

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL CON DOS CEPAS
COMERCIALES Y DOS TIPOS DE MIELES DE CAÑA PROVENIENTES DE LA
REGIÓN DE GUALIVÁ, DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA

LAURA AGUILAR GIANNINI
DANIEL FELIPE AVILA FLOREZ

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ, D.C.
2017

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL CON DOS CEPAS
COMERCIALES Y DOS TIPOS DE MIELES DE CAÑA PROVENIENTES DE LA
REGIÓN DE GUALIVÁ, DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA

Proyecto integral de grado para optar por el título de:
INGENIERO QUÍMICO

Director
Néstor Javier Triana Ramírez
Ingeniero químico

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ, D.C.
2017

Nota de aceptación

Nubia Liliana Becerra

Diana Morales

Edgar Fernando Moreno

Bogotá, D.C. Julio, 2017

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. Jaime Posada Díaz

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. Luis Jaime Posada García-Peña

Secretario General

Dr. Juan Carlos Posada García-Peña

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dr. Ana Josefa Herrera Vargas

Decano General Facultad de Ingenierías

Ing. Julio Cesar Fuentes Arismendi

Director de Ingeniería Química

Ing. Leonardo de Jesús Herrera Gutiérrez

La responsabilidad de los conceptos emitidos en este escrito es exclusiva de los
autores.

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo de grado a nuestras familias, quienes nos han apoyado incondicionalmente en el transcurso de la carrera.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios, al SENA que sin su ayuda no hubiese sido posible realizar este proyecto, y a nuestras familias por todo el apoyo y ayuda incondicional a lo largo de nuestros estudios.

A nuestro director ingeniero Néstor Javier Triana Ramírez y asesor el ingeniero Edgar Fernando Moreno por su conocimiento, paciencia, compromiso y apoyo constante.

Y a todas las personas que de una u otra forma nos apoyaron en la realización de este trabajo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	17
JUSTIFICACIÓN	18
OBJETIVOS	19
1. MARCO TEORICO	20
1.1 CAÑA DE AZÚCAR	20
1.1.1 Generalidades	20
1.1.2 Mielles de caña	21
1.1.3 Mielles invertidas	22
1.2 ETANOL	23
1.2.1 Generalidades	23
1.2.2 Producción de etanol vía fermentativa	24
1.2.2.1 Microorganismos productores de etanol	24
1.2.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
1.2.2.3 Requerimientos nutricionales	26
1.2.2.4 Requerimientos físico-químicos	27
2. CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE LAS MIELES	29
2.1 PH	29
2.2 °BRIX	30
2.3 CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	30
2.4 DENSIDAD	34
2.5 PUREZA RELATIVA	34
2.6 ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE	35
2.6.1 Almacenamiento	35
2.6.2 Transporte	38
2.6.2.1 Viscosidad	38
2.7 COMPARACIÓN DE LAS MIELES	39
3. PRODUCCIÓN DE ETANOL Y RENDIMIENTO DE LA REACCIÓN	41
3.1 DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS	41
3.1.1 Tipo de microorganismo	41
3.1.2 Disponibilidad	41
3.1.3 Condiciones ambientales	42
3.1.4 ATCC® 9763™*	42
3.1.5 ATCC® 4098™*	43

3.2	PREPARACIÓN DEL INÓCULO	43
3.3	FERMENTACIÓN DE LAS MIELES	47
3.4	ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA Y RENDIMIENTO DE LA REACCIÓN	49
3.4.1	Análisis de varianza ANOVA	49
3.4.2	Rendimiento de la reacción	51
4.	ESPECIFICACIONES DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL	56
4.1	COSTOS INTERCAMBIO DE CALOR	57
4.2	COSTOS Y SELECCIÓN DE COMBINACIÓN CEPA-MIEL	63
5.	CONCLUSIONES	66
6.	RECOMENDACIONES	67
	BIBLIOGRAFÍA	68
	ANEXOS	72

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Promedio de la composición química (%) de los tallos y los jugos de la caña de azúcar	20
Cuadro 2. Composición promedio de las mieles de caña	22
Cuadro 3. Composición típica de mieles invertidas	23
Cuadro 4. Principales microorganismos productores de etanol con aplicación o potencial industrial	24
Cuadro 5. Muestra de plantilla para solver	62

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Volúmenes obtenidos para las titulaciones	33
Tabla 2. Porcentaje cristalizado mieles de caña no invertidas al cabo de 6 meses	38
Tabla 3. Viscosidades de las mieles a 25°C	38
Tabla 4. Viscosidad miel no invertida a 35°C	39
Tabla 5. Comparación de propiedades entre las mieles	39
Tabla 6. Resultados de la fermentación	49
Tabla 7. Resultados prueba inter-sujetos	49
Tabla 8. Análisis estadístico descriptivo	50
Tabla 9. Rendimiento de las fermentaciones	54
Tabla 10. Especificación de las corrientes del diagrama de producción de etanol por vía fermentativa empleando mieles de caña	56
Tabla 11. Especificación de las corrientes del diagrama de producción de etanol por vía fermentativa empleando mieles de caña invertidas	57
Tabla 12. Etanol estimado en 30L	59
Tabla 13. Flujo de calor en el fermentador por hora	60
Tabla 14. Costo de acueducto y T1 máxima para operación	63
Tabla 15. Ganancia por venta de etanol por unidad de Inóculo inicial, para cada combinación cepa-miel	63

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Proceso de producción de mieles en un ingenio	21
Figura 2. Ruta Embden Meyerhoff Parnas para la producción de etanol	26
Figura 3. Mieles en dilución: No invertida (A) & Invertida (B)	31
Figura 4. Primera parte de la titulación: Mieles de caña (A) y Blanco de glucosa (B)	32
Figura 5. Final de la titulación, presencia de precipitado como oxido de cobre (I)	33
Figura 6. Mieles con alto grado de cristalización (A) y Mieles con bajo grado de cristalización (B)	36
Figura 7. Presencia de contaminación en las mieles de caña no invertidas	37
Figura 8. Cristales miel de caña no invertida	37
Figura 9. Presentación de las cepas ATCC 9763 (A) y ATCC 4098 (B)	44
Figura 10 Inóculo de las cepas ATCC 9763 (A) y ATCC 4098 (B)	45
<i>Figura 11. Comparación día 1 (A) y día 5 (B) cepa ATCC 9763</i>	46
Figura 12. Comparación día 1 (A) y día 5 (B) cepa ATCC 4098	46
Figura 13. Rota evaporador utilizado por el CGI	48
Figura 14. Cromatografo de gases utilizado por el CGI	48
Figura 15. Medidas marginales de Etanol % v/v	51
Figura 16. Diagrama de producción de etanol por vía fermentativa empleando mieles de caña	56
Figura 17. Diagrama de producción de etanol vía fermentativa empleando mieles de caña invertidas	57
Figura 18. Fermentador con serpentín	58

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Producción de etanol - ruta EMP	25
Ecuación 2. Reacción de óxido-reducción para la formación de Oxido de cobre (I)	32
Ecuación 3. Gramos de glucosa para titular 25mL del reactivo de Fehling	33
Ecuación 4. Concentración Miel de caña no invertida	33
Ecuación 5. Concentración Miel invertida de caña	34
Ecuación 6. Concentración miel de caña no invertida expresada en g azúcares reductores/g solución	34
Ecuación 7. Pureza relativa Miel de caña expresada en g azúcares reductores/g solidos solubles	34
Ecuación 8. Concentración miel invertida de caña expresada en g azúcares reductores/g solución	35
Ecuación 9. Pureza relativa Miel invertida de caña expresada en g azúcares reductores/g solidos solubles	35
Ecuación 10. Masa de miel usada	53
Ecuación 11. Volumen de etanol según GARZÓN	53
Ecuación 12. Porcentaje de etanol según relación GARZÓN v/v	53
Ecuación 13. Masa de azúcares reductores	53
Ecuación 14. Masa de etanol en 5L	53
Ecuación 15. Porcentaje etanol teórico v/v	53
Ecuación 16. Masa de azúcares totales	53
Ecuación 17. Formación de etanol con dextrosa	58
Ecuación 18. Entalpía de reacción	59
Ecuación 19. Entalpía de reacción expresada en kJ/g etanol	59
Ecuación 20. Flujo de calor en el fermentador	60
Ecuación 21. Flujo másico fermentador	61
Ecuación 22. Correlación para enfriadores	61
Ecuación 23. Costo de acueducto por fermentación	62
Ecuación 24. Costo total	64
Ecuación 25. Ingresos	64
Ecuación 26. Ganancia	64

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. CALCULO ECUACIONES 3 A 9	73
ANEXO B. INSTRUCCIONES DE USO KWIK-STICK	75
ANEXO C. CERTIFICADO CEPA ATCC 4098	76
ANEXO D. CERTIFICADO CEPA ATCC 9763	78
ANEXO E. FICHA CEPA ATCC 4098	80
ANEXO F. FICHA CEPA ATCC 9763	81
ANEXO G. INFORME DE CROMATOGRAFIAS	84
ANEXO H. CALCULOS ECUACIONES 10-16	87

GLOSARIO

AZÚCARES REDUCTORES: son aquellos que poseen su grupo carbonilo intacto, y que a través de este pueden reaccionar como reductores con otras moléculas.

CEPA: material biológico de características específicas que identifican un grupo de microorganismos.

ETANOL: líquido incoloro e inflamable con un punto de ebullición de 78 °C. Principal producto de las bebidas alcohólicas.

INÓCULO: suspensión celular donde se adapta la cepa al sustrato previo a la fermentación.

INVERSIÓN DE AZÚCARES: proceso mediante el cual la sacarosa se separa en dos monosacáridos (glucosa y fructosa) empleando la hidrólisis enzimática o hidrólisis ácida.

MEDIO DE CULTIVO: son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos.

METABOLITO: cualquier sustancia química involucrada en una ruta metabólica ya sea como sustrato, intermediario o producto, en algunos casos biomasa.

MIELES INVERTIDAS: producto que se obtiene al someter mieles a los procesos de inversión y concentración, logrando un mayor contenido de azúcares.

MIELES: mezcla altamente concentrada de azúcares, que se obtiene por evaporación al vacío.

RUTA METABÓLICA: serie de reacciones químicas que ocurren dentro de una célula catalizadas por enzimas, para formar un producto a partir de un sustrato consumiendo o produciendo energía.

RESUMEN

El etanol es una fuente de energía potencial y su producción a partir de biomasa renovable ha adquirido gran popularidad, alrededor del mundo se encuentran investigaciones para su producción mediante la utilización de sustratos regionales de bajo valor comercial, desechos orgánicos y residuos industriales.

Con esta iniciativa se realizó un proceso de fermentación, utilizando como sustratos dos tipos de mieles de caña, una miel de caña estándar y otra invertida, las cuales se caracterizaron de acuerdo a pH, °Brix, densidad, viscosidad y pureza relativa, fueron sometidas a un proceso de pasteurización previamente a la inoculación y fermentación. Se utilizaron dos cepas comerciales de *Saccharomyces cerevisiae*, ATCC® 4098™* y ATCC® 9763™*, aisladas del vino blanco y de una destilería, se realizó un inóculo de cada una durante cinco días en una habitación con control de temperatura, durante este tiempo se realizaron liberaciones de presión manuales cinco veces al día para evitar la inhibición de las cepas; la fermentación se realizó a una concentración de 15 °Brix y un pH de 4,5 y un 10% v/v del Inóculo durante tres días sin aireación; por último se determinó la producción de etanol usando la técnica de cromatografía de gases acoplada a masas.

Los resultados obtenidos permitieron la selección del tipo de miel y cepa de acuerdo a costos de producción y rendimientos alcanzados. Obteniendo así que la combinación de miel invertida y cepa ATCC® 4098™* presentaron los mayores rendimientos (86,52% y 84,65%) y una ganancia de 247.037,69 COP por unidad de Inóculo inicial.

Palabras clave: etanol, miel de caña, miel de caña invertida, *Saccharomyces cerevisiae*, inóculo, cromatografía de gases acoplada a masas, rendimientos.

INTRODUCCIÓN

El agotamiento de los combustibles fósiles en todo el mundo ha generado la necesidad de investigar combustibles alternativos, mediante el uso de recursos energéticos renovables, se puede encontrar la solución a estos problemas de una forma sostenible; en este contexto destacan los procesos fermentativos, donde el metabolito microbiano se utiliza para la transformación de materias primas simples en productos con alto valor agregado, entre las fuentes de energía potenciales se encuentra el bioetanol¹, cuya rentabilidad depende de la disponibilidad y costo de las materias primas utilizadas, el tipo de microorganismos empleados, la eficiencia del proceso de conversión biológica y la separación de los productos y subproductos².

La producción de etanol por fermentación es una industria bien establecida y compleja dado la gran cantidad de variables que intervienen, en la actualidad se utiliza una gran variedad de materias primas sin embargo maíz, trigo, centeno, sorgo y caña de azúcar son las principales fuentes de azúcar fermentable; los costos de producción siguen siendo elevados por lo tanto es necesario implementar la utilización de fuentes de carbono económicas para la producción de etanol a escala comercial³.

De esta manera este proyecto evalúa la producción de etanol vía fermentativa, empleando como fuente de carbono dos tipos de mieles de caña y dos cepas comerciales, teniendo en cuenta los costos implicados en su producción.

¹ AGARWAL, Avinash Kumar. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. En: PROGRESS IN ENERGY AND COMBUSTION SCIENCE. vol. 33, no. 3, p. 233-271

² BALAT, Mustafa; BALAT, Havva y ÖZ, Cahide. Progress in bioethanol processing. En: PROGRESS IN ENERGY AND COMBUSTION SCIENCE. vol. 34, no. 5, p. 551-573

³ TANAKA, Kenji; HILARY, Zakpaa D. y ISHIZAKI, Ayaaki. Investigation of the utility of pineapple juice and pineapple waste material as low-cost substrate for ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. En: JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING. vol. 87, no. 5, p. 642-646

JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con FedeBiocombustibles⁴ actualmente en Colombia se tiene una producción de alcohol carburante a nivel nacional de 1.970.000 L/día de los cuales 1.650.000 L/día se producen en un ingenio azucarero, según datos de ministerio de agricultura⁵, en el departamento de Cundinamarca se encuentra como mayor cultivo permanente la caña panelera con un 27,39%, teniendo la panela como producto base ; desde algunos años se ha iniciado un proceso de modernización técnica de la infraestructura y de los cultivos, y la incursión en la producción de otros productos derivados de la caña de azúcar o la panela para la diversificación del mercado. Debido a que el precio promedio de la panela al productor hasta septiembre del año 2016 según datos de FedePanela⁶ es de 1.969,33 COP/ kg mientras que el precio de alcohol es de 2.228 COP/ litro, acorde con la Resolución 40349 del 28 de Abril de 2017, entrando en vigencia desde el 1 de Mayo de 2017

Teniendo en cuenta esta nueva perspectiva, es necesario evaluar los recursos disponibles en la región de Gualivá relacionados con la producción de mieles de caña, disponibilidad comercial de enzimas y condiciones de infraestructura; con el fin de generar rutas de producción eficientes que impulsen la economía de la región, para lo cual es necesario evaluar los rendimientos que se obtienen en la producción de etanol mediante mieles de caña, su calidad y costos.

El presente trabajo plantea la posibilidad de evaluar el uso de las mieles provenientes de la región de Gualivá, evaluar los rendimientos de producción de etanol y los costos asociados a la fermentación; para una futura implementación en plantas de producción de etanol en la región.

⁴ Información general sector azucarero. [En línea]. Federación nacional de biocombustibles de Colombia. [Citado 3-Marzo-2017]. Disponible en internet: [http://www.fedebiocombustibles.com/v3/estadistica-mostrar_info-titulo Alcohol_Carburante_\(Etanol\).htm](http://www.fedebiocombustibles.com/v3/estadistica-mostrar_info-titulo_Alcohol_Carburante_(Etanol).htm)

⁵ Informe de rendición de cuentas 2016-2017 “el renacer del campo”. [En línea]. Ministerio de agricultura. [Citado 3-Marzo-2017]. Disponible en internet: <https://www.minagricultura.gov.co/Documentos%20Publicos/RENDICION%20DE%20CUENTAS%200-%20INFORME%202016-2017.pdf>

⁶ Histórico de precios, promedio nacional ponderado. [En línea]. Federación nacional de productores de panela. [Citado 3-Marzo-2017]. Disponible en internet: <http://www.fedepanela.org.co/images/precios/PP2SEP.pdf>

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de etanol a partir dos cepas comerciales y dos tipos de mieles de caña provenientes de la región de Gualivá, departamento de Cundinamarca.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Caracterizar las mieles de caña provenientes de la región de Gualivá.
2. Evaluar la producción de etanol y el rendimiento de la fermentación, según el tipo de miel y cepa.
3. Determinar los costos asociados a la fermentación.

1. MARCO TEORICO

1.1 CAÑA DE AZÚCAR

1.1.1 Generalidades. “La caña de azúcar es una gramínea tropical, que cuenta con un tallo leñoso, redondo y hueco donde se forma un tejido esponjoso y se acumula un jugo rico en sacarosa. Su altura puede superar los 2 metros, tiene hojas largas, lampiñas y flores purpúreas en panoja piramidal”⁷.

En el Cuadro 1 Cuadro 1 se presentan los rangos del contenido porcentual para los principales componentes de la caña de azúcar.

Cuadro 1. Promedio de la composición química (%) de los tallos y los jugos de la caña de azúcar

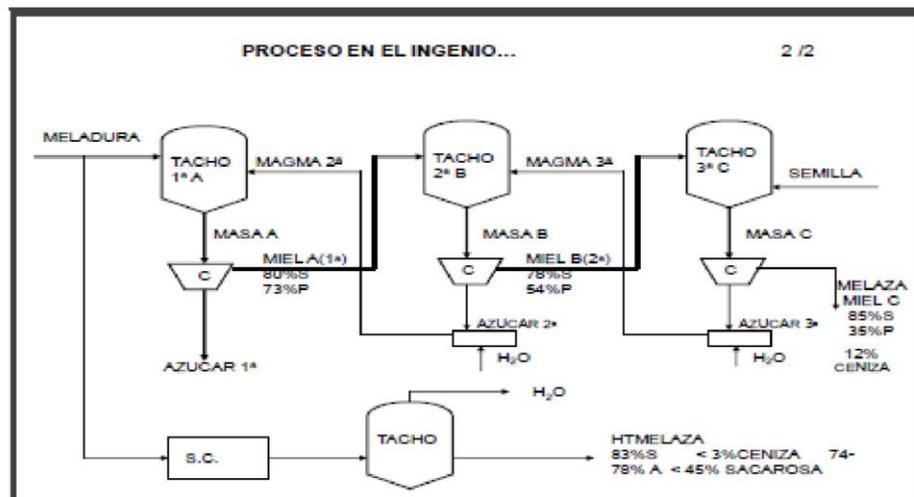
Constituyente químico en los tallos	%
Agua	73-76
Sólidos	24-27
• Sólidos solubles (°Brix)	10-16
• Fibra seca	11-16
En sólidos solubles del jugo	
Azúcares	75-92
• Sacarosa	70-88
• Glucosa	2-4
• Fructosa Sales	2-4
• Inorgánicas	3-3,4
• Orgánicas	1,5-4,5
Ácidos orgánicos	1-3
Otros no azúcares orgánicos	
• Proteína	0,5-0,6
• Almidones	0,001-0,050
• Gomas	0,3-0,6
• Grasas, ceras	0,15-0,5
• Compuestos fenólicos	0,1-0,80

Fuente 1. GUERRA, Alex y HERNÁNDEZ, Alejandra. EL CAMBIO CLIMÁTICO Y EL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR. En: EL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR EN GUATEMALA. p. 311, SA, 2014

⁷ CASAGRANDE, Aílto Antonio. Tópicos De Morfología e Fisiología Da Cana-DeAçúcar. Funep, 1991.

1.1.2 Mieles de caña. Se pueden obtener tanto del proceso de producción de azúcar como de panela. En la etapa de cristalización luego de la clarificación, se inicia la evaporación de agua para aumentar la concentración de azúcares en el jugo de caña, por el calentamiento a 96°C se obtiene una parte sólida (cristales de sacarosa) y una parte líquida (mieles), esta mezcla se somete a una centrifugación para separar los cristales de las mieles; como dichas mieles aún poseen una alto contenido de azúcares el proceso se repite, obteniendo como resultado mieles de grados B, C y D, las cuales cuentan con una menor cantidad de azúcares presentes que la anterior, respectivamente, reduciendo su valor como sustrato fermentable. En la Figura 1, podemos observar el proceso de producción de mieles en un ingenio⁸.

Figura 1. Proceso de producción de mieles en un ingenio



Fuente 2. GUERRA, Alex y HERNÁNDEZ, Alejandra. EL CAMBIO CLIMÁTICO Y EL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR. En: EL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR EN GUATEMALA. p. 388, SA, 2014

Estas mieles se emplean tanto como alimento animal como para la obtención de alcohol, la composición de estas es en extremo variable debido a que depende de factores industriales y agrícolas. En el Cuadro 2 se puede observar una composición aproximada de las mieles de caña.

⁸ CLARKE, Margaret A. y GODSHALL, Mary An. Chemistry and Processing of Sugarbeet and Sugarcane: Proceedings of the Symposium on the Chemistry and Processing of Sugarbeet, Denver, Colorado, April 6, 1987 and the Symposium on the Chemistry and Processing of Sugarcane, New Orleans, Louisiana, September 3-4, 1987. Elsevier, 2013.

Cuadro 2. Composición promedio de las mieles de caña

Ítem	Unidad	Valor	Ítem	Unidad	Valor
Agua	%	20,5	Calcio (Ca)		0,8
°Brix		79,5	Fósforo (P ₂ O ₃)		0,08
Sólidos totales		75,0	Sodio (Na)		2,4
Densidad (G l ⁻¹)		1,41	Cloruros (Cl ⁻)		1,4
Azúcares totales		46,0	Azufre (S)		0,5
Sacarosa		28,0	Si		0,2
Glucosa		9,3	Riboflavina		1,8
Proteína cruda		3,0	Cu	(mg/kg)	36
Nitrógeno (N ₂)		0,35	Hierro		249
ELN		63,0	Manganeso		35
Grasas		0,0	Zinc		13
Fibra bruta		0,0	Biotina		0,36
Cenizas		8,1	Colina		745
Gomas y coloides		8,9	Ácido pantoténico		21
Aminoácidos		0,95	Tiamina		0,9

Fuente 3. Xu, Y.; BARRINGER, S. y ALVAREZ, V. (2005). Cause and Prevention of Cane Molasses Gelling. *Journal of Food Chemistry and Toxicology*, 70(8), 461-464.

1.1.3 Miel invertida. Los azúcares contenidos en las mieles de caña, son en su mayor parte sacarosa para la cual la levadura produce una enzima (invertasa) que rompe la sacarosa en dos monosacáridos (glucosa y fructosa) ya que no la puede convertir directamente a etanol, por lo tanto, se somete a un proceso de inversión de azúcares para obtener una mayor cantidad de los azúcares glucosa y fructosa, los cuales por ser azúcares reductores no se cristaliza o solidifica. En el cuadro 3 observamos una composición aproximada de las mieles invertidas.

La inversión de las mieles de caña se puede realizar mediante dos métodos los cuales son:

- Fermentación: se mezclan 0,5 libras de levadura seca por 1000 galones de las mieles de caña a una concentración de 55°Brix, las levaduras producen la invertasa quien transforma la sacarosa en glucosa y fructosa; este proceso tarda de 6 a 9 horas, posteriormente se lleva a unos evaporadores a una temperatura de 60°C, como resultado se obtiene la miel invertida o HTM (High Test Molasses) de aproximadamente 85,3°Brix⁹.

⁹ Jaques, K. A., Lyons, T. P., and Kelsall, D. R. The Alcohol Textbook. Nottingham University Press: 2003, p. 77.

- Hidrólisis ácida: se agrega ácido sulfúrico a una concentración del 92% (v/v) en una proporción de 1 a 2 litros por 100 litros de las mieles a 55°Brix, seguida de un calentamiento en un rango de temperaturas entre 90 y 93°C hasta que la medida de polarización sea de cero, posteriormente se adiciona una cantidad de cal para restaurar el pH a 6, y luego se realiza una evaporación para obtener una concentración de 85°Brix¹⁰.

Cuadro 3. Composición típica de mieles invertidas

° Brix	85
Sacarosa, %	27
Azúcares reductores, %	50
Calcio, %	0,2
Cenizas, %	2,25
Agua, %	15,50

Fuente 4. CHEN, James CP y CHOU, Chung-Chi. *Cane Sugar Handbook: A Manual for Cane Sugar Manufacturers and their Chemists*. John Wiley and Sons, Inc., 1993

1.2 ETANOL

1.2.1 Generalidades. El etanol o alcohol etílico es un hidrocarburo natural, de fórmula general C_2H_5OH . Industrialmente se produce mediante el proceso de fermentación de la glucosa, carbohidrato monomérico presente en la sacarosa y en otros compuestos poliméricos como el almidón y la celulosa.

El proceso industrial de la producción de etanol consiste en tres etapas:

- Reacciones bioquímicas: producto del metabolismo de los microorganismos utilizados, que transforman los azúcares fermentables en alcohol etílico como metabolito principal y otros subproductos que dependen de la pureza de la materia prima utilizada y de las condiciones ambientales¹¹.
- Separación del producto deseado: separación del etanol del resto de los compuestos presentes en el mosto fermentado y concentración del mismo para reducir el volumen facilitando su manejo posterior. El método más utilizado es la destilación pero se puede realizar también por extracción, adsorción, etcétera¹².

¹⁰ *Ibíd.*, p. 78.

¹¹ Espinosa, R. 1984. *The alcoholic Fermentation of molasses- practical aspects*. Doctoral dissertation, Century University, New Mexico, p.32.

¹² *Ibíd.*, p. 33. ⁷ *Ibíd.*, p. 36.

- Tratamiento, disposición y aprovechamiento de los subproductos separados: para el mejor aprovechamiento de recursos y la protección al medio ambiente⁷.

1.2.2 Producción de etanol vía fermentativa. La producción de etanol por la acción de levaduras sobre malta o extractos de fruta ha sido llevada a cabo a gran escala por muchos años y fue el primer proceso industrial para la producción de un metabolito microbiano. Por esta vía se obtiene la mayor cantidad de etanol a nivel mundial. “El 95% del etanol en el mundo se obtiene por fermentación a partir de materias primas que contengan carbohidratos”.

1.2.2.1 Microorganismos productores de etanol. Los microorganismos más utilizados son las levaduras, siendo diversas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* las de mayor aplicación, así como algunas bacterias, entre ellas *Zymomonas mobilis*. El Cuadro 4 resume algunos de los microorganismos utilizados y/o investigados para la producción de etanol a partir de diversos sustratos y sus respectivas condiciones de fermentación.

Estos microorganismos tienen condiciones de crecimiento y requerimientos nutricionales diferentes, por lo que en la selección del microorganismo se debe tener en cuenta el medio de cultivo que se va a utilizar y las condiciones a las cuales es necesario mantener dicho medio de cultivo para la producción de etanol como producto principal y para la supervivencia de los microorganismos¹³.

Cuadro 4. Principales microorganismos productores de etanol con aplicación o potencial industrial

Microorganismo	Sustratos fermentables	Condiciones de Fermentación
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucosa Fructosa Sacarosa Maltosa Maltotriosa Galactosa Manosa	Anaeróbico 30-37°C
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Glucosa Fructosa Maltosa Sacarosa	Anaeróbico 30-35°C

¹³ STEELE,D. Bernie y STOWERS,Mark D. Techniques for selection of industrially important microorganisms. En: ANNUAL REVIEWS IN MICROBIOLOGY. vol. 45, no. 1, p. 89-106

Cuadro 4. (continuación)		
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Glucosa	Anaeróbico 40-45°C
<i>Candida shehatae</i>	Glucosa Xilosa	Microaerofílico 20-31°C
<i>Pichia stipitis</i>	Glucosa Xilosa	Microaerofílico 26-35°C
<i>Pachisolen tannophilus</i>	Glucosa Xilosa Glicerol	Microaerofílico
<i>Zymomonas mobilis</i>	Glucosa Fructosa Sacarosa	Anaeróbico 30°C
<i>Clostridium thermocellum</i>	Glucosa Celulosa	Anaeróbico 55-65°C
<i>Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum</i>	Glucosa xilosa	Anaeróbico 60°C

Fuente 5. MARISCAL MORENO, Juan Pablo. En: EVALUACIÓN y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL a NIVEL INDUSTRIAL= EVALUATION AND SELECTION OF MICROORGANISMS FOR ETHANOL PRODUCTION AT INDUSTRIAL LEVEL.

1.2.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*. Este microorganismo fue descrito por E. C. Hansen en 1838. "Pertenece al *Phylum Ascomycota*, Clase *Saccharomycetes*, Orden *Saccharomycetales*, Familia *Saccharomycetaceae*"¹⁴.

La producción de etanol es llevada a cabo vía glucolítica, también conocida como la ruta de Embden Meyerhoff Parnas (EMP), en la cual la glucosa es transformada en etanol bajo condiciones anaeróbicas¹⁵. Un esquema de esta ruta es presentado en la Figura 2 y la Ecuación 1 expresa la producción de etanol a partir de glucosa por esta ruta.

Ecuación 1. Producción de etanol - ruta EMP

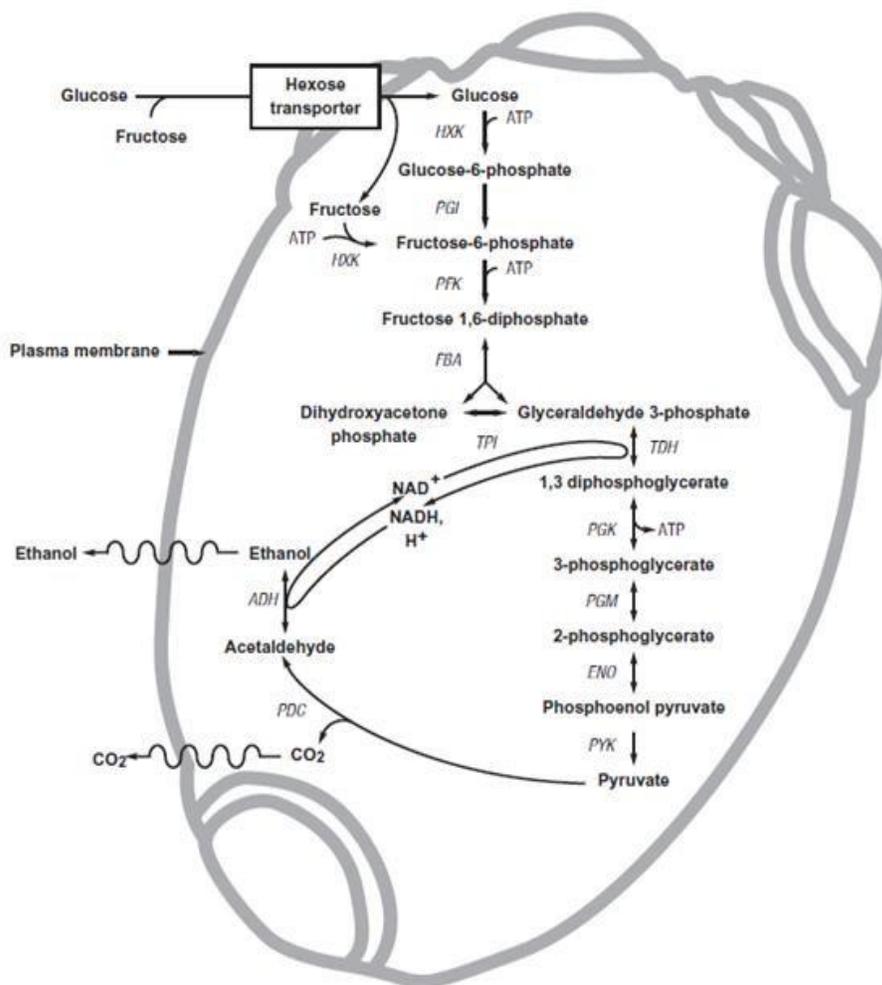


Fuente 6. AQUES, K. A., LYONS, T. P., y KELSALL, D. R. *The Alcohol Textbook*. Nottingham University Press: Nottingham, UK, 2003.

¹⁴ GRAVAN PEREZ, Cynthia. Diseño de una instalación destinada a los procesos de fermentación alcohólica y mamoláctica. Universidad de Cadiz, 2008

¹⁵ DRAPCHO, Caye M.; NHUAN, Nghiem Phu y WALKER, Terry H. *Biofuels Engineering Process Technology*. McGraw-Hill New York, NY, USA:, 2008

Figura 2. Ruta Embden Meyerhoff Parnas para la producción de etanol



Fuente 7. JAUQUES, K. A., LYONS, T. P., y KELSALL, D. R. *The Alcohol Textbook*. Nottingham University Press: Nottingham, UK, 2003.

1.2.2.3 Requerimientos nutricionales. *Saccharomyces cerevisiae* requiere ciertos nutrientes y condiciones ambientales para su apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son necesarios como por ejemplo carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo¹⁶.

- **Carbono:** Los compuestos carbonados son utilizados tanto como fuente de energía y como fuentes de carbono como glucosa, fructosa, manosa etcétera¹⁷.

¹⁶ OSPINA, A. y PALACIOS, M. Efecto del cultivo de levaduras sobre la carga orgánica de los efluentes de SUCROMILES SA

¹⁷ JONES, R. P. y GREENFIELD, P. F. A review of yeast ionic nutrition. I: growth and fermentation requirements. En: *PROCESS BIOCHEMISTRY*. vol. 19, no. 2, p. 49.

- **Nitrógeno:** Promueve el crecimiento por lo cual su presencia es de gran importancia en los medios de cultivo. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* puede utilizar el nitrógeno en forma de iones de amonio los cuales pueden ser aportados por sales como cloruro de amonio, nitrato de amonio, fosfato de amonio y sulfato de amonio. Otra fuente de nitrógeno son los aminoácidos, dipéptidos, tripéptidos y urea¹⁸.
- **Fósforo:** Es esencial para el crecimiento ya que regula la síntesis de lípidos y carbohidratos, mantiene la integridad de la pared celular. la levadura asimila el fósforo mediante iones ortofosfato, las fuentes de fósforo en el medio de cultivo son el dihidrógenofosfato o el hidrógenofosfato disódico en un concentración de 0.6 mM/g de células para una fermentación óptima¹⁹
- **Azufre:** La fuente de azufre más utilizada por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el sulfato de amonio, sulfito y el tiosulfato²⁰.
- **Elementos traza:** “K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn y Cl quienes se requieren a concentraciones de 0.1 a 1 mM”²¹.
- **Potasio:** A pH ácidos estimula la fermentación y la respiración, actúa como efector de varias enzimas como piruvato quinasa, aldolasa, aldehído deshidrogenasa y permeasa; e interviene en la estructura de los ARN, las fuentes de potasio son el cloruro potásico y los fosfato mono y dipotásico²².
- **Magnesio:** Es utilizado como activador de las enzimas glicolíticas, estimula la síntesis de ácidos grasos y regula las ATPasas; es aportado al medio de cultivo en forma de sulfato o cloruro de magnesio²³.

1.2.2.4 Requerimientos físico-químicos. Es una levadura utilizada industrialmente en la fabricación de bebidas alcohólicas, puesto que es de fácil acceso y se tienen buenos resultados con la misma bajo unas condiciones de crecimiento que resultan de fácil manejo y tolera altas concentraciones de etanol²⁴. Las variables que inciden sobre el proceso fermentativo con *Saccharomyces cerevisiae* son:

¹⁸ *Ibíd.*, p. 49.

¹⁹ *Ibíd.*, p. 50.

²⁰ *Ibíd.*, p. 50.

²¹ *Ibíd.*, p. 50.

²² *Ibíd.*, p. 51.

²³ *Ibíd.*, p. 52.

²⁴ NIELSEN, Jens. Fermentation monitoring, design and optimization. En: ENCYCLOPEDIA OF BIOPROCESS TECHNOLOGY., p. 244

- Concentración de azúcar: Este es el factor más importante pues incide directamente en la velocidad de fermentación y en la concentración alcohólica la cual influye en la actividad de la levadura. Una concentración de 10 a 18% es la más adecuada. Un aumento en la concentración, aumenta el tiempo de fermentación y una concentración muy baja no resulta económica²⁵.
- pH: La fermentación se efectúa satisfactoriamente cuando el pH del mosto se encuentra entre 4 y 5. Este pH es el óptimo para la multiplicación de la levadura y evita la contaminación del sustrato por bacterias y hongos filamentosos²⁶.
- Temperatura: La temperatura de crecimiento de la levadura, es en general 22 – 30°C para su óptimo y en un máximo comprendido entre 34 – 47°C²⁷.
- Tiempo de fermentación: La fermentación se lleva a cabo sobre las 50 horas o menos, dependiendo de la temperatura, concentración inicial y reducción de azúcares²⁸.
- Concentración de etanol: el etanol es tóxico en concentraciones de 8% (p/v) al 18% (p/v)²⁵.

²⁵ *Ibíd.*, p. 245.

²⁶ *Ibíd.*, p. 247.

²⁷ *Ibíd.*, p. 249.

²⁸ GRAVÁN. *Óp. cit.*, p.25 25

2. CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE LAS MIELES

Para la caracterización de las mieles se realizaron pruebas de pH, °Brix, densidad y concentración de azúcares reductores. Se cuentan con dos tipos de mieles, unas obtenidas directamente del proceso de la panela y otras que fueron posteriormente tratadas para invertir sus azúcares, la inversión asegura mayor cantidad de glucosa separada del disacárido sacarosa, el cual se encuentra en mayor proporción²⁹. Estos son importantes, tanto metodológicamente para el estudiante, como para el crecimiento adecuado del microorganismo, las cepas seleccionadas se tratan de cepas tipos *Saccharomyces* y por tanto tienen un rango de pH óptimo de 4 a 5 pH³⁰, los °Brix son una medición indirecta de los azúcares que contienen las mieles, por lo que son importantes si se consideran los requerimientos nutricionales de los microorganismos (Véase 1.2.2.3), pero también son importantes metodológicamente, puesto que las mieles al tener un valor de °Brix que puede ir desde 60 a 85 °Brix, fueron diluidas para poder trabajar con ellas; la concentración de azúcares reductores es importante porque da un estimado de los azúcares que los microorganismos pueden procesar más fácilmente en etanol, finalmente la densidad se utiliza para calcular la pureza relativa de las mieles junto con las demás características.

2.1 PH

Para la caracterización del pH de las mieles se utilizó un pH metro marca BANTE modelo 900P, con corrección de temperatura automática, el cual fue calibrado posteriormente con una solución buffer de pH 4, tanto las mieles invertidas como las no invertidas obtuvieron un pH considerablemente ácido, ya que se esperaba un pH entre 6,7 y 7,2³¹, propio del proceso de la producción de miel de caña, la miel invertida obtuvo 4,060 pH, mientras que la miel no invertida obtuvo un valor de 4.157 pH.

Se puede ver que ambos tipos de mieles presentan un pH óptimo para la realización de la fermentación, ya que al tratarse de cepas tipo *Saccharomyces*, tienen un valor

²⁹ QUESADA, Walter F. Determinación de parámetros óptimos para la producción y aromatización de miel hidrolizada, panela soluble y azúcar. *Universidad Tecnica del Norte. Ibarra Ecuador. 2007*

³⁰ NARENDRANATH, Neelakantam y POWER, Ronan. Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of Lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. *American Society for Microbiology – Applied and Environmental Microbiology. Mayo de 2005. p. 2239-2243*

³¹ MELGAR, Mario; MENESES, Adlai. EL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR EN GUATEMALA. 2014. Artemis Edinter S.A. p 336.

óptimo de pH entre 4 y 5³², por lo tanto no es necesario realizar un ajuste de pH mediante la adición de ácido cítrico. De esta forma se decidió llevar a los dos tipos de mieles a 15°Brix, esto es 150g/L siendo su composición mayoritariamente azúcares con 46% de los sólidos totales y teniendo en cuenta que el crecimiento de *Saccharomyces* se ve disminuido para algunas cepas luego de 100g/L³³, se tomó el valor de 15°Brix por estar por debajo de dicha concentración, facilidad de preparación y por qué valores más elevados no permitirían el crecimiento de la levadura al dificultar su movilidad.

2.2 °BRIX

Los °Brix se determinaron con un refractómetro de rango de 0-85°Brix marca Milwaukee, modelo MA871, los resultados obtenidos contrastan con los esperados, las mieles invertidas obtuvieron el grado más alto, con un valor de 75.5°Brix, los valores esperados para este tipo de mieles rondan los 80°Brix; el otro tipo de miel obtuvo un valor menor, siendo este de 66°Brix. La importancia de los °Brix viene dada junto con la concentración real de cada tipo de miel, puesto que la fuente de carbono para las cepas se trata de los azúcares presentes en estas mieles y su disponibilidad, *Saccharomyces Cerevisiae* no puede fermentar todo tipo de azúcares, La sacarosa no es un azúcar fermentable como si, primero se debe hidrolizar en glucosa/fructosa, que si son fermentables y reductores³⁴; esto supone un gran problema porque del 46% de los azúcares presentes en las mieles, 28% es sacarosa (Ver 1.1.2), razón por la cual la disponibilidad de azúcares en la miel invertida es mayor.

2.3 CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

La concentración de azúcares reductores se determinó por medio de una titulación con reactivo de Fehling, ya que los azúcares reductores reaccionan a este reactivo y los azúcares no reductores no lo hacen, el reactivo de Fehling permite la determinación de la concentración de azúcares reductores sin importar la concentración de otros azúcares no reductores como la sacarosa.

Se usó como blanco una solución de glucosa, las titulaciones se realizaron con una bureta de 50mL, un beaker de 250mL, una placa de calentamiento con agitador magnético y una solución de reactivo de Fehling preparada en el momento, siendo

³² NARENDRANATH. Op. cit.

³³ LOPEZ, Noe; ORLIC, Sandi. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces Cerevisiae*, *S. Kudriavzevii* and their specific hybrid. *International Journal of food microbiology*. 2009

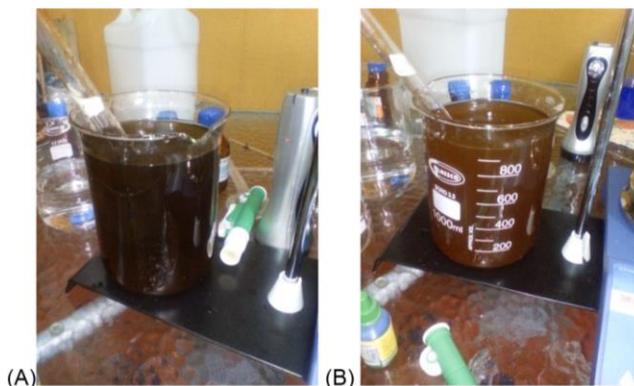
³⁴ MELGAR. Op Cit. p.390

esta de un litro en una proporción 1:1:3 entre reactivo de Fehling A, reactivo de Fehling B y agua destilada. Cada una de las titulaciones se realizó con tres réplicas³⁵.

La preparación de la solución de glucosa usada como blanco consto de 2,5g de glucosa anhidra en 500 mL de agua destilada; debido a que las mieles presentan una viscosidad elevada acorde a lo determinado experimentalmente en este proyecto (1600-18800cP), se realizó una dilución de la misma, siendo esta de 100mL de miel en 900mL de agua para ambas mieles.

En la Figura 3 se puede observar el resultado de la dilución de ambos tipos de mieles, junto con el color característico de cada una de ellas, ya que para ambos casos su tonalidad era café oscuro, se procedió con las titulaciones con cuidado, ya que afectaba notablemente el color de la solución a titular y no se disponían de referentes bibliográficos sobre cómo podía cambiar el color durante la titulación para soluciones con mieles de caña o soluciones no translucidas en general.

Figura 3. Miel en dilución: No invertida (A) & Invertida (B)



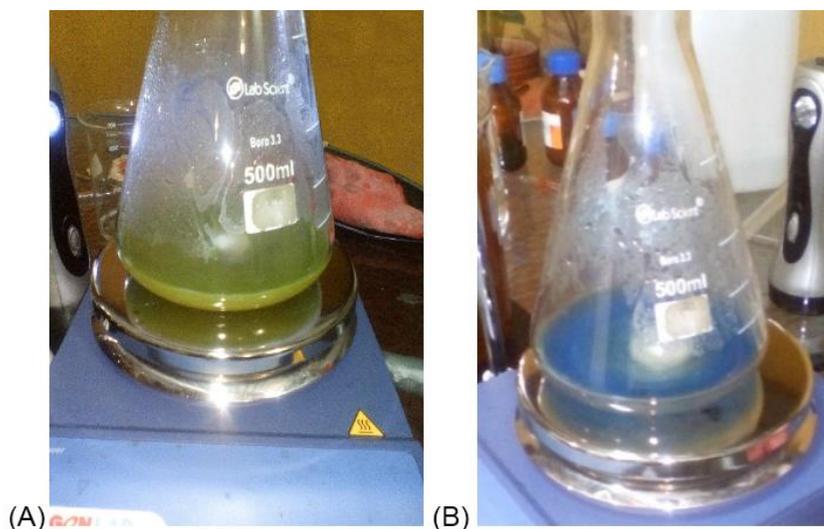
La titulación de cada una de las soluciones consistió en la adición por goteo de las soluciones a 25mL del reactivo de Fehling preparado con anterioridad, al tiempo que se mantenía una temperatura superior a 70°C (sin llevar a ebullición)³⁶ con la placa de calentamiento, que a su vez ayudo en la agitación del Erlenmeyer. Se dividió en varias etapas, en un primer momento al adicionar la solución comenzaba un cambio de color del azul característico del reactivo de Fehling a un azul grisáceo, esto para el blanco de glucosa, el cambio de color presente en la solución a titular debido a la tonalidad natural de las mieles fue un factor que se observó

³⁵ Determination of Glucose by Titration with Fehling's Reagent. [En línea]. Truman State University. [Citado 10-Enero-2017]. Disponible en internet: <http://blamp.sites.truman.edu/files/2016/01/Fehling-final.pdf>

³⁶ Ibid., p.2.

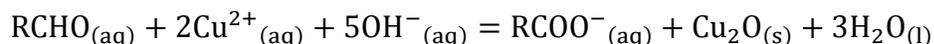
detenidamente para los cambios de color inherentes a la titulación, el primer cambio de color para el blanco de glucosa y las mieles de caña es diferente, para las mieles de caña el tono adquirido se inclinaba más a un tono verdoso, debido al mismo color de las mieles. En la Figura 4, se puede observar la diferencia en el cambio de color entre las soluciones de miel de caña y la solución del blanco de glucosa.

Figura 4. Primera parte de la titulación: Miel de caña (A) y Blanco de glucosa (B)



Una vez se presentaba el anterior cambio de color se añadían 2 gotas del indicador azul de metileno y se continuaba con la titulación hasta que el color desaparecía totalmente y se presentaba un precipitado de color rojo, debido a la reacción de óxido reducción de la titulación, en la cual se obtiene óxido de cobre (I), siendo este el precipitado que indica el final de la reacción.

Ecuación 2. Reacción de óxido-reducción para la formación de Óxido de cobre (I)



Fuente 8. Determination of Glucose by Titration with Fehling's Reagent. [En línea]. Truman State University. [Citado 10-Enero-2017]. Disponible en internet: <http://blamp.sites.truman.edu/files/2016/01/Fehling-final.pdf>

El precipitado de la reacción se puede observar en la Figura 5, dado que el precipitado era muy abundante para todas las soluciones no se observó ninguna diferencia respecto al color rojo entre las distintas soluciones, para el final de la titulación.

Figura 5. Final de la titulación, presencia de precipitado como óxido de cobre (I)



Las titulaciones se realizaron hasta 3 veces para cada solución, los resultados obtenidos se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Volúmenes obtenidos para las titulaciones

Blanco de Glucosa	Miel de Caña	Miel de Caña Invertida
5.7 ± 0.1 mL	15.7 ± 0.1 mL	0.9 ± 0.1 mL
5.7 ± 0.1 mL	15.6 ± 0.1 mL	0.9 ± 0.1 mL
5.6 ± 0.1 mL	15.6 ± 0.1 mL	0.9 ± 0.1 mL
	Promedio	
5.7 ± 0.1 mL	15.6 ± 0.1 mL	0.9 ± 0.1 mL

Con los datos obtenidos y las ecuaciones 3 a 5 se calculó la concentración de azúcares reductores para ambas mieles.

Ecuación 3. Gramos de glucosa para titular 25mL del reactivo de Fehling

$$\text{Factor de fehling} = \frac{\text{g glucosa}}{\text{mL solución}} * \text{mL titulación Blanco}$$

Ecuación 4. Concentración Miel de caña no invertida

$$[\text{Miel de caña}] = \frac{\text{Factor de fehling}}{\text{mL titulación miel de caña}} * \frac{1000\text{mL solución}}{100\text{mL Miel de caña}}$$

Ecuación 5. Concentración Miel invertida de caña

$$[\text{Miel invertida de caña}] = \frac{\text{Factor de fehling}}{\text{mL titulación miel invertida}} * \frac{1000\text{mL solución}}{100\text{mL Miel invertida}}$$

El resultado de la Ecuación 3 fue de 0.0285g de glucosa, este valor se sustituyó en las siguientes dos ecuaciones, junto con los valores obtenidos de la titulación para obtener de la Ecuación 4 una concentración de $\frac{0.01827 \text{ g azúcares reductores}}{\text{mL Miel de caña no invertida}}$ y de la Ecuación 5 una concentración de $\frac{0.31667 \text{ g azúcares reductores}}{\text{mL Miel invertida de caña}}$. Los cálculos de estas ecuaciones se pueden encontrar en el apartado de anexos (Ver Anexo A).

2.4 DENSIDAD

La densidad de las mieles se determinó por medio de un picnómetro, siendo la densidad de las mieles de caña de 1,343g/mL y la de las mieles invertidas de caña de 1,42g/mL.

2.5 PUREZA RELATIVA

Junto con la concentración, la densidad y los °Brix, se puede determinar la relación que hay entre °Brix y concentración de azúcares reductores, como los °Brix se expresan en g de sólidos disueltos/ g de solución, es necesaria la densidad para expresar la concentración en estas unidades. A través de la Ecuación 6 Ecuación 6 y Ecuación 7 se determina la pureza relativa de la miel de caña no invertida.

Ecuación 6. Concentración miel de caña no invertida expresada en g azúcares reductores/g solución

$$[\text{Miel de caña p/p}] = [\text{Miel de caña}] * \frac{1}{\rho_{\text{Miel de caña no invertida}}}$$

Ecuación 7. Pureza relativa Miel de caña expresada en g azúcares reductores/g sólidos solubles

$$\text{Pureza relativa Miel de caña} = \frac{[\text{Miel de caña p/p}]}{[\text{°Brix Miel de caña no invertida}]}$$

La concentración obtenida fue de 0.0136g azúcares reductores/g solución, equivalente a una pureza relativa de 0.02061g azúcares reductores/g sólidos solubles para las mieles de caña no invertidas.

Ecuación 8. Concentración miel invertida de caña expresada en g azúcares reductores/g solución

$$[\text{Miel invertida de caña p/p}] = [\text{Miel invertida de caña}] * \frac{1}{\rho_{\text{Miel invertida de caña}}}$$

Ecuación 9. Pureza relativa Miel invertida de caña expresada en g azúcares reductores/g sólidos solubles

$$\text{Pureza relativa Miel invertida de caña} = \frac{[\text{Miel de caña p/p}]}{[\text{°Brix Miel invertida de caña}]}$$

De manera análoga se utilizan la Ecuación 8 y Ecuación 9, para determinar la concentración de miel invertida de caña, siendo esta de 0.223g azúcares reductores/g solución, equivalente a 0.2954g azúcares reductores/g sólidos solubles. Los cálculos de las ecuaciones 6 a 9, se pueden encontrar en el apartado de anexos (Ver Anexo A).

2.6 ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

2.6.1 Almacenamiento. En términos de cómo deben ser almacenadas ambas mieles no difieren significativamente, según Ramírez³⁷, las mieles deben ser almacenadas en tanques con un amplio margen de seguridad estructural. Puesto es posible que los ácidos presentes en las mieles afecten la estructura de los tanques; deben tener una adecuada aireación para permitir el escape de los gases y no deben llenarse a más de dos tercios de su capacidad, esto por la necesidad de aireación, bajo la posibilidad de ventilar los tanques, el escape de gases y la formación de espumas.

La temperatura es un factor a tener en cuenta en el almacenamiento de las mieles, HONIG dice³⁸ que se puede esperar un decremento promedio de 1.2% de los azúcares totales para mieles almacenadas durante 6 meses a 30°C, pero se registran valores de hasta 2.5% y estos valores aumentan con la temperatura, por lo que debe ser controlada para evitar pérdidas.

El contenido de azúcares juega un papel importante en el almacenamiento puesto que las mieles contienen azúcares cristalizables como la sacarosa y azúcares no cristalizables como los azúcares reductores³⁹, la sacarosa puede iniciar un proceso de cristalización por semillamiento dentro del recipiente de almacenamiento, en condiciones normales este proceso se fuerza saturando las mieles con sacarosa durante la producción de panela, requiriendo altas temperaturas y presiones al

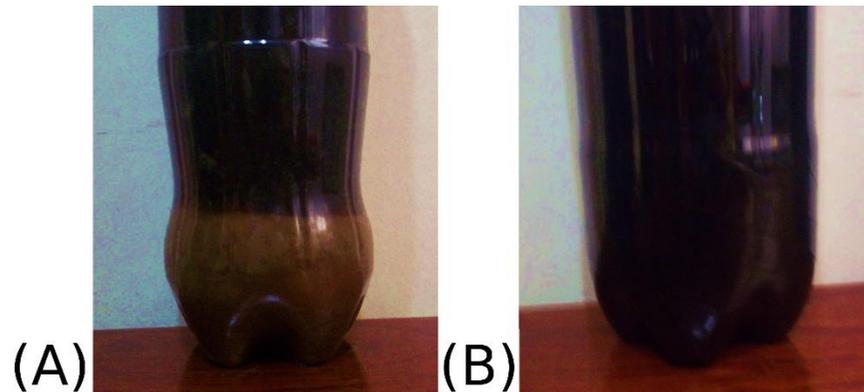
³⁷ RAMIREZ, Nidia L. Evaluación de los cambios fisicoquímicos en la composición de la melaza almacenada respecto al tiempo. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2000. p. 9-10

³⁸ HONIG, Pieter. Principles of Sugar Technology, Vol I. Elsevier, Amsterdam. 1953

³⁹ MELGAR, op. cit, p.389

vacío; sin embargo el proceso puede ocurrir de manera natural durante prolongados periodos de tiempo. Por tal motivo se realizaron pruebas con distintas muestras, estas muestras fueron almacenadas en cilindros de PET (Teraftalato de polietileno) de 2L, bajo las mismas condiciones, aisladas de luz, a una temperatura promedio de 23°C. Se utilizaron 6 muestras, la Figura 6 muestra la evolución de distintas muestras de miel luego de 6 meses.

Figura 6. Mieles con alto grado de cristalización (A) y Mieles con bajo grado de cristalización (B)



Se observaron resultados diversos para las distintas muestras de miel de caña no invertida, todas las muestras presentaron cristalización de sacarosa, sin embargo, se observa que se presenta distinto grado de cristalización para cada una de las muestras, las mieles invertidas de caña no presentaron indicios de cristalización alguna, adicionalmente las mieles de caña no invertidas presentaron contaminación externa, en 4 de las 6 muestras, como se ve en la Figura 7, por lo que para evitar la pérdida de azúcares en las mieles de caña no invertidas, estas deberán ser usadas lo antes posible; en caso de necesitar ser almacenarlas por largos periodos de tiempo se tendrá que realizar una pasteurización a las mieles para eliminar cualquier microorganismo presente así como también esterilizar los recipientes en los cuales se llevará a cabo el almacenamiento, para así evitar cualquier tipo de contaminación.

Figura 7. Presencia de contaminación en las mieles de caña no invertidas



Se calculó el grado de cristalización de cada muestra tomando el peso de la muestra y el peso de la parte cristalizada, en la Figura 8 se puede apreciar los cristales fuera del recipiente y el grado de cristalización para cada una de las muestras se resume en la Tabla 2, se puede observar un mínimo de 1.1% y un máximo de 6.4% del peso total de la muestra, se esperaba que hubiera cristalización por parte de las mieles de caña no invertidas puesto que tienen una concentración de sacarosa mayor a las mieles invertidas de caña, sin embargo, el máximo valor alcanzado, revela que estas mieles no son viables para almacenamiento durante periodos de tiempo prolongados.

Figura 8. Cristales miel de caña no invertida



Tabla 2. Porcentaje cristalizado mieles de caña no invertidas al cabo de 6 meses

Muestra	Peso completo (g)	Peso cristalizado (g)	%Cristalizado
1	2697,3	173,6	6,4%
2	2710,7	49,3	1,8%
3	2787,8	38,3	1,4%
4	2864,3	49,9	1,7%
5	2775	30	1,1%
6	2737,3	95,2	3,5%

El peso completo de las muestras varía debido a que se trata de muestras tomadas de distintos lotes del ingenio, en distintos días.

2.6.2 Transporte. En cuanto al transporte de las mieles se refiere, el factor más determinante de estas es la viscosidad, las mieles presentan por su naturaleza viscosidades altas, según OLBRICH, se esperan viscosidades entre 8000cP y 100cP, para 80°Brix⁴⁰ y 60°Brix⁴¹ a 25°C, dicha viscosidad se puede controlar con la temperatura, pero este método a la larga deshidrata las mieles, concentrándolas aún más, lo que puede generar la formación de cristales de sacarosa y cenizas, obstruyendo tuberías por lo que necesitarían una limpieza con mayor frecuencia.

2.6.2.1 Viscosidad. Se realizó un análisis de viscosidad para ambos tipos de mieles con la ayuda de un viscosímetro rotacional marca Fungilab modelo ALPHA SERIES ALPL101271, como se observa en la Tabla 3, este análisis se realizó a 25°C ya que sería la temperatura de operación aproximada.

Tabla 3. Viscosidades de las mieles a 25°C

Viscosidad							
Miel no invertida a 25°C				Miel invertida a 25°C			
Usillo	RPM	cP	%	Usillo	RPM	cP	%
L4	30	18640	93,3	L3	60	1619,1	80,9
L4	20	18800	62,7	L3	50	1628,4	68,9
L4	12	19076	38,2	L3	30	1643,6	41,1

⁴⁰ OLBRICH, H. The Molasses. Institut für Zuckerindustrie, Berlin. 1963. p.36

⁴¹ Ibid. p.38

Se observó que la viscosidad de las mieles no invertidas es mucho mayor que la viscosidad de las mieles invertidas, lo cual es una clara desventaja frente a las mieles invertidas, la viscosidad de las mieles no invertidas al rondar los 18800cP las hacen poco viables para manejar directamente en sistemas de tuberías, sería necesario calentarlas antes de que estas entren en el sistema, lo que supone un gasto energético, además de los problemas expuestos anteriormente. Dada la alta viscosidad de las mieles no invertidas se tomó la decisión de elevar su temperatura 10°C y observar la viscosidad con esta temperatura, como se puede ver en la Tabla 4, la viscosidad continua siendo mayor a la de las mieles no invertidas, pese al incremento de 10°C.

Tabla 4. Viscosidad miel no invertida a 35°C

Viscosidad miel no invertida a 35°C			
Usillo	RPM	cP	%
L3	20	3497,5	58,3
L3	12	3450,5	35,4
L3	10	3537,4	29,5

2.7 COMPARACIÓN DE LAS MIELES

Se tomaron todos los parámetros anteriormente estudiados y se realizó un cuadro comparativo para facilitar el análisis.

Tabla 5. Comparación de propiedades entre las mieles

Propiedad	Miel		Unidades	% de mejora
	No invertida	Invertida		
pH (4 réplicas)	4,157 ± 0.001	4,06 ± 0.001	pH	No aplica
°Brix (4 réplicas)	66 ± 0.1	75,5 ± 0.1	g solidos solubles/g totales *100	14,39%
Concentración de azúcares reductores (3 réplicas)	0,01827	0,31667	g azúcares reductores/mL	1633,28%
Densidad (4 réplicas)	1,343 ± 0.001	1,42 ± 0.001	g/mL	No aplica
Pureza relativa (3 réplicas)	0,02061	0,2954	g azúcares reductores/g solidos solubles	1333,28%

Tabla 5. (Continuación)

%Cristalización (6 réplicas)	1,1-6,4 %	0	g cristalizado/g totales	No aplica
Viscosidad (3 réplicas)	18800 (62.7%)	1643,6 (41.1%)	cP	91,26%

En resumen se observa que las mieles invertidas son claramente mejores en todas las propiedades críticas para el proceso, presenta una concentración mayor de azúcares reductores, siendo esta 16 veces mayor a la no invertida, lo que se traduce en una pureza relativa de azúcares reductores más alta, con un aumento de 13 veces respecto a la no invertida, propiedad que junto con los °Brix son los indicadores de compra más usados para comercializar mieles de caña, teniendo un incremento del 14.39% frente a las mieles no invertidas; fuera de los indicadores de compra, también se tiene que las mieles invertidas son mejores debido a que pueden almacenarse por largos periodos de tiempo, sin sufrir pérdidas de azúcares por cristalización y por consiguiente reducción de los rendimientos.

Finalmente se tiene que para el proceso es mucho más fácil utilizar las mieles invertidas debido a su baja viscosidad, siendo la viscosidad de las mieles invertidas un 91.26% menor a la de las mieles no invertidas; la única propiedad que no tiene ningún inconveniente para ambas mieles es el pH, debido a que ambas cuentan con un pH ácido óptimo para las cepas, y en caso de necesitar controlarlo a futuro, los insumos como el ácido cítrico ya se usan en el proceso para ambas mieles y no supondrían mayor gasto.

3. PRODUCCIÓN DE ETANOL Y RENDIMIENTO DE LA REACCIÓN

Para la producción de etanol se tuvo en cuenta el tipo de microorganismo con el cual se trabaja, puesto que es importante que este se ajuste a las condiciones del proceso en la planta; se realizaron las fermentaciones, así como las correspondientes cromatografías de gases acoplado a masa (GC/MS), para conocer el rendimiento de las reacciones y tener una idea de que parámetros son más importantes para las fermentaciones en cuanto a tipo de miel y cepa.

3.1 DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS

Es importante tener en cuenta para el tipo de microorganismo las condiciones de crecimiento y el sustrato que se utilizará; también es necesario no olvidar que para obtener cepas certificadas dichas cepas requieren ser importadas lo cual genera un tiempo de espera. Las cepas seleccionadas por el SENA se tratan de ATCC® 9763™ y ATCC® 4098™

3.1.1 Tipo de microorganismo. La fermentación alcohólica comienza con la glucólisis de una molécula de glucosa para dar dos moléculas de ácido pirúvico y dos moléculas de ATP, como se puede observar en la Ecuación 1 las dos moléculas de ácido pirúvico se convierten en dos moléculas de acetaldehído y dos moléculas de CO₂, las dos moléculas de acetaldehído se reducen mediante dos moléculas de NADH para formar dos moléculas de etanol; “llevado a cabo por varias levaduras y hongos (especies de *Saccharomyces*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*) y por ciertas bacterias (*Zymomonas*)”⁴².

Al emplear las mieles de caña como materia prima para la fermentación y posterior producción de etanol, el microorganismo que es más utilizado es *Saccharomyces cerevisiae*⁴³.

3.1.2 Disponibilidad. Actualmente se cuenta con la posibilidad de adquirir cepas certificadas a partir de unas colecciones internacionales como National Collection of type Cultures, Londres (CEPAS NCTC), American Type Culture Collection. Rockville, EU (ATCC) y World Data Centre for Microorganism (WDCM); para las cuales es necesario realizar la importación lo que tarda entre 30 y 45 días a excepción de las WDCM quienes se encuentran para entrega inmediata, al realizar una revisión bibliográfica el tipo de cepas certificadas más utilizadas, para la

⁴² TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R. y CHRISTINE, L. Case. Microbiology: An Introduction

⁴³ WILLEY, Joanne; SHERWOOD, Linda y WOOLVERTON, Chris. Prescott's Microbiology. McGraw - Hill Higher Education, 2013.

producción de etanol empleando como sustrato mieles de caña, son ATCC por lo cual se decide emplear dicha colección.

En cuanto a su costo está alrededor de \$ 215.000 y \$ 220.000 pesos lo que incluye 2 KWIK-Stik™ que contiene una única cepa del microorganismo elegido en un sedimento liofilizado, un depósito de fluido hidratante y un hisopo inoculado.

3.1.3 Condiciones ambientales. Debido a que la fermentación se llevará a cabo en la provincia de Gualivá, departamento de Cundinamarca, Colombia, donde se han presentado temperaturas desde 16 °C a 31 °C desde el mes de septiembre de 2016 a junio de 2017, según datos AccuWeather⁴⁴; se escogieron las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC® 4098™* y ATCC® 9763™* quienes cuentan con condiciones de crecimiento óptimo de 25 a 30 °C y 30°C respectivamente, encontradas en la ficha técnica de cada cepa en la página oficial de la American Type Culture Collection. Aunque también se presentan estudios en los cuales el crecimiento máximo de *Saccharomyces cerevisiae* se alcanza de 34 a 37 °C⁴⁵, lo que se considera temperaturas elevadas para las fermentaciones de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las cepas adquiridas son certificadas lo cual significa que es un cultivo puro que se ha sometido a pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares, las cuales son acreditadas para que se considere válida la fuente de procedencia; en los certificados (Ver Anexos 3 y 4) se encuentra tanto las características macroscópicas como las microscópicas, los resultados del sistema de identificación, donde se muestra la información de identificación, el organismo seleccionado y los detalles bioquímicos y los medios de hidratación, cultivo e incubación que se pueden utilizar en dichas cepas. Estas se almacenan entre 2 a 8 °C hasta su uso.

3.1.4 ATCC® 9763™* La cepa ATCC 9763 ha sido aislada de una destilería, esta cuenta con rendimientos reportados para melazas de caña de azúcar del 88,24% respecto a rendimientos teóricos según las guías de fermentación de la Universidad Nacional.⁴⁶

⁴⁴ Tiempo meteorológico Villeta, Colombia. [En línea]. [Citado 14-Junio-2017]. Disponible en internet: <http://www.accuweather.com/es/co/villeta/108238/month/108238?monyr=6/01/2017>

⁴⁵ LALUCE, Cecília, et al. Continuous ethanol production in a nonconventional five-stage system operating with yeast cell recycling at elevated temperatures. En: JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. vol. 29, no. 3, p. 140-144

⁴⁶ S. Garzon. C. Hernandez. Estudio comparativo de la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. Universidad tecnológica de Pereira. 2009

Además, tiene una temperatura de crecimiento que se adecua a las condiciones con las que se cuenta en la región de Gualivá, teniendo una temperatura óptima de crecimiento de 30°C y la región tiene un promedio de 24-30°C.

La cepa tarda entre 1 y 2 días en ser cultivada hasta obtener una concentración de biomasa de 21,3 g/L a una temperatura de 30°C⁴⁷ la cual es una concentración óptima para realizar la fermentación.

3.1.5 ATCC® 4098™*. La cepa ATCC 4098proveniente del vino blanco, esta cuenta con altos rendimientos reportados al emplearla de forma inmovilizada (hasta 75 mg/ml)⁴⁸

Esta cepa se selecciona, no únicamente por su rendimiento, sino también por tener características de cultivo muy similares a la cepa ATCC 9763, al tratarse también de una levadura del tipo *Saccharomyces*, se cuenta con una temperatura óptima de crecimiento de 30°C, y un tiempo de cultivo de entre 1 y 2 días, lo que facilita la replicación de las condiciones de crecimiento para ambas cepas.

Otro factor a tener en cuenta es el pH, el valor óptimo para cada cepa puede variar, sin embargo existen estudios comparativos para las levaduras del tipo *Saccharomyces* en donde se observa que este valor se encuentra alrededor de 4-5 pH⁴⁹, las mieles trabajadas, son de por sí de carácter ácido, pero debido a que estas también tienen como destino la fabricación de panela, su pH se restaura hasta aproximadamente 6, por lo que se deberá controlar el pH de estas.

3.2 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se lleva a cabo para aumentar la cantidad de microorganismos con el fin de realizar las posteriores fermentaciones. En primer lugar se sacaron las cepas de refrigeración y se dejaron reposar para que llegara a temperatura ambiente (20°C) durante mínimo 2 horas, de acuerdo con las fichas técnicas de cada cepa (Anexos 5 y 6), se realizó la esterilización de los recipientes sumergiéndolos en agua en su punto de ebullición durante 20 minutos, posteriormente se desinfectó el recipiente por medios químicos con alcohol industrial (92% de concentración), de acuerdo con

⁴⁷ FAJARDO CASTILLO,Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO,Sandra Constanza. En: evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*.

⁴⁸ Patente US 4350765 A, Method for producing ethanol with immobilized microorganism [En línea]. [Citado 20-Febrero-2017]. Disponible en internet: <https://www.google.com/patents/US4350765>

⁴⁹ Buzas, K. Dallmann, B. Szajani. Influence of pH on the Growth and Ethanol Production of Free and Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells. Department of Biochemistry, Jozsef Attila University, Hungría. 1988

lo indicado por Puentes⁵⁰ para la preparación de los inóculos con mieles de caña, se utilizó un medio de cultivo consistente de 5%p/v de miel de caña y fosfato de amonio, el cual se pasteurizó a 80°C durante 20 minutos.

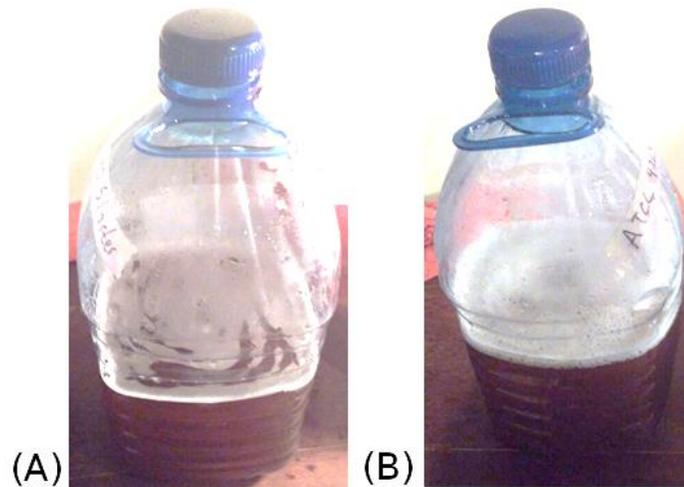
Figura 9. Presentación de las cepas ATCC 9763 (A) y ATCC 4098 (B)



Posteriormente se depositó un volumen de 4L del medio de cultivo anteriormente descrito en los recipientes estériles para luego abrir los KWIK-Stik™ que contienen las cepas y proceder la hidratación de las levaduras, según las indicaciones del fabricante (Ver Anexo B) y ser adicionadas a su respectivo recipiente (ver Figura 10). Estos se deben mantener en condiciones aerobias a una temperatura de 30°C siguiendo las condiciones de crecimiento encontradas en la ficha técnica del microorganismo. Además, se realizó un medio de cultivo control sin levadura, para observar si hubo contaminación externa, el cual no presentó indicios de contaminación.

⁵⁰ PUENTES, Adriana. Producción estimulada de alcohol a partir de mieles de caña mediante un complejo enzimático obtenido de *Rhizopus* spp. Universidad Industrial de Santander. 2008. p.39.

Figura 10 Inóculo de las cepas ATCC 9763 (A) y ATCC 4098 (B)



El control de la temperatura para los inóculos iniciales, se llevó a cabo mediante el uso de una habitación cerrada en la que previamente se tomó la temperatura mínima y máxima, durante una semana, siendo estas temperaturas de 23 y 30°C respectivamente, esto se hizo con el fin de simular las condiciones a las que se podrían realizar futuras fermentaciones dentro de la planta trapiche, sin embargo debido a que las condiciones óptimas de crecimiento de las cepas por ser del tipo *Saccharomyces*, y a las recomendaciones de las fichas técnicas de las cepas, se elevó la temperatura de la habitación para que no bajara de los 25°C, registrando una temperatura promedio de 27°C.

Luego se llevaron los inóculos a la habitación previamente acondicionada, teniendo presente la temperatura optima, y que no estuvieran expuestas a la luz, para facilitar su crecimiento; se evidenció actividad de las levaduras al cabo de 1 día de la inoculación, ya que se presentó espumado en la superficie de los inóculos, la cepa ATCC® 9763™ fue quien presento mayor cantidad de CO₂ producido.

La producción de los inóculos se realizaron durante 5 días, con el fin de aumentar la cantidad de biomasa presente, se observó un aumento en la cantidad de espuma, reflejado en la producción de CO₂ que aumentaba la presión de los recipientes, por lo que se realizaron liberaciones de presión manuales 5 veces al día (12AM, 6AM, 11AM, 3PM, 8 PM) para evitar la acumulación de CO₂ que ocasiona inhibición de las levaduras y en el peor de los casos muerte de estas. La presión que debe resistir un recipiente PET según la NTC 4857 es de 150 psi (1.034MPa) durante 60 segundos, se reporta que para *Saccharomyces cerevisiae* a 25°C y pH 4.5, empieza a existir inhibición con presiones parciales de dióxido de carbono a 0.5 atm

(0.0507MPa) e inhibición total a 2.7 atm (0.274MPa)⁵¹, mientras que se reporta rompimiento de la pared celular de la levadura a 200MPa⁵², por lo tanto se debe evitar llegar a estas presiones. En la Figura 11 y Figura 12 se presenta una comparación de la actividad al inicio y al final del Inóculo.

Figura 11. Comparación día 1 (A) y día 5 (B) cepa ATCC 9763

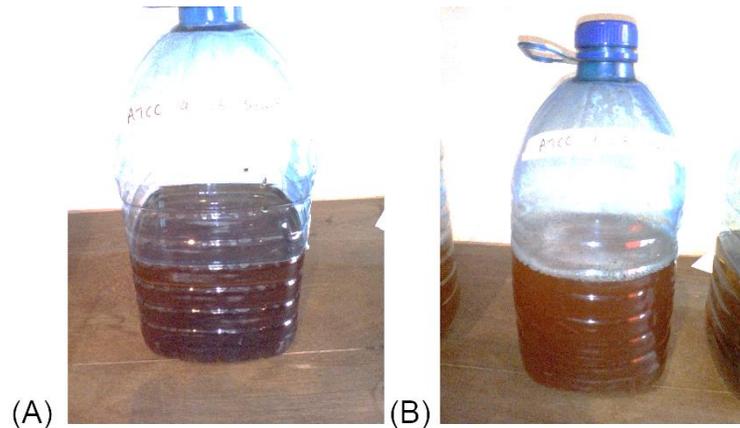
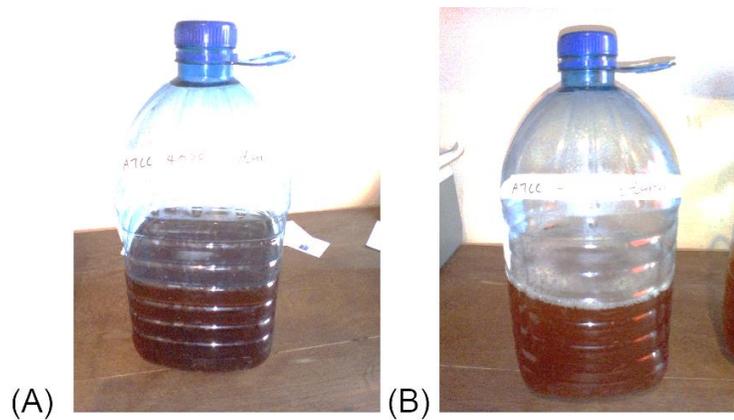


Figura 12. Comparación día 1 (A) y día 5 (B) cepa ATCC 4098



⁵¹ JONES, Rodney y GREENFIELD, Paul. Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. Department of chemical engineering, University of Queensland, St Lucia. Enzyme microbiology. Technology Vol 4. Australia. 1982. p. 213

⁵² OSUMI, Masako. Pressure effects on yeast cell ultrastructure: changes in the ultrastructure and cytoskeleton of the dimorphic yeast, *Candida tropicalis*. High pressure and biotechnology. 1992. p. 9-18.

3.3 FERMENTACIÓN DE LAS MIELES

La fermentación de las mieles y mieles invertidas mediante los microorganismos *Saccharomyces cerevisiae* ATCC® 9763™* y ATCC® 4098™* se llevó a cabo en recipientes estériles, empleando un volumen efectivo de 5L de los dos tipos de mieles sometidas previamente a una pasteurización a 80°C durante 15 min para la eliminación de cualquier contaminación presente, luego se estabilizó a temperatura ambiente, a una concentración de 15 °Brix y un pH de 4,5 se agregó un 10% v/v del inóculo y se fermentó por 3 días, sin aireación.

Debido a que se cuenta con dos variables independientes (tipo de miel y tipo de cepa) las cuales a su vez cuentan con dos niveles (miel de caña no invertida y miel de caña invertida y cepas ATCC® 9763™* y ATCC® 4098™*), de esta forma se obtiene un diseño de experimentos factorial 2²; se realizó la experimentación por duplicado por lo tanto se realizaron 8 fermentaciones en total. Este diseño de experimentos es importante para determinar qué factores influyen más en las fermentaciones, el tipo de miel, el tipo de cepa o la interacción miel-cepa; y en qué grado influyen cada uno de estos factores.

Una vez finalizadas las fermentaciones se tomaron 8 muestras de 1L cada una, para su análisis en el CGI (Centro de gestión industrial) del SENA de Bogotá, la técnica a utilizar fue una cromatografía de gases acoplada a masas (GC/MS).

El CGI encontró que para poder trabajar con las muestras en el cromatógrafo se debían tratar primero, dicho tratamiento consistió en la pasteurización de las muestras, para que el choque térmico acabara con los microorganismos que aun estuvieran presentes en las muestras, la pasteurización se realizó con baño de maría a 80°C durante 20 minutos con recipientes sellados de 250mL; debido al alto contenido de azúcares que contienen las muestras (hasta 63.334g de azúcares reductores/L y que la concentración para las mieles invertidas era de 0.31667g azúcares reductores/mL) y a la temperatura de inyección del cromatógrafo (200°C) pueden producir una caramelización provocando una obstrucción en el inyector del cromatógrafo por lo cual se realizó la destilación de cada una de las muestras.

Figura 13. Rota evaporador utilizado por el CGI



Para las destilaciones el CGI utilizó un rota evaporador, configurado para trabajar con una presión de vacío de 100mbar, una temperatura de baño de maría de 60°C y 50 RPM durante 30 minutos, usando 25mL de muestra, esta metodología tuvo repetitividad pues el volumen de destilado para todas las muestras fue de 19mL. Posteriormente se tomaron los destilados y se pasaron por el cromatógrafo, la información sobre la configuración del cromatógrafo se puede encontrar en el reporte entregado por el CGI en el Anexo G, la curva de calibración del cromatógrafo se realizó con alcohol etílico absoluto ($\geq 99.5\%$ v/v) a concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5 % v/v.

Figura 14. Cromatógrafo de gases utilizado por el CGI



Los resultados obtenidos por el CGI corresponden al porcentaje de etanol v/v de las destilaciones, los cromatogramas para cada uno de estos se pueden encontrar en el anexo G, se tomaron estos valores y se pasaron a un porcentaje v/v de la

muestras, considerando que todos los destilados eran de 19mL y las muestras de 25mL, los resultados para el porcentaje v/v de destilado y muestra se observan en la Tabla 6, se puede ver que existe una mayor desviación con la cepa ATCC 9763, esto puede deberse a que esta cepa según su ficha técnica tiene una temperatura optima de crecimiento de 30°C, mientras que la cepa ATCC 4098 tienen un rango de crecimiento de 25-30°C, lo que hace a la cepa ATCC 9763 más sensible a los cambios de temperatura y la fermentación se realizó de tal manera que la temperatura se mantuviera siempre entre el rango de 25-30°C, esta cepa se vio más afectada.

Tabla 6. Resultados de la fermentación

Miel	Muestra	Cepa	% Etanol v/v destilado	% Etanol v/v muestra
Invertida	1	ATCC 4098	12,994	9,875
Invertida	2	ATCC 4098	12,712	9,661
No invertida	1	ATCC 4098	9,678	7,355
No invertida	2	ATCC 4098	9,581	7,281
Invertida	1	ATCC 9763	10,458	7,948
Invertida	2	ATCC 9763	7,427	5,644
No invertida	1	ATCC 9763	6,742	5,124
No invertida	2	ATCC 9763	7,944	6,037

3.4 ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA Y RENDIMIENTO DE LA REACCIÓN

3.4.1 Análisis de varianza ANOVA. Se realizó un análisis de varianza con la ayuda del software SPSS 23 versión de prueba, los resultados para los efectos inter-sujetos se observan en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados prueba inter-sujetos

Variable dependiente: % Etanol v/v						
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado
Modelo corregido	32,151 ^a	3	10,717	7,997	0,036	0,857
Intersección	751,479	1	751,479	560,769	0	0,993
Cepa	19,201	1	19,201	14,328	0,019	0,782
Miel	11,631	1	11,631	8,679	0,042	0,685

Tabla 7. (Continuación)

Cepa * Miel	1,319	1	1,319	0,984	0,377	0,197
Error	5,36	4	1,34			
Total	788,99	8				
Total corregido	37,511	7				

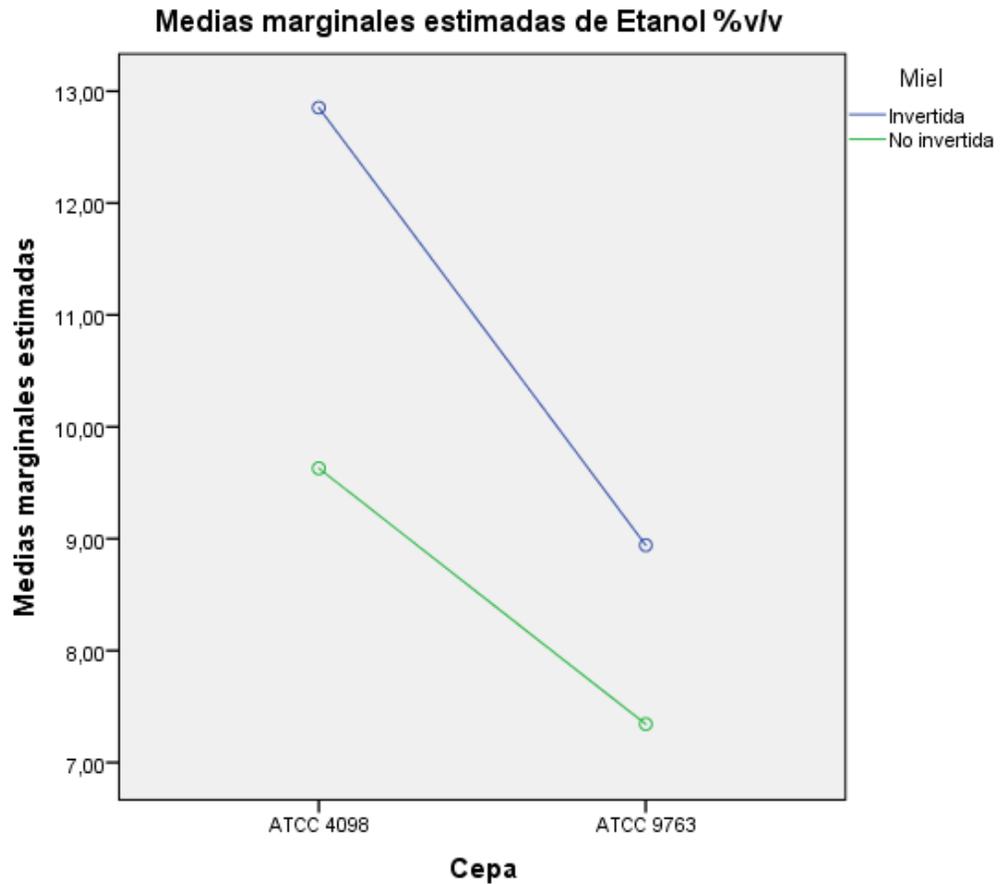
a. R al cuadrado = 0,857 (R al cuadrado ajustada = 0,750)

Se observa que se tiene una significancia (Sig.) al 0,05 para todos los tratamientos, menos para la interacción entre el tipo de cepa y miel, esto supone que la cepa no se ve afectada por el tipo de miel, sin embargo los tratamientos individuales de tipo de cepa y miel si afectan el rendimiento, especialmente el tipo de cepa, en la Figura 15, se puede observar este comportamiento, existe una brecha entre los dos tipos de mieles, esta brecha se hace más grande con la cepa ATCC 4098, siendo esta de 3.223% para la cepa ATCC 4098 y de 1.599% para la cepa ATCC 9763, en cuanto al R al cuadrado, se tiene que el 85.7% del etanol obtenido se puede atribuir a los factores elegidos, este valor pudo ser más grande pero como se observa en la Tabla 6, para la cepa ATCC 9763 con miel invertida hay una desviación mayor a la presentada en las demás combinaciones, como se observa en la Tabla 8, la desviación en dicho caso es la más elevada de todas con un valor de 2.143.

Tabla 8. Análisis estadístico descriptivo

Variable dependiente: Etanol % v/v				
	Cepa	Media	Desviación estándar	N
ATCC 4098	Invertida	12,853	0,199	2
	No invertida	9,629	0,069	2
	Total	11,241	1,865	4
ATCC 9763	Invertida	8,942	2,143	2
	No invertida	7,343	0,850	2
	Total	8,142	1,620	4

Figura 15. Medidas marginales de Etanol % v/v



3.4.2 Rendimiento de la reacción. Para el rendimiento de la reacción se tomaron los datos de la Tabla 6, en conjunto con la cantidad de miel de caña utilizada en cada fermentación y la relación empírica usada por Garzón. S y Hernandez. C⁵³ “Según la Universidad Nacional de Colombia (Guías de fermentación) para determinar el rendimiento en el proceso de fermentación con base a la masa de melaza utilizada se utiliza la siguiente relación”

⁵³ Gonzales, S y Hernandez, C. Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. Universidad Tecnológica de Pereira. 2009

Relación entre masa de melaza y etanol producido

100kg de melaza → 33L de etanol

Fuente 9. Garzón, S y Hernandez, C. Estudio comparativo para la producción de etanol entre Saccharomyces cerevisiae silvestre, Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 y Candida utilis ATCC 9950. Universidad Tecnológica de Pereira. 2009

El uso de esta relación es debido a la dificultad que existe para determinar con exactitud la composición de las mieles, por lo que estas varían en cada lote, en el presente trabajo se determinaron los azúcares reductores, sin embargo la composición total de azúcares es incierta y los referentes bibliográficos tienen diferentes °Brix, por lo que se usa esta relación para comparar el rendimiento teórico, considerando los azúcares reductores, y el rendimiento empírico, según la anterior relación.

Teniendo en cuenta lo anterior, se tomó la cantidad utilizada de miel en las fermentaciones, estas corresponden a 1L para miel invertida y a 1,14L para las mieles no invertidas, estas luego fueron llevadas a 15°Brix completando un volumen de 5L, se usó el volumen de miel y con ayuda de la densidad se determinó la masa de miel usada, usando la ecuación 10, luego se usó la Ecuación 11 para determinar el volumen de etanol según la relación, finalmente este se expresa en % v/v considerando los 5L totales usando la Ecuación 12. De manera análoga, se determinó el % v/v de etanol según la concentración de azúcares reductores, considerando el volumen de miel en las fermentaciones (1L y 1.41L) en la Ecuación 13 junto con la concentración de azúcares reductores, luego con la Ecuación 14 y teniendo en cuenta que 180.16g de dextrosa forman 92.14g de etanol, se determina la masa de etanol en 5L, finalmente con esta masa, los 5L de volumen y la densidad, se determina el % v/v de etanol teórico con la Ecuación 15.

Finalmente se tiene también el rendimiento de acuerdo a los azúcares totales, este se determinó teniendo en cuenta que las mieles de caña tienen en promedio 62%p/p de azúcares totales, expresados como azúcares reductores⁵⁴, por lo que se usa la Ecuación 10 para determinar la masa de miel, la Ecuación 16 para determinar la masa de azúcares totales, la Ecuación 14 para la masa de etanol y la Ecuación 15 para el porcentaje de etanol v/v.

⁵⁴ OLBRICH, H. The Molasses. Institut für Zuckerindustrie, Berlin. 1963. p 6

Ecuación 10. Masa de miel usada

$$\text{Masa de miel} = \text{Volumen de miel} * \rho$$

Ecuación 11. Volumen de etanol según GARZÓN

$$\text{Volumen de etanol segun GARZON} = \text{Masa de miel} * \frac{33\text{L etanol}}{100\text{kg de miel}}$$

Ecuación 12. Porcentaje de etanol según relación GARZÓN v/v

$$\% \text{Etanol} \frac{v}{v} \text{ segun relación} = \frac{\text{Volumen de etanol teorico}}{5\text{L}} * 100$$

Ecuación 13. Masa de azúcares reductores

$$\text{Masa azúcares reductores} = [\text{azúcares reductores}] * V$$

Ecuación 14. Masa de etanol en 5L

$$\text{Masa de etanol} = \text{Masa de azúcares reductores} * \frac{92.14\text{g etanol}}{180.16\text{g dextrosa}}$$

Ecuación 15. Porcentaje etanol teórico v/v

$$\% \text{Etanol} \frac{v}{v} \text{ teorico} = \frac{\text{Masa de etanol}}{5\text{L}} * \frac{1}{\rho} * 100$$

Ecuación 16. Masa de azúcares totales

$$\text{Masa de azúcares totales} = \text{Masa de miel} * 0.62$$

Los resultados de estas ecuaciones se encuentran en la Tabla 9, así como la comparación con el resultado experimental, los cálculos de las ecuaciones 10-16 se encuentran en el Anexo H. El rendimiento para cada porcentaje se determinó tomando el valor real sobre el valor de la relación, el de azúcares reductores y azúcares totales respectivamente.

Tabla 9. Rendimiento de las fermentaciones

Miel	Cepa	% Etanol v/v muestra	% Etanol según GARZÓN v/v	% Etanol azúcares reductores v/v	% Etanol azúcares totales v/v
Invertida	ATCC 4098	9,88%	9,37%	4,11%	11,41%
Invertida	ATCC 4098	9,66%	9,37%	4,11%	11,41%
No invertida	ATCC 4098	7,36%	10,10%	0,27%	12,31%
No invertida	ATCC 4098	7,28%	10,10%	0,27%	12,31%
Invertida	ATCC 9763	7,95%	9,37%	4,11%	11,41%
Invertida	ATCC 9763	5,64%	9,37%	4,11%	11,41%
No invertida	ATCC 9763	5,12%	10,10%	0,27%	12,31%
No invertida	ATCC 9763	6,04%	10,10%	0,27%	12,31%

Miel	Cepa	Rendimiento Según GARZÓN	Rendimiento azúcares reductores**	Rendimiento azúcares totales
Invertida	ATCC 4098	105,37%*	240,55%	86,52%*
Invertida	ATCC 4098	103,08%*	235,33%	84,65%*
No invertida	ATCC 4098	72,79%	2724,04%	59,77%
No invertida	ATCC 4098	72,06%	2696,73%	59,17%
Invertida	ATCC 9763	84,81%	193,60%	69,64%
Invertida	ATCC 9763	60,23%	137,49%	49,45%
No invertida	ATCC 9763	50,71%	1897,65%	41,64%
No invertida	ATCC 9763	59,75%	2235,97%	49,06%

* Como se observa en la Tabla 9 para las muestras de miel invertida con la cepa ATCC 4098 se obtuvo un porcentaje de etanol por encima del esperado usando la correlación de GARZÓN, esto es debido a que pueden variar las mieles en cuanto a su composición, dificultando un cálculo exacto por métodos estequiométricos, si se desconoce la cantidad de azúcares totales, teniendo en cuenta el promedio de azúcares totales en mieles de caña el rendimiento para esta miel se estima entre un 85 y 100%, considerando que la diferencia en los demás casos varía entre un 10 y 15% mayor para la relación de GARZÓN frente al promedio de azúcares totales.

** En cuanto al rendimiento con azúcares reductores, el cual no tienen en cuenta el resto de los azúcares como la sacarosa, este muestra cuantas veces tuvo que hidrolizar el microorganismo la sacarosa de las mieles en relación a los azúcares reductores, para el caso de la miel no invertida, se tiene que hidrolizo entre 22 y 27 veces la misma cantidad de azúcares reductores al inicio, esto da una idea del

esfuerzo que tiene el microorganismo, puesto que con la miel invertida ronda alrededor de las 2 veces, lo que seguramente significa que el tiempo necesario para la fermentación con mieles invertidas es menor y debe investigarse esta diferencia en posteriores trabajos.

Existen otros referentes teóricos que correlacionan el rendimiento con la cantidad de alcohol obtenido, en los que también se observan rendimientos con este tipo de comportamiento, según OLBRICH⁵⁵ para los productos de la fermentación de melazas, se observa que con 1 tonelada de melaza se pueden producir 315L de alcohol, equivalente a 31,5L/100kg melaza, valor parecido a los 33L/100kg melaza de GARZÓN, por lo que se respalda la correlación.

Como era de esperarse las mieles con mayor rendimiento fueron las invertidas, ya se había discutido que las cepas eran el factor determinante más importante de las fermentaciones, y esto se hace obvio al observar la diferencia entre los rendimientos de la cepa ATCC 4098 Y ATCC 9763, para cualquier tipo de miel y bajo las mismas condiciones la cepa ATCC 4098 se ubica entre un 20 y 30% por encima de la cepa ATCC 9763. Las mieles invertidas al presentar los azúcares desdoblados facilitan el trabajo del microorganismo, además acorta el tiempo necesario para que el microorganismo convierta todos los azúcares, por lo que a la larga la miel invertida al contar con el mismo tiempo de residencia que la no invertida para la fermentación no solo se aprovecharía mejor los azúcares reductores si no que se transformarían los azúcares restantes en menor tiempo que la miel no invertida.

⁵⁵ OLBRICH, H. The Molasses. Institut für Zuckerindustrie, Berlin. 1963. p 60

4. ESPECIFICACIONES DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

Se realizó un análisis de los costos de producción para cada combinación de miel-levadura, tomando en cuenta el proceso en el ingenio, la cantidad de calor a retirar en el fermentador e insumos adicionales que podrían necesitarse.

El proceso que se realiza en el ingenio tiene pequeñas variaciones de un proceso a otro, pero su base es la misma, por lo que se toman únicamente los costos adicionales para cada caso, en el caso de la miel invertida el único insumo adicional se trata de la invertasa, cuyo precio se estima en 300 COP/g, la cantidad necesaria varía entre 0,7-1 g invertasa/kg sacarosa. En ambos procesos se utiliza ácido cítrico como regulador de pH. En la Figura 16 y Figura 17, se observa el proceso en la planta para las mieles de caña no invertidas e invertidas respectivamente y en la Tabla 10 y Tabla 11 se encuentra la especificación de cada corriente, en donde el flujo de calor en la etapa de fermentación es continuo durante 72 horas.

Figura 16. Diagrama de producción de etanol por vía fermentativa empleando mieles de caña



Tabla 10. Especificación de las corrientes del diagrama de producción de etanol por vía fermentativa empleando mieles de caña

Corriente	Jugo de caña clarificado	Q1	Miel de caña 1	Ácido cítrico	Miel de caña 2	Miel de caña 3	Cepas activadas	Inoculo
pH	6,5 - 6,9		6,5 - 6,9		4 - 5	4 - 5		
Concentración	15 -18°Brix		65 - 67°Brix		65 - 67°Brix	65 - 67°Brix		10% V/V
Temperatura	60 - 70°C		100 - 110 °C		20 - 23°C	20 - 23°C	20 - 23°C	
Cantidad	10 L		6 - 7 L	6 - 8 g	6 - 7 L	7 L		
Flujo		20 kJ/h						

Agua serpentín 1	Agua	Mosto fermentado	Agua serpentín 2	Q2
		5,8 - 4,7 % p/v etanol		
18 - 20°C	18 - 20°C		25,8 -26,4°C	
	20 L			
0,435 - 0,495 kg/h			0,433 - 0,495 kJ/h	-17,4 a -14,3 kJ/h

Figura 17. Diagrama de producción de etanol vía fermentativa empleando mieles de caña invertidas

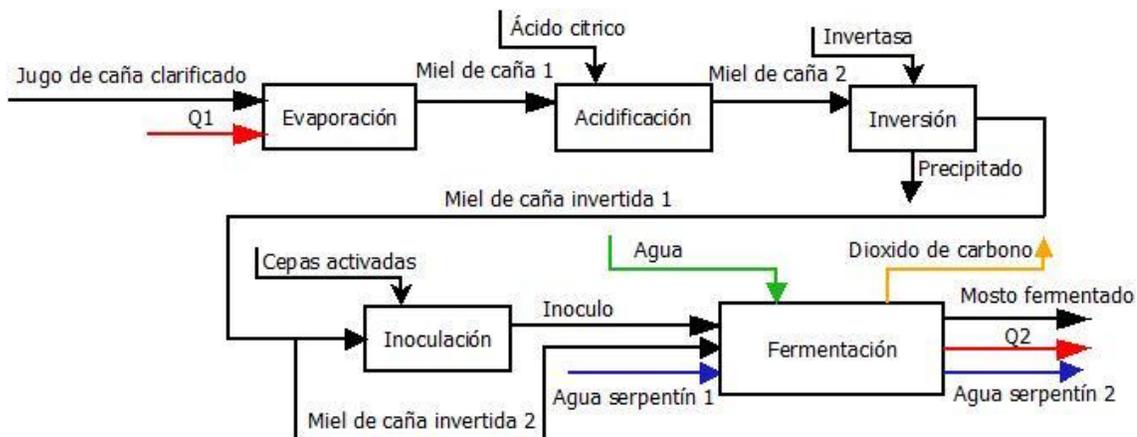


Tabla 11. Especificación de las corrientes del diagrama de producción de etanol por vía fermentativa empleando mieles de caña invertidas

Corriente	Jugo de caña clarificado	Q1	Miel de caña 1	Ácido cítrico	Miel de caña 2	Invertasa	miel de caña invertida 1	Cepas activadas
pH	6,5 - 6,9		6,5 - 6,9		4 - 5		4 - 5	
Concentración	15 - 18°Brix		65 - 67°Brix		65 - 67°Brix		70 - 85°Brix	
Temperatura	60 - 70°C		100 - 110 °C		20 - 23°C		20 - 23 °C	20 - 23 °C
Cantidad	10 L		6 - 7 L	6 - 8 g	6 - 7 L	0,7 - 1 g	6 - 7 L	
Flujo		20 kJ/h						

miel de caña invertida 2	Inóculo	Agua serpentín 1	Agua	Mosto fermentado	Q2
4 - 5					
70 - 85°Brix	10% V/V			6,2 - 7,7 % p/v etanol	
20 - 23 °C		18 - 20°C	18 - 20°C		
6 L			21 L		
		0,521 - 0,604 kg/h			-23,4 a -18,8 kJ/h

Al comparar las Figura 16 y Figura 17 se evidencia que los dos procesos tienen en común las dos primeras etapas, en las cuales se lleva a cabo la transformación del jugo de caña clarificado a mieles de caña y la adición de ácido cítrico para el ajuste del pH, respectivamente, así como todas las etapas anteriores; por lo tanto para el cálculo de los costos no se tomarán en cuenta las etapas en común.

4.1 COSTOS INTERCAMBIO DE CALOR

El fermentador del que dispone el SENA de Villeta se trata de un fermentador de 30L en acero inoxidable AISI 304 con serpentín, el serpentín tiene un desarrollo de 9 metros, un diámetro de tubería de 15mm, espesor de 1,5mm y un diámetro de serpentín de 19cm, además usa una trampa de gases para liberar la presión a 2bar; en la Figura 18 se puede observar el fermentador junto con su serpentín.

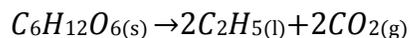
Figura 18. Fermentador con serpentín



Para determinar cuánto calor se debe extraer, se determina el ΔH de la reacción de fermentación, luego con el porcentaje de etanol v/v de cada combinación cepa-miel, la capacidad del fermentador y la densidad del etanol, se determina el calor producido por la reacción.

La formación de etanol se puede dar por medio de cualquiera de las dextrosas presentes en las mieles (glucosa y fructosa), por ello la importancia de determinar los azúcares reductores, estos dos azúcares tienen entalpías de formación distintas, por lo que para determinar la entalpía de la reacción con absoluta precisión se tendría que contar primero con las proporciones de los azúcares en las mieles. Sin embargo se sabe que la mayoría de los azúcares reductores se tratan de glucosa, esto sumado a que las entalpías de formación no difieren mucho entre si (-1274kJ/mol para glucosa⁵⁶ y -1265.6kJ/mol para fructosa⁵⁷), por lo que se puede utilizar la entalpía de la glucosa sin desviarse del valor real.

Ecuación 17. Formación de etanol con dextrosa



⁵⁶ CHANG, R. Química sexta edición. McGRAW-HILL.1999. Apéndice 3 p A-13.

⁵⁷ NIST WEBBOOK. Consultado el 27 de Abril de 2017. En línea en:
<http://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C57487&Mask=2#Thermo-Condensed>

Por medio de la Ecuación 17 y Ecuación 18, se determinó la entalpía de la reacción como -66.46kJ/mol usando -1274.5kJ/mol para glucosa, -276.98kJ/mol de etanol⁵⁸ y -393.5kJ/mol para dióxido de carbono⁵⁹, a una temperatura estándar de 25°C.

Ecuación 18. Entalpía de reacción

$$\Delta H_{rx} = \frac{2(-276,98 + -393,5)kJ}{mol} - \left(-\frac{1274,5kJ}{mol} \right) = -\frac{66,46kJ}{mol}$$

Para determinar el calor necesario a extraer se tomaron los porcentajes de etanol obtenidos y se convirtieron a porcentajes peso / volumen para poder tener la cantidad de etanol producido en peso con el volumen del fermentador, esto se hace con la densidad del alcohol absoluto (>99.5%v/v), la cual es de 0.789g/mL, finalmente teniendo en cuenta el volumen de 30L se determina la masa para cada combinación cepa-miel. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 12, luego con ayuda de las masas obtenidas y el peso molecular del etanol (46.0684g/mol), se toma el resultado de la Ecuación 18 y se expresa en gramos de etanol con la Ecuación 19, dando -0,7213kJ/g etanol.

Ecuación 19. Entalpía de reacción expresada en kJ/g etanol

$$\Delta H_{rx} = -\frac{66,46kJ}{mol} * \frac{1}{\frac{46,0684g}{mol}} * \frac{1mol dextrosa}{2mol etanol} = -\frac{0,7213kJ}{g etanol}$$

Tabla 12. Etanol estimado en 30L

Miel	Cepa	% Etanol v/v	%Etanol p/v	Masa de etanol (g) en 30L
Invertida	ATCC 4098	9,875	7,792	2337,516
No invertida	ATCC 4098	7,355	5,803	1740,995
Invertida	ATCC 9763	7,948	6,271	1881,311
No invertida	ATCC 9763	6,037	4,763	1429,062

⁵⁸ CHANG. Op. Cit

⁵⁹ Ibid., Apendice 3 p. A-9

Se determinó el flujo de calor de la reacción teniendo un tiempo de residencia de 72 horas, para esto se usó la Ecuación 20, los valores obtenidos se resumen en la Tabla 13.

Ecuación 20. Flujo de calor en el fermentador

$$Q = \Delta H_{rx}(\text{kJ/g de etanol}) * \frac{\text{Masa de etanol}}{72 \text{ horas}}$$

Tabla 13. Flujo de calor en el fermentador por hora

Miel	Cepa	Masa de etanol (g) en 30L	Flujo de calor kJ/h
Invertida	ATCC 4098	2337,517	-23,418
No invertida	ATCC 4098	1740,995	-17,442
Invertida	ATCC 9763	1881,311	-18,847
No invertida	ATCC 9763	1429,062	-14,317

Con la información de la Tabla 13, se determinó el flujo másico usando la Ecuación 21 y la Ecuación 22, de la Ecuación 22 se fijó un flujo másico inicial, y una temperatura de salida inicial, luego por medio de la herramienta solver, disponible en Excel versión 2013, se igualo el lado izquierdo de la ecuación con el lado derecho de la ecuación, del mismo modo se iguala el flujo de calor obtenido anteriormente, con el flujo de calor de la Ecuación 21 que se obtendría con T1=18°C y el T2 usado en la Ecuación 22; se tuvo por condiciones que la resta de la parte izquierda y derecha de la Ecuación 22 fuera igual a cero, que la resta de los flujos de calor fuese cero y que T2<30°C, cambiando los valores de T2 y flujo másico.

Se tiene que para serpentines sumergidos en agua un estimado del coeficiente global de transferencia de calor U a bajas presiones (hasta 2 Bar) puede ser de 570 W/(m²°C)⁶⁰ (2052kJ/h m²°C), considerando el desarrollo de 9 metros del serpentín, junto con el diámetro de 15mm se tiene un área de intercambio de 0.42412 m², estos datos se usan en la Ecuación 22, los resultados para las temperaturas de salida del serpentín, así como el flujo másico se encuentran en la Tabla 14, la temperatura del agua de enfriamiento puede operar entre 18°C y 30°C, entre estas

⁶⁰ The Engineering ToolBox, consultado el: 27 de Abril de 2017. En línea en: http://www.engineeringtoolbox.com/heat-load-steam-pipes-water-d_287.html

temperaturas el Cp es 4.18 y 4.178kJ/kg°C, por lo que se usa un valor fijo de 4.18kJ/kg°C⁶¹.

Para soluciones de melaza de 15°Brix el calor específico es aproximadamente de 0.9cal/kg°C (3.77kJ/kg°C)⁶², el coste atribuido al enfriamiento del fermentador, se calcula con base a una tarifa de 2296 COP/m³ con la Ecuación 23, en donde V es el volumen específico del agua⁶³.

Ecuación 21. Flujo másico fermentador

$$m = \frac{-Q}{C_p * (T_1 - T_2)}$$

Ecuación 22. Correlación para enfriadores

$$\ln \frac{t_1 - T_1}{T_2 - T_1} = \frac{W C_e}{M C_f} * \left(\frac{K_2 - 1}{K_2} \right) * \Theta \quad K_2 = e^{(U A) / W C_e}$$

Fuente 10. PERRY, ROBERT. Manual del ingeniero químico Sexta edición. McGRAW-HILL. 2001. Tomo III.p.40

Dónde:

t1	es la temperatura del jugo	(25°C)
T1	es la temperatura de entrada del serpentín	(18°C)
T2	es la temperatura de salida del serpentín	(°C)
W	es el flujo másico de agua	(kg/h)
Ce	es el Calor específico del agua	(kJ/kg°C)
Cf	es el calor específico del jugo a fermentar	(kJ/kg°C)
M	es la masa contenida en el fermentador	(kg)
U	es el coeficiente global de transferencia de calor	(kJ/hm ² °C)
A	es el área de transferencia del serpentín	(m ²)
Θ	es el tiempo de residencia en el fermentador	(72h)

⁶¹ The Engineering ToolBox, consultado el: 27 de Abril de 2017. En línea en: http://www.engineeringtoolbox.com/water-thermal-properties-d_162.html

⁶² OLBRICH. Op Cit.,p.44

⁶³ Ibid.

Una muestra de la plantilla de solver para la cepa ATCC 9763 con miel no invertida se muestra en el Cuadro 5. Cuadro 5, la masa en el fermentador M, se determinó teniendo en cuenta que se necesitan 6 y 7L aproximadamente de miel invertida y miel no invertida respectivamente, para tener 15°Brix en el fermentador al completar el volumen de 30L, se tomó entonces la densidad de cada miel, el volumen necesario y junto con la densidad y volumen para completar 30L de agua, se determinó la masa total en el fermentador.

Cuadro 5. Muestra de plantilla para solver

T1	18	°C
T2	25,9	°C
t1	30	°C
Cf	3,77	kJ/kg°C
Ce	4,18	kJ/kg°C
U	2052	kJ/hm ² °C
A	0,424	m ²
M	32,52	kg
W	0,434	kg/h

Izquierda	Derecha	Error
1,068	1,068	1,17E-07
K2	7,69E+207	

Flujo de calor kJ/h	Flujo serpentín kJ/h	Error
-14,3168	-14,31	6,78E-07

Ecuación 23. Costo de acueducto por fermentación

$$\text{Costo acueducto} = m * V * \frac{2296COP}{m^3} * 48h$$

Tabla 14. Costo de acueducto y T1 máxima para operación

Miel	Cepa	Flujo de calor kJ/h	T2 °C	Flujo másico kg/h	Costo 72 horas
Invertida	ATCC 4098	-23,42	24,2	0,9	\$148,66
No invertida	ATCC 4098	-17,44	23,8	0,72	\$118,89
Invertida	ATCC 9763	-18,85	23,9	0,76	\$125,90
No invertida	ATCC 9763	-14,32	23,5	0,62	\$103,18

4.2 COSTOS Y SELECCIÓN DE COMBINACIÓN CEPA-MIEL

Ya se han establecido los costos que genera el enfriamiento del fermentador, este al tratarse de un fermentador de 30L se puede conectar directamente a la corriente de agua y controlar el flujo directamente con una válvula de manera manual. La Tabla 15 resume los costos asociados a cada combinación y las posibles ganancias con la venta de etanol.

El costo para cualquiera de las dos cepas es el mismo de 250.000 COP, pero este costo no cubre una sola fermentación, de lo experimentado durante la inoculación y fermentación de las cepas se observó que la biomasa obtenida durante la preparación del Inóculo podría ser suficiente para unas 16 fermentaciones, puesto se preparó el Inóculo en un medio de 5L, posteriormente se usó 1/8 de este medio luego del crecimiento de biomasa, para las fermentaciones, si se tiene en cuenta que en la adquisición de la cepa se tienen dos cepas, se tendría suficiente para 16 fermentaciones en la primera replica y para 128 fermentaciones con una segunda replica; considerando que el 10%v/v para el fermentador serían 3L, se tendría suficiente con cada una de estas replicas para una fermentación, lo que se traduce en unas 64 fermentaciones por unidad de Inóculo inicial, haciendo dos replicas.

El precio de venta que se tomó fue de 2228 COP, acorde con la Resolución 40349 del 28 de Abril de 2017, entrando en vigencia desde el 1 de Mayo de 2017.

Tabla 15. Ganancia por venta de etanol por unidad de Inóculo inicial, para cada combinación cepa-miel

Miel	Invertida	No invertida	Invertida	No invertida
Cepa	ATCC 4098	ATCC 4098	ATCC 9763	ATCC 9763
Costo acueducto	\$ 9.513,93	\$ 7.608,69	\$ 8.057,43	\$ 6.603,52
Costo de la cepa COP	\$ 250.000,00	\$ 250.000,00	\$ 250.000,00	\$ 250.000,00

Tabla 15. (Continuación)

Costo de la cepa por unidad de Inóculo	\$	125.000,00	\$	125.000,00	\$	125.000,00	\$	125.000,00
Costo invertasa COP/g sacarosa	\$	19.200,00	NO APLICA		19200		NO APLICA	
Masa de miel a utilizar (g)		545280		601664		545280		601664
Costo total invertasa COP	\$	40.896,00	NO APLICA		40896		NO APLICA	
Etanol estimado L		189,608448		141,221376		152,603136		115,918848
Costo total COP	\$	175.409,93	\$	132.608,69	\$	173.953,43	\$	131.603,52
Ingresos COP	\$	422.447,62	\$	314.641,23	\$	339.999,79	\$	258.267,19
Ganancia COP	\$	247.037,69	\$	182.032,54	\$	166.046,36	\$	126.663,67

Ecuación 24. Costo total

Costo total = costo acueducto + costo de la cepa por fermentación + costo total invertasa

Ecuación 25. Ingresos

Ingresos = (litros de etanol estimado)(precio de venta por litro de etanol)

Ecuación 26. Ganancia

Ganancia = ingresos – costo total

La Tabla 15 toma el precio de las cepas y lo divide en dos, debido a que se tienen dos cepas al momento de la compra y cada una se usa en un Inóculo inicial, los cálculos de costos, ganancia e ingresos se realizan mediante la Ecuación 24, Ecuación 25 y Ecuación 26. Ha de aclararse que no se tuvo en cuenta los gastos del proceso de separación puesto que el ingenio no cuenta todavía con los medios para dicha separación, por lo cual el precio real puede ser menor, por lo que el ingenio debería considerar la inversión de un fermentador de mayor volumen, así como la de una torre de destilación, para aumentar sus ganancias a largo plazo.

De la Tabla 15 se observa que la mayor ganancia se obtendría de la combinación ATCC 4098-Miel invertida, con una ganancia de 247.037,69 COP, también es de notarse que la ganancia que se podría obtener con ATCC 4098-Miel no invertida, es superior a la que se podría obtener con ATCC 9763-Miel no invertida, por lo que

para otros ingenios de la región en el momento no tengan acceso a la inversión de las mieles, podrían usar la cepa ATCC 4098 para su proceso.

El tipo de cepa es el factor más determinante en la producción de etanol, como se vio en la sección 3.4.1, la cepa ATCC 4098 pese a contar con pocos referentes bibliográficos, demostró tener un alto rendimiento, entre el 85 y 100%, para mieles invertidas y del 73% para mieles no invertidas (Tabla 9), por lo que es la más adecuada para la fermentación con cualquier tipo de miel, por lo visto en el capítulo 2 se sabe que las mieles invertidas poseen ventaja frente a las mieles no invertidas en los aspectos más relevantes (Tabla 5), para evitar la contaminación de las mieles no invertidas será necesario disminuir la carga microbiana contenida en dichas mieles. Se seleccionó la cepa ATCC 4098, por su rendimiento y la miel invertida por no contar la presencia de cristales al almacenarse en periodos prolongados de tiempo, una pureza relativa mayor a la de la miel no invertida en 1333.28% para el contenido de azúcares reductores, correspondiente a 0.295g azúcares reductores/g solidos solubles, y una viscosidad menor a la miel no invertida en 91.26%, correspondiente a 1643.6 cP.

5. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos de la caracterización de los dos tipos de mieles de caña de la región de Gualivá, en cuanto a pH, °Brix y concentración de azúcares reductores, son adecuados para su utilización como sustratos en la producción de etanol por vía fermentativa empleando las cepas *Saccharomyces cerevisiae*, ATCC® 4098™* y ATCC® 9763™*.
- Las mieles de caña no invertidas son las que tienen un mayor grado de dificultad de utilización en cuanto al transporte y almacenamiento, debido a que presentan una viscosidad un 91,25 % superior a la de las mieles de caña invertidas, y a la pérdida de azúcares mediante la cristalización.
- Se determinó que las muestras en las que se utilizó la cepa ATCC® 4098™* y la miel invertida, presentaron una mayor concentración de etanol, arrojando rendimientos de 105,4% y 103,1% según la relación de GARZÓN, y de 86.52% y 84.65% según la cantidad promedio de azúcares totales en mieles de caña.
- Respecto a las ganancias netas de las cuatro combinaciones entre los dos tipos de cepas y mieles, la combinación cepa ATCC® 4098™* - miel invertida presentó la mayor ganancia con un valor de 247.037,69 COP por unidad de Inóculo inicial, llevándolo a 2 réplicas, con un total de 64 fermentaciones de una duración de 72 horas y utilizando 6L de miel en cada una.

6. RECOMENDACIONES

- Como el etanol es un producto que seguirá adquiriendo una mayor importancia, se recomienda aplicar los conocimientos adquiridos en distintas áreas de la ingeniería química para realizar un diseño del proceso de separación y purificación del etanol, obteniéndolo con un alto grado de pureza y así poder comercializarlo a un mayor precio.
- La continuación del proyecto se puede basar en los datos obtenidos de costos, etanol producido y tipo de sustrato empleado, utilizando el conocimiento adquirido en el área de bioprocesos y microbiología industrial para obtener información del crecimiento microbiano y consumo de sustrato.
- Basándose en los resultados obtenidos en el proyecto se recomienda continuar la investigación realizando pruebas de °Brix, concentración de azúcares reductores y pH, en las mieles de caña para determinar el tiempo límite de utilización de las mieles y así poder diseñar un sistema adecuado de almacenamiento y bombeo para las mieles.
- Se le recomienda al ingenio hacer un análisis financiero que tenga en cuenta el proceso de separación, en cuanto a la adquisición del equipo y el consumo de este.

BIBLIOGRAFÍA

AGARWAL, Avinash Kumar. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. En: PROGRESS IN ENERGY AND COMBUSTION SCIENCE. vol. 33, no. 3, p. 233-271

BALAT, Mustafa; BALAT, Havva y ÖZ, Cahide. Progress in bioethanol processing. En: PROGRESS IN ENERGY AND COMBUSTION SCIENCE. vol. 34, no. 5, p. 551-573

BUZAS, Zs. DALLMANN, K. SZAJANI, B. Influence of pH on the Growth and Ethanol Production of Free and Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells. Department of Biochemistry, Jozsef Attila University, Hungria. 1988

CASAGRANDE, Aílto Antonio. Tópicos De Morfologia e Fisiologia Da Cana-De Açúcar. Funep, 1991.

CHANG, R. Química sexta edición. McGRAW-HILL.1999. Apéndice 3 p A-13.

CLARKE, Margaret A. y GODSHALL, Mary An. Chemistry and Processing of Sugarbeet and Sugarcane: Proceedings of the Symposium on the Chemistry and Processing of Sugarbeet, Denver, Colorado, April 6, 1987 and the Symposium on the Chemistry and Processing of Sugarcane, New Orleans, Louisiana, September 3-4, 1987. Elsevier, 2013.

Determination of Glucose by Titration with Fehling's Reagent. [En línea].Truman State University. [Citado 10-Enero-2017]. Disponible en internet: <http://blamp.sites.truman.edu/files/2016/01/Fehling-final.pdf>

DRAPCHO, Caye M.; NHUAN, Nghiem Phu y WALKER, Terry H. Biofuels

ENCYCLOPEDIA OF BIOPROCESS TECHNOLOGY. p. 244-249

Engineering Process Technology. McGraw-Hill New York, NY, USA, 2008

ESPINOSA, R. 1984. The alcoholic Fermentation of molasses- practical aspects. Doctoral dissertation, Century University, New Mexico, p.32-36.

FAJARDO, Erika y SARMIENTO, Sandra. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana. 2007

GARZÓN, S y HERNANDEZ, C. Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. Universidad Tecnológica de Pereira. 2009

GRAVAN, Cynthia. Diseño de una instalación destinada a los procesos de fermentación alcohólica y mamoláctica. Universidad de Cadiz, 2008

Histórico de precios, promedio nacional ponderado. [En línea]. Federación nacional de productores de panela. [Citado 3-Marzo-2017]. Disponible en internet: <http://www.fedepanela.org.co/images/precios/PP2SEP.pdf>

HONIG, Pieter. Principles of Sugar Technology, Vol I. Elsevier, Amsterdam. 1953 p.38

Ibid., Apendice 3 p. A-9c

Información general sector azucarero. [En línea]. Federación nacional de biocombustibles de Colombia. [Citado 3-Marzo-2017]. Disponible en internet: [http://www.fedebiocombustibles.com/v3/estadistica-mostrar_info-tituloAlcohol_Carburante_\(Etanol\).htm](http://www.fedebiocombustibles.com/v3/estadistica-mostrar_info-tituloAlcohol_Carburante_(Etanol).htm)

Informe de rendición de cuentas 2016-2017 “el renacer del campo”. [En línea]. Ministerio de agricultura. [Citado 3-Marzo-2017]. Disponible en internet: <https://www.minagricultura.gov.co/Documentos%20Publicos/RENDICION%20DE%20CUENTAS%20-%20INFORME%202016-2017.pdf>

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Documentación. Presentación De Tesis, Trabajos De Grado y Otros Trabajos De Investigación. NTC 1486. 6th ed. Bogotá D.C.: 2008. 42 p.

----- . Referencias Bibliográficas. Contenido, Forma y Estructura. NTC 5613. Bogotá D.C.: 2008. 38 p.

----- . Referencias Documentales para Fuentes de Información Electrónica. NTC 4490. Bogotá D.C.: 1998. 27p.

Jaques, K. A., Lyons, T. P., and Kelsall, D. R. The Alcohol Textbook. Nottingham University Press: 2003, p. 77-78.

JONES, Rodney y GREENFIELD, Paul. Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. Department of chemical engineering, University of Queensland, St Lucia. Enzyme microbiology. Technology Vol 4. Australia. 1982. p. 213

JONES, RP y GREENFIELD, PF. A review of yeast ionic nutrition. I: growth and fermentation requirements. En: PROCESS BIOCHEMISTRY. vol. 19, no. 2, p. 49-52.

LALUCE, Cecília, et al. Continuous ethanol production in a nonconventional five-stage system operating with yeast cell recycling at elevated temperatures. En:

JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. vol. 29, no. 3, p. 140-144

LOPEZ, Noe; ORLIC, Sandi. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces Cerevisiae*, *S. Kudriavzevii* and their specific hybrid. International Journal of food microbiology. 2009

MELGAR, Mario; MENESES, Adlai. EL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR EN GUATEMALA. 2014. Artemis Edinter S.A. p 336-390.

NARENDRANATH, Neelakantam y POWER, Ronan. Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. American Society for Microbiology – Applied and Environmental Microbiology. Mayo de 2005. p. 2239-2243

NIST WEBBOOK. Consultado el 27 de Abril de 2017. En línea en: <http://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C57487&Mask=2#Thermo-Condensed>

OLBRICH, H. The Molasses. Institut für Zuckerindustrie, Berlin. 1963. p 36, 40, 60

OSPINA, A. y PALACIOS, M. Efecto del cultivo de levaduras sobre la carga orgánica de los efluentes de SUCROMILES SA

OSUMI, Masako. Pressure effects on yeast cell ultrastructure: changes in the ultrastructure and cytoskeleton of the dimorphic yeast, *Candida tropicalis*. High pressure and biotechnology. 1992. p. 9-18.

Patente US 4350765 A, Method for producing ethanol with immobilized microorganism [En línea]. [Citado 20-Febrero-2017]. Disponible en internet: <https://www.google.com/patents/US4350765>

PUENTES, Adriana. Producción estimulada de alcohol a partir de mieles de caña mediante un complejo enzimático obtenido de *Rhizopus* spp. Universidad Industrial de Santander. 2008. p.39.

QUESADA, Walter F. Determinación de parámetros óptimos para la producción y aromatización de miel hidrolizada, panela soluble y azúcar. Universidad Técnica del Norte. Ibarra Ecuador. 2007

RAMIREZ, Nidia L. Evaluación de los cambios fisicoquímicos en la composición de la melaza almacenada respecto al tiempo. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2000. p. 9-10

GARZON, S. HERNANDEZ, C. Estudio comparativo de la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. Universidad tecnológica de Pereira. 2009

STEELE, D. Bernie y STOWERS, Mark D. Techniques for selection of industrially important microorganisms. En: ANNUAL REVIEWS IN MICROBIOLOGY. vol. 45, no. 1, p. 89-106

TANAKA, Kenji; HILARY, Zakpaa D. y ISHIZAKI, Ayaaki. Investigation of the utility of pineapple juice and pineapple waste material as low-cost substrate for ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. En: JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING. vol. 87, no. 5, p. 642-646

The Engineering ToolBox, consultado el: 27 de Abril de 2017. En línea en: http://www.engineeringtoolbox.com/water-thermal-properties-d_162.html

The Engineering ToolBox, consultado el: 27 de Abril de 2017. En línea en: http://www.engineeringtoolbox.com/heat-load-steam-pipes-water-d_287.html

Tiempo meteorológico Villeta, Colombia. [En línea]. [Citado 14-Junio-2017]. Disponible en internet: <http://www.accuweather.com/es/co/villeta/108238/month/108238?monyr=6/01/2017>

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R. y CHRISTINE, L. Case. Microbiology: An Introduction

WILLEY, Joanne; SHERWOOD, Linda y WOOLVERTON, Chris. Prescott's Microbiology. McGraw -Hill Higher Education, 2013.

ANEXOS

**ANEXO A.
CALCULO ECUACIONES 3 A 9**

$$\text{factor de Fehling} = \frac{\text{g glucosa}}{\text{mL solución}} * \text{mL titulación Blanco}$$

$$\text{factor de Fehling} = \frac{2,5\text{g glucosa}}{500\text{mL solución}} * 5,7\text{mL solución}$$

$$\text{factor de Fehling} = 0,0285\text{g glucosa}$$

$$[\text{Miel de caña}] = \frac{\text{factor de Fehling}}{\text{mL titulación miel de caña}} * \frac{1000\text{mL solución}}{100\text{mL Miel de caña}}$$

$$[\text{Miel de caña}] = \frac{0,0285\text{g glucosa}}{15,6\text{mL solución}} * \frac{1000\text{mL solución}}{100\text{mL Miel de caña}}$$

$$[\text{Miel de caña}] = \frac{0,01827\text{g azúcares reductores}}{\text{mL Miel de caña}}$$

$$[\text{Miel invertida de caña}] = \frac{\text{factor de Fehling}}{\text{mL titulación miel invertida}} * \frac{1000\text{mL solución}}{100\text{mL Miel invertida}}$$

$$[\text{Miel invertida de caña}] = \frac{0,0285\text{g}}{0,9\text{mL}} * \frac{1000\text{mL solución}}{100\text{mL Miel invertida}}$$

$$[\text{Miel invertida de caña}] = \frac{0,31667\text{g azúcares reductores}}{\text{mL Miel invertida}}$$

$$[\text{Miel de caña p/p}] = [\text{Miel de caña}] * \frac{1}{\rho_{\text{Miel de caña no invertida}}}$$

$$[\text{Miel de caña p/p}] = \frac{0,01827\text{g azúcares reductores}}{\text{mL Miel de caña}} * \frac{1\text{mL miel de caña}}{1,343\text{g solución}}$$

$$[\text{Miel de caña p/p}] = \frac{0,0136 \text{ g azúcares reductores}}{\text{g solución}}$$

$$\text{Pureza relativa Miel de caña} = \frac{[\text{Miel de caña p/p}]}{[^\circ\text{Brix Miel de caña no invertida}]^*}$$

$$\text{Pureza relativa Miel de caña} = \frac{\frac{0,01360 \text{ g azúcares reductores}}{\text{g solución}}}{\frac{66 \text{ g solidos solubles}}{100 \text{ g solución}}}$$

$$\text{Pureza relativa Miel de caña} = \frac{0,02061 \text{ g azúcares reductores}}{\text{g solidos solubles}}$$

$$[\text{Miel invertida de caña p/p}] = [\text{Miel invertida de caña}] * \frac{1}{\rho_{\text{Miel invertida de caña}}}$$

$$[\text{Miel invertida de caña p/p}] = \frac{0,31667 \text{ g azúcares reductores}}{\text{mL Miel invertida}} * \frac{1 \text{ mL miel invertida}}{1,42 \text{ g solución}}$$

$$[\text{Miel invertida de caña p/p}] = \frac{0,223 \text{ g azúcares reductores}}{\text{g solución}}$$

$$\text{Pureza relativa Miel invertida de caña} = \frac{[\text{Miel de caña p/p}]}{[^\circ\text{Brix Miel invertida de caña}]}$$

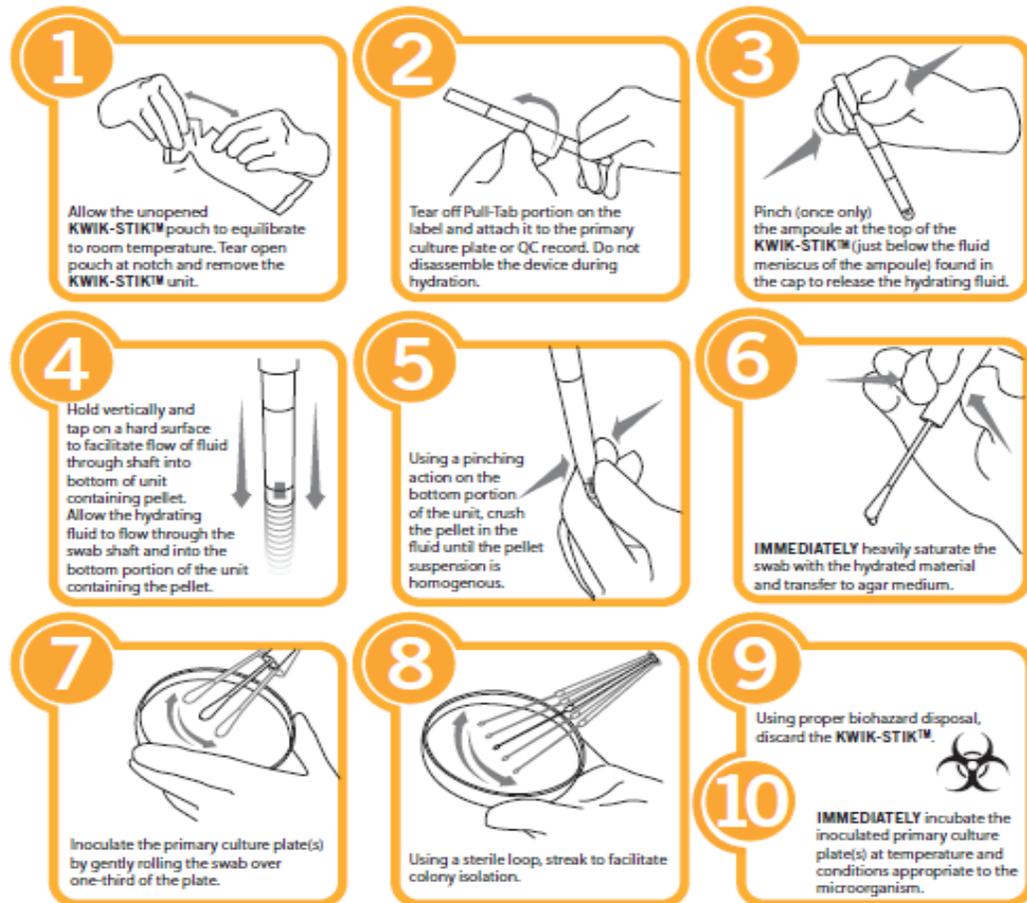
$$\text{Pureza relativa Miel invertida} = \frac{\frac{0,223 \text{ g azúcares reductores}}{\text{g solución}}}{\frac{75 \text{ g solidos solubles}}{100 \text{ g solución}}}$$

$$\text{Pureza relativa Miel invertida} = \frac{0,2954 \text{ g azúcares reductores}}{\text{g solidos solubles}}$$

ANEXO B. INSTRUCCIONES DE USO KWIK-STICK

KWIK-STIK™ Instructions for Use

Please add the packaging option to the catalog number when placing an order: P = KWIK-STIK™ 2 Pack,
K = KWIK-STIK™ 6 Pack. Example: 0335P, 0335K



Visit www.microbiologics.com or call 320.253.1640 to place your order!

ANEXO C. CERTIFICADO CEPA ATCC 4098



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p>Specifications Microorganism Name: Saccharomyces cerevisiae Catalog Number: 0534 Lot Number: 534-12 Reference Number: ATCC® 4098™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 2</p>	<p>Expiration Date: 2017/9/30 Release Information: Quality Control Technologist: Marie M Howe Release Date: 2015/10/16</p>
Performance	
<p>Macroscopic Features: Medium to large, circular, convex, entire edge, cream, smooth with waxy appearance.</p> <p>Microscopic Features: Gram positive, ovoidal, budding yeast cells.</p>	<p>Medium: SAB DEX EMMONS</p> <p>Method: Gram Stain (1)</p>
<p>ID System: Vitek YST (1) See attached ID System results document.</p>	
 Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE	
<p><small>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p>	
	<p><small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small></p>
 ACCREDITED	<p><small>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small></p>
<p>TESTING CERT #2655.01</p>	

bioMerieux Customer: 05871
System #: C21105

Laboratory Report

Printed Oct 16, 2015 07:21 CDT
Printed by: mmh
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: 534-12

Bench: MH

Card Type: YST Testing Instrument: 00000A6D6328 (1116)

Bionumber: 4002145001104100

Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card: YST	Lot Number: 243356820	Expires: Sep 20, 2016 13:00 CDT
	Completed: Oct 16, 2015 06:03 CDT	Status: Final	Analysis Time: 18.25 hours
Selected Organism	99% Probability Saccharomyces cerevisiae		Confidence: Excellent identification
SRF Organism	Bionumber: 4002145001104100		
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s)			

Biochemical Details																	
3	LysA	-	4	IMLTa	-	5	LeuA	+	7	ARG	-	10	ERYa	-	12	GLYLa	-
13	TyrA	-	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	-	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	+	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	-	38	ISBEa	-
39	IRHAa	-	40	XLTa	-	42	dSORa	-	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	-
47	dTURa	+	48	dTREa	-	49	NO3a	-	51	IARAa	-	52	dGATa	-	53	ESC	-
54	IGLTa	-	55	dXYLa	-	56	LATa	+	58	ACEa	+	59	CITa	-	60	GRTas	-
61	IPROa	-	62	2KGa	-	63	NAGa	-	64	dGNTa	-						

**ANEXO D.
CERTIFICADO CEPA ATCC 9763**



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Saccharomyces cerevisiae Catalog Number: 0899 Lot Number: 699-92 Reference Number: ATCC® 9763™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4	Expiration Date: 2018/4/30 Release Information: Quality Control Technologist: Tracy A Blenker Release Date: 2016/6/1
--	---

Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, circular, dull, white to cream colonies.	Medium: SAB DEX EMMONS
Microscopic Features: Gram positive, yeast cells, oval to spherical, spores are gram negative when present.	Method: Gram Stain (1)

ID System: Vitek YST (1) See attached ID System results document.
 Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.



(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

TESTING CERT #2655.01

Microbiologics

bioMerieux Customer: 1012555
System #: 521711

Laboratory Report

Printed May 31, 2016 14:56 CDT
Printed by: tab

Isolate Group: 699 92-1

Bench: TB

Card Type: YST Testing Instrument: 000017919CE3 (15220)

Bionumber: 4002145005104100

Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card: YST	Lot Number: 243385220	Expires: Jul 1, 2017 13:00 CDT
	Completed: May 27, 2016 08:16 CDT	Status: Final	Analysis Time: 18.50 hours
Selected Organism	98% Probability <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Confidence: Excellent identification
SRF Organism	Bionumber: 4002145005104100		
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AGLU(13).			

Biochemical Details																	
3	LysA	-	4	IMLTa	-	5	LeuA	+	7	ARG	-	10	ERYa	-	12	GLYLa	-
13	TyrA	-	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	-	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	+	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	-	38	ISBEa	-
39	IRHAa	-	40	XLTa	-	42	dSORa	-	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+
47	dTURa	+	48	dTREa	-	49	NO3a	-	51	IARa	-	52	dGATa	-	53	ESC	-
54	IGLTa	-	55	dXYLa	-	56	LATa	+	58	ACEa	+	59	CITa	-	60	GRTas	-
61	IPROa	-	62	2KGa	-	63	NAGa	-	64	dGNTa	-						

ANEXO E. FICHA CEPA ATCC 4098



Product Sheet

Saccharomyces cerevisiae (ATCC® 4098™)

Please read this FIRST

Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section



 Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC® 4098™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 2

Description

Strain Designation: [657, IFO 1661]

Deposited Name: *Saccharomyces ellipsoideus* Reess

Product Description: An ampoule containing viable cells (may include spores and mycelia) suspended in cryoprotectant.

Propagation

The information recommended in this section is to assist users in obtaining living culture(s) for their studies. The recommendation does not imply that the conditions or procedures provided below are optimum. Experienced researchers may initiate the growth of a culture in their own way.

ATCC® Medium 200: YM agar or YM broth
ATCC® Medium 28: Emmons' modification of Sabouraud's agar
ATCC® Medium 1245: YEPD

Growth Conditions

Temperature: 25°C to 30°C

Atmosphere: Typical aerobic

Recommended Procedure

For freeze-dry (lyophilized) ampoules:

1. Open an ampoule according to enclosed instructions.
2. From a single test tube of **sterile distilled water** (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a sterile pipette and apply directly to the pellet. Stir to form a suspension.
3. Aseptically transfer the suspension back into the test tube of sterile distilled water.
4. Let the test tube sit at room temperature (25°C) undisturbed for at least 2 hours; longer (e.g., overnight) rehydration might increase viability of some fungi.
5. Mix the suspension well. Use several drops (or make dilutions if desired) to inoculate recommended solid or liquid medium. Include a control that receives no inoculum.
6. Incubate the inoculum at the propagation conditions recommended.
7. Inspect for growth of the inoculum/strain regularly. The sign of viability is noticeable typically after 1-2 days of incubation. However, the time necessary for significant growth will vary from strain to strain.

Colony and Cell Morphology: After 4 days on YM at 25°C, colonies are white, smooth, butyrous. Cells are ovoidal, single, in pairs and small clusters; pseudohyphae absent.

Notes

No special notes.

Additional, updated information on this product may be available on the ATCC® web site at www.atcc.org.

DNA Sequence

18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
GGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTAATAATTTGAAAAATGGATTTTTTTG
TTTGGCAAAGCATGAGACTTTACTGGCAAGAAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTG
CGCTAAGTGCCTGCTGCTAGGCTTGTAAAGTTCTTTCTTCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTG
TGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACT
TTTTCTTTGGCATTCGAGCAATCGGGCCAGAGGTAAACAACAACAATTTATCTATTATTAA
ATTTTGTCAAACAATTTTGTAACTGGAAATTTTAAATATTAACATTTCAACAACGGATC
TCTTGTTCTCGCATCGATGAAAGCAAGCAAGCAAGTGCATACGTAATGTGAATTCGACAATCCGTG
AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATCCAGGGGGCATGCCGTTTGAGCGTCATT
TCCTTCTCAAACAATTTGTTGGTAGTGAGTACTCTTTGGAGTTAACTTGAATTTGCTGGCCTTTTCA
TTGGATGTTTTTTCCAAAGAGAGTTTCTCTGCGTGTGGAGGTATAATGCAAGTACGGCTGTTTAG
GTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGT
CTAGGCGAACAAATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCAGCTGAACCTTAAGCATAT
CAATAA

D1D2 region of the 26S ribosomal RNA gene

ATATCAATAAGCGGAGGAAAGAAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAAACGGCGAGTGAAGCGGCAAA
AGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGSCCGT



Product Sheet

Saccharomyces cerevisiae (ATCC® 4098™)

Please read this FIRST



Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC® 4098™)

```
TCCTTGTCTATGTTCCCTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGT
TCCTTTGTAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCAT
CTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACT
TTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGT
TTGTGCCCTCTGCTCCTGTGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATAGTTTGGTGGCAG
GATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATCTGCAGCTGGGA
CTGAGGACTGCCGACGTAAGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCCG
```

Isolation

German white wine yeast

References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.

© ATCC 2016. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [04/27]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

ANEXO F. FICHA CEPA ATCC 9763



ATCC

Product Sheet

Saccharomyces cerevisiae
(ATCC® 9763™)

Please read this FIRST

Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section

Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC® 9763™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 2

Description

Strain Designation: NRRL Y-567 [CBS 2978, CBS 5900, CCY 21-4-48, CCY 21-4-54, NCTC 10716, NCTC 7239, NCYC 87, Pattee 6, PCI M-50]

Deposited Name: *Saccharomyces cerevisiae* Hansen

Product Description: An ampoule containing viable cells suspended in cryoprotectant.

Propagation

The information recommended in this section is to assist users in obtaining living culture(s) for their studies. The recommendation does not imply that the conditions or procedures provided below are optimum. Experienced researchers may initiate the growth of a culture in their own way.

ATCC® Medium 200: YM agar or YM broth

ATCC® Medium 28: Emmons' modification of Sabouraud's agar

ATCC® Medium 1245: YEPD

Growth Conditions

Temperature: 30°C

Atmosphere: Typical aerobic

Recommended Procedure

For freeze-dried (lyophilized) ampoules:

1. Open an ampoule according to enclosed instructions.
2. From a single test tube of **sterile distilled water** (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a sterile pipette and apply directly to the pellet. Stir to form a suspension.
3. Aseptically transfer the suspension back into the test tube of sterile distilled water.
4. Let the test tube sit at room temperature (25°C) undisturbed for **at least 2 hours**; longer (e.g., overnight) rehydration might increase viability of some fungi.
5. Mix the suspension well. Use several drops (or make dilutions if desired) to inoculate recommended solid or liquid medium. Include a control that receives no inoculum.
6. Incubate the inoculum at the propagation conditions recommended.
7. Inspect for growth of the inoculum/strain regularly. The sign of viability is noticeable typically after 1-2 days of incubation. However, the time necessary for significant growth will vary from strain to strain.

Colony and Cell Morphology: On YM agar after 3 days at 25°C, colonies are cream colored, smooth, usually flat, occasionally raised in the centerpart. Older colonies may be slightly tan and opaque. Cells are ovoid, globose, budding, usually isolated or clustered, 3.0-8.0 by 5.0-10.0 µm.

Notes

No special notes.

Additional, updated information on this product may be available on the ATCC® web site at www.atcc.org.

DNA Sequence

18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
TATTCAATTAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACGGAAATTTAAAATATTTAAAACTTTCAA
CAACGGATCTCTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCATACGTAATGTGAATTCGAG
AATTCCTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTG
AGCGTCATTTGCTTCTCAAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAATTCGTC
GCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAAGTAAATGCAAGTACG
GTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGA
AGAGAGCGCTAGGC GAACAA

D1D2 region of the 26S ribosomal RNA gene

ATATCAATAAGCGGAGGAAAGAAACC AACCGGGATTGCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC AAA
AGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGT
TCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCAGGAGTGC GGT
TCTTTGTAAGTGCCTTCGAAGAGTCAAGTGTGTTGGGAATGCAGCTCAAGTGGGTGGTAAATTCAT
CTAAAGCTAAATATTGCCGAGAGACC GATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAACT
TTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGT



Product Sheet

Saccharomyces cerevisiae (ATCC® 9763™)

Please read this FIRST



Storage Temp.

Frozen: -80°C or colder

Freeze-Dried: 2°C to 8°C

Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC® 9763™)

TTGTGCCCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCGCATTTCACTGGCCAGCATCAGTTTGGTGGCAG
GATAAATCCATAGGAATGTAAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCAGCTGGGA
CTGAGGACTGCGACGTAAGTCAAGGATGCTGGCATAATGTTATATGCCGC



Isolation

Distillery yeast



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to ensure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org
© ATCC 2016. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [05/31]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

ANEXO G. INFORME DE CROMATOGRAFIAS

==== Shimadzu GCMSsolution Browser Report ====

CENTRO DE GESTION INDUSTRIAL LABORATORIOS DE QUIMICA ANALISIS DEL CONTENIDO DE ETANOL EN MIELES DE CANA FERME

Method

[Comment]

==== Analytical Line 1 =====

[GC-2010]

Column Oven Temp. :50.0 °C
Injection Temp. :200.00 °C
Injection Mode :Split
Flow Control Mode :Linear Velocity
Pressure :174.4 kPa
Total Flow :92.3 mL/min
Column Flow :1.14 mL/min
Linear Velocity :30.0 cm/sec
Purge Flow :0.0 mL/min
Split Ratio :80.0
High Pressure Injection :OFF
Carrier Gas Saver :ON
Carrier Gas Saver Split Ratio :1.0
Carrier Gas Saver Time :2.00 min
Splitter Hold :OFF

Oven Temp. Program	Temperature(°C)	Hold Time(min)
Rate		
-	50.0	1.00
7.00	120.0	1.00
70.00	180.0	0.00

< Ready Check Heat Unit >

Column Oven : Yes
SPL1 : Yes
MS : Yes

< Ready Check Detector(FTD) >

< Ready Check Baseline Drift >

< Ready Check Injection Flow >

SPL1 Carrier : Yes
SPL1 Purge : Yes

< Ready Check APC Flow >

< Ready Check Detector APC Flow >

External Wait : Yes
Equilibrium Time :1.0 min

[GC Program]

[GCMS-QP2010 SE]

IonSourceTemp :180.00 °C
Interface Temp. :180.00 °C
Solvent Cut Time :1.00 min
Detector Gain Mode :Relative
Detector Gain :+0.00 kV
Threshold :0

[MS Table]

--Group 1 - Event 1--

Start Time :1.00min
End Time :8.00min
ACQ Mode :Scan
Event Time :0.30sec
Scan Speed :113
Start m/z :20.00
End m/z :50.00

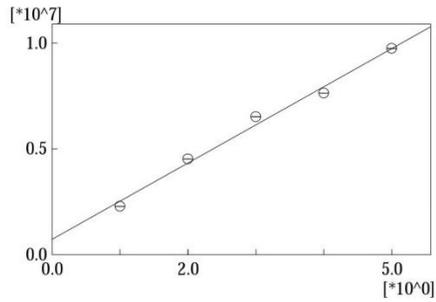
Sample Inlet Unit :GC

[MS Program]

Use MS Program :OFF

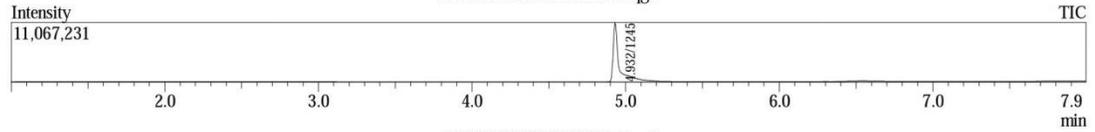
Calibration

ID#:1 Mass:31.00 Name:Ethanol
 f(x)=1804406.800000*x+729156.800000
 r1=0.994900 r2=0.989826
 MeanRF:2115786.34 RFS:175855.16 RFRSD:8.31
 Curve Type:Least Square Method
 Zero Through:Not Through
 Weighted Regression:None
 External Standard

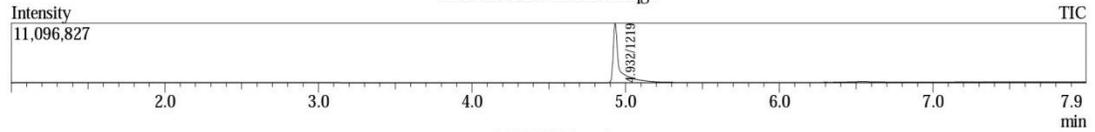


#	Conc. (%)	Mean Area
1	1.000	2287687.00
2	2.000	4517039.00
3	3.000	6522038.00
4	4.000	7633763.00
5	5.000	9751359.00

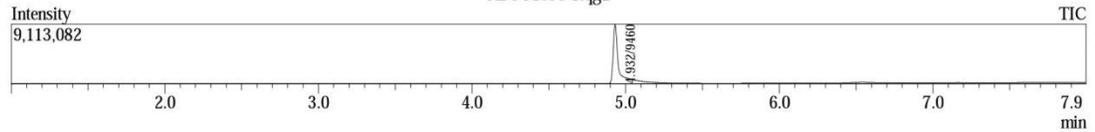
Summary(Concentration)
 ATCC4098 INVERTIDA-1.qgd



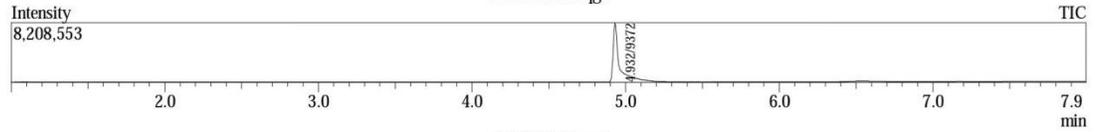
ATCC4098 INVERTIDA-2.qgd



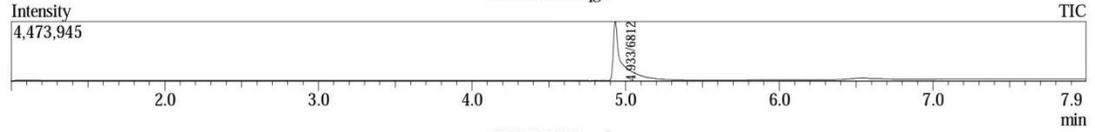
ATCC4098-1.qgd



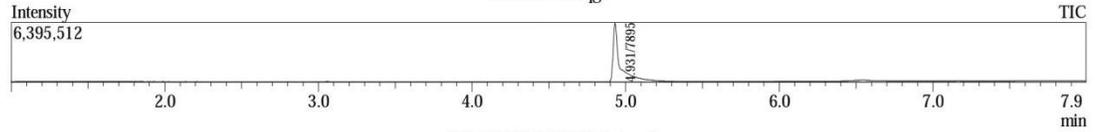
ATCC4098-2.qgd



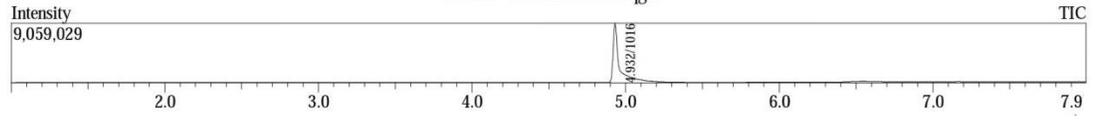
ATCC9763-1.qgd

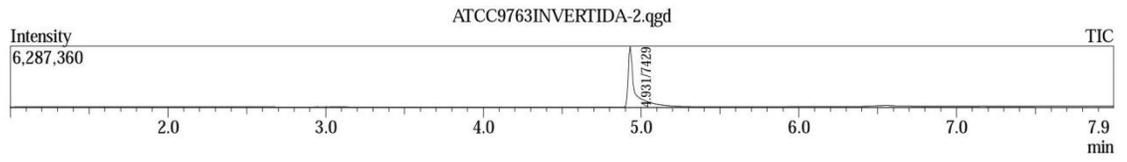


ATCC9763-2.qgd



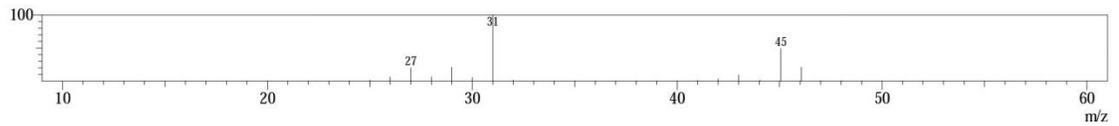
ATCC9763INVERTIDA-1.qgd





Title	Sample Name	Sample ID	Ethanol
ATCC4098 INVERTIDA-1.qgd	Invertida-1	ATCC4098-1	12.994
ATCC4098 INVERTIDA-2.qgd	Invertida-2	ATCC4098-2	12.712
ATCC4098-1.qgd	No invertida-1	ATCC4098-1	9.678
ATCC4098-2.qgd	No invertida-2	ATCC4098-2	9.581
ATCC9763-1.qgd	No invertida-1	ATCC9763-1	6.742
ATCC9763-2.qgd	No invertida-2	ATCC9763-2	7.944
ATCC9763INVERTIDA-1.qgd	Invertida-1	ATCC9763-1	10.458
ATCC9763INVERTIDA-2.qgd	Invertida-2	ATCC9763-2	7.427
Maximum			12.994
Minimum			6.742

Spectrum Check



**ANEXO H.
CALCULOS ECUACIONES 10-16**

$$\text{Masa de miel} = \text{Volumen de miel} * \rho$$

$$\text{Masa de miel (invertida)} = 1\text{L} * \frac{1.42\text{kg}}{\text{L}}$$

$$\text{Masa de miel (invertida)} = 1,42\text{kg}$$

$$\text{Masa de miel (no invertida)} = 1.14\text{L} * \frac{1.343\text{kg}}{\text{L}}$$

$$\text{Masa de miel (no invertida)} = 1,53102\text{kg}$$

$$\text{Volumen de etanol teorico} = \text{Masa de miel} * \frac{33\text{L etanol}}{100\text{kg de miel}}$$

$$\text{Volumen de etanol teorico (invertida)} = 1.42\text{kg} * \frac{33\text{L etanol}}{100\text{kg de miel}}$$

$$\text{Volumen de etanol teorico (invertida)} = 0.4686\text{L}$$

$$\text{Volumen de etanol teorico (no invertida)} = 1,53102\text{kg} * \frac{33\text{L etanol}}{100\text{kg de miel}}$$

$$\text{Volumen de etanol teorico (no invertida)} = 0.50524\text{L}$$

$$\% \text{Etanol } \frac{V}{V} \text{ segun relación} = \frac{\text{Volumen de etanol teorico}}{5L} * 100$$

$$\% \text{Etanol } \frac{V}{V} \text{ segun relación (invertida)} = \frac{0.4686L}{5L} * 100$$

$$\% \text{Etanol } \frac{V}{V} \text{ segun relación (invertida)} = 9.37\%$$

$$\% \text{Etanol } \frac{V}{V} \text{ segun relación (no invertida)} = \frac{0.50524L}{5L} * 100$$

$$\% \text{Etanol } \frac{V}{V} \text{ segun relación (no invertida)} = 10.10\%$$

$$\text{Masa azucares reductores} = [\text{azucares reductores}] * V$$

$$\text{Masa azucares reductores (Invertida)} = 0,31667g \text{ azucar reductor/mL} * 1000mL$$

$$\text{Masa azucares reductores (Invertida)} = 316.67g$$

$$\text{Masa azucares reductores (No Invertida)} = 0,01827g \text{ azucar reductor/mL} * 1140mL$$

$$\text{Masa azucares reductores (No Invertida)} = 20.83g$$

$$\text{Masa de azucares totales} = \text{Masa de miel} * 0.62$$

$$\text{Masa de azucares totales (Invertida)} = 1420g * 0.62 = 880,4g$$

$$\text{Masa de azúcares totales (No Invertida)} = 1531g * 0.62 = 949,2g$$

$$\text{Masa de etanol} = \text{Masa de azúcares reductores} * \frac{92.14g \text{ etanol}}{180.16g \text{ dextrosa}}$$

Para azúcares reductores

$$\text{Masa de etanol (Invertida)} = 316.67g * \frac{92.14g \text{ etanol}}{180.16g \text{ dextrosa}} = 161.96g$$

$$\text{Masa de etanol (No Invertida)} = 20.83g * \frac{92.14g \text{ etanol}}{180.16g \text{ dextrosa}} = 10.65g$$

Para azúcares totales

$$\text{Masa de etanol (Invertida)} = 880,4g * \frac{92.14g \text{ etanol}}{180.16g \text{ dextrosa}} = 450.27g$$

$$\text{Masa de etanol (No Invertida)} = 942.2g * \frac{92.14g \text{ etanol}}{180.16g \text{ dextrosa}} = 481.87g$$

$$\%Etanol \frac{v}{v} \text{ teorico} = \frac{\text{Masa de etanol}}{5L} * \frac{1}{\rho} * 100$$

Para azúcares reductores

$$\%Etanol \frac{v}{v} \text{ (Invertida)} = \frac{161.96g}{5000mL} * \frac{1}{\frac{0.789g}{mL}} * 100 = 4.11\%$$

$$\%Etanol \frac{v}{v} \text{ (No Invertida)} = \frac{10.65g}{5000mL} * \frac{1}{\frac{0.789g}{mL}} * 100 = 0.27\%$$

Para azúcares totales

$$\%Etanol \frac{v}{v} (Invertida) = \frac{450.27g}{5000mL} * \frac{1}{\frac{0.789g}{mL}} * 100 = 11.41\%$$

$$\%Etanol \frac{v}{v} (No Invertida) = \frac{481.87g}{5000mL} * \frac{1}{\frac{0.789g}{mL}} * 100 = 12.31\%$$

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL LUMIERES

Nosotros Laura Aguilar Giannini y Daniel Felipe Avila Flórez en calidad de titulares de la obra Evaluación de la producción de etanol con dos cepas comerciales y dos tipos de mieles de caña provenientes de la región de Gualivá, departamento de Cundinamarca, elaborada en el año 2016 , autorizamos al **Sistema de Bibliotecas de la Fundación Universidad América** para que incluya una copia, indexe y divulgue en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres, la obra mencionada con el fin de facilitar los procesos de visibilidad e impacto de la misma, conforme a los derechos patrimoniales que nos corresponden y que incluyen: la reproducción, comunicación pública, distribución al público, transformación, en conformidad con la normatividad vigente sobre derechos de autor y derechos conexos (Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, entre otras).

Al respecto como Autores manifestamos conocer que:

- La autorización es de carácter no exclusiva y limitada, esto implica que la licencia tiene una vigencia, que no es perpetua y que el autor puede publicar o difundir su obra en cualquier otro medio, así como llevar a cabo cualquier tipo de acción sobre el documento.
- La autorización tendrá una vigencia de cinco años a partir del momento de la inclusión de la obra en el repositorio, prorrogable indefinidamente por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales del autor y podrá darse por terminada una vez el autor lo manifieste por escrito a la institución, con la salvedad de que la obra es difundida globalmente y cosechada por diferentes buscadores y/o repositorios en Internet, lo que no garantiza que la obra pueda ser retirada de manera inmediata de otros sistemas de información en los que se haya indexado, diferentes al Repositorio Digital Institucional – Lumieres de la Fundación Universidad América.
- La autorización de publicación comprende el formato original de la obra y todos los demás que se requiera, para su publicación en el repositorio. Igualmente, la autorización permite a la institución el cambio de soporte de la obra con fines de preservación (impreso, electrónico, digital, Internet, intranet, o cualquier otro formato conocido o por conocer).
- La autorización es gratuita y se renuncia a recibir cualquier remuneración por los usos de la obra, de acuerdo con la licencia establecida en esta autorización.
- Al firmar esta autorización, se manifiesta que la obra es original y no existe en ella ninguna violación a los derechos de autor de terceros. En caso de que el trabajo haya sido financiado por terceros, el o los autores asumen la responsabilidad del cumplimiento de los acuerdos establecidos sobre los derechos patrimoniales de la obra.
- Frente a cualquier reclamación por terceros, el o los autores serán los responsables. En ningún caso la responsabilidad será asumida por la Fundación Universidad de América.
- Con la autorización, la Universidad puede difundir la obra en índices, buscadores y otros sistemas de información que favorezcan su visibilidad.

Conforme a las condiciones anteriormente expuestas, como autores establezco establecemos las siguientes condiciones de uso de nuestra obra de acuerdo con la **licencia Creative Commons** que se señala a continuación:

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

	Atribución- no comercial- sin derivar: permite distribuir, sin fines comerciales, sin obras derivadas, con reconocimiento del autor.	<input checked="" type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial: permite distribuir, crear obras derivadas, sin fines comerciales con reconocimiento del autor.	<input type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial – compartir igual: permite distribuir, modificar, crear obras derivadas, sin fines económicos, siempre y cuando las obras derivadas estén licenciadas de la misma forma.	<input type="checkbox"/>

Licencias completas: http://co.creativecommons.org/?page_id=13

Siempre y cuando se haga alusión de alguna parte o nota del trabajo, se debe tener en cuenta la correspondiente citación bibliográfica para darle crédito al trabajo y a sus autores.

De igual forma como autores autorizamos la consulta de los medios físicos del presente trabajo de grado así:

AUTORIZAMOS	SI	NO
La consulta física (sólo en las instalaciones de la Biblioteca) del CD-ROM y/o Impreso	X	
La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer para efectos de preservación	X	

Información Confidencial: este Trabajo de Grado contiene información privilegiada, estratégica o secreta o se ha pedido su confidencialidad por parte del tercero, sobre quien se desarrolló la investigación. En caso afirmativo expresamente indicaremos, en carta adjunta, tal situación con el fin de que se respete la restricción de acceso.	SI	NO
		X

Para constancia se firma el presente documento en Bogotá D.C, a los 29 días del mes de Julio del año 2017.

LOS AUTORES:

Autor 1

Nombres	Apellidos
Laura	Aguilar Giannini
Documento de identificación No	Firma
1032469646	

Autor 2

Nombres	Apellidos
Daniel Felipe	Avila Flórez
Documento de identificación No	Firma
1073242667	