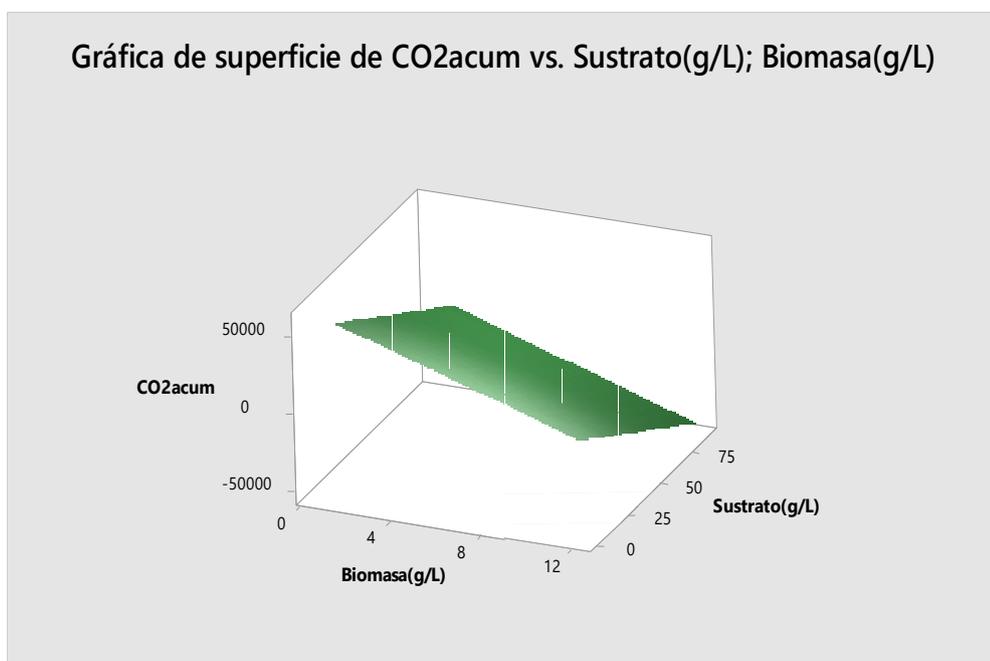
S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
2577.04	68.84%	63.17%	50.65%

## Coeficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	66445	106387	0.62	0.545	
Biomasa(g/L)	-4774	8719	-0.55	0.595	2981.15
Sustrato(g/L)	-677	1062	-0.64	0.537	2981.15

## Ecuación de regresión

$$\text{CO2acum} = 66445 - 4774 \text{ Biomasa(g/L)} - 677 \text{ Sustrato(g/L)}$$



**Gráfico de superficie de respuesta de producción de CO<sub>2</sub> acumulado en el proceso de fermentación alcohólica de la segunda etapa.**

## ANEXO 2



**Figura 1: Plantas de cabuya azul de diferentes zonas del Perú: (1a) plantas de cabuya azul en las zonas rurales de la provincia de Ambo, departamento de Huánuco; (1b) plantas de cabuya azul de las zonas rurales del distrito de La Merced, provincia de Churcampa, departamento de Huancavelica.**





(7c)

**Figura 7: Proceso de elaboración artesanal de chancaca del jugo de cabuya azul: (7a) Ollas utilizadas en el proceso de elaboración, (7b) Jugo concentrado y (7c) Producto obtenido.**

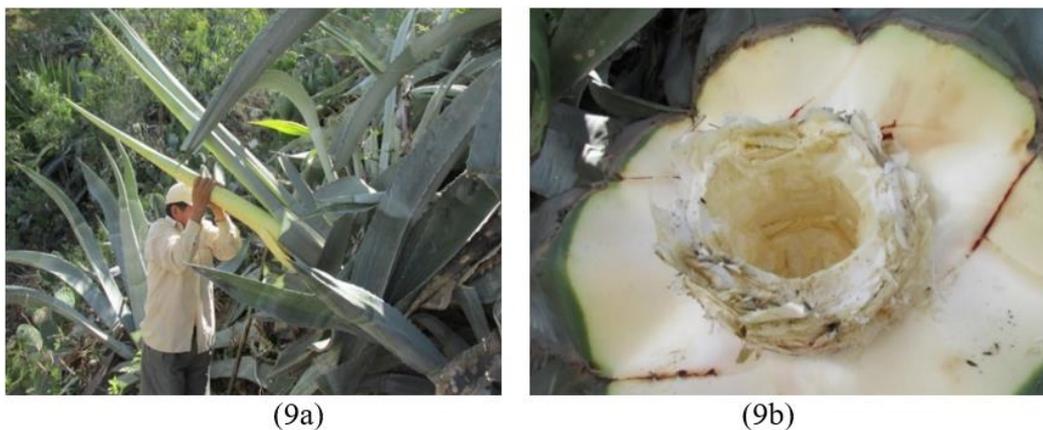


(8a)



(8b)

**Figura 8: Plantas de cabuya azul, (8a) Plantas de cabuyas maduras, (8b) Plantas de cabuyas sin madurar.**



**Figura 9: (9a) Corte de las hojas de la planta de cabuya azul para acceder al tronco, (9b) Hoyo practicado en la parte superior del tronco para la acumulación del jugo.**



**Figura 10: (10a) Espectrofotómetro Thermo Modelo GENESYS™ 10S UV/Vis, (10b) Muestras con el reactivo DNS, para la determinación de azúcares en el espectrofotómetro.**



(11a)



(11b)

**Figura 11: (11a) Autoclave utilizada en la hidrólisis del jugo de cabuya azul, (11b) Muestras para hidrolizar.**



**Figura 12: Determinación de la densidad del jugo de cabuya con densímetro de medida triple (densidad, % de azúcar y temperatura).**



(14a)



(14b)

**Figura 14: (14a) Adición de DNS a las muestras del proceso de hidrólisis, (14b) Soluciones hidrolizadas, tratadas con DNS, para los análisis de azúcares reductores en el espectrofotómetro UV/Vis.**



(17a)



(17b)



(17c)



(17d)

**Figura 17: (17a) Biorreactor de 120 L, (17b) Control automático de temperatura, (17c) Toma de muestra para los diferentes controles del proceso de fermentación alcohólica, y (17d) 20 L de jugo de cabuya azul, utilizado en el proceso de fermentación alcohólica.**



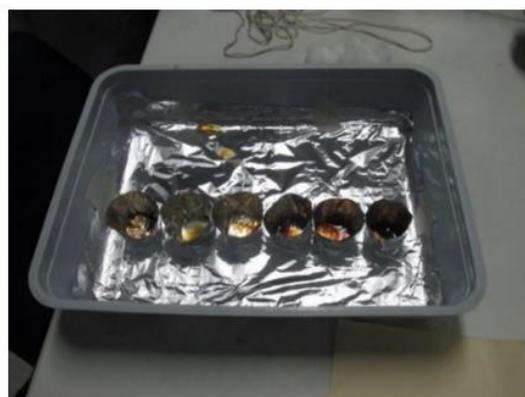
(18a)



(18b)



(18c)

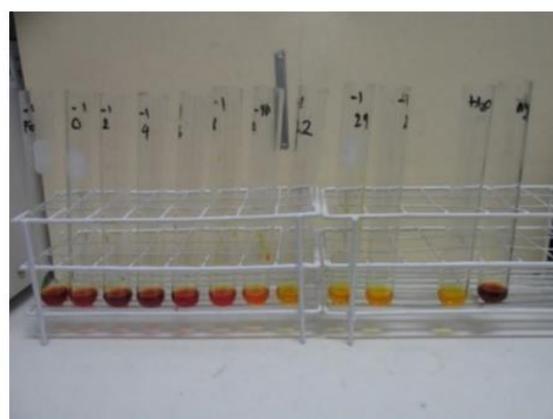


(18d)

**Figura 18: Medición de biomasa: (18a) Centrifuga utilizada para separar la biomasa, (18b) Biomasa centrifugada, (18c) Estufa con controles de tiempo y temperatura, y (18d) Biomasa deshidratada.**



(19a)



(19b)

**Figura 19: (19a) Tratamiento del líquido sobrenadante con DNS, (19b) Solución tratada con DNS para la medición de azúcares reductores en el espectrofotómetro UV.**



(22a)



(22b)

**Figura 22:** (22a) Nutriente fosfato diamónico (DAP), (22b) Levadura *S. cerevisiae* – D 47, LALVIN - Canadá.



(23a)



(23b)

**Figura 23:** (23a) Preparación del jugo de cabuya para el cultivo del inóculo, (23b) Obtención del inóculo de levadura *S. cerevisiae*.



**Figura 24:** Biorreactor utilizado en las pruebas experimentales del proceso de fermentación alcohólica.



**Figura 25:** Inoculación del jugo con levaduras *S. cerevisiae* para iniciar el proceso de fermentación alcohólica.



(84a)



(84b)

**Figura 84: (84a) Destilador de vidrio de torre rellena, (84b) relleno de vidrio.**



(88a)



(88b)

**Figura 88: Variedades de agave: (88a) *A. americana* L. (cabuya azul, provincia de Churcampa, departamento de Huancavelica), (88b) *A. angustifolia* Haw. (cabuya verde, provincia y departamento de Huánuco).**

## ANEXO 3

### **1. Reporte de los ensayos fisicoquímicos del licor del mosto de cabuya Azul, destilado en un destilador de vidrio de torre rellena**

Análisis realizado por La Molina Calidad Total Laboratorios – Instituto de Certificación, Inspección y Ensayos - Universidad Nacional Agraria La Molina.



## LA MOLINA CALIDAD TOTAL LABORATORIOS UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Instituto de Certificación, Inspección y Ensayos



### INFORME DE ENSAYOS

N° 007370 - 2019

**SOLICITANTE** : ROBERTO ROBLES CALDERÓN  
**DIRECCIÓN LEGAL** : CALLE LA ESPERANZA N° 721- LIMA- LIMA - LIMA  
 : RUC: 06078749 Teléfono: ---  
**PRODUCTO** : LICOR DE CABUYA AZUL  
**NÚMERO DE MUESTRAS** : Uno  
**IDENTIFICACIÓN/MTRA.** : S.I.  
**CANTIDAD RECIBIDA** : 03 botellas de 1250 ml de muestra proporcionada por el solicitante.  
**MARCA(S)** : S.M.  
**FORMA DE PRESENTACIÓN** : Envasado, la muestra ingresa en botella de vidrio sellada  
**SOLICITUD DE SERVICIO** : S/S N°EN-004810 -2019  
**REFERENCIA** : PERSONAL  
**FECHA DE RECEPCIÓN** : 11/09/2019  
**ENSAYOS SOLICITADOS** : FÍSICO/QUÍMICO  
**PERÍODO DE CUSTODIA** : No aplica

#### RESULTADOS :

##### ENSAYOS FÍSICOS/QUÍMICOS :

ALCANCE : N.A.

ENSAYOS	RESULTADO
1.- Acetato de Etilo (mg / 100 mL alcohol anhidro)	41,3
2.- Acidez Volátil (mg / 100 mL alcohol anhidro) (Expresado como ácido acético)	5,7
3.- Alcohol Metílico o Metano(mg / 100 mL alcohol anhidro)	74,1
4.- Alcoholes Superiores Totales(mg / 100 mL alcohol anhidro)	292,4
5.- Aldehído Acético o Acetaldehído(mg / 100 mL alcohol anhidro)	56,6
6.- Ésteres (Como Acetato de Etilo)	41,8
7.- Extracto(g / L de muestra original)	0,8
8.- Furfural(mg / 100 mL alcohol anhidro)	0,8
9.- Acetato de Iso Amilo (*) (mg / 100 mL alcohol anhidro)	No detectable
10.- Formiato de Etilo(mg / 100 mL alcohol anhidro)	0,6
11.- Iso Teramílico(mg / 100 mL alcohol anhidro)	216,0
12.- Butanol(mg / 100 mL alcohol anhidro)	3,0
13.- Iso Butanol (*) (mg / 100 mL alcohol anhidro)	No detectable
14.- Iso Propanol (*) (mg / 100 mL alcohol anhidro)	No detectable
15.- Propanol(mg / 100 mL alcohol anhidro)	73,4
16.- Grado Alcohólico(% v/v a 20 °C / 20 °C)	41,5

##### MÉTODOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO :

- 1.- NTP 211.035:2003
- 2.- NTP 211.035:2003
- 3.- NTP 211.035:2003
- 4.- NTP 211.035:2003
- 5.- NTP 211.035:2003

CONTINÚA INFORME DE ENSAYOS N° 007370 - 2019

Pág 1/2



Av. La Molina S/N (frente a la puerta principal de la Universidad Agraria) - La Molina - Lima - Perú  
 Telf.: (511) 3495640 - 3492507 Fax: (511) 3495794

E-mail: mktg@lamolina.edu.pe - Página Web: www.lamolina.edu.pe/calidadtotal - la molina calidad total



**LA MOLINA CALIDAD TOTAL LABORATORIOS  
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

*Instituto de Certificación, Inspección y Ensayos*



**INFORME DE ENSAYOS  
N° 007370 - 2019**

- 6.- NTP 211.035:2003
- 7.- AOAC 920.47 Cap. 26, Pág. 7, 20th Edition 2016
- 8.- NTP 211.035:2003
- 9.- NTP 211.035:2003
- 10.- NTP 211.035:2003
- 11.- NTP 211.035:2003
- 12.- NTP 211.035:2003
- 13.- NTP 211.035:2003
- 14.- NTP 211.035:2003
- 15.- NTP 211.035:2003
- 16.- AOAC 942.06 Cap. 26, Pág. 3, 20th Edition 2016

Observaciones: (\*) Límite de detección: Acetato de Iso Amilo: 0,0373(pAxS); Iso Butanol: 0,1115 (pAxS); Iso Propanol: 0,3734 (pAxS).

FECHA DE EJECUCION DE ENSAYOS: Del 11/09/2019 Al 20/09/2019.

**ADVERTENCIA :**

- 1.- El muestreo, las condiciones de muestreo, tratamiento y transporte de la muestra hasta su ingreso a La Molina Calidad Total - Laboratorios son de responsabilidad del Solicitante.
- 2.- Se prohíbe la reproducción parcial o total del presente Informe sin la autorización de La Molina Calidad Total - Laboratorios.
- 3.- Válido sólo para la cantidad recibida. No es un Certificado de Conformidad ni Certificado del Sistema de Calidad de quien lo produce.

La Molina, 20 de Setiembre de 2019



LA MOLINA CALIDAD TOTAL LABORATORIOS-UNALM

*Mary Flor Cesáre Coral*  
Ing. Mg. Q. Quím. Mary Flor Cesáre Coral  
DIRECTORA TÉCNICA  
C.Q.P. N° 635

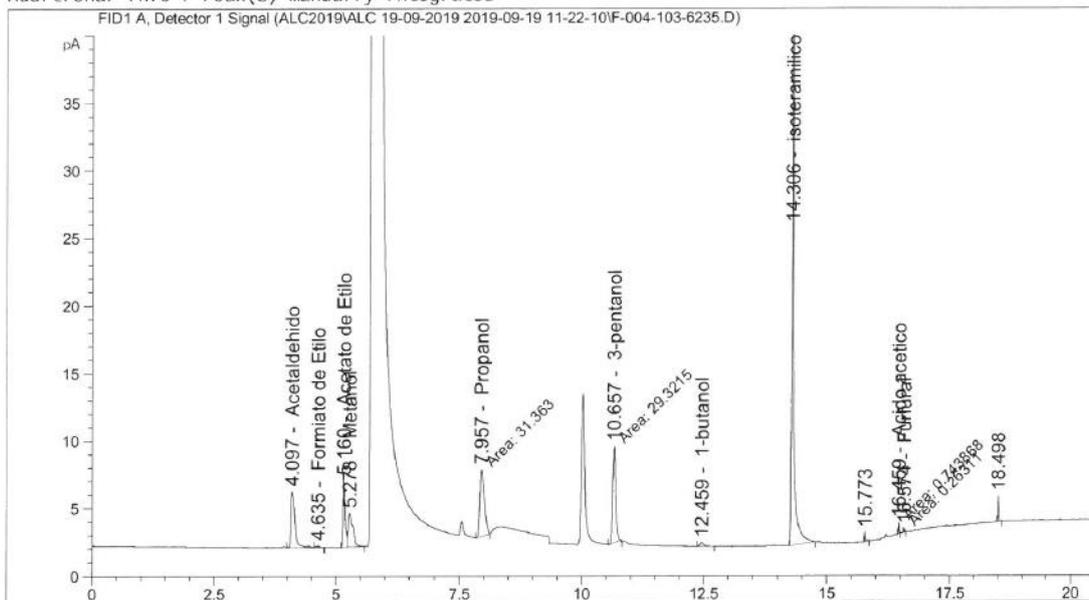
Pág 2/2

Sample Name: 6235

```

=====
Acq. Operator   : LMCTL-FQ-9                      Seq. Line :    4
Sample Operator : LMCTL-FQ-9
Acq. Instrument : INTUVO 9000 FQ1A                Location  : 103 (F)
Injection Date  : 19-Sep-19 12:42:55 PM           Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 1 µl
Acq. Method    : C:\Users\Public\Documents\ChemStation\1\Data\ALC2019\ALC 19-09-2019 2019-09-19 11-22-10\ALCLMCTL.M
Last changed   : 19-Sep-19 12:38:05 PM by LMCTL-FQ-9
Analysis Method: C:\Users\Public\Documents\ChemStation\1\Data\ALC2019\ALC 19-09-2019 2019-09-19 11-22-10\ALCLMCTL.M (Sequence Method)
Last changed   : 19-Sep-19 3:51:09 PM by LMCTL-FQ-9
                (modified after loading)
    
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Tuesday, December 4, 2018 7:54:06 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FID1 A, Detector 1 Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	4.097	BV R	0.0785	23.74057	9.97188	Acetal dehi do
2	4.635	VB E	0.0608	5.32037e-1	0.22347	Formiato de Etilo
3	5.160	BV	0.0427	14.29362	6.00382	Acetato de Etilo

Sample Name: 6235

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
4	5.278	VB	0.0922	16.68770	7.00942	Metanol
5	5.703		0.0000	0.00000	0.00000	Isopropanol
6	7.957	MM	0.1055	31.36300	13.17357	Propanol
7	10.099		0.0000	0.00000	0.00000	Isobutanol
8	10.657	MM	0.0686	29.32148	12.31605	3-pentanol
9	11.218		0.0000	0.00000	0.00000	Acetato de isoamilo
10	12.459	BB	0.0771	1.45441	0.61090	1-butanol
11	14.306	BB	0.0295	116.42706	48.90347	isoteramilico
12	15.773	BB	0.0201	9.39265e-1	0.39452	?
13	16.459	MM	0.0152	7.43868e-1	0.31245	Acido acetico
14	16.574	MM	0.0165	2.63110e-1	0.11052	Furfural
15	18.498	BB	0.0181	2.30913	0.96992	?

Totals : 238.07525

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====  
 \*\*\* End of Report \*\*\*