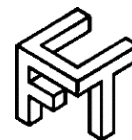




Universidad de Matanzas
Facultad de Ciencias Técnicas



VALORACIÓN DE ALTERNATIVAS PARA LA
OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE MEZCLAS
DE JUGOS SECUNDARIOS Y MELAZAS EN LA
DESTILERÍA JESÚS RABÍ

Tesis Presentada como Requisito Parcial para la Obtención
del Título de Máster en Ingeniería Asistida por Computadora

Autor: Ing. Javier Díaz Pineda

Tutores: Dr.C. Jesús D. Luis Orozco
Dr.C. Josep Ribes Bertomeu

Consultante: Dr.C. Ramón Quiza Sardiñas

Matanzas, 2021

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y NOTA LEGAL

Yo, Javier Díaz Pineda, declaro que soy el único autor de la siguiente tesis, titulada: *Valoración de alternativas para la obtención de etanol a partir de mezclas de jugos secundarios y melazas en la destilería Jesús Rabí* y, en virtud de tal, cedo el derecho de copia de la misma a la Universidad de Matanzas, bajo la licencia *Creative Commons* de tipo *Reconocimiento No Comercial Sin Obra Derivada*, con lo cual se permite su copia y distribución por cualquier medio siempre que mantenga el reconocimiento de sus autores, no haga uso comercial de la obra y no realice ninguna modificación de ella.

Matanzas, 1 de marzo de 2021.



Javier Díaz Pineda

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del Tribunal Firma

Miembro del Tribunal Firma

Miembro del Tribunal Firma

RESUMEN

En la presente investigación se realiza una evaluación de diferentes alternativas para la obtención de etanol a partir de mezclas de jugos secundarios y melazas de caña de azúcar en la destilería Jesús Rabí. Para el estudio de la fermentación alcohólica de las diferentes combinaciones de sustratos azucarados a escala de laboratorio, se aplica un diseño experimental de mezclas del tipo enrejado *simplex* con centroide. Mediante la caracterización físico-química de los sustratos, se demuestra su calidad y potencialidades fermentativas. Los mejores resultados se logran con la mezcla compuesta por los tres sustratos estudiados. Se obtienen modelos matemáticos del tipo cúbico especial, que describen el comportamiento de cada una de las variables de respuesta con una adecuada calidad de ajuste y de gran utilidad para la industria. Con la optimización simultánea de los modelos, se alcanzan valores óptimos de grado alcohólico: 6,72 %, eficiencia fermentativa: 91,71 %, rendimiento alcohólico: 59,36 % y contenido de dióxido de carbono generado: 26,78 g; correspondientes a una mezcla con composiciones óptimas de azúcares reductores totales en la miel final: 0,411, jugo diluido: 0,303 y jugo filtrado: 0,286. El etanol producido a partir de las variantes de mezclas, mostró características potenciales para su utilización en la elaboración de bebidas alcohólicas. El uso de jugos secundarios favorece un menor consumo de melaza y agua en la industria. Todas las alternativas analizadas reportan beneficios económicos, lo cual favorece que se alcancen significativos ingresos, tanto por las ventas de etanol como de alimento animal, fabricados a partir de la miel final ahorrada.

Palabras claves: fermentación alcohólica; jugos secundarios; melazas; etanol; modelos matemáticos.

ABSTRACT

In this research, an evaluation of different alternatives for obtaining ethanol from mixtures of secondary juices and sugarcane molasses is carried out at Jesús Rabí distillery. For the study of the alcoholic fermentation of the different combinations of sugary substrates on a laboratory scale, an experimental design of mixtures of the simplex lattice with centroid type is applied. By means of the physical-chemical characterization of the substrates, their quality and fermentative potentialities are demonstrated. The best results are achieved with the mixture composed of the three substrates studied. Mathematical models of the special cubic type are obtained, which describe the behavior of each of the response variables with an adequate quality of fit and of great utility for the industry. With the simultaneous optimization of the models, optimal values of alcoholic degree are reached: 6,72 %, fermentation efficiency: 91,71 %, alcoholic yield: 59,36 % and content of carbon dioxide generated: 26,78 g; corresponding to a mixture with optimal compositions of total reducing sugars in molasses: 0,411, diluted juice: 0,303 and filter juice: 0,286. The ethanol obtained from the mixed variants showed potential characteristics for its use in the production of alcoholic beverages. The use of secondary juices favors a lower consumption of molasses and water in the industry. All the alternatives analyzed report economic benefits, which favors the achievement of significant income, both from the sales of ethanol and animal feed, manufactured from the saved molasses.

Keywords: alcoholic fermentation; secondary juices; molasses; ethanol; mathematical models.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 4 |
| 1.1 Características y propiedades del etanol | 4 |
| 1.2 Fundamentos básicos de la fermentación alcohólica | 5 |
| 1.2.1 Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 6 |
| 1.2.2 Formación de congéneres | 7 |
| 1.3 Producción de etanol a partir de sustratos procedentes de la industria azucarera | 9 |
| 1.3.1 Miel final | 9 |
| 1.3.2 Jugos secundarios | 11 |
| 1.3.3 Beneficios del uso de mezclas de jugos y melazas de caña de azúcar | 12 |
| 1.4 Factores que afectan la fermentación alcohólica..... | 14 |
| 1.4.1 Efectos de la temperatura y el pH | 14 |
| 1.4.2 Requerimientos de nutrientes | 15 |
| 1.4.3 Concentración de azúcares | 16 |
| 1.4.4 Oxígeno disponible..... | 17 |
| 1.4.5 Concentración de etanol resultante..... | 17 |
| 1.4.6 Formación de inhibidores de la fermentación | 18 |
| 1.5 Contaminantes microbianos y sus efectos en la producción de etanol..... | 19 |
| 1.5.1 Control de la contaminación bacteriana | 20 |
| 1.6 Fundamentos generales del proceso tecnológico de fabricación de etanol | 21 |
| 1.7 Conclusiones parciales del capítulo | 24 |
| CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 25 |
| 2.1 Estudio de la fermentación alcohólica de mezclas de diferentes sustratos | 26 |
| 2.1.1 Muestreo, preparación y caracterización de las materias primas | 26 |
| 2.1.2 Características del microorganismo empleado | 26 |
| 2.1.3 Test de fermentación alcohólica y condiciones experimentales..... | 27 |
| 2.1.3.1 Determinación del grado alcohólico | 30 |
| 2.1.3.2 Determinación del contenido de dióxido de carbono generado | 32 |
| 2.1.3.3 Determinación de los componentes volátiles mayoritarios en los destilados | 32 |
| 2.1.3.4 Cálculo del rendimiento alcohólico y la eficiencia fermentativa..... | 34 |

| | | |
|---|--|-----------|
| 2.1.4 | Métodos analíticos y microbiológicos empleados..... | 34 |
| 2.1.4.1 | Determinación de la concentración de sólidos solubles..... | 35 |
| 2.1.4.2 | Determinación potenciométrica del pH..... | 35 |
| 2.1.4.3 | Determinación del contenido de azúcares reductores totales (ART)..... | 35 |
| 2.1.4.4 | Determinación del porcentaje de células de levadura viables y gemantes..... | 36 |
| 2.2 | Diseño experimental de las mezclas de sustratos azucarados | 37 |
| 2.3 | Procesamiento estadístico de los resultados experimentales..... | 41 |
| 2.4 | Cálculo de los ahorros de miel final y agua para cada alternativa | 43 |
| 2.4.1 | Cálculo de los beneficios económicos obtenidos con las alternativas de mezclas..... | 43 |
| CAPÍTULO 3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS | | 46 |
| 3.1 | Caracterización físico-química de los sustratos fermentativos | 46 |
| 3.2 | Análisis de los resultados de la dinámica de fermentación | 53 |
| 3.2.1 | Comportamiento del pH | 53 |
| 3.2.2 | Comportamiento de la concentración de sólidos solubles y los ART..... | 54 |
| 3.2.3 | Análisis de viabilidad celular y gemación en los mostos fermentados | 57 |
| 3.2.4 | Análisis del rendimiento alcohólico y la eficiencia de la fermentación..... | 58 |
| 3.3 | Análisis de la calidad del etanol obtenido | 62 |
| 3.4 | Análisis de los resultados del diseño experimental | 66 |
| 3.4.1 | Análisis de la calidad de ajuste de los modelos..... | 66 |
| 3.4.2 | Optimización de los modelos | 69 |
| 3.5 | Determinación de los ahorros de miel final y agua en cada alternativa | 72 |
| 3.5.1 | Valoración económica de los beneficios obtenidos con las alternativas de mezclas ... | 73 |
| 3.6 | Conclusiones parciales del capítulo | 76 |
| CONCLUSIONES..... | | 78 |
| RECOMENDACIONES | | 79 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | | 80 |
| ANEXOS..... | | 98 |

INTRODUCCIÓN

La crisis del mercado internacional del azúcar, ha traído como consecuencia la necesidad de la diversificación de la industria azucarera cubana y la implementación de nuevas tecnologías, que a la par de generar beneficios económicos, contribuyan a lograr la sostenibilidad ambiental de las producciones y presupongan una mayor flexibilidad tecnológica con impactos positivos en la eficiencia del proceso. En el Plan Nacional de Desarrollo Económico y Social hasta 2030 (PNDES), se contempla a la agroindustria azucarera y sus derivados, como uno de los sectores estratégicos para la transformación productiva del país. De ahí que, resulte clave el fomento de la producción de azúcar, el incremento de la eficiencia agrícola e industrial, la modernización del equipamiento, y el avance hacia la creación, recuperación y explotación de las plantas de derivados, priorizando las destinadas a la obtención de etanol, alimento animal y bioproductos (Gálvez, 2019; PCC, 2017).

Por tal motivo, el país continúa potenciando la producción de alcohol etílico, a pesar de que las capacidades de miel final disponible en las instalaciones industriales no satisfacen la demanda para la fermentación alcohólica. Actualmente, su importancia aumenta debido a la problemática existente en torno al déficit de portadores energéticos no renovables y al desarrollo de la industria química, y dentro de ella la alcoholera (Mesa *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta estos aspectos, la creciente demanda de etanol en el mercado internacional como biocombustible y considerando que existen capacidades instaladas ociosas en las destilerías del país, se hace necesario la investigación y el desarrollo de nuevas fuentes de sustratos alternativos para la obtención de etanol, no tan tradicionales como las melazas de caña, con el objetivo de elevar la producción con el menor costo asociado. Por tanto, es de interés para la industria intensificar la fabricación de alcohol etílico, usando mezclas de diferentes sustratos.

Entre estas materias primas se encuentran los jugos secundarios (jugo diluido y jugo de los filtros) de menor calidad en el proceso azucarero. La extracción de estas corrientes intermedias con fines fermentativos, conducirían a una mayor eficiencia en la etapa de purificación, obteniéndose un azúcar de mayor calidad, así como una disminución significativa del consumo de vapor y el incremento de la disponibilidad de bagazo sobrante para la generación de energía renovable. También, favorecería el incremento de la capacidad de molienda del central azucarero y se evitaría la recirculación al proceso de un material con altos contenidos de azúcares reductores, coloides, sólidos insolubles y demás impurezas que perjudican la calidad del azúcar y el agotamiento de las

mieles. Además, el empleo de estos jugos contribuye al ahorro de miel final y agua en el proceso fermentativo, así como reduce considerablemente la transportación de melazas, operación que influye de forma significativa en los costos de la producción de alcohol étlico (Cortés *et al.*, 2021; Rivero *et al.*, 2012).

En la literatura científica se reportan varias investigaciones sobre las posibilidades de esquemas integrados en la producción de azúcar, etanol y otros derivados de la caña de azúcar. La búsqueda de nuevas formulaciones para la fermentación alcohólica, ha sido pertinente desde hace años, de ahí que se han obtenido resultados favorables con mezclas de miel final, jugo de los filtros, jugo diluido, licor hidrolizado de bagazo, vinazas y flemazas (De Armas *et al.*, 2020; Fabelo, 1999; González *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2013; Morales *et al.*, 2018). El uso de estos sustratos azucarados con tales fines, constituye una práctica actual de los grandes productores de etanol en el mundo, entre los que se destaca Estados Unidos, Brasil y la India (Saura *et al.*, 2019). Esta alternativa tecnológica inédita para Cuba, presenta ventajas indiscutibles desde el punto de vista económico y a la par confiere una gran flexibilidad productiva al proceso global del complejo ingenio azucarero - destilería, permitiendo reducir el impacto económico negativo inherente a la cotización siempre cambiante del azúcar en los mercados internacionales. De ahí que, el Grupo Azucarero AZCUBA se encuentra inmerso en el Programa Nacional de Rehabilitación y Modernización de la Industria Alcohólica. Este programa persigue el empleo de estos jugos en la producción de etanol, así como lograr el incremento de la eficiencia de fermentación y el rendimiento alcohólico en las destilerías de Cuba (Ibáñez *et al.*, 2018; Saura *et al.*, 2006).

La Unidad Empresarial Básica de Derivados (UEBD) Jesús Rabí, se encuentra situada en el municipio de Calimete de la provincia de Matanzas y se caracteriza, como el resto de las destilerías cubanas, por tener bajas eficiencias de fermentación (75 - 78 %) y grado alcohólico (4,5 - 5,5 % (v/v)) en los mostos fermentados, si se comparan con los valores que se reportan internacionalmente, que son superiores a 90 % y 8 % (v/v) respectivamente (Alonso, 2015; Ibáñez, 2018). Dicha destilería utiliza como materia prima fundamental, la miel final procedente del Central Azucarero Jesús Rabí, cuyos índices de producción actualmente son insuficientes para sostener la creciente demanda de etanol en el mercado. Si se tiene en cuenta que una tonelada de miel final genera alrededor de 250 L de alcohol étlico, la máxima producción de etanol estaría limitada por la disponibilidad de este sustrato (asumiendo que se usa el total de las melazas producidas). Además, existe una alta demanda de este subproducto para otras aplicaciones

como son la alimentación animal (Almazán, García, *et al.*, 2016; Otero *et al.*, 2009). También, es significativo destacar que esta industria tiene previsto realizar en los próximos años un proceso inversionista para la incorporación de jugos secundarios provenientes del ingenio azucarero, como materias primas. Es por ello que, reviste gran importancia conocer el potencial fermentativo de estos sustratos azucarados, que permita una sustitución o reducción del consumo de miel final, favoreciéndose una mayor producción alcoholera.

Teniendo en consideración los elementos expuestos con anterioridad, se formula el siguiente problema científico de la investigación:

¿Será posible la utilización de otras fuentes de sustratos fermentativos que favorezcan el incremento de la producción de etanol y ahorros significativos de miel final en la destilería Jesús Rabí?

Para dar solución al problema científico se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

Si se realiza un estudio de la fermentación alcohólica de diferentes alternativas de mezclas de jugos secundarios y melazas, se podrá demostrar la factibilidad del uso de estos sustratos para la obtención de etanol, lo que favorecerá el incremento de su producción a partir de ahorros significativos de miel final en la destilería Jesús Rabí.

Se tiene como objetivo general de la investigación:

Evaluar diferentes alternativas para la obtención de etanol a partir de mezclas de jugos secundarios y melazas en la destilería Jesús Rabí.

Para dar cumplimiento al objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar los sustratos azucarados que se emplean en el proceso fermentativo.
2. Analizar el comportamiento de la dinámica de fermentación y la calidad del etanol obtenido a partir de las alternativas de mezclas.
3. Obtener modelos matemáticos que describan el comportamiento del grado alcohólico, el contenido de dióxido de carbono generado, el rendimiento y la eficiencia de la fermentación en función de las composiciones de los sustratos.
4. Valorar económicamente de forma preliminar, los beneficios obtenidos con las alternativas de mezclas analizadas.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En este capítulo se abordan diferentes temáticas relacionadas con la utilización de mezclas de jugos y melazas de caña de azúcar en la producción de etanol por vía fermentativa, a partir de la revisión de diversas fuentes bibliográficas. Primeramente, se profundiza en tópicos relacionados con las características y propiedades del etanol, así como los fundamentos bioquímicos que rigen la fermentación alcohólica. También, se realiza un análisis de los principales factores físicos, químicos y biológicos que afectan el proceso fermentativo, así como de los tratamientos empleados para el control de la contaminación bacteriana. Finalmente, se exponen aspectos generales del proceso tecnológico de fabricación de alcohol etílico a escala industrial. Estos elementos en su conjunto, sientan las bases conceptuales para el desarrollo de la presente investigación.

1.1 Características y propiedades del etanol

El etanol, nombrado también alcohol etílico, es un compuesto orgánico de fórmula química C_2H_5OH , perteneciente al grupo de los alcoholes, un conjunto de compuestos químicos cuyas moléculas contienen un grupo hidroxilo, $-OH$, unido a un átomo de carbono (Figura 1.1). Se caracteriza por ser un líquido incoloro en condiciones estándar de temperatura y presión, de olor agradable y fuertemente penetrante, de sabor cáustico y ardiente. Es miscible en agua, inflamable y volátil (Basile *et al.*, 2019; Walker *et al.*, 2018). En la tabla 1.1, se muestran algunas propiedades físicas del etanol.

Tabla 1.1 Propiedades físicas del etanol

| Propiedades | Valor |
|---|----------------------|
| Punto de ebullición (°C) | 78,4 |
| Densidad a 20 °C (g/cm ³) | 0,789 |
| Índice de refracción (η_d^{20}) | 1,361 |
| Viscosidad a 20 °C (mPa·s) | 1,074 |
| Tensión superficial (J/m ²) | $22,3 \cdot 10^{-3}$ |
| Calor específico (J/g°C) | 2,43 |
| Calor de combustión (kJ/mol) | 1 372 |
| Punto de inflamación (°C) | 18,3 |

Fuente: Green y Southard (2019).

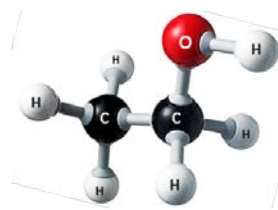


Figura 1.1 Estructura química de la molécula de etanol. Fuente: Basile *et al.* (2019)

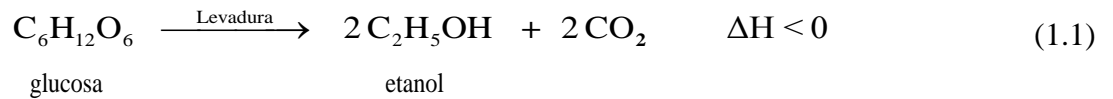
El alcohol etílico se puede obtener de manera sintética en la industria petroquímica hidratando el etileno, o a partir de una reacción bioquímica durante el proceso de fermentación alcohólica (Goldstein, 2017; González y Miño, 2015; Lazar *et al.*, 2019). Este producto se puede fabricar de forma anhidra o hidratado. La versión hidratada es un componente fundamental de las bebidas alcohólicas y se emplea en productos farmacéuticos y cosméticos (Ceballos, 2018; Gálvez, 2000; Najafpour, 2015). La versión anhidra se utiliza fundamentalmente como combustible, disolvente, en la producción de etileno y acetaldehído, en pinturas, barnices, explosivos y como intermediario en la síntesis orgánica de diversos compuestos (ácido acético, éter, butadieno, etc.) (Bajpai, 2013; Bordiga, 2018; Jalilnejad y Ghasemzadeh, 2019).

Los dos principales países productores de etanol son Estados Unidos y Brasil, que juntos producen más del 70 % del total producido a nivel mundial (Estados Unidos a partir del maíz y Brasil de la caña de azúcar), seguidos por China, India y Francia (De Lima y Bacchi, 2018; De Matos *et al.*, 2020; De Moraes y Zilberman, 2014; De Souza y De Farias, 2019; Kohler, 2019). Según Saura *et al.* (2019), en el Grupo Azucarero AZCUBA, existen 13 destilerías de alcohol etílico por vía fermentativa, distribuidas por toda Cuba, con una capacidad de producción total instalada de unos 800 m³/d. Varias de las destilerías trabajan solo durante la campaña azucarera.

1.2 Fundamentos básicos de la fermentación alcohólica

La fermentación es la transformación bioquímica de sustancias orgánicas en compuestos más simples por la acción de enzimas producidas por microorganismos. Este proceso se caracteriza por una baja acumulación de subproductos, buena tolerancia a la concentración de sustrato y valores de pH bajos (Nitayavardhana y Khanal, 2017). Según Najafpour (2015) y Saura *et al.* (2019), la fermentación alcohólica es un proceso biológico en el cual ocurren transformaciones anaerobias de carbohidratos mediante reacciones liberadoras de energía por la acción de levaduras. Las materias primas directamente fermentables son monosacáridos, como la glucosa y la fructosa, que al entrar en contacto con el agente de transformación (la levadura), producen etanol y dióxido de carbono (CO₂), lo cual puede ser representado químicamente mediante la ecuación (1.1) (Carrazana, 1987; Dalena *et al.*, 2019). Las levaduras convierten primeramente la glucosa en piruvato mediante una serie de pasos enzimáticos llamados la vía glucolítica, y luego el piruvato se transforma en etanol en condiciones anaeróbicas (Anexo 1) (Chandel y Silveira, 2018). Como resultado de reacciones paralelas a la fermentación alcohólica se obtienen otros productos, llamados congéneres, cuyas proporciones varían de acuerdo con las condiciones en que se realiza el proceso fermentativo. Uno

de los microorganismos más utilizados para la fermentación en condiciones anaeróbicas es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Kuila y Sharma, 2018; Küüt *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2016).



De acuerdo con la ecuación (1.1), una molécula de glucosa produce dos moléculas de etanol y dos moléculas de dióxido de carbono. Por lo que, cada 100 kg en peso de azúcares (glucosa o fructosa), se producirán teóricamente 51,1 kg de etanol y 48,9 kg de CO₂, con liberación de energía en forma de calor. Sin embargo, en los procesos industriales este rendimiento de fermentación no se logra, debido a que las células de levadura utilizan una parte de los azúcares en la producción de biomasa celular y compuestos secundarios (congéneres) como glicerol, ácidos succínico, málico y acético, aceite de fusel y otros subproductos en menor cantidad. Por esta razón, el rendimiento máximo de fermentación alcanzado es de 93 %. Además, el rendimiento depende en gran medida de la cepa de levadura empleada en el proceso (Lopes *et al.*, 2016; Otero, 1997; Saura *et al.*, 2019).

1.2.1 Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras son organismos eucariotas con gran diversidad respecto a su tamaño, forma y color. Son consideradas hongos unicelulares y generalmente sus células son ovaladas, pero también pueden encontrarse en forma esférica, cilíndrica o elíptica. Son microorganismos mesófilos aerobios facultativos que se reproducen por gemación (El-Mansi *et al.*, 2019; Santos, Eichler, Machado, *et al.*, 2020). Se usan como aditivos en alimentos para humanos y forrajes, por el alto contenido de proteínas, buen balance de aminoácidos y elevada riqueza en vitaminas del complejo B en el caso de la levadura cervecera. Se ha empleado en la confección de alimentos tradicionalmente consumidos por el hombre, como pan y bebidas con diferentes grados alcohólicos (cervezas, vinos, aguardientes, etc.). Desde el punto de vista tecnológico, las levaduras tienen ventajas en relación con otros microorganismos por su capacidad de asimilar gran variedad de sustratos, altas velocidades de crecimiento y además su biomasa es fácilmente separable (Berenjian, 2019; Brar *et al.*, 2019; Gálvez, 2000).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el organismo microbiano más comúnmente utilizado en la fermentación de jugos y melazas de caña de azúcar para la producción industrial de etanol en el mundo (Marques *et al.*, 2016). Su nombre se deriva de los vocablos *Saccharo* (azúcar), *myces*

(hongo) y *cerevisiae* (cerveza). Es un hongo no filamentoso que se reproduce por crecimiento vegetativo o reproducción sexual. Además, es un ejemplo de organismo facultativo, puesto que tiene un metabolismo aeróbico y anaeróbico (Sheth y Borse, 2018; Suárez *et al.*, 2016). En presencia de oxígeno, la *S. cerevisiae* se reproduce y maximiza la formación de biomasa. En ausencia de oxígeno y bajo condiciones controladas produce metabolitos, como la enzima deshidrogenasa, que convierte el azúcar en etanol. Es por ello que, la fermentación se debe llevar a cabo con alimentación programada de azúcares en ausencia de aire, para maximizar la formación de alcohol etílico (Vogel y Todaro, 2014). Dicha levadura es capaz de fermentar sacarosa en etanol con altos rendimientos, alta productividad y tolerar altas concentraciones de etanol en comparación con otras cepas de levadura. También tiene la capacidad de crecer a pH bajos y temperaturas que oscilan entre 15 y 35 °C, así como es tolerante a algunos inhibidores fermentativos. Este microorganismo fermenta las hexosas, sus dímeros, trímeros y tetrámeros como glucosa, fructosa, galactosa y maltosa (Basso *et al.*, 2011; Santos, Eichler, De Queiroz, *et al.*, 2020). En cultivos discontinuos aerobios, típicamente fermenta cerca de un 70 % de la glucosa disponible a etanol y CO₂, un 20 % se incorpora a la biomasa y un 8 % se usa en la producción de glicerol (Borroto *et al.*, 2017). Según Arshad *et al.* (2017) y Wu *et al.* (2020), varios estudios han demostrado que el contenido de etanol obtenido de la fermentación de melazas de caña por cepas de *S. cerevisiae* es aproximadamente de 79,25 a 96,29 g/L.

1.2.2 Formación de congéneres

Durante la fermentación alcohólica, además de la biosíntesis de etanol y la generación de CO₂, se producen diversos compuestos volátiles y no volátiles que contribuyen a la complejidad sensorial de las bebidas que se fermentan. Los compuestos que integran la fracción aromática de las bebidas alcohólicas son también denominados congéneres o impurezas en algunos casos, siendo las levaduras junto a los microorganismos contaminantes del proceso industrial, los principales responsables de su formación. Estos compuestos químicos volátiles son formados durante los procesos de fermentación, destilación y añejamiento de las bebidas alcohólicas, por la interacción química entre algunos ácidos orgánicos con el alcohol etílico para formar ésteres, aldehídos, ácidos orgánicos, alcoholes superiores y furfural. La operación de destilación permite eliminar del producto, un mayor o menor contenido de congéneres, dependiendo del tipo y la eficiencia de dicha operación (Borroto *et al.*, 2017; Gálvez, 2019).

En el caso de la destilación del mosto fermentado, los compuestos volátiles son comúnmente asociados con las propiedades sensoriales y aromáticas de las bebidas alcohólicas (Estévez, 2014; Ibáñez *et al.*, 2020). Si su concentración en las bebidas es elevada, éstas pueden ser tóxicas para el organismo, siendo los responsables del dolor de cabeza y malestar que se manifiestan después de la embriaguez. Además, producen un sabor desagradable y olor penetrante en el producto, así como aportan una sensación de aspereza al paladar; motivos por los cuales, se debe cumplir con las especificaciones que establece la norma reguladora para la producción y comercialización de la bebida alcohólica destilada (Núñez *et al.*, 2020; Versari *et al.*, 2014).

Según Borroto *et al.* (2017) y Saura *et al.* (2019), puede tenerse una idea de la variedad de impurezas que se consideran en la caracterización de los alcoholes, observando las referencias internacionales de los alcoholes finos o rectificados, entre ellas se pueden distinguir las especies correspondientes a familias químicas como son:

- Los alcoholes superiores. Por definición los que poseen más carbonos que el etanol, los más significativos son: propanoles, butanoles y pentanoles con sus isómeros más comunes.
- Los aldehídos. Son los compuestos de mayor volatilidad presentes, destacándose el acetaldehído y los acetales (dietilacetal, 1,1-dietoxietano).
- Los ésteres. Se originan básicamente mediante la reacción de esterificación entre un ácido orgánico y un alcohol. Su importancia radica en su contribución decisiva a las propiedades organolépticas del alcohol etílico destilado. El procedimiento de destilación actúa de forma similar a un reactor de esterificación, por ello los sistemas de destilación en sí se comportan como esterificadores.
- Metanol. En todos los alcoholes potables la determinación de este compuesto es solicitada, dada su toxicidad. Su presencia es muy pronunciada en el alcohol sintético y en aquellos de origen natural, procedentes de fermentaciones de sustancias con alto contenido en pectinas, como las frutas y algunos granos. Su presencia en alcoholes de caña es muy baja.
- Carbamato de etilo. Denominado también como uretano, es el éster etílico del ácido carbámico y se conoce su potencial carcinogénico en humanos. Esta molécula puede formarse durante todo el proceso de producción, por la reacción entre el etanol y algunos productos nitrogenados, como la urea, carbamifosfatos, n-carbamil aminoácidos y cianuros (Lorenzo *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2017).

1.3 Producción de etanol a partir de sustratos procedentes de la industria azucarera

Según Saura *et al.* (2019), el alcohol etílico se puede producir a partir de varias materias primas renovables. En dependencia de la procedencia de estos sustratos, se pueden identificar tres grupos de los mismos. El primer grupo lo conforman los sustratos que contienen grandes cantidades de azúcares fácilmente fermentables, como las mieles finales y varios jugos con diferentes calidades obtenidos de la caña y la remolacha azucarera durante el proceso azucarero y el sorgo dulce, entre otros (Khan y Khan, 2019; Rabelo *et al.*, 2020). El segundo grupo lo conforman los almidones y fructosanos, procedentes del maíz, la papa, el trigo y el agave, por ejemplo, que, como regla deben hidrolizarse primero en azúcares, sin mucha dificultad, para luego ser convertidos en alcohol (Buckeridge y De Souza, 2017). El tercer grupo lo integran los materiales lignocelulósicos (bagazo de caña, residuos forestales y agrícolas, madera, pajas de trigo y arroz, mazorcas de maíz, etc.) que deben hidrolizarse primero en azúcares a partir de procesos complejos en desarrollo, para luego ser convertidos en etanol (Morales *et al.*, 2015; Yousefi y Ghasemzadeh, 2019).

En Cuba, la principal materia prima para la producción de alcohol es la caña de azúcar. En general, se necesitan unos dos kilogramos de azúcares para producir un litro de etanol. Es posible obtener cerca de 70 L de etanol por tonelada de caña (a partir de los azúcares de su jugo), si toda se dedica a ello, o alrededor de 250 L de etanol por tonelada de melaza, en dependencia de la eficiencia de fermentación, o de 250 a 300 L de etanol por tonelada de bagazo seco. Si toda la caña, incluyendo su bagazo, se dedicase totalmente a la producción de etanol podría lograrse un rendimiento de 100 a 120 L de etanol por tonelada de la misma (Gálvez, 2019).

1.3.1 Miel final

La miel final o melaza (MF), es un líquido viscoso de color marrón oscuro, rico en azúcares, que resulta de la separación de los cristales de azúcar de su licor madre en la purga o centrifugación de las masas de agotamiento en el proceso de producción de azúcar crudo de caña (Bordiga, 2018; Ray y Didier, 2015). Este subproducto de la industria azucarera, tiene un gran valor como materia prima en la industria fermentativa y para la alimentación animal, aunque también se utiliza para otras producciones biotecnológicas, como la levadura forrajera y el ácido cítrico, entre otras (Gálvez, 2000; Lopes *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2020).

Las mieles finales han sido el sustrato tradicional para la producción de alcohol. Según Santos, Rabelo, *et al.* (2020), su densidad varía de 1,4 a 1,5 g/mL y se produce a razón de 40 kg/t de

caña, así como el rendimiento en etanol es de 280 a 320 L/t. La composición de las melazas es muy variable y puede cambiar de lote a lote dentro de la fábrica de azúcar, pues no es uniforme y en ellas pueden influir diferentes factores agrícolas e industriales, como la variedad de la caña, grado de madurez, condiciones climáticas, tipo de suelo, métodos de cosechas, fertilización, tiempo de almacenamiento, eficiencia industrial y otras especificaciones propias del proceso aplicado a cada fábrica (M. Díaz *et al.*, 2019; Gálvez, 2000; Ibáñez *et al.*, 2020). En la tabla 1.2, se muestra la composición química que presentan las mieles finales de caña en Cuba.

Tabla 1.2 Composición química de las melazas cubanas

| Constituyente | Valor, % |
|------------------------------------|---------------|
| Agua | 15 - 20 |
| Materia orgánica | 72 - 76 |
| Azúcares reductores totales | 46 - 52 |
| Azúcares reductores libres | 15 - 20 |
| Sacarosa | 30 - 40 |
| Glucosa | 13 - 15 |
| Fructosa | 15 - 17 |
| Rafinosa | No se detecta |
| Azúcares reductores infermentables | 2 - 4 |
| Nitrógeno total | 0.5 - 0.6 |
| Proteína Kjeldahl | 3 - 4 |
| No azúcares orgánicos | 9 - 12 |
| Cenizas | 8 - 11 |

Fuente: Saura *et al.* (2019).

Cuando se emplea la miel final en la industria alcoholera, no deben tenerse en cuenta solamente sus composiciones químico-físicas, sino también, su comportamiento desde el punto de vista fermentativo, debido al carácter biológico de este proceso. En este sentido, juega un papel muy importante la interacción levadura - materia prima, la calidad del proceso de fermentación y las características de la levadura (Ibáñez *et al.*, 2020). La composición de las melazas puede incidir en los parámetros operacionales de los fermentadores, puesto que presentan gran número de impurezas en forma coloidal, en suspensión y disueltas como ácidos orgánicos volátiles, así como contiene una numerosa flora microbiana (M. Díaz *et al.*, 2019; Stanbury *et al.*, 2017).

1.3.2 Jugos secundarios

El jugo de caña de azúcar es una materia prima ideal para la producción de alcohol etílico, puesto que contiene azúcares libres, nutrientes orgánicos y minerales. El contenido de azúcares fermentables en el jugo de caña es de 12 a 17 %, que varía en dependencia de la madurez de la caña, la variedad y el sistema de cosecha (O'Hara y Mundree, 2016). Aproximadamente, el 90 % del azúcar presente en estos jugos es sacarosa y el 10 % restante es glucosa y fructosa. El jugo primario del proceso de fabricación de azúcar crudo, es el jugo extraído de la caña de azúcar en el primer molino, y en algunos ingenios donde existe desmenuzadora, es la combinación de este jugo con el de la desmenuzadora. Los restantes jugos que se obtienen durante el proceso de producción se denominan jugos secundarios, como son los jugos diluido, mezclado, clarificado y filtrado (Basso y Lino, 2019; Rein, 2017).

Jugo diluido

El jugo diluido (JD) es aquel que se obtiene por la compresión en el último molino con la ayuda del agua de imbibición. Este jugo pasa hacia el cuarto molino y así descendientemente hasta el segundo, conocido este proceso como maceración. Al extraerlo del tren de molinos, se une al jugo primario para formar el jugo mezclado. El jugo diluido se caracteriza por poseer bajos niveles de azúcares reductores y sólidos solubles (3 a 5 °Brix), así como un alto contenido de agua (Almazán, García, *et al.*, 2016; Falcón *et al.*, 1995). Según Otero *et al.* (2009), si se emplean los jugos diluidos directamente para la producción de etanol, alrededor de 4,8 t de sacarosa serán convertidas en 2 666 L de etanol, sin contar con las ventajas adicionales de una mayor calidad del azúcar producida y cantidades significativas de bagazo sobrante para la generación de energía eléctrica renovable.

Jugo de los filtros

El jugo de los filtros de cachaza (JF), se puede definir como la corriente intermedia o filtrado que se obtiene en la operación de separación de la torta de cachaza extraída del jugo clarificado en el proceso de fabricación de azúcar crudo. Posee un contenido de sólidos solubles de 10 a 13 °Brix y una pureza en el entorno del 80 % (Rein, 2017). Debido a su baja retención, tiene aproximadamente un 5% de sólidos insolubles, lo que obliga a recircularlo en cantidades de 10 a 20 % con el jugo mezclado en el proceso azucarero. De ahí que, se considera una corriente conflictiva en dicho proceso, puesto que contiene una gran cantidad de impurezas y polisacáridos como el almidón y la

dextrana, que afectan el propio proceso de clarificación y operaciones posteriores, lo que perjudica la calidad del azúcar crudo producida. En Cuba se ha utilizado para sustituir parcialmente la miel final en la producción industrial de alcohol etílico y levadura forrajera. Se han realizado estudios referidos a la mezcla de vinazas de destilería (VD) y JF, para hacer una sustitución total de la miel final en las plantas de levadura. Esta integración de sustratos en un complejo agroindustrial azucarero sería económicamente ventajosa para la producción integral: azúcar - alcohol - levadura (Almazán, Casanova, *et al.*, 2016; M. Díaz *et al.*, 2019; Gálvez, 2000).

Al mezclar los jugos secundarios (JF y JD) con melaza para ajustar la concentración de azúcares reductores al valor deseado, se obtiene un sustrato de muy buenas características para la producción de alcohol etílico. Según Saura *et al.* (2019), investigadores del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), realizaron durante el año 2005, pruebas para la producción de etanol a escala industrial a partir de jugos secundarios en la destilería asociada al UEB Central Azucarero Heriberto Duquesne. Se estudiaron diferentes factores que influyen en la eficiencia de la fermentación, como el balance de nutrientes, la temperatura y la utilización de bactericidas para controlar posibles contaminaciones. Los factores de mayor incidencia en la eficiencia del proceso fueron la temperatura de fermentación y la concentración de azúcares en los fermentadores. Se demostró que la temperatura de 35 ± 1 °C era la óptima para obtener eficiencias del orden de 85 %, en tanto la concentración de azúcares alimentados se encontrase entre 105 y 115 g/L. El análisis de regresión mostró que la concentración de 113 g/L de azúcares reductores totales fue la óptima para la bioconversión de estos en etanol, a una concentración celular de trabajo de $100 \cdot 10^6$ células/mL. De acuerdo a los resultados de las pruebas, cada tonelada de sacarosa presente en los jugos de baja calidad se convertirá en unos 550 L de etanol (Gálvez, 2019; Otero *et al.*, 2010).

1.3.3 Beneficios del uso de mezclas de jugos y melazas de caña de azúcar

Las tendencias actuales en la producción de etanol, conducen al empleo de sustratos alternativos a las ya tradicionales melazas de caña y remolacha azucarera. Entre ellos se encuentran los jugos de menor calidad en el proceso azucarero. El programa cubano de modernización y rehabilitación de la industria alcoholera nacional, presupone el uso de jugos secundarios (jugos diluidos y de los filtros) de la producción de azúcar crudo, como fuente alternativa de carbono para la fabricación de alcohol etílico (Ibáñez *et al.*, 2018; Saura *et al.*, 2009). Esta alternativa tecnológica presenta ventajas indiscutibles desde el punto de vista económico y a la par confiere una gran flexibilidad productiva

al proceso global del complejo ingenio azucarero - destilería de alcohol, debido a que permite reducir el impacto económico negativo inherente a la cotización, siempre cambiante del azúcar en el mercado internacional. A partir de estas materias primas y mediante una coherente estrategia de diversificación, es posible adaptar la industria de manera dinámica a las peculiaridades del mercado (Morales *et al.*, 2014). La producción de etanol a partir de jugos de caña en las destilerías existentes en Cuba es factible y solo requiere de inversiones mínimas para adecuar el ingenio azucarero a la entrega de jugos de baja calidad a este proceso. Es por tanto de interés para la industria, intensificar el proceso de producción de alcohol etílico en su etapa fermentativa, usando mezclas compuestas por estos sustratos (Almazán, Casanova, *et al.*, 2016; Gálvez, 2019; Otero *et al.*, 2010).

Según Martínez *et al.* (2013), la efectividad económica de la producción de etanol se encuentra marcadamente influenciada por la disponibilidad, precios en el mercado y los destinos de mejor uso de las materias primas. Por ello, se han realizado varios estudios donde se emplean sustratos combinados como el jugo de los filtros de cachaza, jugos diluidos, jugos clarificados, miel B y miel final en la etapa de fermentación (De Armas *et al.*, 2020; De la Cruz *et al.*, 2000; Mesa *et al.*, 2006; Rivero *et al.*, 2012). Fabelo (1999), realizó importantes contribuciones con su estudio sobre la modelación y optimización de la etapa fermentativa, mediante la utilización de vinazas y jugo de los filtros mezclados con miel final en diferentes proporciones. También, se han empleado mezclas de miel final y licor hidrolizado de bagazo como fuente de carbohidratos (Mesa *et al.*, 2020; Morales *et al.*, 2018). Estos estudios han demostrado que con el empleo de mezclas de diversos sustratos, es posible reducir los costos de producción y el impacto ambiental de los residuales generados en el proceso de obtención de etanol por vía fermentativa.

García *et al.* (2015), señala que las mezclas de jugos secundarios con melazas, son sustratos de muy buenas características para la producción de etanol, aunque es válido destacar que para que se puedan asimilar en la destilería, se necesita realizar previamente un proceso de preparación, clarificación y enfriamiento para que alcance las condiciones óptimas para su empleo en la fermentación alcohólica. La utilización de estas mezclas permite obtener un incremento de la concentración de etanol en la batición fermentada, lo que favorece el aumento de la eficiencia del proceso (Cortés *et al.*, 2021; González *et al.*, 2009). Klibansky *et al.* (1985), evaluó el uso del jugo de los filtros en la obtención de alcohol etílico, concluyendo que, aunque el consumo de jugo por hectolitro de alcohol referido a las mieles, se incrementa debido a la disminución de azúcar presente en el mismo, su utilización reporta grandes ventajas desde el punto de vista tecnológico y como

sustituto de una parte de la miel final, que pudiera destinarse a otros usos como la alimentación animal. La extracción de estas corrientes de jugos secundarios para la producción de etanol, permite una reducción de sustancias nocivas en el proceso de producción de azúcar crudo, tales como sólidos insolubles, polisacáridos, cenizas y otras impurezas que entorpecen las etapas de evaporación, concentración y cristalización del azúcar, así como contribuye al ahorro de agua en el proceso fermentativo, al sustituirse parte de la misma por estos jugos. Además, conduce a una mayor eficiencia en la etapa de clarificación en el proceso azucarero, obteniéndose un azúcar de mayor calidad, así como una disminución del consumo de vapor y un incremento de la disponibilidad de bagazo sobrante (J. Díaz *et al.*, 2019; Fernández *et al.*, 2008; Guerra *et al.*, 1995; Rivero *et al.*, 2012).

1.4 Factores que afectan la fermentación alcohólica

Para producir etanol de manera eficiente, es importante comprender los procesos bioquímicos fundamentales que rigen la fermentación y los parámetros físicos, químicos y biológicos que afectan a los microorganismos involucrados. La determinación de los factores que limitan la glucólisis fermentativa del etanol son complejos debido a la interrelación existente y a la naturaleza de los parámetros que intervienen en este proceso. En el presente epígrafe, se describen algunos de los factores más importantes que afectan la fermentación alcohólica.

1.4.1 Efectos de la temperatura y el pH

La temperatura tiene una influencia directa sobre la cinética de fermentación. Durante el proceso fermentativo ocurre un desprendimiento de calor, por lo que la temperatura del medio se eleva y puede alcanzar valores que inhiban la acción de la levadura. Las fluctuaciones de temperatura afectan la tasa de crecimiento, los requerimientos nutricionales, la permeabilidad celular, la actividad enzimática y el metabolismo de las levaduras. Los principales mecanismos afectados son la estructura y composición de las membranas citoplasmáticas, que determinan la tasa de utilización de sustrato (Nitayavardhana y Khanal, 2017; Soccol *et al.*, 2013). Las altas temperaturas provocan un aumento de los ácidos grasos saturados esterificados en los lípidos de la membrana. Además, un incremento en la temperatura de fermentación, provoca un aumento de los efectos inhibitorios del etanol. Los valores de temperatura para lograr un eficiente proceso fermentativo deben oscilar entre los 33 y 35 °C (Amore y Faraco, 2013; Saura *et al.*, 2019). A menores temperaturas, el tiempo de

fermentación se alarga, dando más oportunidad a bacterias u otros organismos para fermentar azúcares a productos no deseados (Rein, 2017).

El pH es un factor limitante en la fermentación alcohólica. La acidez es uno de los parámetros organolépticos más importantes en las bebidas alcohólicas y es el resultado de la presencia de ácidos orgánicos débiles, como los ácidos succínico y acético, producidos por la levadura y bacterias contaminantes durante la fermentación (Amore y Faraco, 2013; Vasconcelos, 2015). El pH puede limitar la tasa de crecimiento de las levaduras al alterar la actividad enzimática, la permeabilidad celular y la disponibilidad de iones metálicos. Las levaduras pueden sobrevivir en un amplio rango de pH (2,0 a 8,0), pero el pH óptimo para su crecimiento es entre 4,8 y 5,0, que es ligeramente ácido (Suárez *et al.*, 2016). Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* crecen en medios ácidos a valores de pH no inferiores a 2,5. Así como, a pH superiores a 5,0 puede disminuir el rendimiento de etanol (Nitayavardhana y Khanal, 2017).

1.4.2 Requerimientos de nutrientes

Según Sablayrolles (2019), la cinética de fermentación puede variar considerablemente en dependencia de la composición del mosto, debido a que los nutrientes son esenciales para el crecimiento y la supervivencia de la levadura. La principal fuente de carbono para el crecimiento de las levaduras y la producción de etanol proviene de las moléculas de azúcar. La *Saccharomyces cerevisiae* puede degradar una amplia variedad de azúcares, como monosacáridos (glucosa, manosa, fructosa y galactosa), disacáridos (sacarosa, maltosa y trehalosa) y trisacáridos (maltotriosa y rafinosa). También, estos microorganismos requieren para su crecimiento de fuentes de nitrógeno y fósforo en el medio de cultivo. Sin garantizar estas condiciones es muy difícil lograr un inóculo saludable que se pueda utilizar en el caldo fermentativo. El contenido de nitrógeno y fósforo asimilables en el mosto, juega un papel importante en la duración y progreso de la fermentación alcohólica (Seguinot *et al.*, 2018), puesto que son necesarios en importantes procesos fisiológicos como el crecimiento celular, la velocidad de fermentación y la síntesis de proteínas (Saura *et al.*, 2019; Vidal *et al.*, 2013). Tradicionalmente en las destilerías cubanas se emplea como nutrientes la urea, el sulfato de amonio y el hidrógenofosfato de amonio (Borroto *et al.*, 2017).

Las vitaminas y los minerales, también son nutrientes esenciales para el buen desempeño del proceso fermentativo. Según Amore y Faraco (2013), las vitaminas actúan principalmente como cofactores en las conversiones enzimáticas. La biotina, el ácido nicotínico, la vitamina C, la tiamina

y el ácido pantoténico, son las principales vitaminas necesarias para el crecimiento de la levadura. La biotina está involucrada en muchas reacciones enzimáticas, incluida la síntesis de proteínas, material genético (ADN), carbohidratos y ácidos grasos. Se ha demostrado en gran medida el efecto de las vitaminas en la producción de alcoholes superiores (isoamílico y n-propílico), que contribuyen principalmente al sabor y aroma de las bebidas alcohólicas. Entre los principales minerales involucrados en la reproducción celular y el metabolismo de la levadura, se encuentran el potasio, calcio, magnesio, cobre y zinc. Los iones de magnesio y los fosfolípidos estabilizan la membrana celular, protegiendo a las células de levadura de los efectos tóxicos del etanol. Todos estos micronutrientes se requieren en pequeñas cantidades y generalmente se encuentran en proporciones suficientes en la materia prima utilizada en la fermentación (Almazán, Cabello, *et al.*, 2016; Nitayavardhana y Khanal, 2017; Sablayrolles, 2019).

1.4.3 Concentración de azúcares

Una alta concentración de azúcares puede disminuir el rendimiento y la productividad de etanol. Este fenómeno se denomina inhibición de catabolitos o azúcares, que provoca una reducción de la actividad de las enzimas catabólicas implicadas en el proceso fermentativo. La inhibición del azúcar depende de la cepa de levadura empleada y normalmente comienza con una concentración de 150 g/L de glucosa. Sin embargo, hay cepas que crecen adecuadamente con una concentración mayor de 250 g/L o hasta 500 g/L de azúcares. Por otro lado, a concentraciones de azúcar superiores a 500 g/L, se tiene como resultado una actividad del agua demasiado baja y condiciones muy complejas para que crezcan estos microorganismos (Walker y Walker, 2018). Una aplicación industrial de este hecho es la melaza, un subproducto proveniente de la industria azucarera, con alrededor del 50 % de concentración de azúcar (Wu *et al.*, 2020). La melaza se puede almacenar en un ambiente abierto, incluso durante años sin degradación biológica. Además, la concentración excesiva de hidratos de carbono en forma de monosacáridos y disacáridos puede frenar la actividad bacteriana. A altas concentraciones de azúcares, las levaduras producen etanol en lugar de producir biomasa, incluso en condiciones aeróbicas (efecto *Crabtree*). En esta condición, se inhibe la producción de enzimas oxidativas y las células se ven obligadas a un metabolismo fermentativo. También, las elevadas concentraciones de azúcares afectan a los procesos de ósmosis dentro de la membrana celular. Sin embargo, concentraciones muy bajas de azúcar, por ejemplo, menos de aproximadamente 3 g/L, pueden causar la muerte de las células de levadura por inanición nutricional (Amore y Faraco, 2013; Laluce *et al.*, 2016; Wikandari *et al.*, 2019).

1.4.4 Oxígeno disponible

La fermentación alcohólica es un proceso completamente anaeróbico. La presencia de oxígeno induce la cadena respiratoria y la producción de biomasa celular, pero simultáneamente disminuye la cinética de la fermentación del azúcar y la producción de etanol. De hecho, estas condiciones se utilizan para la producción industrial de levadura seca. Por otro lado, las bajas concentraciones de oxígeno provocan la inhibición por catabolitos de las primeras enzimas del ciclo de Krebs, con aumento simultáneo de enzimas claves de la glucólisis (por ejemplo, fosfo-fructoquinasa), lo que da como resultado la dirección del metabolismo celular hacia la producción de etanol. Este es el llamado “efecto Pasteur”, que se basa en la supresión de la fermentación alcohólica debido a la presencia de oxígeno en el medio de cultivo. Esta es la razón por la que los fermentadores se cierran herméticamente (Amore y Faraco, 2013; Vasconcelos, 2015). Una vez que el microorganismo comienza a consumir azúcares, se producen grandes cantidades de dióxido de carbono, se desplaza el oxígeno y se crean condiciones semianaeróbicas que favorecen la fermentación. Sin embargo, las células de *S. cerevisiae* necesitan oxígeno, al menos durante las primeras horas después de la inoculación. Una oxigenación insuficiente resulta en un crecimiento inadecuado y una reducción de la viabilidad celular al final de la fermentación. Además, el oxígeno es necesario en la biosíntesis de esteroides, ácidos grasos insaturados y fosfolípidos necesarios en la formación de las membranas celulares. La cantidad de oxígeno requerida generalmente para el crecimiento eficiente de las levaduras está en el rango de 5 a 10 mg/L (Sablayrolles, 2019; Sarris y Papanikolaou, 2016).

1.4.5 Concentración de etanol resultante

El etanol es el principal producto obtenido durante la fermentación de azúcares, y sus efectos inhibitorios sobre el crecimiento de células de levadura se han estudiado en gran medida en los últimos años (Nitayavardhana y Khanal, 2017). Se ha demostrado que el etanol afecta negativamente tanto el crecimiento celular como la velocidad de fermentación a medida que aumenta su concentración en el medio. Estudios realizados por D'Amore (1992), evidencian que el etanol puede modificar la membrana celular, al alterar tanto su organización estructural como su permeabilidad, lo que trae como consecuencia la ausencia de cofactores y coenzimas. Además, puede causar la desnaturalización de muchas enzimas intracelulares, incluidas las enzimas glucolíticas y la inhibición de los sistemas de transporte de azúcares y aminoácidos. La respuesta metabólica de las células a altas concentraciones de etanol es sintetizando solutos compatibles como el glicerol y la trehalosa, que ayudan a las células a protegerse contra los efectos del estrés hídrico y

la ruptura de los enlaces de hidrógeno por el etanol. Es por ello que, las cepas industriales para la producción de etanol deben tener una alta tolerancia al etanol (Amore y Faraco, 2013; Pandey *et al.*, 2019; Vamvakas y Kapolos, 2020).

1.4.6 Formación de inhibidores de la fermentación

Según Wikandari *et al.* (2019), los inhibidores son sustancias o compuestos que pueden alterar y/o detener la actividad de las enzimas, catalizadores o microorganismos para degradar los sustratos. Las materias primas utilizadas para la producción de etanol, así como las etapas previas a la fermentación, pueden contener o crear algunos compuestos químicos que reducen la capacidad de las levaduras para producir etanol. Estos inhibidores pueden reducir el rendimiento o la productividad del etanol, disminuir la viabilidad de la levadura o detener completamente la fermentación. Además, la fuente de carbono del proceso de fermentación, es decir, los azúcares, o el producto principal de la fermentación, el etanol, también pueden actuar como inhibidores.

La melaza, subproducto de la industria azucarera, es uno de los principales sustratos utilizados en la producción de etanol. Contiene una variedad de inhibidores como el furfural, hidroximetil-furfural (HMF), fenol, vainillina, ácido vanílico, hexanol y heptanol. También, durante la etapa de calentamiento de jugo de caña en el proceso fermentativo, se producen algunos inhibidores a partir de la degradación del azúcar (por ejemplo, furfural) y las melanoidinas de Maillard. La reacción de Maillard es una reacción química entre un aminoácido y un azúcar reductor a una temperatura elevada. Tanto las reacciones de Maillard como las de caramelización, podrían resultar en la formación de componentes inhibidores como el HMF. Estos componentes podrían reducir la formación de etanol hasta en un 80 %. Se ha demostrado que el furfural, disminuye la tasa de crecimiento específica, el rendimiento de biomasa en ATP y la productividad de etanol, así como es letal para las células de levadura, en concentraciones superiores a 84 nmol/g (peso seco) (Basso y Lino, 2019).

El jugo de caña de azúcar, también presenta iones metálicos potencialmente tóxicos en su composición. Una alta concentración de cationes como Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} y Na^{+} y aniones como Cl^{-} y SO_4^{2-} , podrían inhibir severamente el crecimiento de las levaduras y disminuir la productividad de la fermentación. Otro factor importante es el estrés osmótico causado por la concentración elevada de sales. De ahí que, muchos estudios han demostrado que la viabilidad y el crecimiento de la levadura, se ven fuertemente afectados por la presión osmótica,

puesto que la mayoría de las levaduras son sensibles al estrés osmótico (Amore y Faraco, 2013; Wikandari *et al.*, 2019).

1.5 Contaminantes microbianos y sus efectos en la producción de etanol

A pesar de los avances tecnológicos alcanzados, la contaminación microbiana sigue siendo un problema frecuente y uno de los principales desafíos económicos en las operaciones de fermentación alcohólica a gran escala (Díaz *et al.*, 2020; Muthaiyan *et al.*, 2011). Estas infecciones pueden, como mínimo, afectar la eficiencia de la fermentación y, en el peor de los casos, provocar fermentaciones lentas o atascadas que ocasionan el cierre de las instalaciones industriales para su limpieza y desinfección (Duarte *et al.*, 2019; Rich *et al.*, 2018). Estos retrasos provocan una pérdida de tiempo significativa, así como el encarecimiento del costo del producto final. La presencia de estos contaminantes genera considerables pérdidas económicas para las industrias, debido a que estos compiten con las levaduras por azúcares fermentables y otros nutrientes presentes en los sustratos fermentativos, lo que resulta en una reducción de la producción de etanol (Beckner *et al.*, 2011; Reisman, 2019).

Los contaminantes bacterianos se introducen inadvertidamente en el proceso de fermentación a través de numerosas fuentes: como el suelo de las plantaciones de caña, la propia caña de azúcar, los diluyentes de los mostos de fermentación y los equipos empleados en cada etapa del proceso. Por tal motivo, lograr la asepsia resulta extremadamente difícil, teniendo en cuenta las condiciones de operación en las que se desarrolla el proceso y los grandes volúmenes de sustrato que se procesan (Basso y Lino, 2019). La existencia de estos contaminantes en niveles superiores a 107 UFC/mL, puede reducir el rendimiento de la fermentación alcohólica en un 30% (Maia *et al.*, 2019).

Las bacterias ácido lácticas (LAB) del género *Lactobacillus*, son los contaminantes bacterianos más comunes que se encuentran en las instalaciones productoras de etanol (Bonatelli *et al.*, 2017; Ceccato-Antonini, 2018; Costa *et al.*, 2015; Lucena *et al.*, 2010). Estos microorganismos se pueden clasificar de acuerdo a su metabolismo en homofermentativos (que producen solamente ácido láctico) o heterofermentativos (que producen una mezcla de ácido láctico, etanol o ácido acético y dióxido de carbono), durante la degradación de hexosas a través de la glucólisis. Tanto el ácido láctico como el acético son inhibidores fuertes de la actividad fermentativa a pH bajos, mientras que el ácido láctico es generalmente el ácido débil más abundante en las fermentaciones industriales (Basso *et al.*, 2014; Laluca *et al.*, 2016; Lopes *et al.*, 2016). Si bien se han identificado

varios géneros de bacterias ácido lácticas a partir de fermentaciones contaminadas, las especies encontradas con mayor frecuencia son: *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. casei* y *L. vini* (Carvalho-Netto *et al.*, 2015; Da Silva-Neto *et al.*, 2020; Lucena *et al.*, 2010). Estos microorganismos presentan un adecuado crecimiento a $\text{pH} < 5$ (Laluce *et al.*, 2016).

El ácido láctico producido por las LAB, reduce el rendimiento de etanol al inhibir la fermentación, así como la formación y viabilidad de las yemas de levadura a concentraciones superiores a 4,8 g/L (De Souza *et al.*, 2012). Según Basso *et al.* (2014), el *L. fermentum* o el *L. plantarum* presentes durante la fermentación de jugos de caña de azúcar, producen aproximadamente entre 3 y 4 g/L de ácido láctico. Además de los ácidos orgánicos, las LAB producen otros metabolitos extracelulares como el diacetilo, ácidos grasos hidroxilados y la reuterina, que influyen negativamente en el crecimiento de la levadura. Estas bacterias están bien adaptadas para la supervivencia en condiciones de bajo pH, altas concentraciones de etanol y bajo contenido de oxígeno (Beckner *et al.*, 2011; Bonatelli *et al.*, 2017; Mendonça *et al.*, 2020).

Durante la obtención de etanol a partir del mosto de la caña de azúcar, la presencia de bacterias ácido lácticas y levaduras silvestres es inevitable, puesto que se originan a partir de la propia materia prima y el entorno industrial (Bonatelli *et al.*, 2019). La competencia por los nutrientes, el desvío de azúcares a metabolitos distintos al etanol, la reducción de la viabilidad celular, cambios en la morfología celular de la levadura, la floculación y la formación de biopelículas, se enumeran como factores importantes que inciden en la disminución de la productividad (Basso *et al.*, 2014; Brexó y Sant'Ana, 2017; Oliveira *et al.*, 2019). Según Amorim *et al.* (2011), se estima que 108 bacterias/mL disminuyen la producción de etanol aproximadamente entre 10 000 y 30 000 L/d en una destilería capaz de producir un millón de litros diariamente.

1.5.1 Control de la contaminación bacteriana

La contaminación bacteriana es un problema recurrente en las unidades productoras de etanol. De ahí que, el monitoreo constante del proceso fermentativo permite determinar la fuente potencial de contaminación y los factores que lo agravan, a fin de diseñar una estrategia que controle el crecimiento bacteriano (M. Costa *et al.*, 2018; Díaz *et al.*, 2020). Tradicionalmente, en las destilerías se lleva a cabo un tratamiento con ácido sulfúrico a las células de levadura, que disminuye significativamente la carga de bacterias contaminantes (Basso *et al.*, 2008; M. Costa *et al.*, 2018). Después de cada ciclo fermentativo, la masa celular se recupera del mosto fermentado

por centrifugación y se lava posteriormente con una solución de ácido sulfúrico (pH: 1,8 a 2,5) durante un par de horas. Sin embargo, los sucesivos ciclos de fermentación y las condiciones no asépticas conducen al establecimiento de comunidades microbianas contaminantes que interactúan entre sí de diversas maneras (Albergaria y Arneborg, 2016; Brexó y Sant'Ana, 2017). Por lo que, este tratamiento químico no siempre es lo suficientemente efectivo, y también puede afectar el cultivo inicial de levaduras y comprometer el rendimiento de la fermentación. Además, la naturaleza corrosiva del ácido sulfúrico representa un grave riesgo para la salud de los trabajadores y hace que el tratamiento final del efluente sea costoso. En estas circunstancias, se emplean métodos alternativos como el uso de antibióticos, agentes químicos y compuestos naturales (Ceccato-Antonini, 2018).

Los niveles de contaminantes bacterianos se pueden reducir significativamente con la utilización de procedimientos efectivos de limpieza y desinfección de las instalaciones, pasteurización de los sustratos y adición de antibióticos. Los productores de etanol deben mantener los contaminantes bacterianos en niveles aceptables (≤ 106 UFC/mL) para evitar brotes de infecciones. De ahí que, una gran diversidad de antimicrobianos está disponible comercialmente (Walker *et al.*, 2018). La elección de un producto antimicrobiano está determinada por su eficacia a bajas concentraciones, bajos costos y seguridad ecológica. Existen varios antisépticos químicos (dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno y metabisulfito de potasio) y antibióticos como la penicilina, estreptomicina, monensina y la tetraciclina, que pueden limitar el crecimiento de contaminantes en el mosto de fermentación (Laluce *et al.*, 2016). A pesar del uso generalizado de antibióticos en las destilerías y su relativa eficacia en el control de la contaminación bacteriana, la aparición de cepas resistentes a los medicamentos ha limitado su uso (Mendonça *et al.*, 2016; Walter *et al.*, 2019). También, el empleo de productos naturales como propóleos, ácidos del lúpulo (alfa ácidos y lupulonas) y el quitosano, han demostrado sus efectos bactericidas y bacteriostáticos en fermentaciones de jugos de caña de azúcar y melaza (Ceccato-Antonini, 2018; De Oliveira *et al.*, 2016).

1.6 Fundamentos generales del proceso tecnológico de fabricación de etanol

El etanol se puede producir a través de la fermentación directa de jugos de caña de azúcar, una mezcla de jugos y melazas, o melaza diluida en agua. La producción de alcohol etílico a partir de melazas de caña, generalmente incluye cuatro etapas fundamentales: primero el acondicionamiento de las materias primas, luego la conversión de los carbohidratos en azúcares simples o asimilables por la levadura, después la fermentación alcohólica de estos azúcares y finalmente la separación del

etanol y otros subproductos por destilación. En la figura 2.1 del anexo 2, se puede apreciar un diagrama de flujo típico del proceso tecnológico de producción de etanol a escala industrial. Primeramente, la miel final de caña se diluye con agua, se ajusta el pH (de 4 a 5 unidades) con ácido sulfúrico y se le añade nitrógeno y fósforo en forma de sales solubles (sulfato y fosfato de amonio) (Bamforth y Cook, 2019; Laluce *et al.*, 2016). La levadura proveniente de un cultivo puro de laboratorio se propaga mediante pasos sucesivos estériles en condiciones aeróbicas hasta obtener volúmenes de 1 a 2 m³. Se aumenta la biomasa en el prefermentador con un volumen que oscila entre 10 y 20 % del fermentador. En esta etapa se añade miel con una concentración de azúcares de unos 100 g/L en condiciones no estériles. Cuando la levadura se encuentra a mediados de la fase de crecimiento es inoculada en el fermentador, donde comienza la fermentación alcohólica en condiciones anaeróbicas con una concentración de azúcares de 150 a 160 g/L. La levadura crece simultáneamente con la producción de alcohol por espacio de unas 20 h. La velocidad de fermentación aumenta de forma rápida hasta alcanzar el máximo al término de las 15 h. La producción de alcohol continúa entonces a una velocidad decreciente, concluyendo el ciclo de 24 a 30 h de fermentación, para obtener una concentración final de etanol de 6 a 7 % v/v. Durante la producción de etanol ocurren reacciones exotérmicas, por lo que es necesario eliminar el calor desprendido en el transcurso de la fermentación y mantener la temperatura cerca del óptimo (de 33 a 34 °C), de lo contrario la temperatura aumenta de 40 a 42 °C, con sensibles pérdidas en el rendimiento (Bergmann *et al.*, 2018; Gálvez, 2000; Ramesh y Ramachandran, 2019).

Una planta alcoholera puede disponer de 8 a 10 fermentadores que operen desfasados en el tiempo, a intervalos de 3 a 4 horas, para garantizar la alimentación continua al sistema de destilación. El líquido fermentado es descargado en un tanque de balance capaz de absorber las fluctuaciones del proceso de destilación. La productividad típica de un proceso discontinuo clásico en *batch* es de 1,8 a 2,5 g de etanol por litro de mosto fermentado en una hora. Esta productividad puede aumentarse de manera sensible si se recircula la levadura producida en el fermentador o se emplea la fermentación continua. En estos casos los valores típicos se encuentran entre 5 y 8 g de etanol por litro de mosto fermentado por hora (Vasconcelos, 2015; Yousefi y Ghasemzadeh, 2019).

Una variante del proceso discontinuo es la recirculación de la levadura, donde al finalizar la fermentación, se procesa el sustrato fermentado a través de una centrífuga para separar las células de levadura (proceso de fermentación *Melle-Boinot*) (Anexo 2, Figura 2.2). La crema de levadura obtenida se recircula al fermentador para reducir el tiempo de fermentación y aumentar los

rendimientos de etanol, mejorando la adaptación de las células de levadura a concentraciones más altas de azúcar y etanol. Además, esto permite elevar la concentración inicial de levadura, aumentar la productividad y reducir el número de fermentadores instalados (Laluce *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2015; Santos, Eichler, Machado, *et al.*, 2020).

Según Saura *et al.* (2019), el sistema de destilación tradicional empleado en Cuba está compuesto por una columna destiladora y varias rectificadoras. Esta operación física está destinada a separar los componentes de la mezcla, de acuerdo a las volatilidades relativas de los mismos. La batición fermentada con un porcentaje alcohólico entre 8 y 9 % (v/v), pasa primeramente por un precalentador donde se eleva su temperatura desde 35 hasta 60 °C, aproximadamente. Esto se realiza aprovechando el calor desprendido durante la condensación de los vapores alcohólicos obtenidos en el tope de la columna rectificadora. El vapor que arrastrará al etanol se alimenta por la base de la columna y la batición fermentada por el tope en la columna destiladora, que contiene un número importante de platos perforados. En cada plato se producen evaporaciones y condensaciones sucesivas, como resultado de lo cual, el vapor que asciende se enriquecerá en etanol y en los componentes más volátiles, y el líquido, que desciende en contracorriente, saldrá enriquecido en los componentes más pesados que, finalmente, abandonan la columna por el fondo a una temperatura de 100 °C, dando lugar a la vinaza. Por la zona superior de la columna rectificadora se extrae el producto final (etanol) y en dependencia del tipo de alcohol deseado, será el plato por donde se realice la extracción (Gálvez, 2000; Rein, 2017).

Durante la destilación, se generará un líquido enriquecido en alcoholes pesados y otras impurezas orgánicas (acetato de etilo, acetaldehído y furfural, entre otras), que se producen también durante la fermentación. Esta mezcla, fundamentalmente de alcoholes isoamílico, isopropílico, n-propílico e isobutílico, llamada “aceite fusel”, se extrae en una zona intermedia de la columna, porque es en esa posición donde existe una concentración de etanol favorable (45 a 65 % v/v) para lograr su separación. El etanol hidratado puede almacenarse o enviarse a un tanque de deshidratación donde se agrega ciclohexano para producir etanol anhidro. Otra forma de producir etanol anhidro es a través de tamices moleculares que consumen menos energía (Rein, 2017; Santos, Rabelo, *et al.*, 2020; Sheth y Borse, 2018).

La obtención de subproductos de la producción de alcohol puede mejorar la rentabilidad global del proceso. Los principales son el dióxido de carbono que se obtiene con un alto grado de pureza y se

emplea en la carbonatación de aguas, refrescos y cervezas, así como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de 40 a 45 % de proteína, rica en vitaminas y sales minerales, es un excelente producto para la fabricación de piensos y forrajes. Las vinazas generalmente se envían a los campos de caña para ser utilizadas como fertilizante (fertirrigación) debido a su alto contenido de potasio o pueden ser empleadas también en la producción de etanol y biogás (Cortez *et al.*, 2019; Gálvez, 2000).

1.7 Conclusiones parciales del capítulo

1. Durante el proceso de fermentación alcohólica, además de la biosíntesis de etanol y la generación de dióxido de carbono por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se producen otros compuestos volátiles mayoritarios (congéneres), que contribuyen a la calidad sensorial de las bebidas fermentadas.
2. La utilización de mezclas de jugos secundarios y melazas como sustratos alternativos, ofrece grandes potencialidades en la producción de etanol por vía fermentativa, así como la extracción de estos jugos del proceso azucarero, favorece la obtención de un azúcar de mayor calidad e incrementa la disponibilidad de bagazo sobrante para la generación de energía renovable.
3. Entre los principales factores que afectan el proceso fermentativo, se destacan: las altas temperaturas, pH muy ácidos, altas concentraciones de azúcares y etanol, insuficiencia de nutrientes y la formación de sustancias inhibidoras, que limitan el crecimiento de las levaduras, con afectaciones significativas en el rendimiento alcohólico.
4. Las bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*, son los contaminantes bacterianos que se encuentran con mayor frecuencia en la industria alcoholera, con una incidencia negativa sobre la viabilidad de las levaduras y la bioconversión de azúcares en etanol.
5. La producción de alcohol etílico a escala industrial, generalmente incluye cuatro etapas fundamentales: (a) acondicionamiento de las materias primas, (b) conversión de los carbohidratos en azúcares simples o asimilables por la levadura, (c) fermentación alcohólica de estos azúcares y (d) separación del etanol y otros subproductos por destilación.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describe la metodología empleada en el estudio de la fermentación alcohólica utilizando mezclas de jugos secundarios y melazas a escala de laboratorio. En el mismo se abordan los métodos analíticos para la caracterización físico-química de los sustratos azucarados, el procedimiento para la realización del diseño experimental, la modelación matemática de las variables objeto de estudio en el proceso fermentativo y la determinación de la calidad del etanol obtenido. También, se expone el procedimiento para la estimación de los beneficios económicos del uso de estos sustratos en la producción de etanol a nivel industrial. En la figura 2.1, se muestra un diagrama con el resumen del procedimiento experimental desarrollado en la investigación.

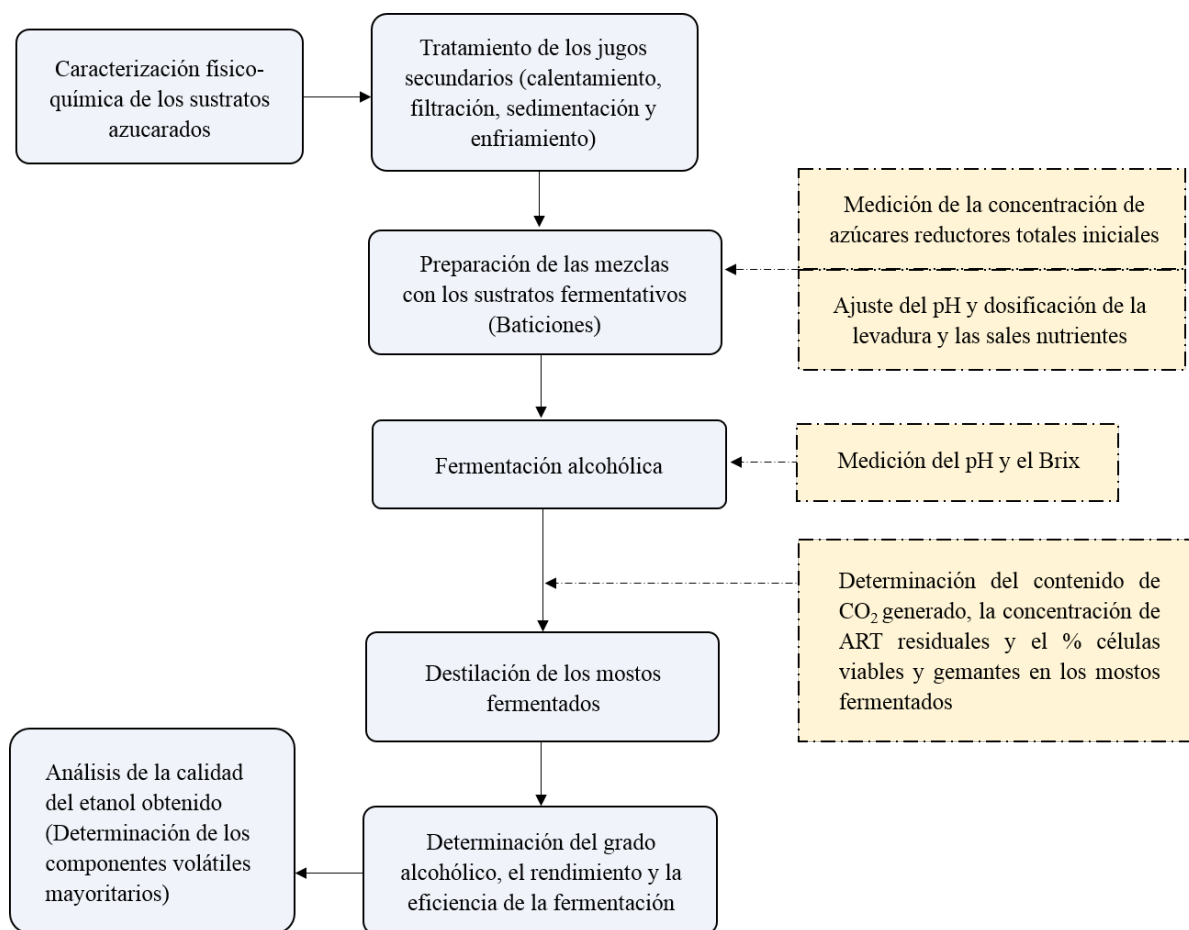


Figura 2.1 Resumen del procedimiento experimental desarrollado en la investigación

2.1 Estudio de la fermentación alcohólica de mezclas de diferentes sustratos

2.1.1 Muestreo, preparación y caracterización de las materias primas

Para el estudio de la fermentación alcohólica, se utilizaron como materias primas o sustratos fermentativos: miel final, jugo diluido y jugo de los filtros de cachaza. Los jugos secundarios (jugo diluido y jugo de los filtros) fueron extraídos de las corrientes del proceso productivo y caracterizados en las instalaciones del laboratorio de la UEB Central Azucarero Jesús Rabí, con el objetivo de conocer los parámetros de calidad de cada uno de ellos, antes de ser utilizados en las etapas posteriores de la investigación. La miel final fue obtenida del tanque de almacenamiento de la UEB Derivados Destilería Jesús Rabí y caracterizada en el Laboratorio de Análisis Químico adjunto al Departamento de Alcohol, Levadura y Alimento Animal perteneciente al Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar.

Los jugos secundarios, previamente se someten a un proceso de calentamiento hasta 100 °C. Posteriormente, se tamizan a través de un colador con malla # 100 y aberturas de 0,15 mm; y luego se decantan en probetas de 1 L, utilizando el líquido claro como materia prima del proceso fermentativo. En la sedimentación se utiliza como agente de floculación una disolución del producto Quimifloc 400, a una concentración de 0,1 %. Los jugos son enfriados hasta temperatura ambiente, antes ser empleados en la fermentación. Tanto la miel final como los jugos secundarios, son almacenados y conservados en recipientes de cristal de 1 L y ubicados en el laboratorio en lugares limpios, ventilados, libres de polvo y protegidos contra insectos y roedores.

En las tablas 3.1 y 3.2 del anexo 3, se muestran los diferentes procedimientos empleados en la caracterización físico-química de los sustratos fermentativos, con la finalidad de determinar sus parámetros de calidad. Estos métodos analíticos pueden consultarse principalmente en el Manual de Técnicas Analíticas para las Destilerías (Vázquez *et al.*, 2012) y en el libro de Métodos Analíticos para Azúcar Crudo (Pérez y Fernández, 2006).

2.1.2 Características del microorganismo empleado

Para la realización de la fermentación a escala de laboratorio se utilizó una cepa de levadura seca activa comercial *Ethanol Red* del género *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura de rápida acción, posee una elevada tolerancia al etanol, presenta elevados rendimientos de alcohol y mantiene alta viabilidad. Es utilizada específicamente para la producción de etanol industrial y es capaz de

maximizar los rendimientos en un amplio rango de condiciones de fermentación. Está particularmente muy bien adaptada a sustratos azucarados (jugos dulces, melazas) y mostos pre-sacarificados. Es importante destacar que esta cepa de levadura ha sido ampliamente utilizada por los productores de etanol en Cuba. En la tabla 2.1, se exponen las principales características de la levadura *Ethanol Red*, ofrecida por el fabricante *Lesaffre Advanced Fermentations* (LEAF).

Tabla 2.1 Características de la levadura Ethanol Red

| | |
|-----------------------------|--|
| Ingredientes | Levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) Emulsionante: monoestearato de sorbitán (E491) |
| Instrucciones de uso | <p>Inoculación directa (sin propagación): Se requiere entre 25 y 50 g de levadura seca por hectolitro para obtener aproximadamente una concentración inicial de 5 a 10 millones de células viables por mililitro en los fermentadores.</p> <p>Inoculación directa (con propagación corta): En instalaciones modernas, donde se realizan estrictos controles de la contaminación, la levadura seca puede ser propagada por un período corto de tiempo. La cantidad de levadura empleada disminuye conforme a esta práctica.</p> <p>Antes de ser utilizada en la fermentación, la levadura debe ser rehidratada en un volumen de agua estéril de por lo menos 5 veces mayor a su propio peso. El procedimiento es realizado a $35^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ de 15 a 30 min, para asegurar un acondicionamiento y homogenización perfectos.</p> |
| Temperatura de fermentación | 30 a 40 °C |
| Análisis típico | <p>% peso seco: 94,0 a 96,5</p> <p>Células viables: $\geq 20 \cdot 10^9$ UFC/g</p> <p>Gérmenes totales: $\leq 1 \cdot 10^4$ UFC/g</p> |

2.1.3 Test de fermentación alcohólica y condiciones experimentales

Para las fermentaciones alcohólicas a escala de laboratorio, a partir de las diferentes mezclas de sustratos azucarados, se realizó un test de fermentación con el objetivo de estimar el rendimiento alcohólico y la eficiencia fermentativa en base a los azúcares reductores totales. El mismo consiste en la fermentación anaerobia de los azúcares presentes en los medios de cultivo por levaduras, constituidos por mezclas de jugos secundarios con mieles finales, con la posterior determinación del grado alcohólico. Esta técnica de laboratorio ha sido ampliamente utilizada para evaluar

biológicamente las mieles para uso fermentativo y se basa en la realización de una prueba de fermentación bajo condiciones normalizadas muy controladas. Este procedimiento analítico ha sido validado e implementado por el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar en varias destilerías del país, obteniéndose excelentes resultados en su aplicación. A continuación, se muestran los reactivos, utensilios y equipos, así como el procedimiento establecido para la realización del test fermentativo.

Reactivos

- Agua destilada o desionizada
- Hidrógenofosfato de amonio (fosfato diamónico): $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$
- Sulfato de amonio: $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4): 0,5 mol/L (1N)
- Levadura seca activa *Ethanol Red* del género *Saccharomyces cerevisiae*

Utensilios y equipos

- Frascos de boca estrecha o erlenmeyer de 1L
- Trampas de dióxido de carbono (CO_2)
- Tapones de goma
- Probetas de 100, 500 y 1 000 mL
- Pipetas de descarga 10, 50 y 100 mL
- Pipetas graduadas de 1 y 5 mL
- Vasos de precipitados de 50 100, 500 y 1 000 mL
- Embudo de vidrio
- Agitador de vidrio
- Frasco lavador
- Termómetro que aprecie 1 °C
- Incubadora
- pH-metro
- Agitador magnético
- Balanza analítica digital, precisión 0,1 mg
- Balanza técnica digital, precisión 0,01 g

Balance de nutrientes

Con el objetivo de garantizar que la fermentación comience con una concentración celular de levadura *Ethanol Red* de $300 \cdot 10^6$ células/mL, debe pesarse 0,016 g de levadura por cada mL de medio de cultivo. Por ello, se necesitarán 8 g de levadura para la preparación de 500 mL de batición. Para que las levaduras se desarrollen y se multipliquen, es necesario añadirle al medio de cultivo nutrientes ricos en fósforo (P) y nitrógeno (N). Para el primer elemento se utiliza el fosfato diamónico y para el segundo se recomiendan la urea o el sulfato de amonio. Por ello, se tiene en cuenta que el nitrógeno será ajustado para una composición porcentual en biomasa de 8 % y el fósforo para un 3,5 %, considerando que la biomasa pueda duplicar su peso seco.

Balance de Fósforo

La sal de fosfato diamónico posee contenidos de N de 21,2 % y P_2O_5 de 53,8 %, así como la sal de sulfato de amonio contiene un 21,2 % de N. Se necesitan 0,28 g de P_2O_5 por cada 500 mL de medio de cultivo (requerimiento de P para obtener 8 g de levadura en 500 mL de batición). Por lo tanto, el cociente entre 0,28 g de P_2O_5 demandado por la levadura y 0,538, resultaría igual a 0,52 g de fosfato diamónico.

Balance de Nitrógeno

Se necesitan 0,64 g de N por cada 500 mL de medio de cultivo (requerimiento de N para obtener 8 g de levadura en 500 mL de batición). Por lo que, serían aportados unos 0,11 g de N vía fosfato diamónico y el resto 0,53 g sería suministrado por vía de sulfato de amonio. Por lo tanto, el cociente entre 0,53 g y 0,212, resultaría igual a 2,52 g de sulfato de amonio.

De lo que se concluye que, se deben suministrar a los 500 mL de batición: 2,52 g de sulfato de amonio y 0,52 g de fosfato diamónico.

Procedimiento

Primeramente, se le determina a cada uno de los sustratos fermentativos el contenido de azúcares reductores totales, con el objetivo de conocer la porción o cantidad que se va a emplear en el análisis en base a los ART. Luego, se prepara una batición con los sustratos según el diseño de experimentos, con una concentración de ART inicial de 120 g/L y un volumen efectivo de 500 mL. Se le agregan posteriormente las sales nutrientes: 2,52 g de sulfato de amonio y 0,52 g de fosfato

diamónico. A continuación, se ajusta el pH del medio entre 4 - 4,5 con gotas de ácido sulfúrico (1N) y luego se añade 8 g de la levadura seca activa (*Saccharomyces cerevisiae*) *Ethanol Red* (se recomienda disolverla previamente con aproximadamente 60 mL de agua destilada). Esta levadura tiene la particularidad que se añade directamente a la fermentación sin necesidad de propagarla. Si se realiza esta prueba con la cepa de producción, se le añadirán las sales en la etapa de propagación solamente.

Posteriormente, se transfiere la batición a los frascos de boca estrecha (botellones de 1 L) hasta el volumen efectivo (500 mL). Después, se añade 2 mL de ácido sulfúrico (1N) a cada trampa de CO₂ y luego se les colocan las trampas a los botellones, con la finalidad de que la fermentación transcurra en condiciones anaerobias. Este análisis se realiza por triplicado. Luego, se colocan los frascos en la incubadora a una temperatura de 37 °C durante 24 horas. Un indicador de que la fermentación ha concluido, es que cese el burbujeo de CO₂ en las trampas. Cuando concluya la fermentación, retirar inmediatamente las trampas y tapar los frascos para que no ocurra pérdida de vapores. Seguidamente, se determinan los ART_R residuales, para efectuar los cálculos de eficiencia fermentativa y rendimiento alcohólico.

Para el control del proceso fermentativo, se determinó el pH y la concentración de sólidos solubles (Brix) en los mostos cada 3 horas. Además, se determinaron los porcentajes de viabilidad celular y gemación obtenidos en los mostos fermentados de cada alternativa de mezcla.

2.1.3.1 Determinación del grado alcohólico

Una vez efectuado el test de fermentación, se procede a la destilación de los mostos fermentados y a la determinación de su grado alcohólico según la norma cubana NC 290: 2007. Este método se basa en la medición de la densidad de las soluciones hidroalcohólicas en los destilados de las muestras de ensayo a 20 °C, mediante un alcoholímetro calibrado a esa temperatura y con el intervalo adecuado para el grado alcohólico del producto a analizar.

Utensilios y equipos

- Matraz aforado de 250 mL
- Balón de destilación con cuello largo de 1 000 mL
- Condensador de espiral o serpentín (de preferencia Graham, no menor de 400 mm)

- Trampa de vapor
- Mechero o fuente de calor eléctrica
- Probeta (de preferencia lisa con diámetro suficiente para efectuar simultáneamente las mediciones alcohólicas y de temperatura (prefiérase sin graduación con un diámetro de 4 o 5 cm y de capacidad mínima de 300 mL hasta la boca).
- Alcohólmetro con escala en por ciento en volumen, graduado en 0,1 % alcohol en volumen y referido a 20 °C.
- Termómetro con escala de 0 a 50 °C, con división mínima no mayor a 0,5 °C.

Procedimiento

Para realizar la destilación del mosto fermentado, se vierte y mide en el matraz volumétrico, 250 mL de muestra a una temperatura de $20\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$, transferidos cuantitativamente con 75 mL de agua destilada (procurando enjuagar con el agua al menos tres veces el matraz volumétrico), al matraz de destilación que contiene perlas de vidrio, conectándolo al refrigerante mediante el adaptador.

Posteriormente, se calienta el matraz de destilación y se destila lentamente recibiendo el destilado en el mismo matraz donde se midió la muestra. El refrigerante terminará en una adaptación con manguera y tubo con la punta biselada que entre en el matraz de recepción hasta el nivel del agua puesta en éste (agregar 10 mL de agua destilada en el matraz de recepción del destilado). Por el refrigerante estará circulando siempre agua, y el matraz de recepción debe encontrarse sumergido, de preferencia, en un baño de agua e hielo durante el curso de la destilación. Se debe ajustar la velocidad de destilación de forma tal que haya un pequeño reflujo en el matraz y no salgan vapores no condensados del condensador.

Cuando la cantidad de destilado contenida en el matraz se acerque a la marca (0,5 cm, debajo de la marca de aforo), se debe suspender la destilación y retirar el matraz de recepción, y llevar el destilado a la temperatura en la que se midió la muestra, procurar no perder líquido. Finalmente, se lleva a la marca con agua destilada y se homogeniza.

Para la medición del grado alcohólico, se adiciona una pequeña cantidad del destilado, en una probeta adecuada al tamaño del alcohólmetro y a la cantidad de la muestra destilada, para enjuagar la misma. Se vierte el destilado enjuagando la probeta primero con un poco del mismo destilado. A continuación, se vierte el resto del destilado hasta unos centímetros debajo del nivel total. Introducir

el alcoholímetro cuidadosamente junto con el termómetro. El alcoholímetro debe flotar libremente. Se aconseja que esté separado de las paredes de la probeta $\pm 0,5$ cm. Se estabiliza la temperatura y se eliminan las burbujas de aire. Se efectúa la lectura de ambos. Si la lectura se realiza a una temperatura diferente de 20 °C, se hace la corrección según la tabla de corrección de grado alcohólico por temperatura a 20 °C. El grado alcohólico se expresa en por ciento de alcohol en volumen a 20 °C.

2.1.3.2 Determinación del contenido de dióxido de carbono generado

Para determinar el contenido de dióxido de carbono generado durante el proceso fermentativo, se deben pesar los volúmenes de batición tanto al inicio como al final de la fermentación. De ahí que, dicha diferencia entre ambos pesos, represente la masa de dióxido de carbono generado, como muestra la ecuación 2.1.

$$m(\text{CO}_2) = B_i - B_f \quad (2.1)$$

Donde:

$m(\text{CO}_2)$: masa de dióxido de carbono generado durante la fermentación (g).

B_i : masa de la batición al inicio de la fermentación (g).

B_f : masa de la batición al final de la fermentación (g).

2.1.3.3 Determinación de los componentes volátiles mayoritarios en los destilados

La determinación de los componentes volátiles mayoritarios presentes en los destilados obtenidos a partir de los mostos fermentados correspondientes a cada alternativa de mezcla, se realizó mediante una cromatografía gaseosa, según el procedimiento analítico establecido en la norma cubana NC 508: 2011. Esta determinación se efectuó en las instalaciones del Laboratorio de Alcoholes y Bebidas (LABEB) del Centro de Referencia de Alcoholes y Bebidas (CERALBE) perteneciente al ICIDCA.

La cromatografía de gases se caracteriza porque la muestra es volatilizada e inyectada en la cabeza de una columna cromatográfica. Este método analítico se basa en la separación de dos o más compuestos dada su distribución diferencial entre la fase gaseosa o móvil y la fase estacionaria que puede ser sólida o líquida. El cromatógrafo de gases emplea un gas portador inerte (fase móvil) para mover una muestra vaporizada a través de una columna estrecha y larga impregnada o rellena con

una fase estacionaria no volátil. Independientemente del equipamiento utilizado se determinan los siguientes compuestos: acetaldehído, acetato de etilo, metanol, 1-propanol, isobutanol (2-metil-1-propanol) y los isómeros del alcohol amílico (2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol). Opcionalmente y en dependencia de la columna utilizada podrán determinarse adicionalmente: acetal, 1-butanol, 2-butanol, y de forma separada 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol (Borroto *et al.*, 2017).

Según la norma NC 508: 2011, en este análisis se utiliza un detector de ionización de llama (FID), que convierte las moléculas de los componentes de la muestra en una señal eléctrica a medida que eluyen de la columna, que es medida y registrada. La salida del cromatógrafo de gases es un cromatograma que es un gráfico que relaciona la abundancia de la señal del detector contra el tiempo. Esta abundancia permanece en un nivel bajo como una línea de base, excepto cuando un componente separado de la muestra eluye de la columna y produce un pico sobre el cromatograma. La altura o el área del pico pueden ser usados para medir la cantidad de ese componente en la muestra. El tiempo de retención de cada componente de la muestra es reproducible bajo una serie de condiciones dadas. La identificación de los picos del cromatograma puede ser posible sobre la base del tiempo de retención, necesiándose patrones para establecer las correspondientes identidades.

Los compuestos volátiles se analizaron mediante inyección directa de 1 μ L de las muestras de destilado en un cromatógrafo de gases modelo GC-17A (SHIMADZU), equipado con inyector automático y conectado a un detector de ionización de llama (FID). Se utilizó una columna capilar CP-WAX 10 (60 m \times 0,25 mm diámetro interno \times 0,25 μ m espesor de película) para separar los compuestos volátiles con hidrógeno como gas portador a una presión de 128 kPa. La temperatura de la columna fue programada desde una temperatura inicial de 40 °C durante 10 min y luego elevada a 70 °C a una velocidad de 5 °C/min. La temperatura del inyector fue de 150 °C y la del detector 250 °C. Como patrones se utilizaron acetaldehído, acetal, acetato de etilo, metanol, 1-propanol, 1-butanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol y como estándar interno 1-pentanol, reactivos de la firma Sigma-Aldrich, con una pureza superior a 99 %. Éstas son firmas productoras regidas por sistemas de gestión de la calidad certificados según las normas ISO, con certificado de pureza y libre de otras impurezas de congéneres del etanol.

2.1.3.4 Cálculo del rendimiento alcohólico y la eficiencia fermentativa

La eficiencia de la fermentación, se define como la relación existente entre los azúcares fermentables aprovechados teóricamente en la producción de alcohol a 100 % (v/v), y los azúcares fermentables contenidos en una cantidad determinada de mosto fermentado, el cual se determina por la ecuación 2.2.

$$\text{Eficiencia} = \left(\frac{\text{ALC} \cdot 1,545}{\text{ART}_i - \text{ART}_R} \right) \cdot 100 \quad (2.2)$$

Donde:

ALC: grado alcohólico de la batición fermentada (%).

ART_i: contenido de azúcares reductores totales presentes en la batición al inicio de la fermentación (%).

ART_R: contenido de azúcares reductores totales residuales presentes en la batición fermentada (%).

Según la ecuación química de la fermentación alcohólica, teóricamente 100 kg de azúcares fermentables producen 64,72 L de alcohol a 100 % (v/v) (según Gay-Lussac), para una temperatura de 20 °C y una densidad de 0,78974 g/mL.

$$\frac{100 \text{ kg azúcares fermentables}}{64,72 \text{ L alcohol a } 100 \% \text{ (v/v)}} = 1,545 \quad (2.3)$$

Por lo tanto 1,545 es el factor para convertir los litros de alcohol a 100 % (v/v) al equivalente teórico en gramos de azúcares fermentables.

Para determinar el rendimiento alcohólico de la fermentación, se emplea la ecuación 2.4.

$$\text{Rendimiento} = \left(\frac{\text{ALC}}{\text{ART}_i - \text{ART}_R} \right) \cdot 100 \quad (2.4)$$

2.1.4 Métodos analíticos y microbiológicos empleados

A continuación, se muestran los procedimientos analíticos y microbiológicos utilizados en la investigación, con el objetivo de conocer el comportamiento de algunos parámetros durante el proceso fermentativo.

2.1.4.1 Determinación de la concentración de sólidos solubles

La medición del contenido de sólidos areométricos disueltos se realiza con un juego de areómetros Brix. Este método de ensayo se basa en el empuje que experimenta cualquier cuerpo sumergido en una fase líquida o gaseosa y en la proporcionalidad que existe entre dicho empuje y la densidad de la fase. La determinación areométrica de los sólidos solubles puede utilizarse para obtener la masa de solutos en la disolución, la que fundamentalmente está compuesta por sacarosa, sustancia utilizada para graduar los areómetros Brix, por lo tanto, con ellos se determina sacarosa real en soluciones acuosas puras. En la práctica la escala de Brix mide el porcentaje m/m de sólidos disueltos en una disolución acuosa impura. El procedimiento analítico establecido para la determinación del Brix areométrico en jugos de caña de azúcar, mieles finales y mostos fermentados, puede consultarse a profundidad en el libro de Métodos Analíticos para Azúcar Crudo (Pérez y Fernández, 2006) y en el Manual de Técnicas Analíticas para las Destilerías (Vázquez *et al.*, 2012).

2.1.4.2 Determinación potenciométrica del pH

La medición del pH se realiza con un pH-metro (Hanna, HI2002-02), previamente calibrado mediante la utilización de soluciones *buffers* de referencia de 4,0 y 7,0 unidades de pH. Este método potenciométrico se basa en la diferencia de potencial entre el electrodo de medición, sensible a los iones hidrógeno, y el de referencia, por lo regular de calomel, cuando se sumergen en una solución acuosa. El procedimiento analítico establecido para la determinación del pH en jugos de caña de azúcar, mieles finales, inóculos y mostos fermentados, puede consultarse en el Manual de Técnicas Analíticas para las Destilerías (Vázquez *et al.*, 2012).

2.1.4.3 Determinación del contenido de azúcares reductores totales (ART)

Los azúcares reductores totales, constituyen los compuestos básicos sobre los cuales se llevan a cabo los procesos fermentativos. Por esta razón, su determinación es fundamental para la producción alcoholera y constituye un requisito importante a la hora de determinar la calidad de cualquier materia prima para esta industria, como lo pueden ser los jugos, mieles intermedias y finales provenientes del proceso de fabricación de azúcar crudo. Este método de ensayo se basa en la propiedad que tiene el cobre (II), en medio alcalino y acomplejado con el ion tartrato, de oxidar a los ART, reduciéndose a cobre (I). Este proceso redox requiere que la concentración de los reactivos, la temperatura, la velocidad y el tiempo de calentamiento, así como el volumen final de la

solución resultante, sean estrictamente controlados. En el Manual de Técnicas Analíticas para las Destilerías (Vázquez *et al.*, 2012), puede consultarse el procedimiento analítico establecido para la determinación del contenido de ART en jugos de caña de azúcar, mieles finales y mostos fermentados.

2.1.4.4 Determinación del porcentaje de células de levadura viables y gemantes

La determinación de la viabilidad celular, mediante la tinción con azul de metileno, es una técnica muy asequible para el trabajo de rutina y se utiliza para distinguir las células vivas o viables de las células muertas de levadura. El azul de metileno es un indicador reducible, cuando es absorbido por las células vivas, este se reduce rápidamente a su forma incolora, puesto que las células lo usan como aceptor de iones H^+ en reacciones metabólicas. Las células muertas también absorben el colorante, pero no lo reducen, por lo que las muertas o debilitadas fisiológicamente se mantienen azules y las vivas se muestran incoloras. La gemación es el proceso mediante el cual las células de levadura se reproducen asexual o vegetativamente. Se inicia por la formación de una evaginación pequeña o yema en un punto de la superficie de la célula. Durante el crecimiento subsiguiente, el tamaño de la célula permanece más o menos constante, mientras que la yema o blasto-espora aumenta su tamaño hasta formar una nueva célula, que después de algún tiempo se separa de la célula madre (Vázquez *et al.*, 2012).

A partir de las ecuaciones 2.5 y 2.6, se puede determinar el porcentaje de levaduras vivas en relación al número total de células y el porcentaje de células gemantes con respecto al número de vivas respectivamente, mediante el conteo celular en cámara Neubauer a través de observaciones en el microscopio. En el Manual de Técnicas Analíticas para las Destilerías (Vázquez *et al.*, 2012), pueden consultarse las técnicas microbiológicas establecidas para la determinación de los porcentajes de viabilidad celular y de gemación, tanto al inicio como al final de la fermentación.

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{N_v}{N_t} \cdot 100 \quad (2.5)$$

$$\% \text{ Gemación} = \frac{N_g}{N_v} \cdot 100 \quad (2.6)$$

Donde:

Nv: número total de células vivas o viables de levadura (10^6 células/mL).

Ng: número total de células vivas gemantes de levadura (10^6 células/mL).

Nt: número total de células de levadura, siendo $Nt = Nv + Nm$ (10^6 células/mL).

Nm: número total de células muertas de levadura (10^6 células/mL).

2.2 Diseño experimental de las mezclas de sustratos azucarados

Para el estudio fermentativo de las diferentes combinaciones de sustratos azucarados a escala de laboratorio, se realiza un diseño experimental de mezclas del tipo enrejado *simplex* con centroide. Este diseño explora siete puntos experimentales, que corresponden a la preparación de siete medios de cultivos, tres como base y los cuatro restantes son combinaciones de ellos, siendo la fuente de ART la variable de estudio. De manera que, se examinan un número mayor de variantes a utilizar en la dinámica de fermentación, con un menor número de experiencias a partir de los sustratos seleccionados, donde se tiene en cuenta la utilización de hasta un 100 % de los ART aportados por los sustratos.

Para este estudio se prepararon fermentaciones de 500 mL, con tres réplicas para cada alternativa de mezcla, para un tiempo de fermentación de 24 horas. Además, a cada batición se le adicionó 8 g de la levadura seca activa *Ethanol Red*. Los nutrientes añadidos fueron: 2,52 g de sulfato de amonio y 0,52 g de hidrógenofosfato de amonio. Las variables de respuesta seleccionadas fueron: grado alcohólico (ALC), contenido de dióxido de carbono generado (CO_2), rendimiento alcohólico (REND) y eficiencia de la fermentación (EFIC).

Para la evaluación del diseño de experimentos de mezclas se utiliza el programa estadístico *Statgraphics Centurion*, versión 16.2. Además, se determinan los modelos matemáticos para las variables de respuesta establecidas y se realiza una optimización de los resultados experimentales obtenidos, a partir de gráficos de superficie de respuesta.

El diseño de experimentos con mezclas es una clase especial de diseño de superficie de respuesta, donde los factores experimentales son los componentes o ingredientes de las mezclas, por lo cual los niveles de cada factor no son independientes (Dean *et al.*, 2015). Entre los objetivos de un experimento con mezclas se encuentran: determinar cuáles de los ingredientes de la mezcla o interacciones entre ellos tienen mayor influencia sobre una o varias respuestas de interés, modelar

las respuestas de interés en función de las proporciones de los componentes de la mezcla y usar dichos modelos para determinar en qué porcentaje debe participar cada uno de los ingredientes para lograr que la formulación tenga las propiedades deseadas (Gutiérrez y De la Vara, 2012). De ahí que, la variable de respuesta depende de la composición final que alcance la mezcla resultante, dada por el aporte o proporciones relativas de cada uno de los ingredientes que han participado en la mezcla y no de la cantidad absoluta de ellos (Gómez *et al.*, 2016; Montgomery, 2019).

En el sistema triangular de coordenadas (Figura 2.2), se puede visualizar una representación del diseño experimental planificado, donde los tres componentes de las variantes de mezclas se muestran en términos de su proporción con respecto al todo (equivalente a 1). Los vértices del triángulo representan las mezclas puras, conocidas como mezclas de un solo componente. En las mezclas puras, la proporción de un componente es 1 y la de los otros es 0. Los puntos medios a lo largo de los bordes del triángulo representan las combinaciones en las que uno de los componentes está ausente. El punto central o centroide es la mezcla completa en la que todos los componentes están presentes en iguales proporciones.

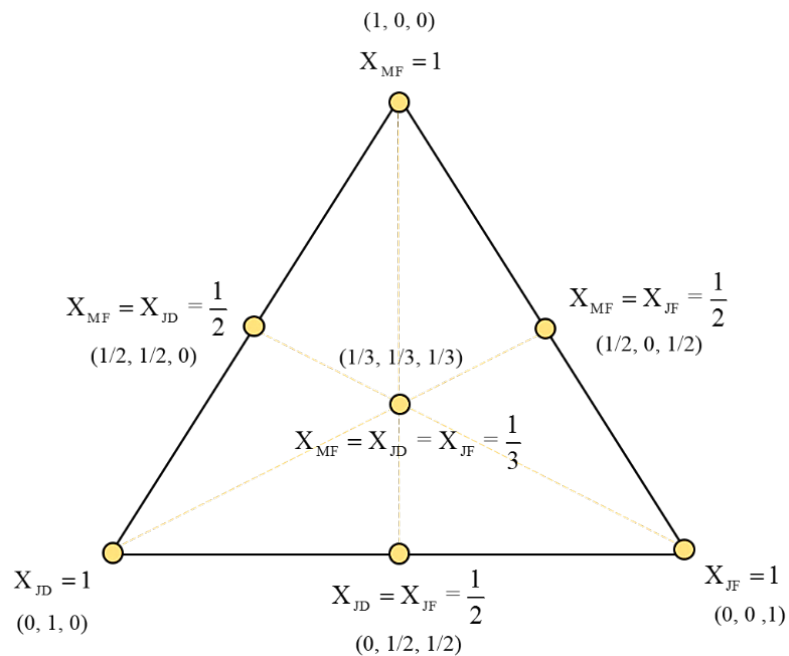


Figura 2.2 Diagrama del diseño de enrejado simplex con centroide

Es preciso señalar que, para el diseño de los puntos medios de los lados del triángulo, cada uno de los sustratos aporta el 50 % de los ART de la masa final y en el punto central del triángulo, se toma el 33,3 % de los ART del aporte de cada sustrato (Figura 2.2). Todos los puntos se ajustaron a una concentración inicial de 120 g/L de ART (16 °Brix, equivalente), siendo esta la concentración óptima para realizar la fermentación según Fabelo (1999). Este tipo de diseño de experimentos resulta ventajoso, pues requiere de un plan experimental mínimo y brinda una información completa. En la tabla 2.2, se muestra la composición másica de azúcares reductores totales aportados por cada componente de la mezcla.

Tabla 2.2 Planificación del diseño experimental

| <i>Puntos</i> | <i>Mezclas</i> | <i>Composición másica de ART</i> | | |
|---------------|----------------|----------------------------------|---------------------------------|--|
| | | <i>Miel final</i> x_{MF} | <i>Jugo diluido</i> x_{JD} | <i>Jugo de los filtros</i> x_{JF} |
| 1 | MF | 1 | 0 | 0 |
| 2 | JD | 0 | 1 | 0 |
| 3 | JF | 0 | 0 | 1 |
| 4 | JD + MF | 0,50 | 0,50 | 0 |
| 5 | JF + MF | 0,50 | 0 | 0,50 |
| 6 | JD + JF | 0 | 0,50 | 0,50 |
| 7 | JD + JF + MF | 0,33 | 0,33 | 0,33 |

El cálculo de los volúmenes de sustratos azucarados a emplear en cada punto del diseño se realizó a través de balances de masa (Tabla 2.3). El primer punto del diseño es con la mezcla tradicional de miel y agua. En los puntos restantes se utiliza para la dilución, el jugo de los filtros y el jugo diluido, con el objetivo de reducir el consumo miel y agua. En el caso de las variantes de mezcla donde se utilizó jugo diluido, fue necesario la adición de miel final para completar la base inicial de azúcares reductores totales requeridos en la mezcla.

Tabla 2.3 Balances de masa en cada punto del diseño experimental

| Puntos | Componentes | Valores | Ecuaciones |
|---------------|--|---------|--|
| 1 | Miel final [MF] (mL) | 325 | $MF + A = B$ (2.7) |
| | ART_{MF} (g/L) | 572,3 | $MF \cdot ART_{MF} = B \cdot ART_B$ (2.8) |
| | Densidad ρ_{MF} (g/mL) | 1,416 | |
| | Miel final [MF _m] (g) | 460,3 | $MF = \frac{B \cdot ART_B}{ART_{MF}}$ (2.9) |
| | Agua [A] (mL) | 1 225 | |
| | Batición [B] (mL) | 1 550 | $MF_m = \rho_{MF} \cdot MF$ (2.10) |
| | ART_B (g/L) | 120 | $A = B - MF$ (2.11) |
| 2 | Jugo diluido [JD] (mL) | 1 298 | |
| | ART_{JD} (g/L) | 32 | $JD + MF = B$ (2.12) |
| | Densidad ρ_{JD} (g/mL) | 1,016 | $JD \cdot ART_{JD} + MF \cdot ART_{MF} = B \cdot ART_B$ (2.13) |
| | Jugo diluido [JD _m] (g) | 1 319,2 | |
| | Miel final (mL) | 252,4 | $MF = \frac{B \cdot ART_B - JD \cdot ART_{JD}}{ART_{MF}}$ (2.14) |
| | Miel final [MF _m] (g) | 358 | |
| | Agua (mL) | 0 | $JD_m = \rho_{JD} \cdot JD$ (2.15) |
| 3 | Batición (mL) | 1 550 | |
| | Jugo de los filtros [JF] (mL) | 1 081 | $JF + A = B$ (2.16) |
| | ART_{JF} (g/L) | 172 | $JF \cdot ART_{JF} = B \cdot ART_B$ (2.17) |
| | Densidad ρ_{JF} (g/mL) | 1,053 | |
| | Jugo de los filtros [JF _m] (g) | 1 139,1 | $JF = \frac{B \cdot ART_B}{ART_{JF}}$ (2.18) |
| | Miel final (mL) | 0 | $JF_m = \rho_{JF} \cdot JF$ (2.19) |
| | Agua (mL) | 469 | $A = B - JF$ (2.20) |
| 4 | Batición (mL) | 1 550 | |
| | Jugo diluido (mL) | 1 298 | $JD + MF = B$ (2.21) |
| | Jugo diluido [JD _m] (g) | 1 319,2 | |
| | Miel final (mL) | 252,4 | $MF = \frac{0,50 \cdot (B \cdot ART_B)}{ART_{MF}}$ (2.22) |
| | Miel final [MF _m] (g) | 357,5 | |
| | Agua (mL) | 0 | $JD = \frac{0,50 \cdot (B \cdot ART_B)}{ART_{JD}}$ (2.23) |
| Batición (mL) | 1 550 | | |

| | | | | |
|-------|--|-------|---|--------|
| | Jugo de los filtros (mL) | 540,7 | $JF + MF + A = B$ | (2.24) |
| | Jugo de los filtros [JF _m] (g) | 569,6 | $JF \cdot ART_{JF} + MF \cdot ART_{MF} = B \cdot ART_B$ | (2.25) |
| 5 | Miel final (mL) | 162,5 | $JF = \frac{0,50 \cdot (B \cdot ART_B)}{ART_{JF}}$ | (2.26) |
| | Miel final [MF _m] (g) | 230 | | |
| | Agua (mL) | 846,8 | $MF = \frac{0,50 \cdot (B \cdot ART_B)}{ART_{MF}}$ | (2.27) |
| | Batición (mL) | 1 550 | $A = B - JF - MF$ | (2.28) |
| <hr/> | | | | |
| | Jugo de los filtros (mL) | 540,7 | $JF + JD + MF + A = B$ | (2.29) |
| | Jugo de los filtros [JF _m] (g) | 569,6 | $JF = \frac{0,50 \cdot (B \cdot ART_B)}{ART_{JF}}$ | (2.30) |
| 6 | Jugo diluido (mL) | 840 | | |
| | Jugo diluido [JD _m] (g) | 853,7 | $JD = \frac{0,50 \cdot (B \cdot ART_B)}{ART_{JD}}$ | (2.31) |
| | Miel final (mL) | 115,5 | | |
| | Miel final [MF _m] (g) | 163,6 | $MF = \frac{B \cdot ART_B - JF \cdot ART_{JF} - JD \cdot ART_{JD}}{ART_{MF}}$ | (2.32) |
| | Agua (mL) | 53,8 | | |
| | Batición (mL) | 1 550 | $A = B - JF - JD - MF$ | (2.33) |
| <hr/> | | | | |
| | Jugo de los filtros (mL) | 360,1 | $JD + JF + MF + A = B$ | (2.34) |
| | Jugo de los filtros [JF _m] (g) | 379,3 | | |
| 7 | Jugo diluido (mL) | 970 | $JD = \frac{0,33 \cdot (B \cdot ART_B)}{ART_{JD}}$ | (2.35) |
| | Jugo diluido [JD _m] (g) | 985,8 | | |
| | Miel final (mL) | 162,5 | $JF = \frac{0,33 \cdot (B \cdot ART_B)}{ART_{JF}}$ | (2.36) |
| | Miel final [MF _m] (g) | 230,2 | | |
| | Agua (mL) | 57,35 | $MF = \frac{0,33 \cdot (B \cdot ART_B)}{ART_{MF}}$ | (2.37) |
| | Batición (mL) | 1 550 | | |

2.3 Procesamiento estadístico de los resultados experimentales

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos en la caracterización de los sustratos y de los parámetros estudiados durante el proceso fermentativo, se empleó el mismo software usado para la planificación experimental (*Statgraphics Centurion*, versión 16.2). A estos valores experimentales se les determinó la media aritmética y algunos estadígrafos de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación), ambos parámetros indican el grado de dispersión o variabilidad de los datos respecto al valor de la media.

Con el propósito de conocer si existen diferencias significativas entre los valores promedios de los resultados experimentales, se realiza un análisis de varianza con la aplicación de la prueba de Fischer. Además, se aplica la prueba de múltiples rangos de Tukey con el objetivo de identificar cuáles son los grupos homogéneos y cuáles son los que presentan diferencias significativas (considerando una tasa de error de 5 %) (Gutiérrez y De la Vara, 2012; Montgomery, 2019).

Una vez obtenidos los valores experimentales del diseño de mezcla, es necesario ajustar un modelo estadístico, sea de primer o mayor grado (lineal, cuadrático o cúbico especial), con la finalidad de investigar el efecto de las composiciones de los componentes de la mezcla sobre la variable de respuesta. Si consideramos el ajuste a partir de un modelo cúbico especial para tres componentes, este está dado por la ecuación 2.38. A partir de este polinomio, es posible obtener los puntos óptimos y las superficies de respuesta correspondiente a cada variable en dependencia de la composición de la mezcla.

$$E(y) = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 \quad (2.38)$$

Donde:

$E(y)$: valor esperado de la variable de respuesta y .

$\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_{123}$: coeficientes lineales de las variables independientes.

x_1, x_2, x_3 : composiciones de los ingredientes de la mezcla, donde se cumple que $0 \leq x_i \leq 1$ y

$x_1 + x_2 + x_3 = 1$.

Para corroborar la validez del modelo obtenido y conocer hasta qué punto el mismo representa fielmente el fenómeno que se estudia, es necesario verificar su calidad de ajuste y el grado de correlación entre las variables. La calidad de ajuste de los modelos matemáticos correspondientes a las variables de respuesta, se determinó mediante la prueba de Fisher y el análisis de los coeficientes de determinación (R^2) y R^2 ajustado. Otro indicador de calidad a tener en cuenta, es el error relativo de predicción del modelo, este se estima por la diferencia entre los resultados obtenidos por el modelo con respecto a los datos de referencia que se utilizan para su determinación. Mediante el estadígrafo de Durbin-Watson, se establece si los errores experimentales no se encuentran correlacionados entre sí para un 95 % de confianza (Montgomery, 2019).

2.4 Cálculo de los ahorros de miel final y agua para cada alternativa

La utilización de los jugos secundarios en la dilución de las mieles con fines fermentativos, además de aportar azúcares a la mezcla, genera significativos ahorros de agua y miel final. Una disminución en los consumos de estas materias primas, incidiría positivamente en la reducción de los costos de producción del proceso. A partir de la ecuación 2.39, se puede determinar el porcentaje de ahorro de miel final (A_{MF}) obtenido en cada variante con respecto a la mezcla tradicional de miel final y agua.

$$A_{MF} = \left(1 - \frac{MF_{exp.}}{MF_{exp.1}} \right) \cdot 100 \quad (2.39)$$

Donde:

$MF_{exp.}$: volumen de miel final utilizado para cada una de las variantes de mezclas (mL).

$MF_{exp.1}$: volumen de miel final utilizado en la alternativa de 100 % de miel final (mL).

Del mismo modo, se procede en el cálculo del porcentaje de ahorro de agua (A_{agua}) obtenido en cada variante de mezcla:

$$A_{agua} = \left(1 - \frac{A_{exp.}}{A_{MF}} \right) \cdot 100 \quad (2.40)$$

Donde:

$A_{exp.}$: volumen de agua utilizado para cada una de las variantes de mezclas (mL).

A_{MF} : volumen de agua utilizado en la alternativa de 100 % de miel final (mL).

2.4.1 Cálculo de los beneficios económicos obtenidos con las alternativas de mezclas

La UEB Derivados Destilería Jesús Rabí, tiene una capacidad de producción de etanol de 500 hL/d. Actualmente, esta industria emplea miel final como materia prima, proveniente del central azucarero anexo, que utiliza un esquema de producción de tres masas cocidas con doble semilla. Para el cálculo de los ingresos económicos por concepto de utilización de las diferentes variantes de mezclas analizadas en los epígrafes anteriores, se estudiaron dos alternativas con el objetivo de determinar los ingresos brutos generados. Para ello, se tuvo en cuenta que en la destilería se procesan diariamente 6 fermentadores con un volumen de batición total de 7 740 hL y que las columnas de destilación operan con un 95 % de eficiencia. Además, para la realización de estos cálculos se considera que la destilería trabaja durante los 140 días que muele anualmente como

promedio el central azucarero, con la finalidad de tener un suministro estable del resto de las materias primas (jugo diluido y jugo de los filtros).

Alternativa 1. Se basa en los ingresos económicos brutos generados por las ventas del etanol producido con cada variante de mezcla y por la comercialización de la sobreproducción del etanol obtenido a partir de la miel final sustituida por jugos secundarios, por concepto de ahorro de MF. Para ello, se emplea la ecuación 2.41.

$$I_{A1} = I_{alc.} + I_{alc. \text{ con MF sustituida}} \quad (2.41)$$

Donde:

I_{A1} : ingresos económicos brutos obtenidos con la alternativa 1 (CUP/a).

$I_{alc.}$: ingresos económicos brutos generados por las ventas del etanol producido a partir de cada variante de mezcla (CUP/a).

$I_{alc. \text{ con MF sustituida}}$: ingresos económicos brutos generados por las ventas de la sobreproducción de etanol obtenida a partir de la miel final sustituida, por concepto de ahorro (CUP/a).

$$I_{alc.} = V_{batición} \cdot \% Alc_{batición} \cdot \% Efic_{destilación} \cdot pup_{alcohol} \cdot T_{operación} \quad (2.42)$$

$$I_{alc. \text{ con MF sustituida}} = V_{batición} \cdot \% Alc_{MF} \cdot \% Efic_{destilación} \cdot A_{MF} \cdot pup_{alcohol} \cdot T_{operación} \quad (2.43)$$

Donde:

$V_{batición}$: volumen de batición a destilar diariamente (hL/d).

$\% Alc_{batición}$: grado alcohólico de la batición correspondiente a cada variante de mezcla (%).

$\% Alc_{MF}$: grado alcohólico de la batición correspondiente a la variante compuesta solamente por miel final (%).

$\% Efic_{destilación}$: eficiencia de las columnas de destilación (%).

A_{MF} : porcentaje de ahorro de miel final obtenido en cada variante con respecto a la mezcla tradicional de miel final y agua (%).

$T_{operación}$: cantidad de días que operaría anualmente la destilería (d).

Se considera que el alcohol producido se comercializa como alcohol flema a un precio unitario ($pup_{alcohol}$) de 263,2 CUP/hL (AZCUBA, 2020a) y que para producir un hectolitro de alcohol se necesitan 390 kg de miel final (Cuellar *et al.*, 2012).

Alternativa 2. Se basa en los ingresos económicos brutos generados por las ventas del etanol obtenido con cada variante de mezcla y por la comercialización de alimento animal Miel-Urea-Bagacillo (MUB), producido a partir de la miel final sustituida por jugos secundarios, por concepto de ahorro de MF. Para ello, se emplea la ecuación 2.44.

$$I_{A2} = I_{alc.} + I_{MUB \text{ con MF sustituida}} \quad (2.44)$$

Donde:

I_{A2} : ingresos económicos brutos obtenidos con la alternativa 2 (CUP/a).

$I_{MUB \text{ con MF sustituida}}$: ingresos económicos brutos generados por las ventas de alimento animal Miel-Urea-Bagacillo, producido a partir de la miel final sustituida por jugos secundarios (CUP/a).

Se considera que para producir una tonelada de MUB se necesitan 0,15 toneladas de miel final (Cuellar *et al.*, 2012) y que el precio unitario (pup_{MUB}) de la MUB es de 120 CUP/t (AZCUBA, 2020b).

$$I_{MUB \text{ con MF sustituida}} = \frac{(390 \text{ kg}_{MF} / 1 \text{ hL}_{ALC}) \cdot V_{batición} \cdot \% Alc_{MF} \cdot \% Efic_{destilación} \cdot A_{MF}}{1000 \cdot 0,15 \text{ t}} \cdot pup_{MUB} \cdot T_{operación} \quad (2.45)$$

En resumen, para calcular los ingresos generados con las alternativas propuestas, se tuvieron en cuenta los siguientes indicadores: volumen de batición a destilar (hL), grado alcohólico de la batición (%), eficiencia en la destilación (%), índices de consumo de miel final (kg/hL), cantidad de días de trabajo de la industria, porcentajes de ahorro de miel final y los precios unitarios de los productos a comercializar.

CAPÍTULO 3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

En este capítulo se analizan los resultados de la aplicación de la metodología de trabajo descrita en el capítulo 2, con el propósito de darle cumplimiento a los objetivos propuestos en la investigación. Primeramente, se exponen los resultados referidos a la caracterización físico-química de los sustratos fermentativos. Luego, se explican los resultados relacionados con el estudio del comportamiento de los principales parámetros del proceso de fermentación alcohólica. También, se determina la composición y calidad del etanol producido. Se muestran los modelos matemáticos obtenidos para las variables de respuesta analizadas, así como su optimización. Finalmente, se presenta una valoración económica de los beneficios obtenidos con las alternativas de mezclas estudiadas.

3.1 Caracterización físico-química de los sustratos fermentativos

La miel final o melaza es un líquido viscoso de color oscuro que posee gran valor como materia prima en la industria fermentativa. En la tabla 3.1, se muestran los resultados obtenidos en la caracterización de la miel final empleada como sustrato en la fermentación alcohólica. La gran mayoría de los parámetros analizados exhiben valores pequeños de desviación estándar (S). También, se aprecia que el 55 % de las variables presentan un coeficiente de variación (CV) inferior al 4 % y el resto muestra valores entre 4 y 8 %, lo que indica la existencia de poca dispersión o variabilidad en los datos respecto al valor de la media aritmética y demuestra confiabilidad en las mediciones efectuadas (Anexo 4, Tabla 4.1). Si se realiza un análisis comparativo entre los valores promedios obtenidos y los intervalos establecidos en las normas de calidad planteadas por varios autores, se puede observar que en más de la mitad de los casos se cumple con los valores normados para este producto, con excepción de 9 de los 22 parámetros estudiados.

Los azúcares reductores totales constituyen los compuestos básicos sobre los cuales se llevan a cabo los procesos fermentativos. Por esta razón, su determinación es de suma importancia para la producción alcoholera y constituye un requisito necesario a la hora de determinar la calidad de cualquier materia prima para esta industria. En la caracterización realizada, se observa que el contenido de ART en la miel final (57,23 %), cumple con lo expuesto en la norma NC 715: 2009, que fija como requisito de calidad, un valor mínimo de 52 %. Las mieles finales cubanas contienen de 60 a 65 % de ART y mientras mayor sea la presencia de estos azúcares invertidos (glucosa y fructosa), se obtendrán mayores rendimientos alcohólicos en la fermentación (Almazán, Cabello, *et al.*, 2016; Saura *et al.*, 2019).

Tabla 3.1 Características físico-químicas de la miel final utilizada en la fermentación

| Parámetros | Miel final (MF) | | | Normas de calidad | |
|--|-----------------|-------|--------|-------------------|------------------------------|
| | Media | S | CV (%) | Valores | Referencia |
| Sólidos areométricos disueltos (°Brix) | 82,24 | 1,36 | 1,65 | 85 (mín.) | NC 715: 2009 |
| Sacarosa [Pol] (%) | 28,45 | 1,21 | 4,24 | 30 - 40 | Otero (1997) |
| Pureza (%) | 34,59 | 1,34 | 3,86 | 33 - 46 | Biart <i>et al.</i> (1982) |
| Azúcares reductores totales (%) | 57,23 | 1,35 | 2,36 | 52 (mín.) | NC 715: 2009 |
| Azúcares reductores libres (%) | 22,39 | 0,97 | 4,35 | 15 - 20 | M. Díaz <i>et al.</i> (2019) |
| Azúcares reductores infermentables (%) | 4,78 | 0,06 | 1,28 | 4,5 (máx.) | Almazán <i>et al.</i> (2016) |
| Azúcares fermentables (%) | 52,45 | 1,40 | 2,67 | 48,2 (mín.) | NC 715: 2009 |
| Concentración de almidón (mg/L) | 610,4 | 44,43 | 7,28 | 249 - 465 | Jimenez (2017) |
| pH | 5,36 | 0,12 | 2,31 | 5,2 - 5,7 | NC 715: 2009 |
| Acidez total | 0,62 | 0,02 | 3,04 | 0,30 - 1,35 | Biart <i>et al.</i> (1982) |
| Capacidad buffer | 79,80 | 2,56 | 3,21 | 35,5 - 108,2 | Biart <i>et al.</i> (1982) |
| Cenizas (%) | 7,10 | 0,30 | 4,18 | 12 (máx.) | NC 715: 2009 |
| Lodos (%) | 4,20 | 0,18 | 4,35 | 8 (máx.) | NC 715: 2009 |
| Materia seca gravimétrica (%) | 77,48 | 2,45 | 3,16 | 70,5 - 91,3 | Biart <i>et al.</i> (1982) |
| Coloides (%) | 8,72 | 0,41 | 4,66 | 8 (máx.) | Almazán <i>et al.</i> (2016) |
| Nitrógeno total (%) | 0,28 | 0,02 | 6,52 | 0,45 (mín.) | Almazán <i>et al.</i> (1982) |
| Fósforo total [P ₂ O ₅] (%) | 0,17 | 0,01 | 8,01 | 0,08 (mín.) | Almazán <i>et al.</i> (1982) |
| Proteína bruta (%) | 1,75 | 0,11 | 6,52 | 3 - 4 | M. Díaz <i>et al.</i> (2019) |
| Magnesio [MgO] (%) | 0,33 | 0,02 | 5,59 | 0,30 (máx.) | Almazán <i>et al.</i> (2016) |
| Calcio [CaO] (%) | 0,64 | 0,02 | 3,42 | 1,20 (máx.) | Almazán <i>et al.</i> (2016) |
| Densidad [30°C] (g/mL) | 1,416 | 0,01 | 0,68 | 1,38 - 1,42 | Otero (1997) |
| Viscosidad [60°C] (mPa·s) | 1 625 | 18,25 | 1,12 | 5 000 (máx.) | Rein (2017) |

S: Desviación estándar CV: Coeficiente de variación

La miel final está constituida por 4,78 % de azúcares reductores infermentables (Tabla 3.1), valor ligeramente superior al intervalo fijado por autores como Otero (1997) y Gálvez (2019) [2 a 4 %], así como por Almazán, Cabello, *et al.* (2016) [4,5 % máx.]. Los azúcares infermentables son compuestos que se producen durante el proceso de fabricación de azúcar, son generalmente no cristalizables y, por lo tanto, pasan a las mieles finales. Poseen en su estructura grupos aldehídos o cetónicos que reaccionan ante el cobre y desarrollan color de forma similar a los azúcares simples y disacáridos. Dentro de estos compuestos, destacan inhibidores del crecimiento microbiano como el furfural y el 5-hidroximetil-furfural, de ahí la importancia de su determinación para evaluar la capacidad fermentativa de las melazas (Almazán, Cabello, *et al.*, 2016; Biart *et al.*, 1982).

El pH tiene un marcado efecto sobre el crecimiento óptimo de la biomasa y el rendimiento de la fermentación. La norma de calidad NC 715: 2009, refiere que el pH debe comportarse entre 5,2 y 5,7, por lo que la melaza objeto de análisis cumple con este indicador (Tabla 3.1). Otero (1997), considera que la capacidad buffer que poseen las mieles finales de caña, ejercen cierta resistencia amortiguadora a los cambios bruscos de pH en determinadas zonas de acidez. Entre las sustancias que tienden a estabilizar el pH, se encuentran los ácidos orgánicos, las bases débiles y sus sales, los ácidos carboxílicos y los aminoácidos. Su efecto amortiguador sobre el pH es directamente proporcional a su concentración. La capacidad buffer de la melaza analizada es de 79,80 unidades, valor que se encuentra dentro del rango establecido por Biart *et al.* (1982) en sus estudios sobre las mieles finales cubanas y acorde con lo reportado en la literatura (Rein, 2017; Saura *et al.*, 2019).

Los lodos son los sólidos suspendidos presentes en las mieles finales y que sedimentan fácilmente por centrifugación. La formación de lodos, es una evidencia de la ocurrencia de la reacción de Maillard (reacción de oscurecimiento no enzimático), que en su estado final conduce a reacciones de polimerización con la formación de melanoidinas insolubles, que constituyen una parte de los coloides presentes en las melazas (Otero, 1997). La miel final presenta un valor promedio de 4,20 % de lodos, por lo que cumple con lo señalado en la norma NC 715: 2009, que establece un máximo de 8 %.

Según Otero (1997), la cantidad de coloides en peso presente en las mieles finales, oscila entre 6 y 10 %. Sin embargo, Almazán, Cabello, *et al.* (2016) considera que su valor máximo admisible debe ser de 8 %, por lo que la miel analizada (8,72 %) incumple con lo referido por dicho autor. Los coloides son sistemas dispersos, cuyo grado de dispersión puede variar entre 0,1 y 0,001 micras. Están formados por polímeros y ácidos grasos de cadena larga, sustancias gomosas y de naturaleza peptídica. En los procesos fermentativos, algunos de los componentes de los coloides son altamente inhibidores del crecimiento microbiano, incluyendo las melanoidinas. Por otra parte, pudieran afectar la transferencia de oxígeno y de masa en las células de levadura, debido a la formación de una barrera sobre la superficie de las mismas (Biart *et al.*, 1982; Otero *et al.*, 2009).

Los no azúcares inorgánicos forman parte de la composición de las cenizas, que en las mieles finales cubanas promedian un 9,57 %. Entre las cenizas solubles se encuentran los carbonatos, cloruros y sulfatos de los metales alcalinos, y la parte insoluble está compuesta principalmente por sales de calcio (Biart *et al.*, 1982; Gálvez, 2019). Las muestras de miel estudiadas contienen un 7,10 % de

cenizas como valor promedio, inferior a lo referido en la norma de calidad NC 715: 2009, que establece un máximo de 12 %, lo que resulta favorable para el proceso fermentativo.

Tabla 3.2 Características físico-químicas de los jugos secundarios utilizados en la fermentación

| <i>Parámetros</i> | <i>Jugo diluido (JD)</i> | | | <i>Jugo de los filtros (JF)</i> | | |
|--|--------------------------|----------|---------------|---------------------------------|----------|---------------|
| | <i>Media</i> | <i>S</i> | <i>CV (%)</i> | <i>Media</i> | <i>S</i> | <i>CV (%)</i> |
| Sólidos refractométricos disueltos (°Brix) | 5,18 | 0,56 | 10,80 | 13,46 | 0,71 | 5,25 |
| Sólidos totales (%) | 8,24 | 0,51 | 6,14 | 24,08 | 0,82 | 3,40 |
| Sacarosa [Pol] (%) | 2,71 | 0,24 | 8,66 | 11,26 | 0,69 | 6,14 |
| Pureza (%) | 52,56 | 3,21 | 6,11 | 83,68 | 3,77 | 4,51 |
| Azúcares reductores totales (%) | 3,20 | 0,25 | 7,74 | 17,20 | 0,51 | 2,98 |
| Concentración de almidón (mg/L) | 644,7 | 75,59 | 11,73 | 1 654 | 198 | 11,97 |
| Concentración de dextrana (mg/L) | 0 | – | – | 0 | – | – |
| pH | 5,60 | 0,06 | 1,13 | 5,81 | 0,06 | 0,97 |
| Acidez total | 0,018 | 0,00 | 6,69 | 0,025 | 0,002 | 6,94 |
| Capacidad buffer | 1,39 | 0,04 | 2,65 | 1,52 | 0,02 | 1,50 |
| Color ICUMSA (UI _{7.0}) | 15 211 | 1 605 | 10,55 | 18 074 | 1 293 | 7,16 |
| Turbiedad (UA) | 0,28 | 0,02 | 5,76 | 0,34 | 0,02 | 5,96 |
| Cenizas conductimétricas (%) | 0,17 | 0,01 | 8,74 | 0,72 | 0,02 | 3,13 |
| Sólidos insolubles (%) | 3,62 | 0,42 | 11,57 | 8,11 | 0,97 | 11,91 |
| Gomas acuosolubles (mL) | 4,50 | 0,53 | 11,71 | 15,10 | 1,20 | 7,93 |
| Ceras (%) | 0,77 | 0,08 | 9,79 | 1,53 | 0,16 | 10,13 |
| Bagacillo (%) | 0,18 | 0,02 | 10,02 | 0,07 | 0,01 | 11,88 |
| Concentración de fosfato [P ₂ O ₅] (mg/L) | 134,4 | 9,57 | 7,12 | 206,9 | 19,96 | 9,65 |
| Magnesio [MgO] (%) | 0,32 | 0,02 | 6,26 | 0,57 | 0,01 | 1,90 |
| Calcio [CaO] (%) | 0,21 | 0,01 | 5,30 | 0,43 | 0,01 | 2,41 |
| Densidad [30°C] (g/mL) | 1,016 | 0,003 | 0,32 | 1,053 | 0,01 | 0,43 |
| Viscosidad [30°C] (mPa·s) | 0,93 | 0,06 | 6,29 | 1,421 | 0,08 | 5,24 |

S: Desviación estándar CV: Coeficiente de variación

En la tabla 3.2, se muestran los resultados alcanzados en la caracterización físico-química de los jugos secundarios (jugo diluido y jugo de los filtros de cachaza) utilizados también como sustratos fermentativos. La gran mayoría de los parámetros estudiados presentan valores pequeños de desviación estándar. Además, se aprecia que el 41 % de las variables exhiben un coeficiente de variación de 4 a 8 % y el resto muestra valores inferiores a 12 %, lo que demuestra la existencia de

poca dispersión en los datos respecto al valor de la media aritmética. En las tablas 4.2 y 4.3 del anexo 4, se pueden observar los valores obtenidos en cada parámetro durante una decena de días para ambos jugos.

Estévez (2005), considera que a diferencia de los jugos para la producción de azúcar, propiedades tales como alto contenido de sacarosa (Pol), elevada pureza, bajo contenido de azúcares reductores libres, gran brillantez y transparencia, bajo color y pH neutro, deseables para la cristalización de azúcar, carecen de relevancia para la producción de alcohol. De ahí que, solo se requiere un alto contenido de azúcares reductores totales, el pH ácido, bajo contenido de sólidos sedimentables y en suspensión, la ausencia de inhibidores biológicos y de contaminación bacteriana. Estas razones hacen que los tratamientos de purificación clásicos para jugos de caña, sólidamente establecidos en la industria azucarera como la alcalización, sulfitación y carbonatación, son incompetentes para su aplicación directa a jugos destinados para la fermentación y producción de alcohol. Es por ello que, los jugos deben ser tratados previamente con equipos industriales de separación como: coladores, hidrociclones, tanques de floculación, clarificadores y mediante operaciones de calentamiento y enfriamiento para la eliminación de los microorganismos y las impurezas presentes en los jugos.

Tabla 3.3 Especificaciones de calidad de los jugos de caña para su utilización en la fermentación

| <i>Parámetros de calidad</i> | <i>Valores</i> |
|--|--------------------------|
| Azúcares reductores totales (ART) | 10 % (mín.) |
| pH | 5,5 - 5,9 |
| Acidez total | 0,05 % (máx.) |
| Sólidos sedimentables (por centrifugación) | Ausencia |
| Sólidos suspendidos (por filtración) | Ausencia |
| Hongos filamentosos (en placa) | Ausencia |
| Levaduras viables (en placa) | Ausencia |
| Bacterias totales viables (en placa) | < 10 ² UFC/mL |

Fuente: Estévez (2005).

En la tabla 3.3, se pueden apreciar algunas de las especificaciones mínimas requeridas para considerar a los jugos de caña, previamente tratados, con la calidad adecuada para su uso en la fermentación alcohólica. Existen otras determinaciones analíticas que también resultan valiosas, pero no son consideradas como análisis de rutina durante la producción, sino como análisis especiales, entre ellas se encuentran la cuantificación del contenido de nitrógeno, fósforo, azufre, potasio,

magnesio, calcio, vitaminas (biotina) y coloides (almidón, dextrana, ceras, gomas acuosolubles, etc.) (Estévez, 2005).

Para el parámetro de azúcares reductores totales, se observaron valores del orden de 3,20 % y 17,20 % en los jugos diluido y de los filtros respectivamente (Tabla 3.2), lo que permite inferir que el porcentaje restante de Brix se debe a la presencia de aminoácidos, proteínas, ácidos totales, no azúcares fermentables y otras biomoléculas. Para el caso del jugo diluido, se verificó un valor inferior al 10 % de ART recomendado como mínimo por Estévez (2005), debido a que este jugo está constituido fundamentalmente por agua y sólidos insolubles, como resultado del proceso de imbibición durante la etapa de molienda de la caña. Los valores de ART obtenidos, fueron similares a los reportados en la literatura por autores como Otero *et al.* (2009), García *et al.* (2015), Ribeiro *et al.* (2017) y Cortés *et al.* (2021). Además, Steindl (2010), afirma que los jugos de caña de azúcar presentan entre 13 y 14 % de ART en su constitución.

En la tabla 3.2, se puede observar como los valores de pH y acidez para ambos jugos, oscilan en el rango establecido por Estévez (2005) (Tabla 3.3). El pH es un factor de alta influencia sobre la eficiencia de la fermentación alcohólica. La acidez total constituye un índice confiable para determinar la frescura y calidad de los jugos. Para la levadura son perjudiciales los valores neutros y alcalinos, así como los de acidez extrema. Como la propia actividad fermentativa tiende a incrementar la concentración de iones hidrógeno, un pH del jugo entre 5,5 y 5,9 es adecuado, pues durante el curso de la fermentación el mismo disminuye hasta valores apropiados para el crecimiento de la levadura (pH: 4,5 a 4,7) (Nitayavardhana y Khanal, 2017).

En la investigación, se utilizaron jugos secundarios con un contenido de sólidos insolubles inferior al 9 % (Tabla 3.2), valor superior a lo planteado por Rein (2017) para el caso del jugo de los filtros (4 a 6 %). Por tal motivo, estos jugos fueron sometidos a operaciones de calentamiento, filtración, floculación y sedimentación, antes de ser empleados como sustratos de la fermentación alcohólica. Autores como Almazán, Casanova, *et al.* (2016) y Estévez (2005), consideran que los sólidos insolubles carecen de una acción fisiológica directa sobre las levaduras, pero indirectamente inciden fuertemente sobre el proceso fermentativo al constituirse en soportes para microorganismos contaminantes, barreras a la transferencia de calor, así como origen de incrustaciones, abrasiones, deposiciones, tupiciones y demás efectos mecánicos sobre la maquinaria del proceso. La presencia de fibras, bagacillo, arena, arcilla, tierra u otros materiales extraños en los jugos, es un aspecto

negativo de la mayor significación práctica. Por lo que, se requiere la mayor remoción posible de sólidos insolubles, tanto de los fibrosos como de los granulares o pulverulentos (González *et al.*, 2009).

La existencia de un alto contenido de coloides en los jugos, provoca la formación de espumas durante la fermentación y obstaculiza el transporte a través de la pared y membrana celulares de la levadura (Estévez, 2005). En la tabla 3.2, se puede percibir como existe una mayor presencia de coloides (gomas acuosolubles, ceras y almidones) en el jugo de los filtros respecto al jugo diluido. De ahí la importancia que posee el tratamiento de estos jugos antes de ser fermentados, con la finalidad de que no haya presencia de sólidos suspendidos y sedimentables.

La contaminación microbiana, no solo es nociva para la eficiencia fermentativa, debido a la competencia que ejercen las bacterias y levaduras salvajes sobre la utilización de los azúcares, sino también por el incremento, producto del desecho metabólico, de ciertas sustancias que poseen un fuerte efecto de inhibición sobre la viabilidad de la levadura, como son los ácidos orgánicos volátiles, láctico, acético, propiónico y butírico (Bonatelli *et al.*, 2019; Estévez, 2005; Mendonça *et al.*, 2020). Además, este efecto inhibitorio provoca la ralentización de la fermentación y el no agotamiento de todos los azúcares disponibles. De ahí que, resulta de gran importancia evitar la presencia en los jugos de bacterias que propicien la fermentación dextránica, butírica y levánica, además de la láctica, heteroláctica y acética (Brexó y Sant'Ana, 2017; Díaz *et al.*, 2020). Es significativo destacar, que en ambos jugos no hay presencia de dextrana, lo que evidencia que no existe crecimiento de bacterias indeseables tales como el *Leuconostoc mesenteroides*.

Partiendo de que los resultados de la caracterización de los sustratos son aceptables, de acuerdo a las normas establecidas para cada uno de ellos, se puede concluir que los mismos se encuentran con calidad y tienen potencialidades para ser utilizados en la fermentación alcohólica. Además, la extracción de estas corrientes intermedias del proceso azucarero (jugos diluido y de los filtros) con fines fermentativos, conducirían a una mayor eficiencia en la etapa de purificación, obteniéndose un azúcar de mayor calidad, así como la disminución significativa del consumo de vapor y el incremento de la disponibilidad de bagazo sobrante para la generación de energía renovable. También, favorecería el incremento de la capacidad de molienda del central azucarero y se evitaría la recirculación al proceso de un material con altos contenidos de azúcares reductores, coloides, sólidos insolubles y demás impurezas que perjudican la calidad del azúcar y el agotamiento de las mieles.

3.2 Análisis de los resultados de la dinámica de fermentación

Como resultados del diseño de experimentos y de la dinámica de fermentación para cada corrida experimental, corresponde analizar las variables más significativas que influyen en la producción de etanol. Es por ello que, se controló el comportamiento del pH y la concentración de sólidos solubles (Brix) cada 3 horas, el contenido de azúcares reductores totales al inicio y al final de la fermentación, así como los porcentajes de viabilidad celular y gemación obtenidos en las baticiones fermentadas (Anexo 5). Además, se determinó el grado alcohólico, el contenido de dióxido de carbono generado, el rendimiento y la eficiencia fermentativa correspondiente a cada alternativa de mezcla (Anexo 6).

3.2.1 Comportamiento del pH

La figura 3.1, muestra el comportamiento del pH durante todo el proceso fermentativo. Se puede apreciar como este parámetro presenta una tendencia a la disminución en las alternativas analizadas, cuyos valores descienden desde 4,5 hasta 4,3, excepto la variante de jugo filtrado (JF) que decrece hasta 4,1. Según Sablayrolles (2019), durante la fermentación, además de la producción de etanol y CO₂, se generan otros subproductos como el glicerol y ácidos orgánicos débiles como los ácidos succínico y acético, que pueden disminuir el pH del medio de cultivo. El pH puede limitar la tasa de crecimiento de las levaduras al alterar la actividad enzimática, la permeabilidad celular y la disponibilidad de iones metálicos (Nitayavardhana y Khanal, 2017). Por tal motivo, se hace necesario el control del mismo para evitar la formación de subproductos y afectaciones en la viabilidad de la levadura.

Los valores obtenidos de pH, infieren que durante la fermentación existió una mayor producción de ácidos orgánicos en las variantes de jugo diluido (JD) y jugo filtrado (JF), en comparación con la alternativa compuesta por melaza (MF) (Figura 3.1). Este comportamiento puede deberse a condiciones estresantes que afronta la levadura en el medio de fermentación, que estimulan al microorganismo a producir ácidos como una forma de regular sus actividades metabólicas, así como para eliminar microorganismos del medio (Alcantara *et al.*, 2020). Según Basso *et al.* (2011), el azúcar metabolizado por la *Saccharomyces cerevisiae* se dirige a la producción de ATP, biomasa, CO₂, ácidos orgánicos, etanol y otros compuestos en menor cuantía. Siempre por la vía metabólica, parte del carbohidrato absorbido se utiliza en la regeneración de la coenzima NAD. Sin embargo, en condiciones desfavorables del medio, existe una estimulación de la levadura a producir un mayor

contenido de glicerol para mantener sus actividades celulares. La utilización de azúcares fermentables para la producción de glicerol, resulta directamente en la disminución de la cantidad de etanol producido (G. Costa *et al.*, 2018).

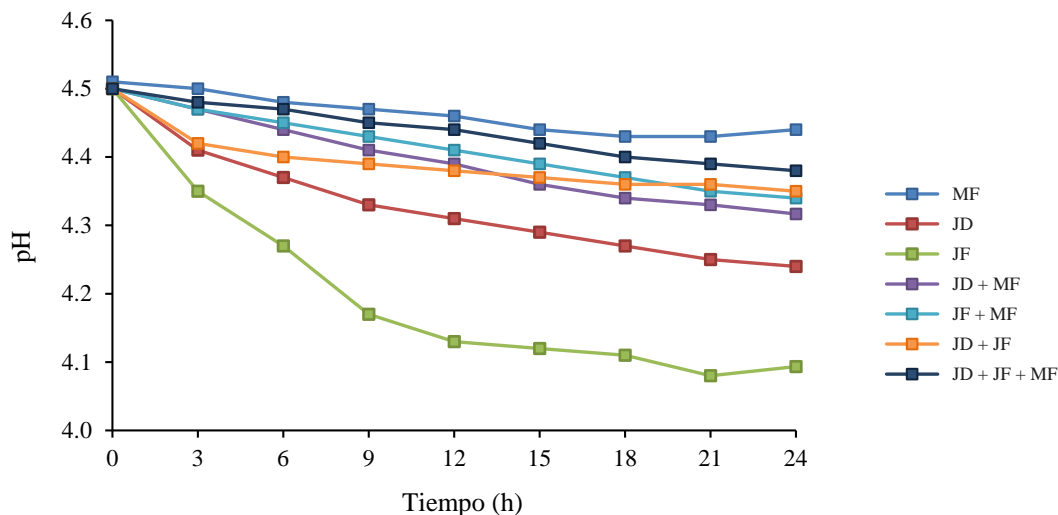


Figura 3.1 Comportamiento del pH durante la fermentación de cada alternativa de mezcla

Aunque se observó una reducción del pH en los medios de cultivo, este parámetro se comportó de forma similar a lo reportado en la literatura por autores que trabajaron con fermentaciones de melaza y jugos de caña de azúcar (De la Cruz *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2017). Según Nitayavardhana y Khanal (2017), las cepas de *S. cerevisiae* que crecen en medios ácidos, a valores de pH entre 4 y 5, no tienen un efecto significativo sobre el rendimiento de etanol durante la fermentación, pero se ha observado un mayor tiempo de fermentación cuando esta se efectúa a un pH más bajo. Así como, a pH superiores a 5 puede disminuir el rendimiento alcohólico. Se puede concluir que, con los valores de pH obtenidos experimentalmente, la levadura empleada en la investigación, desarrolla mejor y eficientemente el proceso de bioconversión de azúcares reductores (glucosa y fructosa) en etanol.

3.2.2 Comportamiento de la concentración de sólidos solubles y los ART

Otro de los parámetros controlados durante el proceso fermentativo fue el comportamiento de la concentración de sólidos solubles (Brix). En la figura 3.2, se puede observar como en todas las alternativas, existe una disminución de la concentración de sólidos solubles con el tiempo, cuyos valores descienden desde 16 hasta 2 °Brix para la variante de jugo filtrado, lo que evidencia el consumo de sustratos por parte de la *Saccharomyces cerevisiae*, principalmente los azúcares fermentables presentes en el medio de fermentación (Martínez *et al.*, 2013; Mesa *et al.*, 2006).

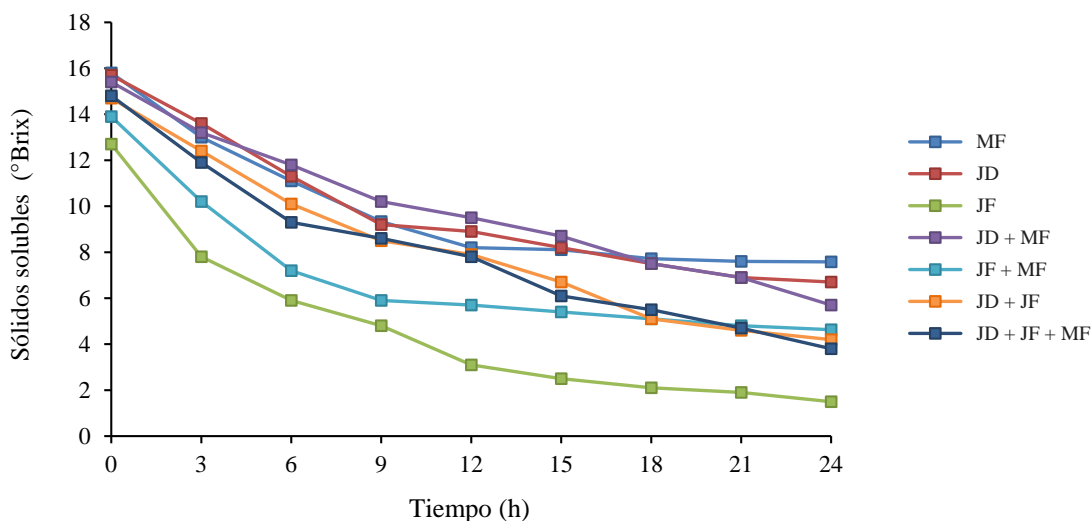


Figura 3.2 Comportamiento del Brix durante la fermentación de cada alternativa de mezcla

Durante las primeras 12 horas de fermentación, existe un decrecimiento de la concentración de sólidos solubles superior al 45 % (Figura 3.2). Si comparamos la alternativa compuesta por 100 % de ART aportados por la miel final con el resto de los tratamientos, vemos que son similares e incluso en las variantes donde se utiliza el jugo de los filtros se obtienen valores inferiores, lo que denota las ventajas de este sustrato por ser más rico en compuestos carbonados simples con una mejor asimilación por la levadura. Este comportamiento demuestra que el jugo de los filtros es una corriente que presenta una calidad adecuada para los procesos fermentativos. La variación de los sólidos solubles en los mostos fermentados, se comportó de forma semejante a los resultados alcanzados industrialmente y a lo reportado en estudios realizados con iguales sustratos azucarados por autores como Fabelo (1999), Torres (2005) y Otero *et al.* (2010).

Con el propósito de determinar si existen diferencias significativas entre los valores promedios obtenidos, tanto para el Brix como para los azúcares reductores totales residuales (ART_R) en los siete mostos fermentados, se realiza un análisis de varianza y la prueba de múltiples rangos de Tukey, cuyos resultados se exponen en los anexos 7 y 8 respectivamente. Se pudo comprobar mediante la prueba de Fisher (Prueba-F) que existen para ambos parámetros analizados, diferencias estadísticamente significativas entre las medias con un nivel de confianza del 95 %, debido a que el valor de la probabilidad (Valor-P) es menor que el nivel de significancia ($\alpha = 0,05$). Como se aprecia en la figura 3.3, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes según la prueba de Tukey. Para el caso de los ART_R , 19 de los 21 pares de medias difieren

significativamente (Anexo 8). Se puede apreciar la considerable reducción que tienen los ART, debido al consumo de estos durante el proceso fermentativo y su transformación en etanol, lo cual coincide con resultados alcanzados tradicionalmente con estas materias primas (Bello *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2021; García *et al.*, 2015). Los tratamientos MF y JD tuvieron un alto contenido residual de ART. La alternativa compuesta por jugo filtrado (JF) se diferencia del resto en más de un 80 % en el consumo de azúcares invertidos durante la fermentación, siendo este tratamiento el de menor cantidad de ART_R observado (0,22 %). Esta diferencia se debe a que cuando se utiliza melaza en grandes proporciones, es posible verificar la presencia de azúcares infermentables posterior a la fermentación (Oliveira *et al.*, 2019).

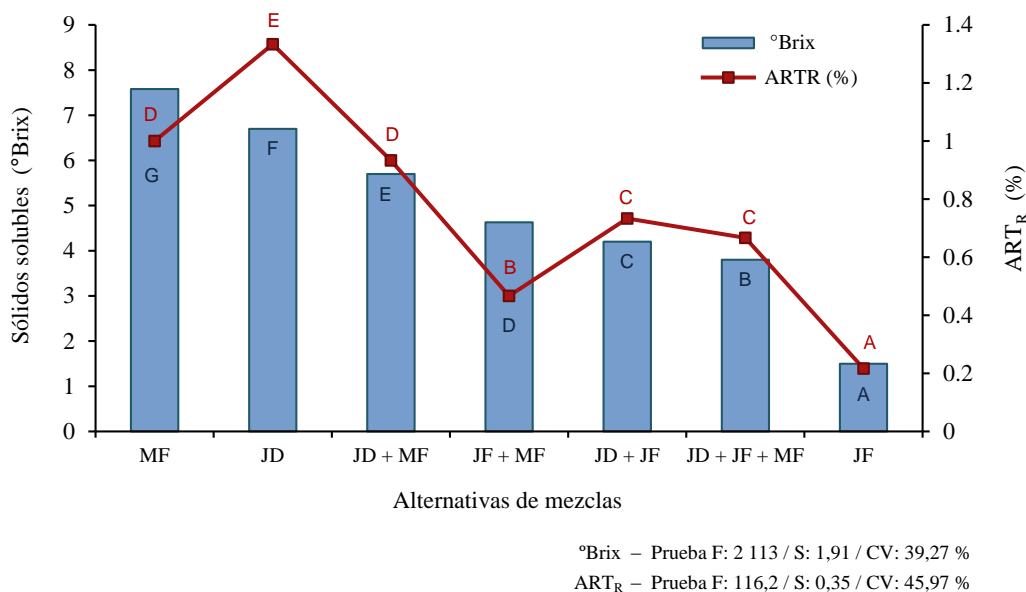


Figura 3.3 Valores promedios de Brix y ART_R obtenidos en los mostos fermentados de cada alternativa de mezcla. Las letras comparan las diferencias existentes entre las medias según la prueba de Tukey (5 %)

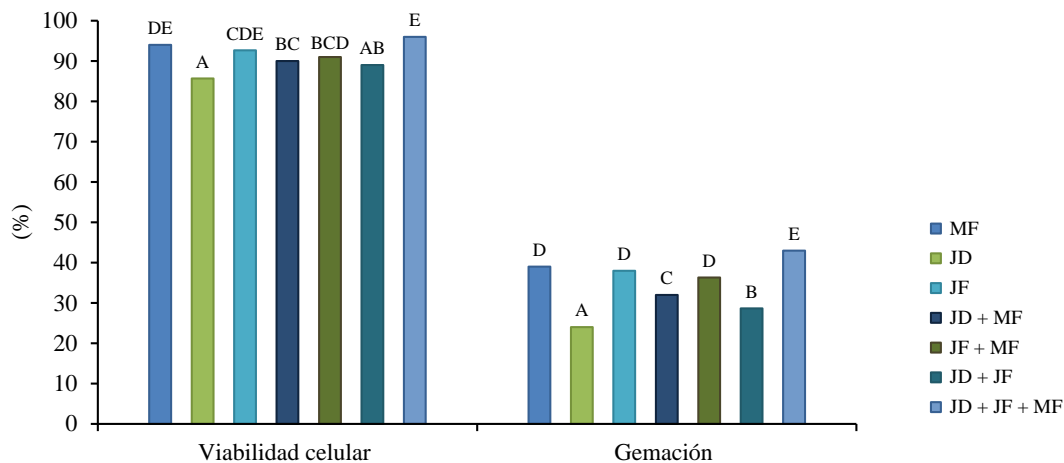
El empleo del jugo de los filtros como materia prima alternativa presenta niveles más bajos de ART_R y sólidos solubles en el mosto fermentado, respecto al uso de miel final al 100 % (Figura 3.3). Resulta común que las melazas produzcan mostos con un alto contenido de sólidos solubles al final de la fermentación, como fue demostrado por De la Cruz *et al.* (2000), Torres (2005) y De Armas *et al.* (2020), que también obtuvieron valores superiores a 7 °Brix, dado que la mayoría de los sólidos solubles presentes en este análisis son compuestos de azúcares degradados, calcio, potasio, ácidos orgánicos, entre otros (Almazán, Cabello, *et al.*, 2016; Kaur *et al.*, 2002).

En todas las variantes se observó que hay consumo de sustratos por parte de la levadura, así como no se percibieron alteraciones considerables en indicadores tales como: Brix y ART; lo que indica que los sustratos empleados cada uno por separado y combinados entre ellos con los convencionales, no tienen acción inhibitoria por la presencia de sales, metabolitos y otros compuestos. El consumo de azúcares reductores se comportó de forma semejante al proceso convencional de producción de alcohol.

3.2.3 Análisis de viabilidad celular y gemación en los mostos fermentados

A partir de los análisis de varianza y la prueba de múltiples rangos de Tukey (Anexos 9 y 10), se pudo comprobar, tanto para la viabilidad celular como para la gemación, que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las siete variantes de mezcla, para un nivel de confianza de 95 %. Al final de la fermentación, las alternativas analizadas mostraron una buena viabilidad celular en el rango de 86 a 96 %, por lo que estas levaduras pueden ser reutilizadas en un nuevo ciclo fermentativo (Figura 3.4). El mosto compuesto por jugo diluido resultó el de menor porcentaje de viabilidad (86 %) respecto al resto de los tratamientos, debido a que este jugo presenta cantidades más pequeñas de nutrientes en relación con la melaza y el jugo filtrado; y que, cuando se mezcló con estos sustratos, se complementó con elementos que beneficiaron el proceso fermentativo.

Es importante destacar, que la levadura *Ethanol Red* ha sido ampliamente utilizada en Cuba por los productores de alcohol, debido a que muestra resistencia a las altas temperaturas y concentraciones de etanol, bajo tiempo de fermentación y permanece en el proceso durante toda la campaña de producción. Debido a estas características, el procesamiento del mosto compuesto por los tres sustratos (Figura 3.4), resultó en un mayor número de células vivas al final de la fermentación (96 %), lo que junto con las mezclas de melaza y jugos secundarios resultaron en una viabilidad celular superior al 85 %, un valor recomendado por Amorim y Leão (2005) como parámetro de fermentaciones con alto rendimiento y eficiencia industrial. Freita *et al.* (2012), al estudiar la viabilidad en mostos de jugo de caña de azúcar, obtuvieron valores entre 85 y 100 % al inicio y al final de la fermentación, así como Alcantara *et al.* (2020) alcanzó valores superiores a 95 % con melazas. Una mayor cantidad de células vivas proporciona un mayor número de ciclos, fermentaciones más rápidas, reducción de la contaminación bacteriana, aumento de la eficiencia del proceso con una posible reducción de costos y permite la obtención de destilados de mejor calidad. (Ribeiro *et al.*, 2017).



% Viabilidad celular – Prueba F: 20,99 / S: 3,41 / CV: 3,74 %
 % Gemación – Prueba F: 118,1 / S: 6,29 / CV: 18,27 %

Figura 3.4 Valores promedios de los porcentajes de viabilidad celular y gemación obtenidos en los mostos fermentados de cada alternativa de mezcla. Las letras comparan las diferencias existentes entre las medias según la prueba de Tukey (5 %)

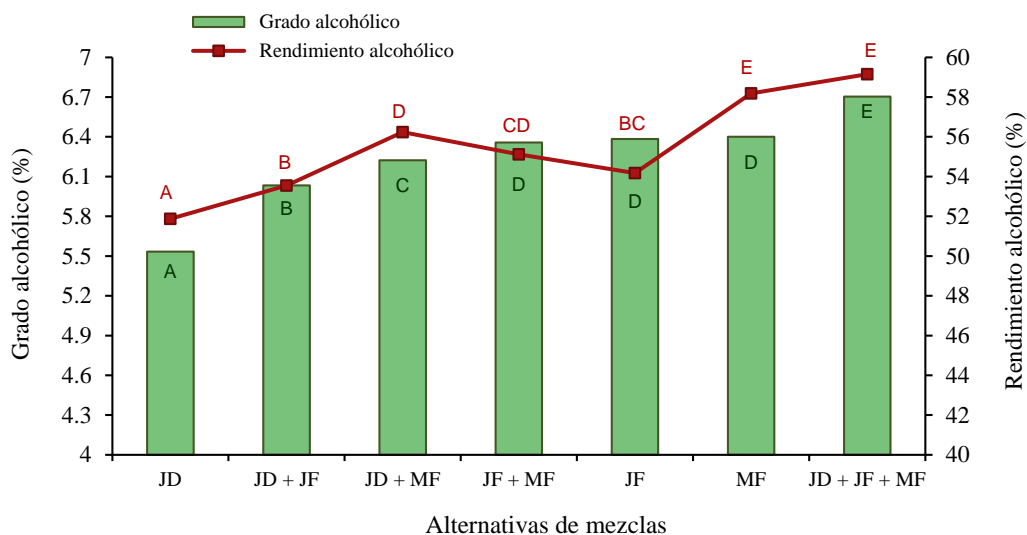
Teniendo en cuenta que las levaduras se reutilizan en los posteriores ciclos fermentativos, la presencia de células gemantes viables al final de la fermentación es sumamente importante (Oliveira *et al.*, 2019). En la figura 3.4, se observa como las tasas de gemación oscilan desde 24 hasta 43 %. Al analizar los resultados obtenidos para las mezclas de sustratos azucarados, independientemente de la proporción, este parámetro aumentó respecto a la fermentación compuesta por jugo diluido. Este índice demuestra la cantidad de nuevas células que se generan y los valores altos son beneficiosos para el proceso, puesto que se vuelve más robusto, capaz de tolerar variaciones en las condiciones fisicoquímicas y la presencia de microorganismos contaminantes (Basso *et al.*, 2011). Freita *et al.* (2012), al estudiar el contenido de células gemantes de levadura en baticiones fermentadas de jugos de caña de azúcar, observó valores entre 23 y 36 % al final del proceso fermentativo.

3.2.4 Análisis del rendimiento alcohólico y la eficiencia de la fermentación

A partir de los análisis de varianza, se pudo comprobar mediante la prueba de Fisher que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las siete alternativas de mezcla, tanto para el grado alcohólico como para el rendimiento con un nivel de confianza de 95 % (Anexos 11 y 12), debido a que el valor de la probabilidad es menor que el nivel de significación ($\alpha = 0,05$). Como

se aprecia en la figura 3.5, para el caso del grado alcohólico existen diferencias entre los pares de medias, exceptuando las alternativas denotadas con la letra D.

Según la prueba estadística, las alternativas difieren entre sí, por lo que cada variante tuvo un efecto diferente en la producción de etanol. Se obtienen mostos fermentados con grados alcohólicos en el orden de 5,53 hasta 6,70 % (Figura 3.5). Debe resaltarse que los valores fueron superiores a los obtenidos en estudios realizados con iguales sustratos azucarados por autores como: Mesa *et al.* (2006) [4,98 a 5,80 %], Rivero *et al.* (2012) [4,81 a 5,90 %] y García *et al.* (2015) [5,02 a 5,85 %]. También, los valores fueron más altos a los alcanzados por Fabelo (1999), Crespo (2014) y Arencibia (2014) durante la fermentación de melazas con vinazas y jugos de los filtros [4,36 a 5,98 %], y similares a los reportados por Martínez *et al.* (2013) a partir de combinaciones de agua, vinazas y flemazas [6 a 6,8 %]. Además, en investigaciones efectuadas por Morales *et al.* (2018), se analizaron las posibilidades de utilización del licor hidrolizado de bagazo en la fermentación con mezclas de miel final y jugo de los filtros de cachaza, obteniéndose mostos con un contenido alcohólico inferior a 5,38 %.



Grado alcohólico – Prueba F: 352,8 / S: 0,35 / CV: 5,63 %

Rendimiento – Prueba F: 101,2 / S: 2,47 / CV: 4,46 %

Figura 3.5 Valores promedio de rendimiento y grado alcohólico obtenidos en los mostos fermentados de cada alternativa de mezcla. Las letras comparan las diferencias existentes entre las medias según la prueba de Tukey (5 %)

Los mejores resultados se alcanzan con la alternativa compuesta por los tres sustratos (grado alcohólico: 6,70 % y rendimiento: 59,15 %), seguido del experimento donde se utiliza la mezcla tradicional de miel final y agua (Figura 3.5). También, con la variante compuesta por 100 % de ART aportados por el jugo de los filtros (JF) se logra un grado alcohólico de 6,36 %, resultados que demuestran que el jugo de los filtros es una corriente que favorece el proceso fermentativo y presenta una calidad adecuada para estos fines. Al evaluar el rendimiento de etanol, se verificaron valores entre 51,88 y 59,15 %, siendo la alternativa constituida por jugo diluido la que resultó con los índices más bajos (grado alcohólico: 5,53 % y rendimiento: 51,88 %), debido a que las características de este jugo no son tan favorables para la fermentación como el resto de los sustratos, pues presenta las menores concentraciones de azúcares reductores y un alto contenido de agua. De ahí que, se considera que este jugo debe ser usado como complemento del proceso fermentativo en la dilución de las mieles finales y de esta forma contribuir al ahorro de agua en las fábricas de alcohol. Otros factores que se pueden tener en cuenta para explicar el rendimiento inferior al esperado en algunas alternativas son: una mayor producción de biomasa y de metabolitos que inhiben la formación de etanol provocando estrés en las levaduras (Oliveira *et al.*, 2019). No obstante, los rendimientos alcanzados, son superiores a los valores observados en fermentaciones de melaza con jugos secundarios por autores como Mesa *et al.* (2005) [43,75 a 50,88 %], Rivero *et al.* (2012) [41,31 a 56,22 %] y García *et al.* (2015) [44,61 a 51,32 %].

La obtención de valores superiores de grado alcohólico y rendimiento en las alternativas analizadas, puede estar influenciado por varios factores, entre los que se destaca la utilización de la levadura alcoholera *Ethanol Red*, debido a que la misma es empleada específicamente en la producción de alcohol industrial por su elevada tolerancia a altas concentraciones de etanol y su capacidad de maximizar los rendimientos en un amplio rango de condiciones de fermentación, exhibiendo altas tasas de consumo de azúcares reductores (Gumienna *et al.*, 2014; Láinez *et al.*, 2019). Además, se mantuvo constante la temperatura de la batición (37 °C) durante todo el proceso fermentativo y el suministro adecuado de sales nutrientes, que garantizan el crecimiento óptimo de la levadura y la bioconversión de azúcares en etanol. Se infiere que, en todas las combinaciones ensayadas, no debió existir una contaminación bacteriana que ocasionara afectaciones significativas a la fermentación, considerando los resultados positivos comentados con anterioridad. Además, se realizó una adecuada sedimentación y esterilización de los mostos, así como no se observó una elevada tasa de floculación de levaduras, ni una excesiva formación de espuma durante la fermentación, puesto que constituyen

factores que indican la ocurrencia de una contaminación microbiana. Se pudo comprobar en cada uno de los experimentos la presencia de la levadura con valores superiores a los $300 \cdot 10^6$ células/mL.

En los análisis de varianza realizados, tanto para el dióxido de carbono generado como para la eficiencia alcohólica (Anexos 13 y 14), se pudo comprobar la existencia de diferencias significativas entre las medias de las siete alternativas de mezcla para un nivel de significación igual a 0,05. Además, con la prueba de múltiples rangos de Tukey efectuada para ambos parámetros, se detectaron cuáles medias eran significativamente diferentes de otras. En la figura 3.6, se puede verificar que para el caso del dióxido de carbono producido, existen diferencias entre los pares de medias, exceptuando las variantes denotadas con la letra C que presentan valores muy semejantes.

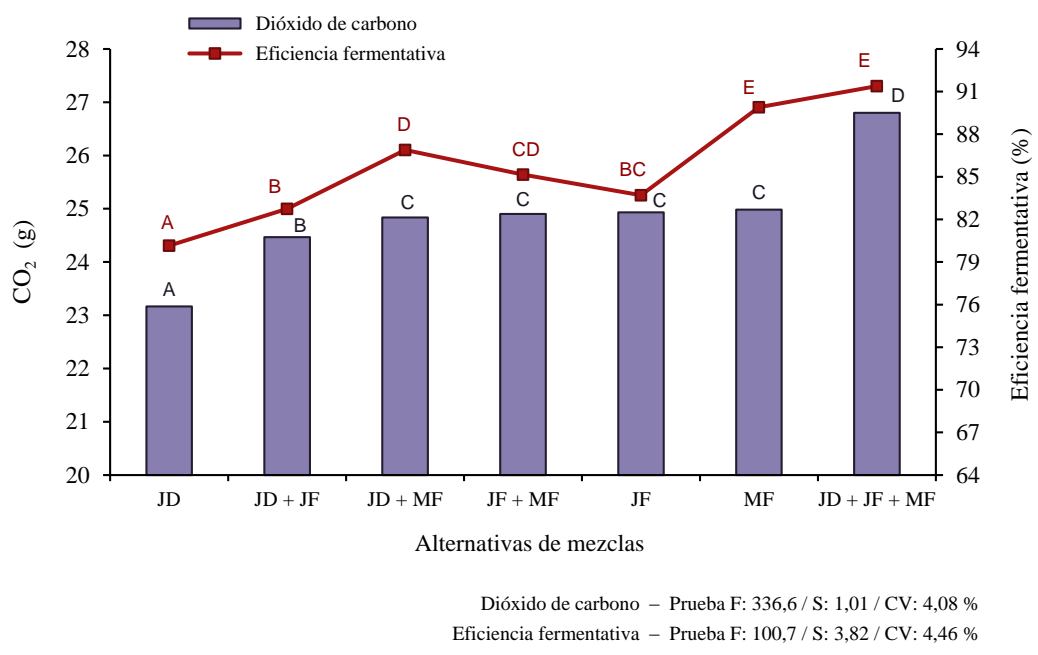


Figura 3.6 Valores promedio de eficiencia fermentativa y dióxido de carbono obtenidos en los mostos fermentados de cada alternativa de mezcla. Las letras comparan las diferencias existentes entre las medias según la prueba de Tukey (5 %)

Se puede observar como el mayor contenido de dióxido de carbono se obtuvo con la variante compuesta por los tres sustratos (26,80 g), para la cual se alcanzaron también los mayores valores de grado alcohólico (6,70 %) y rendimiento (59,15 %) (Anexo 15). Según Bergmann *et al.* (2018), la cantidad de dióxido de carbono generado en la fermentación es equimolar con respecto al etanol producido, como lo indica la ecuación estequiométrica (1.1). Por ejemplo, 90 kg de glucosa se convierten aproximadamente en 46 kg de etanol y 44 kg de CO₂, de manera que en base másica se

producirá una cantidad de CO₂ apenas menor que la de etanol. De acuerdo al rendimiento de Pasteur, se espera una cantidad máxima de 486 kg CO₂/t de azúcares fermentables, expresados como sacarosa. Dependiendo del contenido de azúcares en la melaza, y asumiendo una recuperación entre 80 y 85 %, la producción de CO₂ es de aproximadamente 180 kg/t de melaza. De ahí que, en la medida que se produzca una mayor cantidad de CO₂, se favorece el rendimiento y la eficiencia fermentativa, lográndose grados alcohólicos superiores en las baticiones fermentadas (Rein, 2017).

La eficiencia de la fermentación es un parámetro de suma importancia, debido a las implicaciones económicas que tiene sobre el proceso productivo. Al evaluar este indicador (Figura 3.6), se verificaron valores entre 80,15 y 91,39 %, siendo la mezcla constituida por los tres sustratos la de mayor cuantía. Estas cifras son significativas, debido a que una gran parte de las variantes presentan valores superiores al 85 % recomendado por Amorim y Leão (2005) y Otero *et al.* (2010), para lograr altos rendimientos industriales en fermentaciones con concentraciones iniciales de ART entre 105 y 120 g/L. Además, son superiores a los resultados obtenidos durante la fermentación de mezclas de jugo de caña de azúcar con melazas en investigaciones realizadas por Mesa *et al.* (2006) [67,93 a 79,01 %], Otero *et al.* (2009) [70 a 78 %] y García *et al.* (2015) [69,27 a 79,70 %].

La eficiencia de la fermentación depende en gran medida de las materias primas empleadas, en particular de la disponibilidad y la tasa de consumo de azúcares fermentables por la levadura. Durante la transformación de las materias primas en productos intermedios, se producen cambios fisicoquímicos que pueden influir de forma positiva o negativa en el rendimiento de la fermentación (Gumienna *et al.*, 2014). Se puede concluir que el contenido de los compuestos no azucarados (como proteínas, grasas y ácidos orgánicos presentes en los jugos) no influyó desfavorablemente en el rendimiento de etanol. Estos compuestos pueden constituir una fuente de nutrición beneficiosa para el crecimiento de la levadura. La utilización de jugos secundarios como medio para la producción de etanol constituye una buena solución desde un punto de vista tecnológico. Estos resultados demuestran que los jugos secundarios y la melaza, así como sus mezclas en diferentes proporciones, dan como resultado un sustrato con características apropiadas para la fermentación, con valores superiores de rendimiento alcohólico y eficiencia fermentativa.

3.3 Análisis de la calidad del etanol obtenido

Conocer la composición y calidad del etanol producido a partir de los mostos fermentados correspondientes a cada variante de mezcla, resulta de gran importancia a la hora de evaluar el uso

de los sustratos alternativos en la fermentación alcohólica. De ahí que, se realizó la determinación de los compuestos volátiles mayoritarios presentes en los destilados obtenidos a partir de una cromatografía gaseosa. Tanto la figura 3.7 como la tabla 16.1 del anexo 16, reflejan estos resultados.

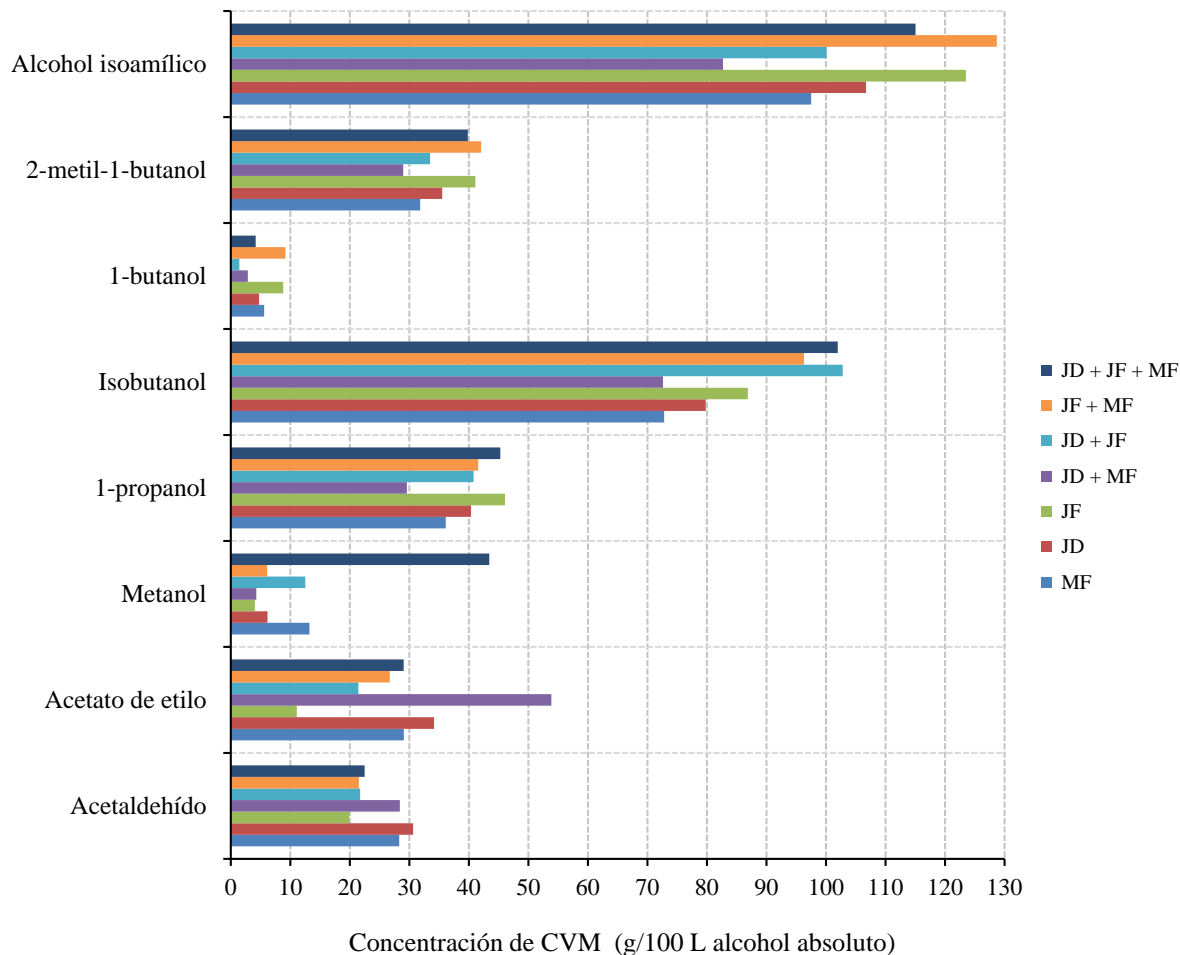


Figura 3.7 Componentes volátiles mayoritarios (CVM) en muestras de destilados obtenidos a partir de los mostos fermentados correspondientes a cada alternativa de mezcla

Durante la fermentación alcohólica se produce junto con el etanol, una variedad de compuestos volátiles denominados mayoritarios. Entre estos, se destacan en importancia los alcoholes superiores (alcoholes con más de dos átomos de carbono): 1-propanol, isobutanol, 2-metil-1-butanol y alcohol isoamílico, separados en las columnas rectificadoras en forma de aceite de fusel. En una segunda etapa de destilación, las concentraciones de esos compuestos pueden ser controladas en sus rangos de concentración para que los productos finales clasifiquen como alcoholes etílicos. Controlar la formación de estos congéneres, constituye un factor primordial para obtener aguardientes con un

bouquet que acredite su calidad para la formulación de bebidas destiladas que así lo requieran, especialmente en rones extrasecos (De la Cruz *et al.*, 2003; Estévez, 2014).

Es necesario destacar, que la concentración de los alcoholes superiores detectados (Figura 3.7), se incrementa en la medida que existe una mayor presencia de jugos secundarios (jugo filtrado y jugo diluido) en las alternativas de mezcla, en comparación con la batición constituida por miel final (MF). Jover *et al.* (1998) y Versari *et al.* (2014), consideran que las características de la batición fermentada se definen por la presencia, en mayor o menor medida, de microcomponentes volátiles y etanol. La diversidad de estos compuestos en los mostos fermentados, así como su concentración, influyen marcadamente en el aroma y sabor de los rones y aguardientes, y ello está estrechamente vinculado a la calidad de las materias primas, tipos de cepas de microorganismos, nutrientes empleados, condiciones de destilación, añejamiento, almacenamiento y, sobre todo, a las condiciones en que se realiza la fermentación.

Como muestra la figura 3.7, existe una mayor concentración de alcohol isoamílico e isobutanol respecto al resto de los alcoholes superiores presentes en las muestras, coincidiendo con los resultados obtenidos en estudios realizados por Otero *et al.* (2009) y Ribeiro *et al.* (2017) con iguales sustratos azucarados, así como por Ibáñez *et al.* (2020) con muestras de miel final. En la producción de bebidas alcohólicas, los alcoholes superiores se consideran impurezas y su concentración puede ser lo suficientemente elevada como para generar sabores desagradables y olores penetrantes en el producto final, así como aportar una sensación de aspereza al paladar (Borroto *et al.*, 2020). Su formación a partir de los aminoácidos aromáticos es generalmente a través de la vía catabólica o ruta de Ehrlich, donde los aminoácidos son primeramente transaminados a 2-oxoácidos, después descarboxilados a aldehídos y finalmente reducidos a los correspondientes alcoholes superiores por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (Álvarez *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 2013).

Resulta preciso señalar, que en ninguno de los casos fue detectado por el cromatógrafo de gases, la presencia de 2-butanol y acetal en los destilados. Se ha demostrado que dentro de los factores que pueden determinar la composición de la fracción aromática (especialmente los alcoholes superiores) de fermentaciones derivadas de jugos y melazas provenientes de la fabricación de azúcar de caña, se encuentran: la cepa *Saccharomyces cerevisiae* empleada, y la relación carbono-nitrógeno, específicamente la presencia de nitrógeno amínico y amoniacal en el medio de fermentación (Borroto *et al.*, 2017; Ibáñez *et al.*, 2020).

Según Spinosa *et al.* (2016), los ésteres representan el mayor grupo de compuestos aromáticos en las bebidas alcohólicas. Se caracterizan por otorgar sabores y olores dulces y afrutados en las bebidas fermentadas, por esa razón su presencia determina en parte la calidad sensorial. Su formación se produce en las fases finales de la fermentación y son sintetizados por medio de la enzima alcohol acetil transferasa. La formación de ésteres depende de las condiciones de fermentación y de la levadura utilizada (Núñez *et al.*, 2020; Pérez *et al.*, 2013). En la figura 3.7, quedan representadas las concentraciones de acetato de etilo (éster) presentes en las muestras analizadas, destacándose una mayor concentración en el destilado obtenido a partir de la fermentación de jugo diluido y miel final (53,84 g/100 L alcohol absoluto).

Tabla 3.4 Concentraciones de los congéneres presentes en los destilados

| <i>Componentes</i> | <i>Alternativas de mezcla (g/100 L alcohol absoluto)</i> | | | | | | | <i>Normas de calidad</i> | |
|----------------------|--|-----------|-----------|--------------|--------------|--------------|-----------------|--------------------------|---------------------|
| | <i>MF</i> | <i>JD</i> | <i>JF</i> | <i>JD+MF</i> | <i>JD+JF</i> | <i>JF+MF</i> | <i>JD+JF+MF</i> | <i>Valor Mínimo</i> | <i>Valor Máximo</i> |
| Aldehídos | 28,28 | 30,62 | 19,92 | 28,39 | 21,73 | 21,50 | 22,49 | – | 30 |
| Ésteres | 29,06 | 34,14 | 11,08 | 53,84 | 21,44 | 26,69 | 29,04 | 1 | 90 |
| Metanol | 13,20 | 6,15 | 4,03 | 4,27 | 12,52 | 6,11 | 43,41 | – | 10 |
| Alcoholes superiores | 243,9 | 267,1 | 306,3 | 216,7 | 278,6 | 317,8 | 306,3 | 8 | 350 |

En la tabla 3.4, se muestran las concentraciones de congéneres presentes en los destilados, agrupados por funciones químicas. Es importante destacar, que cada una de estas impurezas son eliminadas en gran medida a través de las diferentes etapas de destilación fraccionada previstas a escala industrial (columnas: destiladora, depuradora y rectificadora), donde los componentes volátiles y no volátiles son extraídos de acuerdo a la diferencia entre sus temperaturas de ebullición. Sin embargo, a pesar de que las muestras analizadas fueron obtenidas a partir de una destilación simple de los mostos fermentados a nivel de laboratorio, sin incluir todas las etapas de separación mencionadas con anterioridad; si se realiza un análisis comparativo entre los valores obtenidos y los intervalos establecidos en la norma de calidad NC 264: 2005 para aguardientes de caña, se puede apreciar que en la mayoría de los casos se cumple con los valores normados para este producto, con excepción del contenido de metanol para tres de las alternativas de mezcla (MF, JD+JF y JD+JF+MF).

El metanol se produce a partir de la desmetilación enzimática de las pectinas contenidas en el mosto durante la fermentación. La presencia de este congénere en alcoholes de caña es muy baja, puesto que las pectinas son compuestos naturales que son abundantes en las frutas y sus jugos (González *et al.*, 2020). Debido a que es un compuesto químico tóxico y nocivo para la salud humana, se sugiere que los destilados con alto contenido de metanol sean empleados como biocombustibles. No obstante, en la industria estos destilados son suministrados a una columna desmetilizadora (destilación fraccionada), donde este contaminante queda reducido a concentraciones permisibles.

3.4 Análisis de los resultados del diseño experimental

Definidos los valores de las variables de respuesta del diseño de mezclas del tipo enrejado *simplex* con centroide, se procede a la obtención de los modelos matemáticos a partir del procesamiento estadístico de los resultados experimentales alcanzados durante la fermentación. Estos modelos tienen como variables de respuesta: grado alcohólico, eficiencia fermentativa, rendimiento alcohólico y dióxido de carbono generado. Como factores o variables independientes se tomaron las composiciones de ART aportados a la mezcla por los sustratos fermentativos: miel final, jugo diluido y jugo de los filtros de cachaza.

Al desarrollar el diseño de mezclas en el programa *Statgraphics Centurion*, versión 16.2, se obtiene el análisis de varianza, la gráfica de errores relativos, el modelo matemático, así como la superficie de respuesta y los valores óptimos correspondiente a cada variable dependiente. El análisis de varianza permite evaluar si existe una relación significativa entre los factores y la respuesta medida. A partir de la gráfica de residuos se puede determinar la diferencia entre la respuesta observada y la respuesta predicha por el modelo, lo cual permite hacer un diagnóstico más directo de la calidad del modelo, puesto que su magnitud señala qué tan bien el modelo describe los datos.

3.4.1 Análisis de la calidad de ajuste de los modelos

En el anexo 17, se muestran los modelos de ajuste (lineal, cuadrático y cúbico especial) que describen el comportamiento y la influencia de las variables de respuesta, respecto a la composición de las mezclas de los sustratos empleados en la investigación. Se obtienen mejores ajustes para el modelo cúbico especial, debido a que con este se alcanzan los mayores valores en los coeficientes de determinación (R^2) y R^2 ajustado (superiores a 96 %), así como presenta el menor valor de probabilidad inferior a 0,05 para un nivel de confianza del 95 %. La tabla 3.5, contiene las ecuaciones de los modelos cúbico especial para cada una de las variables de respuesta.

Tabla 3.5 Modelos matemáticos obtenidos para las variables de respuesta

| Variable de respuesta | Ecuación del modelo cúbico especial ajustado | |
|--|--|-------|
| Grado alcohólico [ALC] (%) | $ALC = 6,4 \cdot x_{MF} + 5,53333 \cdot x_{JD} + 6,38333 \cdot x_{JF} + 1,02667 \cdot x_{MF} \cdot x_{JD} - 0,14 \cdot x_{MF} \cdot x_{JF} + 0,3 \cdot x_{JD} \cdot x_{JF} + 12,5802 \cdot x_{MF} \cdot x_{JD} \cdot x_{JF}$ | (3.1) |
| Rendimiento alcohólico [REND] (%) | $REND = 58,1833 \cdot x_{MF} + 51,8767 \cdot x_{JD} + 54,1733 \cdot x_{JF} + 4,82667 \cdot x_{MF} \cdot x_{JD} - 4,24667 \cdot x_{MF} \cdot x_{JF} + 2,11333 \cdot x_{JD} \cdot x_{JF} + 110,782 \cdot x_{MF} \cdot x_{JD} \cdot x_{JF}$ | (3.2) |
| Eficiencia fermentativa [EFIC] (%) | $EFIC = 89,9033 \cdot x_{MF} + 80,1533 \cdot x_{JD} + 83,7 \cdot x_{JF} + 7,44667 \cdot x_{MF} \cdot x_{JD} - 6,55333 \cdot x_{MF} \cdot x_{JF} + 3,26667 \cdot x_{JD} \cdot x_{JF} + 171,243 \cdot x_{MF} \cdot x_{JD} \cdot x_{JF}$ | (3.3) |
| Dióxido de carbono [CO ₂] (g) | $CO_2 = 24,9833 \cdot x_{MF} + 23,1667 \cdot x_{JD} + 24,9333 \cdot x_{JF} + 3,04667 \cdot x_{MF} \cdot x_{JD} - 0,22 \cdot x_{MF} \cdot x_{JF} + 1,66667 \cdot x_{JD} \cdot x_{JF} + 52,3708 \cdot x_{MF} \cdot x_{JD} \cdot x_{JF}$ | (3.4) |

Donde:

x_{MF} , x_{JD} , x_{JF} : Fracciones másicas de ART aportados por la miel final, el jugo diluido y el jugo de los filtros a la mezcla ternaria respectivamente.

Teniendo en consideración los criterios que se muestran en la tabla 3.6, se procede a la validación de los modelos matemáticos del tipo cúbico especial obtenidos.

Tabla 3.6 Parámetros de calidad de ajuste de los modelos matemáticos

| Parámetros de validación del modelo | Variables de respuesta | | | |
|--|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| | Grado alcohólico (ALC) | Rendimiento alcohólico (REND) | Eficiencia fermentativa (EFIC) | Dióxido de carbono (CO ₂) |
| R ² (%) | 99,38 | 97,75 | 97,74 | 99,41 |
| R ² ajustado (%) | 98,96 | 96,25 | 96,23 | 99,02 |
| Estadístico de Durbin-Watson (Valor-P) | 2,77 (0,962) | 2,45 (0,840) | 2,44 (0,839) | 2,61 (0,917) |
| Prueba-F (Valor-P) | 239,71 (0,000) | 65,08 (0,000) | 64,76 (0,000) | 254,53 (0,000) |

El coeficiente de determinación (R^2) indica en qué porcentaje los modelos, así ajustados, explican la variabilidad de las variables de respuesta, obteniéndose en todos los casos valores próximos a 100 %. Además, todos los modelos presentan valores de R^2 ajustado por encima de 70 %, valor recomendado como mínimo por Gutiérrez y De la Vara (2012). Los valores de probabilidad (Valor-P) correspondientes a la prueba de Durbin-Watson para todas las variables de respuesta son superiores a 0,05 para un nivel de confianza del 95 %, lo que significa que los errores experimentales no se encuentran correlacionados entre sí.

Mediante la prueba de Fisher se estudia la pérdida de ajuste por un estimador interno de la varianza del error experimental. En este caso, como los valores de probabilidad en los análisis de varianza son menores que el nivel de significación ($\alpha = 0,05$) (Anexo 18), existe una relación estadísticamente significativa entre las variables de respuesta y la composición de ART en los componentes de la mezcla, para un nivel de confianza de 95 %. Al no existir evidencias de pérdida de la calidad de ajuste de los modelos, no se debe modificar o remover ningún término de estos. Al tener en consideración los criterios anteriores, se corrobora que los modelos presentan una calidad de ajuste adecuada.

A partir del análisis del diseño de experimentos, se pudo comprobar también, que no existen diferencias significativas entre los bloques de réplicas de los experimentos, puesto que presenta un valor de probabilidad superior a 0,05.

Al analizar los coeficientes de las variables independientes en los modelos obtenidos del ajuste de los datos experimentales (Tabla 3.5), se puede observar que el factor que mayor influencia tiene sobre las variables de respuesta, es la composición de miel final en la mezcla. Este resultado se puede corroborar a partir del análisis de las figuras 3.5 y 3.6, debido a que los mejores resultados experimentales se obtuvieron en las alternativas donde estaba presente la miel final como sustrato. Se aprecia, además, que se favorece el proceso fermentativo con el uso de una mezcla de jugo diluido, jugo de los filtros y miel final, como se ha analizado con anterioridad. Estos resultados permiten la toma de decisiones para evaluar otras alternativas de mayor capacidad de producción de etanol con la disponibilidad de los jugos de los filtros y diluidos provenientes de la fábrica de azúcar, y con ello se evitaría el proceso de concentración de estas corrientes e incluso los gastos de agua en su posterior dilución con fines fermentativos, lo que resultaría indudablemente en un impacto económico y ambiental positivos.

Los estudios de mezcla, como el desarrollado en este trabajo, pueden servir de base para llevar sus resultados a la industria, al obtener modelos que permitan explorar todas las posibles combinaciones de las variables independientes, en busca de mejoras en las variables dependientes. Se pueden buscar tantos modelos, como propiedades se midan durante la experimentación. De ahí que, al definir previamente un objetivo, por ejemplo, mantener en un rango determinado el rendimiento en la etapa de fermentación al utilizar jugo diluido y de los filtros para la dilución de la miel final, se pueden tomar datos de variables medibles durante la fermentación que incidan en el rendimiento. Al obtener los modelos que describen el rendimiento y demás variables que influyen en este, todos dependientes de la composición de la mezcla, se puede optimizar el rendimiento utilizando los demás modelos como restricciones al fijar los valores en los que se quiera que estén.

3.4.2 Optimización de los modelos

Partiendo de los modelos cúbico especial ajustados (Tabla 3.5), se procede a la optimización de cada uno de ellos, maximizando las variables de respuesta. Para el caso del modelo de grado alcohólico (ALC), se puede observar en la figura 3.9, los diferentes contornos que realiza el programa estadístico *Statgraphics Centurion 16.2*, hasta llegar a la región del óptimo. De ahí que, se identifica como el punto óptimo del diseño, a la mezcla compuesta por los tres sustratos azucarados, con las siguientes composiciones: MF: 0,401, JD: 0,264 y JF: 0,335, para un grado alcohólico óptimo de 6,73 % (Figura 3.8). Es importante aclarar que, para los efectos reales, la región del óptimo es considerada como la región de trabajo para una primera aproximación de los resultados obtenidos con estas formulaciones.

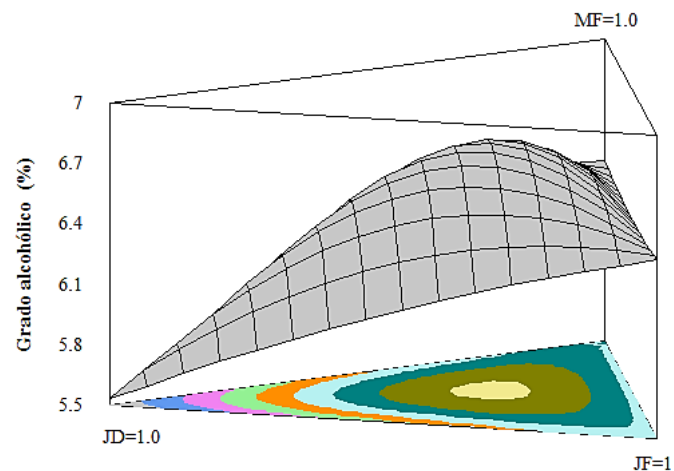


Figura 3.8 Superficie de respuesta estimada para el modelo de grado alcohólico

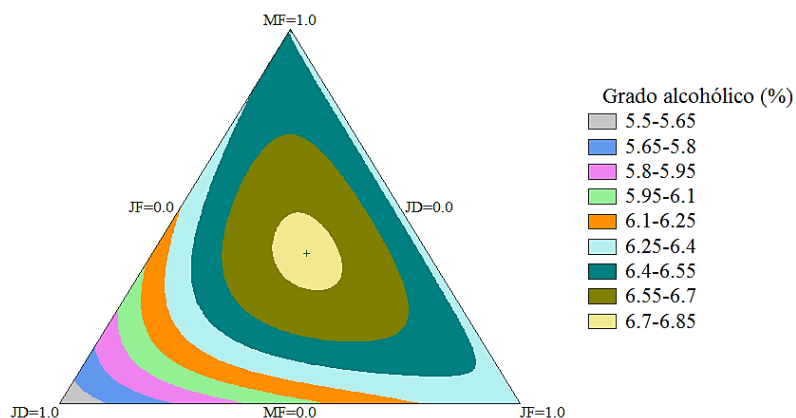


Figura 3.9 Gráfico de contornos de la superficie de respuesta para el modelo de grado alcohólico

La relación existente entre la composición de ART aportada por los sustratos y el grado alcohólico alcanzado durante la fermentación, se ofrece en las figuras 3.8 y 3.9. En la práctica industrial se trabaja en la región cercana al óptimo. La figura 3.10, muestra el error relativo entre los valores experimentales y los calculados por la ecuación 3.1 del modelo de grado alcohólico. En este gráfico, se puede observar que la mayoría de los experimentos muestran un error relativo inferior al 5 %, lo que valida la calidad de ajuste de este modelo matemático.

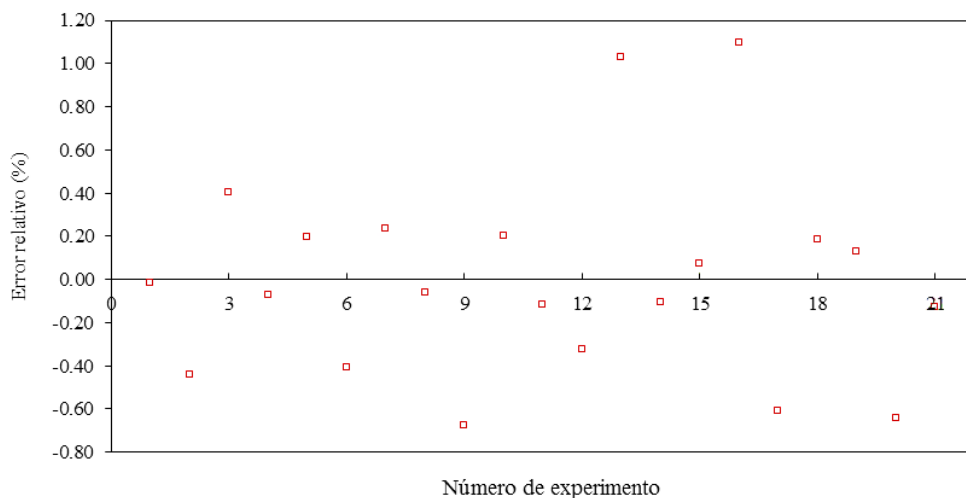


Figura 3.10 Representación del error relativo entre el grado alcohólico experimental y el calculado por la ecuación del modelo ajustado

La tabla 3.7, contiene también los valores óptimos alcanzados durante la optimización del resto de las variables de respuesta, correspondiente a cada uno de los modelos matemáticos. En los anexos 19, 20 y 21, se muestran las gráficas de superficie de respuesta estimada y la de contornos correspondiente a los modelos de rendimiento alcohólico, eficiencia fermentativa y dióxido de carbono generado, respectivamente.

Tabla 3.7 Resultados de la optimización de los modelos matemáticos

| <i>Variables de respuesta</i> | <i>Criterio de optimización</i> | <i>Valor óptimo</i> | <i>Valores óptimos Composición másica de ART</i> | | |
|-------------------------------|---------------------------------|---------------------|--|---------------------|----------------------|
| | | | <i>Miel final</i> | <i>Jugo diluido</i> | <i>Jugo filtrado</i> |
| | | | x_{MF} | x_{JD} | x_{JF} |
| Grado alcohólico (%) | | 6,73 | 0,401 | 0,264 | 0,335 |
| Rendimiento alcohólico (%) | Maximizar | 59,37 | 0,434 | 0,299 | 0,267 |
| Eficiencia fermentativa (%) | | 91,73 | 0,434 | 0,299 | 0,267 |
| Dióxido de carbono (g) | | 26,82 | 0,363 | 0,304 | 0,333 |

Como se observa en la tabla 3.7, se alcanzan los valores óptimos de las variables dependientes, a medida que exista una mayor composición de ART aportados por la miel final a la mezcla ternaria, respecto a las proporciones en las que se encuentran los jugos diluido y filtrado. Es importante señalar, que los puntos óptimos obtenidos para cada una de las variables de respuesta, solo deben considerarse para una aproximación en el estudio hacia la región del óptimo y una valoración de las posibilidades y potencialidades de mezcla de estos sustratos.

Optimización simultánea de las variables de respuesta

En el análisis anterior se determinaron los puntos óptimos considerando solamente una variable de respuesta. Uno de los métodos de optimización simultánea es el basado en la función de deseabilidad. Este método provee soluciones consistentes tanto con los datos observados en el experimento, como con la información que se les provee. Así mismo, es intuitivo y flexible, en el sentido de que permite balancear de diversas formas la importancia relativa de las respuestas. El éxito de alcanzar un óptimo multirespuesta mediante la función de deseabilidad depende de la calidad de los modelos de estimación que se utilizan para construir las respuestas

deseables individuales. Estos modelos deben ser estadísticamente significativos (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

La función de deseabilidad implica transformaciones de cada una de las variables de respuesta estimadas a un valor deseable, en función de los criterios de optimización adoptados. En la tabla 3.8, se muestra el criterio de optimización simultánea considerado en el estudio, así como los límites máximos y mínimos para cada variable de respuesta.

Tabla 3.8 Criterio de optimización simultánea para las variables de respuesta

| <i>Variables de respuesta</i> | <i>Criterio de optimización</i> | <i>Valor superior (U_i)</i> | <i>Valor inferior (L_i)</i> | <i>Pesos (w_i)</i> |
|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|
| Grado alcohólico (%) | | 6,71 | 5,50 | 5 |
| Rendimiento alcohólico (%) | Maximizar | 59,38 | 51,40 | 4 |
| Eficiencia fermentativa (%) | | 91,75 | 79,42 | 4 |
| Dióxido de carbono (g) | | 26,90 | 23,00 | 3 |

Con la función de deseabilidad se persigue hallar el óptimo simultáneo donde se maximicen todas las variables de respuesta objeto de estudio, con la finalidad de conocer la composición óptima de azúcares reductores en la mezcla, que garantice resultados satisfactorios en la fermentación de estos sustratos. Mediante la Matriz de Saaty (Anexo 22), se determina el orden de impacto de las variables de respuesta, y se define w_i en función de los criterios del programa estadístico *Statgraphics Centurion*, versión 16.2. Como resultado de este análisis se obtiene que el valor óptimo de deseabilidad (0,9928) corresponde a la mezcla de los tres componentes, con las siguientes composiciones óptimas: MF: 0,411, JD: 0,303 y JF: 0,286, alcanzándose valores óptimos en las variables de respuesta: grado alcohólico (6,72 %), eficiencia fermentativa (91,71 %), rendimiento alcohólico (59,36 %) y contenido dióxido de carbono generado (26,78 g).

3.5 Determinación de los ahorros de miel final y agua en cada alternativa

La utilización de las mezclas de diferentes sustratos favorece el proceso de fermentación, si se tiene en cuenta que se aprovecha el jugo diluido y el jugo de los filtros para la dilución de las mieles, además de aportar azúcares a la mezcla a fermentar. Al realizar los balances de masa en cada punto experimental, se obtiene el porcentaje que representa el ahorro de miel final y agua en cada

alternativa con respecto a la mezcla tradicional compuesta por miel final y agua (MF), tal y como se representa en la tabla 3.9, lo cual resulta interesante al lograr una disminución en los consumos de estas materias primas que inciden significativamente en los costos de producción del proceso.

Tabla 3.9 Ahorros de miel final y agua obtenidos en cada alternativa de mezcla

| <i>Puntos</i> | <i>Mezclas</i> | <i>Ahorro de miel final (%)</i> | <i>Ahorro de agua (%)</i> |
|---------------|----------------|---------------------------------|---------------------------|
| 1 | MF | – | – |
| 2 | JD | 22,33 | 100 |
| 3 | JF | 100 | 61,75 |
| 4 | JD + MF | 23,08 | 100 |
| 5 | JF + MF | 50,00 | 30,87 |
| 6 | JD + JF | 64,45 | 95,61 |
| 7 | JD + JF + MF | 49,99 | 95,32 |

Los mayores ahorros de miel final se alcanzaron en los puntos 3 y 6, ambos compuestos por jugos secundarios (Tabla 3.9). También, se obtienen valores superiores de ahorro de agua en las mezclas constituidas por jugo diluido, correspondientes a los puntos 2 y 4, debido a que este jugo presenta un alto contenido de agua que favorece la sustitución completa de la misma. Las condiciones de estas mezclas deberán analizarse de manera independiente y dependerán, no solo de los resultados tecnológicos, sino también del análisis de factibilidad económica y su aplicación en cada instalación industrial.

3.5.1 Valoración económica de los beneficios obtenidos con las alternativas de mezclas

En la tabla 3.10, se exhiben los ingresos económicos brutos que se generarían por las ventas del etanol producido con cada variante de mezcla y por la comercialización de la sobreproducción del etanol obtenido a partir de la miel final sustituida por jugos secundarios, por concepto de ahorro de MF (Alternativa 1). Como muestra la figura 3.11, se alcanzan los mayores ingresos económicos (34 635 590,81 CUP/a) con la variante de mezcla compuesta por jugo filtrado [JF], debido a que no se emplea miel final en su preparación, por lo que esta variante exhibe un ahorro de 100 % de MF y presenta un grado alcohólico de 6,38 %, incidiendo ambos factores en la obtención de mayores ingresos por la venta de etanol. También, se logran altos ingresos (27 522 982,97 CUP/a) con la variante compuesta por los jugos secundarios [JD + JF].

Tabla 3.10 Ingresos económicos brutos obtenidos con la alternativa 1

| Variantes | Ingresos por la venta del alcohol producido (CUP/a) | Ingresos por la venta de la sobreproducción de alcohol a partir de MF sustituida (CUP/a) | Ingresos totales (CUP/a) |
|--------------|---|--|--------------------------|
| MF | 17 340 374,02 | 0 | 17 340 374,02 |
| JD | 14 992 198,37 | 3 872 129,59 | 18 864 327,96 |
| JF | 17 295 216,79 | 17 340 374,02 | 34 635 590,81 |
| JD + MF | 16 861 707,44 | 4 001 624,77 | 20 863 332,21 |
| JF + MF | 17 222 965,23 | 8 670 070,47 | 25 893 035,71 |
| JD + JF | 16 346 915,09 | 11 176 067,88 | 27 522 982,97 |
| JD + JF + MF | 18 162 235,49 | 8 668 019,43 | 26 830 254,92 |

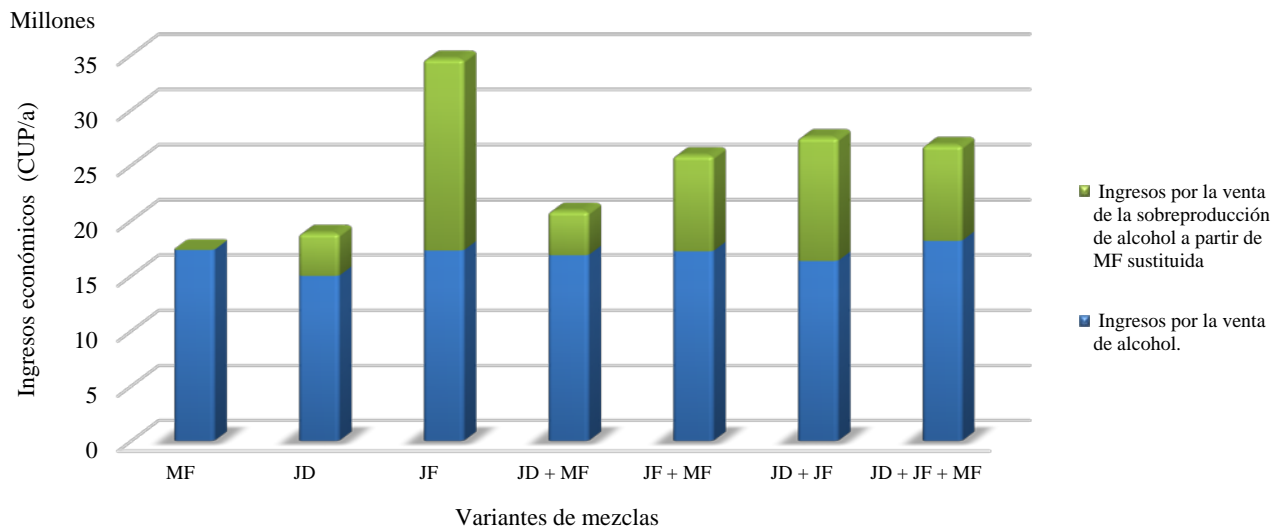


Figura 3.11 Relación de ingresos económicos obtenidos con la alternativa 1

En la tabla 3.11, se exhiben los ingresos económicos brutos generados por las ventas del etanol obtenido con cada variante de mezcla y por la comercialización de alimento animal Miel-Urea-Bagacillo (MUB), producido a partir de la miel final sustituida por jugos secundarios, por concepto de ahorro de MF (Alternativa 2). Como muestra la figura 3.12, el mayor ingreso que se obtiene por la venta de etanol, pertenece a la variante compuesta por los tres sustratos estudiados [JD + JF + MF] (18 162 235,49 CUP/a), debido a que la misma presenta el mayor grado alcohólico (6,70 %) respecto

al resto de las mezclas analizadas. Sin embargo, los ingresos alcanzados a partir de la utilización de la miel final sustituida por jugos secundarios para la producción de MUB, son superiores en la variante donde se emplea jugo filtrado [JF] (20 555 458,56 CUP/a). La segunda variante de mezcla compuesta por jugo diluido [JD], ostenta los ingresos económicos más bajos por la venta de MUB, debido a que posee el menor porcentaje de ahorro de miel final (22,33 %).

Tabla 3.11 Ingresos económicos brutos obtenidos con la alternativa 2

| Variantes | Ingresos por la venta del alcohol producido (CUP/a) | Ingresos por la venta de la MUB producida a partir de la MF sustituida (CUP/a) | Ingresos totales (CUP/a) |
|--------------|---|--|--------------------------|
| MF | 17 340 374,02 | 0 | 17 340 374,02 |
| JD | 14 992 198,37 | 4 590 062,44 | 19 582 260,80 |
| JF | 17 295 216,79 | 20 555 458,56 | 37 850 675,35 |
| JD + MF | 16 861 707,44 | 4 743 567,36 | 21 605 274,8 |
| JF + MF | 17 222 965,23 | 10 277 591,14 | 27 500 556,37 |
| JD + JF | 16 346 915,09 | 13 248 226,37 | 29 595 141,45 |
| JD + JF + MF | 18 162 235,49 | 10 275 159,81 | 28 437 395,31 |

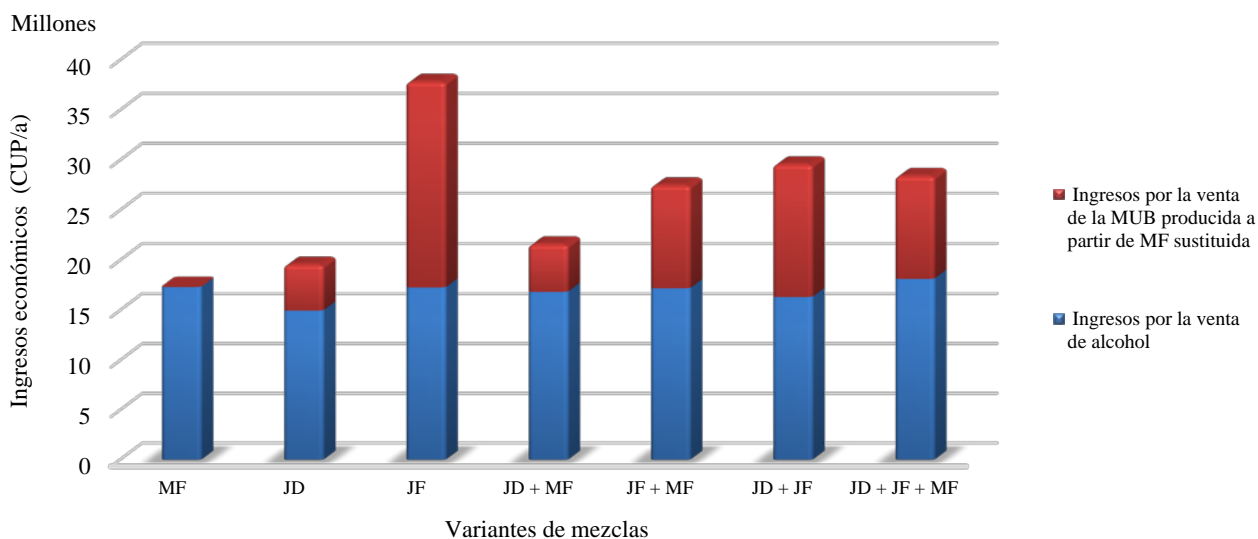


Figura 3.12 Relación de ingresos económicos obtenidos con la alternativa 2

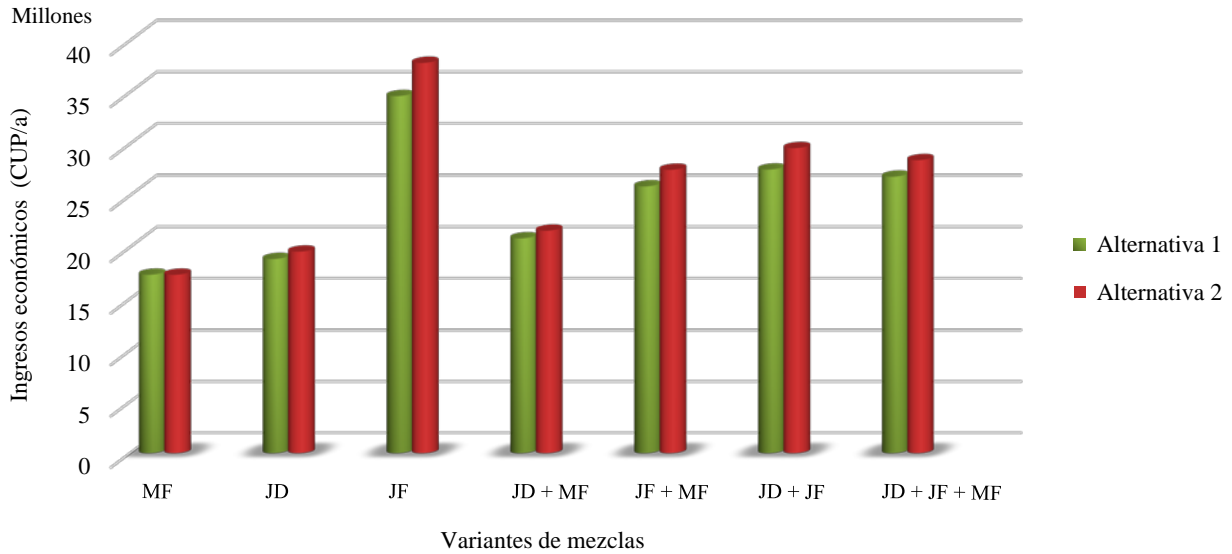


Figura 3.13 Relación de ingresos económicos obtenidos con ambas alternativas

En la figura 3.13, se puede observar como la alternativa 2 muestra ingresos ligeramente superiores a los alcanzados con la alternativa 1. Esto se debe fundamentalmente a que el índice de consumo de miel final para la producción de MUB (150 kg MF / t MUB) es inferior al índice reportado para la producción de etanol (390 kg MF / hL etanol), por lo que permite una mayor producción de este alimento animal. Además, coincide para ambas alternativas, que los mayores ingresos por venta se logran con las variantes de mezcla [JF] y [JD + JF]. Los resultados obtenidos en el análisis económico de las variantes de fermentación alcohólica, permiten afirmar de forma preliminar, que la producción de etanol a partir de mezclas de jugos secundarios y melazas, es factible económicamente a nivel industrial.

3.6 Conclusiones parciales del capítulo

1. Los resultados alcanzados con la caracterización físico-química, evidencian que los sustratos azucarados presentan una adecuada calidad y potencialidades para ser empleados en la fermentación alcohólica, así como muestran algunos de los efectos perjudiciales de la incorporación de los jugos secundarios en el proceso azucarero.

2. La concentración de sólidos solubles durante la fermentación de las alternativas de mezclas, disminuye de 16 a 2 °Brix aproximadamente y el pH se comporta de forma decreciente en un rango de 4,5 a 4,1 unidades, lo que evidencia el consumo de sustratos por parte de la levadura.
3. Los mejores resultados se obtienen con la mezcla compuesta por los tres sustratos estudiados, alcanzándose un grado alcohólico de 6,70 %, una eficiencia fermentativa de 91,39 %, un rendimiento alcohólico de 59,15 % y un contenido de dióxido de carbono generado de 26,80 g.
4. El etanol obtenido a partir de las variantes de mezcla, mostró características potenciales para su utilización como materia prima en la elaboración de bebidas alcohólicas.
5. Se obtienen modelos matemáticos de superficie de respuesta del tipo cúbico especial, que describen el comportamiento de cada una de las variables de respuesta, con valores de R^2 superiores a 97,75 % y valores de probabilidad del coeficiente Durbin-Watson mayores que 0,05, lo que valida la calidad de ajuste de estos modelos.
6. Con las ventas del alimento animal que se produce a partir de la miel final ahorrada (alternativa 2), se alcanzan ingresos económicos ligeramente superiores a los obtenidos por las ventas de etanol (alternativa 1).

CONCLUSIONES

1. Con el estudio de la fermentación alcohólica de las diferentes alternativas de mezclas de jugos secundarios y melazas, se demuestra la factibilidad y calidad de estos sustratos azucarados para ser empleados en la obtención de etanol, por lo que se valida la hipótesis planteada.
2. Mediante el análisis de los componentes volátiles mayoritarios presentes en los destilados, se demuestra la calidad del etanol obtenido con cada variante de mezcla y sus características potenciales para ser utilizado como materia prima en la elaboración de bebidas alcohólicas.
3. Se obtienen modelos matemáticos de superficie de respuesta del tipo cúbico especial, que describen el comportamiento de cada una de las variables de respuesta con una adecuada calidad de ajuste y de gran utilidad para la industria.
4. Con la optimización simultánea de los modelos matemáticos, se alcanzan valores óptimos de grado alcohólico: 6,72 %, eficiencia fermentativa: 91,71 %, rendimiento alcohólico: 59,36 % y contenido de dióxido de carbono generado: 26,78 g, correspondientes a una mezcla con composiciones óptimas de ART en la miel final: 0,411, jugo diluido: 0,303 y jugo de los filtros: 0,286.
5. Todas las alternativas analizadas reportan beneficios económicos, lo cual favorece que se alcancen significativos ingresos, tanto por la venta del etanol como por la comercialización de alimento animal, obtenidos a partir de la miel final ahorrada con cada variante de mezcla.

RECOMENDACIONES

1. Determinar las condiciones óptimas para el tratamiento de las corrientes de jugos secundarios para su utilización en el proceso de fermentación alcohólica.
2. Validar los resultados de los modelos matemáticos obtenidos, mediante su aplicación a escala industrial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albergaria, H., y Arneborg, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2035-2046. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7255-0>
- Alcantara, G. U., Nogueira, L. C., Stringaci, L. A., Moya, S. M., y Costa, G. G. (2020). Brazilian “Flex Mills”: Ethanol from sugarcane molasses and corn mash. *BioEnergy Research*, 13(1), 229-236. <https://doi.org/10.1007/s12155-019-10052-3>
- Almazán, O., Cabello, A., García, R., Otero, M. A., y Sáenz, T. (2016). Las mieles de la caña de azúcar. Propiedades, aprovechamiento y potencial. En O. Almazán, E. Casanova, L. O. Gálvez, J. Lodos, N. Fernández, y A. J. Abril (Eds.), *Patrimonio científico del nuevo ICIDCA. Una contribución al desarrollo de la industria azucarera y de los derivados* (pp. 254-354). Editorial ICIDCA.
- Almazán, O., Casanova, E., Gálvez, L. O., Lodos, J., Fernández, N., y Abril, A. J. (Eds.). (2016). *Patrimonio científico del nuevo ICIDCA. Una contribución al desarrollo de la industria azucarera y de los derivados*. Editorial ICIDCA.
- Almazán, O., García, R., Otero, M. A., y Cabello, A. (2016). La proteína unicelular. Tecnologías, producción y empleos. En O. Almazán, E. Casanova, L. O. Gálvez, J. Lodos, N. Fernández, y A. J. Abril (Eds.), *Patrimonio científico del nuevo ICIDCA. Una contribución al desarrollo de la industria azucarera y de los derivados* (pp. 17-253). Editorial ICIDCA.
- Almazán, O., Klibansky, M., y Otero, M. A. (1982). *Producción de proteína unicelular a partir de subproductos de la industria azucarera*. Editorial Científico – Técnica.
- Alonso, D. (2015). *Evaluación de alternativas de mejoras energéticas y ambientales en la destilería Jesús Rabí* [Tesis en opción al título de Máster en Análisis y Control de Procesos, Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”]. La Habana, Cuba.
- Álvarez, X., Valdés, I., García, R., Porto, O., y Hernández, L. M. (2005). Reducción de alcoholes superiores mediante fermentación con mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* auxotrofo para aminoácidos. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 39(1), 15-22. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120659003>

- Amore, A., y Faraco, V. (2013). Physical and chemical factors affecting fermentation in food processing. En C. Soccol, A. Pandey, y C. Larroche (Eds.), *Fermentation processes engineering in the food industry* (pp. 47-74). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b14070-4>
- Amorim, H. V., y Leão, R. M. (2005). *Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia*. Editora Fermentec.
- Amorim, H. V., Lopes, M. L., de Castro Oliveira, J. V., Buckeridge, M. S., y Goldman, G. H. (2011). Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(5), 1267-1275. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3437-6>
- Arencibia, Y. (2014). *Impacto de la recirculación de vinazas a la etapa fermentativa en el proceso de producción de etanol en la destilería Heriberto Duquesne* [Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Químico, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas]. Santa Clara, Cuba.
- Arshad, M., Hussain, T., Iqbal, M., y Abbas, M. (2017). Enhanced ethanol production at commercial scale from molasses using high gravity technology by mutant *S. cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48, 403-409. <https://www.scielo.br/pdf/bjm/v48n3/1517-8382-bjm-48-03-0403.pdf>
- AZCUBA. (2020a). Ficha de costo de la producción de alcohol flema. Departamento de Economía. UEB Derivados Jesús Rabí. Matanzas, Cuba.
- AZCUBA. (2020b). Ficha de costo de la producción de miel con urea y bagacillo. Departamento de Economía. UEB Derivados Jesús Rabí. Matanzas, Cuba.
- Bajpai, P. (2013). *Advances in bioethanol*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1584-4>
- Bamforth, C. W., y Cook, D. J. (2019). *Food, fermentation, and micro-organisms* (2nd ed.). John Wiley & Sons.
- Basile, A., Iulianelli, A., Dalena, F., y Veziroğlu, T. N. (Eds.). (2019). *Ethanol: Science and engineering*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-01422-5>
- Basso, L. C., Basso, T. O., y Rocha, S. N. (2011). Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation. En M. A. Santos (Ed.), *Biofuel production: Recent developments and prospects* (pp. 85-100). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/17047>

- Basso, L. C., De Amorim, H. V., De Oliveira, A. J., y Lopes, M. L. (2008). Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1155-1163. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x>
- Basso, T. O., Gomes, F. S., Lopes, M. L., de Amorim, H. V., Eggleston, G., y Basso, L. C. (2014). Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(1), 169-177. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0063-6>
- Basso, T. O., y Lino, F. S. O. (2019). Clash of kingdoms: How do bacterial contaminants thrive in and interact with yeasts during ethanol production? En T. P. Basso y L. C. Basso (Eds.), *Fuel ethanol production from sugarcane* (pp. 23-38). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.78413>
- Beckner, M., Ivey, M. L., y Phister, T. G. (2011). Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letters in Applied Microbiology*, 53(4), 387-394. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03124.x>
- Bello, D., García, R., Otero, M. A., y Saura, G. (2005). Fermentación alcohólica con jugo de caña mezclado en Heriberto Duquesne. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 39(2), 29-34. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223120661006.pdf>
- Berenjian, A. (Ed.). (2019). *Essentials in fermentation technology*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-16230-6>
- Bergmann, J. C., Trichez, D., Sallet, L. P., Silva, F., y Almeida, J. R. (2018). Technological advancements in 1G ethanol production and recovery of by-products based on the biorefinery concept. En A. Chandel y M. H. L. Silveira (Eds.), *Advances in sugarcane biorefinery* (pp. 73-95). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804534-3.00004-5>
- Biart, J. R., Serrano, P., y Conde, J. (1982). *Estudio de las mieles finales de la caña de azúcar*. Editorial Científico - Técnica.
- Bonatelli, M. L., Ienczak, J. L., y Labate, C. A. (2019). Sugarcane must fed-batch fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: impact of sterilized and non-sterilized sugarcane must. *Antonie van Leeuwenhoek*, 112(8), 1177-1187. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01250-2>

- Bonatelli, M. L., Quecine, M. C., Silva, M. S., y Labate, C. A. (2017). Characterization of the contaminant bacterial communities in sugarcane first-generation industrial ethanol production. *FEMS Microbiology Letters*, 364(17). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx159>
- Bordiga, M. (Ed.). (2018). *Post-fermentation and -distillation technology: Stabilization, aging, and spoilage*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315155050>
- Borroto, D., Lorenzo, M., García, R., y Reyes, A. (2017). Aspectos generales sobre la determinación de alcoholes superiores en bebidas alcohólicas. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 51(3), 58-64. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223158039009.pdf>
- Borroto, D., Lorenzo, M., Herrera, N., Reyes, A., y Mato, S. (2020). Determinación de alcoholes superiores por cromatografía de gases y espectrofotometría. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 54(1), 59-63. <https://www.revista.icidca.azcuba.cu/wp-content/uploads/2020/07/articulo-11.pdf>
- Brar, S. K., Das, R. K., y Sarma, S. J. (Eds.). (2019). *Microbial sensing in fermentation*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781119248002>
- Brexó, R. P., y Sant'Ana, A. d. S. (2017). Microbial interactions during sugar cane must fermentation for bioethanol production: does quorum sensing play a role? *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(2), 231-244. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1332570>
- Buckeridge, M. S., y De Souza, A. P. (Eds.). (2017). *Advances of basic science for second generation bioethanol from sugarcane*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-49826-3>
- Carrazana, L. (1987). *Análisis agroindustrial azucarero. Teoría y práctica*. Editorial Pueblo y Educación.
- Carvalho-Netto, O. V., Carazzolle, M. F., Mofatto, L. S., Teixeira, P. J. P. L., Noronha, M. F., Calderón, L. A. L., Mieczkowski, P. A., Argueso, J. L., y Pereira, G. A. G. (2015). *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0196-6>
- Ceballos, R. M. (2018). *Bioethanol and natural resources: Substrates, chemistry and engineered systems*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315154299>

- Ceccato-Antonini, S. R. (2018). Conventional and nonconventional strategies for controlling bacterial contamination in fuel ethanol fermentations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(6), 80. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2463-2>
- Chandel, A., y Silveira, M. H. L. (Eds.). (2018). *Advances in sugarcane biorefinery: Technologies, commercialization, policy issues and paradigm shift for bioethanol and by-products*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-02033-0>
- Cortés, M. F., Armas, A. C., Alomá, I., y Morales, M. (2021). Impacto de la extracción del jugo de los filtros en la sostenibilidad de un complejo azucarero industrial. *Centro Azúcar*, 48(1), 59-70. http://centroazucar.uclv.edu.cu/index.php/centro_azucar/article/view/642
- Cortez, L., Leal, M., y Nogueira, L. (Eds.). (2019). *Sugarcane bioenergy for sustainable development: Expanding production in Latin America and Africa*. Routledge. <https://doi.org/10.4324/9780429457920>
- Costa, G., Messias, R. C., Lozano, E. d. V., Nogueira, L. C., y Blanco, L. M. (2018). The effect of calcium concentration on the physiology of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in fermentation. *Sugar Tech*, 20(3), 371-374. <https://doi.org/10.1007/s12355-018-0603-5>
- Costa, M., Cerri, B. C., y Ceccato-Antonini, S. R. (2018). Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate *Lactobacillus fermentum* from the fermentation process for fuel ethanol production. *Letters in Applied Microbiology*, 66(1), 77-85. <https://doi.org/10.1111/lam.12819>
- Costa, O., Souto, B. M., Tupinambá, D. D., Bergmann, J. C., Kyaw, C. M., Kruger, R. H., Barreto, C. C., y Quirino, B. F. (2015). Microbial diversity in sugarcane ethanol production in a Brazilian distillery using a culture-independent method. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(1), 73-84. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1533-1>
- Crespo, Y. (2014). *Alternativas de incremento de la eficiencia en fermentación alcohólica en la destilería Heriberto Duquesnet* [Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Químico, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas]. Santa Clara, Cuba.
- Cuellar, H., Rodríguez, J., Estévez, R., Saura, G., Garit, C., y Guardia, M. (2012). *Manual de cálculo para el control de la producción de alcohol*. Editorial ICIDCA.
- D'Amore, T. (1992). Cambridge prize lecture improving yeast fermentation performance. *Journal of the Institute of Brewing*, 98(5), 375-382. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1992.tb01119.x>

- Da Silva-Neto, J. M., Covre, E. A., Rosa, B. C., y Ceccato-Antonini, S. R. (2020). Can ethanol partially or fully replace sulfuric acid in the acid wash step of bioethanol production to fight contamination by *Lactobacillus fermentum*? *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s43153-020-00033-x>
- Dalena, F., Senatore, A., Iulianelli, A., Di Paola, L., Basile, M., y Basile, A. (2019). Ethanol from biomass: Future and perspectives. En A. Basile, A. Iulianelli, F. Dalena, y T. N. Veziroğlu (Eds.), *Ethanol: Science and engineering* (pp. 25-59). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811458-2.00002-X>
- De Armas, A. C., Lamas, Y., Albriza, M. T., y González, E. (2020). Posibilidades de utilización del jugo de los filtros en una fábrica de azúcar con destilería. *El Directivo al Día*, 20(2), 27-36.
- De la Cruz, R., González, E., y Abreu, A. (2000). Alternativas de la combinación de sustratos para la fermentación alcohólica en la destilería anexa al Complejo Agroindustrial Azucarero Melanio Hernández. *Centro Azúcar*, 27(4), 22-28.
- De la Cruz, R., González, E., y Domínguez, E. R. (2003). Optimización de las etapas de fermentación y destilación en la operación de producción de aguardiente a partir de sustratos alternativos. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 33(2-3), 51-56.
- De Lima, L. M., y Bacchi, M. R. P. (2018). Global ethanol market: Commercialization trends, regulations, and key drivers. En A. Chandel y M. H. L. Silveira (Eds.), *Advances in sugarcane biorefinery* (pp. 253-277). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804534-3.00013-6>
- De Matos, M., Santos, F., y Eichler, P. (2020). Sugarcane world scenario. En F. Santos, S. C. Rabelo, M. De Matos, y P. Eichler (Eds.), *Sugarcane biorefinery, technology and perspectives* (pp. 1-19). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814236-3.00001-9>
- De Moraes, M. A. F. D., y Zilberman, D. (2014). *Production of ethanol from sugarcane in Brazil: From state intervention to a free market* (Vol. 43). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-03140-8>
- De Oliveira, T. A., Batista, F., Bernadete, M., y de Almeida, J. B. (2016). Producción de aguardiente utilizando extracto de alfa ácidos del lúpulo en el control biocida del proceso fermentativo. *Centro Azúcar*, 43(1), 18-24. http://centroazucar.uclv.edu.cu/index.php/centro_azucar/article/view/126/119

- De Souza, A. K., y De Farias, C. E. (2019). Bioethanol in Brazil: Status, challenges and perspectives to improve the production. En C. R. Ramesh y S. Ramachandran (Eds.), *Bioethanol production from food crops* (pp. 417-443). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813766-6.00021-7>
- De Souza, R. B., Santos, B. M. D., De Fátima, R., Silva, P. K., Lucena, B. T. L., y de Moraes, M. A. (2012). The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(11), 1645-1650. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1167-0>
- Dean, A., Morris, M., Stufken, J., y Bingham, D. (Eds.). (2015). *Handbook of design and analysis of experiments*. Chapman and Hall/CRC. <https://doi.org/10.1201/b18619>
- Díaz, J., García, A., González, L. Y., Luis, J., y Díaz, M. L. V. (2019). Adsorción de impurezas del jugo clarificado de la industria azucarera mediante biomasa pirolizada. *Revista Cubana de Química*, 31(3), 463-477. <https://cubanaquimica.uo.edu.cu/index.php/cq/article/view/5027/4498>
- Díaz, J., Luis, J., y Dueñas, S. (2020). *Control de la contaminación bacteriana en la producción de etanol por vía fermentativa*. Monografías de la Universidad de Matanzas. ISBN: 978-959-16-4472-5. <http://monografias.umcc.cu/monos/2020/FCTec/mo20194.pdf>
- Díaz, M., Saura, G., y Pérez, I. (2019). La producción de levadura *Candida utilis* (levadura Torula). En L. O. Gálvez (Ed.), *Resultados de los institutos cubanos de investigación, desarrollo e innovación en las tecnologías sobre azúcar y derivados* (pp. 338-351). Editorial ICIDCA.
- Duarte, A., Salgado, A., Lemos, S. V., Alves de Souza, M. A., y Antunes, F. d. A. (2019). Proposal of operating best practices that contribute to the technical efficiency in Brazilian sugar and ethanol mills. *Journal of Cleaner Production*, 214, 173-184. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.12.204>
- El-Mansi, E., Nielsen, J., Mousdale, D., y Carlson, R. (Eds.). (2019). *Fermentation microbiology and biotechnology* (4th ed.). CRC press. <https://doi.org/10.1201/9780429506987>
- Estévez, R. (2005). *Apuntes acerca de los jugos de caña para su uso en la fermentación alcohólica*. La Habana: Ministerio del Azúcar.
- Estévez, R. (2014). *Manual tecnológico industria alcoholera cubana. Tema 7: Fermentación*. Editorial ICIDCA, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar.

- Fabelo, J. A. (1999). *Estudio de la etapa de fermentación alcohólica utilizando mezcla de diferentes sustratos* [Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Técnicas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas]. Santa Clara, Cuba.
- Falcón, F., Peláez, M., y Esturo, C. (1995). *Manual de operaciones para la producción de azúcar crudo de caña*. Dirección de Tecnología, Ministerio del Azúcar.
- Fernández, K., Morales, Y., Nápoles, M., González, E., y Cruz, M. (2008). Estudio de la extracción de los jugos secundarios en la refinería del Central Argentina. *Centro Azúcar*, 28(2), 43-48. http://centroazucar.uclv.edu.cu/index.php/centro_azucar/article/view/507/512
- Freita, L. A., Masson, I. S., Freita, C. M., Ferreira, O. E., y Mutton, M. J. R. (2012). Evaluation of fermentative microbiota in broth of two *saccharin sorghum* genotypes. *Science & Technology: Fatec-JB*, 4. www.citec.fatecjab.edu.br/index.php/files/article/download/69/pdf
- Galano, O. (2016). *Manual de técnicas analíticas. Planta de cera refinada*. Editorial ICIDCA.
- Gálvez, L. O. (Ed.). (2000). *Manual de los derivados de la caña de azúcar* (3ra ed.). Editorial ICIDCA.
- Gálvez, L. O. (Ed.). (2019). *Resultados de los institutos cubanos de investigación, desarrollo e innovación en las tecnologías sobre azúcar y derivados*. Editorial ICIDCA.
- García, R., Pérez, A., Diéguez, K., Mesa, L., González, I., González, M., y González, E. (2015). Incorporación de otras materias primas como fuentes de azúcares fermentables en destilerías existentes de alcohol. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 75, 130-142. <https://doi.org/10.17533/udea.redin.n75a13>
- Goldstein, W. E. (2017). *The science of ethanol*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315307398>
- Gómez, M. J., Romero, R., Molina, R. D., Terrazas, S., y Nuñez, O. (2016). Uso de la metodología del diseño por mezclas en el sector agrícola. *Cultura Científica y Tecnológica*, 1(55). <http://erevistas.uacj.mx/ojs/index.php/culcyt/article/view/761>
- González, E., y Miño, J. E. (2015). *Vías para la gestión de conocimientos con apoyo de la comunidad científica para contribuir a la mitigación del impacto ambiental de la industria química y fermentativa*. Editorial Universitaria de la Universidad Nacional de Misiones (EdUNaM). <https://editorial.unam.edu.ar/>

- González, H., Hernández, J., y Hendrik, J. (2020). Metanol: tolerancias y exigencias en las normas para mezcal y bebidas de agave. *RIVAR, Revista Iberoamericana de Viticultura, Agroindustria y Ruralidad*, 7(19), 1-21. <https://doi.org/10.35588/rivar.v7i19.4246>
- González, M., Barceló, Y., Albornas, Y., y González, E. (2009). Factibilidad de obtención de bioetanol a partir de diferentes materias primas. *Centro Azúcar*, 36(4), 5-13. http://centroazucar.uclv.edu.cu/index.php/centro_azucar/article/view/481/481
- Green, D. W., y Southard, M. Z. (2019). *Perry's Chemical Engineers' Handbook* (9th ed.). McGraw-Hill Education.
- Guerra, M., Correa, Y., Medel, F., Martínez, L., y Pérez, O. (1995). Estudio de la fermentación alcohólica con vinculación de otros sustratos. Análisis económico. *Centro Azúcar*, 22(3), 24-30.
- Gumienna, M., Szambelan, K., Jeleń, H., y Czarnecki, Z. (2014). Evaluation of ethanol fermentation parameters for bioethanol production from sugar beet pulp and juice. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(4), 543-549. <https://doi.org/10.1002/jib.181>
- Gutiérrez, H., y De la Vara, R. (2012). *Análisis y diseño de experimentos* (3ra ed.). McGraw-Hill.
- Ibáñez, M.-L. (2018). *Rehabilitación de la destilería "Héctor Molina" para la producción de etanol a partir de jugos de los filtros y secundarios* [Tesis en opción al título de Máster en Análisis y Control de Procesos, Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría"]. La Habana, Cuba.
- Ibáñez, M.-L., Saura, G., Pérez, I., Pérez, O., y Zumalacárregui, L. (2018). Análisis de alternativas para la producción de etanol a partir de jugos de los filtros y jugos secundarios. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 52(1), 21-29. <https://www.revista.icidca.azcuba.cu/wp-content/uploads/2019/06/art%C3%ADculo4.pdf>
- Ibáñez, M., Saura, G., García, R., Carrera, E., Herrera, N., Lorenzo, M., y Reyes, A. (2020). Potencial fermentativo de mieles finales para la producción de etanol en las destilerías. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 54(2), 54-58. <https://www.revista.icidca.azcuba.cu/wp-content/uploads/2020/11/articulo-8-1.pdf>
- Jalilnejad, E., y Ghasemzadeh, K. (2019). Ethanol for food or transportation: A kind of competition. En A. Basile, A. Iulianelli, F. Dalena, y T. N. Veziroğlu (Eds.), *Ethanol: Science and engineering* (pp. 103-129). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811458-2.00004-3>

- Jimenez, A. (2017). *Evaluación del comportamiento del contenido de almidón y su desdoblamiento con alfa amilasa en el proceso de producción de azúcar crudo* [Tesis en opción al título de Máster en Ingeniería Asistida por Computadora, Universidad de Matanzas]. Matanzas, Cuba. http://cefes.umcc.cu/miac/thesis/3ed/2017_Adielis_Jimenez_Cardenas.pdf
- Jover, J., Estévez, R., y Martínez, L. (1998). Caracterización de la fermentación alcohólica de melazas y su incidencia en la calidad del aguardiente I. *Centro Azúcar*, 25(3), 5-8.
- Kaur, S., Kaler, R. S. S., y Aamarpali. (2002). Effect of starch on the rheology of molasses. *Journal of Food Engineering*, 55(4), 319-322. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00108-5](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00108-5)
- Khan, M. T., y Khan, I. A. (Eds.). (2019). *Sugarcane biofuels: Status, potential, and prospects of the sweet crop to fuel the world*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-18597-8>
- Klibansky, M., González, L., Plaza, A., Rodríguez, M., y Verdecia, O. (1985). Evaluación de diferentes métodos de tratamiento de jugo de caña para la producción de alcohol. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 19(3), 1-5.
- Kohler, M. (2019). Economic assessment of ethanol production. En A. Basile, A. Iulianelli, F. Dalena, y T. N. Veziroğlu (Eds.), *Ethanol: Science and engineering* (pp. 505-521). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811458-2.00019-5>
- Kuila, A., y Sharma, V. (Eds.). (2018). *Principles and applications of fermentation technology*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781119460381>
- Küüt, A., Ritslaid, K., Küüt, K., Ilves, R., y Olt, J. (2019). State of the art on the conventional processes for ethanol production. En A. Basile, A. Iulianelli, F. Dalena, y T. N. Veziroğlu (Eds.), *Ethanol: Science and engineering* (pp. 61-101). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811458-2.00003-1>
- Láinez, M., Ruiz, H. A., Arellano-Plaza, M., y Martínez-Hernández, S. (2019). Bioethanol production from enzymatic hydrolysates of *Agave salmiana* leaves comparing *S. cerevisiae* and *K. marxianus*. *Renewable Energy*, 138, 1127-1133. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.02.058>
- Laluce, C., Leite, G., Zavitoski, B., Zamai, T., y Ventura, R. (2016). Fermentation of sugarcane juice and molasses for ethanol production. En I. O'Hara y S. Mundree (Eds.), *Sugarcane-based biofuels and bioproducts* (pp. 53-86). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118719862.ch3>

- Lazar, M. D., Senila, L., Dan, M., y Mihet, M. (2019). Crude bioethanol reforming process: The advantage of a biosource exploitation. En A. Basile, A. Iulianelli, F. Dalena, y T. N. Veziroğlu (Eds.), *Ethanol: Science and engineering* (pp. 257-288). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811458-2.00010-9>
- Lopes, M. L., Paulillo, S. C. d. L., Godoy, A., Cherubin, R. A., Lorenzi, M. S., Giometti, F. H. C., Bernardino, C. D., Amorim Neto, H. B. d., y Amorim, H. V. d. (2016, 2016). Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*, 64-76. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.003>
- Lorenzo, M., Borroto, D., y Porto, O. (2014). Estado del arte sobre determinaciones de carbamato de etilo y las concentraciones legisladas para bebidas fermentadas y destiladas. *Centro Azúcar*, *41*(3), 55-63. http://centrozucar.uclv.edu.cu/index.php/centro_azucar/article/view/263/254
- Lucena, B. T. L., dos Santos, B. M., Moreira, J. L. S., Moreira, A. P. B., Nunes, A. C., Azevedo, V., Miyoshi, A., Thompson, F. L., y de Morais, M. A. (2010). Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiology*, *10*(1), 298-306. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-298>
- Maia, N. J. L., Corrêa, J. A. F., Rigotti, R. T., da Silva Junior, A. A., y Luciano, F. B. (2019). Combination of natural antimicrobials for contamination control in ethanol production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*(10), 158. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2734-6>
- Marques, W. L., Raghavendran, V., Stambuk, B. U., y Gombert, A. K. (2016). Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. *FEMS Yeast Research*, *16*(1). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov107>
- Martínez, Y., Penin, E., González, V., y González, E. (2013). Estudio preliminar de la mezcla agua-vinazas-flemazas y su impacto en la etapa de fermentación en la producción de etanol. *Tecnología Química*, *33*(3), 206-211.
- Mendonça, A. A., da Silva, P. K. N., Calazans, T. L. S., de Souza, R. B., Elsstein, C., y de Morais Junior, M. A. (2020). Gene regulation of the *Lactobacillus vini* in response to industrial stress in the fuel ethanol production. *Microbiological Research*, *236*, 126450. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126450>

- Mendonça, A. A., Lucena, B. T. L., Morais, M. M. C., y Morais, M. A. (2016). First identification of Tn916-like element in industrial strains of *Lactobacillus vini* that spread the tet-M resistance gene. *FEMS Microbiology Letters*, 363 (3). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv240>
- Mesa, L., González, E., González, M., y Agüero, G. (2005). La producción de etanol. Alternativas de materias primas. *Revista Cubana de Química*, 17(1), 129-137. <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543685055.pdf>
- Mesa, L., González, E., González, M., Agüero, G., y Benitez, T. (2006). Estudio preliminar del mezclado de los sustratos: jugo de los filtros, jugos secundarios y miel en la producción de etanol. *Centro Azúcar*, 33(4), 32-36.
- Mesa, L., Martínez, Y., Celia de Armas, A., y González, E. (2020). Ethanol production from sugarcane straw using different configurations of fermentation and techno-economical evaluation of the best schemes. *Renewable Energy*, 156, 377-388. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.04.091>
- Montgomery, D. C. (2019). *Design and analysis of experiments* (10th ed.). John Wiley & Sons.
- Morales, M., Armas, A., Mesa, L., Acosta, D., y González, E. (2018). Avances en el uso del licor hidrolizado de bagazo en la fermentación de mezclas azucaradas. *Afinidad*, 75(581), 61-65. <https://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/view/335964/426756>
- Morales, M., Quintero, J., Conejeros, R., y Aroca, G. (2015). Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Environmental impacts and energy balance. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 1349-1361. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.097>
- Morales, Y., Nápoles, M., Fernández, K., y González, E. (2014). Evaluación del efecto de la extracción de los jugos secundarios en el sistema termoenergético de la empresa Siboney. *Centro Azúcar*, 41(1), 55-64. http://centroazucar.uclv.edu.cu/index.php/centro_azucar/article/view/246/237
- Muthaiyan, A., Limayem, A., y Ricke, S. C. (2011). Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(3), 351-370. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2010.06.005>
- Najafpour, G. D. (2015). *Biochemical engineering and biotechnology* (2nd ed.). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-09819-2>

- NC. (2005). *NC 264: 2005. Aguardiente. Especificaciones*. Oficina Nacional de Normalización, La Habana, Cuba.
- NC. (2007). *NC 290: 2007. Bebidas alcohólicas. Determinación del grado alcohólico en alcoholes, bebidas alcohólicas destiladas, vinos, licores, bebidas alcohólicas preparadas, cocteles y extractos hidroalcohólicos*. Oficina Nacional de Normalización, La Habana, Cuba.
- NC. (2009). *NC 715: 2009. Miel final (Melaza). Especificaciones*. Oficina Nacional de Normalización, La Habana.
- NC. (2011). *NC 508: 2011. Bebidas alcohólicas. Determinación de componentes volátiles mayoritarios en bebidas alcohólicas destiladas, aguardientes y alcohol etílico por cromatografía gas líquido*. Oficina Nacional de Normalización, La Habana, Cuba.
- NC. (2017a). *NC 79: 2017. Determinación de cenizas conductimétricas en azúcar crudo, azúcar moreno, jugo, jarabe y melaza*. Oficina Nacional de Normalización, La Habana, Cuba.
- NC. (2017b). *NC 82: 2017. Determinación del color en solución de azúcares crudos, azúcares morenos y jarabes coloreados a pH 7,0*. Oficina Nacional de Normalización, La Habana, Cuba.
- Nitayavardhana, S., y Khanal, S. K. (2017). Ethanol Fermentation. En Y. Li y S. K. Khanal (Eds.), *Bioenergy: Principles and applications* (pp. 250-276). John Wiley & Sons.
- Núñez, A., Iliná, A., Ramos, R., Flores, C., Lorenzo, M., Aguilar, C., Michelena, G., Flores, A., y Martínez, J. L. (2020). Determinación de compuestos sensoriales en destilados obtenidos de fermentación alcohólica utilizando sistemas nanoestructurados magnéticos. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 54(1), 45-49. <https://www.revista.icidca.azcuba.cu/wp-content/uploads/2020/07/articulo-8.pdf>
- O'Hara, I. M., y Mundree, S. (Eds.). (2016). *Sugarcane-based biofuels and bioproducts*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118719862>
- Oliveira, M. R. B., Sunhiga, R. F., Castro, E., Pereira, E. B., y Baptista, A. S. (2019). Produção de etanol a partir de melaço de cana. *Revista de Estudos Ambientais*, 21(1), 38-45. <https://doi.org/10.7867/1983-1501.2019v21n1p38-45>
- Otero, M. A. (1997). *Las mieles finales de caña. Composición, propiedades y usos*. Editorial ICIDCA, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar.

- Otero, M. A., Estévez, R., Saura, G., Martínez, J. A., García, R., y Bello, D. (2010). Experiencias en la producción de etanol a partir de jugos de caña mezclados. Parte II. Efecto de la temperatura y la concentración de azúcares. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 43(1), 29-34. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120681004>
- Otero, M. A., García, R., Pérez, M. C., Martínez, J., Vasallo, M., Saura, G., y Bello, D. (2009). Producción de bioetanol a partir de mezclas de jugos-melazas de caña de azúcar. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 43(1), 17-22. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223120657003.pdf>
- Pandey, A., Larroche, C., Dussap, C.-G., Gnansounou, E., Khanal, S. K., y Ricke, S. (Eds.). (2019). *Biofuels: Alternative feedstocks and conversion processes for the production of liquid and gaseous biofuels* (2nd ed.). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2018-0-00957-3>
- PCC. (2017). *Bases del plan nacional de desarrollo económico y social hasta el 2030: Visión de la nación, ejes y sectores estratégicos. Documento aprobado por el VII Congreso del PCC*. La Habana: Editorial Granma. <http://www.granma.cu/file/pdf/gaceta/%C3%BA%20PDF%2032.pdf>
- Pérez, E., González, J. C., Chávez, M. C., y Cortés, C. (2013). Caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de jugo de *Agave cupreata* en la elaboración de mezcal. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 12(3), 451-461. <https://www.redalyc.org/pdf/620/62029966008.pdf>
- Pérez, F., y Fernández, F. (2006). *Métodos analíticos para azúcar crudo*. Publicaciones Azucareras, Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras (ICINAZ).
- Rabelo, S. C., de Paiva, L. B. B., Pin, T. C., Pinto, L. F. R., Tovar, L. P., y Nakasu, P. Y. S. (2020). Chemical and energy potential of sugarcane. En F. Santos, S. C. Rabelo, M. De Matos, y P. Eichler (Eds.), *Sugarcane biorefinery, technology and perspectives* (pp. 141-163). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814236-3.00008-1>
- Ramesh, C. R., y Ramachandran, S. (Eds.). (2019). *Bioethanol production from food crops: Sustainable sources, interventions, and challenges*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-00234-3>

- Ray, R., y Didier, M. (Eds.). (2015). *Microorganisms and fermentation of traditional foods*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b17307>
- Rein, P. (2017). *Cane sugar engineering* (2nd ed.). Verlag Dr. Albert Bartens KG.
- Reisman, H. B. (2019). *Economic analysis of fermentation processes*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429262562>
- Ribeiro, M. L. D., Ferreira, O. E., Teixeira, V., Mutton, M. A., y Mutton, M. J. R. (2017). Physico-chemical treatment of sugarcane juice produces quality cachaça. *Agronomic Science Magazine*, 48(3), 458-463. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20170053>
- Rich, J. O., Bischoff, K. M., Leathers, T. D., Anderson, A. M., Liu, S., y Skory, C. D. (2018). Resolving bacterial contamination of fuel ethanol fermentations with beneficial bacteria – An alternative to antibiotic treatment. *Bioresource Technology*, 247, 357-362. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.067>
- Rivero, R. P., Morales, M., y Mesa, L. (2012). Evaluación económica de la utilización de mezclas de sustratos azucarados para la producción de etanol. *Centro Azúcar*, 39(4), 29-35. <http://centroazucar.uclv.edu.cu/index.php/es/volumen-2012/numero-4>
- Sablayrolles, J.-M. (2019). Kinetics and control of alcoholic fermentation during wine production. En P. Romano, M. Ciani, y G. H. Fleet (Eds.), *Yeasts in the production of wine* (pp. 283-313). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9782-4_9
- Santos, F., Borém, A., y Caldas, C. (Eds.). (2015). *Sugarcane: Agricultural production, bioenergy and ethanol*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-02692-5>
- Santos, F., Eichler, P., De Queiroz, J. H., y Gomes, F. (2020). Production of second-generation ethanol from sugarcane. En F. Santos, S. C. Rabelo, M. De Matos, y P. Eichler (Eds.), *Sugarcane biorefinery, technology and perspectives* (pp. 195-228). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814236-3.00011-1>
- Santos, F., Eichler, P., Machado, G., De Mattia, J., y De Souza, G. (2020). By-products of the sugarcane industry. En F. Santos, S. C. Rabelo, M. De Matos, y P. Eichler (Eds.), *Sugarcane biorefinery, technology and perspectives* (pp. 21-48). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814236-3.00002-0>

- Santos, F., Rabelo, S. C., de Matos, M., y Eichler, P. (Eds.). (2020). *Sugarcane biorefinery, technology and perspectives*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-00884-4>
- Sarris, D., y Papanikolaou, S. (2016). Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies. *Engineering in Life Sciences*, 16(4), 307-329. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400199>
- Saura, G., Domenech, F., Martínez, J., García, R., Otero, M., Flimani, N., Cordovés, M., Armenteros, S., y Izquierdo, Y. (2006). *Desarrollo del programa integrado de producción de alcohol con la industria azucarera* (Informe Final Proyecto CITMA, No. 00103187). La Habana: Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar.
- Saura, G., García, R., Otero, M. A., Martínez, J. A., Bello, D., y Pérez, I. (2009). Experiencias en la producción de etanol a partir de jugos de caña mezclados. Parte I. Materias Primas. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 43(2), 42-46. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223120662003.pdf>
- Saura, G., Ibáñez, M.-L., y Valdivieso, J. M. (2019). Producción de alcohol a partir de subproductos de la industria azucarera. En L. O. Gálvez (Ed.), *Resultados de los institutos cubanos de investigación, desarrollo e innovación en las tecnologías sobre azúcar y derivados* (pp. 295-319). Editorial ICIDCA.
- Seguinot, P., Rollero, S., Sanchez, I., Sablayrolles, J.-M., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., y Mouret, J.-R. (2018). Impact of the timing and the nature of nitrogen additions on the production kinetics of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during winemaking fermentation in synthetic media. *Food microbiology*, 76, 29-39. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.04.005>
- Sheth, A., y Borse, P. (2018). Sugarcane vinasse, molasses, yeast cream: Agricultural, environmental, and industrial aspects. En A. Chandel y M. H. L. Silveira (Eds.), *Advances in sugarcane biorefinery* (pp. 153-161). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804534-3.00007-0>
- Soccol, C., Pandey, A., y Larroche, C. (Eds.). (2013). *Fermentation processes engineering in the food industry*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b14070>
- Spinosa, W. A., dos Santos Júnior, V., Galvan, D., Fiorio, J. L., y Gomez, R. J. H. C. (2016). Fermentation kinetics of rice syrup, with high content of dextrose equivalent, by *Saccharomyces*

- cerevisiae* and characterization of volatile compounds from wine. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(6), 1199-1205. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12702>
- Stanbury, P., Whitaker, A., y Hall, S. (2017). *Principles of fermentation technology* (3rd ed.). Butterworth-Heinemann. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-00186-7>
- Steindl, R. J. (2010). Clarification of cane juice for fermentation. *Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists*, 27, 1-10. https://eprints.qut.edu.au/34291/1/FP_02_Steindl.pdf
- Suárez, C., Garrido, N. A., y Guevara, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol: Revisión bibliográfica. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 50(1), 20-28. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223148420004.pdf>
- Torres, D. (2005). *Estudio de la etapa de fermentación alcohólica utilizando mezclas de diferentes sustratos* [Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Químico, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas]. Santa Clara, Cuba.
- Vamvakas, S. S., y Kapolos, J. (2020). Factors affecting yeast ethanol tolerance and fermentation efficiency. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(8), 114. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02881-8>
- Vasconcelos, J. N. (2015). Ethanol Fermentation. En F. Santos, A. Borém, y C. Caldas (Eds.), *Sugarcane: Agricultural production, bioenergy and ethanol* (pp. 311-340). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802239-9.00015-3>
- Vázquez, M., Cuellar, H., García, R., Díaz, M. E., Reyes, A., González, M. D., Méndez, J., Guardia, M., y Ibáñez, M. L. (2012). *Manual de técnicas analíticas para las destilerías*. Editorial ICIDCA, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar.
- Versari, A., Laurie, V. F., Ricci, A., Laghi, L., y Parpinello, G. P. (2014). Progress in authentication, typification and traceability of grapes and wines by chemometric approaches. *Food Research International*, 60, 2-18. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.007>
- Vidal, E., de Billerbeck, G. M., Simões, D. A., Schuler, A., François, J. M., y de Moraes, M. A. (2013). Influence of nitrogen supply on the production of higher alcohols/esters and expression of flavour-related genes in cachaça fermentation. *Food Chemistry*, 138(1), 701-708. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.147>

- Vogel, H. C., y Todaro, C. M. (Eds.). (2014). *Fermentation and biochemical engineering handbook: Principles, process design, and equipment* (3rd ed.). William Andrew Publishing, Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-05779-4>
- Walker, G. M., Abbas, C., Ingledew, W. M., y Pilgrim, C. (2018). *The alcohol textbook* (6th ed.). Ethanol Technology Institute.
- Walker, G. M., y Walker, R. S. K. (2018). Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. En G. M. Gadd y S. Sariaslani (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 105, pp. 87-129). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.05.003>
- Walter, A. L., Yang, D., Zeng, Z., Bayrock, D., Urriola, P. E., y Shurson, G. C. (2019). Assessment of antibiotic resistance from long-term bacterial exposure to antibiotics commonly used in fuel ethanol production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(4), 66. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2641-x>
- Wikandari, R., Sanjaya, A. P., Millati, R., Karimi, K., y Taherzadeh, M. J. (2019). Fermentation inhibitors in ethanol and biogas processes and strategies to counteract their effects. En A. Pandey, C. Larroche, C.-G. Dussap, E. Gnansounou, S. K. Khanal, y S. Ricke (Eds.), *Biofuels: Alternative feedstocks and conversion processes for the production of liquid and gaseous biofuels* (2nd ed., pp. 461-499). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816856-1.00020-8>
- Wu, R., Chen, D., Cao, S., Lu, Z., Huang, J., Lu, Q., Chen, Y., Chen, X., Guan, N., Wei, Y., y Huang, R. (2020). Enhanced ethanol production from sugarcane molasses by industrially engineered *Saccharomyces cerevisiae* via replacement of the PHO4 gene. *Royal Society of Chemistry Advances*, 10(4), 2267-2276. <https://doi.org/10.1039/C9RA08673K>
- Yousefi, T., y Ghasemzadeh, K. (2019). Ethanol economy: Environment, demand, and marketing. En A. Basile, A. Iulianelli, F. Dalena, y T. N. Veziroğlu (Eds.), *Ethanol: Science and engineering* (pp. 451-504). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811458-2.00018-3>
- Zhang, Z., Harrison, M. D., y O'Hara, I. M. (2016). Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse. En I. O'Hara y S. Mundree (Eds.), *Sugarcane-based biofuels and bioproducts* (pp. 87-110). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118719862.ch4>

ANEXOS

Anexo 1. Formación de etanol a partir del proceso de glucólisis enzimática

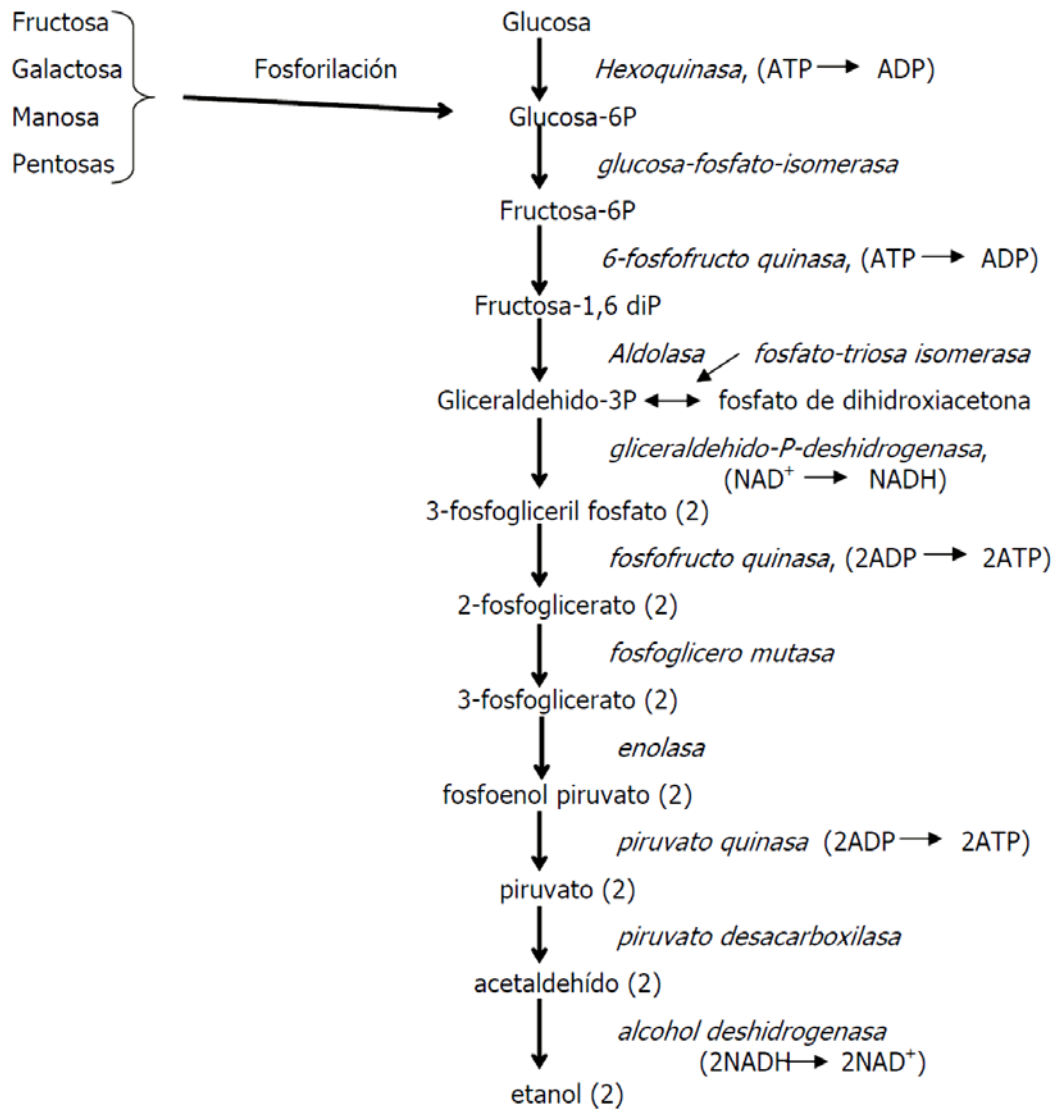


Figura 1.1 Ruta enzimática para la producción de etanol por vía fermentativa. Fuente: Otero (1997).

Anexo 2. Diagramas del proceso de fabricación de alcohol etílico

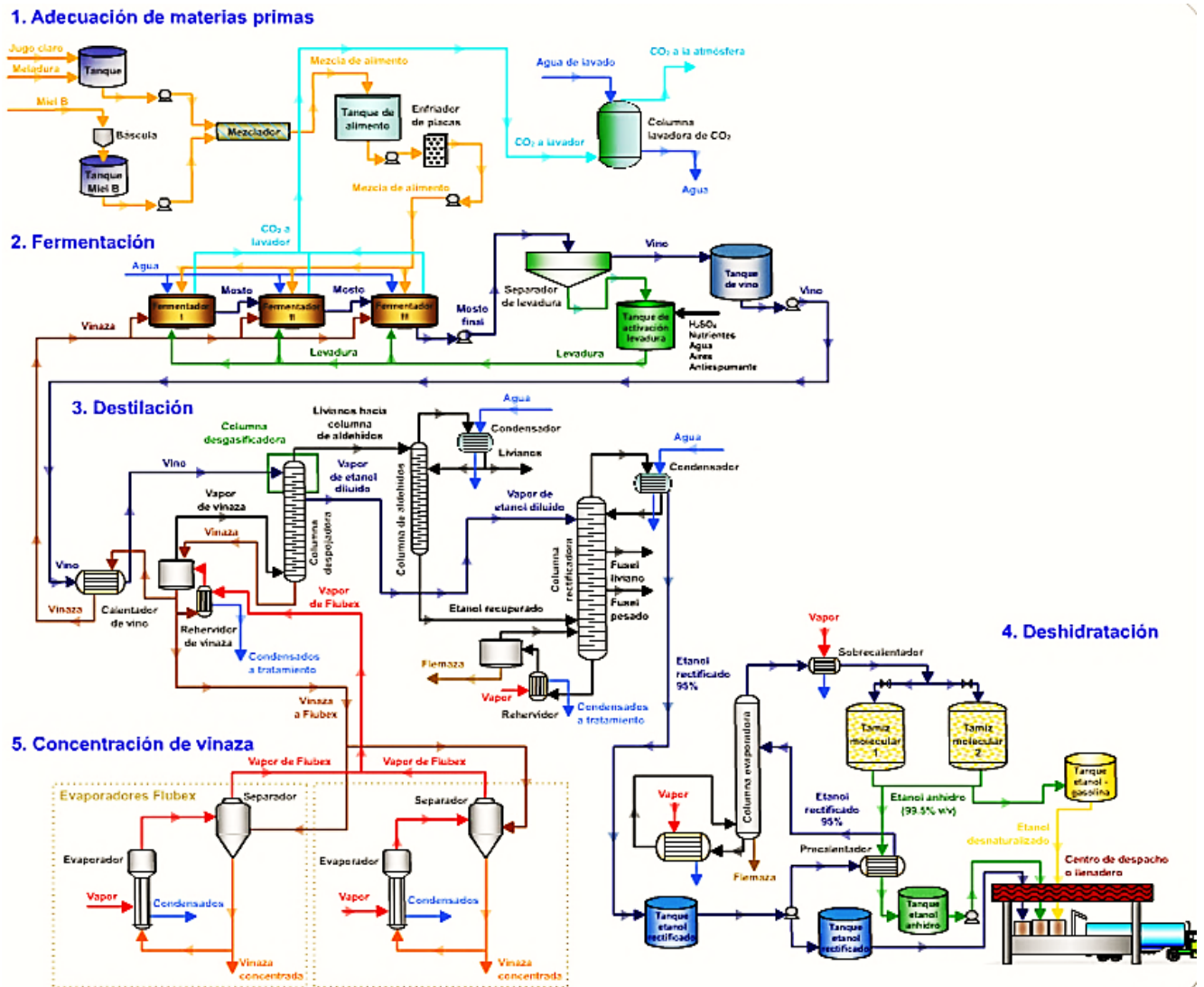


Figura 2.1 Diagrama de flujo del proceso tecnológico de producción de etanol

Fuente: www.cenicana.org/proceso-de-obtencion-de-etanol/

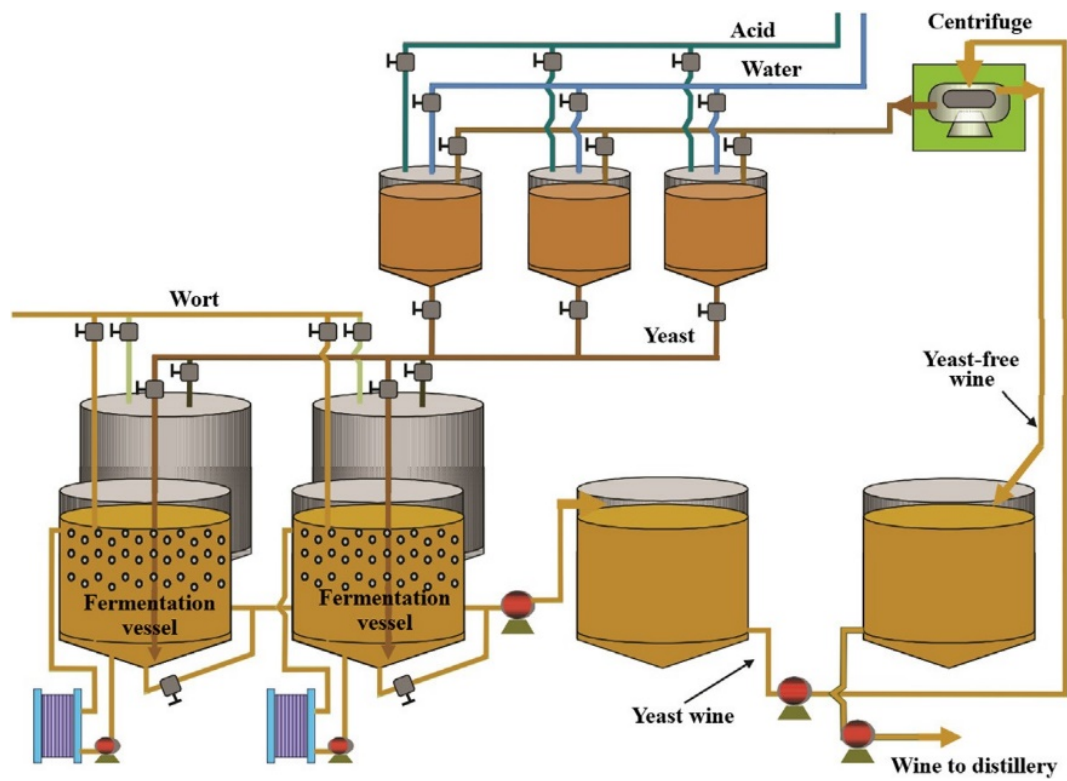


Figura 2.2 Diagrama del proceso de fermentación alcohólica de Melle-Boinot

Fuente: Santos, Rabelo, et al. (2020).

Anexo 3. Procedimientos empleados en la caracterización físico-química de los sustratos fermentativos

Tabla 3.1 Procedimientos utilizados en la caracterización físico-química de los jugos secundarios

| <i>Parámetros</i> | <i>Procedimientos</i> |
|--|--|
| Sólidos refractométricos disueltos (°Brix) | Pérez y Fernández (2006, p. 58) - C8 |
| Sólidos totales (%) | Pérez y Fernández (2006, p. 175) - C34 |
| Sacarosa [Pol] (%) | Pérez y Fernández (2006, p. 72) - C10 |
| Pureza (%) | Carrazana (1987, p. 278) |
| Azúcares reductores totales (%) | Pérez y Fernández (2006, p. 94) - C16 |
| Concentración de almidón (mg/L) | Pérez y Fernández (2006, p. 141) - C27 |
| Concentración de dextrana (mg/L) | Pérez y Fernández (2006, p. 169) - C32 |
| pH | Pérez y Fernández (2006, p. 113) - C18 |
| Acidez total | Pérez y Fernández (2006, p. 46) - C5 |
| Capacidad buffer | Pérez y Fernández (2006, p. 46) - C5 |
| Color ICUMSA (UI _{7.0}) | NC 82: 2017 |
| Turbiedad (UA) | Pérez y Fernández (2006, p. 137) - C25 |
| Cenizas conductimétricas (%) | NC 79: 2017 |
| Sólidos insolubles (%) | Pérez y Fernández (2006, p. 180) - C35 |
| Gomas acuosolubles (mL) | Pérez y Fernández (2006, p. 208) - C45 |
| Ceras (%) | Galano (2016) |
| Bagacillo (%) | Pérez y Fernández (2006, p. 139) - C26 |
| Concentración de fosfato [P ₂ O ₅] (mg/L) | Pérez y Fernández (2006, p. 134) - C24 |
| Magnesio [MgO] (%) | Otero (1997, p. 125) |
| Calcio [CaO] (%) | Otero (1997, p. 125) |
| Densidad [30°C] (g/mL) | Almazán <i>et al.</i> (1982) |
| Viscosidad [30°C] (mPa·s) | Almazán <i>et al.</i> (1982) |

Tabla 3.2 Procedimientos utilizados en la caracterización físico-química de la miel final

| <i>Parámetros</i> | <i>Procedimientos</i> |
|--|--|
| Sólidos areométricos disueltos (°Brix) | Vázquez <i>et al.</i> (2012, p. 52) |
| Sacarosa [Pol] (%) | Pérez y Fernández (2006, p. 72) - C10 |
| Pureza (%) | Carrazana (1987, p. 278) |
| Azúcares reductores totales (%) | Vázquez <i>et al.</i> (2012, p. 13) |
| Azúcares reductores libres (%) | Vázquez <i>et al.</i> (2012, p. 23) |
| Azúcares reductores infermentables (%) | Vázquez <i>et al.</i> (2012, p. 30) |
| Azúcares fermentables (%) | Vázquez <i>et al.</i> (2012, p. 30) |
| Concentración de almidón (mg/L) | Pérez y Fernández (2006, p. 141) - C27 |
| pH | Vázquez <i>et al.</i> (2012, p. 55) |
| Acidez total | Vázquez <i>et al.</i> (2012, p. 35) |
| Capacidad buffer | Almazán <i>et al.</i> (1982, p. 22) |
| Cenizas (%) | Otero (1997, p. 131) |
| Lodos (%) | Vázquez <i>et al.</i> (2012, p. 53) |
| Materia seca gravimétrica (%) | Otero (1997, p. 129) |
| Coloides (%) | Almazán <i>et al.</i> (1982, p. 21) |
| Nitrógeno total (%) | Otero (1997, p. 137) |
| Fósforo total [P ₂ O ₅] (%) | Otero (1997, p. 141) |
| Proteína bruta (%) | Otero (1997, p. 137) |
| Magnesio [MgO] (%) | Otero (1997, p. 125) |
| Calcio [CaO] (%) | Otero (1997, p. 125) |
| Densidad [30°C] (g/mL) | Almazán <i>et al.</i> (1982) |
| Viscosidad [60°C] (mPa·s) | Pérez y Fernández (2006, p. 182) - C36 |

Anexo 4. Caracterización físico-química de los sustratos empleados en la fermentación alcohólica durante una decena de días

Tabla 4.1 Resultados de la caracterización físico-química de la miel final (MF)

| <i>Parámetros</i> | <i>Días</i> | | | | | | | | | |
|--|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Sólidos areométricos disueltos (°Brix) | 82,16 | 81,04 | 84,12 | 82,25 | 81,20 | 84,03 | 80,11 | 82,55 | 83,63 | 81,34 |
| Sacarosa [Pol] (%) | 28,01 | 27,56 | 30,14 | 28,43 | 27,74 | 29,21 | 28,03 | 26,20 | 29,15 | 30,02 |
| Pureza (%) | 34,09 | 34,01 | 35,83 | 34,57 | 34,16 | 34,76 | 34,99 | 31,74 | 34,86 | 36,91 |
| Azúcares reductores totales (%) | 57,03 | 55,27 | 59,34 | 57,22 | 55,74 | 57,24 | 56,05 | 58,17 | 59,12 | 57,10 |
| Azúcares reductores libres (%) | 22,04 | 21,16 | 23,12 | 22,40 | 24,14 | 22,21 | 21,02 | 23,51 | 22,32 | 22,02 |
| Azúcares reductores infermentables (%) | 4,71 | 4,85 | 4,69 | 4,79 | 4,82 | 4,79 | 4,82 | 4,78 | 4,68 | 4,83 |
| Azúcares fermentables (%) | 52,32 | 50,42 | 54,65 | 52,43 | 50,92 | 52,45 | 51,23 | 53,39 | 54,44 | 52,27 |
| Concentración de almidón (mg/L) | 662,4 | 586,0 | 659,4 | 569,2 | 630,5 | 578,9 | 685,4 | 579,7 | 582,2 | 570,2 |
| pH | 5,29 | 5,30 | 5,59 | 5,36 | 5,42 | 5,39 | 5,45 | 5,28 | 5,37 | 5,12 |
| Acidez total | 0,64 | 0,62 | 0,60 | 0,63 | 0,61 | 0,65 | 0,63 | 0,64 | 0,63 | 0,59 |
| Capacidad buffer | 76,68 | 83,84 | 77,49 | 79,81 | 81,71 | 75,83 | 79,54 | 80,65 | 79,95 | 82,50 |
| Cenizas (%) | 6,55 | 7,13 | 6,88 | 7,11 | 7,30 | 6,73 | 7,34 | 7,25 | 7,22 | 7,51 |
| Lodos (%) | 3,90 | 4,30 | 4,20 | 4,10 | 4,50 | 4,00 | 4,20 | 4,30 | 4,10 | 4,40 |
| Materia seca gravimétrica (%) | 73,28 | 75,32 | 79,48 | 77,49 | 80,14 | 74,60 | 78,43 | 76,56 | 79,37 | 80,09 |
| Coloides (%) | 7,90 | 8,64 | 8,81 | 8,74 | 9,35 | 8,80 | 8,32 | 8,72 | 8,68 | 9,20 |
| Nitrógeno total (%) | 0,30 | 0,28 | 0,25 | 0,27 | 0,29 | 0,28 | 0,27 | 0,26 | 0,31 | 0,29 |
| Fósforo total [P2O5] (%) | 0,16 | 0,18 | 0,17 | 0,16 | 0,15 | 0,19 | 0,17 | 0,16 | 0,18 | 0,15 |
| Proteína bruta (%) | 1,88 | 1,75 | 1,56 | 1,69 | 1,81 | 1,75 | 1,69 | 1,63 | 1,94 | 1,81 |
| Magnesio [MgO] (%) | 0,35 | 0,31 | 0,33 | 0,32 | 0,34 | 0,32 | 0,33 | 0,36 | 0,34 | 0,30 |
| Calcio [CaO] (%) | 0,61 | 0,64 | 0,62 | 0,63 | 0,66 | 0,63 | 0,65 | 0,67 | 0,64 | 0,60 |
| Densidad [30°C] (g/mL) | 1,401 | 1,417 | 1,428 | 1,425 | 1,413 | 1,426 | 1,402 | 1,417 | 1,424 | 1,411 |
| Viscosidad [60°C] (mPa·s) | 1 631 | 1 609 | 1 647 | 1 623 | 1 615 | 1 653 | 1 602 | 1 629 | 1 638 | 1 599 |

Tabla 4.2 Resultados de la caracterización físico-química del jugo diluido (JD)

| Parámetros | Días | | | | | | | | | |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Sólidos refractométricos disueltos (°Brix) | 5,42 | 5,81 | 4,66 | 5,61 | 4,15 | 5,38 | 4,62 | 4,92 | 5,48 | 5,76 |
| Sólidos totales (%) | 7,43 | 7,65 | 8,14 | 8,51 | 7,80 | 8,76 | 8,50 | 7,98 | 8,72 | 8,86 |
| Sacarosa [Pol] (%) | 2,83 | 3,06 | 2,34 | 2,90 | 2,37 | 2,75 | 2,54 | 2,79 | 2,89 | 2,66 |
| Pureza (%) | 52,21 | 52,67 | 50,21 | 51,69 | 57,11 | 51,12 | 54,98 | 56,71 | 52,74 | 46,18 |
| Azúcares reductores totales (%) | 3,17 | 3,25 | 2,66 | 3,52 | 3,35 | 3,42 | 3,16 | 2,93 | 3,25 | 3,28 |
| Concentración de almidón (mg/L) | 656,3 | 578,5 | 596,3 | 674,2 | 587,3 | 752,56 | 629,2 | 650,1 | 542,8 | 779,2 |
| Concentración de dextrana (mg/L) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| pH | 5,58 | 5,64 | 5,53 | 5,62 | 5,59 | 5,48 | 5,69 | 5,57 | 5,61 | 5,67 |
| Acidez total | 0,019 | 0,017 | 0,018 | 0,018 | 0,017 | 0,016 | 0,020 | 0,018 | 0,019 | 0,017 |
| Capacidad buffer | 1,395 | 1,351 | 1,420 | 1,351 | 1,377 | 1,438 | 1,409 | 1,456 | 1,391 | 1,354 |
| Color ICUMSA (UI _{7.0}) | 15 150 | 17 065 | 14 321 | 16 701 | 15 109 | 17 217 | 16 122 | 13 704 | 12 189 | 14 527 |
| Turbiedad (UA) | 0,284 | 0,258 | 0,304 | 0,297 | 0,301 | 0,274 | 0,263 | 0,290 | 0,269 | 0,292 |
| Cenizas conductimétricas (%) | 0,191 | 0,184 | 0,162 | 0,180 | 0,176 | 0,143 | 0,154 | 0,182 | 0,175 | 0,164 |
| Sólidos insolubles (%) | 3,25 | 3,41 | 4,02 | 3,38 | 4,14 | 3,74 | 4,11 | 3,97 | 3,06 | 3,15 |
| Gomas acuosolubles (mL) | 5 | 4 | 4 | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 |
| Ceras (%) | 0,82 | 0,65 | 0,73 | 0,80 | 0,76 | 0,85 | 0,70 | 0,67 | 0,85 | 0,83 |
| Bagacillo (%) | 0,173 | 0,166 | 0,184 | 0,204 | 0,162 | 0,180 | 0,219 | 0,181 | 0,173 | 0,165 |
| Concentración de fosfato [P ₂ O ₅] (mg/L) | 122,30 | 149,42 | 139,85 | 126,53 | 133,41 | 147,17 | 136,11 | 133,25 | 120,59 | 135,67 |
| Magnesio [MgO] (%) | 0,302 | 0,321 | 0,296 | 0,342 | 0,315 | 0,330 | 0,298 | 0,349 | 0,336 | 0,347 |
| Calcio [CaO] (%) | 0,192 | 0,215 | 0,193 | 0,216 | 0,221 | 0,202 | 0,206 | 0,214 | 0,215 | 0,224 |
| Densidad [30°C] (g/mL) | 1,018 | 1,020 | 1,017 | 1,012 | 1,015 | 1,022 | 1,018 | 1,015 | 1,014 | 1,012 |
| Viscosidad [30°C] (mPa·s) | 0,862 | 0,927 | 1,023 | 0,950 | 0,902 | 0,834 | 0,977 | 0,962 | 0,910 | 0,992 |

Tabla 4.3 Resultados de la caracterización físico-química del jugo de los filtros de cachaza (JF)

| Parámetros | Días | | | | | | | | | |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Sólidos refractométricos disueltos (°Brix) | 14,21 | 13,45 | 13,07 | 14,03 | 12,42 | 14,23 | 14,20 | 13,34 | 12,38 | 13,25 |
| Sólidos totales (%) | 24,21 | 23,85 | 24,96 | 24,80 | 22,64 | 25,12 | 24,12 | 24,18 | 22,85 | 24,11 |
| Sacarosa [Pol] (%) | 10,85 | 11,48 | 11,30 | 11,69 | 9,94 | 12,35 | 11,88 | 10,68 | 10,85 | 11,55 |
| Pureza (%) | 76,35 | 85,35 | 86,46 | 83,32 | 80,03 | 86,79 | 83,66 | 80,06 | 87,64 | 87,17 |
| Azúcares reductores totales (%) | 16,85 | 17,24 | 16,54 | 17,74 | 17,45 | 16,90 | 18,12 | 17,38 | 17,22 | 16,51 |
| Concentración de almidón (mg/L) | 1808,3 | 1723,2 | 1164,3 | 1768,7 | 1556,1 | 1778,7 | 1832,5 | 1641,0 | 1552,1 | 1716,2 |
| Concentración de dextrana (mg/L) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| pH | 5,92 | 5,84 | 5,81 | 5,73 | 5,75 | 5,83 | 5,82 | 5,78 | 5,77 | 5,86 |
| Acidez total | 0,025 | 0,023 | 0,026 | 0,025 | 0,028 | 0,024 | 0,025 | 0,023 | 0,027 | 0,023 |
| Capacidad buffer | 1,483 | 1,532 | 1,505 | 1,512 | 1,537 | 1,520 | 1,533 | 1,508 | 1,557 | 1,489 |
| Color ICUMSA (UI _{7.0}) | 17 256 | 17 694 | 20 345 | 18 721 | 19 862 | 17 124 | 17 503 | 17 409 | 16 205 | 18 624 |
| Turbiedad (UA) | 0,321 | 0,360 | 0,357 | 0,374 | 0,348 | 0,332 | 0,326 | 0,359 | 0,337 | 0,310 |
| Cenizas conductimétricas (%) | 0,684 | 0,741 | 0,753 | 0,712 | 0,694 | 0,723 | 0,740 | 0,722 | 0,740 | 0,705 |
| Sólidos insolubles (%) | 8,71 | 5,93 | 7,87 | 8,56 | 8,82 | 8,72 | 8,73 | 6,95 | 8,74 | 8,03 |
| Gomas acuosolubles (mL) | 13 | 16 | 15 | 16 | 15 | 14 | 15 | 16 | 14 | 17 |
| Ceras (%) | 1,35 | 1,75 | 1,60 | 1,73 | 1,53 | 1,36 | 1,66 | 1,35 | 1,54 | 1,42 |
| Bagacillo (%) | 0,055 | 0,082 | 0,066 | 0,072 | 0,063 | 0,061 | 0,077 | 0,063 | 0,072 | 0,067 |
| Concentración de fosfato [P ₂ O ₅] (mg/L) | 194,2 | 234,3 | 190,6 | 185,5 | 183,7 | 198,2 | 201,3 | 219,6 | 234,1 | 226,9 |
| Magnesio [MgO] (%) | 0,552 | 0,574 | 0,568 | 0,576 | 0,572 | 0,591 | 0,583 | 0,567 | 0,572 | 0,585 |
| Calcio [CaO] (%) | 0,408 | 0,425 | 0,440 | 0,436 | 0,429 | 0,434 | 0,418 | 0,429 | 0,436 | 0,441 |
| Densidad [30°C] (g/mL) | 1,048 | 1,056 | 1,049 | 1,060 | 1,053 | 1,055 | 1,061 | 1,051 | 1,049 | 1,052 |
| Viscosidad [30°C] (mPa·s) | 1,374 | 1,423 | 1,574 | 1,520 | 1,351 | 1,418 | 1,348 | 1,381 | 1,443 | 1,374 |

Anexo 5. Valores experimentales de viabilidad celular y gemación obtenidos en los mostos fermentados

Tabla 5.1 Porcentajes de viabilidad celular y gemación en los mostos fermentados

| <i>Parámetros</i> | <i>Mezclas</i> | <i>Réplicas experimentales</i> | | | <i>Media</i> | <i>Desviación estándar</i> | <i>Coefficiente de variación (%)</i> |
|------------------------|----------------|--------------------------------|----------|----------|--------------|----------------------------|--------------------------------------|
| | | <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | | | |
| Viabilidad celular (%) | MF | 93 | 95 | 94 | 94 | 1,00 | 1,06 |
| | JD | 87 | 84 | 86 | 86 | 1,53 | 1,78 |
| | JF | 92 | 91 | 95 | 93 | 2,08 | 2,25 |
| | JD + MF | 91 | 89 | 90 | 90 | 1,00 | 1,11 |
| | JF + MF | 90 | 92 | 91 | 91 | 1,00 | 1,10 |
| | JD + JF | 90 | 89 | 88 | 89 | 1,00 | 1,12 |
| | JD + JF + MF | 96 | 95 | 97 | 96 | 1,00 | 1,04 |
| Gemación (%) | MF | 38 | 40 | 39 | 39 | 1,00 | 2,56 |
| | JD | 23 | 24 | 25 | 24 | 1,00 | 4,17 |
| | JF | 37 | 39 | 38 | 38 | 1,00 | 2,63 |
| | JD + MF | 31 | 33 | 32 | 32 | 1,00 | 3,13 |
| | JF + MF | 38 | 36 | 35 | 36 | 1,53 | 4,20 |
| | JD + JF | 29 | 28 | 29 | 29 | 0,58 | 2,01 |
| | JD + JF + MF | 44 | 42 | 43 | 43 | 1,00 | 2,33 |

Anexo 6. Resultados de las variables de respuesta del diseño de experimentos

Tabla 6.1 Valores experimentales de las variables de respuesta

| Variables de respuesta | Mezclas | Réplicas experimentales | | | Media | Desviación estándar | Coeficiente de variación (%) |
|-----------------------------|--------------|-------------------------|-------|-------|-------|---------------------|------------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | | | |
| Grado alcohólico (%) | MF | 6,39 | 6,40 | 6,41 | 6,40 | 0,01 | 0,16 |
| | JD | 5,50 | 5,50 | 5,60 | 5,53 | 0,06 | 1,04 |
| | JF | 6,40 | 6,40 | 6,35 | 6,38 | 0,03 | 0,45 |
| | JD + MF | 6,21 | 6,22 | 6,24 | 6,22 | 0,02 | 0,25 |
| | JF + MF | 6,36 | 6,34 | 6,37 | 6,36 | 0,02 | 0,24 |
| | JD + JF | 6,00 | 6,10 | 6,00 | 6,03 | 0,06 | 0,96 |
| | JD + JF + MF | 6,71 | 6,70 | 6,70 | 6,70 | 0,01 | 0,09 |
| Rendimiento alcohólico (%) | MF | 58,62 | 57,66 | 58,27 | 58,18 | 0,49 | 0,84 |
| | JD | 51,40 | 51,89 | 52,34 | 51,88 | 0,47 | 0,90 |
| | JF | 54,24 | 54,24 | 54,04 | 54,17 | 0,11 | 0,21 |
| | JD + MF | 56,15 | 56,14 | 56,42 | 56,23 | 0,16 | 0,28 |
| | JF + MF | 55,30 | 54,66 | 55,39 | 55,12 | 0,40 | 0,73 |
| | JD + JF | 53,10 | 54,46 | 53,10 | 53,55 | 0,79 | 1,47 |
| | JD + JF + MF | 59,38 | 59,29 | 58,77 | 59,15 | 0,33 | 0,56 |
| Eficiencia fermentativa (%) | MF | 90,58 | 89,09 | 90,04 | 89,90 | 0,76 | 0,84 |
| | JD | 79,42 | 80,17 | 80,87 | 80,15 | 0,72 | 0,90 |
| | JF | 83,80 | 83,80 | 83,50 | 83,70 | 0,17 | 0,21 |
| | JD + MF | 86,76 | 86,74 | 87,17 | 86,89 | 0,25 | 0,28 |
| | JF + MF | 85,45 | 84,45 | 85,59 | 85,16 | 0,62 | 0,73 |
| | JD + JF | 82,04 | 84,15 | 82,04 | 82,74 | 1,22 | 1,47 |
| | JD + JF + MF | 91,75 | 91,61 | 90,81 | 91,39 | 0,51 | 0,56 |
| Dióxido de carbono (g) | MF | 24,95 | 25,10 | 24,90 | 24,98 | 0,10 | 0,42 |
| | JD | 23,30 | 23,00 | 23,20 | 23,17 | 0,15 | 0,66 |
| | JF | 24,93 | 24,92 | 24,95 | 24,93 | 0,02 | 0,06 |
| | JD + MF | 24,90 | 24,80 | 24,81 | 24,84 | 0,06 | 0,22 |
| | JF + MF | 24,91 | 24,90 | 24,90 | 24,90 | 0,01 | 0,02 |
| | JD + JF | 24,50 | 24,60 | 24,30 | 24,47 | 0,15 | 0,62 |

Anexo 7. Análisis de varianza y prueba de múltiples rangos de Tukey para la concentración de sólidos solubles (°Brix) obtenida en los mostos fermentados de cada alternativa de mezcla

Tabla 7.1 Análisis de varianza

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Cuadrado medio</i> | <i>Prueba-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| Entre grupos | 73,17 | 6 | 12,20 | 2 113,01 | 0,000 |
| Intra grupos | 0,08 | 14 | 0,006 | | |
| Total | 73,25 | 20 | | | |

Tabla 7.2 Prueba de múltiples rangos de Tukey (5 %)

| <i>Mezclas</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos homogéneos</i> |
|----------------|--------------|--------------|--------------------------|
| JF | 3 | 1,5 | X |
| JD + JF + MF | 3 | 3,8 | X |
| JD + JF | 3 | 4,2 | X |
| JF + MF | 3 | 4,63 | X |
| JD + MF | 3 | 5,7 | X |
| JD | 3 | 6,7 | X |
| MF | 3 | 7,58 | X |

| <i>Contraste</i> | <i>Sig.</i> | <i>Diferencia</i> | <i>+/- Límites</i> |
|------------------------|-------------|-------------------|--------------------|
| JD - JD + JF | * | 2,5 | 0,212 |
| JD - JD + JF + MF | * | 2,9 | 0,212 |
| JD - JD + MF | * | 1,0 | 0,212 |
| JD - JF | * | 5,2 | 0,212 |
| JD - JF + MF | * | 2,07 | 0,212 |
| JD - MF | * | -0,88 | 0,212 |
| JD + JF - JD + JF + MF | * | 0,4 | 0,212 |
| JD + JF - JD + MF | * | -1,5 | 0,212 |
| JD + JF - JF | * | 2,7 | 0,212 |
| JD + JF - JF + MF | * | -0,43 | 0,212 |
| JD + JF - MF | * | -3,38 | 0,212 |
| JD + JF + MF - JD + MF | * | -1,9 | 0,212 |
| JD + JF + MF - JF | * | 2,3 | 0,212 |
| JD + JF + MF - JF + MF | * | -0,83 | 0,212 |
| JD + JF + MF - MF | * | -3,78 | 0,212 |
| JD + MF - JF | * | 4,2 | 0,212 |
| JD + MF - JF + MF | * | 1,07 | 0,212 |
| JD + MF - MF | * | -1,88 | 0,212 |
| JF - JF + MF | * | -3,13 | 0,212 |
| JF - MF | * | -6,08 | 0,212 |
| JF + MF - MF | * | -2,95 | 0,212 |

* indica una diferencia significativa.

Anexo 8. Análisis de varianza y prueba de múltiples rangos de Tukey para el contenido de azúcares reductores totales residuales (ART_R) obtenido en los mostos fermentados de cada alternativa de mezcla

Tabla 8.1 Análisis de varianza

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Cuadrado medio</i> | <i>Prueba-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| Entre grupos | 2,421 | 6 | 0,404 | 116,22 | 0,000 |
| Intra grupos | 0,049 | 14 | 0,004 | | |
| Total | 2,469 | 20 | | | |

Tabla 8.2 Prueba de múltiples rangos de Tukey (5 %)

| <i>Mezclas</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos homogéneos</i> |
|----------------|--------------|--------------|--------------------------|
| JF | 3 | 0,217 | X |
| JF + MF | 3 | 0,467 | X |
| JD + JF + MF | 3 | 0,667 | X |
| JD + JF | 3 | 0,733 | X |
| JD + MF | 3 | 0,933 | X |
| MF | 3 | 1,0 | X |
| JD | 3 | 1,333 | X |

| <i>Contraste</i> | <i>Sig.</i> | <i>Diferencia</i> | <i>+/- Límites</i> |
|------------------------|-------------|-------------------|--------------------|
| JD - JD + JF | * | 0,6 | 0,164 |
| JD - JD + JF + MF | * | 0,667 | 0,164 |
| JD - JD + MF | * | 0,4 | 0,164 |
| JD - JF | * | 1,117 | 0,164 |
| JD - JF + MF | * | 0,867 | 0,164 |
| JD - MF | * | 0,333 | 0,164 |
| JD + JF - JD + JF + MF | | 0,067 | 0,164 |
| JD + JF - JD + MF | * | -0,2 | 0,164 |
| JD + JF - JF | * | 0,517 | 0,164 |
| JD + JF - JF + MF | * | 0,267 | 0,164 |
| JD + JF - MF | * | -0,267 | 0,164 |
| JD + JF + MF - JD + MF | * | -0,267 | 0,164 |
| JD + JF + MF - JF | * | 0,45 | 0,164 |
| JD + JF + MF - JF + MF | * | 0,2 | 0,164 |
| JD + JF + MF - MF | * | -0,333 | 0,164 |
| JD + MF - JF | * | 0,717 | 0,164 |
| JD + MF - JF + MF | * | 0,467 | 0,164 |
| JD + MF - MF | | -0,067 | 0,164 |
| JF - JF + MF | * | -0,25 | 0,164 |
| JF - MF | * | -0,783 | 0,164 |
| JF + MF - MF | * | -0,533 | 0,164 |

* indica una diferencia significativa.

Anexo 9. Análisis de varianza y prueba de múltiples rangos de Tukey para el porcentaje de viabilidad celular obtenida en los mostos fermentados de cada alternativa de mezcla

Tabla 9.1 Análisis de varianza

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Cuadrado medio</i> | <i>Prueba-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| Entre grupos | 209,91 | 6 | 34,98 | 20,99 | 0,000 |
| Intra grupos | 23,33 | 14 | 1,67 | | |
| Total | 233,24 | 20 | | | |

Tabla 9.2 Prueba de múltiples rangos de Tukey (5 %)

| <i>Mezclas</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos homogéneos</i> |
|----------------|--------------|--------------|--------------------------|
| JD | 3 | 85,67 | X |
| JD + JF | 3 | 89,0 | XX |
| JD + MF | 3 | 90,0 | XX |
| JF + MF | 3 | 91,0 | XXX |
| JF | 3 | 92,67 | XXX |
| MF | 3 | 94,0 | XX |
| JD + JF + MF | 3 | 96,0 | X |

| <i>Contraste</i> | <i>Sig.</i> | <i>Diferencia</i> | <i>+/- Límites</i> |
|------------------------|-------------|-------------------|--------------------|
| JD - JD + JF | | -3,33 | 3,601 |
| JD - JD + JF + MF | * | -10,33 | 3,601 |
| JD - JD + MF | * | -4,33 | 3,601 |
| JD - JF | * | -7,0 | 3,601 |
| JD - JF + MF | * | -5,33 | 3,601 |
| JD - MF | * | -8,33 | 3,601 |
| JD + JF - JD + JF + MF | * | -7,0 | 3,601 |
| JD + JF - JD + MF | | -1,0 | 3,601 |
| JD + JF - JF | * | -3,67 | 3,601 |
| JD + JF - JF + MF | | -2,0 | 3,601 |
| JD + JF - MF | * | -5,0 | 3,601 |
| JD + JF + MF - JD + MF | * | 6,0 | 3,601 |
| JD + JF + MF - JF | | 3,33 | 3,601 |
| JD + JF + MF - JF + MF | * | 5,0 | 3,601 |
| JD + JF + MF - MF | | 2,0 | 3,601 |
| JD + MF - JF | | -2,67 | 3,601 |
| JD + MF - JF + MF | | -1,0 | 3,601 |
| JD + MF - MF | * | -4,0 | 3,601 |
| JF - JF + MF | | 1,67 | 3,601 |
| JF - MF | | -1,33 | 3,601 |
| JF + MF - MF | | -3,0 | 3,601 |

* indica una diferencia significativa.

Anexo 10. Análisis de varianza y prueba de múltiples rangos de Tukey para el porcentaje de gemación obtenida en los mostos fermentados de cada alternativa de mezcla

Tabla 10.1 Análisis de varianza

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Cuadrado medio</i> | <i>Prueba-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| Entre grupos | 775,81 | 6 | 129,30 | 118,06 | 0,000 |
| Intra grupos | 15,33 | 14 | 1,10 | | |
| Total | 791,14 | 20 | | | |

Tabla 10.2 Prueba de múltiples rangos de Tukey (5 %)

| <i>Mezclas</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos homogéneos</i> |
|----------------|--------------|--------------|--------------------------|
| JD | 3 | 24,0 | X |
| JD + JF | 3 | 28,67 | X |
| JD + MF | 3 | 32,0 | X |
| JF + MF | 3 | 36,33 | X |
| JF | 3 | 38,0 | X |
| MF | 3 | 39,0 | X |
| JD + JF + MF | 3 | 43,0 | X |

| <i>Contraste</i> | <i>Sig.</i> | <i>Diferencia</i> | <i>+/- Límites</i> |
|------------------------|-------------|-------------------|--------------------|
| JD - JD + JF | * | -4,67 | 2,919 |
| JD - JD + JF + MF | * | -19,0 | 2,919 |
| JD - JD + MF | * | -8,0 | 2,919 |
| JD - JF | * | -14,0 | 2,919 |
| JD - JF + MF | * | -12,33 | 2,919 |
| JD - MF | * | -15,0 | 2,919 |
| JD + JF - JD + JF + MF | * | -14,33 | 2,919 |
| JD + JF - JD + MF | * | -3,33 | 2,919 |
| JD + JF - JF | * | -9,33 | 2,919 |
| JD + JF - JF + MF | * | -7,67 | 2,919 |
| JD + JF - MF | * | -10,33 | 2,919 |
| JD + JF + MF - JD + MF | * | 11,0 | 2,919 |
| JD + JF + MF - JF | * | 5,0 | 2,919 |
| JD + JF + MF - JF + MF | * | 6,67 | 2,919 |
| JD + JF + MF - MF | * | 4,0 | 2,919 |
| JD + MF - JF | * | -6,0 | 2,919 |
| JD + MF - JF + MF | * | -4,33 | 2,919 |
| JD + MF - MF | * | -7,0 | 2,919 |
| JF - JF + MF | | 1,67 | 2,919 |
| JF - MF | | -1,0 | 2,919 |
| JF + MF - MF | | -2,67 | 2,919 |

* indica una diferencia significativa.

Anexo 11. Análisis de varianza y prueba de múltiples rangos de Tukey para el grado alcohólico obtenido en los mostos fermentados de cada alternativa de mezcla

Tabla 11.1 Análisis de varianza

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Cuadrado medio</i> | <i>Prueba-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| Entre grupos | 2,449 | 6 | 0,408 | 352,80 | 0,000 |
| Intra grupos | 0,016 | 14 | 0,001 | | |
| Total | 2,466 | 20 | | | |

Tabla 11.2 Prueba de múltiples rangos de Tukey (5 %)

| <i>Mezclas</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos homogéneos</i> |
|----------------|--------------|--------------|--------------------------|
| JD | 3 | 5,533 | X |
| JD + JF | 3 | 6,033 | X |
| JD + MF | 3 | 6,223 | X |
| JF + MF | 3 | 6,357 | X |
| JF | 3 | 6,383 | X |
| MF | 3 | 6,40 | X |
| JD + JF + MF | 3 | 6,703 | X |

| <i>Contraste</i> | <i>Sig.</i> | <i>Diferencia</i> | <i>+/- Límites</i> |
|------------------------|-------------|-------------------|--------------------|
| JD - JD + JF | * | -0,5 | 0,095 |
| JD - JD + JF + MF | * | -1,17 | 0,095 |
| JD - JD + MF | * | -0,69 | 0,095 |
| JD - JF | * | -0,85 | 0,095 |
| JD - JF + MF | * | -0,823 | 0,095 |
| JD - MF | * | -0,867 | 0,095 |
| JD + JF - JD + JF + MF | * | -0,67 | 0,095 |
| JD + JF - JD + MF | * | -0,19 | 0,095 |
| JD + JF - JF | * | -0,35 | 0,095 |
| JD + JF - JF + MF | * | -0,323 | 0,095 |
| JD + JF - MF | * | -0,367 | 0,095 |
| JD + JF + MF - JD + MF | * | 0,48 | 0,095 |
| JD + JF + MF - JF | * | 0,32 | 0,095 |
| JD + JF + MF - JF + MF | * | 0,347 | 0,095 |
| JD + JF + MF - MF | * | 0,303 | 0,095 |
| JD + MF - JF | * | -0,16 | 0,095 |
| JD + MF - JF + MF | * | -0,133 | 0,095 |
| JD + MF - MF | * | -0,177 | 0,095 |
| JF - JF + MF | | 0,027 | 0,095 |
| JF - MF | | -0,017 | 0,095 |
| JF + MF - MF | | -0,043 | 0,095 |

* indica una diferencia significativa.

Anexo 12. Análisis de varianza y prueba de múltiples rangos de Tukey para el rendimiento alcohólico obtenido en los mostos fermentados de cada alternativa de mezcla

Tabla 12.1 Análisis de varianza

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Cuadrado medio</i> | <i>Prueba-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| Entre grupos | 119,58 | 6 | 19,93 | 101,16 | 0,000 |
| Intra grupos | 2,76 | 14 | 0,197 | | |
| Total | 122,33 | 20 | | | |

Tabla 12.2 Prueba de múltiples rangos de Tukey (5 %)

| <i>Mezclas</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos homogéneos</i> |
|------------------------|--------------|-------------------|--------------------------|
| JD | 3 | 51,88 | X |
| JD + JF | 3 | 53,55 | X |
| JF | 3 | 54,17 | XX |
| JF + MF | 3 | 55,12 | XX |
| JD + MF | 3 | 56,24 | X |
| MF | 3 | 58,18 | X |
| JD + JF + MF | 3 | 59,15 | X |
| <i>Contraste</i> | <i>Sig.</i> | <i>Diferencia</i> | <i>+/- Límites</i> |
| JD - JD + JF | * | -1,677 | 1,238 |
| JD - JD + JF + MF | * | -7,27 | 1,238 |
| JD - JD + MF | * | -4,36 | 1,238 |
| JD - JF | * | -2,297 | 1,238 |
| JD - JF + MF | * | -3,24 | 1,238 |
| JD - MF | * | -6,307 | 1,238 |
| JD + JF - JD + JF + MF | * | -5,593 | 1,238 |
| JD + JF - JD + MF | * | -2,683 | 1,238 |
| JD + JF - JF | | -0,62 | 1,238 |
| JD + JF - JF + MF | * | -1,563 | 1,238 |
| JD + JF - MF | * | -4,63 | 1,238 |
| JD + JF + MF - JD + MF | * | 2,91 | 1,238 |
| JD + JF + MF - JF | * | 4,973 | 1,238 |
| JD + JF + MF - JF + MF | * | 4,03 | 1,238 |
| JD + JF + MF - MF | | 0,963 | 1,238 |
| JD + MF - JF | * | 2,063 | 1,238 |
| JD + MF - JF + MF | | 1,12 | 1,238 |
| JD + MF - MF | * | -1,947 | 1,238 |
| JF - JF + MF | | -0,943 | 1,238 |
| JF - MF | * | -4,01 | 1,238 |
| JF + MF - MF | * | -3,067 | 1,238 |

* indica una diferencia significativa.

Anexo 13. Análisis de varianza y prueba de múltiples rangos de Tukey para el contenido de dióxido de carbono generado en los mostos fermentados de cada alternativa de mezcla

Tabla 13.1 Análisis de varianza

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Cuadrado medio</i> | <i>Prueba-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| Entre grupos | 20,42 | 6 | 3,40 | 336,55 | 0,000 |
| Intra grupos | 0,14 | 14 | 0,01 | | |
| Total | 20,57 | 20 | | | |

Tabla 13.2 Prueba de múltiples rangos de Tukey (5 %)

| <i>Mezclas</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos homogéneos</i> |
|----------------|--------------|--------------|--------------------------|
| JD | 3 | 23,17 | X |
| JD + JF | 3 | 24,47 | X |
| JD + MF | 3 | 24,84 | X |
| JF + MF | 3 | 24,90 | X |
| JF | 3 | 24,93 | X |
| MF | 3 | 24,98 | X |
| JD + JF + MF | 3 | 26,80 | X |

| <i>Contraste</i> | <i>Sig.</i> | <i>Diferencia</i> | <i>+/- Límites</i> |
|------------------------|-------------|-------------------|--------------------|
| JD - JD + JF | * | -1,3 | 0,281 |
| JD - JD + JF + MF | * | -3,633 | 0,281 |
| JD - JD + MF | * | -1,67 | 0,281 |
| JD - JF | * | -1,767 | 0,281 |
| JD - JF + MF | * | -1,737 | 0,281 |
| JD - MF | * | -1,817 | 0,281 |
| JD + JF - JD + JF + MF | * | -2,333 | 0,281 |
| JD + JF - JD + MF | * | -0,37 | 0,281 |
| JD + JF - JF | * | -0,467 | 0,281 |
| JD + JF - JF + MF | * | -0,437 | 0,281 |
| JD + JF - MF | * | -0,517 | 0,281 |
| JD + JF + MF - JD + MF | * | 1,9633 | 0,281 |
| JD + JF + MF - JF | * | 1,867 | 0,281 |
| JD + JF + MF - JF + MF | * | 1,897 | 0,281 |
| JD + JF + MF - MF | * | 1,817 | 0,281 |
| JD + MF - JF | | -0,097 | 0,281 |
| JD + MF - JF + MF | | -0,067 | 0,281 |
| JD + MF - MF | | -0,147 | 0,281 |
| JF - JF + MF | | 0,03 | 0,281 |
| JF - MF | | -0,05 | 0,281 |
| JF + MF - MF | | -0,08 | 0,281 |

* indica una diferencia significativa.

Anexo 14. Análisis de varianza y prueba de múltiples rangos de Tukey para la eficiencia fermentativa obtenida en los mostos fermentados de cada alternativa de mezcla

Tabla 14.1 Análisis de varianza

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Cuadrado medio</i> | <i>Prueba-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| Entre grupos | 285,77 | 6 | 47,63 | 100,68 | 0,000 |
| Intra grupos | 6,62 | 14 | 0,47 | | |
| Total | 292,39 | 20 | | | |

Tabla 14.2 Prueba de múltiples rangos de Tukey (5 %)

| <i>Mezclas</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos homogéneos</i> |
|----------------|--------------|--------------|--------------------------|
| JD | 3 | 80,15 | X |
| JD + JF | 3 | 82,74 | X |
| JF | 3 | 83,7 | XX |
| JF + MF | 3 | 85,16 | XX |
| JD + MF | 3 | 86,89 | X |
| MF | 3 | 89,90 | X |
| JD + JF + MF | 3 | 91,39 | X |

| <i>Contraste</i> | <i>Sig.</i> | <i>Diferencia</i> | <i>+/- Límites</i> |
|------------------------|-------------|-------------------|--------------------|
| JD - JD + JF | * | -2,59 | 1,919 |
| JD - JD + JF + MF | * | -11,24 | 1,919 |
| JD - JD + MF | * | -6,737 | 1,919 |
| JD - JF | * | -3,547 | 1,919 |
| JD - JF + MF | * | -5,01 | 1,919 |
| JD - MF | * | -9,75 | 1,919 |
| JD + JF - JD + JF + MF | * | -8,647 | 1,919 |
| JD + JF - JD + MF | * | -4,147 | 1,919 |
| JD + JF - JF | | -0,957 | 1,919 |
| JD + JF - JF + MF | * | -2,42 | 1,919 |
| JD + JF - MF | * | -7,16 | 1,919 |
| JD + JF + MF - JD + MF | * | 4,5 | 1,919 |
| JD + JF + MF - JF | * | 7,69 | 1,919 |
| JD + JF + MF - JF + MF | * | 6,227 | 1,919 |
| JD + JF + MF - MF | | 1,487 | 1,919 |
| JD + MF - JF | * | 3,19 | 1,919 |
| JD + MF - JF + MF | | 1,727 | 1,919 |
| JD + MF - MF | * | -3,013 | 1,919 |
| JF - JF + MF | | -1,463 | 1,919 |
| JF - MF | * | -6,203 | 1,919 |
| JF + MF - MF | * | -4,74 | 1,919 |

* indica una diferencia significativa.

Anexo 15. Resultados alcanzados durante la fermentación de las mezclas de sustratos azucarados

Tabla 15.1 Resumen de los resultados alcanzados en el proceso de fermentación de las alternativas de mezclas

| <i>Puntos</i> | <i>Mezclas</i> | <i>ART_{inicial}</i> (g/L) | <i>ART_{residual}</i> (g/L) | <i>ΔART</i> (g/L) | <i>Grado</i> <i>alcohólico</i> (%) | <i>Rendimiento</i> <i>alcohólico</i> (%) | <i>Eficiencia</i> <i>fermentativa</i> (%) | <i>Dióxido</i> <i>de carbono</i> (g) |
|---------------|----------------|---------------------------------------|--|----------------------|--|--|---|--|
| 1 | MF | 120 | 10 | 110 | 6,40 | 58,18 | 89,90 | 24,98 |
| 2 | JD | 120 | 13,33 | 106,67 | 5,53 | 51,88 | 80,15 | 23,17 |
| 3 | JF | 120 | 2,17 | 117,83 | 6,38 | 54,17 | 83,70 | 24,93 |
| 4 | JD + MF | 120 | 9,33 | 110,67 | 6,22 | 56,23 | 86,89 | 24,84 |
| 5 | JF + MF | 120 | 4,67 | 115,33 | 6,36 | 55,12 | 85,16 | 24,90 |
| 6 | JD + JF | 120 | 7,33 | 112,67 | 6,03 | 53,55 | 82,74 | 24,47 |
| 7 | JD + JF + MF | 120 | 6,67 | 113,33 | 6,70 | 59,15 | 91,39 | 26,80 |

Anexo 16. Composición de los destilados obtenidos a partir de las alternativas de fermentación

En la tabla 16.1, se muestran las concentraciones de los componentes volátiles mayoritarios presentes en los destilados, obtenidas mediante cromatografía gaseosa. Estos resultados se encuentran plasmados en el informe (Código: RC-PNO-21-02, Recepciones: 154 y 155) emitido por el Laboratorio de Alcoholes y Bebidas (LABEB) del Centro de Referencia de Alcoholes y Bebidas (CERALBE) perteneciente al Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

Tabla 16.1 Composición química de los destilados obtenidos a partir de los mostos fermentados correspondientes a cada alternativa de mezcla

| <i>Componentes</i> | <i>Alternativas de mezcla (g/100 L alcohol absoluto)</i> | | | | | | |
|--------------------|--|-----------|-----------|----------------|----------------|----------------|---------------------|
| | <i>MF</i> | <i>JD</i> | <i>JF</i> | <i>JD + MF</i> | <i>JD + JF</i> | <i>JF + MF</i> | <i>JD + JF + MF</i> |
| Acetaldehído | 28,28 | 30,62 | 19,92 | 28,39 | 21,73 | 21,50 | 22,49 |
| Acetato de etilo | 29,06 | 34,14 | 11,08 | 53,84 | 21,44 | 26,69 | 29,04 |
| Acetal | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Metanol | 13,20 | 6,15 | 4,03 | 4,27 | 12,52 | 6,11 | 43,41 |
| 2-butanol | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 1-propanol | 36,12 | 40,36 | 46,05 | 29,58 | 40,78 | 41,57 | 45,28 |
| Isobutanol | 72,81 | 79,78 | 86,87 | 72,61 | 102,81 | 96,29 | 101,97 |
| 1-butanol | 5,61 | 4,73 | 8,80 | 2,87 | 1,42 | 9,18 | 4,17 |
| 2-metil-1-butanol | 31,81 | 35,52 | 41,07 | 28,95 | 33,48 | 42,04 | 39,82 |
| Alcohol isoamílico | 97,50 | 106,73 | 123,50 | 82,68 | 100,09 | 128,68 | 115,04 |

ND: No se detecta

Anexo 17. Resultados de los modelos de ajuste obtenidos para las variables de respuesta

Tabla 17.1 Modelos de ajuste obtenidos para las variables de respuesta

| <i>Variable de respuesta</i> | <i>Modelo</i> | <i>Error estándar (ES)</i> | <i>R² (%)</i> | <i>R² ajustado (%)</i> |
|---|-----------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| Grado alcohólico [ALC] | Lineal | 0,24194 | 62,01 | 52,52 |
| | Cuadrático | 0,17866 | 83,17 | 74,11 |
| | Cúbico especial | 0,03574 | 99,38 | 98,96 |
| Rendimiento alcohólico [REND] | Lineal | 1,88438 | 53,56 | 41,95 |
| | Cuadrático | 1,61117 | 72,42 | 57,56 |
| | Cúbico especial | 0,47924 | 97,75 | 96,25 |
| Eficiencia fermentativa [EFIC] | Lineal | 2,91252 | 53,58 | 41,98 |
| | Cuadrático | 2,49101 | 72,41 | 57,56 |
| | Cúbico especial | 0,74266 | 97,74 | 96,23 |
| Dióxido de carbono [CO ₂] | Lineal | 0,95509 | 29,03 | 11,29 |
| | Cuadrático | 0,73622 | 65,74 | 47,29 |
| | Cúbico especial | 0,10020 | 99,41 | 99,02 |

Anexo 18. Análisis de varianza para los modelos cúbico especial obtenidos

Tabla 18.1 Análisis de varianza para el modelo de grado alcohólico [ALC]

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Cuadrado medio</i> | <i>Prueba-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| Modelo cúbico especial | 2,450 | 8 | 0,306 | 239,71 | 0,0000 |
| Error total | 0,015 | 12 | 0,001 | | |
| Total | 2,466 | 20 | | | |

Tabla 18.2 Análisis de varianza para el modelo de rendimiento alcohólico [REND]

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Cuadrado medio</i> | <i>Prueba-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| Modelo cúbico especial | 119,581 | 8 | 14,948 | 65,08 | 0,0000 |
| Error total | 2,756 | 12 | 0,229 | | |
| Total | 122,337 | 20 | | | |

Tabla 18.3 Análisis de varianza para el modelo de eficiencia fermentativa [EFIC]

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Cuadrado medio</i> | <i>Prueba-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| Modelo cúbico especial | 285,770 | 8 | 35,721 | 64,76 | 0,0000 |
| Error total | 6,619 | 12 | 0,552 | | |
| Total | 292,389 | 20 | | | |

Tabla 18.4 Análisis de varianza para el modelo de dióxido de carbono [CO₂]

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Cuadrado medio</i> | <i>Prueba-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| Modelo cúbico especial | 20,445 | 8 | 2,556 | 254,53 | 0,0000 |
| Error total | 0,125 | 12 | 0,010 | | |
| Total | 20,566 | 20 | | | |

Anexo 19. Gráficas de superficie de respuesta y de contornos para el modelo de rendimiento alcohólico

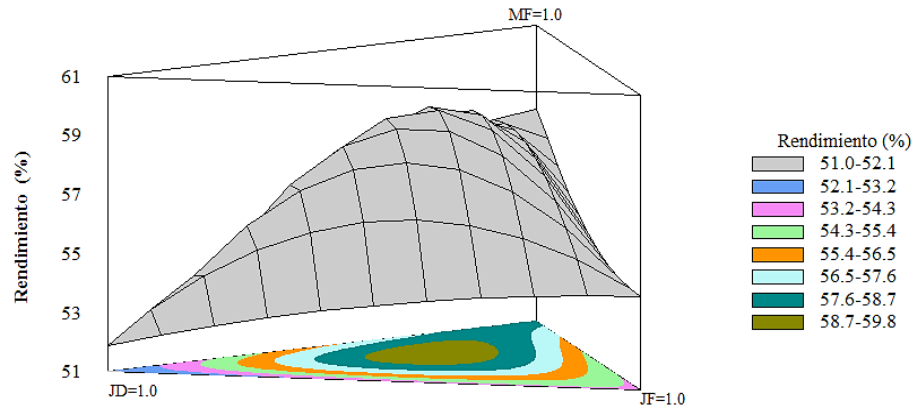


Figura 19.1 Superficie de respuesta estimada para el modelo de rendimiento alcohólico

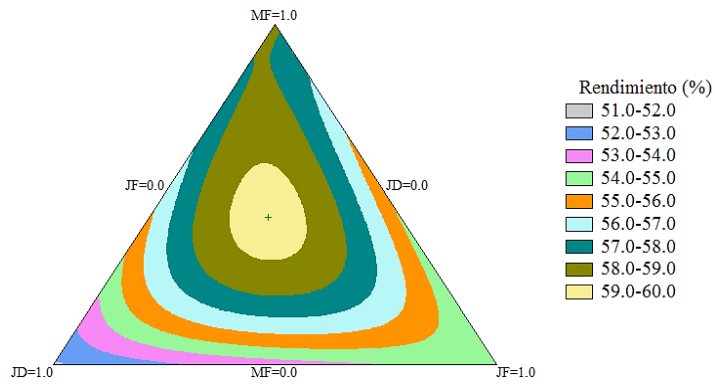


Figura 19.2 Contornos de la superficie de respuesta para el modelo de rendimiento alcohólico

Anexo 20. Gráficas de superficie de respuesta y de contornos para el modelo de eficiencia fermentativa

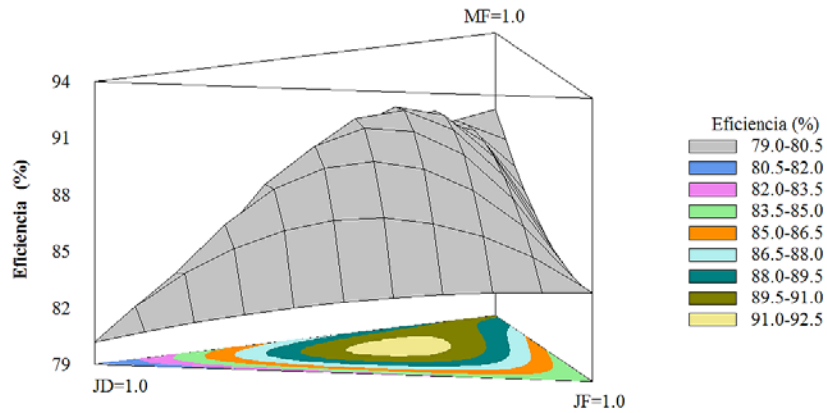


Figura 20.1 Superficie de respuesta estimada para el modelo de eficiencia fermentativa

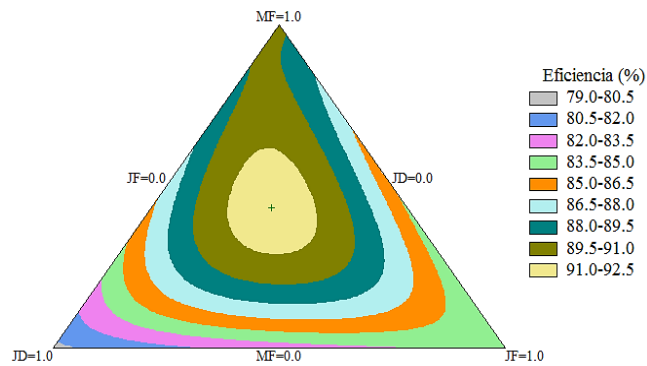


Figura 20.2 Contornos de la superficie de respuesta para el modelo de eficiencia fermentativa

Anexo 21. Gráficas de superficie de respuesta y de contornos para el modelo de dióxido de carbono generado

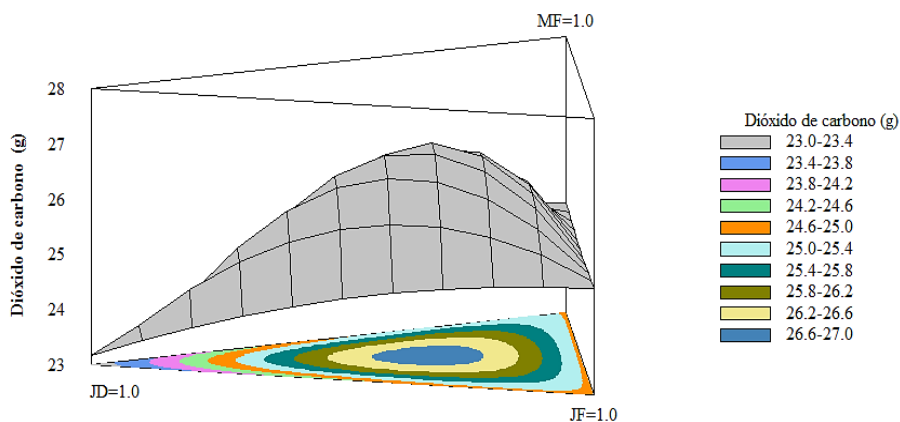


Figura 21.1 Superficie de respuesta estimada para el modelo de dióxido de carbono generado

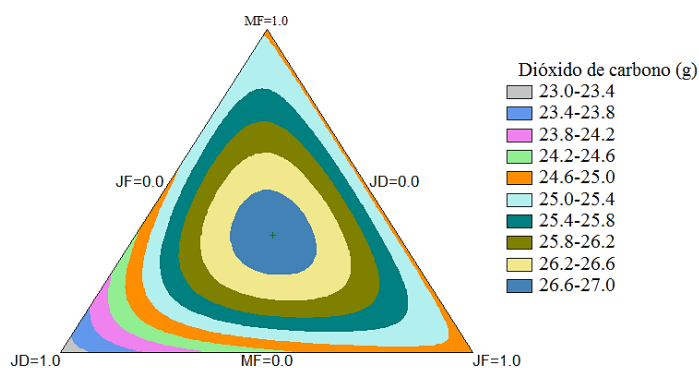


Figura 21.2 Contornos de la superficie de respuesta para el modelo de dióxido de carbono generado

Anexo 22. Resultados de la determinación de los pesos de las variables por el método de Saaty

Tabla 22.1 Matriz de Saaty

| <i>Variables</i> | <i>Grado alcohólico</i> | <i>Rendimiento alcohólico</i> | <i>Eficiencia fermentativa</i> | <i>Dióxido de carbono</i> | C_i | w_i |
|---|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|--------|-------|
| Grado alcohólico (ALC) | 1 | 2 | 2 | 2 | 0,3839 | 5 |
| Rendimiento alcohólico (REND) | 1/2 | 1 | 1 | 3 | 0,2526 | 4 |
| Eficiencia fermentativa (EFIC) | 1/2 | 1 | 1 | 3 | 0,2526 | 4 |
| Dióxido de carbono (CO ₂) | 1/2 | 1/3 | 1/3 | 1 | 0,1108 | 3 |