



UNIVERSIDAD LAYCA “ELOY ALFARO” DE MANABI

FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL

TESIS DE GRADO

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERO INDUSTRIAL

MENCIÓN EN:

GENSTIÓN EMPRESARIAL Y PROYECTOS

TEMA:

**“APLICACIÓN DE UN DISEÑO EXPERIMENTAL EN LA
PRODUCCIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO EN LA MELAZA DE CAÑA
DE AZÚCAR EN LOS PROCESOS ARTESANALES EN LA CIUDAD
DE MANTA”**

DIRECTORA DE TESIS

ING. ANGÉLICA INDACOCHEA VÁSQUEZ

AUTOR:

JOSÉ CRISTÓBAL MACÍAS MACÍAS

MANTA – MANABI – ECUADOR

2015 – 2016



UNIVERSIDAD LAYCA “ELOY ALFARO” DE MANABI

FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL

TESIS DE GRADO

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERO INDUSTRIAL

MENCIÓN EN:

GENSTIÓN EMPRESARIAL Y PROYECTOS

TEMA:

“APLICACIÓN DE UN DISEÑO EXPERIMENTAL EN LA
PRODUCCIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO EN LA MELAZA DE CAÑA
DE AZÚCAR EN LOS PROCESOS ARTESANALES EN LA CIUDAD
DE MANTA”

DIRECTORA DE TESIS

ING. ANGÉLICA INDACOCHEA VÁSQUEZ

AUTOR:

JOSÉ CRISTÓBAL MACÍAS MACÍAS

MANTA – MANABI – ECUADOR

2015 – 2016

CERTIFICACIÓN

Ing. Angélica Indacochea, catedrática de la Facultad de Ingeniería Industrial de la Universidad Laica “Eloy Alfaro de Manabí”; en calidad de Directora de tesis, certifico.

Que el trabajo fue desarrollado bajo mi dirección, orientación y supervisión; sin embargo el proceso investigativo, los conceptos y resultados son exclusiva responsabilidad del graduado; Macías Macías José Cristóbal, cuya tesis tiene como tema **“APLICACIÓN DE UN DISEÑO EXPERIMENTAL EN LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO EN LA MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR EN LOS PROCESOS ARTESANALES EN LA CIUDAD DE MANTA”, DURANTE EL PERIODO 2015- 2016”**.

Bajo la dirección del suscrito habiendo cumplido con las disposiciones establecidas para efecto.

ING. ANGÉLICA INDACOCHEA

DIRECTORA DE TESIS

TESIS DE GRADO

“APLICACIÓN DE UN DISEÑO EXPERIMENTAL EN LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO EN LA MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR EN LOS PROCESOS ARTESANALES EN LA CIUDAD DE MANTA 2015- 2016”

Sometida a consideración del Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ingeniería Industrial de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, como requisito para obtener el título de:

INGENIERO INDUSTRIAL

Aprobado por el Tribunal Examinador:

Ing. Emilio Loor

DECANO

Ing. Angélica Indacochea

DIRECTORA DE TESIS

JURADO EXAMINADOR

JURADO EXAMINADOR

DEDICATORIA

A mi familia por apoyarme en todo momento, por darme siempre los consejos que me sirvieron de mucho para mi formación profesional y en especial a mi hermana María Paola Macías por estar siempre hay quedo muy agradecido contigo en todo momento estuviste cuando más te necesitaba, aquellas personas que contribuyeron con su colaboración y pudiera llegar a culminar esta profesión.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme fuerzas y guiarme en todo momento y haberme permitido llegar a terminar esta esta meta.

A mi hermana María Paola Macías M. Por qué sé que estuviste hay cuando más te necesitaba por apoyarme siempre.

Gratificó la ayuda a la Ing. Angélica Indacochea Vásquez por su invaluable guía y orientación y sugerencias en el desarrollo de esta investigación como directora de tesis

Al Ing. Amado Alcívar por su guía sugerencias en el desarrollo de la investigación

Al Ing. Cesar López Zambrano por haberme sido mi guía en el laboratorio.

A la facultad de Ciencias agropecuarias de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí por haberme permitido realizar el desarrollo práctica de la investigación de la tesis en sus laboratorios.

RESPONSABILIDAD DEL AUTOR DE TESIS

Yo José Cristóbal Macías Macías soy responsables por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en ésta tesis, corresponden exclusivamente al autor, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado corresponderá a la Universidad Laica Eloy Alf aro de Manabí”

José Cristóbal Macías Macías

TABLA DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN	IV
AGRADECIMIENTO	VII
RESPONSABILIDAD DEL AUTOR DE TESIS	VIII
RESUMEN	XVI
CAPITULO I	1
1. INTRODUCCIÓN DEL PROYECTO	1
1.1. Situación del problema	2
1.2. Formulación del problema	3
1.3. Justificación	3
1.4. OBJETIVOS	4
1.4.1. Objetivo general	4
1.4.2. Objetivo específicos	4
1.5. Hipótesis	5
1.5.1. VARIABLES	5
1.5.2. Dependiente	5
1.5.3. Independiente	5
CAPITULO II	6
2. MARCO TEORICO	6
2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación	6
2.2. ANTECEDENTE DE LA INVESTIGACIÓN	7
2.3. BASES TEÓRICAS	12
2.3.1.1. Melaza de caña de azúcar	12

2.3.1.2.	Definición	12
2.3.1.3.	Obtención.....	12
2.3.1.4.	Propiedades Físicas – químicas	13
2.3.1.5.	Composición de la melaza de caña de azúcar	13
2.3.1.6.	Usos generales de la melaza de caña	15
2.3.2.	Factores que intervienen en el proceso de fermentación	15
2.3.2.1.	Cultivo Iniciador.....	15
2.3.2.2.	Levaduras y clasificación.....	15
2.3.2.3.	Clasificación.....	16
2.3.2.4.	Saccharomyces cerevisiae	17
2.3.2.5.	Saccharomyces uvaruní.....	17
2.3.2.6.	Fuentes nutricionales como fuentes de nitrógeno.....	17
2.3.2.7.	Urea	17
2.3.2.8.	Sulfato de amonio	18
2.3.2.9.	Nitrato de potásico	18
2.3.2.10.	Oxígeno.....	19
2.3.2.11.	PH del mosto	19
2.3.2.12.	Concentración de azúcar	20
2.3.2.13.	Temperatura	20
2.3.2.14.	Temperatura de fermentación	21
2.3.3.	Producto final obtenido de la melaza de la caña de la caña de azúcar.....	21
2.3.3.1.	Alcoholes	21
2.3.4.	Fundamentos bioquímicos de la fermentación alcohólica	23

2.3.4.1.	Producción de alcohol etílico	24
2.3.4.2.	La fermentación alcohólica.....	24
2.3.4.3.	Desarrollo de la fermentación	25
2.3.4.4.	Procesos de fermentación	25
2.3.4.5.	Mecanismo de fermentación.....	26
2.3.5.	Técnicas de destilación de alcohol	27
2.3.5.1.	Destilación simple	27
2.3.5.2.	Destilación fraccionada.....	27
2.3.6.	Tipos de diseño experimental, características y ventajas	27
2.3.6.1.	Definición.....	27
2.3.6.2.	Experimento	28
2.3.6.3.	Clasificación y selección de los diseños experimentales.....	28
2.3.6.4.	Diseño completamente al azar y anova (con un solo factor).	29
2.3.6.5.	Diseño en bloque completo al azar.....	30
2.3.6.6.	Diseño cuadrado latino.....	31
2.3.6.7.	Diseño grecolatino	32
2.3.6.8.	Diseño factoriales.....	33
CAPITULO III.....		34
3. METODOLOGIA.....		34
3.1. Características del área experimental		34
3.1.1. Ubicación del área de estudio		34
3.2. Determinación de las variables experimentales		34
3.2.1. Factores en estudio		34

3.3. Unidades experimentales del diseño.....	35
3.3.1. Análisis estadístico.....	35
3.3.2. Análisis funcional	35
3.4. Diseño experimental	35
3.4.1. Característica del diseño experimental.....	35
3.4.2. Tratamientos	36
3.4.2.1. Tratamientos a estudiar	36
3.4.2.2. Matriz del diseño experimental.....	39
3.4.3. Evaluación de las variables en el experimento.....	39
3.4.3.1. Sólidos solubles (° Brix)	39
3.4.3.2. PH.....	40
3.4.3.3. Nutrientes.....	40
3.4.3.4. Producto final (alcohol etílico).....	41
CAPITULO IV	42
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	42
4.1. Proceso experimental para la fermentación.....	42
4.1.1. Pruebas pilotos.....	42
4.1.2. Dilución de la melaza	42
4.1.3. Preparación del mosto	42
4.1.4. Preparación del inóculo inicial para determinar el tipo de levadura	43
4.1.5. Preparación de las soluciones para los tratamientos	43
4.1.6. Hidratación de la levadura activa.....	47
4.1.7. Inicio de la fermentación.....	48

4.1.8. Recuperación de la levadura	48
4.1.9. Método de destilación para determinación del alcohol etílico	49
4.2. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	51
4.2.1. Análisis Estadísticos de la evaluación de las condiciones de fermentación a diferentes condiciones de °Brix y temperatura.....	52
4.3. Contraste de hipótesis	59
4.3.1. Confirmación de la información obtenida en Excel mediante el Software Estadístico Minitab 16.....	60
4.3.2. Gráfico de Medias	61
4.3.3. Método de Tukey	62
4.3.4. Balance de materia para obtener los rendimientos alcohólicos ...	64
4.3.4.1. Rendimiento de alcohol para el primer grupo de tratamiento	64
4.3.4.2. Rendimiento de alcohol para el segundo grupo de tratamiento	65
4.3.4.3. Rendimiento de alcohol para el tercer grupo de tratamientos.	66
CONCLUSIONES	67
RECOMENDACIONES	68
BIBLIOGRAFIA.	69
ANEXOS	71

INDICE DE CUADROS

CUADRO 2.1: Composición de la miel final de caña.....	14
CUADRO 2.2: Esquema de los factores en estudio	35
CUADRO 2.3: Tratamientos a estudiar	36
CUADRO 2.4 Aleatorización de todos los posibles datos del diseño cuadrado latino	37
CUADRO 2.5 Aleatorización de datos para la construcción de la matriz del diseño experimental.....	38
CUADRO 2. 6 Esquema de la matriz del diseño experimental.....	39
CUADRO 2. 7: Cálculo para la determinación de soluto y solvente para las soluciones.....	45
CUADRO 2.8 : Diagrama de proceso para la preparación de los tratamientos...	46
CUADRO 2.9 : Procedimiento a seguir para la hidratación dela levadura.....	47
CUADRO 2.10 : Diagrama de proceso para la determinación de alcohol etílico.	50
CUADRO 4. 11 Diagrama de cálculo estadístico del diseño experimental.....	58
CUADRO 4.12 Análisis de varianza para los factores tipo de nutrientes, °Brix disminuidos y temperatura al evaluar el proceso de fermentación alcohólica.	59

INDICE DE GRAFICOS

GRAFICO 4.1 . Representación Gráfica de la Variación de la concentración de la concentración de solidos (°Brix).....	52
GRAFICO 4.2. Representación gráfica de la variación de la concentración de sólidos con y sin nutriente.....	53
GRAFICO 4.3. Representación gráfica del contenido de grados alcohólicos	55
GRAFICO 4.4. Representación gráfica del rendimiento de alcohol etílico	56
GRAFICO 4. 5. Representación gráfica de las medias de los tipos de nutrientes con intervalo LSD	62

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Dilución de la melaza	72
ANEXO 2. Pasteurización de la melaza	73
ANEXO 3. Enfriamiento	73
ANEXO 4. Preparación de los materiales	74
ANEXO 5. Preparación de los tratamientos.....	74
ANEXO 6. Preparación de las soluciones	75
ANEXO 7. Medición del PH y grados Brix al inicio de la fermentación	75
ANEXO 8. Activación de la levadura (inoculo).....	76
ANEXO 9. Aireación	76
ANEXO 10. Preparación de las fuentes de nitrógeno.....	77
ANEXO 11. Sulfato de amonio	77
ANEXO 12. Urea	78
ANEXO 13. Nitrato de Potasio.....	78
ANEXO 14. Inicio de la fermentación	79
ANEXO 15. Medición de los grados dos Brix finales	80
ANEXO 16. Destilación de las muestras	80
ANEXO 17. Medición de grados Alcohólicos.....	81
ANEXO 18. Resultados de Análisis de nitrógeno total en la urea.....	82
ANEXO 19. Resultados de Análisis de nitrógeno total en el Sulfato de Amonio	83
ANEXO 20. Resultados de Análisis Microbiológicos en la maleza	84
ANEXO 21. Resultados de análisis Microbiológicos.....	85
ANEXO 22. Resultados de Análisis de crecimiento celular (levadura activa seca)	86
ANEXO 23. Resultados de análisis de crecimiento celular (levadura activa fresca).....	87

RESUMEN

La investigación de este proyecto de investigación se lo realizo en el laboratorio de la facultad de ciencias agropecuarias de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí.

El objetivo principal de este trabajo de investigación fue obtener alcohol etílico en la melaza de caña de azúcar de caña de azúcar mediante tres fuentes de nitrógeno a diferentes condiciones de °Brix y temperatura, sometiendo la melaza a una serie de procesos como: Dilución, pasterización, enfriamiento, fermentación y destilación.

Para la realización de la etapa de experimental se utilizó un diseño cuadrado latino de 3 x 3 en el que se consideró el factor de interés como el tipo de nutriente y los factores perturbadores como: Concentración de solidos (°Brix) y temperatura de fermentación .

Antes de evaluar las condiciones de fermentación se evaluaron pruebas fermentativas con dos tipos de levaduras comerciales. Levadura liofilizada y levadura activa seca y se pudo determinar que la levadura activa seca presento mejor suspensión celular, además se realizaron análisis químicos de nitrógeno total en las fuentes de nutrientes el paso siguiente fue evaluar el proceso de fermentación alcohólica con las tres fuentes de nutrientes evaluadas a 17°Brix ,22°Brix y 26°Brix y a una temperatura de 22°C, 26°C y 29°C se pudo determinar que la fuente de nutriente como el sulfato de amonio incrementan el rendimiento alcohólico seguido de la urea a diferencia del nitrato de potasio que fue el que género menor rendimiento de alcohol. Además se pudo determinar que las fuentes de nutrientes reducen la velocidad de fermentación y se pudo comprobar que a mayor °Brix mayor rendimiento de alcohol se produce.

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN DEL PROYECTO

El alcohol es un producto que tiene una alta demanda en las principales destilerías y en muchos procesos industriales del país, es por ello que su consumo es cada vez mayor por esta razón que se deben implementar nuevas técnicas de elaboración que maximicen la producción y se obtenga una mejor productividad de forma eficiente. El presente proyecto que consiste en la aplicación de un diseño experimental en La producción de alcohol etílico en la melaza de caña de azúcar en los procesos artesanales en la ciudad de Manta, la importancia de esta investigación es conocer las diferentes características, consecuencias y la calidad que tendrá el producto ya que para eso se va a seguir un cierto cuidado en su proceso de fermentación , ya que todo esto será importante cuando finalice el experimento para así dar a conocer a los mejores rendimientos alcohólicos obtenidos .

Debido a que en su proceso de elaboración existe un alto grado de complejidad por las características que se presentan en la fermentación y en todo el proceso ya que su rendimiento está en función de unas series de factores que pueden afectar significativamente la producción, por ello que se plantea la realización del presente proyecto que trata de una investigación experimental en la producción de alcohol etílico en la melaza de caña de azúcar en los procesos artesanal en la ciudad de Manta. El propósito principal de realizar este proyecto es aplicar una nueva técnica en el proceso de fermentación de alcohol a partir de un mejoramiento técnico y científico mediante el uso del control de variables como. Cantidad óptima de concentración de azúcar en el fermento y el control óptimo de temperatura que pueda mejorar el rendimiento y así obtener una mejor productividad mediante un método tradicional de destilación fraccionada que se lo realiza al proceso final de la fermentación. La investigación es de tipo experimental partir de un estudio comparativo mediante

tres fuentes de nutrientes como son: La urea, sulfato de amonio y nitrato de potasio, y al final hacer una evaluación de rendimientos alcohólicos obtenidos con las tres fuentes de nutrientes.

1.1. Situación del problema

El alcohol etílico hoy en día es un producto que es bastante utilizado en el país teniendo un alto porcentaje de utilización destinado para el consumo humano y utilizado en muchos procesos industriales.

El alcohol presenta condiciones muy complejas en los procesos de fermentación cuyo rendimiento depende de muchos factores técnicos y científico como son el tipo de levadura, condiciones climáticas del medio, tipo de nutrientes condiciones de aireación es por ello que en muchos procesos de extracción de alcohol se producen ineficiencia en la producción y producto de esto se dan pérdidas económicas en su proceso de extracción. Por ende la problemática a tratar en este experimento serían las reacciones de los diferentes tipos de nutrientes que se aplicaran como urea, sulfato de amonio y nitrato de potasio ya que tales contienen nitrógeno y podrían variar en los grados brix en la fermentación ya que la levadura necesitan estas fuentes de nitrógeno para su proceso de desarrollo por ende estos elementos químicos podrían tener influencia negativa o positiva en la fermentación de alcohol.

Se escogió el área de estudio para la realización del experimento de investigación se lo realizó en la ciudad de Manta en el laboratorio de la Facultad Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí por contar con los elementos y condiciones necesarios de laboratorios para realizar la investigación.

1.2. Formulación del problema

¿Cuál de las fuentes de nutrientes presentaría mayor rendimiento alcohólico exponiéndolas a diferentes condiciones de fermentación?

1. ¿Cuál sería las consecuencias de una mala fermentación?
2. ¿Qué influencia tendría o que características tendría el tipo de nutriente en el rendimiento alcohólico o de alcohol
3. ¿Cuál sería la variación de los grados brix (concentración de azúcar) y la temperatura en el tiempo final de fermentación de los nutrientes?
4. ¿Cuáles serían las condiciones óptimas de los nutrientes en la fermentación alcohólicas o de alcohol?

1.3. Justificación

La investigación es de conveniencia porque servirá para identificar, analizar y determinar los diferentes compuestos químicos que se le puede aplicar a los diferentes procesos de fermentación de alcohol y poder así aplicarlos con seguridad en un futuro en una empresa o microempresa

Es de relevancia social porque con la investigación de este proyecto los sectores productores de alcohol etílico que se dedican a producir en los cantones de Manabí podrían aplicar esta nueva técnica de mejoramiento que les permitan poder optimizar la producción y obtener mejores rendimientos alcohólicos.

Es de aplicación práctica porque se podrá realizar un diseño experimenta para establecer los porcentajes de Nitrógeno y Carbono en el proceso de

fermentación, aplicando los conocimientos adquiridos en la formación profesional.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo general

Aplicar un Diseño Experimental con los diferentes tipos de nutrientes para mejorar el porcentaje de alcohol etílico de melaza de caña de azúcar en los procesos artesanales en la Ciudad de Manta.

1.4.2. Objetivo específicos

- Analizar los diferentes métodos de reacciones que se obtendrían al combinar los tipos de nutrientes al momento de someterlas a diferentes condiciones de fermentación.
- Diseñar el experimento para determinar las condiciones óptimas de fermentación de alcohol y los nutrientes.
- Realizar pruebas de laboratorio físico-químicas con los diferentes tipos de nutrientes para determinar la calidad del producto o alcohol que se desea obtener.
- Determinar el rendimiento de alcohol y grado alcohólico de acuerdo a sus condiciones óptimas de fermentación en cuánto a su

concentración de azúcar y su temperatura, incorporado en la dilución los tres tipos de nutrientes.

1.5. Hipótesis

El tipo de nutriente incrementa el rendimiento de alcohol etílico de la melaza de caña de azúcar en el proceso artesanal.

1.5.1. VARIABLES

1.5.2. Dependiente

- Rendimiento de alcohol etílico

1.5.3. Independiente

- Tipos de nutrientes

CAPITULO II

2. MARCO TEORICO

2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación

El consumo de alcohol etílico en la ciudad de Manta y en el país es una actividad que se ha venido desarrollando desde muchos tiempos ancestrales.

Las elaboraciones de alcohol etílico artesanal es una es una actividad industrial que se ha venido desarrollando desde hace muchos tiempos antiguos.

“La apasionante historia del fabricante de alcohol, atribuido a los dioses, a poderes sobrenaturales, etc., es una larga aventura científica ligada al descubrimiento y desarrollo de la destilación, uno de los procesos más importantes de la química práctica, y que podemos considerar que no termina hasta 1857 cuando Pasteur proporciona una explicación científica de la fermentación.” (Freixa F, 1978).

Todas las fuentes apuntan a que los árabes, que conocían las ideas y prácticas de los tecnólogos y alquimistas chinos, hicieron una gran aportación a la obtención del alcohol con el desarrollo y la mejora de la técnica de la destilación.

“La fabricación y consumo de bebidas alcohólicas se remonta a las primeras etapas de la humanidad. Es probable que determinadas experiencias, relacionadas con la fabricación y utilización de recipientes, la fermentación natural de la miel o de otros azúcares, condujera a los seres humanos a interesarse por los procesos fermentativos”. (Rosenstingl, 1978). A pesar de estos conocimientos y experiencias tan ancestrales, la humanidad tardó siglos en conocer objetivamente el proceso de producción del alcohol y en obtenerlo a partir de las bebidas que lo contenían.

La fermentación alcohólica fue estudiada por Louis Pasteur (1822-1895) y desde entonces sabemos que un microorganismo - un hongo-, la levadura, es el que inicia y produce la compleja cadena de fenómenos físico-químicos que reciben el nombre de fermentación por el que se produce finalmente alcohol etílico a partir de azúcares.

2.2. ANTECEDENTE DE LA INVESTIGACIÓN

Según (Garzon & Hernandez, 2009) “realizo un estudio de investigación de Estudio comparativo para la producción de etanol entre *saccharomyces cerevisiae* silvestre, *saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *candida utilis* ATCC 9950”.

El etanol es considerado un recurso energético sostenible, puesto que ofrece diversas ventajas sobre los derivados del petróleo, como son; la disminución en la producción de gases invernadero, disminución del costo del combustible, mayor seguridad energética y apoyo a producciones agrícolas. Éste se obtiene a partir de microorganismos, los cuales realizan la fermentación de azúcares que se encuentran en productos vegetales, que pueden provenir de subproductos de grandes procesos industriales, para la producción del azúcar como: la melaza, el jugo de caña entre otros, emplear éstos subproductos, como sustratos para ser fermentados y obtener

Etanol, generan una oportunidad importante en el desarrollo de nuevas formas de energía renovable y en los cuales se encuentre un desarrollo sostenible con el medio ambiente.

El presente trabajo tuvo como objetivo comparar la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y

Candida utilis ATCC 9950, adicional a esto se evaluó la cepa *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080.

Se realizaron ensayos a diferentes concentraciones de melaza (180, 200 y 250 g/L) con *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, con el fin de establecer la concentración de melaza que produjera el mejor porcentaje de alcohol; encontrando lo con la concentración de 250 g/L. Evaluando a esta concentración las otras levaduras; el consumo de azúcares reductores se determinó por el método Dubois, para realizar el seguimiento de los mismos.

Las cepas *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, ATCC 9080 y *Candida utilis* ATCC 9950 presentaron un porcentaje de alcohol del 8% (V/V), mientras que la *Saccharomyces cerevisiae* silvestre mostro un porcentaje del 6,5% (V/V) a la concentración de 250 g/L; el etanol obtenido fue cuantificado por alcoholimetría y cualificado por cromatografía de gases .

Según (Campués & Tarapí, 2011) “realizó un estudio de investigación de Obtención de alcohol a partir de jugo de caña, cachaza y melaza, mediante la incorporación de dos niveles de fermento.”

En la presente investigación se pretende utilizar jugo de caña y subproductos de bajo nivel comercial de la Industria Azucarera y Panelera como son la melaza y cachaza respectivamente, con la finalidad de obtener alcohol mediante la incorporación de dos niveles de fermento (*Sacharomyces cerevisiae*), para optimizar los rendimientos de producción.

Se realizó la fase experimental en la Unidad de Azúcares- Laboratorios de la FICAYA- UTN, ubicada en la ciudad de Ibarra, provincia Imbabura y los respectivos análisis físico- químicos se efectuaron en el Laboratorio de control de calidad LICORES DE AMERICA “LICORAM”.

El presente estudio consistió en obtener alcohol a partir del mosto de jugo de caña, cachaza y melaza, sometiendo a las materias primas a diversos procesos como adquisición, recepción, filtrado, dilución, pasteurizado, enfriamiento, fermentación y destilado. Las variables en estudio fueron: sólidos solubles y pH de la materia prima y en el proceso de fermentación; aldehídos, alcoholes superiores, esterres, metanol y rendimiento en el producto final; y en el análisis sensorial: color, olor y sabor.

Para el desarrollo de la fase experimental se utilizó un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial $A \times B$; en el que A corresponde a la materia prima, B a la cantidad de fermento.

Las características del experimento fueron tres repeticiones, seis tratamientos y dieciocho unidades experimentales conformadas por 15 litros cada una. El análisis sensorial se realizó con la ayuda de una guía instructiva y la hoja de encuesta; para determinar su significación estadística se utilizó la prueba de Friedman.

Posteriormente se determinó los dos mejores tratamientos, en los cuales se realizó análisis físico-químico concluyendo como mejor tratamiento A1B1 (Jugo de caña + 0,15 gramos de *Saccharomyces cerevisiae* por litro de disolución), en el cual se obtuvo mayor rendimiento de alcohol.

Según (Fijardo & Sarmiento, 2009)“ realizó un estudio sobre “La evaluación de la melaza como sustrato para la producción de *saccharomyces cerevisiaea*”.

Los pro bióticos son microorganismos vivos que agregados como suplementos alimenticos benefician, al huésped aumentando el balance microbiano intestinal y previniendo el desarrollo de patógenos por lo que son de alta importancia al ser adicionado como alimento de alta concentraciones actualmente el género *saccharomyces* ha sido utilizado para el tratamiento y prevención de

desórdenes tanto intestinales como en animales como en humanos en esta investigación se determinaron las condiciones necesarias para obtener una alta concentración de biomasa con el fin de evaluar su capacidad pro biótica este trabajo tuvo como objetivo evaluar la melaza como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*, cepa nativa (cepa A) comparándola con una cepa nativa utilizada como este estudio una cepa reconocida como (cepa B). Se realizaron cultivos en Erlenmeyer utilizando diferentes concentraciones de melaza de caña (10, 20 y 30% (P/V) con el fin de determinar la concentración adecuada para obtener la mayor concentración de biomasa. Se determinó el consumo de sustrato por medio de la técnica DNS con previa hidrólisis de la sacarosa. La biomasa obtenida se cuantificó por medio de la técnica de absorbancia de peso seco. Se evaluó la viabilidad del microorganismo por medio del recuento en placa del agar YPG. Se obtuvo mayor crecimiento de biomasa a una concentración del 20% (p/v) de melaza de caña con un PH inicial de 5, temperatura de 30 grados centígrado, 150 rpm durante 20 horas estas condiciones fueron llevadas a fermentaciones en bioreactor de 1.5 L. Adicionalmente se establecieron parámetros cinéticos ajustados al modelo matemático que permitieron escoger las mejores condiciones de crecimientos tanto de Erlenmeyer como como en bioreactor; los mejores datos en cuanto a reproducción de levaduras así como los valores de rendimientos de biomasa fueron los obtenidos por los de la cepa A en una concentración de melaza al 20% (p/v).

Según (Tellez & Peraza, 2012) “realizó un estudio sobre la Optimización del proceso de fermentación para la producción de tequila, utilizando la metodología de superficie de respuesta (msr)” que tiene como objetivo optimizar las concentraciones de azúcar, nitrógeno y fósforo del medio, para incrementar la eficiencia en la producción y establecer la influencia de esos macronutrientes en los compuestos sensoriales indicados en la normatividad Mexicana (NOM - 006-SCFI-2005). Se utilizaron dos cepas de levaduras *Saccharomyces* y dos

tipos de mosto: 100% Agave y Mixto (Agave más sacarosa). En un principio se utilizó un diseño factorial (24-1). Variables a controlar: concentración de azúcar; nitrógeno y fósforo; y la temperatura. Variables de respuesta: Eficiencia de fermentación y las concentraciones de los compuestos indicados en la NOM. Por mínimos cuadrados se determinó la función objetivo para cada variable de respuesta con sus restricciones. Para una eficiencia de 94.58% (con una función deseable de 0.891312), el programa sugirió: mosto mixto (Agave y sacarosa), *Saccharomyces* THL 110; 8°Bx; 0.797979 g/l N; 0.376875 g/l P, y 40°C.

De los estudios referenciales anteriormente mencionados se pudo analizar que la fermentación alcohólica de la melaza, su comportamiento en cuanto a la variación, los tipos de levaduras son significativos y es un factor determinante para el rendimiento alcohólico; en cuanto a la concentración en la solución también juega un papel fundamental ya que a mayor concentración de azúcar en la solución, mayor es su rendimiento alcohólico; pero se necesita conocer cuál es la concentración óptima de azúcar en la solución; se puede decir que a una concentración de azúcar óptima que presentaría un mejor rendimiento alcohólico es de 250 g/L. También se deben de tomar en consideración que para poder realizar una fermentación con un buen crecimiento de levadura se realicen una pre fermentación a las levaduras es decir una incubación y así poder determinar cuál sería su concentración óptima en la fermentación.

La metodología que más se acoge a este proyecto de investigación es el estudio sobre la optimización de los procesos de tequila ya que se estudiaron variables como las fuentes nitrogenadas, azúcar en la fermentación ya que se pudo determinar en este estudio realizado que las fuentes de nitrógeno influyen en el mejoramiento de crecimiento de las levaduras y por ende mejoran su eficiencia fermentativa. Se tomaran en cuenta en el desarrollo de la investigación las variables anteriormente mencionadas para poder determinar

cuál es el comportamiento de la levadura adicionándoles nutrientes, si estos hacen que las levaduras incrementen su tiempo de fermentación y realicen un mayor consumo de azúcar mejorarían su rendimiento alcohólico en la fermentación alcohólica en la melaza .

2.3. BASES TEÓRICAS

2.3.1.1. Melaza de caña de azúcar

2.3.1.2. Definición

Las melazas, mieles finales, suelen ser definidas por muchos autores como los residuos de la cristalización final del azúcar de los cuales no se puede obtener más azúcar por métodos físicos.

También otros autores la definen como jarabe o líquido denso y viscoso, separado de la misma masa cocida final en la obtención de azúcar.

2.3.1.3. Obtención

Existen muchos tipos de melaza. Únicamente se tratará aquí de las melazas obtenidas de la caña de azúcar. La melaza residual o melaza final es el subproducto de la industria azucarera del cual se ha abstraído el máximo de azúcar. Cuando se emplea la palabra melaza sin especificación, se suele referir a la melaza residual.

“La miel que se obtiene de una centrifuga se bombea a un tanque de almacenamiento para luego someterla a superiores evaporaciones y cristalizaciones en los tachas. Al cabo de tres cristalizaciones sucesivas se obtiene miel final, que se retira del proceso y se comercializa como materia

prima para la elaboración de alcoholes y otros usos” (Sitio Argentino de Producción Animal, 2016).

2.3.1.4. Propiedades Físicas – químicas

La miel final o melaza es un líquido denso y viscoso de color oscuro, dulce y olor más o menos agradable que queda como residuo de la fabricación o refinación de la sacarosa procedente de la caña de azúcar. La importancia se debe casi exclusivamente a los carbohidratos, ya que carece de materia grasa y de celulosa.

2.3.1.5. Composición de la melaza de caña de azúcar

Es un substrato de la industria azucarera, y una de las fuentes más baratas de carbohidratos. La composición de la melaza de caña de azúcar depende de tres factores principales:

a) Caña de azúcar

- Condiciones del suelo
- Fertilizantes
- Clima
- Control de insectos, enfermedades, mala hierba
- Método de cultivo
- Método de cosecha
- Variedad de la caña
- Madurez de la caña

b) Tipo de planta procesadora

- Método de fabricación

c) Método de manejo de la melaza

- Almacenaje de la melaza
- Transporte de la melaza

Cuadro 2.1: Composición de la miel final de caña

COMPONENTES		%
Agua		20
Compuestos inorgánicos(cenizas)		
SiO ₂	0,5	8
N ₂ O	3,5	
CaO	1,5	
MgO	0,1	
P ₂ O ₆	0,2	
NA ₂ O	0,2	
FeO ₃		
AlO ₃		
Sosa y carbonatos		
Sulfatos(SO ₃)	1,6	
Cloruros	0,4	
Compuestos orgánicos		
Azúcares: sacarosa		62
Glucosa	14	
Fructosa	16	
No azúcares: Sustancias		10
Nitrogenadas, sustancias		
Gomas solubles, ácido libres		
y combinados		
Total		100

Fuente: (Campués & Tarapí, 2011)

2.3.1.6. Usos generales de la melaza de caña

Debido a su gran producción se han destinado varios puntos de los cuales citaremos los más importantes.

Las mieles se utilizan como materia prima para la producción de alcohol etílico en la destilería.

Principalmente se emplea la melaza como suplemento energético para la alimentación de rumiantes por su alto contenido de azúcares y su bajo costo en algunas regiones. No obstante, una pequeña porción de la producción se destina al consumo humano, empleándola como edulcorante culinario.

Las melazas de mejor calidad se utilizan para endulzar alimentos tales como caramelos y bizcochos. Las de baja calidad, van a las fábricas de raciones para animales o se emplean en la fabricación del alcohol.

2.3.2. Factores que intervienen en el proceso de fermentación

2.3.2.1. Cultivo Iniciador

Según (De la Rosa Tullio, 1998) “en la utilización de levaduras liofilizadas dice, 1 gramo de levaduras desecadas contiene de 10 a 30 millones de células prevalentemente vitales, por lo que se recomienda la adición de 15 a 20 g/hl de mosto”

2.3.2.2. Levaduras y clasificación

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* son las más utilizadas en la mayoría de los procesos de fermentación es un organismo seleccionado para su estudio por la biología celular y la genética: los conocimientos fundamentales que se desprenden aún hoy día permiten clarificar desde un nuevo punto de vista la biología de este organismo y su adaptación al metabolismo fermentativo. Es por

esta razón que se hayan producido grandes progresos en el campo de la fermentación alcohólica.

La fermentación alcohólica en condiciones enológicas se efectúa en cuasi-anaerobiosis (cantidad de oxígeno disponible en el mosto al comienzo de la fermentación inferior a 10 mg de O₂ por litro). El metabolismo de *Sacharomyces cerevisiae* en tales condiciones es pues estrictamente fermentativo. (De la Rosa Tullio, 1998)“Considera las levaduras son microorganismos fúngicos unicelulares, dotados de especial facultad zimógena.

Es decir que representa a la capacidad de biosíntesis del complejo enzimático responsable en el proceso de fermentación alcohólica”.

Su forma de las levaduras es muy variable y depende tanto de la especie como de las condiciones de cultivo. En condiciones normales se distinguen 4 tipos:

- *Saccharomyces cerevisiae* células redondeadas
- *Saccharomyces elíпсоideus* células clípticas
- *Saccharomyces apiculatus* forma de limones
- *Sacharomyces uvarum* forma de salchichas

2.3.2.3. Clasificación

Existen en la naturaleza varios tipos de especies de levadura, pero de mayor interés industrial en el campo de las bebidas alcohólicas corresponden al género *Saccharomyces*; este género comprende 30 especies y 3 variedades que se distinguen por su acción fermentativa y su capacidad de asimilación de diversos azúcares. Las levaduras utilizadas en la industria de bebidas fermentadas son:

2.3.2.4. Saccharomyces cerevisiae

Según (Gonzales Sosa R., 1978) "Ese tipo de especie es típica de fermentación de mayor preferencia en las industria cervecera, sus colonias son blandas, húmedas y de color crema. Fermentan la galactosa, la sacarosa, la maltosa y la rafmosa, y no utiliza nitritos".

2.3.2.5. Saccharomyces uvaruní

Basando en lo que establece (De la Rosa Tullio, 1998) "esta levadura se caracteriza por células frecuentemente grandes, alargadas y en forma de salchicha fermentan la glucosa, sacarosa, maltosa y rafinosa.

2.3.2.6. Fuentes nutricionales como fuentes de nitrógeno

De las fuentes de carbono y energía que pueden emplear las levaduras figuran en primer lugar la glucosa y la sacarosa, aunque también pueden emplearse fructuosa, galactosa, maltosa y huero hidrolizado.

El nitrógeno se puede presentarse en forma de amoniaco, urea o sales de amonio aunque también se pueden emplear mezclas de aminoácidos. Ni el Nitrito pueden ser asimilados.

2.3.2.7. Urea

El nitrógeno que se va a utilizar es la urea ya que es un compuesto con alto contenido de nitrógeno para la fase de multiplicación como para la fase de fermentación debido a la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos.

Es un compuesto cristalino incoloro ligero, con un 46% de nitrógeno (producto en forma pura). También se presenta en forma granulada de perlas de 1 – 2 mm., con un 45% de N.

Soluble en agua sin dejar residuos insolubles, con un descenso marcado de la temperatura (calor de disolución en el agua 57.8 cal/ gr.), en alcohol, y ligeramente soluble en éter, acetato de etilo y en piridina a las temperaturas ordinarias no es de uso comestible y es de baja toxicidad.

2.3.2.8. Sulfato de amonio

De fórmula química $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y con una riqueza en estado puro: 21.2% N y 24% de S, en estado abono: 20.5% N y 59% de SO_4 . Es un compuesto que se presenta en polvo, cristales y granular, soluble en agua y aumenta considerablemente con la temperatura. La solubilidad en Kg. de sulfato de amonio por litro de agua es: a 0°C, de 70.6 - 20°C, de 75.4 - 60°C, de 88.0 y a 100°C, de 103.3, no inflamable y de baja toxicidad. Por su carácter ácido, el sulfato de amonio es recomendable en aplicaciones a suelos alcalinos y/o suelos calcáreos.

2.3.2.9. Nitrato de potásico

Es la fuente más usada de potasio en fertirrigación, estando su consumo muy generalizado en todo tipo de cultivos, tanto anuales como permanentes. Estimula las plantas para su crecimiento vegetativo. Al ser aplicado no deja ningún residuo, aportando solo elementos útiles, pues es soluble en su totalidad. Al aportar el nitrógeno en forma nítrica, no retenida por el suelo, su reparto es muy homogéneo. La ausencia de cloro es una ventaja para las plantaciones de frutas cítricas y tabaco, también se usa en la producción de

fertilizantes líquidos y es un importante constituyente de los fertilizantes multinutrientes.

Características Químicas:

Contenido Porcentaje Nitrógeno (N): 13

Potasio (K₂O): 44 pH

(Solución al 10 %): 7,5 – 8,5 (a 20°C)

Características Físicas:

Fórmula Química: KNO₃ Sinónimo

Sal inorgánica, sal Peter Apariencia: blanco cristalino granular Solubilidad a 20°C: 36g/100 cc Por exposición al aire seco pierde una molécula de agua; amargo, soluble en agua, poco soluble en alcohol.

2.3.2.10. Oxígeno

Las levaduras son microorganismos que pueden desarrollarse en presencia o ausencia de oxígeno, en la fermentación. Ya que es de mucha importancia que antes de dar inicio a la fermentación se realicen un pre fermentación dándole una cantidad de oxígeno ya que son procesos previos a la fermentación. Es importante que el aire no esté contaminado, es decir, libre de aceite, humedad o alta temperatura, es por este motivo la cual se recomienda que la temperatura del aire deba ser de 30° C.

2.3.2.11. PH del mosto

Para que no se vea afectada la fermentación se recomienda para una reacción óptima para un proceso fermentativo con levaduras se lo debe realizar a un pH de 4.5 y 5.0. El pH del mosto ha sido ajustado entre 4 y 4.5. Este pH

favorece a las levaduras y es lo suficientemente bajo para inhibir el desarrollo de muchos tipos de bacterias.

Según (Gonzales Sosa R., 1978) "Para que la fermentación sea satisfactoriamente cuando el pH del mosto se mantiene entre 4 y 4.5. Este pH favorece a las levaduras y es lo suficientemente bajo para inhibir el crecimiento de muchos tipos de bacterias que afectan a la fermentación

2.3.2.12. Concentración de azúcar

Este parámetro es uno de los más determinante debido a que las levaduras en concentraciones altas de azúcar no se desarrollan producto a que las sustancias están saturada es por aquello que para la multiplicación inicial de la levadura, la concentración de azúcares debe mantenerse en niveles bajos.

Según Betancourt (BETANCOURT, R., 2001) manifiesta que para la multiplicación inicia de las levaduras del 10 a 22 % en esta etapa del procesos se realizaran en diferentes concentraciones de azúcar en la solución dentro de un rango de aceptación de concentración de azúcar, en ocasiones se emplean concentraciones demasiado altas que inhiben el crecimiento de las levaduras.

2.3.2.13. Temperatura

Según (Gonzales Sosa R., 1978) La temperatura del mosto es bien influyente en la fermentación. Si la temperatura es baja (bajo los 26 - 27° C), no es favorable. En lugares muy fríos se debe proceder a calentar el mosto, debido a que el choque térmico va a producir un retardo en la fermentación. Otra solución sería alimentar con mosto caliente de unos 40 – 50°C. El mosto que alcanza un sobre calentamiento en los tanques de fermentación produce una disminución en el rendimiento alcohólico por la evaporación de alcohol durante la Fermentación. Por otro lado, existe una correlación altamente positiva entre bacterias en el mosto y la temperatura de éste, principalmente entre

temperaturas de 30 – 40°C, por lo tanto, si la temperatura del mosto fuera por encima de 30°C, el número de bacterias incrementaría proporcionalmente en función a la temperatura.

2.3.2.14. Temperatura de fermentación

En la fermentación pueda tener lugar en un rango de temperaturas desde los 13-14°C hasta los 33-35°C. Las levaduras son microorganismos mesófilos.

Cuanto mayor sea la temperatura dentro del rango establecido mayor será la velocidad del proceso fermentativo siendo también mayor la proporción de productos secundarios.

Sin embargo, a menor temperatura es más fácil conseguir un mayor grado alcohólico, ya que las altas temperaturas hacen fermentar más rápido a las levaduras llegando a agotarlas antes. La temperatura de fermentación debe ser constante desde el inicio hasta el final. Es por esta razón que se aconseja mantenerla por abajo de 34°C y por encima de 31°C.

2.3.3. Producto final obtenido de la melaza de la caña de la caña de azúcar

2.3.3.1. Alcoholes

“El alcohol es el nombre genérico de una familia de compuestos químicos de carbono, hidrógeno y oxígeno que siempre contienen el grupo funcional hidroxilo (-OH), éste último determina las propiedades características de esta familia.

Proviene de la palabra árabe *al-kuhl*, o *kohl*, un polvo fino de antimonio que se emplea para el maquillaje de ojos. En un principio, el término alcohol se

empleaba para referirse a cualquier tipo de polvo fino; sin embargo, más tarde los alquimistas de la Europa medieval lo utilizaron para las esencias obtenidas por destilación, estableciendo así su acepción actual.

Un alcohol se clasifica de acuerdo con el tipo de carbono que sea portador del grupo OH (primario, secundario y terciario). Los alcoholes primarios y secundarios son líquidos incoloros y de olor agradable, solubles en el agua en cualquier proporción y menos densos que ella, mientras que el terciario son todos sólidos” (Revista Semana, 2014)

Según el Instituto Interamericano para la Cooperación de la Agricultura, el alcohol “El alcohol etílico o Etanol, cuya fórmula química es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$, es el componente principal de las bebidas alcohólicas. Se lo puede obtenerse a través de dos procesos de elaboración: la fermentación o descomposición de los azúcares contenidos en distintas frutas, y la destilación, consistente en la depuración de las bebidas fermentadas” .

El metanol y el etanol son alcoholes mono hidroxilos. Los alcoholes también se pueden clasificar en primarios, secundarios y terciarios, dependiendo de que tengan uno, dos o tres átomos de carbono enlazados con el átomo de carbono al que se encuentra unido el grupo hidróxido.

Los alcoholes se caracterizan por la gran variedad de reacciones en las que intervienen; una de las más importantes es la reacción con los ácidos, en la que se forman sustancias llamadas ésteres, semejantes a las sales inorgánicas. Los alcoholes son subproductos normales de la digestión y de los procesos químicos en el interior de las células, y se encuentran en los tejidos y fluidos de animales y plantas.

2.3.4. Fundamentos bioquímicos de la fermentación alcohólica

El descubrimiento hecho por de Buchner en 1897, de que un extracto de levadura del que se habían producido la eliminación las células intactas por filtración conservaba la capacidad de fermentar la glucosa a etanol, demostraba que las enzimas de la fermentación pueden actuar independientemente de la estructura celular.

Los combustibles más corrientes para la fermentación son los azúcares, en especial la D-glucosa, pero algunas bacterias pueden obtener su energía metabólica efectuando la fermentación de ácidos grasos, aminoácidos, las pirimidinas según las especies. Una clase de fermentación importante de la glucosa, es la fermentación alcohólica.

Para muchas levaduras en un medio adecuado, la fermentación significa la conversión de hexosas, principalmente glucosa, fructosa, mañosa y galactosa en ausencia de aire, en los siguientes productos finales:

En la producción de alcohol el proceso se lleva a cabo por la acción de enzimas suministradas por la levadura y favorecida por acción de los fosfatos adicionados mediante series de reacciones. Las portaciones que realizo Gay Lussac ayudaron a establecer la siguiente ecuación de la fermentación alcohólica.



glucosa *Aire(oxígeno)* *Agua* *dioxido de carbono* *Energía*

Es por ésta razón que, en la presencia de oxígeno, la multiplicación de la levadura se da intensamente, pues la cantidad liberada de energía química

(ATP) es mayor (19 veces). Por otro lado el consumo de glucosa es menor que en la ausencia de oxígeno. La célula necesita de una menor cantidad de glucosa en presencia de oxígeno, porque la cantidad de energía producida es mayor.

2.3.4.1. Producción de alcohol etílico

Basándose en lo que establece (CHEN, J., 1991) Menciona que, “el alcohol etílico se puede producir a partir de las mieles. La fermentación de las mieles es el producto de la acción de las levaduras, las que intervienen primero la sacarosa mediante la invertasa que producen. Luego, las levaduras transforman el azúcar en alcohol etílico y bióxido de carbono.

Por lo general, se utilizan las siguientes ecuaciones para calcular la recuperación teórica (RT) y la eficiencia de la fermentación (EF).ⁱ

$$RT = \text{Total de azúcar fermentable} \times 0.64^*$$

* De acuerdo con la ecuación de Gay-Lussac, 1 g de glucosa produce 0.64 ml de etanol.

$$EF = \frac{\text{Recuperación Real}}{\text{Recuperación Teórica}} \times 100\%$$

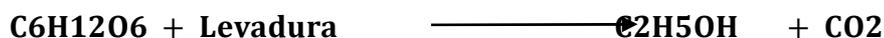
2.3.4.2. La fermentación alcohólica

El propósito principal de la fermentación alcohólica es formar de manera óptima el etanol y los productos secundarios. La fermentación alcohólica es el proceso por el que los azúcares contenidos en el mosto de la solución se convierten en alcohol etílico. Para que este proceso se lleve a cabo este proceso es necesaria la presencia de levaduras.

Según (De la Rosa Tullio, 1998), "la fermentación alcohólica es aquel fenómeno, estrechamente ligado a la actividad vital de las levaduras presentes en el mosto y reguladas por su carga enzimática, por lo cual los azúcares originariamente presentes dan origen a alcohol, anhídrido carbónico y otros productos secundario si etanol representa el producto principal de la fermentación alcohólica y puede generar una concentraciones que varía desde 12 a 14% vol. El dióxido de carbono representa el segundo producto de la fermentación alcohólica.

2.3.4.3. Desarrollo de la fermentación

La fermentación alcohólica se desenvuelve a través de una serie de reacciones; siendo la reacción principal, establecida por GAY – LUSSAC y corregida por DUMAS la siguiente:



En esta reacción principal es el producto del desdoblamiento de los azúcares fermentables, lo cual se desarrollan en el tiempo que tarda la fermentación. Para que esto suceda se mezcla el inóculo (levadura) con el mosto (mezcla de agua y melaza), iniciándose el proceso de fermentación: dentro de este proceso existen diferentes fases que se las puede clasificar como: fase preliminar, fase tumultuosa y fase final.

2.3.4.4. Procesos de fermentación

Cuando se realizan fermentación alcohólica se utilizan diversos métodos, cualquiera que sea el método aplicable, el éxito de estos procesos depende de la regulación de diversos factores importantes (cantidad de levadura, azúcares reductores).

Los más importantes son: Los valores iniciales y finales, las variaciones de las sustancias convertibles (usualmente carbohidratos) durante el tratamiento; las sustancias asimilables (nutrientes), la temperatura, el pH, la acidez o la alcalinidad.

Para este proceso son valorables los productos finales, y la cantidad de microorganismos que funcionan en todo el proceso de que se lleva a cabo la fermentación.

Entre los procesos existentes hay:

- El proceso intermitente (batch).
- El proceso continuo.
- El proceso semicontinuo.
- El proceso intermedio (intermitente - continuo).

2.3.4.5. Mecanismo de fermentación

El mecanismo de la fermentación se refiere solamente a un tipo bien concreto de acción microbiana. Estos procesos bioquímicos que tienen relación a cambios en el comportamiento de las células que a su vez transformando la adecuadamente se obtienen productos que servirán al ser humano.

Para los fines de la práctica se distinguen en la vida microbiana: el desarrollo, la asimilación, la biosíntesis y la desasimilación. El desarrollo, que se refiere tanto al micro individuo como a todo el grupo de organismos que viven juntos con una colonia o un cultivo, incluye el aumento en el tamaño de la célula y la reproducción de la célula por división, gemación o por la formación de cuerpos especiales, como esporas y conidios. Asimilación, es la actividad por la cual son transformados los diversos componentes del substrato en sustancia de las

células, proporcionando así el material necesario para el desarrollo y las actividades de la vida. El oxígeno atmosférico, uno o varios de los compuestos intermedios formados por catabolismo u otro compuesto reducible presente en el substrato puede ser el receptor de hidrógeno.

2.3.5. Técnicas de destilación de alcohol

2.3.5.1. Destilación simple

Es cuando se realiza en una única etapa. Se utiliza cuando los dos elementos o componentes de una mezcla tienen entre sus puntos de ebullición una diferencia de 80°C por lo menos. Al momento de calentar, destila el componente más volátil y queda el menos volátil como residuo.

2.3.5.2. Destilación fraccionada

“Ocurre cuando La diferencia entre las temperaturas de ebullición de los componentes de una mezcla es menor de 80°C, la separación de ambos se realiza por destilaciones sencillas repetidas de los sucesivos destilados, o utilizando columnas de destilación fraccionada mediante las que se obtiene como destilado el producto más volátil ” (Yaira Perez, 2015).

2.3.6. Tipos de diseño experimental, características y ventajas

2.3.6.1. Definición

El diseño de experimentos es la aplicación del método científico para generar conocimiento acerca de un sistema o proceso, por medio de pruebas planeadas adecuadamente. Esta metodología se ha ido consolidando como un conjunto de técnicas estadísticas y de ingeniería, que permiten entender mejor situaciones complejas de relación causa-efecto.

2.3.6.2. Experimento

Un experimento es un cambio en las condiciones de operación de un sistema o proceso, que se hace con el objetivo de medir el efecto del cambio sobre una o varias propiedades del producto o resultado. Asimismo, el experimento permite aumentar el conocimiento acerca del sistema. Por ejemplo, en un proceso químico se pueden probar diferentes temperaturas y presiones, y medir el cambio observado en el rendimiento (ppm, defectivo) del proceso. Al analizar los efectos (datos) obtiene conocimiento acerca del proceso químico, lo cual permite mejorar su desempeño.

2.3.6.3. Clasificación y selección de los diseños experimentales

Existen muchos diseños experimentales para estudiar la gran diversidad de problemas o situaciones que ocurren en la práctica. Esta cantidad de diseños hace necesario saber cómo elegir el más adecuado para una situación dada y, por ende, es preciso conocer cómo es que se clasifican los diseños de acuerdo con su objetivo y su alcance. Los cinco aspectos que más influyen en la selección de un diseño experimental, en el sentido de que cuando cambian por lo general nos llevan a cambiar de diseño, son:

1. El objetivo del experimento.
2. El número de factores a estudiar.
3. El número de niveles que se prueban en cada factor.
4. Los efectos que interesa investigar (relación factores-respuesta).
5. El costo del experimento, tiempo y precisión deseada.

El objetivo del experimento se utiliza como un criterio general de clasificación de los diseños experimentales, mientras que los otros cuatro puntos son útiles para sub clasificarlos. En este sentido, de acuerdo con su objetivo y sin pretender ser exhaustivos, los diseños se pueden clasificar como:

1. Diseños para comparar dos o más tratamientos.
2. Diseños para estudiar el efecto de varios factores sobre la(s) respuesta(s).
3. Diseños para determinar el punto óptimo de operación del proceso.
4. Diseños para la optimización de una mezcla.
5. Diseños para hacer el producto o proceso insensible a factores no controlables.

2.3.6.4. Diseño completamente al azar y anova (con un solo factor)

Muchas comparaciones, como las antes mencionadas, según (Guitierrez & De la vara, 2008)“el diseño completamente al azar (DCA), que es el más simple de todos los diseños que se utilizan para comparar dos o más tratamientos, dado que sólo consideran dos fuentes de variabilidad: los tratamientos y el error aleatorio. En el siguiente capítulo veremos diseños que consideran la influencia de otras fuentes de variabilidad (bloques).

Se caracteriza este diseño porque es completamente al azar porque todas las corridas experimentales se realizan en orden aleatorio completo posee un solo factor de interés. De esta manera, si durante el estudio se hacen en total N pruebas, éstas se corren al azar, de manera que los posibles efectos ambientales y temporales se vayan repartiendo equitativamente entre los tratamientos. “

2.3.6.5. Diseño en bloque completo al azar

Según (Guitierrez & De la vara, 2008) “Este tipo de diseño se lo aplica cuando se quieren comparar ciertos tratamientos o estudiar el efecto de un factor, es deseable que las posibles diferencias se deban principalmente al factor de interés y no a otros factores que no se consideran en el estudio. Cuando esto no ocurre y existen otros factores que no se controlan o nulifican para hacer la comparación, las conclusiones podrían ser afectadas sensiblemente. Por ejemplo, supongamos que se quieren comprar varias máquinas, si cada máquina es manejada por un operador diferente y se sabe que éste tiene una influencia en el resultado, entonces es claro que el factor operador debe tomarse en cuenta si se quiere comparar a las máquinas de manera justa. Un operador más hábil puede hacer ver a su máquina (aunque ésta sea la peor) como la que tiene el mejor desempeño, lo cual impide hacer una comparación adecuada de los equipos. “

Característica principal de este modelo experimental (DBCA) es que se consideran tres fuentes de variabilidad el factor de tratamiento, factor de bloque y el error aleatorio es decir, se tienen tres posibles “culpables” de la variabilidad presente en los datos. La palabra completo en el nombre del diseño se debe a que en cada bloque se prueban todos los tratamientos, o sea, los bloques están completos. La aleatorización se hace dentro de cada bloque; por lo tanto, no se realiza de manera total como en el diseño completamente al azar. El hecho de que existan bloques hace que no sea práctico o que incluso sea imposible aleatorizar en su totalidad.

Ventajas

- Elimina una fuente de variación del error aumentando de
- Esta forma la precisión del ensayo. La precisión del ensayo se mide a través del coeficiente de variación

- Permite una gran flexibilidad en la relación tratamiento bloque, siempre y cuando se reserven un número igual (o un múltiplo) de tratamientos por unidad experimental.
- La pérdida de información por bloque o tratamiento no dificulta el análisis estadístico.

2.3.6.6. Diseño cuadrado latino

Según (Douglas C.Motgomery) “En el diseño en cuadro latino (DCL) se controlan dos factores de bloque y se estudia un factor de tratamientos, por lo que se tienen cuatro fuentes de variabilidad que pueden afectar la respuesta observada, estas son: los tratamientos, el factor de bloque I (columnas), el factor de bloque II (renglones) y el error aleatorio. Se llama cuadro latino por dos razones: es un cuadro debido a que tiene la restricción adicional de que los tres factores involucrados se prueban en la misma cantidad de niveles, y es latino porque se utilizan letras latinas para denotar a los tratamientos o niveles del factor de interés. Sean A, B, C,..., K, los k tratamientos a comparar, por lo tanto ambos factores de bloques tienen también k niveles cada uno. Se caracteriza este modelo experimental por tener dos factores que son el factor de bloque uno que pertenecen a las columnas y el factor de bloque dos que son los renglones y el error aleatorio”.

Ventajas

- Si se conocen dos fuentes de variabilidad de las unidades experimentales y se puede hacer un “bloqueo” en dos direcciones, se va a poder hacer una comparación más precisa de los tratamientos (se tiene más potencia) pues la variación debida a las filas y las columnas es removida del error experimental.

- Es fácil de analizar, comparado con el diseño de bloques al azar, sólo se requiere de una suma de cuadrados adicional.
- Cuando se tienen cuadrados pequeños (lo que implica pocos grados de libertad para el error experimental).
- Se pueden utilizar varios de estos cuadrados de poco tamaño y realizar un análisis combinado de los mismos en algo que se llama cuadrados latinos repetidos.

Para el desarrollo de la presente investigación se ha adoptado el modelo experimental Cuadrado Latino, debido a que permite estudiar y analizar los tipos de nutrientes frente a dos factores perturbadores controlables, como son temperatura de fermentación y concentración de azúcar en la solución, para determinar el rendimiento del porcentaje de alcohol.

2.3.6.7. Diseño grecolatino

Según (Douglas C.Motgomery) “con el diseño en cuadro grecolatino (DCGL) se controlan tres factores de bloque, además del factor de tratamientos. Se llama cuadro grecolatino porque los cuatro factores involucrados se prueban en la misma cantidad de nivel es, de aquí que se pueda escribir como un cuadro además, se utilizan letras latinas para denotar a los tratamientos y letras griegas para nombrar a los niveles del tercer factor de bloque. Al igual que en el cuadro latino, cada letra (latinas y griegas) debe aparecer sólo una vez en cada renglón y en cada columna. Además, cada par de letras debe aparecer sólo una vez en todo el arreglo.

Se caracteriza este modelo experimental por tener que controlar tres factores de bloques y un factor de tratamiento utilizando los cuatros factores en la misma cantidad de niveles”.

2.3.6.8. Diseño factoriales

Según (Guitierrez & De la vara, 2008) menciona que el objetivo de un diseño factorial es estudiar el efecto de varios factores sobre una o varias respuestas, cuando se tiene el mismo interés sobre todos los factores. Por ejemplo, uno de los objetivos particulares más importantes que en ocasiones tiene un diseño factorial es determinar una combinación de niveles de los factores en la que el desempeño del proceso sea mejor. Los factores pueden ser de tipo cualitativo (máquinas, tipos de material, operador, la presencia o ausencia de una operación previa, etc.), o de tipo cuantitativo (temperatura, humedad, velocidad, presión, etc.).

Para estudiar la manera en que influye cada factor sobre la variable de respuesta es necesario elegir al menos dos niveles de prueba para cada uno de ellos.

Así, la matriz de diseño o arreglo factorial es el conjunto de puntos experimentales o tratamientos que pueden formarse considerando todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores. Por ejemplo, con $k = 2$ factores, ambos con dos niveles, se forma el diseño factorial $2 \times 2 = 4$ que consiste en cuatro combinaciones o puntos experimentales. Si ahora uno tiene tres niveles y el otro dos, se pueden construir 3×2 combinaciones que dan lugar al diseño factorial 3×2 .

Ventajas

- Permite obtener más información que en un experimento de un solo factor.
- Se estudian efectos principales, efectos cruzados y de interacción de los factores.

CAPITULO III

3. METODOLOGIA

3.1. Características del área experimental

3.1.1. Ubicación del área de estudio

La presente área de estudio para la realización del experimento de investigación se lo realizó en la ciudad de Manta en el laboratorio de la Facultad Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí.

El laboratorio de investigación de la Facultad de Agropecuaria tiene las siguientes condiciones ambientales:

- Temperatura de trabajo: 19 a 24°C
- Humedad relativa: 48 a 58%
- Presión: 0,90 atm

3.2. Determinación de las variables experimentales

3.2.1. Factores en estudio

En el siguiente cuadro se muestran los factores a estudiar con sus respectivos niveles como son tipo de nutriente (urea, sulfato de amonio y nitrato de potasio) y los factores perturbadores como son porcentaje de solido (17°, 22, y 26 °Bx) y temperatura de fermentación (26° C, 29 y 32° C) Cuadro 1 Esquema de los factores en estudio

Cuadro 2.2: Esquema de los factores en estudio

FACTOR DE INTERÉS	NIVELES	FACTORES PERTURBADORES	NIVELES
TIPO DE NUTRIENTE	UREA (A)	% DE SOLIDOS SOLUBLES (° BRIX)	17° Bx
	SULFATO DE AMONIO(B)		22° Bx
	NITRATO DE POTASIO (C)		26° Bx
		TEMPERATURA	26 ° C
			29 ° C
			32 ° C

3.3. Unidades experimentales del diseño

Las unidades experimentales estuvieron conformadas por 1 lt de solución las cuales fueron elaboradas con melaza adicionándoles diferentes fuentes de nutrientes como son: urea, sulfato de amonio y nitrato de potasio a iguales concentraciones por cada litro de solución.

3.3.1. Análisis estadístico

3.3.2. Análisis funcional

Se procederá a realizar la prueba de Tukey al 5% para todos los tratamientos, para el factor tipo de nutriente A, B, C y la prueba de Diferencia Mínima Significativa (D.M.S.).

3.4. Diseño experimental

Para la realización del estudio experimental de la investigación se utilizó un diseño en cuadrado latino de 3 x 3.

3.4.1. Característica del diseño experimental

Para el desarrollo de la presente investigación se ha adoptado el Diseño en Cuadrado Latino, debido a que permite estudiar y analizar los tipos de

nutrientes frente a dos factores perturbadores controlables, como son temperatura de fermentación y concentración de sólidos solubles en la solución (°Bx) para determinar el rendimiento del porcentaje de alcohol por litro de solución en la melaza de caña de azúcar.

Número de tratamientos: nueve (9)

Número de unidades experimentales: nueve (9)

3.4.2. Tratamientos

3.4.2.1. Tratamientos a estudiar

Cuadro 2.3: Tratamientos a estudiar

NUMERO	TRATAMIENTO	FACTORES PERTURBADORES		FACTOR DE INTERES
		% DE SOLIDOS(°BRIX)	TEMPERATURA	TIPO DE NUTRIENTE
1	T1(A)	17° °Bx	26° C	Urea (A)
2	T2(B)	17° °Bx	26° C	Sulfato de Amonio(B)
3	T3(C)	17° °Bx	26° C	Nitrato Potasio(C)
4	TR(Blanco)	17° °Bx	26° C	Sin nutriente
5	TR(Blanco)	17° °Bx	26° C	0% de levadura
6	T4(A)	22° °Bx	29° C	Urea(A)
7	T5(B)	22° °Bx	29° C	Sulfato de Amonio(B)
8	T6(C)	22° °Bx	29° C	Nitrato Potasio(C)
9	TR(Blanco)	22° °Bx	29° C	Sin nutriente
10	TR(Blanco)	22° °Bx	29° C	0% de levadura
11	T7(A)	26° °Bx	32° C	Urea(A)
12	T8(B)	26° °Bx	32° C	Sulfato de Amonio(B)
13	T9(C)	26° °Bx	32° C	Nitrato de Potasio(C)
14	TR(Blanco)	26° °Bx	32° C	Sin nutriente
15	TR(Blanco)	26° °Bx	32° C	0% de levadura

Además de los tratamientos iniciales se va a considerar dos tratamientos referenciales (sin nutriente y sin la adición de levadura (blanco))

Cuadro 2.4 Aleatorización de todos los posibles datos del diseño cuadrado latino

17°Bx			
ALCOHOL ETILICO	Temperatura		
	26°C	29°C	32°C
Urea	1	4	7
Sulfato de amonio	2	5	8
Nitrato de potasio	3	6	9

17°Bx			
ALCOHOL ETILICO	Temperatura		
	26°C	29°C	32°C
Urea	1	4	7
Sulfato de amonio	2	5	8
Nitrato de potasio	3	6	9

17°Bx			
ALCOHOL ETILICO	Temperatura		
	26°C	29°C	32°C
Urea	1	4	7
Sulfato de amonio	2	5	8
Nitrato de potasio	3	6	9

22°Bx			
ALCOHOL ETILICO	Temperatura		
	26°C	29°C	32°C
Urea	1	4	7
Sulfato de amonio	2	5	8
Nitrato de potasio	3	6	9

22°Bx			
ALCOHOL ETILICO	Temperatura		
	26°C	29°C	32°C
Urea	1	4	7
Sulfato de amonio	2	5	8
Nitrato de potasio	3	6	9

22°Bx			
ALCOHOL ETILICO	Temperatura		
	26°C	29°C	32°C
Urea	1	4	7
Sulfato de amonio	2	5	8
Nitrato de potasio	3	6	9

26°Bx			
ALCOHOL ETILICO	Temperatura		
	26°C	29°C	32°C
Urea	1	4	7
Sulfato de amonio	2	5	8
Nitrato de potasio	3	6	9

26°Bx			
ALCOHOL ETILICO	Temperatura		
	26°C	29°C	32°C
Urea	1	4	7
Sulfato de amonio	2	5	8
Nitrato de potasio	3	6	9

26°Bx			
ALCOHOL ETILICO	Temperatura		
	26°C	29°C	32°C
Urea	1	4	7
Sulfato de amonio	2	5	8
Nitrato de potasio	3	6	9

ALEATORIZACIÓN	
1	3
2	2
3	1
4	4
5	5
6	6
7	9
8	7
9	8

Cuadro 2.5 Aleatorización de datos para la construcción de la matriz del diseño experimental

17°Bx			
ALCOHOL ETILICO	Temperatura		
	26°C	29°C	32°C
Urea	A	B	C
Sulfato de amonio	B	C	A
Nitrato de potasio	C	A	B

17°Bx			
ALCOHOL ETILICO	Temperatura		
	26°C	29°C	32°C
Urea	A	B	C
Sulfato de amonio	B	C	A
Nitrato de potasio	C	A	B

17°Bx			
ALCOHOL ETILICO	Temperatura		
	26°C	29°C	32°C
Urea	A	B	C
Sulfato de amonio	B	C	A
Nitrato de potasio	C	A	B

22°Bx			
ALCOHOL ETILICO	Temperatura		
	26°C	29°C	32°C
Urea	C	A	B
Sulfato de amonio	B	C	A
Nitrato de potasio	A	B	C

22°Bx			
ALCOHOL ETILICO	Temperatura		
	26°C	29°C	32°C
Urea	C	A	B
Sulfato de amonio	B	C	A
Nitrato de potasio	A	B	C

22°Bx			
ALCOHOL ETILICO	Temperatura		
	26°C	29°C	32°C
Urea	C	A	B
Sulfato de amonio	B	C	A
Nitrato de potasio	A	B	C

26°Bx			
ALCOHOL ETILICO	Temperatura		
	26°C	29°C	32°C
Urea	B	C	A
Sulfato de amonio	A	B	C
Nitrato de potasio	C	A	B

26°Bx			
ALCOHOL ETILICO	Temperatura		
	26°C	29°C	32°C
Urea	B	C	A
Sulfato de amonio	A	B	C
Nitrato de potasio	C	A	B

26°Bx			
ALCOHOL ETILICO	Temperatura		
	26°C	29°C	32°C
Urea	B	C	A
Sulfato de amonio	A	B	C
Nitrato de potasio	C	A	B

3.4.2.2. Matriz del diseño experimental

En el siguiente cuadro se muestra la matriz construida ya con los factores previamente aleatorizados, los resultados de este experimento o la función respuesta se expresaran en la cantidad de alcohol o rendimiento en ml obtenido por cada tratamiento o litro de solución al finalizar la etapa de destilación (ver cuadro).

Cuadro 2. 6 Esquema de la matriz del diseño experimental

Acohol etilico	Temperaturas		
	26 ° C	29 ° C	32 ° C
17 °Bx	C	B	A
22 °Bx	A	C	B
26 °Bx	B	A	C

3.4.3. Evaluación de las variables en el experimento

Las variables en estudio que se evaluaron en el proceso de la fermentación fueron °Brix, pH, concentración de nutrientes (urea, sulfato de amonio y nitrato de potasio) y soluto en la solución. Durante la fermentación se consideró, pH, además sólidos solubles finales (° Brix) y al producto final, Grado Alcohólico y Rendimiento.

3.4.3.1. Sólidos solubles (° Brix)

Con la finalidad de poder evaluar el porcentaje de sólidos o azúcar presente en la solución de melaza de caña de azúcar se empleó un refractómetro de escala de 0 a 90°Brix, posteriormente se midió con la ayuda de una probeta de 1000 ml de capacidad para determinar la cantidad de soluto necesario para realizar la dilución, se determinó la cantidad de solvente en todos los tratamientos utilizando la siguiente formula:

$$Bf$$

Donde:

X = Cantidad de agua que necesita en Lt

Mi = Cantidad de melaza de caña de azúcar en Lt

Bi = grados brix inicial

Bf = grados brix final

3.4.3.2. PH

Durante la fermentación: se utilizó en la investigación un potenciómetro, los datos se registraron durante la fermentación en un periodo de 24 horas entre cada registró, esto se aplicó a todos los tratamientos

3.4.3.3. Nutrientes

Antes de adicionar los nutrientes a las soluciones para preparar los tratamientos se hicieron análisis de nitrógeno total en el Laboratorio CE.SE.C.CA (ver anexo 20) a todos los nutrientes con el fin de poder determinar la concentración de nitrógeno que contienen cada nutriente y conocer una concentración de nitrógeno tolerable que puedan soportar las levaduras.

Se prepararon muestras de 1 g de nutriente disueltos en 1lt de solución de mosto de melaza; es decir 1% en m/V, a continuación se muestran los cálculos realizados para determinar la concentración de nitrógeno para cada nutriente.

Cálculos para la determinación de nitrógeno con las tres fuentes de nutrientes en las soluciones de mosto de melaza.

PPM de N (urea)

$$= \frac{1 \text{ g de urea (CH}_4\text{N}_2\text{O)}}{1 \text{ Lt de solucion}} \times \frac{28 \text{ g de N}}{60,60 \text{ g de CH}_4\text{N}_2\text{O}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$$
$$= 462 \text{ PPM de N}$$

PPM de N (Sulfato de Amonio)

$$= \frac{1 \text{ g de sulfato de A (CH}_4\text{N}_2)}{1 \text{ Lt de solucion}} \times \frac{28 \text{ g de N}}{132,14 \text{ g de CH}_4\text{N}_2} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$$
$$= 212 \text{ PPM de N}$$

PPM de N (Nitrato de Potasio)

$$= \frac{1 \text{ g de Nitrato de P (KNO}_3)}{1 \text{ Lt de solucion}} \times \frac{14 \text{ g de N}}{101,10 \text{ g KNO}_3} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$$
$$= 138 \text{ PPM de N}$$

3.4.3.4. Producto final (alcohol etílico)**➤ Grados Alcohólicos**

Se procedió a medir el volumen de alcohol obtenido de la destilación en las soluciones de cada tratamiento con el fin de poder conocer la concentración de alcohol o grados alcohólicos de cada tratamiento, y posteriormente se midieron los grados alcohólicos utilizando un alcoholímetro expresado en (% V) una vez obtenida la cantidad de alcohol en la destilación.

➤ Rendimiento

Se procedió a medir el volumen de alcohol destilado, con el objeto de conocer el rendimiento de alcohol que apporto cada nutriente en la fermentación en todas las soluciones de mosto fermentado basándose en el volumen de alcohol destilado por cada litro de mosto y luego se expresó el rendimiento en ml de alcohol en función al a los grados de alcohol obtenido de la destilación.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DSICUCIONES

4.1. Proceso experimental para la fermentación

4.1.1. Pruebas pilotos

Las instalaciones del Laboratorio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias fueron parte fundamental para poder realizar las pruebas físico-químicas. Para obtener una buena fermentación y poder realizar de una forma correcta el diseño experimental, es necesario que mediante los análisis del laboratorio éstos nos permitan obtener un control idóneo en el manejo del experimento y por ende obtener una eficiente fermentación y por consiguiente en su destilación.

4.1.2. Dilución de la melaza

Para nuestras pruebas se utilizó melaza de caña de azúcar proveniente de las distribuidoras agrícolas en la ciudad de Manta, este subproducto viene con una concentración de sólidos a 85°brix. Por lo que se realizó un balance de materia para determinar cuántos gramos de azúcar (sacarosa) de deben añadir para preparar los mostos hasta obtener en la soluciones concentraciones de 17 ,22 y 26°Brix para todos los tratamientos.

4.1.3. Preparación del mosto

Antes de llevar a cabo la inoculación de las levaduras se debe esterilizar en recipientes de vidrio con la finalidad de eliminar contaminaciones que existen en el ambiente ya que estos perturban la fermentación. El mosto de melaza se lo pasteurizó por 15 minutos a 85°C, luego de este proceso se enfrían las muestras y se procede a ser utilizado.

4.1.4. Preparación del inóculo inicial para determinar el tipo de levadura

Una vez realizada la esterilización se procede a realizar la preparación de cultivo de la levadura con dos medios de cultivos seleccionados que son levaduras *Saccharomyces cerevisiae* de marca comercial (levapan): levadura activa seca (LSA) y levadura fresca (LF) preparando las mismas concentraciones para los dos tipos de cultivos.

Se pesó 0,40 g de levadura diluida en 1000 ml de mosto previamente esterilizado, agregando 274,75 g de melaza/ 811 ml de agua destilada hasta obtener entre unos 19 a 20° brix, se los midieron utilizando un refractómetro luego se homogeniza la mezcla y se le suministra aireación durante 5 minutos para darles las condiciones apropiadas. Una vez realizado este proceso se procede a incubar durante tres días a 30°C en matraces Erlenmeyer, cuyos análisis se los realizaron en el CE.SE.C.CA. (Ver anexo 24). Obteniendo los resultados se pudo determinar una suspensión celular 7×10^5 células /ml para la levadura activa seca y con el medio de cultivo levadura fresca se obtuvo 2×10^6 células /ml a iguales concentraciones con los dos medios de cultivos, la LSA es la que mejor suspensión celular genera.

4.1.5. Preparación de las soluciones para los tratamientos

Se procedió a preparar en un recipiente de plástico con tapa hermética (bioreactor) con capacidad para 1000 ml de mosto de melaza previamente pasteurizado a 4.45 pH y a 17°Bx agregando 240,19 g de melaza / 834 ml de agua destilada para completar un litro de mosto de solución.

Los cálculos se lo hicieron aplicando la siguiente fórmula como se puede observar más adelante hasta obtener dicha concentración, a una temperatura de 26°C para el primer grupo de tratamientos. A continuación se agregan los nutrientes a razón de 1g/Lt de urea, 1g/L de sulfato de amonio y 1g/L de nitrato de potasio a las mismas concentraciones, de la misma forma se preparó 1000 ml de mosto a 22°Bx, agregando 296,3 g de

melaza diluida /795 ml de agua destilada para completar un litro de mosto de solución a una temperatura de 29°C para el segundo grupo de tratamientos, agregándoles nutrientes a las mismas concentraciones y finalmente se prepararon 1000 ml de mosto a 26°Bx agregando 337,38 g de melaza diluida /766 ml de agua destilada a una temperatura de 32°C agregándoles nutrientes para el tercer grupo de tratamientos; además se realizaron tratamientos como testigo referencial sin la adición de nutrientes y con cero % levadura; en el siguiente ejemplo se muestran los cálculos realizados para la determinación de sólidos solubles o grados brix en la solución (ver cuadro).

X = cantidad de agua en Lt

Mi = Cantidad de melaza en Lt

Bi = Grados brix (inicial)

Bf = Grados brix (final)

Cuadro 2. 7: Cálculo para la determinación de soluto y solvente para las soluciones.

$$x = \frac{M_i \times B_i}{B_f} = \frac{(166,80 \text{ ml}) \times (85 \text{ Brix})}{(17 \text{ Brix})} = 834 \text{ ml de agua}$$

$$x = \frac{M_i \times B_i}{B_f} = \frac{(205,76 \text{ ml}) \times (85 \text{ Brix})}{(22 \text{ brix})} = 795 \text{ ml de agua}$$

$$x = \frac{M_i \times B_i}{B_f} = \frac{(234,38 \text{ ml}) \times (85 \text{ Brix})}{(26)} = 766 \text{ ml de agua}$$

Para el primer grupo de tratamientos

Componente	Masa (g)	Densidad (g/mL)	Volumen (mL)	%
Melaza	240,19	1,44	166,80	16,67
Agua	834	1	834,00	83,33
Total			1000,80	100,00

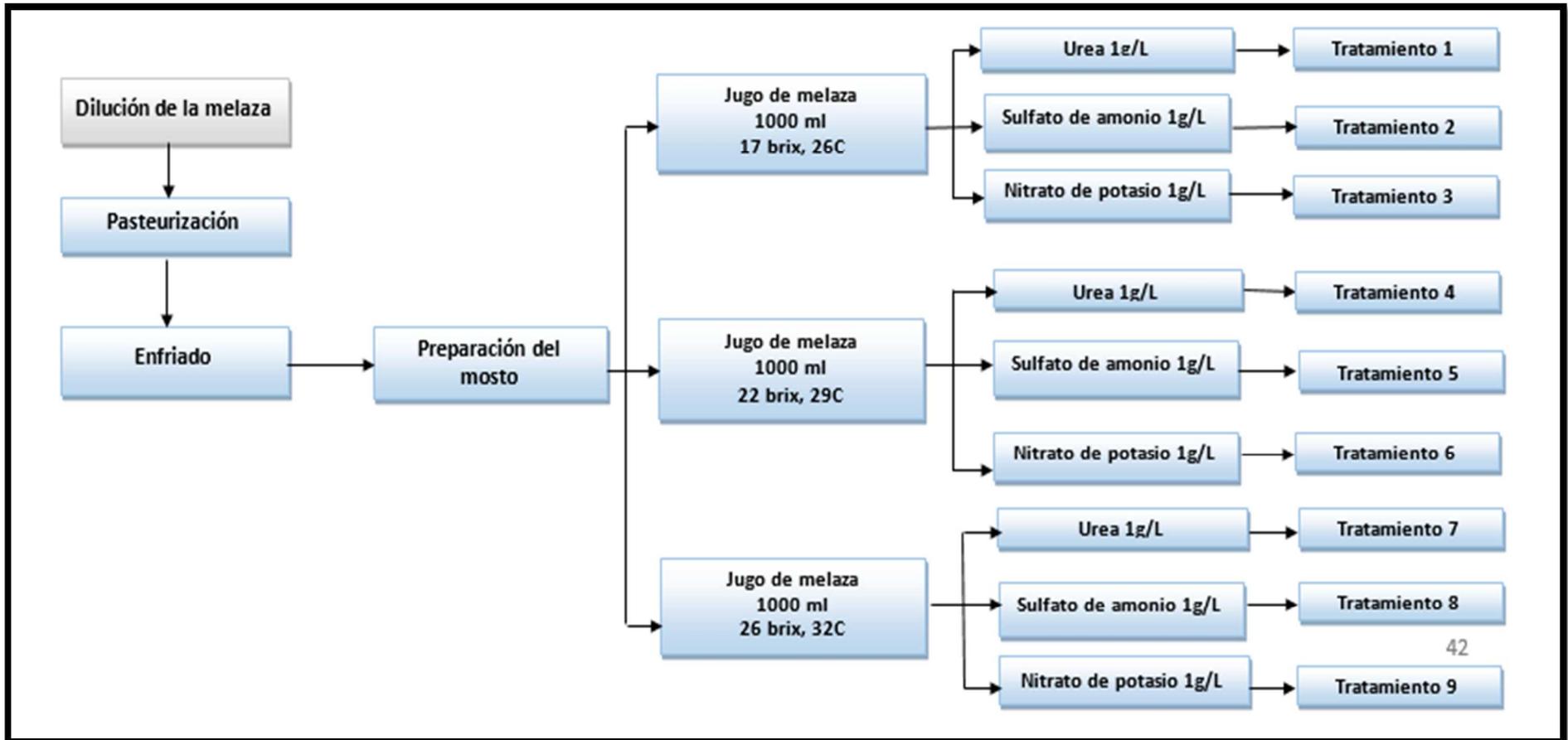
Para el segundo grupo de tratamientos

Componente	Masa (g)	Densidad (g/mL)	Volumen (mL)	%
Melaza	296,3	1,44	205,76	20,56
Agua	795	1	795,00	79,44
Total			1000,76	100,00

Para el tercer grupo de tratamientos

Componente	Masa (g)	Densidad (g/mL)	Volumen (mL)	%
Melaza	337,5	1,44	234,38	23,41
Agua	766,6	1	766,60	76,59
Total			1000,98	100,00

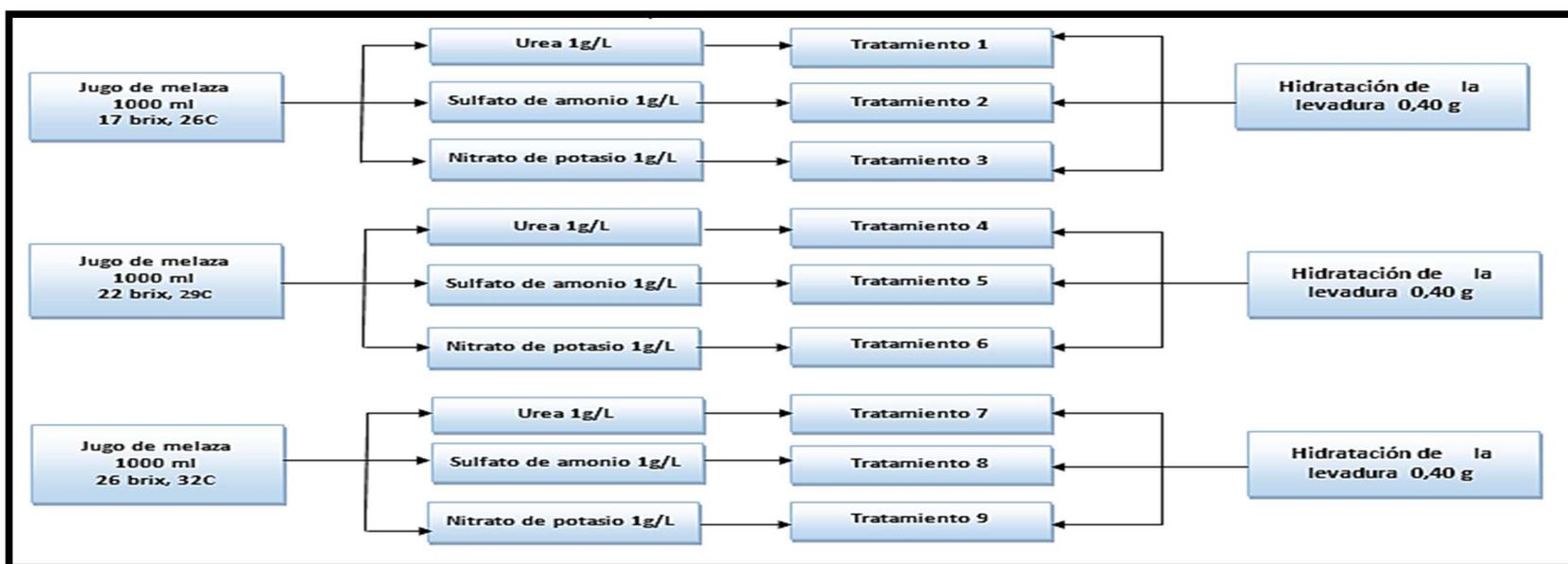
Cuadro 2.8 : Diagrama de proceso para la preparación de los tratamientos



4.1.6. Hidratación de la levadura activa

Posteriormente se agregó 0,40 g de levadura activa seca para cada tratamiento en un recipiente de plástico con 1000 ml de mosto de melaza a 17°Bx a 4,45 PH a 26°C para el primer grupo de tratamientos de igual forma se realizó el mismo procedimiento para el segundo grupo tratamientos a 22°Bx a 29°C y para el tercer grupo de tratamientos a 26°Bx a 32°C; luego se la agitó en baño maría suministrándole aire durante cinco minutos para darles las condiciones de activación (ver cuadro).

Cuadro 2.9 : Procedimiento a seguir para la hidratación de la levadura



4.1.7. Inicio de la fermentación

Para poder evaluar las condiciones de los grados brix, y temperatura con las tres fuentes de nutrientes en el proceso de fermentación alcohólicas se utilizó una especie de bioreactor con capacidad de 1300 ml donde se le agregó 1000 ml de mosto de melaza ya preparado para el primer grupo de tratamientos 1, 2, 3 incubados a una temperatura de 26°C, y de igual forma para el segundo grupo de tratamientos 4, 5, 6 incubados a una temperatura de 29°C y finalmente para los tratamientos 7, 8, 9 incubados a una temperatura de 32°C, para cada grupo de tratamientos se consideraron dos tratamientos referenciales (Blanco) con 0 % de levaduras y sin la adición de nutrientes. Se procedió a monitorear los grados Brix en diferentes intervalos de tiempos a las 24, 48, 72, 90 y 120 horas en donde se pudo analizar los grados Brix consumidos y la concentración de alcohol obtenido una vez terminada la fermentación.

4.1.8. Recuperación de la levadura

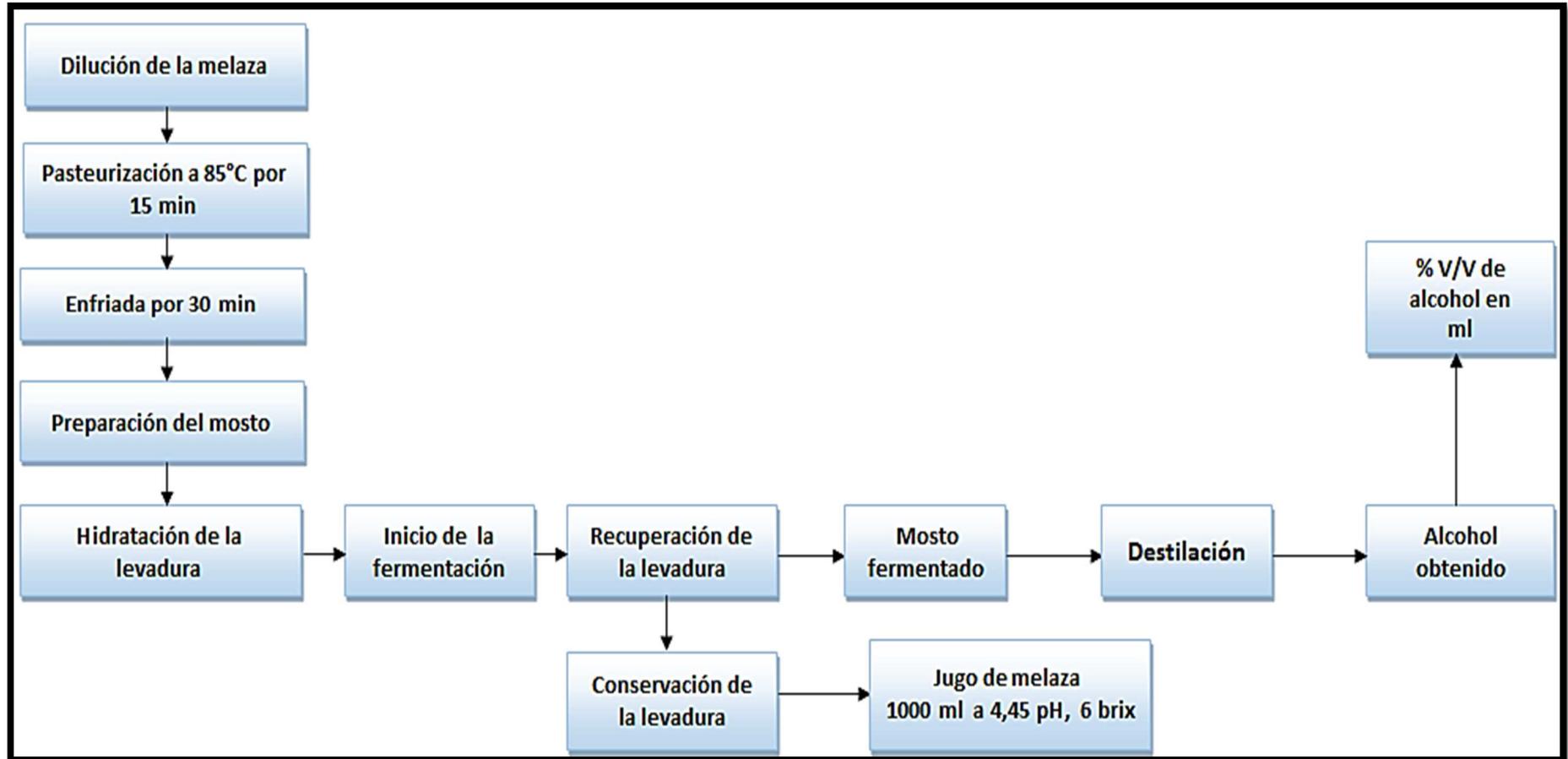
Una vez culminada la fermentación se procedió inmediatamente a recuperar la levadura activa seca (LAS) debido a que el alcohol que se encuentra podría ocasionar la muerte de las células del mosto de melaza.

Se procedió a centrifugar en una centrifugadora automática, el precipitado (levaduras) y se recuperó en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, para poder darles las condiciones apropiadas debe conservarse con mosto de melaza en un matraz a temperatura ambiente ya que esta levadura recuperada se la puede reutilizar como inóculo para la fermentación.

4.1.9. Método de destilación para determinación del alcohol etílico

Una vez terminada la fermentación se procedió a realizar la destilación, el alcohol obtenido se procedió a realizar en un sistema de destilación manual debido a que no se contaba con un sistema de control automático de tiempo y temperatura por lo que se tomaron precauciones en la destilación. Se realizó la destilación a un rango de temperatura desde 78,3 a 96°C para poder eliminar la presencia de alcoholes superiores, el alcohol obtenido fue recolectada en un vaso de precipitación de 200 ml el proceso de destilación se lo realizó a volumen constante para medir el grado alcohólico, para lo cual se utilizó una probeta de 100 ml y un alcoholímetro a 20°C, el grado alcohólico se lo midió en % V/V.

Cuadro 2.10 : Diagrama de proceso para la determinación de alcohol etílico.



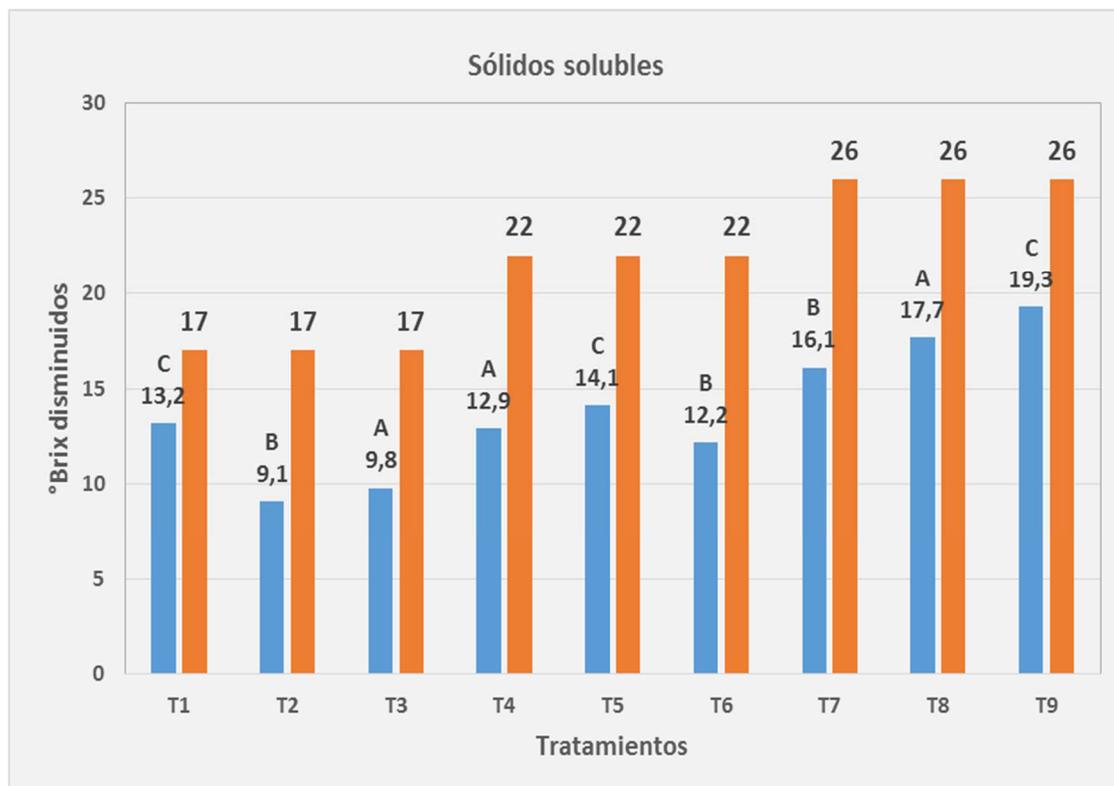
4.2. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Con el objeto de comprobar los factores, variables e hipótesis que se plantearon fue necesario evaluar estadísticamente los factores como tipo de nutriente: (Urea, Sulfato de amonio, Nitrato de potasio), concentración de sólidos ($^{\circ}$ Brix) y temperatura de fermentación, dentro de las variables en estudio se consideró sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix), Grado Alcohólico y Rendimiento.

Al inicio de la fermentación se evaluaron concentración de sólidos ($^{\circ}$ Brix) en todos los tratamientos y PH, durante el proceso también se monitorearon las variables anteriormente mencionadas y al finalizar la fermentación se evaluaron los grados alcohólicos y rendimientos, en el cuadro siguiente se muestran los cálculos estadísticos.

4.2.1. Análisis Estadísticos de la evaluación de las condiciones de Las condiciones de fermentación a diferentes condiciones de °Brix y temperatura

Grafico 4.1 Representación Gráfica de la Variación de la concentración de la concentración de solidos (°Brix)



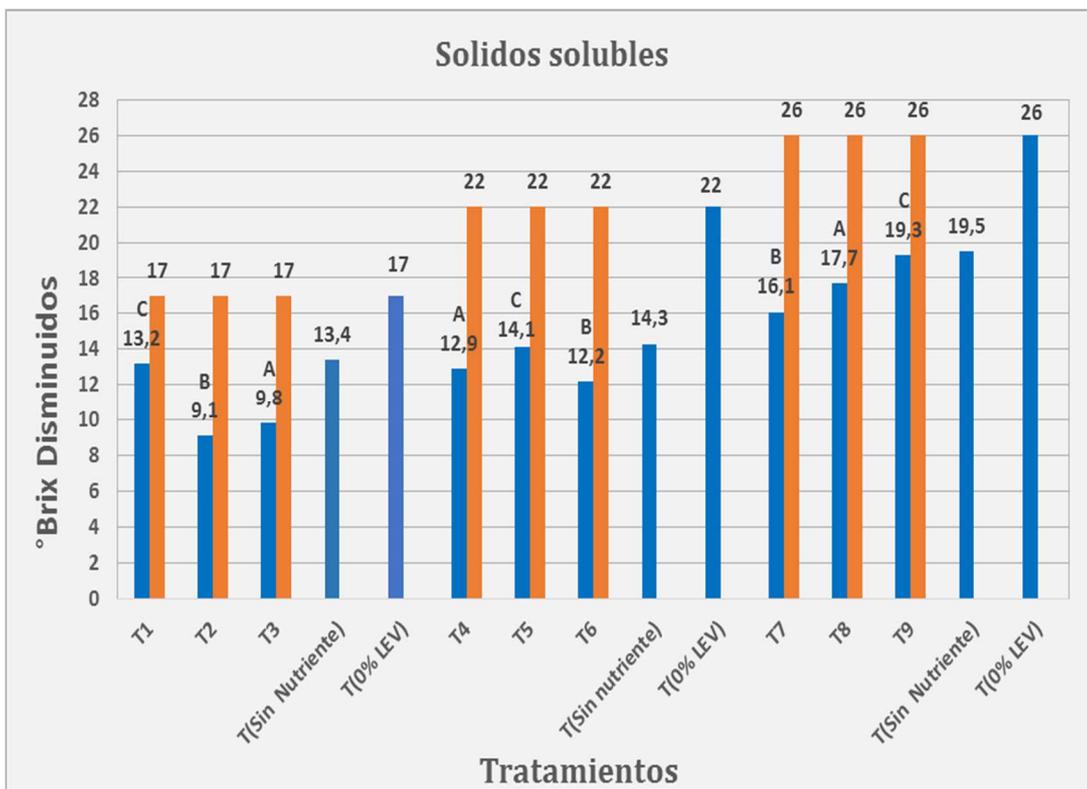
Al poder evaluar las condiciones de fermentación alcohólica en los nueve tratamientos de T1 a T9 con la adición de las tres fuentes de nutrientes como son: Urea (A), sulfato de amonio (B) y nitrato de potasio(C) a diferentes condiciones de °Brix y temperatura como se puede observar en la gráfica; que para los primeros tres tratamientos a 17 °Brix y a 26 °C la disminución de azúcares es mayor para el T2 que se la evaluó con el nutriente B, seguido del T3 que representa el tipo de nutriente A, a diferencia del T1 con nutriente C que tiene menos °Brix consumidos.

La evaluación de las tres fuentes de nutrientes para el segundo grupo de tratamientos (T4, T5 y T6) expuestos a 26 °C a 22 °Brix como se puede observar en la gráfica la disminución de azúcar sigue siendo mayor para el

tipo de nutriente B que representa el T6 seguido del T4 con tipo de nutriente A, mientras que el T5 con la fuente de nutriente tipo C sigue presentando menor °Brix consumidos.

Y finalmente se evaluaron las tres fuentes de nutrientes expuestas a 29°C a 26°Brix para el tercer grupo de tratamientos (T7, T8 y T9) y se pudo obtener que el mayor consumo de azúcar se sigue manteniendo para el tipo de nutriente B es decir para el T7, seguido del T8 con tipo de nutriente tipo A, mientras que para el T9 con la adición de nutriente tipo C es el que menor °Brix ha consumido; por lo tanto su comportamiento en cuanto a la reducción de los °Brix es el mismo para todos los tratamientos.

Grafico 4.2 Representación gráfica de la variación de la concentración de sólidos con y sin nutriente

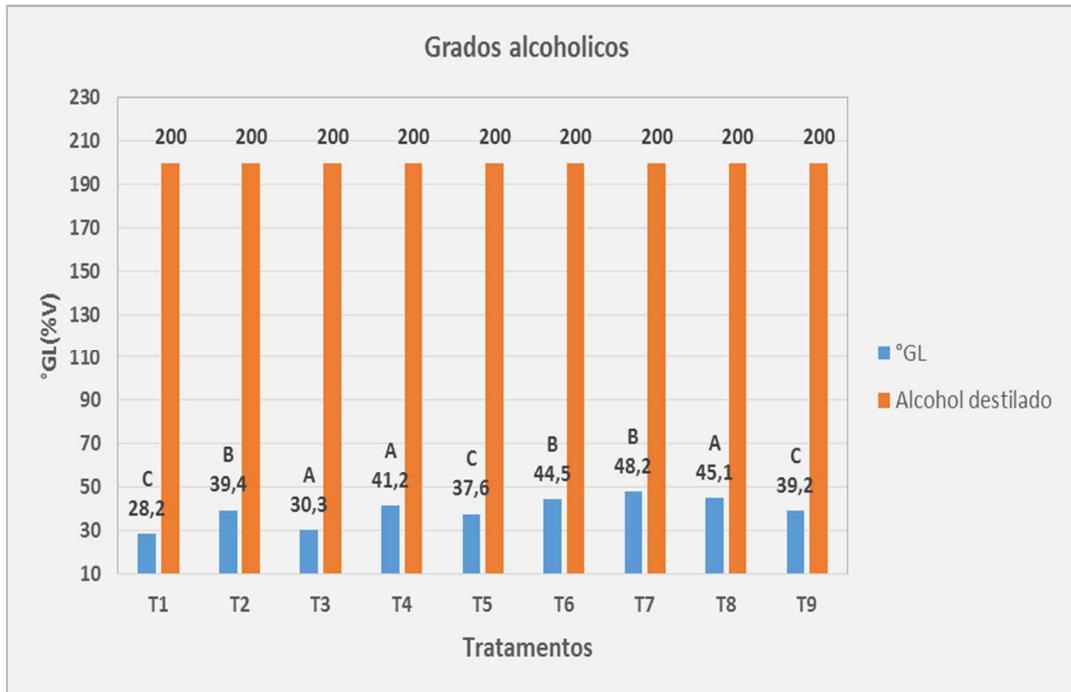


Al poder evaluar el proceso de fermentación alcohólicas a diferentes condiciones de °Brix y temperatura considerando los tratamientos de testigo referencial sin la adición de nutrientes y levaduras como se puede observar en la gráfica el primer grupo de tratamientos fueron evaluados a 17°Brix a

26°C, los tratamientos que generaron mayor consumo de °Brix fueron los T2 Y T3 que se le adicionaron nutrientes con una disminución de azúcares de (9,1°Brix) con el tipo de nutriente B y (9,8°Brix) para el tipo de nutriente A mientras que el tratamiento sin la adición de nutriente es el que produjo menos consumos (13,4°Brix), para el segundo grupo de tratamientos evaluados a 22°Brix a 26°C los tratamientos que siguen presentando mayor consumo de °Brix son los T4 y T6 con una disminución de (12,2°Brix) con el tipo de nutriente B y (12,9°Brix) con el tipo de nutriente A y con una disminución de (14,3°Brix) para el tratamiento sin la adición de nutriente, y finalmente para el tercer grupo de tratamientos evaluados a 26°Brix a 32°C como se puede observar que se sigue presentando mayor consumo de °Brix los tratamientos que se les adicionó nutrientes que son los T7 y T8 con una disminución de °Brix de (16,1°Brix) para el nutriente B y (17,7°Brix) para el nutriente A y con una disminución de (19,5°Brix) para el tratamiento sin la adición de nutriente en la fermentación y un blanco referencial con 0% de levadura para saber si hubo desarrollo de otros microorganismos en la fermentación.

Como se puede observar que al evaluar los tres grupos de tratamientos al no adicionarles nutrientes se producen un menor consumo de °Brix en los tratamientos por ende las fuentes de nutrientes influyen en el consumo de azúcares en el proceso de fermentación.

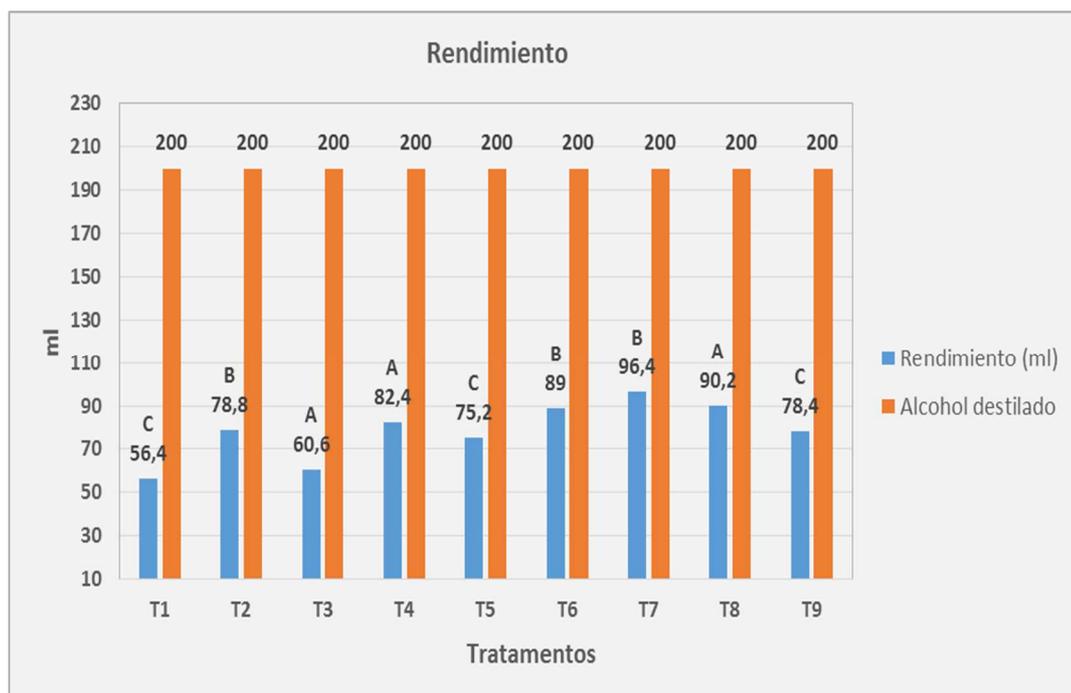
Grafico 4.3 Representación gráfica del contenido de grados alcohólicos



Al evaluar el proceso de fermentación alcohólica con las tres fuentes de nutrientes a diferentes condiciones de °Brix y temperatura para el primer grupo de tratamientos evaluados a 17°Brix y a 26°C, los grados alcohólicos obtenidos al final del proceso de fermentación el que mayor grado de alcohol presentó es el tipo de nutriente B (sulfato de amonio) con 39,4°GL representado para el T2, seguido del tipo de nutriente Urea (A) con 30,3°GL representado por el T1, mientras que el T3 fue el que menor grados de alcohol presentó evaluado con el tipo de nutriente C (nitrato de potasio) los grados alcohólicos fueron de 28,2°GL, de igual forma se evaluaron el proceso de fermentación alcohólicas para el segundo grupo de tratamientos con las tres fuentes de nutrientes a 22°Brix y 29°C y se midieron los grados de alcohol en la destilación y las fuentes de nutrientes que presentaron mayor grados alcohólicos fueron las fuentes de nutrientes B (sulfato de amonio) con 48,2°GL representado por el T6 y para el nutriente A (Urea) con 41,2°GL representado por el T4, mientras que la fuente de nutriente tipo C (nitrato de potasio) sigue presentando menor grados alcohólicos con 37,6°GL.

Y finalmente se evaluaron las tres fuentes de nutrientes a 26°Brix y 32°C y los tratamientos que mayor rendimientos presentaron fueron los T7 y T8 representado con las fuentes de nutrientes B (sulfato de amonio) con grados de alcohol de 48,2°GL y A (Urea) con grados de alcohol de 45,1°GL mientras la fuente de nutriente C (Nitrato de potasio) representado por el T9 sigue presentando menor grados alcohólicos con 39,2°GL.

Grafico 4.4 Representación gráfica del rendimiento de alcohol etílico



Al evaluar el proceso de fermentación alcohólica para el primer grupo de tratamiento estos tratamientos se los evaluaron a 17°Brix y 22°C como se puede observar en la gráfica el tipo de nutriente que mayor cantidad de alcohol produce es el nutriente sulfato de amonio (B) con un rendimiento de 78,8 ml representado por el T2 mientras que los nutriente Urea (A) y nitrato de potasio (C) representados por los tratamientos 1 y 3 que son los que menor cantidad de alcohol producen con un rendimiento de 60,6 ml con el tipo de nutriente A (Urea) y 56,4 ml para el tipo de nutriente C(nitrato de potasio) de igual forma se evaluaron las tres fuentes de nutrientes para el segundo grupo de tratamientos se evaluaron a 22°Brix a 26° y se obtuvo que el tipo de nutriente que mayor cantidad de alcohol produce es el sulfato de

amonio (B) representado por el T4 con un rendimiento de 89 ml mientras que los T5 y T6 presentaron menor rendimiento de alcohol con un rendimiento de 82,4 ml con Urea(A) y 75,2 ml con nitrato de potasio(C), y finalmente se evaluaron las tres fuentes de nutrientes a 26°Brix a 29°C y se pudo obtener que el sulfato de amonio sigue presentando mayor cantidad de alcohol con un rendimiento de 96,4 ml y mientras que las fuentes de nutrientes urea(A) y nitrato de potasio(C) siguen presentando menor cantidad de alcohol con un rendimiento de 90,2 ml y 78,4 ml al final de la destilación.

Cuadro 4. 11 Diagrama de cálculo estadístico del diseño experimental

CALCULOS (CUADRADO LATINO)

ETANOL	Temperaturas			TOTAL
	26 ° C	29 ° C	32 ° C	
17 ° Bx	56,40	78,80	60,60	195,80
22 ° Bx	82,40	75,20	89,00	246,60
26 ° Bx	96,40	90,20	78,40	265,00
TOTAL	235,20	244,20	228,00	707,40

ETANOL	Temperaturas			TOTAL
	26 ° C	29 ° C	32 ° C	
17 ° Bx	3180,96	6209,44	3672,36	13062,76
22 ° Bx	6789,76	5655,04	7921,00	20365,80
26 ° Bx	9292,96	8136,04	6146,56	23575,56
TOTAL	19263,68	20000,52	17739,92	57004,12

$$SS_T = \sum_i \sum_j \sum_k Y_{ijk}^2 - \frac{Y^2}{N} = 1402,48$$

$$SS_{Tratamiento\ con\ letra\ latina} = \frac{1}{p} \sum_{j=1}^p Y_j^2 - \frac{Y^2}{N} = 492,99$$

$$SS_{Renglones} = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p Y_i^2 - \frac{Y^2}{N} = 856,43$$

$$SS_{Columnas} = \frac{1}{p} \sum_{k=1}^p Y_k^2 - \frac{Y^2}{N} = 43,92$$

$$SS_E = SST - SS_{Tratamiento\ letra\ latina} - SS_{Renglones} - SS_{Columnas} = 9,15$$

SUMATORIA LETRAS LATINAS	
A =	233,20
B =	264,2
C =	210
SUMA	707,40

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F Calculada	F tabulada
Letras latinas (Tipo de nutriente)	492,99	2	246,49	53,90	19,00
Renglones(Grados Brix)	856,43	2	428,21	93,63	
Columnas(Temperatura)	43,92	2	21,96	4,80	
Error	9,15	2	4,57		
Total	1402,48	8			

Cuadro 4.12 Análisis de varianza para los factores tipo de nutrientes, °Brix disminuidos y temperatura al evaluar el proceso de fermentación alcohólica.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F Calculada	F tabulada
Letras latinas (Tipo de nutriente)	492,99	2	246,49	53,90	19,00
Renglones(Grados Brix)	856,43	2	428,21	93,63	
Columnas(Temperatura)	43,92	2	21,96	4,80	
Error	9,15	2	4,57		
Total	1402,48	8			

El análisis de varianza, como se puede observar para los factores en estudios que son los tipos de nutrientes, °Brix (sólidos solubles) y temperatura, al evaluar el proceso de fermentación alcohólica con las tres fuentes de nutrientes a diferentes condiciones de °Brix y temperatura se observa significancia estadística para el factor tipo de nutriente (tratamientos) y para el factor concentración de sólidos (°Brix), pero no se observa significancia estadística para el factor temperatura por lo tanto se concluye que el tipo de nutriente afecta significativamente el rendimiento de alcohol etílico.

4.3. Contraste de hipótesis

Inicialmente en el estudio se planteó:

H₀: El tipo de nutriente no incrementa el rendimiento de alcohol etílico.

H₁: El tipo de nutriente incrementa el rendimiento de alcohol etílico.

Se acepta la hipótesis alternativa planteada al inicio de la investigación; es decir que “el tipo de nutriente (fuentes de nitrógenos) incrementa el rendimiento de alcohol etílico en la melaza de caña de azúcar producido a diferentes condiciones de °Brix (sólidos solubles) y temperaturas”.

4.3.1. Confirmación de la información obtenida en Excel mediante el Software Estadístico Minitab 16.

Modelo lineal general: Rendimiento vs. Tipo de Nutr. °Brix. Temperatura

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Tipo de Nutriente	fijo	3	A. B. C
°Brix	fijo	3	17. 22. 26
Temperatura	fijo	3	26. 29. 32

Análisis de varianza para Rendimiento, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tipo de Nutriente	2	492,99	492,99	246,49	53,90	0,018
°Brix	2	856,43	856,43	428,21	93,63	0,011
Temperatura	2	43,92	43,92	21,96	4,80	0,172
Error	2	9,15	9,15	4,57		
Total	8	1402,48				

S = 2,13854 R-cuad. = 99,35% R-cuad. (Ajustado) = 97,39%

De acuerdo al valor-P tenemos la siguiente condición para el rechazo o no de la Hipótesis nula.

- Valor P < nivel de significancia (α) se considera significativo.

Fuente	Valor P	α	Decisión
Tipo de Nutriente	0,018 <	0.05	Si hay Significancia
°Brix	0,011 <	0,05	Si hay Significancia
Temperatura	0,172 >	0,05	No hay significancia

En el análisis de varianza Minitab se determinó que existe significancia estadística para el factor tipo de nutriente debido a que el valor-P es menor al nivel de α ; es decir $0,018 < 0,05$ de igual forma existe significancia estadística para el factor concentración de sólidos (°Brix) es decir que $0,011 < 0,05$ mientras que para el factor temperatura no existe significancia estadística debido a que el valor-P $0,172 > 0,05$ el nivel de α ; por lo tanto las fuentes de nutrientes y los °Brix afectan significativamente el rendimiento alcohólico en los procesos de fermentación de alcohol etílico en la melaza de caña de azúcar.

El coeficiente de determinación R-cuadrado es el porcentaje de variación que existe entre la variable respuesta (Grados de alcohol) en relación a las

variables: tipo de nutriente y concentración de sólidos (°Brix); por lo tanto se puede decir que el 99.35% de la variación observada en el rendimiento alcohólico es explicada por el modelo.

Además significa que los factores estudiados (tipos de nutrientes, °Brix y Temperatura), son responsables o explican un alto porcentaje de la variabilidad observada en la variable de respuesta (Grados de alcohol), lo cual nos dice que la calidad del ajuste es satisfactorio.

4.3.2. Gráfico de Medias

Mediante el gráfico de medias se puede obtener una comparación visual y estadística de las medias de los tratamientos (tipos de nutriente) para saber cuáles tratamientos son diferentes entre sí.

$$\bar{Y}_{i..} \pm t_{\frac{\alpha}{2}, (k-1)(k-2)} \sqrt{\frac{CM_E}{k}}$$

	Urea (A)	Sulfato de Amonio (B)	Nitrato de Potasio ©
Minimo	72,42	82,69	64,69
Media	77,73	88	70
Máximo	83,05	93,31	75,31

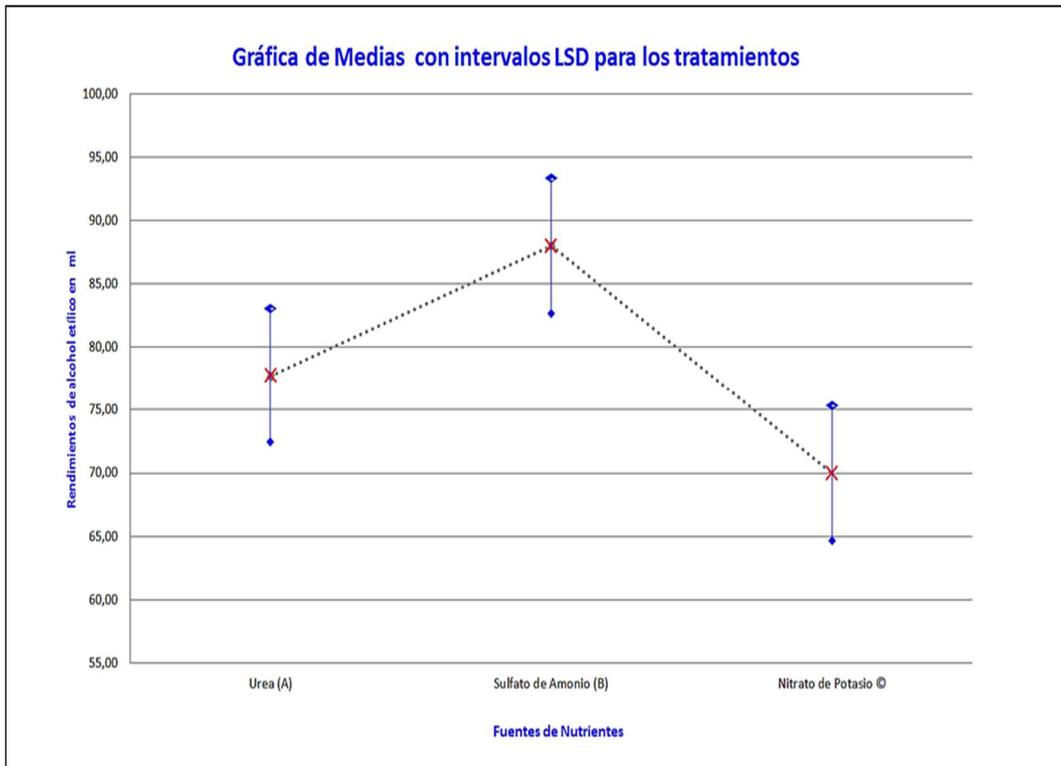


Grafico 4. 5 Representación gráfica de las medias de los tipos de nutrientes con intervalo LSD

Gutiérrez y De la Vara, 2012. Mencionan “*si dos intervalos de confianza se traslapan, los tratamientos correspondientes son estadísticamente iguales en cuanto a sus medias; pero si no se traslapan, entonces son diferentes*”.

Por lo tanto, se observa que los tratamientos con los tipos de nutrientes $A=B$, $A=C$ y $B \neq C$.

4.3.3. Método de Tukey

Mediante el Programa Estadístico Minitab, se obtiene:

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95,0%

Nutriente	N	Media	Agrupación
2	3	88,1	A
1	3	77,7	B
3	3	70,0	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95,0%

Variable de respuesta Rendimiento

Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Nutriente

Nutriente = 1 restado a:

Nutriente	Inferior	Centrada	Superior	
2	0,05	10,333	20,618	(-----*-----)
3	-18,02	-7,733	2,552	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----
				-15 0 15

Nutriente = 2 restado a:

Nutriente	Inferior	Centrada	Superior	
3	-28,35	-18,07	-7,782	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----
				-15 0 15

Pruebas simultáneas de Tukey

Variable de respuesta Rendimiento

Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Nutriente

Nutriente = 1 restado a:

Nutriente	Diferencia de medias	EE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
2	10,333	1,746	5,918	0,0496
3	-7,733	1,746	-4,429	0,0852

Nutriente = 2 restado a:

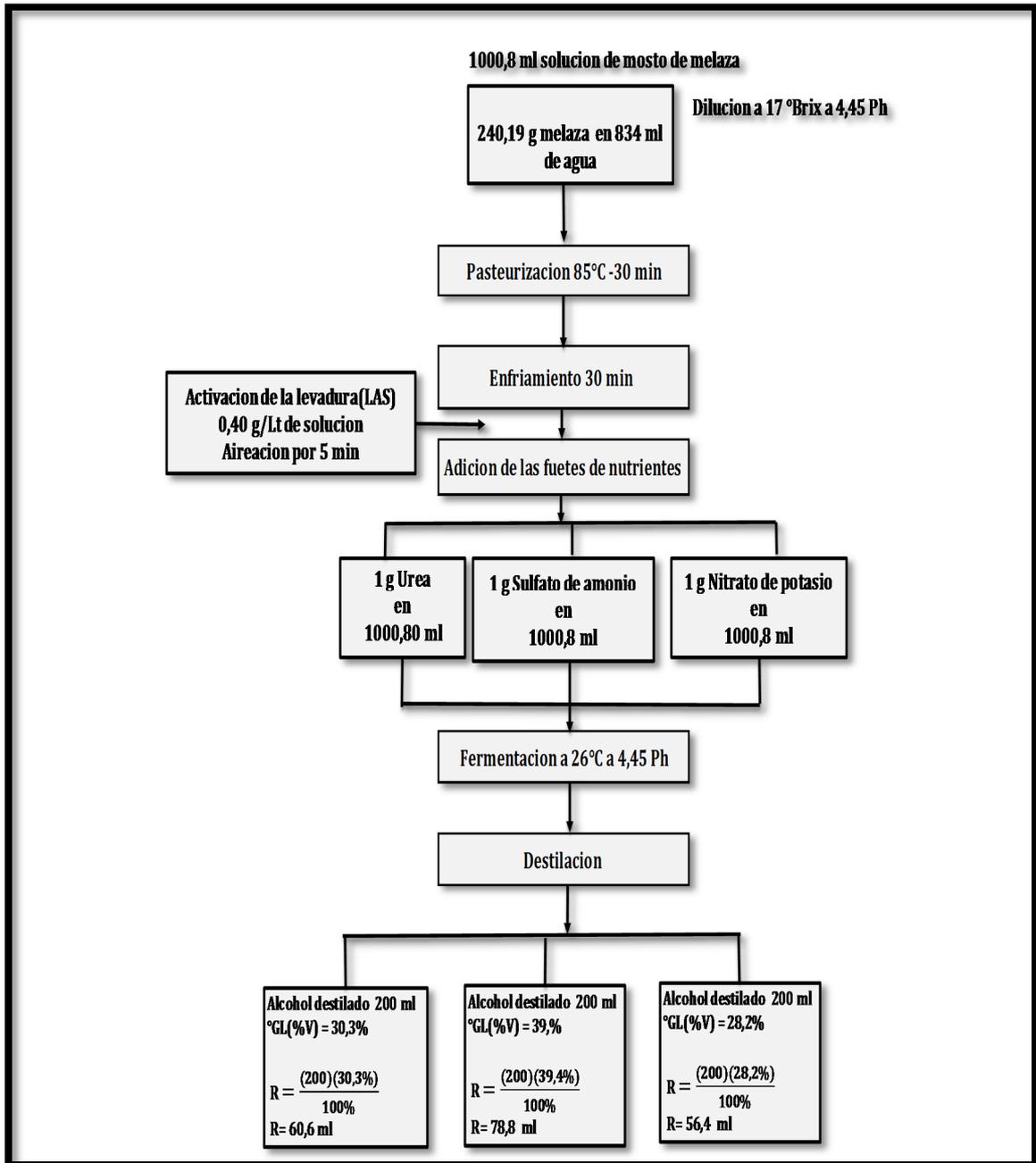
Nutriente	Diferencia de medias	EE de diferencia	Valor T	Valor P ajustado
3	-18,07	1,746	-10,35	0,0168

Así, podemos observar que el método de Tukey detecta, con una confianza de 95% que:

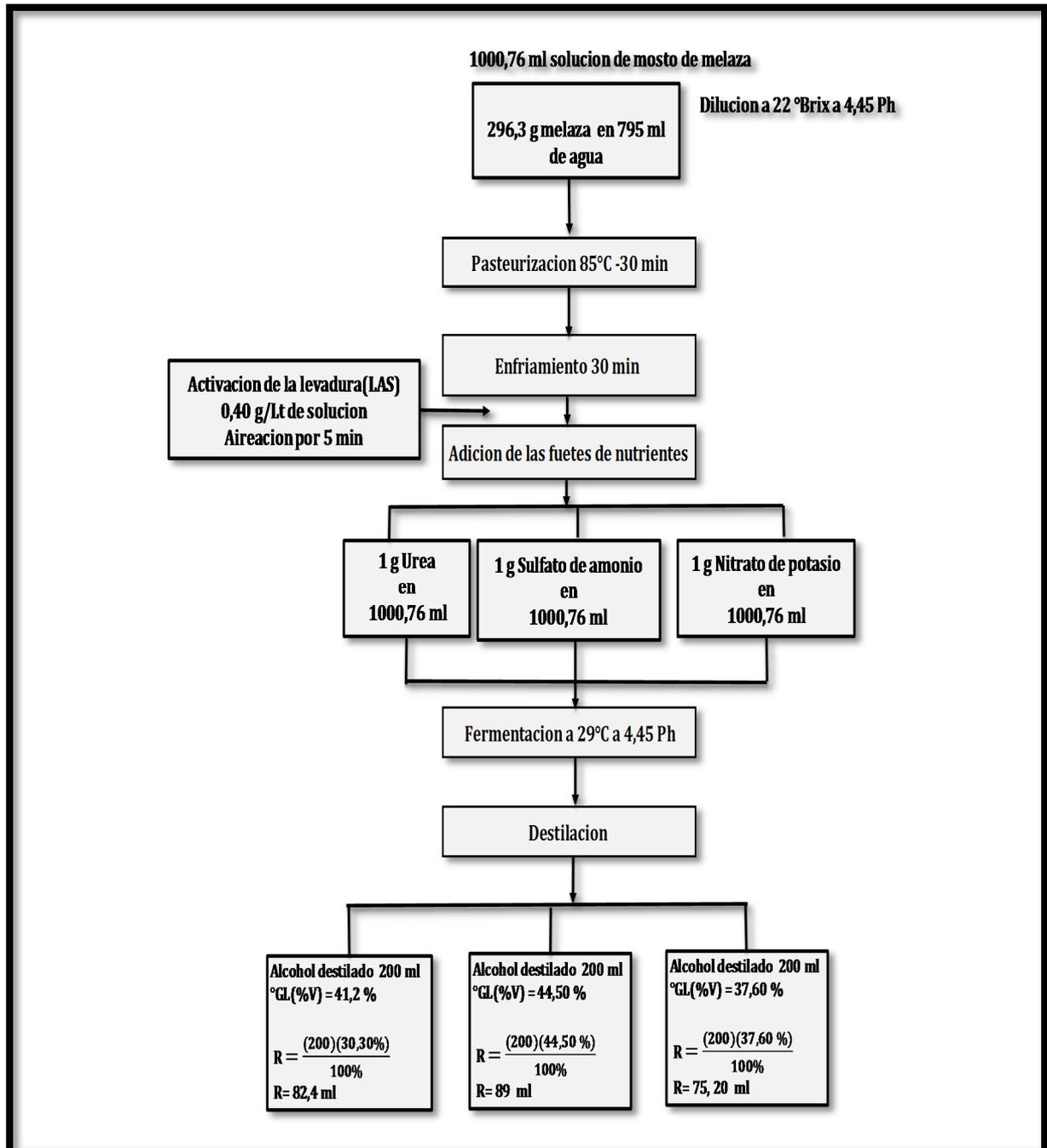
- La media de los tratamientos A y B, A y C son iguales ya que sus valores P 0.05 y 0.08 son mayores o iguales que el nivel de significancia $\alpha = 0.05$, es decir que los tipos de nutrientes Urea (A) - Sulfato de Amonio (B) y Urea (A) – Nitrato de Potasio (C) estadísticamente no son significativos.
- La media de los tratamientos B y C son diferentes, ya que su valor-P 0.0168 es menor a $\alpha = 0.05$; es decir que los tipos de nutrientes Sulfato de Amonio (B) y Nitrato de Potasio (C) estadísticamente son significativos.

4.3.4. Balance de materia para obtener los rendimientos alcohólicos

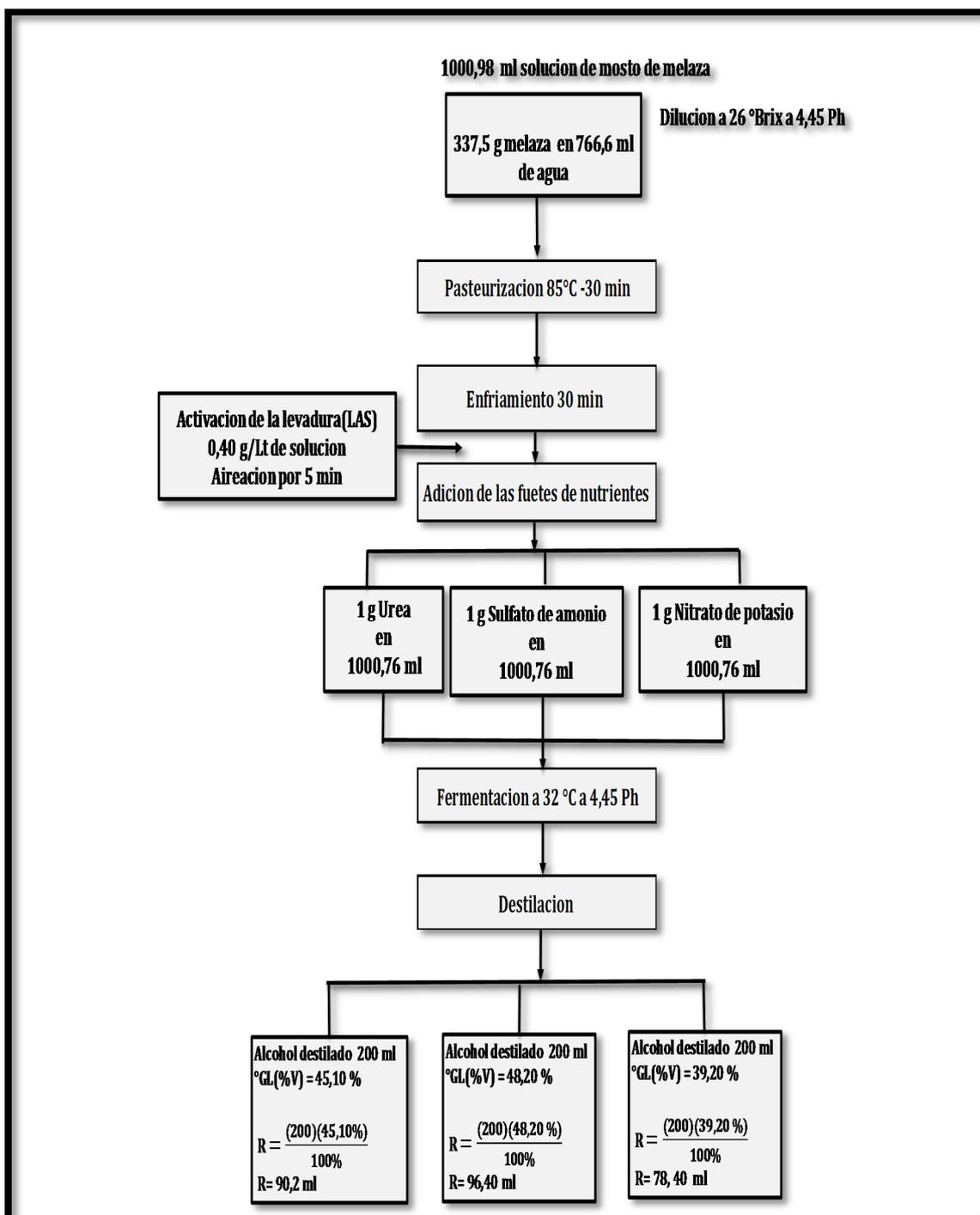
4.3.4.1. Rendimiento de alcohol para el primer grupo de tratamiento



4.3.4.2. Rendimiento de alcohol para el segundo grupo de tratamiento



4.3.4.3. Rendimiento de alcohol para el tercer grupo de tratamientos



CONCLUSIONES

- Se logró determinar que las fuentes de nitrógeno (tipos de nutrientes) influyen en el rendimiento de alcohol etílico en los procesos de fermentación alcohólicas en la melaza de caña de azúcar y que las fuentes de nutrientes que más proporcionaron rendimientos alcohólicos fue el tipo de nutriente (B) es decir el Sulfato de Amonio seguido de las fuente de nutriente tipo (A) Urea y nutriente tipo (C) nitrato de potasio que es el que menor cantidad de alcohol obtuvo.
- Se logró determinar que que a mayor concentración de sólidos (°Brix) mayor cantidad de alcohol se genera, por lo que existe una relación directamente proporcional.
- Se determinó durante el proceso de fermentación que las fuentes de nutrientes disminuyen el tiempo de fermentación y por ende la velocidad de consumo de sólidos solubles (°Brix) es más rápida.
- Se logró determinar mediante el tratamiento referencial (Blanco) que al no adicionarles nutrientes en el proceso de fermentación alcohólica se produce un periodo de tiempo más largo en la fermentación así como también un menor rendimiento alcohólico.
- Se logró determinar que las diferentes fuentes de nitrógenos que generaron mayor rendimiento de alcohol evaluados a 26°Brix y 32°C. fueron:
 - Tratamiento 7 (1 g de sulfato de amonio/litro de solución) con un rendimiento de 96,4 ml de alcohol etílico.
 - Tratamiento 8 (1 g de Urea/litro de solución) con un rendimiento de 90,2 ml de alcohol etílico.
- Se acepta la hipótesis alternativa planteada al inicio de la investigación; es decir que “el tipo de nutriente (fuentes de nitrógenos) incrementa el rendimiento de alcohol etílico en la melaza de caña de azúcar producido a diferentes condiciones de °Brix (sólidos solubles) y temperaturas”.

RECOMENDACIONES

- El nitrógeno como fuente de nutriente tiene una gran influencia en el desarrollo de la fermentación alcohólica en las levaduras, para lo cual se recomienda realizar estudios de las fermentaciones llevadas a cabo con otras fuentes de nutrientes.
- Hacer un estudio de la relación carbono /nitrógeno en la fermentación alcohólica para poder conocer cuál es la tolerancia de esta relación por partes de las levaduras.
- Que las muestras sean debidamente pasteurizadas para evitar la contaminación y crecimiento de otro tipo de microorganismos que pueden ocasionar perturbaciones en el proceso de obtención de alcohol.
- Que los residuos de la destilación someterlos a un proceso de tratamientos y estudio ya que pueden ser utilizados como fuentes de inóculo y de nutrientes para la fermentación.
- Realizar estudios con cromatografía de gases de los productos generados en la fermentación alcohólica para conocer que sustancias se están generando como producto final de la fermentación alcohólica.
- Estudiar los procesos de fermentación alcohólica con otros rangos de temperaturas, para poder conocer cuál es su influencia en la fermentación.
- La fuente de nutriente “nitrato de potasio” no es muy recomendable para este proceso según la investigación, ya que ocasiona bajos rendimientos alcohólicos.

BIBLIOGRAFIA.

- BETANCOURT, R. (2001). Guía de Laboratorio de Operaciones Unitarias. Manizales: UNM.
- Campués, J., & Tarapí, J. (Junio de 2011). "Obtención de alcohol a partir de jugo de caña, cachaza y melaza, mediante la incorporación de dos niveles de fermento". Obtenido de <https://es.scribd.com/.../obtencion-de-alcohol-a-partir-de-jugo-de-ca>.
- Cámpus, J., & Turapi, J. (2011). Obtención de alcohol a partir de jugo de caña, cachaza y melaza, mediante la incorporación de dos niveles de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*)".
- CHEN, J. (1991). Manual del Azúcar de caña. Mexico: Limusa.
- De la Rosa Tullio. (1998). Tecnología de los Vinos Blancos. Barcelona - España: S.A. MUNDI-PRENSA LIBROS.
- Douglas C.Motgomery. (s.f.). Diseño y analisis de Experimentos. Mexico: Limusa, S.A de C.V.
- Fijardo, E., & Sarmiento, S. (Agosto de 2009). "La evaluación de la melaza como sustrato para la producción de *saccharomyces cerevisiaea*". Obtenido de www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis26.pdf
- Freixa. (2006). Estudios de los Nutrientes. Guayaquil: Mc Grawhill.
- Freixa F. (1978). Origen y evolución del término "alcohol". Obtenido de <http://documents.mx/documents/2003-origen-y-evolucion-del-termino-alcohol.html>

- Garzon , S. C., & Hernandez, C. L. (2009).
repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/1689/1/66182g245.pdf.
- Garzon, S. C., & Hernandez, C. L. (Noviembre de 2009). "Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae*".
Obtenido de
repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/1689/1/66182g245.pdf
- Gonzales Sosa R. (1978). Microbiología de las Bebidas. La habana - Cuba: Pueblos y Educaciones.
- Guitierrez , H., & De la vara, R. (2008). Analisis y diseño de Experimentos.
Mexico: Pablo E. Roig Vázquez.
- Guitierrez.Pulido, H. (2008). Diseño y Analisis de Experimentos . Mexico : Pablo E. Roig Vázquez .
- Montgomery, D. (2004). Diseño y analisis de experimentos . Arizona : Limusa, S.A. de S.V.
- Revista Semana. (junio de 2014). Definición de Alcohol. Obtenido de
<http://conceptodefinicion.de/alcohol/>
- Rosenstingl. (1978). Origen y evolución del término "alcohol". Obtenido de
<http://documents.mx/documents/2009-origen-y-evolucion-del-termino-alcohol.html>
- Sitio Argentino de Producción Animal. (20 de Febrero de 2016). Obtenido de
www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/...y_con.../02-melaza.pdf
- Tellez, P., & Peraza, F. (2012). Optimización del proceso de fermentación para la producción de tequila, utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR). Revista mexicana de Ingenieria Quimica.
- Yaira Perez. (15 de Octubre de 2015). Monografias.com S.A. Obtenido de
<http://www.monografias.com/trabajos83/destilacion-simple/destilacion-simple.shtml>

flexo flexo

ANEXO 1: Dilución de la melaza



Fuente: Autor

ANEXO 2. Pasteurización de la melaza



ANEXO 3. Enfriamiento



Fuente: Autor

ANEXO 4. Preparación de los materiales



ANEXO 5. Preparación de los tratamientos



Fuente: Autor

ANEXO 6. Preparación de las soluciones



ANEXO 7. Medición del PH y grados Brix al inicio de la fermentación



Fuente: Autor

ANEXO 8. Activación de la levadura (inoculo)



ANEXO 9. Aireación



Fuente: Autor

ANEXO 10. Preparación de las fuentes de nitrógeno

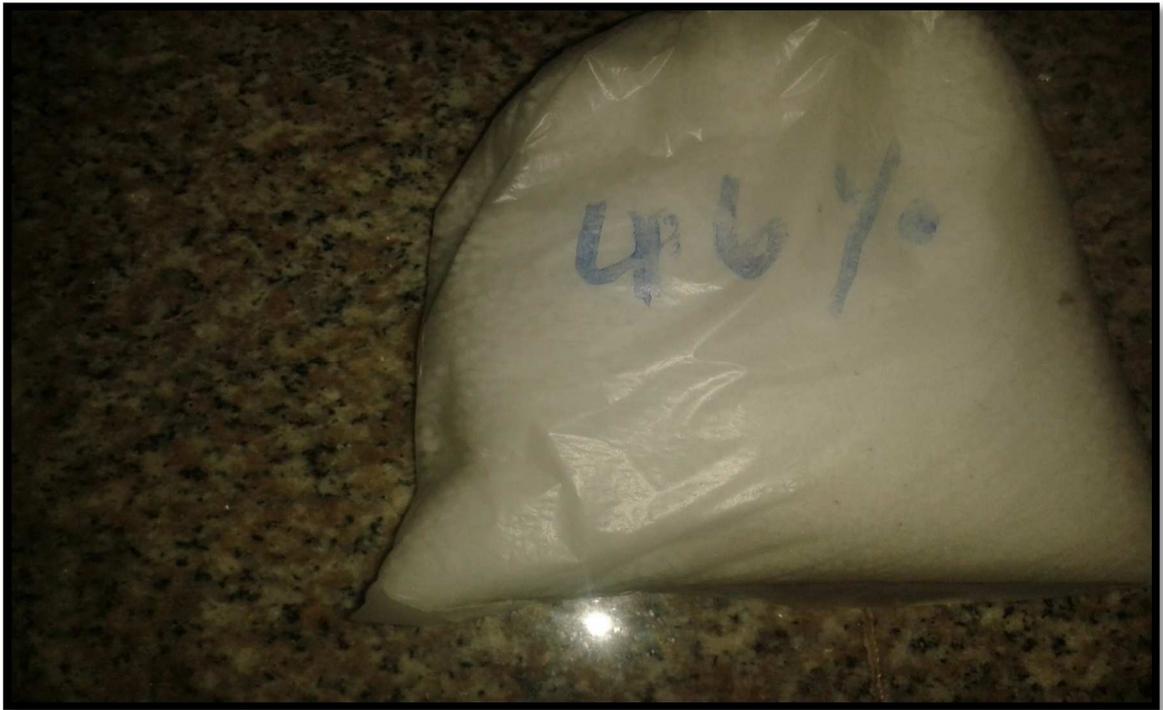


ANEXO 11. Sulfato de amonio

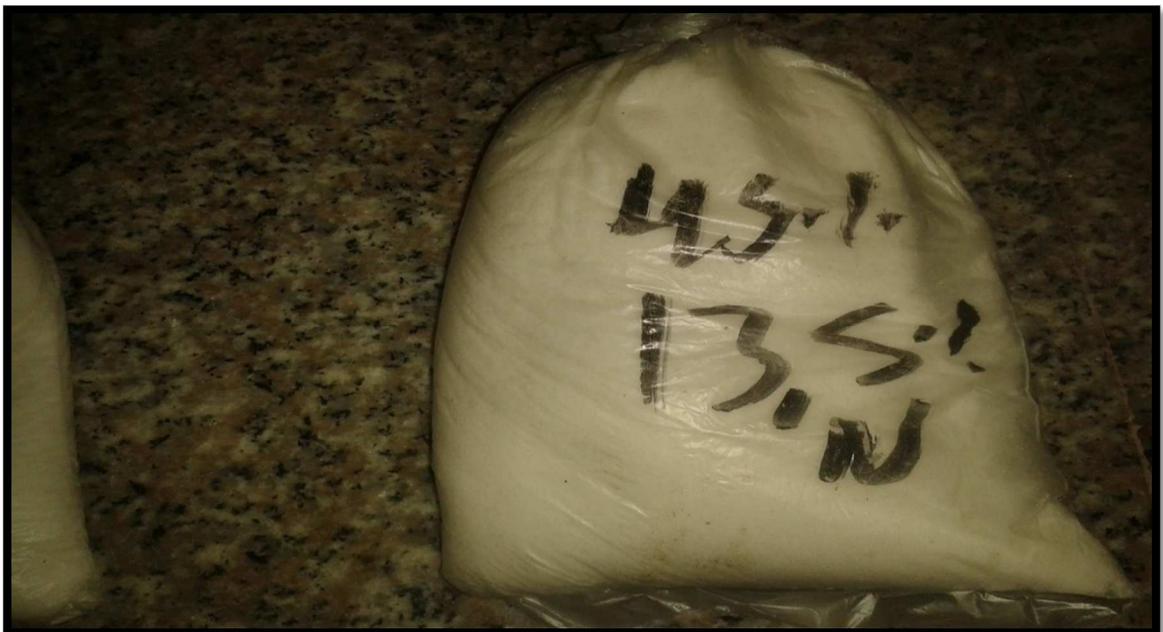


Fuente: Autor

ANEXO 12. Urea



ANEXO 13. Nitrato de Potasio



Fuente: Autor

ANEXO 14. Inicio de la fermentación

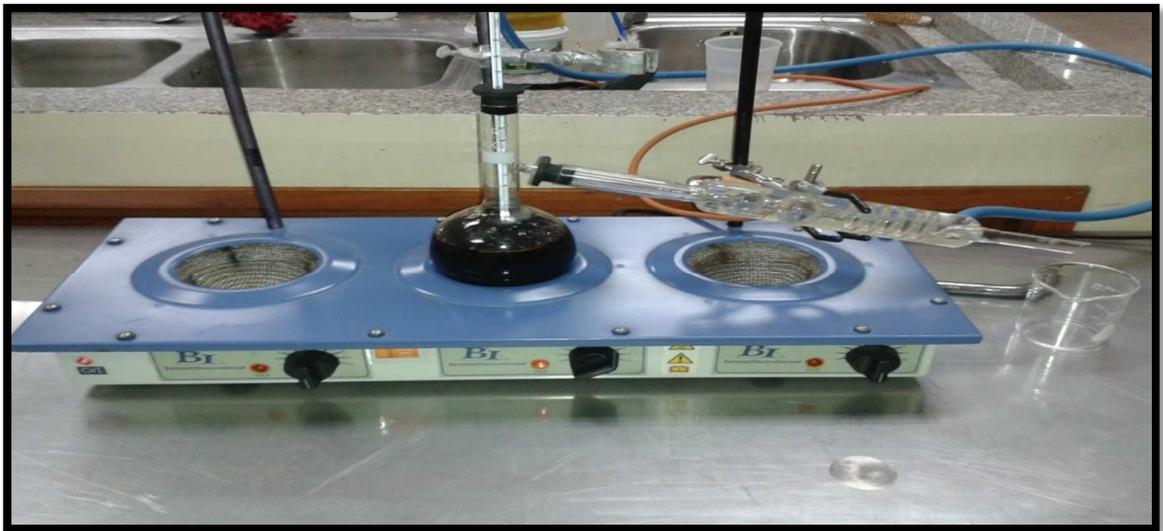


Fuente: Autor

ANEXO 15. Medición de los grados dos Brix finales



ANEXO 16. Destilación de las muestras



Fuente: Autor

ANEXO 17. Medición de grados Alcohólicos



Fuente: Autor

ANEXO 18. Resultados de Análisis de nitrógeno total en la urea



CESECCA

UNIVERSIDAD LAICA "ELOY ALFARO" DE MANABÍ
FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL
CENTRO DE SERVICIOS PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD
"CE.SE.C.C.A."

INFORME DE LABORATORIO

IE/CESECCA/44555

CLIENTE: SR. JOSE MACIAS MACIAS
ATENCIÓN: SR. JOSE MACIAS MACIAS
DIRECCIÓN: LAS CUMBRES - MANTA
ESPECIE: N/A
TIPO DE ENVASE: ENVASE PLASTICO
No. CAJAS: N/A
UNIDADES/PESO: 1/500ml
MARCA: N/A
TIPO DE PRODUCTO: AGUA (SOLUCION AL 1% CON SULFATO DE AMONIO)

FECHA MUESTREO: N/A
FECHA DE INGRESO: 15/10/2015
FECHA INICIO DE ENSAYO: 15/10/2015
FECHA FINALIZACION ENSAYO: 19/10/2015
FECHA EMISION RESULTADOS: 20/10/2015
FACTURA: 026-002-101
ORDEN: 44555
PAIS DE DESTINO: N/A

ENSAYO	LOTE	UNIDADES	RESULTADOS	INCERTIDUMBRE Expandida (k=2)	LIMITES	MÉTODO
Nitrógeno Total	No Aplica	%	0.21			PEI/CESECCA/0015 AOAC Ed 19. 2012 Cap. 4.2.11 Official Method 2001.11

Observaciones:

Muestreo realizado Por: El cliente (X) El Laboratorio ()

Nota 1: Los resultados reportados corresponden únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s) en el laboratorio. Este reporte no debe ser reproducido total o parcialmente, excepto con la aprobación escrita del laboratorio.

N/A: No aplica
 ND: No detectable



Bgo. Arturo Zavala Murillo
Jefe Técnico de Laboratorio (e)



Ing. Leonor Victoria Gallo, MBA
Directora General

Fuente: Informe de Resultados del Laboratorio CE.SE.C.C.A

ANEXO 19. Resultados de Análisis de nitrógeno total en el Sulfato de Amonio



UNIVERSIDAD LAICA "ELOY ALFARO" DE MANABÍ
FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL
CENTRO DE SERVICIOS PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD
"CE.SE.C.C.A."

INFORME DE LABORATORIO IE/CESECCA/44556

CLIENTE:	SR. JOSÉ MACÍAS MACÍAS	FECHA MUESTREO:	N/A
ATENCIÓN:	SR. JOSÉ MACÍAS MACÍAS	FECHA DE INGRESO:	15/10/2015
DIRECCIÓN:	LAS CUMBRES - MANTA	FECHA INICIO DE ENSAYO:	15/10/2015
ESPECIE:	N/A	FECHA FINALIZACIÓN ENSAYO:	19/10/2015
TIPO DE ENVASE:	ENVASE PLÁSTICO	FECHA EMISIÓN RESULTADOS:	20/10/2015
No. CAJAS:	N/A	FACTURA:	026-002-101
UNIDADES/PESO:	1/500ml	ORDEN:	44556
MARCA:	N/A	PAÍS DE DESTINO:	N/A
TIPO DE PRODUCTO:	AGUA (SOLUCIÓN AL 1% CON UREA)		

ENSAYO	LOTE	UNIDADES	RESULTADOS	INCERTIDUMBRE Expandida (k=2)	LÍMITES	MÉTODO
Nitrogeno Total	No Aplica	‰	0.44			IE/CESECCA/0015 AGAC Ed 19, 2012 Cap. 4.2.11 Original VÁLID 2001, 11

Observaciones: _____

Muestreo realizado Por: El cliente () El Laboratorio ()

Nota 1 Los resultados reportados corresponden únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s) en el laboratorio. Este reporte no debe ser reproducido total o parcialmente, excepto con la aprobación escrita del laboratorio.

N/A: No aplica
 ND: No detectable



Jefe Técnico de Laboratorio (e)
CESECCA





Ing. Leoyar, Stauelle Gallor, MBA
Director General
CESECCA

Fuente: Informe de Resultados del Laboratorio CE.SE.C.C.A

ANEXO 20. Resultados de Análisis Microbiológicos en la maleza



CESECCA

UNIVERSIDAD LAICA "ELOY ALFARO" DE MANABÍ
FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL
CENTRO DE SERVICIOS PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD
"CE.SE.C.C.A."

INFORME DE LABORATORIO IE/CESECCA/44402

CLIENTE:	SR. JOSE MACIAS MACIAS	FECHA MUESTREO:	N/A
ATENCIÓN:	SR. JOSE MACIAS MACIAS	FECHA DE INGRESO:	23/09/2015
DIRECCIÓN:	LAS CUMBRES - MANTA	FECHA INICIO DE ENSAYO:	25/09/2015
ESPECIE:	N/A	FECHA FINALIZACION ENSAYO:	29/09/2015
TIPO DE ENVASE:	ENVASE PLASTICO	FECHA EMISION RESULTADOS:	29/09/2015
Nº. CAJAS:	N/A	FACTURA:	026-002-055
UNIDADES/PESO:	1/500g	ORDEN:	44402
MARCA:	N/A	PAIS DE DESTINO:	N/A
TIPO DE PRODUCTO:	MELAZA DE CAÑA DE AZUCAR		

ENSAYO	LOTE	UNIDADES	RESULTADOS	INCERTIDUMBRE Expandida (k=2)	LIMITES	MÉTODO
Miños spp	No Aplica	UPC/g	<1x10	-	-	FE/CESECCA/N/03 AOAC Cap. 17.1.03 Official Method 997.02
Levaduras spp		UPC/g	<1x10	-	-	FE/CESECCA/N/01 AOAC Cap. 17.1.03 Official Method 997.02

Observaciones:

Muestreo realizado Por: El cliente (X) El Laboratorio ()

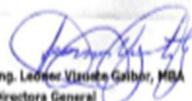
Nota 1 Los resultados reportados corresponden unicamente a la(s) muestra(s) analizada(s) en el laboratorio. Este reporte no debe ser reproducido total o parcialmente, excepto con la aprobación escrita del laboratorio.

N/A: No aplica
 ND: No detectable



Bigo Arturo Zavala Murillo
 Jefe Técnico de Laboratorio (e)
 CESECCA





Ing. Ledyer Vizcaino Galbar, MBA
 Directora General
 CESECCA

Fuente: Informe de Resultados del Laboratorio CE.SE.C.C.A

ANEXO 21. Resultados de análisis Microbiológicos



CESECCA

FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL
CENTRO DE SERVICIOS PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD
"CE.SE.C.C.A."

INFORME DE LABORATORIO

IE/CESECCA/44398

CLIENTE:	SR. JOSE MACIAS MACIAS	FECHA MUESTREO:	N/A
ATENCIÓN:	SR. JOSE MACIAS MACIAS	FECHA DE INGRESO:	23/09/2015
DIRECCIÓN:	LAS CUMBRES - MANTA	FECHA INICIO DE ENSAYO:	24/09/2015
ESPECIE:	N/A	FECHA FINALIZACION ENSAYO:	29/09/2015
TIPO DE ENVASE:	ENVASE PLASTICO	FECHA EMISION RESULTADOS:	29/09/2015
No. CAJAS:	N/A	FACTURA:	026-002-052
UNIDADES/PESO:	1/500g	ORDEN:	44398
MARCA:	N/A	PAIS DE DESTINO:	N/A
TIPO DE PRODUCTO:	MELAZA DE CAÑA DE AZUCAR		

ENSAYO	LOTE	UNIDADES	RESULTADOS	INCERTIDUMBRE Expendida (n=2)	LIMITES	MÉTODO
Mohos spp	No Aplica	UPC/g	<1x10	-	-	PES/CESECCA/M/20 AOAC Cap. 17.2.09 Official Method 907.02
Leveduras spp		UPC/g	<1x10	-	-	PES/CESECCA/M/21 AOAC Cap. 17.2.09 Official Method 907.02

Observaciones: _____

Muestreo realizado Por: El cliente El Laboratorio

Nota 1 Los resultados reportados corresponden unicamente a la(s) muestra(s) analizada(s) en el laboratorio. Este reporte no debe ser reproducido total o parcialmente, excepto con la aprobación escrita del laboratorio.

N/A: No aplica
 ND: No detectable



Dijo, Arturo Zavala Murillo
 Jefe Técnico de Laboratorio (e)
 CESECCA





Ing. Leonor Vizuela Gabor, MBA
 Directora General
 CESECCA

Fuente: Informe de Resultados del Laboratorio CE.SE.C.C.A

ANEXO 22. Resultados de Análisis de crecimiento celular (levadura activa F.)



CESECCA

UNIVERSIDAD LAICA "ELOY ALFARO" DE MANABÍ
FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL
CENTRO DE SERVICIOS PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD
"CE.SE.C.C.A."

INFORME DE LABORATORIO IE/CESECCA/44507

CLIENTE:	SR. JOSE MACIAS MACIAS	FECHA MUESTREO:	N/A
ATENCIÓN:	SR. JOSE MACIAS MACIAS	FECHA DE INGRESO:	07/10/2015
DIRECCIÓN:	LAS CUMBRES - MANTA	FECHA INICIO DE ENSAYO:	08/10/2015
ESPECIE:	N/A	FECHA FINALIZACION ENSAYO:	13/10/2015
TIPO DE ENVASE:	ENVASE PLASTICO	FECHA EMISION RESULTADOS:	15/10/2015
No. CAJAS:	N/A	FACTURA:	026-002-074
UNIDADES/PESO:	1/500g	ORDEN:	44507
MARCA:	N/A	PAIS DE DESTINO:	N/A
TIPO DE PRODUCTO:	MELAZA DE CAÑA DE AZUCAR		

ENSAYO	LOTE	UNIDADES	RESULTADOS	INCERTIDUMBRE Expandida (k=2)	LIMITES	MÉTODO
Levadura spp	Con Levadura Activa Sosa (19.3° Brix)	UPC/g	7.0X10 ⁸			PEE/CESECCA/M121 AOAC Cap. 17.2.09 Official Method 697.02

Observaciones:

Muestreo realizado Por: El cliente (X) El Laboratorio ()

Nota 1 Los resultados reportados corresponden unicamente a la(s) muestra(s) analizada(s) en el laboratorio. Este reporte no debe ser reproducido total o parcialmente, excepto con la aprobación escrita del laboratorio.

N/A: No aplica
 ND: No detectable



Ing. Arturo Zavala Murillo
 Jefe Técnico de Laboratorio (e)
 CESECCA





Ing. Leonor Viquez Galbor, MBA
 Directora General
 CESECCA

Fuente: Informe de Resultados del Laboratorio CE.SE.C.C.A

ANEXO 23. Resultados de análisis de crecimiento celular (levadura activa F.)



CESECCA

UNIVERSIDAD LAICA "ELOY ALFARO" DE MANABÍ
FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL
CENTRO DE SERVICIOS PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD
"CE.SE.C.C.A."

INFORME DE LABORATORIO IE/CESECCA/44506

CLIENTE:	SR. JOSE MACIAS MACIAS	FECHA MUESTREO:	N/A
ATENCIÓN:	SR. JOSE MACIAS MACIAS	FECHA DE INGRESO:	07/10/2015
DIRECCIÓN:	LAS CUMBRES - MANTA	FECHA INICIO DE ENSAYO:	08/10/2015
ESPECIE:	N/A	FECHA FINALIZACION ENSAYO:	13/10/2015
TIPO DE ENVASE:	ENVASE PLASTICO	FECHA EMISION RESULTADOS:	15/10/2015
No. CAJAS:	N/A	FACTURA:	026-002-074
UNIDADES/PESO:	1/500g	ORDEN:	44506
MARCA:	N/A	PAIS DE DESTINO:	N/A
TIPO DE PRODUCTO:	MELAZA DE CAÑA DE AZUCAR		

ENSAYO	LOTE	UNIDADES	RESULTADOS	INCERTIDUMBRE Expandida (k=2)	LIMITES	MÉTODO
Levaduras spp	Con Levadura Liofilizada (19.3° Brix)	UFC/g	2,6x10 ⁸			PEE/CESECCA/021 ADAC Cap. 17.2.09 ORJIM Método 901.02

Observaciones:

Muestreo realizado Por: El cliente (X) El Laboratorio ()

Nota 1 Los resultados reportados corresponden unicamente a la(s) muestra(s) analizada(s) en el laboratorio. Este reporte no debe ser reproducido total o parcialmente, excepto con la aprobación escrita del laboratorio.

N/A: No aplica
 ND: No detectable



Blgo. Arturo Zavala Murillo
Jefe Técnico de Laboratorio (e)
CESECCA



Ing. Leonor Vinyete Gaibor, MBA
Directora General
CESECCA

Fuente: Informe de Resultados del Laboratorio CE.SE.C.C.A