

**EFFECTO DE LA CONCENTRACION DEL CLORO RESIDUAL EN LA
ACTIVIDAD FERMENTATIVA DE LA LEVADURA ALCOHOLICA UTILIZADA
EN LA DESTILERÍA DE MAYAGÜEZ S.A.
VALLE DEL CAUCA, COLOMBIA.**

LEIDY JOHANNA ALBIARES SANCHEZ

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2017**

**EFFECTO DE LA CONCENTRACION DEL CLORO RESIDUAL EN LA
ACTIVIDAD FERMENTATIVA DE LA LEVADURA ALCOHOLICA UTILIZADA
EN LA DESTILERÍA DE MAYAGÜEZ S.A.
VALLE DEL CAUCA, COLOMBIA.**

LEIDY JOHANNA ALBIARES SANCHEZ

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de
MICROBIÓLOGA**

**Tutora: Liliana Agudelo Acosta Msc
Microbióloga- Mayagüez S.A.**

**Tutor: José Félix Ortiz Lemus PhD
Universidad de Pamplona**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2017**

Nota de Aceptación

Firma 1º jurado

Firma 2º jurado

Pamplona, junio 12 de 2017

AGRADECIMIENTOS

Al creador de todas las cosas, el que me ha dado fortaleza para continuar, por ello con toda la sinceridad y humildad de mi corazón, dedico primeramente mi trabajo a mi amado (Dios).

A mis padres quienes con gran esfuerzo dieron lo mejor para que mi sueño de ser profesional se llevara a cabo.

Al profesor José Félix Ortiz Lemus PhD, por su gran apoyo y acompañamiento en esta etapa.

A Liliana Agudelo Acosta Msc, por su colaboración en la dirección de este trabajo, por sus conocimientos y aportes que contribuyeron a la ejecución del mismo.

Al personal técnico de la planta de destilería del ingenio Mayagüez S.A., por su apoyo y oportunidad de hacer posible la ejecución del presente proyecto.

A cada uno de los profesores del programa de microbiología de la UNIVERSIDAD DE PAMPLONA quienes dirigieron diligentemente mi etapa de formación como microbióloga.

DEDICATORIA

A Dios.

Dedico este trabajo a Dios, porque es el motor de mi vida, por brindarme la oportunidad de vivir esta etapa de formación como profesional el cual trajo a mi vida experiencias enriquecedoras.

A mis padres.

Javier Albiarés y Marha Sánchez, por su amor, trabajo y esfuerzos realizados durante todo este tiempo, porque sin ellos no hubiera sido posible este logro, por apoyarme en todo momento.

A mi Abuelo.

Manual Dolores Albiarés Miranda quien lastimosamente hoy no está en este mundo, pero que con sus palabras de sabiduría me impulsaron hacer mis sueños realidad.

“Vive la vida, acepta el reto. Aunque el frío queme, Aunque el miedo muerda, Aunque el sol se esconda y se calle el viento. Acepta tus sombras, entierra tus miedos, Baja la guardia y extiende las manos. Despliega las alas e inténtalo de nuevo. Aún hay fuego en tu alma, Aún hay vida en tus sueños, No te rindas que la vida es eso” M. Benedetti

LISTA DE CONTENIDO.

RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN	14
1. OBJETIVOS	16
1.1. Objetivo General	16
1.2. Objetivos Específicos	16
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	18
5. MARCO TEORICO	19
5.1. GENERALIDADES DE LA CAÑA DE AZÚCAR	19
5.2. LA FERMENTACION ALCOHOLICA	17
5.3. USO DE LA LEVADURA EN EL PROCESO FERMENTATIVO	21
5.4. MECANISMO DE ACCION DEL CLORO	26
5.5. PROCESO DE PRODUCCION DE ETANOL	28
5.6. PRODUCCION DE ALCOHOL EN EL INGENIO MAYAGUEZ S.A.	30
5.7. DESTILACION	32
5.8. DESHIDRATAACION	32
5.9. TRATAMIENTO DE LA VINAZA	32
6. MARCO LEGAL	33
7. ANTECEDENTES	34
8. METODOLOGIA	35
8.1. UNIDAD EXPERIMENTAL	35
8.2. TOMA DE MUESTRA	39
8.3. EVALUACION DE LA CALIDAD MICROBIOLOGICA Y FISICOQUIMICA DEL AGUA DE PROCESO	35
8.4. EFECTO DEL CLORO RESIDUAL PRESENTE EN EL AGUA DE PROCESO SOBRE LA ACTIVIDAD FERMENTATIVA EN LAS ETAPAS DE PROPAGACION Y FERMENTACION	41
8.5. ANALISIS ESTADISTICO	47

9. PLAN DE TRABAJO Y CRONOGRAMA DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO DE PASANTIA.....	47
10. RESULTADOS.....	48
10.1. EVALUACION DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y FÍSICOQUÍMICA DEL AGUA DE PROCESO.....	48
10.2. EFECTO DEL CLORO RESIDUAL PRESENTE EN EL AGUA DE PROCESO SOBRE LA ACTIVIDAD FERMENTATIVA EN LAS ETAPAS DE PROPAGACION Y FERMENTACION	54
10.3. ANALISIS ESTADÍSTICO DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO	76
11. ANALISIS DE RESULTADOS.....	85
12. CONCLUSIONES.....	87
13. RECOMENDACIONES.....	87
14. BIBLIOGRAFIA.....	87
15. ANEXOS.....	92

LISTA DE ILUSTRACIONES.

Ilustración 1. Estequiometria de la fermentación alcohólica. Fuente: (Quintero Suarez, 2011).	20
Ilustración 2. Morfologías de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . A) Aspectos macroscópicos; B) Aspectos microscópicos (tinción con azul de metileno 1 %, objetivo de 40 X).Fuente: http://www.uwyo.edu/virtual_edge/lab13/fungi_results.htm	21
Ilustración 3. Esquema del ciclo biológico de <i>S. cerevisiae</i> . Fuente: (Mariscal Moreno, 2011).....	22
Ilustración 4. Vía metabólica de <i>S. cerevisiae</i> para la producción de etanol Abreviaturas: HK: hexoquinasa, PGI: fosfoglucoisomerasa, PFK: Fosfofructoquinasa, FBPA: fructosa bisfosfato aldolasa, TPI: triosa fosfato isomerasa, GAPDH: gliceraldehídos-3-fosfato deshidrogenasa, PGK: fosfoglicerato quinasa, PGM: fosfogliceromutasa, ENO: Enolasa, PYK: piruvato quinase, PDC: piruvato descarboxilasa, ADH: Alcohol deshidrogenasa. Fuente: (Bai, Anderson, & Moo-Young, 2008).	24
Ilustración 5. Esquema que ilustra los mecanismos de las acciones germicidas de HOCl y -OCl en base a su capacidad para penetrar la membrana en la célula microbiana. El -OCl ionizado tiene una pobre actividad germicida debido a su incapacidad para difundirse a través de la membrana plasmática microbiana y ejerce una acción oxidante sólo desde fuera de la célula (A). HOCl puede penetrar la bicapa lipídica en la membrana plasmática por difusión pasiva debido a su neutralidad eléctrica. HOCl puede atacar la célula microbiana tanto desde el exterior (A') y dentro de la célula (B y C), que es responsable de la potente actividad germicida de HOCl; Fuente: (Fukuzaki 2006).....	27
Ilustración 6. Diagrama de bloques del proceso de obtención de etanol anhidro. Fuente: (Mayagüez, 2007).....	29
Ilustración 7. Diagrama del proceso de producción de alcohol anhidro en el ingenio Mayagüez S.A. Fuente: (Mayagüez, 2007).....	33
Ilustración 8. Promedio de los 7 ensayos realizados evaluando los parámetros microbiológicos del agua de proceso en cada uno de los puntos de muestro.	49
Ilustración 9. Promedio de los 7 ensayos realizados evaluando la variable pH en cada uno de los puntos de muestreo.	51
Ilustración 10. Promedio de los 7 ensayos realizados evaluando la variable Temperatura en cada uno de los puntos de muestreo.....	51
Ilustración 11. Promedio de los 7 ensayos realizados evaluando la variable Conductividad en cada uno de los puntos de muestreo.	52
Ilustración 12. Promedio de los 7 ensayos realizados evaluando la variable Dureza en cada uno de los puntos de muestreo.	53

Ilustración 13. Promedio de los 7 ensayos realizados evaluando la variable Alcalinidad en cada uno de los puntos de muestreo.....	53
Ilustración 14. Promedio de los 7 ensayos realizado evaluando la variable Cloro residual en cada uno de los puntos de muestreo.....	54
Ilustración 15. Soluciones de cloro. A) Solución stock 1000 ppm B) Solución control C) Solución 1.5 ppm D) Solución 2.0 ppm y E) Solución 2.5 ppm.	55
Ilustración 16. Mediciones de cloro residual de las soluciones de cloro preparadas a partir del stock de 1000 ppm, para ser utilizadas en los ensayos. A) Control 0 ppm B) 1.5 ppm C) 2.0 ppm, D) 2.5 ppm.	55
Ilustración 17. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando Variables microbiológicas en la etapa de propagación: Viabilidad celular en los tiempos T0, T8 y T24 horas.....	58
Ilustración 18. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables microbiológicas en la etapa de propagación: Número final de células viables partiendo del inoculo de 100 cel / ml en el tiempo final T24 Horas.	59
Ilustración 19. Tonalidades de la coloración diferencial para evidenciar el estadio morfológico de la levadura. A) Células Azules o blancas, B y C) Células rojas), D) Células rosadas.	60
Ilustración 20. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables microbiológicas en la etapa de propagación: Morfología celular en el tiempo 24 horas.....	62
Ilustración 21. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables fisicoquímicas en la etapa de propagación: Azúcares residuales en los tiempos T8 y T 24 horas.	63
Ilustración 22. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables fisicoquímicas en la etapa de propagación: °Brix en los tiempos T0, T8 y T 24 horas.	64
Ilustración 23. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables fisicoquímicas en la etapa de propagación: pH en los tiempos T0, T8 y T 24 horas.	65
Ilustración 24. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables fisicoquímicas en la etapa de propagación: %OH (v/v) en los tiempos T8 y T 24 horas.....	66
Ilustración 25. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables microbiológicas en la etapa de fermentación: Viabilidad celular en los tiempos T0, T8, T24 y T48 Horas.....	69
Ilustración 26. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables microbiológicas en la etapa de fermentación: Morfología celular en el tiempo final T48 Horas.....	71
Ilustración 27. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables fisicoquímicas en la etapa de fermentación: Porcentaje de azúcares residuales en	

los tiempos T8, T24 y T48 Horas, teniendo en cuenta que se partió de un azúcar fermentable para esta etapa de 13.50 % de azúcar disponible en el medio, se evidencia claramente la reducción de azúcar en el medio de fermentación.....72

Ilustración 28. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables fisicoquímicas en la etapa de fermentación: °Brix en los tiempos T0, T8, T24 y T48 Horas.....73

Ilustración 29. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables fisicoquímicas en la etapa de fermentación: pH en los tiempos T0, T8, T24 y T48 Horas.....74

Ilustración 30. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables fisicoquímicas en la etapa de fermentación: %OH (v/v) en los tiempos T0, T8, T24 y T48 Horas.....75

Ilustración 31. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables fisicoquímicas en la etapa de fermentación: Eficiencia final de etanol en el tiempo final T 48 Horas.....76

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Capacidad de producción de alcohol a base de caña de azúcar.....28

Tabla 2. Unidad experimental evaluación microbiológica del agua de proceso. ...36

Tabla 3. Unidad experimental evaluación fisicoquímica del agua de proceso.....36

Tabla 4. Unidad experimental efecto del cloro en la actividad fermentativa (ETAPA DE PROPAGACION) variables microbiológicas.37

Tabla 5. Unidad experimental efecto del cloro en la actividad fermentativa (ETAPA DE PROPAGACION) variables fisicoquímicas.37

Tabla 6. Unidad experimental efecto del cloro en la actividad fermentativa (ETAPA DE FERMENTACION) variables microbiológicas.37

Tabla 7. Unidad experimental efecto del cloro en la actividad fermentativa (ETAPA DE FERMENTACION) variables fisicoquímicas.38

Tabla 8. Componentes del medio de propagación.42

Tabla 9. Componentes del medio de fermentación.46

Tabla 10. Cronograma de actividades a ser desarrolladas en la ejecución del proyecto.47

Tabla 11. Valores iniciales del alimento para iniciar el proceso de propagación. ...56

Tabla 12. Viabilidad celular en la etapa de propagación.57

Tabla 13. Estado morfológico de la levadura alcohólica (ENSAYO 1,2,3).61

Tabla 14. Valores iniciales del alimento para iniciar el proceso de fermentación. .67

Tabla 15. Viabilidad celular en la etapa de fermentación.68

Tabla 16. Estado morfológico de la levadura alcohólica (ENSAYO 1,2,3)70

Tabla 17. Análisis de varianza de un factor VARIBALE DUREZA.....76

Tabla 18. Estadística descriptiva de la VARIABLE DUREZA en cada punto de muestreo del agua de proceso.....	77
Tabla 19. Análisis de varianza de un factor VARIABLE ALCALINIDAD	77
Tabla 20. Estadística descriptiva de la VARIBALE ALCALINIDAD en cada punto de muestreo del agua de proceso.....	78
Tabla 21. Análisis de varianza de un factor VARIABLE CLORO RESIDUAL.	78
Tabla 22. Estadística descriptiva de la VARIABLE CLORO RESIDUAL en cada punto de muestreo del agua de proceso.....	79
Tabla 23. Análisis de varianza de un factor etapa de propagación CELULAS VIABLES.....	80
Tabla 24. Estadística descriptiva etapa de propagación CELULAS VIABLES en cada uno de los tres ensayos realizados.	80
Tabla 25. Análisis de varianza de un factor etapa de propagación ESTADO MORFOLOGICO.....	81
Tabla 26. Estadística descriptiva etapa de propagación ESTADO MORFOLOGICO en cada uno de los tres ensayos realizados.	81
Tabla 27. Análisis de varianza de un factor etapa de fermentación CELULAS VIABLES.....	82
Tabla 28. Estadística descriptiva etapa de fermentación CÉLULAS VIABLES en cada uno de los tres ensayos realizados.	82
Tabla 29. Análisis de varianza de un factor etapa de fermentación ESTADO MORFOLOGICO.....	83
Tabla 30. Estadística descriptiva etapa de fermentación ESTADO MORFOLOGICO en cada uno de los tres ensayos realizados.	83
Tabla 31. Análisis de varianza de un factor etapa de fermentación PORCENTAJE DE GRADO ALCOHOLICO.	84
Tabla 32. Estadística descriptiva etapa de fermentación PORCENTAJE DE GRADO ALCOHOLICO en cada uno de los tres ensayos realizados.....	84
Tabla 33. Resultados de la evaluación de la calidad microbiológica del agua de proceso en los diferentes puntos de muestreo.	92
Tabla 34. Resultados de la evaluación de la calidad fisicoquímica del agua de proceso en los diferentes puntos de muestreo.	94
Tabla 35. Variables fisicoquímicas en la etapa de propagación.....	96
Tabla 36. Variables fisicoquímicas en la etapa de fermentación.....	97
Tabla 37. Balance de fermentación.....	98
Tabla 38. Cronograma de actividades realizadas en la planta de destilería de Mayagüez S.A.....	100

LISTA DE ECUACIONES.

Ecuacion 1. Calculo de dureza.	40
Ecuacion 2. Calculo de alcalinidad.	41
Ecuacion 3. Preparacion de soluciones de cloro	41
Ecuacion 4. Poblacion de celular.	43
Ecuacion 5. Porcentaje de viabilidad..	43
Ecuacion 6. Numero de celulas viables	43
Ecuacion 7. Calculo Azucares fermentables iniciales (ATR).	45
Ecuacion 8. Factor de dilución empleado en calculo ATR.	45
Ecuacion 9. Calculo azucares residuales.	46

LISTA DE ANEXOS.

Tabla 33. Resultados de la evaluación de la calidad microbiológica del agua de proceso en los diferentes puntos de muestreo.	92
Tabla 34. Resultados de la evaluación de la calidad fisicoquímica del agua de proceso en los diferentes puntos de muestreo.	94
Tabla 35. Variables fisicoquímicas en la etapa de propagación.	96
Tabla 36. Variables fisicoquímicas en la etapa de fermentación.	97
Tabla 37. Balance de fermentación.	98
Tabla 38. Cronograma de actividades realizadas en la planta de destilería de Mayagüez S.A.	100

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS.

1. HK: Hexoquinasa
2. PGI: Fosfoglucoisomerasa
3. PFK: Fosfofructoquinasa,
4. FBPA: Fructosa bisfosfato aldolasa
5. TPI: Triosa fosfato isomerasa
6. GAPDH: Gliceraldehídos-3-fosfato deshidrogenasa
7. PGK: Fosfoglicerato quinasa
8. PGM: Fosfogliceromutasa
9. ENO: Enolasa
10. PYK: Piruvato quinasa
11. PDC: Piruvato descarboxilasa
12. ADH: Alcohol deshidrogenasa
13. G6P: Glucosa- 6- fosfato
14. F6P: Fructuosa - 6- fosfato
15. PP: Vía fosfato-pentosa
16. TCA: Ciclo del ácido tri-carboxílico

17. NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido
18. ATP: Trifosfato de Adenosina.
19. ADP: Difosfato de Adenosina.
20. AMP: Monofosfato de Adenosina.
21. NaOCl: Hipoclorito de sodio
22. (-OCl): Ion hipoclorito
23. HOCl: Acido hipocloroso
24. Cl₂: Cloro
25. C₂H₅OH: Etanol
26. CaCO₃: Carbonato de calcio
27. H₂SO₄: Ácido sulfúrico
28. KCl: Cloruro de potasio
29. NaCl: Cloruro de sodio
30. D.Q.O: Demanda química de oxígeno
31. D.B.O: Demanda bioquímica de oxígeno
32. YGC: Agar Cloranfenicol
33. PC: Agar Plate Count
34. VRB: Agar violeta cristal rojo neutro bilis lactosa
35. DPD: Dietil-para-fenil-diamina

RESUMEN.

El presente trabajo estudia el efecto de las variaciones de la concentración del cloro residual en el agua de proceso, sobre la actividad fermentativa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la planta de destilería del ingenio Mayagüez S.A. Los análisis fisicoquímicos y microbiológicos realizados al agua de producción utilizada en la fermentación alcohólica evidenciaron una influencia en la producción de etanol, que fluctúa entre un 90.56 % y 85.84 % de rendimiento. Estos resultados son correspondientes con los obtenidos a partir de la viabilidad y tinción diferencial de la levadura. El estudio permitió establecer que 1.5 ppm es la concentración de cloro residual adecuada, que ejerce el menor efecto sobre la viabilidad y productividad de etanol en comparación con el control y el balance teórico esperado.

INTRODUCCIÓN.

El etanol es considerado un recurso energético sostenible, puesto que ofrece diversas ventajas sobre los derivados del petróleo, como son: la disminución en la producción de gases invernadero, disminución del costo del combustible, mayor seguridad energética y apoyo a producciones agrícolas (Pérez Ávila, 2012; Ramírez Nieto & Pedroza Flórez, 2001). La producción de etanol en Colombia representó el 0,7% de la oferta mundial del año 2015, con 1.72 mmba (274 millones litros), producidos por 5 ingenios azucareros del valle geográfico del río Cauca, cuya capacidad instalada es de 2.4 mmba (1.050.000 l/día). Estas plantas son abastecidas con 3.8 millones de toneladas de caña de azúcar, equivalentes al 16% de la producción del país (Quintero Dallos, 2009).

El proceso de obtención de etanol a partir de caña de azúcar comprende la extracción del jugo de caña (rico en azúcares) además de su acondicionamiento para hacerlo más asimilable por las levaduras durante la fermentación. Del caldo resultante de la fermentación debe separarse la biomasa, para dar paso a la concentración del etanol mediante diferentes operaciones unitarias y su posterior deshidratación, forma en que es utilizado como aditivo oxigenante (Cardona, Sánchez, Montoya, & Quintero, 2005; Zabed et al., 2014). El etanol ha sido obtenido por fermentación de diversos sustratos, principalmente de la industria agroazucarera tales como la melaza, un sustrato de alto interés ya que es considerado un subproducto de la fabricación del azúcar crudo y debido a su bajo costo y composición, es ideal para la obtención de alcohol por medio de vías fermentativas. Esta melaza está conformada principalmente de diversos azúcares los cuales pueden ser fermentados por levaduras o bacterias. Las principales responsables de la fermentación de estos sustratos han sido levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, aunque existen estudios que demuestran producción de alcohol empleando bacterias como *Zymomona mobilis* (Fajardo Castillo & Sarmiento Forero, 2007; Garzón Castaño & Hernández Londoño, 2009).

Durante el proceso de fermentación de los subproductos de la caña de azúcar, se deben brindar condiciones especiales para que las levaduras puedan llevar a cabo el proceso fermentativo estas condiciones son: Aireación durante la fase aerobia o de propagación, pH, Temperatura, macro y micronutrientes y lo más importante el alimento, como son melazas o mieles, provenientes de la industria azucarera. Las melazas son altamente viscosas, y su manipulación es difícil en estas condiciones. Por estas razones es necesario diluir las melazas, para ello se les agrega agua hasta obtener diluciones de 25° Brix (Mayagüez, 2007). El agua con la cual se prepara la mezcla o el alimento para la levadura, debe someterse a un tratamiento fisicoquímico para eliminar o reducir carga microbiana e impurezas que puedan influenciar negativamente en la fermentación. Uno de los tratamientos principales, utilizado en la industria es la cloración. El uso de este como agente desinfectante empezó a principios del siglo XX y es la práctica universal empleada para la desinfección del agua por su economía y manejabilidad. La experiencia ha demostrado que el cloro y sus compuestos son activos desinfectantes para la destrucción de la flora bacteriana. La desinfección se consigue al provocar una alteración en los mecanismos celulares de los organismos mediante la destrucción o alteración de la organización estructural (daños en la pared celular), interferencia con el metabolismo energético (inhibición de la actividad enzimática), interferencia con la biosíntesis y el crecimiento (alterando la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos) todo ello conllevando a la pérdida de viabilidad del microorganismo. Para llevar a cabo la actividad germicida sobre el microorganismo, el agente oxidante del cloro debe atravesar la membrana plasmática, que es de naturaleza fosfolipídica y oxidar enzimas respiratorias que contengan grupos sulfhidrilo (-SH), tales como la succinato deshidrogenasa que interviene en el ciclo de Krebs, frenando así los mecanismos celulares de obtención de energía (Estrela, Ribeiro, Estrela, Pécora, & Sousa-Neto, 2003; Junli, Li, Nanqi, Fang, & Juli, 1997).

Actualmente en Colombia no existen normas que regule la calidad fisicoquímica y microbiológica de aguas industriales o de proceso, estos valores deben ser establecidos internamente según la actividad y necesidad de la empresa, y tampoco existen estudios concretos que indiquen la concentración de cloro residual ideal en el agua de proceso y que no ejerza un efecto negativo sobre la levadura. Por lo anterior, el presente proyecto tiene como finalidad realizar un seguimiento sobre el efecto de diferentes concentraciones de cloro residual en el estado morfológico, viabilidad y producción de etanol de la levadura alcohólica utilizada en el proceso fermentativo de Mayagüez S.A.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo General.

Estudiar el efecto de la concentración del cloro residual presente en el agua de proceso en la actividad fermentativa de *S. cerevisiae* utilizada en la destilería de Mayagüez S.A.

1.2. Objetivos Específicos.

- Evaluar la calidad fisicoquímica y microbiológica del agua de proceso utilizada en el sistema de fermentación.
- Evaluar el efecto de la concentración del cloro residual en la morfología y viabilidad celular de la levadura alcohólica.
- Determinar el efecto de la concentración del cloro residual en la producción de etanol por *S. cerevisiae*.

2. JUSTIFICACIÓN.

El creciente interés por el desarrollo de sistemas de fermentación que tengan altas rendimientos de productividad encuentra su origen en dos preocupaciones: el calentamiento global y el potencial desabastecimiento de petróleo. Varios países del mundo industrializado han visto en los biocombustibles una fuente de energía alternativa, que los avances de la biotecnología pueden desarrollar y transformarlos en energías más limpias y confiables. Así el etanol se perfila como un recurso energético potencialmente sostenible, de alta viabilidad técnica, que puede ofrecer ventajas medioambientales y económicas a largo plazo. Para la obtención de alcohol es necesario que la levadura desdoble los azúcares presentes en medio en etanol y otros sub- productos, para llevar a cabo este desdoblamiento es necesario brindar condiciones nutricionales y fisicoquímicas a la levadura.

Actualmente el ingenio Mayagüez tiene una capacidad de producción de alcohol entre los 250.000 L a 300.000 L diarios, por lo que hace necesario que el sistema de fermentación se lleve a cabo con éxito, diversos factores deben ser controlados en el proceso de fermentación tales como: temperatura, pH, aireación, concentración de azúcares, factores nutricionales. Sin embargo, el tipo de agua (agua tratada químicamente con cloro) empleada es un factor que se encuentra inmerso a lo largo de la preparación de la fermentación alcohólica, aquí esta misma es empleada en la dilución de las mieles provenientes de fábrica, preparaciones de

insumos (urea y antiespumante y antibióticos) e hidratación de la levadura. El ingenio Mayagüez S.A., cuenta con la infraestructura necesaria que brinda las condiciones anteriormente mencionadas, cuenta con dos propagadores para la etapa aerobia (R-303-R304), 4 fermentadores (R-311, R-312, R-313 y R-314) y un sedimentador de crema de levadura (S-331). Normalmente el sistema empieza con la recepción de la miel y la dilución de la misma con el agua de proceso, a esta dilución final se le llama alimento e ingresa a los propagadores, seguidamente de la adición de macro y micronutrientes, además de brindar condiciones adecuadas de pH, temperatura y aeración. A lo largo de la propagación se ha evidenciado que, en esta etapa la levadura experimenta cambios en su morfología pasando de células redondas a células alargadas y agrupadas, según estudios reportados *Saccharomyces cerevisiae* puede sufrir cambios morfológicos producto de las variaciones ambientales. Por ende, es importante detectar cuales son los factores que provocan estos cambios morfológicos ya que, en los procesos industriales, la rápida proliferación de levadura es potencialmente un factor limitante en la producción del metabolito, además de que estos cambios impiden la floculación adecuada en el final de la fermentación (Barrales, Jiménez-Martínez, & Ibeas, 2009).

Una variable poco estudiada en los sistemas de fermentación es la exposición de la levadura a las concentraciones de cloro residual presentes en las aguas de proceso. Según estudios reportados, las levaduras presentan cambios de morfología cuando están expuestas a concentraciones de dióxido de cloro de 50mg/l (Meneghin, Reis, De Almeida, & Ceccato-Antonini, 2008). El cloro en una solución acuosa, incluso en cantidades pequeñas, presenta una rápida acción biocida. Aunque se desconoce el mecanismo de acción exacto del cloro, se ha demostrado que el ácido hipocloroso (HClO) es el responsable de la destrucción de los microorganismos. Se postula que el mecanismo de acción se basa en la inhibición de reacciones enzimáticas claves por la acción oxidativa del cloro sobre los grupos SH de las enzimas, además de su interacción con componentes de la membrana celular. Por lo anterior se hace necesario establecer cuál es la concentración de cloro residual adecuado en el sistema de fermentación de la planta de destilería de Mayagüez S.A., que no tenga ningún efecto negativo sobre la levadura alcohólica que pueda influir sobre su viabilidad, estado morfológico y rendimiento de etanol.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En los sistemas de fermentación las etapas de propagación y fermentación son los puntos se han utilizado para monitorear la fermentación industrial, debido a que en estas etapas se lleva a cabo el desarrollo celular de la levadura alcohólica para la producción de etanol (Bleocanica & Bahrim, 2013). Para el desarrollo de la levadura

en estas etapas se deben brindar condiciones especiales a lo largo de toda la fermentación como: Concentración de sustrato, pH, presión osmótica, temperatura, oxígeno, etc., esto con el fin de asegurar que el sistema sea eficiente y productivo, se ha demostrado a lo largo de diversas investigaciones que la presión osmótica y la aireación ejercen estrés oxidativo sobre la levadura generando alteraciones en su morfología celular debido a que se producen cambios en el entorno celular de la levadura (Pratt, Bryce, & Stewart, 2003; Vian, Carrascosa, & Gonzalez, 2005). Una variable inmersa dentro de las condiciones que se debe brindar al sistema de fermentación es el tratamiento del agua que se utiliza para la preparación del mismo. El ingenio Mayagüez incorpora en su sistema el agua de proceso para la preparación del alimento (mezcla) que tiene como finalidad servir de sustrato para el desarrollo celular de la levadura ,además de la preparación de insumos e hidratación de la levadura en las etapas de propagación y fermentación, debido a que esta se utiliza en todo el sistema de fermentación el ingenio establece ciertas condiciones que debe cumplir, para ello debe ser sometida a tratamientos fisicoquímicos y biológicos con la finalidad de cambiar las características de la misma y poder hacerlas asimilables dentro del sistema asegurando así que no tengan un efecto negativo en la fermentación, un proceso básico en el tratamiento del agua es la cloración con la incorporación de agentes químicos desinfectantes tales como el cloro ,esto se realiza con el fin de lograr una desinfección o eliminación de impurezas en el agua. Una vez tratada el agua esta ingresa al sistema de fermentación donde esta misma entra en contacto con la levadura y en este punto se evidencia como la levadura experimenta cambios morfológicos que afectan la viabilidad celular y por ende la productividad de etanol. No existe valores de cloro residual exactos que deban usarse dentro del sistema de fermentación que no ejerzan efectos negativos sobre la fermentación alcohólica, estos valores deben ser establecidos según la necesidad por cada organismo competente. Por ende, es importante establecer la concentración de cloro residual idónea para que el sistema de fermentación pueda llevarse a cabo sin afectar la capacidad fermentadora de la levadura e igualmente no comprometa el producto final.

4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

¿La concentración de cloro residual del agua de proceso utilizada en el sistema de fermentación, presenta un efecto sobre la viabilidad, estado morfológico y productividad de etanol en la levadura alcohólica utilizada en el proceso fermentativo del ingenio Mayagüez S.A?

5. MARCO TEORICO.

5.1. GENERALIDADES DE LA CAÑA DE AZÚCAR.

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es una planta monocotiledónea que pertenece a la familia de las poáceas o gramíneas, es una planta originaria de las islas del pacifico sur y nueva Guinea, extendida también en la india y otros países intertropicales de Asia, esta crece rápidamente en todas las regiones tropicales y subtropicales de la tierra. En Colombia se cultiva en forma productiva desde el nivel del mar hasta alturas superiores a los 2.000 metros en las más variadas condiciones de temperatura, luminosidad, precipitación y calidad de suelos y actualmente su cultivo se ha extendido por todo el mundo, hasta convertirse en uno de los principales cultivos. La caña de azúcar tiene el tallo macizo, que puede llegar a medir hasta 6 metros de altura, y de 2 a 8 centímetros de diámetro. Este tallo está lleno por dos partes diferenciadas: Un tejido esponjoso y dulce en la parte central (medula), del que se extrae un jugo rico en sacarosa (azúcar); y una parte periférica, rica en fibra, que en el proceso de extracción del azúcar construirá el “bagazo”. El número de tallos de la planta, el color y el hábito de crecimiento dependen de la variedad de la planta (Pérez Ávila, 2012). Así la caña de azúcar constituye el cultivo de mayor importancia desde el punto de vista de la producción azucarera, además representa una actividad productiva y posee varios subproductos, entre ellos la producción de energía eléctrica derivada de la combustión del bagazo, alcohol de diferentes grados como carburante o farmacéutico.

La clasificación taxonómica de la caña de azúcar es la siguiente: (Pérez Ávila, 2012).

Reino: *Vegetal*
División: *Magnoliophyta*
Clase: *Angiospermae*
Sub-clase: *Monocotyledoneae*
Súper Orden: *Commelinidae*
Orden: *Commelinales*
Familia: *Poaceae*
Género: *Saccharum*
Especie: *officinarum* L.

5.2. LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.

El alcohol se ha producido en grandes cantidades durante siglos. Su producción está asociada a bebidas alcohólicas, pero actualmente además de la enorme industria de las bebidas alcohólicas, el alcohol se ha producido en grandes cantidades como solvente industrial como aditivo para la gasolina. En términos generales la fermentación se describe como un proceso de oxidación en donde se

puede evidenciar la transformación de moléculas complejas a moléculas simples, lo que conlleva a la generación de un producto final orgánico, con liberación de energía. A diferencia de los procesos de oxidación comunes, donde el oxígeno o cualquier compuesto inorgánico oxidado es el que actúa como aceptor final, la energía química en la fermentación deriva de un proceso químico de fosforilación, por el que se da una transferencia de electrones que conduce a la generación de un compuesto orgánico oxidado (Garzon Castaño & Hernandez Londoño, 2009).

La fermentación alcohólica, es un proceso anaeróbico realizado por levaduras y algunas clases de bacterias. Donde el sustrato celular; mono y di sacáridos en su mayoría, son transformados principalmente en alcohol etílico y dióxido de carbono; con la generación de equivalentes de reducción de los compuestos NADH/NAD⁺ y NADHP/NADP⁺ y enlaces de alta energía de fosfato (ATP) (Montoya, Cardona, and Quintero 2004).

Los procesos catabólicos inician luego de que los azúcares son transformados en glucosa-6-fosfato (G6P) o fructosa-6-fosfato (F6P). A partir de allí se desarrolla la glucólisis y el metabolismo del piruvato. La glucólisis, contempla una serie de reacciones intermedias dentro la ruta 'Embden-Meyerhof-Parnas' (EMP) y la vía fosfato-pentosa (PP). En procesos aeróbicos, el piruvato es oxidado dentro del ciclo de los ácidos tri-carboxílicos - TCA; sin embargo, en procesos anaerobios, es la forma reducida de la coenzima NAD, la que se oxida, generando simultáneas reducciones del piruvato a acetato, ácido láctico o etanol, en el caso del metabolismo de fermentación alcohólica. Luego de la glicolisis, en las levaduras, el piruvato se descarboxila a aldehído para la generación de etanol, sin la intervención de Acetil-CoA, ver ilustración 1.

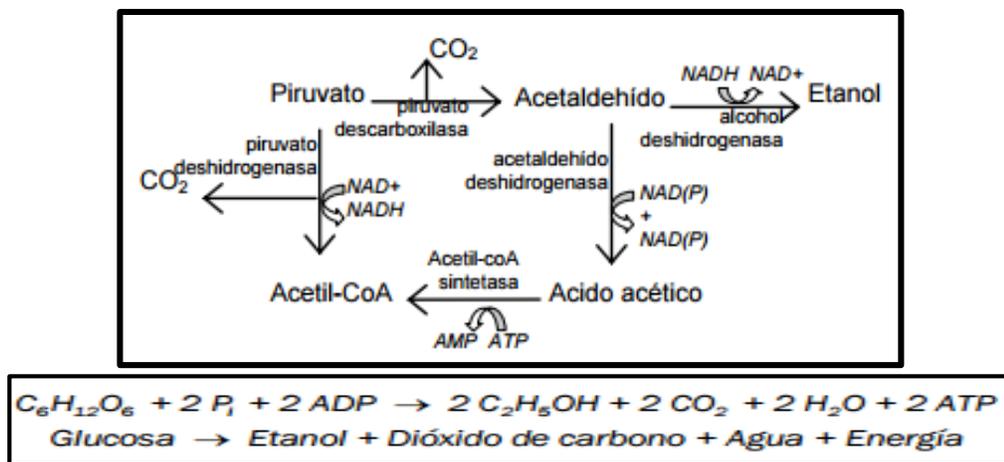


Ilustración 1. Estequiometría de la fermentación alcohólica. Fuente: (Quintero Suarez, 2011).

Según esta reacción, de 100 kg de glucosa se obtienen 51,1 kg de etanol y 48,9 kg de dióxido de carbono. En la práctica, el rendimiento real en etanol es menor que el valor teórico, ya que aproximadamente un 5% de glucosa es utilizado por el microorganismo para producir nuevas células y otros productos de su metabolismo(Mariscal Moreno, 2011; Nieto Galarza, 2009).

5.3. USO DE LA LEVADURA EN EL PROCESO FERMENTATIVO.

5.3.1. Generalidades de *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae es la especie de levaduras utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial puesto que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo , tolera altas concentraciones de etanol , en la fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior (Fajardo Castillo & Sarmiento Forero, 2007).

5.3.1.1. Características macroscópicas y microscópicas.

Saccharomyces cerevisiae es una levadura cuya colonia es color crema o blanco, apariencia húmeda y brillante de bordes irregulares, ver ilustración 2A. La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30 °C. Puede producir ascosporas cuando hay requerimientos nutricionales adecuados (Fajardo Castillo & Sarmiento Forero, 2007).Sus dimensiones son: 2.5-10 micras de ancho y 4.5-21 micras de largo. Microscópicamente se observan redondas y ovoides, elipsoides a veces cilíndricas y filamentosas, ver ilustración 2B (Fajardo Castillo & Sarmiento Forero, 2007).

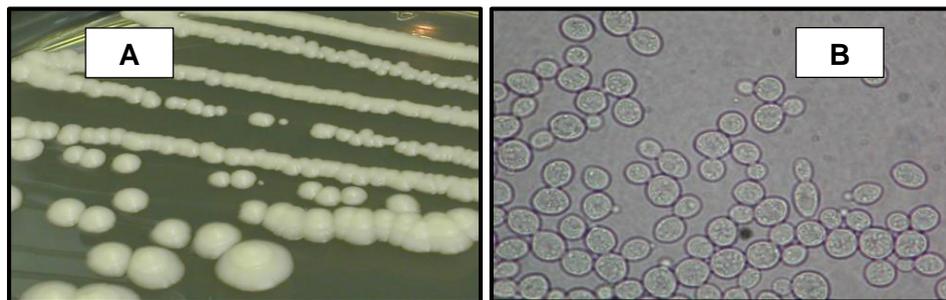


Ilustración 2. Morfologías de *Saccharomyces cerevisiae*. A) Aspectos macroscópicos; B) Aspectos microscópicos (tinción con azul de metileno 1 %, objetivo de 40 X). Fuente: http://www.uwyo.edu/virtual_edge/lab13/funqi_results.htm

5.3.1.2. Taxonomía y ciclo biológico de división celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Pertenece a los ascomycotas, aunque son unicelulares, se encuentran ubicadas dentro de este grupo porque se reproducen sexualmente por somatogamia y generan la formación de ascos, en los cuales se desarrollan ascosporas. El ciclo de vida de la levadura *S. cerevisiae* alterna dos fases, una haploide y otra diploide. Las células haploides presentan dos posibilidades en su ciclo biológico: un ciclo de reproducción vegetativo, por el que la célula se divide para dar dos células iguales, y un ciclo sexual, en el que dos células de tipo sexual opuesto se fusionan para dar lugar a una célula diploide que entra de nuevo en un ciclo de división vegetativo (Mariscal Moreno, 2011).

A continuación, se muestra la clasificación taxonómica de *S. cerevisiae*, y su ciclo de división celular (Garzon Castaño & Hernandez Londoño, 2009).

Reino: Hongo
División: Amastogomycota
Clase: Ascomycetes
Sub-clase: Hemiascomycetidae
Orden: Endomycetales
Familia: Sacchaomycetaceae
Sub-Familia: Saccharomycetidae
Género: *Saccharomyces*
Especie: *cerevisiae*

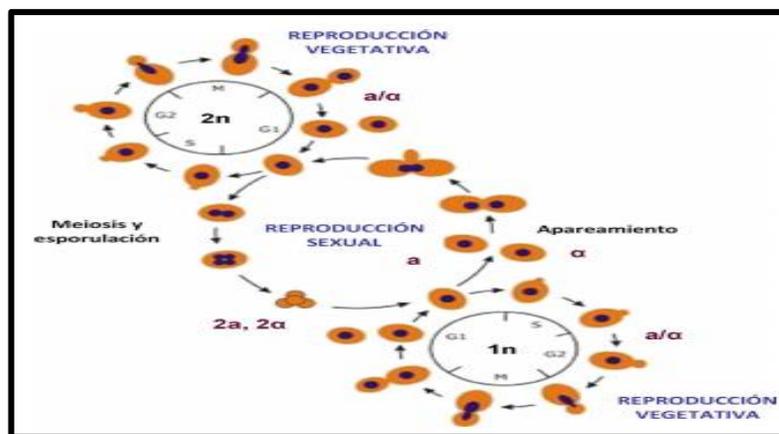


Ilustración 3. Esquema del ciclo biológico de *S. cerevisiae*. Fuente: (Mariscal Moreno, 2011).

Durante el ciclo de vida vegetativo, la levadura se divide por gemación. La célula hija inicia su crecimiento formando una yema en la célula madre hasta que alcanza un tamaño similar a ésta, teniendo lugar en este momento la citocinesis, septación

y separación de las dos células. Este ciclo está organizado en periodos de división celular bien definidos, coordinados e irreversibles (mitosis), separados por periodos de gran actividad metabólica (interfase). La mitosis es el proceso celular que asegura el reparto equitativo del material hereditario, duplicado durante la interfase, y culmina con la citoquinesis, responsable de la división de los orgánulos y otros componentes citoplasmáticos entre las dos células.

Las células diploides pueden reproducirse vegetativamente por gemación si el medio en el que se encuentran tiene los nutrientes apropiados para ello o pueden esporular en condiciones ambientales de limitación de nutrientes, como pueden ser la falta de nitrógeno y la ausencia de una fuente de carbono fermentable en el medio. Durante la esporulación, la célula diploide se divide por meiosis, dando lugar a cuatro células hijas haploides con una dotación cromosómica que será la mitad de la célula madre, las cuales quedan contenidas dentro de un saco denominado asca. Las ascas poseen una pared gruesa capaz de proteger a las células de las adversidades del medio ambiente durante largos periodos de tiempo. Si las condiciones del medio lo permiten, la pared del asca se degrada y se liberan los productos haploides (ascosporas), que germinarían y comenzaría un ciclo mitótico haploide, dividiéndose por gemación (Mariscal Moreno, 2011).

5.3.1.3. Requerimientos nutricionales.

Saccharomyces cerevisiae requiere ciertos nutrientes y condiciones ambientales para su apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son básicamente necesarios como por ejemplo carbono, hidrogeno, oxigeno, nitrógeno y fósforo.

El carbono sirve como fuente de energía y como material constitutivo de la masa celular. El nitrógeno se encuentra en la célula formando parte esencial de las proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos; el fósforo se encuentra en los ácidos nucleicos en la lecitina y en diversos compuestos fosforilados que participan activamente en los procesos de degradación oxidativa y de intercambio energético (ATP, ADP, AMP, NADP) (Fajardo Castillo & Sarmiento Forero, 2007).

5.3.1.4. Requerimientos fisicoquímicos.

El crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se ve favorecido por un pH aproximado de 4.0 a 5.0. A pesar de la tolerancia bastante amplia de la levadura para las variaciones de pH, a partir de los sustratos habitualmente usados en los medios de cultivo forman productos en especial ácidos que influyen en el crecimiento celular, producción enzimática y utilización de glucosa (Fajardo Castillo & Sarmiento Forero, 2007).

5.3.1.5. Ruta metabólica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tradicionalmente, los microorganismos más empleados en la obtención de etanol son las levaduras, aunque existen varios tipos de bacterias y hongos que también son capaces de sintetizarlo en cantidades considerables. La fermentación alcohólica se realiza en ausencia de oxígeno, excepto durante el tiempo de inoculación, durante el cual se proporciona una pequeña cantidad para permitir un crecimiento limitado de los microorganismos, para que estos superen su fase de latencia inicien la fermentación (Nieto Galarza, 2009). En el caso de las levaduras, cuando éstas toman el azúcar del medio, se inicia toda una serie de reacciones intermedias, conocidas como la ruta glicolítica o ruta Embden-Meyerhof. A través de este proceso bioquímico, las levaduras rompen los azúcares en energía, intermediarios útiles para el crecimiento de las células, y una gran cantidad de productos finales (etanol, dióxido de carbono y calor), los cuales son excretados por las mismas. Las levaduras empleadas para llevar a cabo el proceso de fermentación alcohólica, requieren, que la glucosa sea catabolizada mediante la glucólisis o ruta de Embden-Meyerhof, para obtener el piruvato, el cual posteriormente por la acción de enzimas específicas, se convierte anaeróbicamente en etanol y dióxido de carbono, ver ilustración 4 (Bai, Anderson, & Moo-Young, 2008). Posteriormente, el piruvato se descarboxila, debido a la presencia de la enzima piruvato descarboxilasa que se encuentra en todos los organismos que metabolizan alcohol, para formar acetaldehído el cual se reduce a etanol por la presencia de NADH como agente reductor, a través de la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa, la cual está en todos los organismos capaces de dar lugar a la fermentación alcohólica (Bai, Anderson, & Moo-Young, 2008).

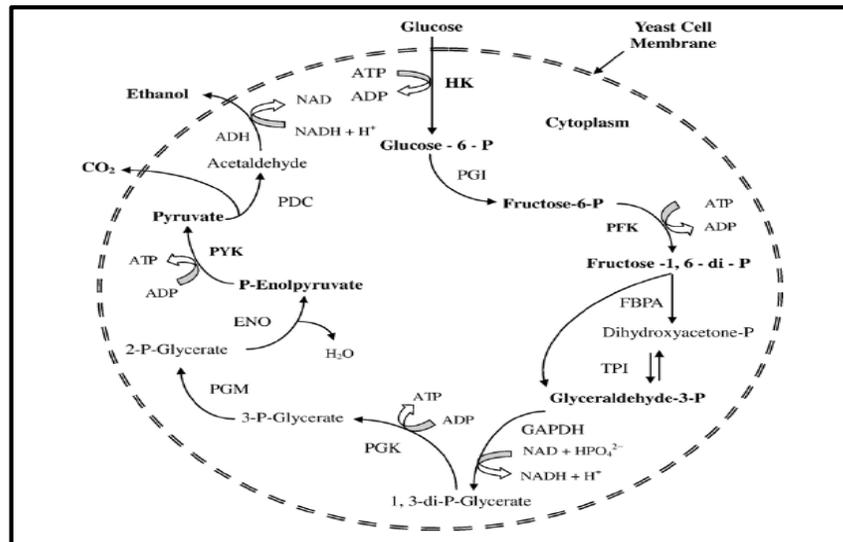


Ilustración 4. Vía metabólica de *S. cerevisiae* para la producción de etanol
 Abreviaturas: **HK:** hexoquinasa, **PGI:** fosfoglucoisomerasa, **PFK:**

Fosfofructoquinasa, FBPA: fructosa bisfosfato aldolasa, TPI: triosa fosfato isomerasa, GAPDH: gliceraldehídos-3-fosfato deshidrogenasa, PGK: fosfoglicerato quinasa, PGM: fosfogliceromutasa, ENO: Enolasa, PYK: piruvato quinase, PDC: piruvato descarboxilasa, ADH: Alcohol deshidrogenasa. Fuente: (Bai, Anderson, & Moo-Young, 2008).

5.3.1.6. Factores que inducen al estrés de *S. cerevisiae* durante la fermentación.

Durante la fermentación de etanol, las células de levadura sufren varios tipos de estrés, algunos son de carácter ambiental, tales como la deficiencia o agotamiento de nutrientes indispensables, las altas temperaturas y la contaminación, mientras que los otros son del metabolismo de la célula de levadura, tales como la acumulación de etanol y la formación de sustancias inhibitorias tras la fermentación (Nieto Galarza, 2009).

- *Concentración de azúcares:* Para la multiplicación inicial de la levadura, la concentración de azúcares debe mantenerse a niveles bajos, ya que la respiración del microorganismo puede verse afectada con grandes cantidades de azúcar.
- *Oxígeno:* En la fermentación, la presencia de oxígeno se traduce en una menor producción de alcohol, debido a que la levadura puede pasar a oxidar carbohidratos por medio de la respiración para obtener energía, generando un crecimiento celular acelerado pero mínima producción de etanol.
- *Agitación:* Es un factor que actúa disminuyendo la sedimentación de células, propiciando un contacto eficiente de los microorganismos con el sustrato.
- *Temperatura:* Influye directamente en el crecimiento de las levaduras y por tanto en la duración de la fermentación y en el metabolismo de las levaduras, que es el que determina la composición química del producto y la aparición o no de sustancias no deseadas. La temperatura durante la fermentación alcohólica se debe mantener entre 28 y 34°C. Como la fermentación alcohólica es un proceso exotérmico, es decir, se desprende energía en forma de calor, es necesario controlar el aumento de temperatura, ya que temperaturas mayores a 37°C aumentan el efecto inhibitorio del etanol, favorecen el desarrollo bacteriano y las levaduras comenzarían a morir deteniéndose el proceso fermentativo.
- *pH:* Considerando que la levadura se desenvuelve perfectamente en medios ácidos, el mosto debe mantenerse a un pH óptimo de 4.5 para evitar el crecimiento de bacterias. Pero hay que tener cuidado porque a un pH por

debajo de 4.2, alcohol etílico aumenta su tendencia a oxidarse hacia ácido acético.

- *Calidad de la levadura:* El éxito o fracaso de un proceso fermentativo está relacionado con el microorganismo utilizado. Para los procesos de fermentación a escala industrial generalmente se busca que la cepa a utilizar sea genéticamente estable, con velocidad de crecimiento alta, que lleve a cabo el proceso fermentativo en un tiempo corto, entre otros.
- *Contenido de alcohol:* El máximo contenido de alcohol que se puede alcanzar en la fermentación es de 12% en volumen, ya que a concentraciones más altas ejerce un efecto antibacteriano contra la levadura.
- *Otros nutrientes:* Además de los azúcares, es de vital importancia que el medio disponga de una base nutricional adecuada para poder llevar a cabo la fermentación. Éste debe contar con una buena concentración de nitrógeno, fósforo, carbono, azufre, potasio, magnesio, calcio y vitaminas. El nitrógeno, por ejemplo, es un factor clave para la multiplicación y la actividad fisiológica de la levadura, pues forma parte de la composición de los aminoácidos, de las proteínas estructurales y de las enzimas que intervienen en las reacciones metabólicas. El fósforo también es necesario porque hace parte de las moléculas de ADN, ARN y de los fosfolípidos en las membranas lipídicas de la levadura; además de ser utilizado para almacenar y transportar la energía mediante el ATP (Fajardo y Sarmiento, 2007).

5.4. MECANISMO DE ACCIÓN DEL CLORO.

El hipoclorito de sodio (NaOCl) es el desinfectante más utilizado en la industria a pesar de la disponibilidad creciente de otros desinfectantes. El hipoclorito de sodio cumple muchos requisitos como el desinfectante ideal y, además, tiene una excelente acción de limpieza. La eficacia del hipoclorito de sodio en los procesos de limpieza y desinfección depende de la concentración de cloro disponible y del pH de la solución. El ácido hipocloroso (HOCl) es un ácido débil y se disocia al ion hipoclorito (-OCl) y protón (H⁺) dependiendo del pH de la solución. Se cree generalmente que HOCl es la especie activa en la acción germicida, mientras que la concentración de -OCl es un factor clave que determina la eficiencia de limpieza. Tanto el ácido hipocloroso (HOCl) como el ion hipoclorito (-OCl) son agentes oxidantes fuertes. Se ha informado que HOCl y -OCl reaccionan con una amplia variedad de moléculas biológicas tales como proteínas, aminoácidos, péptidos, lípidos y ADN a condiciones de pH fisiológicas. Entre las moléculas biológicas, el doble enlace C = C, el enlace peptídico (enlace amida), los grupos amino y los grupos tiol son susceptibles al ataque electrofílico de Cl⁻ (Estrela et al., 2002).

El hipoclorito de sodio tiene un amplio espectro antimicrobiano, la actividad germicida de una solución diluida de hipoclorito de sodio depende de la concentración de HOCl. Esto se atribuye a la penetración de HOCl en la célula microbiana a través de la pared celular y la membrana. Se cree que el mecanismo de la actividad germicida de HOCl o -OCl se debe a la inhibición de la actividad enzimática esencial para el crecimiento, daño a la membrana y al ADN. El HOCl también puede generar especies oxidativas deletéreas comunes que pueden dañar componentes celulares (Fukuzaki 2006).

Un modelo para la acción germicida de HOCl y -OCl está basado en su capacidad para penetrar en la célula microbiana como se muestra en la ilustración 5. Este modelo explica la actividad germicida de HOCl y -OCl para difundir a través de la membrana celular microbiana. Por lo tanto, -OCl sólo ejerce una acción oxidante fuera de la célula (A). En el primer paso de la desinfección con -OCl, se produce la rotura o la desintegración de la pared y de la membrana celular microbiana, -OCl inactiva las proteínas funcionales localizadas en la membrana plasmática. Por otra parte, el HOCl puede penetrar en la bicapa lipídica de la membrana plasmática por difusión pasiva. La penetración de HOCl se debe a su neutralidad eléctrica ya que su tamaño molecular es comparable al del agua. Como resultado, el HOCl puede atacar la célula microbiana no sólo desde fuera de la célula (A'), sino también dentro de la célula (B y C). Los estudios sobre la inactivación de microorganismos por desinfectantes indican que la concentración de desinfección y el tiempo de contacto son las dos variables clave que determinan la eficiencia de la desinfección (Estrela et al. 2003).

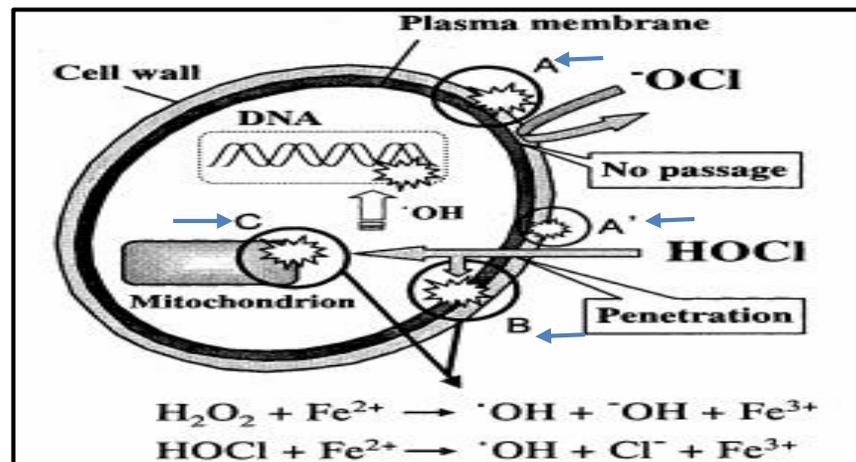


Ilustración 5. Esquema que ilustra los mecanismos de las acciones germicidas de HOCl y -OCl en base a su capacidad para penetrar la membrana en la célula microbiana. El -OCl ionizado tiene una pobre actividad germicida debido a su incapacidad para difundirse a través de la membrana plasmática microbiana y ejerce una acción oxidante sólo desde fuera de la célula (A). HOCl puede penetrar la

bicapa lipídica en la membrana plasmática por difusión pasiva debido a su neutralidad eléctrica. HOCl puede atacar la célula microbiana tanto desde el exterior (A') y dentro de la célula (B y C), que es responsable de la potente actividad germicida de HOCl; Fuente: (Fukuzaki 2006).

5.5. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ETANOL.

5.5.1. Descripción general del proceso.

El sector azucarero colombiano se encuentra ubicado en el valle geográfico del río Cauca, que abarca 47 municipios desde el norte del departamento del Cauca, la franja central del Valle del Cauca, hasta el sur del departamento de Risaralda. En esta región hay 225.560 hectáreas sembradas en caña para azúcar, de las cuales, el 25% corresponde a tierras propias de los ingenios y el restante 75% a más de 2.750 cultivadores de caña. Dichos cultivadores abastecen a 13 ingenios de la región (Cabaña, Carmelita, Manuelita, María Luisa, Mayagüez, Pichichí, Risaralda, San Carlos, Tumaco, Ríopaila-Castilla, Incauca y Providencia). Desde 2005, cinco de los trece ingenios tienen destilerías anexas para la producción de alcohol carburante (Incauca, Manuelita, Providencia, Mayagüez y Risaralda). El valle geográfico del río Cauca ofrece condiciones excepcionales para este cultivo, las cuales han permitido obtener un rendimiento de conversión a etanol de aproximadamente 56,61 bb/ha/año (9.000 l/ha/año), siendo posiblemente la región más productiva del mundo, por ello los datos de gastos agronómicos fueron basados en esta región del país. Cinco destilerías en diferentes locaciones en el país están en funcionamiento, como se muestra en la siguiente tabla (Cardona, Sanchez , Montoya, & Quintero, 2005).

Tabla 1. Capacidad de producción de alcohol a base de caña de azúcar.

DESTILERIA	CAPACIDAD (l/día)	Fecha de Funcionamiento
Incauca	300.000	Octubre 2005
Providencia	250.000	Octubre 2005
Manuelita	250.000	Marzo 2006
Mayaguez	150.000	Marzo 2006
Risaralda	100.000	Marzo 2006
TOTAL	1.050.000	

Fuente: (Pérez Ávila, 2012).

Actualmente el ingenio Mayagüez tiene una capacidad de producción de alcohol entre los 250 000L a 300 000 L diarios.

La producción de etanol tiene 5 procesos básicos que son, ver ilustración 6: materia prima e insumos, propagación y fermentación, destilación, deshidratación y finalmente una etapa de compostaje para el tratamiento de efluentes y subproductos de la producción de etanol (vinaza). El proceso de fermentación propiamente dicho, arranca cuando los azúcares fermentables presentes en la materia prima, se ponen en contacto con la levadura, la cual los transforma a etanol y gas carbónico. Al producto de la fermentación se le conoce como 'Vino' que es un material rico en alcoholes, especialmente el etanol.

El alcohol es obtenido por fermentación de un mosto como resultado de un proceso bioquímico. El mosto es, en este caso el resultado de la mezcla diluida con agua de proceso o de jugo clarificado, meladura y miel A, miel B o de miel final. El mosto se recibe en un tanque de almacenamiento a partir del cual se alimentan los fermentadores para hacer la conversión de los azucares invertidos contenidos en la miel en etanol a través de reacciones bioquímicas ocasionadas por una cepa especial de levadura.

El vino así obtenido (7-10% v/v etanol) se envía a un proceso de destilación que emplea cuatro columnas de platos trabajando en serie con el objetivo de alcanzar un producto de cabeza con 45% v/v de etanol en la segunda columna y 96 % v/v de etanol en la última columna.

El flujo de cabeza de la última columna se envía a un sistema de dos torres de deshidratación, una operando y la otra en regeneración, equipadas con tamices moleculares tipo 3A, los cuales retienen las moléculas de agua cuyo tamaño es de 2,8 angstrom y dejan pasar las moléculas de etanol cuyo tamaño es de 4,4 angstrom. El objetivo que se persigue con esta operación es retirar el agua presente en el alcohol hasta alcanzar una concentración de 99.6 % v/v de etanol (alcohol carburante o anhidro) (Mayagüez, 2007).

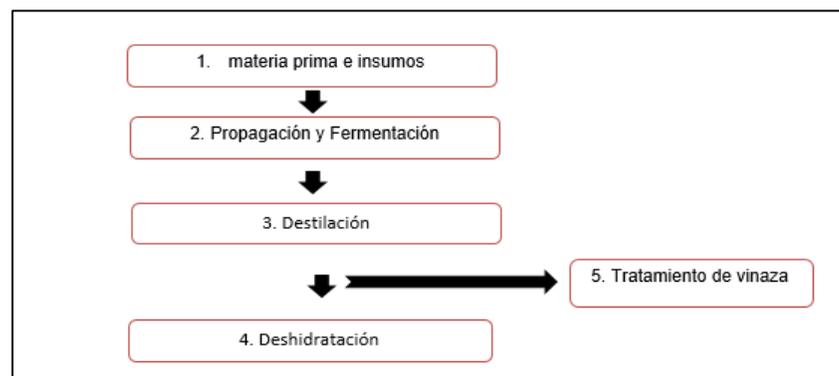


Ilustración 6. Diagrama de bloques del proceso de obtención de etanol anhidro. Fuente: (Mayagüez, 2007).

5.5.1.1. Materia prima e insumos.

Las materias primas utilizadas como sustrato en el proceso de producción de alcohol, juegan un papel fundamental en el proceso de fermentación, por lo cual, sus condiciones físicas, químicas y microbiológicas deben tenerse en cuenta cuando se habla de rendimiento de etanol (Mayagüez, 2007). Las materias primas utilizadas en el ingenio Mayagüez S.A. son: Miel A, Miel B, estas materias primas provenientes de fábrica, son diluidas con agua de proceso tratada químicamente con desinfectantes (Cloro); además de la preparación de insumos tales como: Urea, antiespumante, antibióticos e hidratación de levadura seca, son diluidos con este tipo de agua que ingresa al sistema de fermentación.

5.5.1.1.1. Miel A y B.

Las mieles son el subproducto más importante del proceso de extracción de azúcar debido a que pueden ser utilizadas como materia prima para la obtención de varios productos de interés industrial (Mayagüez, 2007).

El jarabe o meladura obtenida por evaporación es sometido a un proceso de cristalización y centrifugación con el fin de separar los cristales de azúcar. La miel A es el resultado de la primera fase de este proceso al extraer alrededor 75% del azúcar recuperable, sin embargo, este jarabe todavía tiene un alto contenido de azúcar, razón por la cual posteriormente se repite el proceso de cristalización y forma la masa B, la cual se vuelve a separar en las centrifugas. La miel resultante (miel B), se obtiene al extraer alrededor del 86% del azúcar recuperable (Mayagüez, 2007).

5.6. PRODUCCIÓN DE ALCOHOL EN EL INGENIO MAYAGÜEZ S.A.

El etanol (C₂H₅OH) también conocido como alcohol etílico es el alcohol más ampliamente utilizado en el sector transporte a nivel mundial. Su uso masivo como fuente energética es reciente, mientras que las aplicaciones como bebida, solvente, antiséptico, etc. son muy antiguas. Por esta razón, los avances investigativos concernientes a la producción de este compuesto químico son muy amplios y tienen enfoques hacia cada una de las partes que componen la cadena productiva, estimulado actualmente por su aplicación como combustible y justificado en los beneficios ambientales que su uso conlleva (Mayagüez, 2007).

5.6.1. Propagación y fermentación de la levadura alcohólica.

En el ingenio Mayagüez la obtención del alcohol, consta de varias etapas: propagación de la cepa de levadura a escala laboratorio, activación de la levadura, fermentación, destilación y deshidratación a escala industrial.

5.6.1.1. Propagación.

La propagación de la levadura tiene como objetivo, la multiplicación o división de la levadura bajo condiciones aeróbicas. En esta etapa se produce el crecimiento inicial de la levadura a pequeña escala con volúmenes de 600 ml, 1200 ml y 12000 ml. En esta etapa es de vital importancia tener un inóculo de buena calidad, brindando todas las condiciones apropiadas para que la cepa pueda realizar división celular sin ningún problema y cumplir con el %OH esperado.

La propagación de la levadura en planta, inicia en el Reactor R 303, con un volumen de inóculo de 12000 ml producido en el laboratorio, Esta propagación tarda un tiempo de 16 horas, a una temperatura de 30-31°C, con aireación constante, con Micro y Macronutrientes, alimentado con la miel A o B diluida con agua de proceso (a esta mezcla se le llama alimento y debe cumplir con un Brix de 8- 10) y antibióticos diluidos, para control de contaminación. Es importante anotar que esta fase durará mientras la levadura tenga oxígeno y los nutrientes necesarios para su desarrollo (Mayagüez, 2007).

5.6.1.2. Fermentación.

La producción de etanol por parte de la levadura tiene lugar en cuatro fermentadores (tanques R- 311, R -312 y R- 313 y R-314), con volúmenes efectivos de trabajos de 913 000 L. Estos tanques son operados bajo condiciones de anaerobiosis, donde la sacarosa contenida en el mosto se desdobra a azúcares simples o invertidos asimilables por la levadura mediante hidrólisis química ocasionada con adición de H₂SO₄ e hidrólisis enzimática, a través de la enzima Invertasa, metabolizada por la levadura. Los azúcares invertidos (glucosa y fructuosa) contenidos en el mosto son transformados principalmente en etanol y CO₂, también se presentan reacciones colaterales que originan alcoholes superiores (amílico, isoamilico, butílico, aldehídos, glicerina) y ácidos orgánicos: ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, etc., cuyas cantidades generalmente no pasan el 0.5 % del etanol. Es de destacar que la fermentación es un proceso anaeróbico, con liberación de energía, lo cual implica que los fermentadores deben ser enfriados para mantener la temperatura del proceso en un rango de 30 a 32 °C, esto se logra con agua de refrigeración (Mayagüez, 2007).

5.7. DESTILACIÓN.

La destilación consiste en la separación de los componentes del vino provenientes de la fermentación con una concentración alcohólica de 7-10 % v/v por evaporación fraccionada del mismo; los constituyentes más volátiles de la mezcla inicial se obtienen en mayor concentración en los gases y los menos volátiles en el residuo líquido. Esta operación unitaria se lleva a cabo con el fin de obtener un producto de cabeza cuya concentración de etanol corresponda al 95 % v /v. Para obtener tal producto de esta especificación, se requieren de cuatro columnas de destilación trabajando en serie, estas columnas están compuestas por bandejas provistas de elementos de contacto entre fase líquida y vapor. La primera la columna, denominada destiladora o mostera, recibe el alimento proveniente del tanque, esta columna opera bajo vacío y su calentamiento es proporcionado por vapor que sale por el tope de la siguiente columna de rectificación, a través de un intercambiador de calor. El vapor que sale como producto de cabeza de la columna destrozadora, tiene una concentración de 43,4 % v/v en etanol. El producto condensado se envía hacia la columna de rectificación con el objetivo de obtener un producto de 95 % v/v en etanol y a continuación esto se envía a la sección de deshidratación (Mayagüez, 2007).

5.8. DESHIDRATACIÓN.

Esta operación unitaria se realiza con el objetivo de retirar el agua que aun contiene el alcohol, para lo cual se emplean dos torres de tamices moleculares en paralelo que trabajan alternadamente; cuando una está en deshidratación la otra está en regeneración. El objetivo es obtener el etanol anhidro con una concentración del 99,8 % (v/v) (Mayagüez, 2007).

5.9. TRATAMIENTO DE VINAZA.

La vinaza es el principal efluente en la producción de etanol, y es producida durante el proceso de destilación. Se obtiene en una proporción superior a los 10:1, con relación al etanol producido. La vinaza se caracteriza por tener valores de pH bajos (menores a 4.5) y por presentar altos contenidos de materia orgánica en suspensión, expresados en términos D.Q.O y D.B.O, y alto contenido de minerales, lo cual la hace un alto contaminante e impide su descarga directa en fuentes hídricas (Olguín, et al.1995). Varias estrategias han sido sugeridas para el tratamiento de vinazas como lo son la digestión anaerobia, ósmosis inversa y electrodiálisis. Estos tratamientos no presentan un grado de desarrollo suficiente para tratar los altos volúmenes producidos. Otra estrategia es su recirculación al proceso de fermentación, permitiendo la reducción en el consumo de agua y el aprovechamiento de los nutrientes presentes en este efluente, factores que se

traducen al final en incrementos de la eficiencia global del proceso (Mayagüez, 2007).

A continuación, en la ilustración 7 se muestra el diagrama de producción de alcohol anhidro por parte del ingenio Mayagüez S.A.

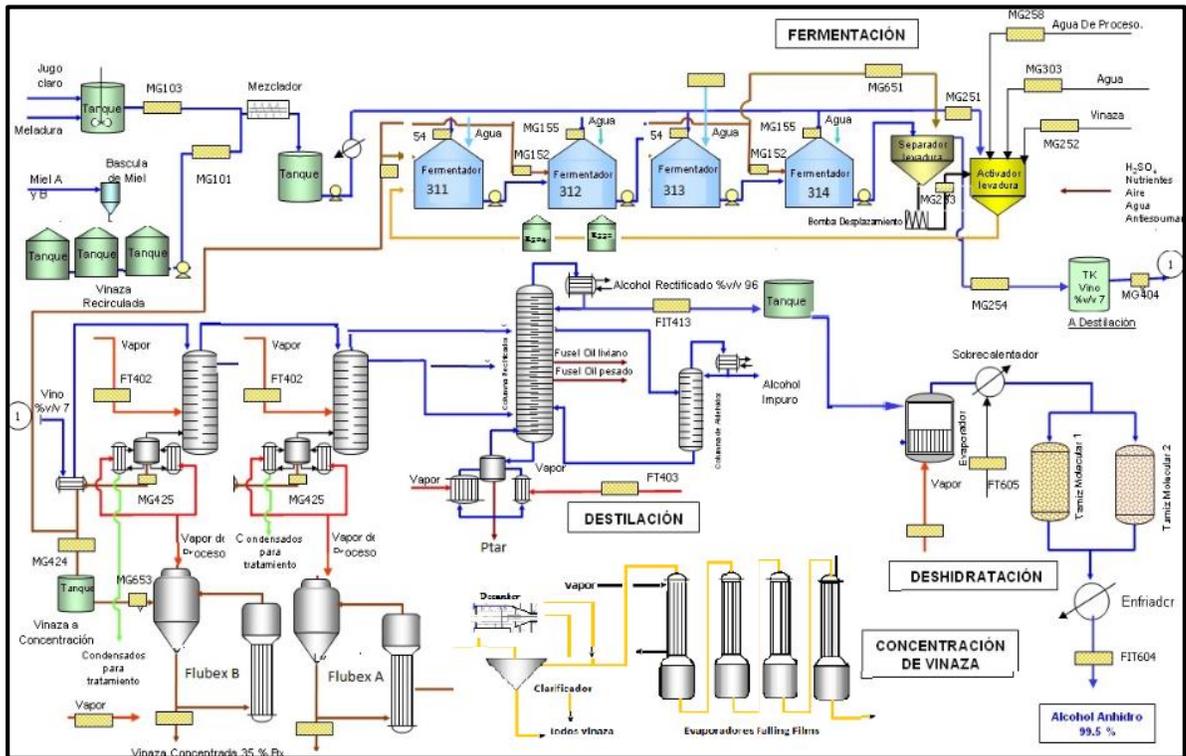


Ilustración 7. Diagrama del proceso de producción de alcohol anhidro en el ingenio Mayagüez S.A. Fuente: (Mayagüez, 2007).

6. MARCO LEGAL.

En Colombia no existe una normatividad que contemple las concentraciones de cloro residual ideales para un sistema de aguas de proceso o industriales que tienen como finalidad ingresar a un sistema de fermentación, lo contrario sucede con aguas potables destinadas para el consumo humano. En la resolución 2115 del 22 de junio de 2007 establece que el valor aceptable del cloro residual libre en cualquier punto de la red de distribución del agua para consumo humano deberá estar comprendido entre 0,3 y 2,0 mg/L. Debido a esta carencia en ingenio Mayagüez S.A., establece unos límites internos de cloro residual en su agua de proceso que van desde los 0.5 y 2.0 ppm, mediante el manual *DES-pos-018: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PLANTA PTAR DESTILERIA DE MAYAGÜEZ S.A.*

7. ANTECEDENTES

Para el monitoreo de la eficiencia de fermentación se han impuesto una variedad de ambientes que deben ser controlados, dado que la fermentación es el proceso por el cual las levaduras obtienen etanol de interés industrial por medio del desdoblamiento de sustratos ricos en azúcares. Gracias a las diversas investigaciones se han establecido condiciones apropiadas para llevar a cabo un proceso fermentativo de alto rendimiento. La presión osmótica y la acumulación de etanol intracelular en las levaduras son las variables más estudiadas ya que tienen efectos negativos sobre la tasa de crecimiento y capacidad fermentativa de la misma, así lo aseguran los autores (Amore, Russell, & Stewart, 1988) en su estudio *Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation*, donde expresan que la acumulación intracelular de etanol en la levadura se debe al aumento de la presión osmótica del medio rico en glucosa o sorbitol provocando un incremento en la concentración intracelular de etanol, además de la acumulación de glicerol lo que genera finalmente un retardamiento en el desarrollo celular por parte de la levadura ; (Pratt, Bryce, & Stewart, 2003; Vian, Carrascosa, & Gonzalez, 2008) en su estudio *The effects of Osmotic Pressure and Ethanol on Yeast Viability and Morphology* indican que la presión osmótica es uno de los factores que más compromete la actividad fermentativa de la levadura ,según los autores a presiones osmóticas muy altas, tales como las que se encuentran en los medios de fermentación, puede distorsionar el metabolismo de la levadura o disminuir su viabilidad afectando el rendimiento de fermentación. Existen otros factores diferentes de la presión osmótica que también tienen efectos adversos sobre la viabilidad y actividad fermentativa de las levaduras como: pH, CO₂ disuelto, etc., así lo expresa (Ohnuki, Enomoto, Yoshimoto, & Ohya, 2014) en su estudio *Dynamic changes in brewing yeast cells in culture revealed by statistical analyses of yeast morphological data*. Por otro lado, existen pocos estudios que relacionen el cloro residual como una variable que afecte la viabilidad y productividad de etanol pero (Meneghin, Reis, De Almeida, & Ceccato-Antonini, 2008) en su estudio *Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation* reporta que concentraciones de 50 mg /l de Dióxido de cloro afecta la viabilidad y morfología celular de la levadura. Por lo anterior es de vital importancia determinar cuál es la concentración de cloro ideal que no afecta la actividad fermentativa de la levadura utilizada en el ingenio Mayagüez S.A.

8. METODOLOGÍA.

El objetivo que se estableció en el presente trabajo fue estudiar el efecto del cloro residual presente en el agua de proceso sobre la actividad fermentativa de la levadura alcohólica en el ingenio Mayagüez S.A. Para estudiar este efecto se tomaron volúmenes de 3000 ml de agua de proceso que ingresa al reactor R 305 en balones de destilación PYREX fondo plano con capacidad de 6000 ml, esta misma se llevó a destilación y esterilización con el fin de reducir el cloro presente en ella y a partir de esta se prepararon las concentraciones de trabajo de cloro residual 1.5, 2.0 y 2.5 ppm evaluando así el posible efecto del cloro residual en la actividad fermentativa de la levadura.

8.1. UNIDAD EXPERIMENTAL

El siguiente trabajo fue realizado en dos etapas que corresponden a: ***EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y FISICOQUÍMICA DEL AGUA DE PROCESO*** y ***EFEECTO DEL CLORO RESIDUAL PRESENTE EN EL AGUA DE PROCESO SOBRE LA ACTIVIDAD FERMENTATIVA EN LAS ETAPAS DE PROPAGACIÓN Y FERMENTACIÓN***. Cada unidad experimental consta de dos variables: Microbiológicas y fisicoquímicas. Para la primera unidad experimental se realizó un total 7 ensayos para cada variable (ver tablas 2 y 3) donde se aplicó una media de los siete ensayos, estadística descriptiva (Desviación estándar y Varianza) y una prueba ANOVA con nivel de confianza del 95 % , para la segunda unidad experimental se realizó un total de 6 ensayos siendo 3 ensayos en la etapa de propagación evaluando variables microbiológicas y fisicoquímicas , 3 ensayos en la etapa de fermentación evaluando variables microbiológicas y fisicoquímicas (ver tablas 4,5,6 y 7) se aplicó una media de los 3 ensayos en cada etapa (propagación y fermentación) , estadística descriptiva (Desviación estándar y Varianza) y una prueba ANOVA con nivel de confianza del 95 % .

Se aplicó un diseño al azar que consistió en las siguientes etapas.

- 1) **EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y FISICOQUÍMICA DEL AGUA DE PROCESO.** Donde la evaluación microbiológica correspondió a: (Aerobios mesófilos, Coliformes totales y fecales, Mohos y levaduras); evaluación fisicoquímica (pH, temperatura, conductividad, dureza, alcalinidad y cloro residual), para ello se tomaron los siguientes puntos de muestreo: Agua de pozo (PZ), Agua clorada (TK 903), y Agua de proceso que ingresa al tanque reactivador (R 305), Se realizaron 7 ensayos para cada evaluación del agua.

Tabla 2. Unidad experimental evaluación microbiológica del agua de proceso.

Evaluación microbiológica Variable a medir	Medio de cultivo	Unidades	Numero de ensayos	Puntos de muestreo
Aerobios mesófilos	PC	Ufc/ml (Log)	7	PZ, TK 903, R 305
Coliformes totales y fecales	VRB	Ufc/ml (Log)	7	PZ, TK 903, R 305
Mohos y Levaduras	YGC	Ufc/ml (Log)	7	PZ, TK 903, R 305
Blanco (Agua Destilada)	PC,VRB,YGC	Ufc/ml (Log)	7	Agua destilada

Tabla 3. Unidad experimental evaluación fisicoquímica del agua de proceso.

Evaluación fisicoquímica Variable a medir	Medio de cultivo	Unidades	Numero de ensayos	Puntos de muestreo
pH	N.A	pH	7	PZ, TK 903, R 305
Temperatura	N.A	°C	7	PZ, TK 903, R 305
Conductividad	N.A	µs/cm	7	PZ, TK 903, R 305
Dureza	N.A	CaCO ₃ ,mg/litro	7	PZ, TK 903, R 305
Alcalinidad	N.A	CaCO ₃ ,mg/litro	7	PZ, TK 903, R 305
Cloro residual	N.A	ppm	7	PZ, TK 903, R 305
Blanco (Agua destilada)	N.A	pH, °C, µs/cm, CaCO ₃ , mg/litro, ppm	7	(Agua destilada)

N.A: No aplica

2) EFECTO DEL CLORO RESIDUAL PRESENTE EN EL AGUA DE PROCESO SOBRE LA ACTIVIDAD FERMENTATIVA EN LAS ETAPAS DE PROPAGACIÓN Y FERMENTACIÓN: En cada etapa se evaluaron variables microbiológicas (Viabilidad celular y estado morfológico) y variables fisicoquímicas (Azúcares fermentables iniciales, °Brix, pH, %OH y Azúcares residuales) en total se realizaron 6 ensayos (3 ensayos para la etapa de propagación evaluando las siguientes concentraciones de cloro residual en el agua 1.5, 2.0 y 2.5 ppm), (3 ensayos para la etapa de fermentación evaluando las siguientes concentraciones de cloro residual en el agua 1.5, 2.0 y 2.5 ppm).

Tabla 4. Unidad experimental efecto del cloro en la actividad fermentativa (ETAPA DE PROPAGACION) variables microbiológicas.

ETAPA DE PROPAGACION Variables microbiológicas Variable a medir	Medio de cultivo	Unidades	Numero de ensayos	[cloro a evaluar, ppm]	Tiempos (Horas)
Viabilidad celular	Propagación	Cel /ml	3	1.5, 2.0 y 2.5 ppm	T0, T8 y T24
Estado morfológico	Propagación	*% Células (Según coloración)	3	1.5, 2.0 y 2.5 ppm	T24

*Coloración de células: Blancas rosadas, marrones y rojas

Tabla 5. Unidad experimental efecto del cloro en la actividad fermentativa (ETAPA DE PROPAGACION) variables fisicoquímicas.

ETAPA DE PROPAGACION Variables fisicoquímicas Variable a medir	Medio de cultivo	Unidades	Numero de ensayos	[cloro a evaluar, ppm]	Tiempos (Horas)
Azúcares fermentables iniciales	Propagación	%Azúcar fermentable	3	1.5, 2.0 y 2.5 ppm	T0
°Brix	Propagación	°Brix	3	1.5, 2.0 y 2.5 ppm	T0, T8, T24
pH	Propagación	pH	3	1.5, 2.0 y 2.5 ppm	T0, T8, T24
% de grado alcohólico (OH)	Propagación	%v/v OH	3	1.5, 2.0 y 2.5 ppm	T0, T8, T24
Azúcar Residual	Propagación	%Azúcar residual	3	1.5, 2.0 y 2.5 ppm	T8, T24

Tabla 6. Unidad experimental efecto del cloro en la actividad fermentativa (ETAPA DE FERMENTACION) variables microbiológicas.

ETAPA DE FERMENTACION Variables microbiológicas Variable a medir	Medio de cultivo	Unidades	Numero de ensayos	[cloro a evaluar, ppm]	Tiempos (Horas)
Viabilidad celular	Fermentación	Cel /ml	3	1.5, 2.0 y 2.5 ppm	T0, T8, T24 y T48
Estado morfológico	Fermentación	*% Células (Según coloración)	3	1.5, 2.0 y 2.5 ppm	T48

*Coloración de células: Blancas rosadas, marrones y rojas

Tabla 7. Unidad experimental efecto del cloro en la actividad fermentativa (ETAPA DE FERMENTACION) variables fisicoquímicas.

ETAPA DE FERMENTACION Variables fisicoquímicas Variable a medir	Medio de cultivo	Unidades	Numero de ensayos	[cloro a evaluar, ppm]	Tiempos (Horas)
Azúcares fermentables iniciales	Fermentación	%Azúcar fermentable	3	1.5, 2.0 y 2.5 ppm	T0
°Brix	Fermentación	°Brix	3	1.5, 2.0 y 2.5 ppm	T0,T8,T24,T48
pH	Fermentación	pH	3	1.5, 2.0 y 2.5 ppm	T0,T8,T24,T48
% de grado alcohólico (OH)	Fermentación	%v/v OH	3	1.5, 2.0 y 2.5 ppm	T0,T8,T24,T48
Azúcar Residual	Fermentación	%Azúcar residual	3	1.5, 2.0 y 2.5 ppm	T8,T24,T48

Las variables de estudio a medir fueron las siguientes:

- 1) EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y FISICOQUÍMICA DEL AGUA DE PROCESO.** Evaluación fisicoquímica (Dureza, alcalinidad y cloro residual).
- 2) EFECTO DEL CLORO RESIDUAL PRESENTE EN EL AGUA DE PROCESO SOBRE LA ACTIVIDAD FERMENTATIVA EN LAS ETAPAS DE PROPAGACIÓN Y FERMENTACIÓN.** Etapa de propagación y fermentación: variables microbiológicas (Viabilidad celular y estado morfológico), Etapa de fermentación: variables fisicoquímicas (Porcentaje de grado alcohólico %OH)

Con los valores obtenidos de las variables de estudio se llevó a cabo un análisis de varianza ANOVA empleando un intervalo de confianza 95%.

8.2. TOMA DE MUESTRA.

8.2.1. Toma de muestra para análisis microbiológico.

Para la toma de muestras del análisis microbiológico de agua clorada se adiciono 0.1 ml de tiosulfato de sodio 4%, a recipientes previamente esterilizados (con el fin de neutralizar el cloro) continuándose con el protocolo descrito en el manual *CCA-pos-052: MUESTREO, IDENTIFICACION Y ANALISIS MICROBIOLOGICO LABORATORIO DESTILERIA DE MAYAGUEZ S.A.*

8.2.2. Toma de muestra para análisis fisicoquímico.

Para la toma de muestras del análisis fisicoquímico de agua clorada, se emplearon recipientes limpios y se procedió a seguir con el protocolo descrito por el manual *CCA-pos-052: MUESTREO, IDENTIFICACION Y ANALISIS MICROBIOLOGICO LABORATORIO DESTILERIA DE MAYAGUEZ S.A.*

8.3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y FISICOQUÍMICA DEL AGUA DE PROCESO.

8.3.1. EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA.

Para el análisis microbiológico de las muestras de agua, se emplearon las técnicas establecidas en el manual *CCA-pos-052: MUESTREO, IDENTIFICACION Y ANALISIS MICROBIOLOGICO LABORATORIO DESTILERIA DE MAYAGÜEZ S.A.* Se empleó la técnica de recuento en placa siembra profundidad, evaluando los parámetros microbiológicos: Recuento total de Aerobios mesófilos, Recuento de coliformes totales y fecales y Recuento de mohos y levaduras.

8.3.1.1. Determinación de Aerobios mesófilos.

Siembra en profundidad, empleando dilución 10^{-1} en Agar Plate Count (Merck Millipore), incubando a 35 ± 2 °C / 24- 48 horas.

8.3.1.2. Determinación de Coliformes totales y fecales.

Siembra en profundidad, empleando dilución 10^{-1} en VRB - Agar violeta-rojo neutro-bilis (Merck Millipore) medio selectivo para la investigación presuntiva y recuento de Coliformes totales, incubando a 35 ± 2 °C / 24- 48 horas. Para la confirmación de

coliformes fecales se examinó la fluorescencia de las colonias presuntivas con lámpara luz U.V

8.3.1.3. Determinación de mohos y levaduras.

Siembra en profundidad, en dilución 10^{-1} en YGC- Agar Cloranfenicol glucosa (Merck Millipore), medio selectivo recomendado para el recuento genérico de mohos y levaduras. Incubando a 30 ± 2 °C / 3 a 5 días

8.3.2. EVALUACIÓN FISICOQUÍMICA.

Para el análisis de las variables fisicoquímicas de las muestras de agua, se emplearon las técnicas establecidas en los manuales *DES-pos-018: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PLANTA PTAR DESTILERIA DE MAYAGÜEZ S.A;* *CCA-pos-062: ANÁLISIS DE CALDERA ALTA PRESIÓN DE MAYAGÜEZ S.A.*

8.3.2.1. Determinación de pH.

En un Beaker de 250 ml se midieron aproximadamente 200 ml de las muestras de agua a analizar, se prosiguió a introducir el electrodo de vidrio del pH-metro en cada muestra. Cuando se estabilizo el equipo, se realizó la lectura y se registró el valor del pH obtenido.

8.3.2.2. Determinación de Conductividad.

Se enjuagaron las celdas de conductividad con una o más porciones de la muestra a medir. Evitando burbujas de aire en la celda. Se realizó la lectura en el Conductímetro y se registró el valor dado por el equipo.

8.3.2.3. Determinación de Dureza.

Para determinar la dureza del agua en términos de carbonatos de calcio, se midieron 50 ml de la muestra de agua en un frasco Erlenmeyer, ajustando el pH a 10. Seguidamente se adiciono 1 ml de solución Buffer y 1 a 2 gotas de indicador negro de ericromo. Posteriormente, se tituló con EDTA 0,02 N desde una bureta, hasta obtener un cambio de color de rojo vino a azul. La dureza se expresó como los mg de carbonato de calcio/ ml de agua con la siguiente expresión:

$$\text{Dureza (EDTA) como CaCO}_3, \text{ mg/ litro} = \frac{A \times N \times 50 \times 1000}{\text{ml de muestra}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Dónde:

A: ml de titulante usado para la muestra (EDTA)

N: Normalidad del EDTA

8.3.2.4. Determinación de Alcalinidad.

Para la determinación de alcalinidad en agua, se midieron 50 ml de la muestra de agua en un frasco Erlenmeyer, se adicionaron 1 a 2 gotas de indicador mixto de verde de bromo cresol-rojo de metilo. Posteriormente se tituló con H₂SO₄ 0,20 N desde una bureta hasta obtener un cambio de color a rojo. La alcalinidad se expresó como los mg de Carbonato de calcio/ ml de agua con la siguiente expresión:

$$\text{Alcalinidad (H}_2\text{SO}_4\text{) como CaCO}_3, \text{ mg/ litro} = \frac{A \times N \times 50 \times 1000}{\text{ml de muestra}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Dónde:

A: ml de titulante usado para la muestra (Ácido Sulfúrico) N: Normalidad del Ácido Sulfúrico.

8.3.2.5. Determinación de cloro residual.

Se empleó el Kit para medir el cloro residual libre DPD (dietil-para-fenil-diamina), se enjuagaron las celdas del kit varias veces con la muestra de agua a analizar, a continuación, se agregaron 0.5 ml (10 gotas) del reactivo de DPD en la celda, seguidamente se adicionaron 5 ml de la muestra de agua a analizar. Se compararon con los patrones de color para obtener la concentración de cloro residual. La intensidad del color se comparó con una tabla de colores estándar para determinar la concentración de cloro en el agua. Entre más intenso el color, mayor es la concentración de cloro en el agua.

8.4. EFECTO DEL CLORO RESIDUAL PRESENTE EN EL AGUA DE PROCESO SOBRE LA ACTIVIDAD FERMENTATIVA EN LAS ETAPAS DE PROPAGACIÓN Y FERMENTACIÓN.

Para evaluar el efecto del cloro residual presente en el agua de proceso se partió de una solución stock de 1000 ppm de cloro y a partir de este stock se realizaron las diluciones para las concentraciones de cloro de 1.5, 2.0 y 2.5 ppm y con estas diluciones de cloro se prepararon los medios de propagación y fermentación según la cantidad de agua necesitada ver tablas 2 y 3

El volumen a adicionar en la muestra se calculó según la siguiente ecuación:

$$V1 * C1 = V2 * C2. \quad (\text{Ecuación 3})$$

Dónde:

C1: Concentración de la solución stock.

V1: Volumen a tomar para preparar la solución de trabajo

C2: Concentración de trabajo

V2: Volumen efectivo de trabajo

8.4.1. EFECTO DEL CLORO EN LA ETAPA DE PROPAGACIÓN.

En un balón de 2000 ml se prepararon 1000 ml de medio de cultivo de propagación: (miel B, + Agua de proceso con las diferentes concentraciones de cloro residual (1.5, 2.0 y 2.5 ppm) y un control de medio de cultivo con agua sin cloro residual (Agua destilada).

El medio de cultivo de propagación debía asegurar las siguientes características: °Brix de la mezcla entre 6.0 – 8.0, pH del medio entre 4.0 - 4, 5, fuente de nitrógeno y fósforo (10%), Micronutrientes (10 ppm), macronutrientes (100 ppm), más el (20 %) una suspensión de la levadura alcohólica estandarizada en la escala de Macfarlán 6 ($1,8 \times 10^9$ Células / ml). La propagación se llevó a cabo por 24 horas con aireación constante.

Tabla 8. Componentes del medio de propagación.

	Volumen
Mezcla (Miel B + Agua)	104.6 ml
*Agua de proceso	697 ml
Inoculo (Mc Farland 6)	200 ml
Ácido sulfúrico	1 ml
Urea	1 g
Acido pentatónico	0.1 g
Sulfato de zinc	0.1 g
Sulfato de cobalto	0.1 g
Sulfato de manganeso	0.1 g
Sulfato de magnesio	0.1 g
Antibiótico	1 g

*Agua de proceso evaluado las concentraciones de cloro residual (1.5, 2.0 y 2.5 ppm) y un control de medio de cultivo con agua sin cloro residual (Agua destilada)

8.4.1.1. Seguimiento de las variables fisicoquímicas y microbiológicas en la etapa de propagación.

Con el fin de evaluar el efecto del cloro residual sobre la levadura en esta etapa, se realizó un monitoreo de las **variables microbiológicas: Viabilidad celular y estado morfológico de la levadura alcohólica**, y **variables fisicoquímicas: Azúcares fermentables iniciales, °Brix, pH, %OH y azúcares residuales**. Este monitoreo se llevó a cabo a las 0, 8 y 24 horas de incubación.

8.4.1.2. Seguimiento de variables microbiológicas.

8.4.1.2.1. Viabilidad celular de la levadura mediante recuento en cámara de Neubauer.

El recuento de viabilidad celular se llevó a cabo en los tiempos mencionados (0, 8 y 24 horas de incubación), para el recuento de la levadura, se tomó 1 ml de muestra + 3 gotas del colorante azul de metileno, en un balón de 100 ml adicionando agua destilada, con la finalidad de diferenciar células vivas de muertas. Se realizó el conteo de las células en los 25 cuadrantes de la cámara de Neubauer; en donde se determinó: Población celular, %viabilidad, Número de células viables/ml teniendo en cuenta las siguientes formulas:

Población celular: Número de Células en 25 cuadrados x muestra en 0.1 mm^3 (i.e. 10^4) x factor de dilución. (Ecuación 4)

Porcentaje de viabilidad: recuento total de células- células muertas/ recuento total x 100% (Ecuación 5)

Número de células viables: Población celular x Porcentaje de viabilidad / 100 (Ecuación 6)

8.4.1.2.2. Estado morfológico.

El seguimiento del estado morfológico de la levadura se realizó al final de la propagación (T 24 horas). Para ello se empleó la técnica de coloración diferencial de levadura propuesto por (Prada & Castro, 1995) el cual consiste en preparar dos soluciones:

Solución A: (0.25 g de azul de metileno; 0.42 g KCl; 0.48 g CaCl₂.6H₂O; 9.0 g NaCl; 0.2 g NaHCO₃; 10 g Glucosa; 1000 ml agua destilada)

Solución B: (0.25 g safranina; 9.0 g NaCl; 0.42 g KCl; 0.48 g CaCl₂.6H₂O; 0.2 g NaHCO₃; 10 g Glucosa; 990 ml agua destilada; 10 ml alcohol etílico)

Estas dos soluciones se unificaron de la siguiente manera: dos partes de la solución B por cada una de la solución A, ajustado el pH a 9.5. Seguidamente se prosiguió a realizar el montaje en cámara de Neubauer de la siguiente manera:

Se tomaron 1ml de la muestra de propagación T 24 horas y se llevó al aforo en un balón de 100 ml y a partir de esta misma se tomaron un volumen de 5 ml y se diluyo en un volumen 2.5 ml de la solución de cloración anteriormente preparada. A partir de esta mezcla se realizó el montaje en cámara de Neubauer para realizar el recuento celular

En el microscopio óptico, se realizó el recuento y se observó la coloración de las células de levadura:

- Coloración azul clara o blanca: Células en excelente estado
- Coloración rosa claro: Células en bajo estado de deterioro
- Coloración marrón: Células en alto estado de deterioro
- Coloración roja: células muertas

8.4.1.3. Seguimiento de variables fisicoquímicas.

8.4.1.3.1. Determinación de azúcares fermentables iniciales.

Este procedimiento se realizó por el método estandarizado CCA-POS-052, con el fin de determinar el porcentaje de azúcares fermentables presente en el alimento, y se llevó a cabo al tiempo 0 horas, es decir al inicio de la propagación : en un Beaker de 250 ml se pesaron 10g de la muestra (Mezcla de miel B + Agua), se adicionaron 90 ml de agua destilada, esto se diluyo y se transfirió a un balón aforado de 200 ml, asegurándose de pasar cuantitativamente la muestra y completar el volumen a la marca de 200 ml. Se pipetearon 25 ml de la solución anterior, y se llevaron a un balón de 250 ml, se adicionaron 5ml de HCl 6.34 N, agitando vigorosamente. Esto se llevó a baño serológico, y cuando se alcanzaron los 65°C se agito fuertemente por 3 minutos, se dejó en reposo el balón con la muestra dentro del baño serológico por 12 minutos. A continuación, se retiró el balón y se dejó en refrigeración. Seguidamente la solución se diluyo en aproximadamente 125 ml con agua destilada, se adicionaron 3 gotas de fenolftaleína al 1%, y se adiciono NaOH 2mol/L hasta que la solución tomo un color rojo brillante. Se prosiguió a adicionar 4 ml de solución EDTA al 4% y se llevó al aforo a 250 ml con agua destilada. La solución anterior se transfirió en una bureta de 50 ml. En un Erlenmeyer se adicionaron 20 ml de agua destilada, 10ml de solución de Fehling A, 10 ml de

solución de Fehling B y se mezcló con ayuda de un magneto. Se adicionaron a la mezcla del Erlenmeyer 10 ml de la solución de la bureta, la solución se llevó a la plancha de calentamiento hasta el punto de ebullición. Cuando empezó a ebullición se cronometraron 2 minutos y se agregaron 5 gotas de azul de metileno al 1%. La solución tomó una coloración azul. Se colocó la bureta aproximadamente 2 cm sobre el cuello del Erlenmeyer, mientras el contenido se calentaba, se tituló adicionando gota a gota la solución hasta que la coloración desapareció completamente y tomó a un color rojo ladrillo.

La cantidad de Azúcares fermentables se expresó con las siguientes fórmulas:

$$\% \text{Azúcares fermentables} = \frac{1000}{\text{Titulo} * \text{Factor de dilucion} * \text{Factor de Fehling}} \quad (\text{Ecuación 7})$$

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{Peso de la muestra} * 25}{200 * 250} \times 100 \quad (\text{Ecuación 8})$$

8.4.1.3.2. Determinación de °Brix.

La determinación del °Brix, se llevó a cabo en los tiempos mencionados anteriormente (0, 8 y 24 horas de incubación). Se realizó el análisis teniendo en cuenta el método estandarizado CCA-pos-024 ° BRIX Y POL DETERMINACION EN PRODUCTOS DE TACHOS MELADURAS Y MIELES DE MAYAGUEZ S.A.

8.4.1.3.3. Determinación de pH.

La determinación del pH, se llevó a cabo en los tiempos mencionados anteriormente (0, 8 y 24 horas de incubación). Se siguió el protocolo estandarizado CCA-pos-018 DETERMINACIÓN DE pH EN SOLUCIONES AZUCARADAS DE MAYAGUEZ S.A.

8.4.1.3.4. Determinación del contenido de etanol.

El porcentaje de alcohol se llevó a cabo a las 8 y 24 horas de incubación y la cantidad de alcohol se determinó a partir de 50 ml de la muestra + 3 gotas de Antiespumante, destilándose en el equipo *Alcotest Raypa* un volumen de 50 ml en un balón aforado. Posteriormente se llevó al *Densitómetro DE 40* para obtener el % de etanol presente en la muestra y expresando como contenido de etanol en % v/v

8.4.1.3.5. Determinación de azúcares residuales.

Para establecer la cantidad de azúcares residuales se llevó a cabo a las 8 y 24 horas de incubación, es decir finalizando la propagación y fermentación, para la determinación de ello se midió 50 ml de la muestra (mosto de propagación) en una bureta. Posteriormente en un vaso de precipitado, se agregaron 20 ml de Agua destilada + 5 ml de Solución Fehling B + 5 ml de Solución Fehling A, además de adicionar 5 ml de la muestra directamente de la bureta, esta mezcla se llevó a una plancha de calentamiento a 480°C. Se dejó hervir durante 2 minutos y posteriormente se tituló lentamente con la muestra, utilizando como indicador azul de metileno hasta obtener un color rojo ladrillo.

Una vez obtenido el título gastado, se realizó el cálculo por medio del software del laboratorio, en donde se tiene en cuenta la siguiente formula:

$$\% \text{ (w/v) Azúcares Residuales} = \frac{5.127}{B.R \times F.F \times D.F} \quad \text{(Ecuación 9)}$$

Donde:

B.R: Lectura Bureta

F.F: Factor Fehling

D.F: Factor dilución

5.127: Constante (Estándar)

8.4.2. EFECTO DEL CLORO EN LA ETAPA DE FERMENTACIÓN.

Se preparó el medio, teniendo en cuenta el balance del proceso de fermentación, para simular las condiciones reales del proceso ver tabla 3 componentes del medio de fermentación, e incubando a 30 °C, con agitación de 70 rpm, durante 48 horas para simular el proceso fermentativo.

Tabla 9. Componentes del medio de fermentación.

	Volumen
Mezcla (Miel B + Agua)	260 ml
Vinaza	345,60 ml
Inoculo (propagación)	100ml
*Agua de proceso	294,40 ml
Urea	1 g
Antibiótico	0.1 g

*Agua de proceso evaluado las concentraciones de cloro residual (1.5, 2.0 y 2.5 ppm) y un control de medio de cultivo con agua sin cloro residual (Agua destilada).

8.4.2.1. Seguimiento de las variables fisicoquímicas y microbiológicas en la etapa de fermentación.

Con el fin de evaluar el efecto del cloro residual sobre la levadura en esta etapa, se realizó un monitoreo de las **variables microbiológicas: Viabilidad celular y estado morfológico de la levadura alcohólica**, y **variables fisicoquímicas: Azúcares fermentables iniciales, °Brix, pH, %OH y azúcares residuales**.

Este monitoreo fue llevado a cabo, teniendo en cuenta la metodología descrita anteriormente en la etapa de propagación, con la diferencia que el estado morfológico de la levadura se realizó en el tiempo T 48 horas. El monitoreo se llevó a cabo a las 0, 8, 24 y 48 horas de incubación.

8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico de datos se realizó en Excel mediante la prueba de ANOVA empleando un intervalo de confianza 95%. Se tomaron como parámetros para evaluar el efecto del cloro en la actividad fermentativa: Numero de células viables, estado morfológico y porcentaje de grado alcohólico en las etapas de propagación y fermentación, partiendo de tres repeticiones para cada etapa.

9. PLAN DE TRABAJO Y CRONOGRAMA DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO DE PASANTIA.

El proyecto presentado se llevó a cabo durante 4 meses (Tabla 10). Es de destacarse que, juntamente con la prioridad académica, la revisión bibliográfica inherente al proyecto se llevó a cabo durante todo el período.

Tabla 10. Cronograma de actividades a ser desarrolladas en la ejecución del proyecto.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES																
Actividades	Meses	MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO		
	Semanas	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	22	23
1. Revisión Bibliográfica																

2. Muestreo del agua de proceso en cada uno de los puntos de muestreo															
3. Evaluación de calidad fisicoquímica y microbiológica del agua de proceso															
4. Montaje y monitoreo del proceso de propagación															
5. Montaje y monitoreo del proceso de fermentación															
6. Análisis de resultados, realización de informe preliminar, correcciones y entrega de informe final															
7. Preparación y sustentación final del proyecto															
Observaciones: Ninguna				Elaboro: Leidy Albiares						Aprobó: Liliana Agudelo					

10. RESULTADOS.

Este trabajo fue un estudio cuantitativo, exploratorio y experimental que tuvo como finalidad estudiar el efecto que tiene la concentración del cloro residual en la actividad fermentativa de levadura alcohólica utilizada en el proceso fermentativo de la destilería de Mayagüez S.A.

10.1. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y FISICOQUÍMICA DEL AGUA DE PROCESO.

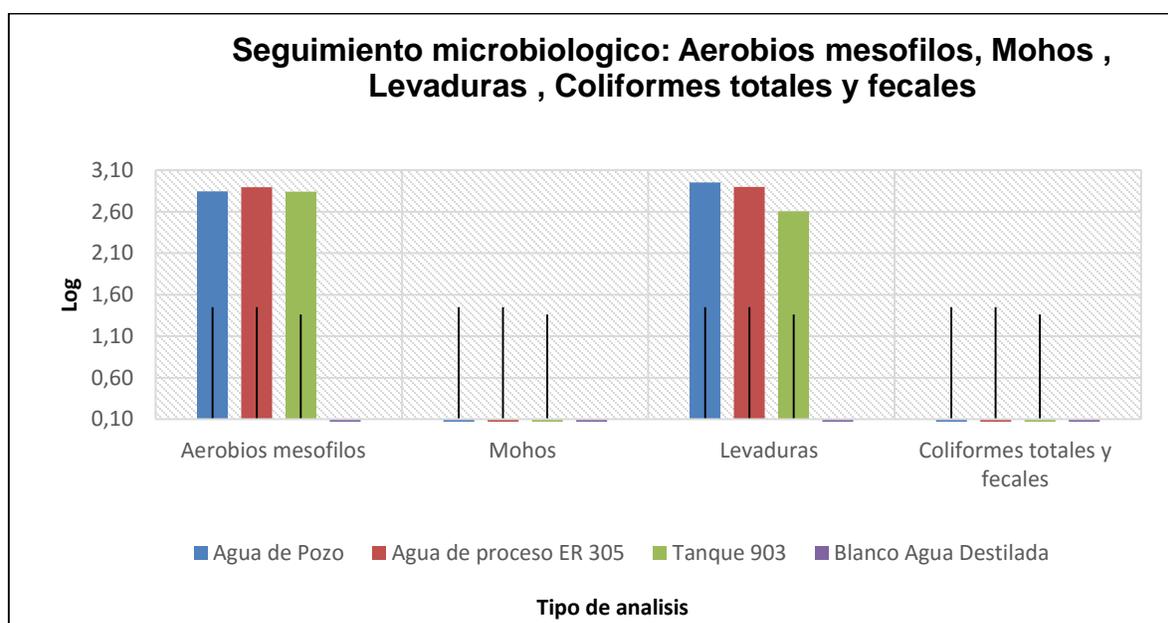
10.1.1. Evaluación microbiológica.

Para la evaluación microbiológica del agua de proceso, se emplearon las técnicas establecidas en el manual *CCA-pos-052: MUESTREO, IDENTIFICACION Y ANALISIS MICROBIOLÓGICO LABORATORIO DESTILERIA DE MAYAGÜEZ S.A.* Donde se evaluaron los siguientes parámetros para cada uno de los puntos de

muestreo del agua de proceso establecidos en el capítulo 8 de metodología: Recuento total de Aerobios mesófilos, Recuento de mohos y levaduras y Recuento de Coliformes totales y fecales. Para observar los recuentos ver tabla 33 en anexos.

A continuación, se muestra límites de los parámetros microbiológicos establecidos por el ingenio en el manual *CCA-for-031. Análisis Microbiológicos Destilería*: Recuentos para el Agua de Proceso: Aerobios Mesófilos: < 100 Ufc /mL (log: 2); Mohos y levaduras: < 100 Ufc /ml (log: 2); Coliformes totales y fecales: Ausencia.

En la ilustración 8 se muestra el promedio de las siete (7) repeticiones de cada parámetro microbiológico de: Recuento total de Aerobios mesófilos, Recuento de mohos y levaduras y Recuento de Coliformes totales y fecales en los puntos de muestreo del agua de proceso que ingresa al sistema de fermentación.



A.M: Aerobios mesófilos; Moh: Mohos; Lev: Levaduras; Col: Coliformes totales y fecales

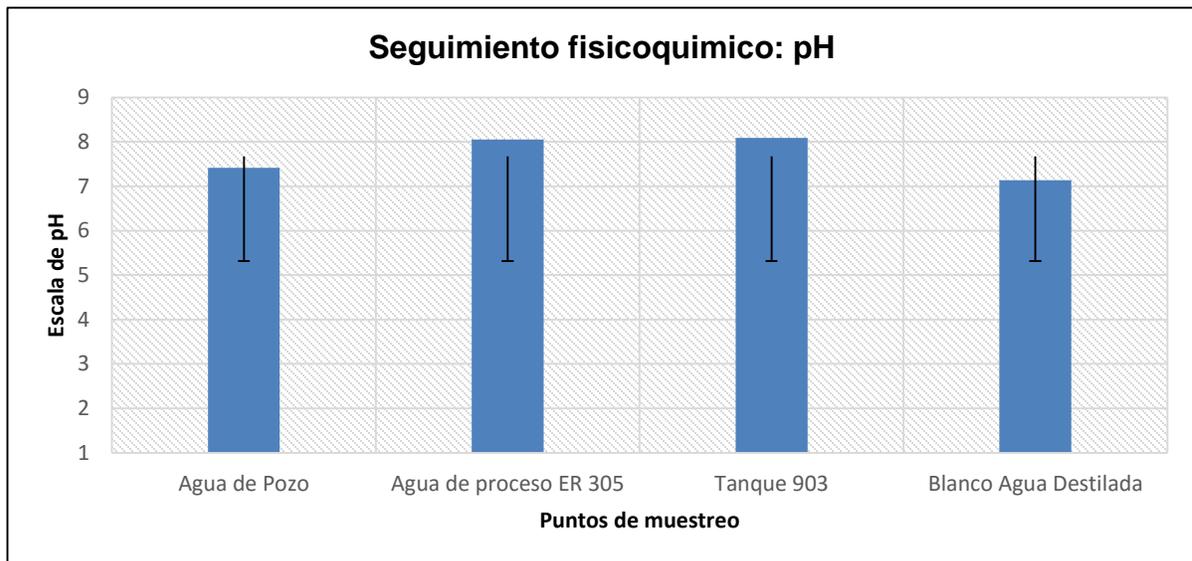
Ilustración 8. Promedio de los 7 ensayos realizados evaluando los parámetros microbiológicos del agua de proceso en cada uno de los puntos de muestreo.

10.1.2. Evaluación fisicoquímica.

Para la evaluación fisicoquímica del agua de proceso, se empleó las técnicas establecidas en los manuales *DES-pos-018: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PLANTA PTAR DESTILERIA DE MAYAGÜEZ S.A*; *CCA-pos-062: ANÁLISIS DE CALDERA ALTA PRESIÓN DE MAYAGÜEZ S.A*. Donde se evaluó los siguientes parámetros para cada uno de los puntos de muestro del agua de proceso establecidos en el capítulo 8 de metodología: pH, Temperatura, Conductividad, Dureza, Alcalinidad y cloro residual. Para observar el seguimiento de estas variables ver tabla 34 en anexos.

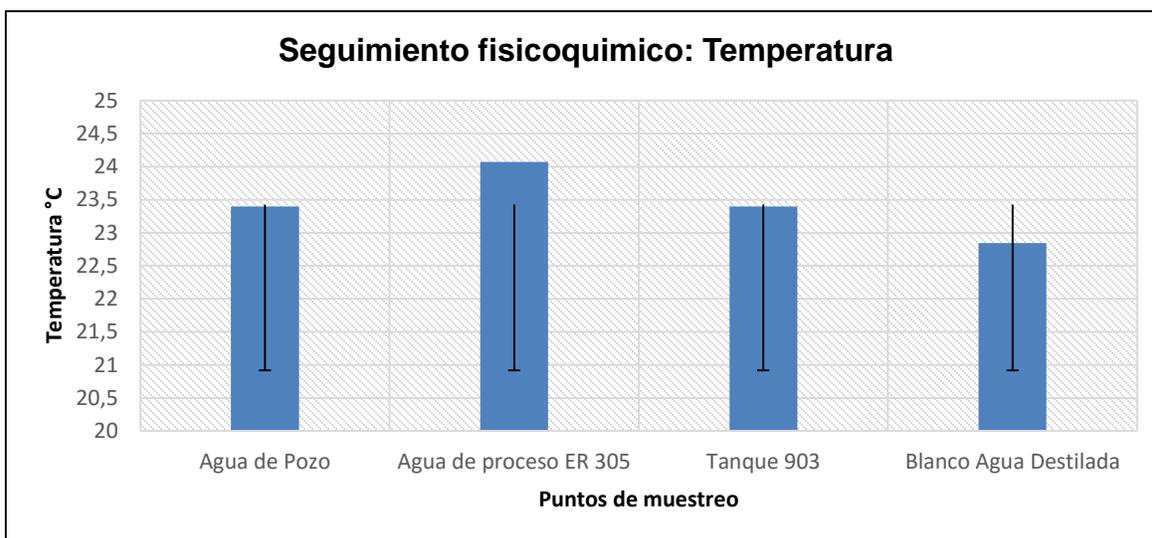
A continuación, se muestra los límites de los parámetros fisicoquímicos establecidos por el ingenio en el manual *DES-pos-018: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PLANTA PTAR DESTILERIA DE MAYAGÜEZ S.A*: Límites de dureza: Blanda 0-60 mg /L CaCO₃, Medianamente dura 60-120 mg /L CaCO₃, Dura 120-180 mg /L, Muy dura > 180 mg /L; Límites de alcalinidad: Baja < 75 mg /L CaCO₃, Media 75- 150 mg /L CaCO₃, Alta > 150 mg /L CaCO₃; Límites de cloro residual: 0.5 -2.0 ppm. Valores de pH: Deberán estar comprendidos entre 6.5 y 8.4. El valor aceptable para la conductividad debe ser de 300 y 700 microsiemens/cm. Valores de Temperatura: Deberán estar comprendidos entre 20 y 35 °C

En las ilustraciones 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se muestra el promedio de las siete (7) repeticiones de cada parámetro fisicoquímico de: pH, Temperatura, Conductividad, Dureza, Alcalinidad y cloro residual en cada uno de los puntos de muestreo



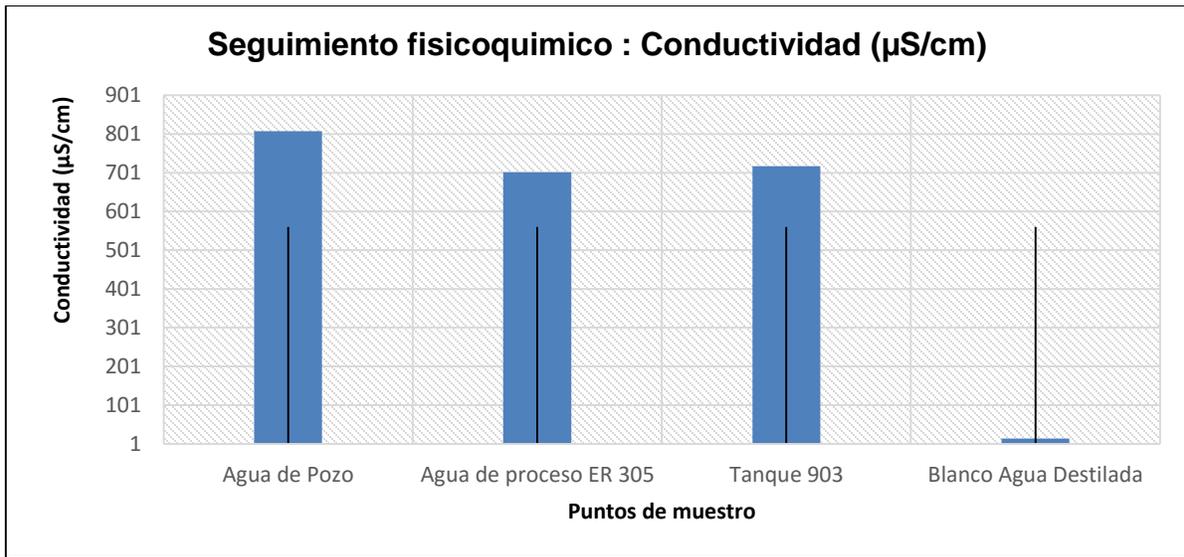
<i>Variable estadística</i>	<i>Agua de pozo</i>	<i>Agua proceso ER 305</i>	<i>Tanque 903</i>	<i>Blanco</i>
<i>Media o promedio</i>	7.37	8.01	8.05	7.10
<i>Desviación estándar</i>	0.13	0.09	0.24	0.48
<i>Varianza</i>	0.01	0.009	0.05	0.23

Ilustración 9. Promedio de los 7 ensayos realizados evaluando la variable pH en cada uno de los puntos de muestreo.



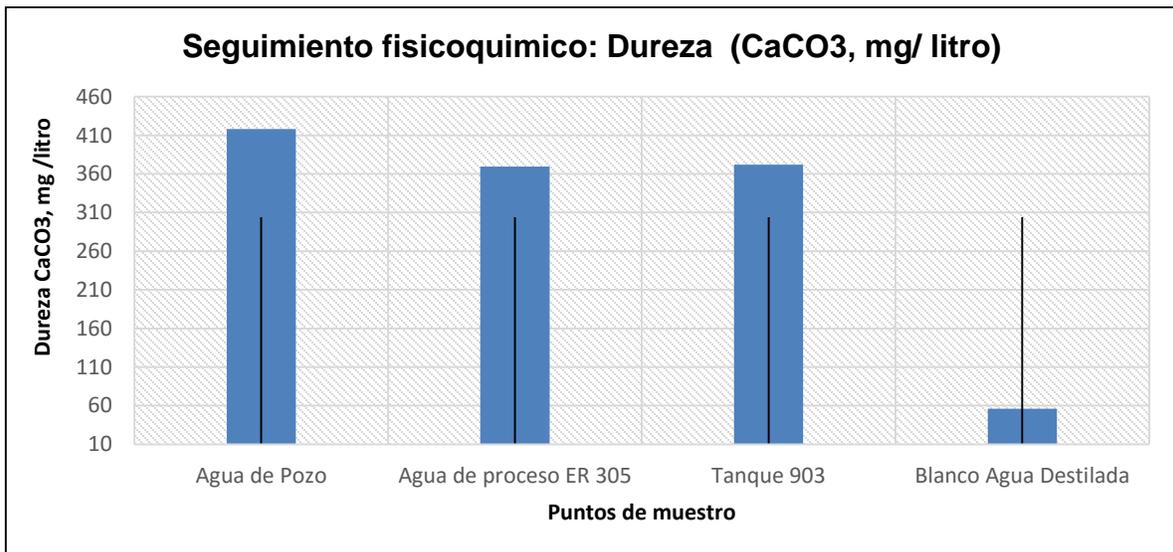
<i>Variable estadística</i>	<i>Agua de pozo</i>	<i>Agua proceso ER 305</i>	<i>Tanque 903</i>	<i>Blanco</i>
<i>Media o promedio</i>	23.4	24.1	23.4	22.8
<i>Desviación estándar</i>	0.85	0.80	0.24	0.71
<i>Varianza</i>	0.72	0.65	0.06	0.51

Ilustración 10. Promedio de los 7 ensayos realizados evaluando la variable Temperatura en cada uno de los puntos de muestreo.



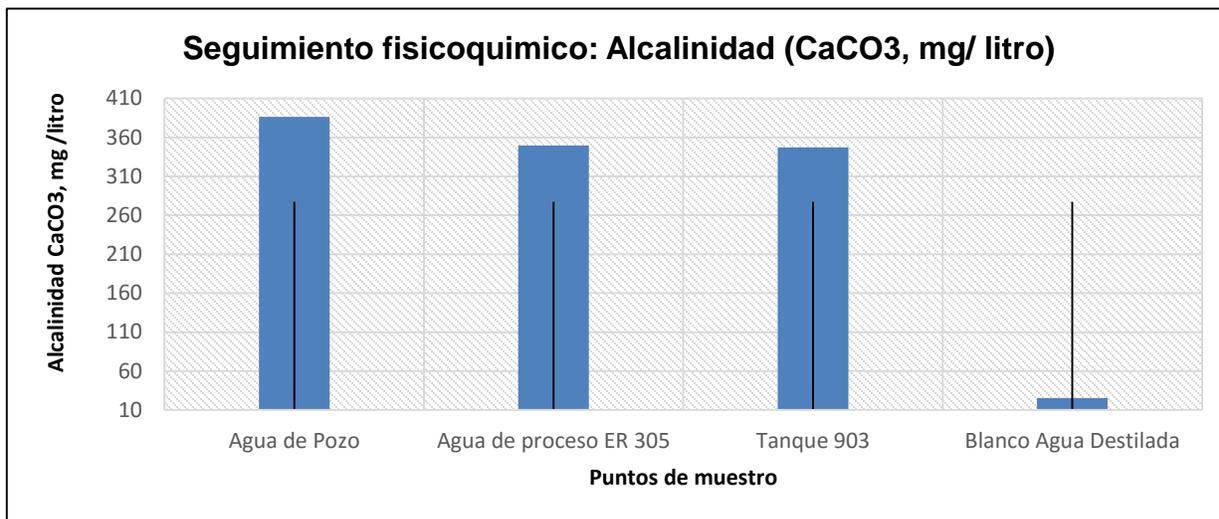
<i>Variable estadística</i>	<i>Agua de pozo</i>	<i>Agua proceso ER 305</i>	<i>Tanque 903</i>	<i>Blanco</i>
Media o promedio	807.8	702.1	718.0	14.3
Desviación estándar	17.8	30.9	47.5	10.4
Varianza	316.9	958.6	2256.5	109.0

Ilustración 11. Promedio de los 7 ensayos realizados evaluando la variable Conductividad en cada uno de los puntos de muestreo.



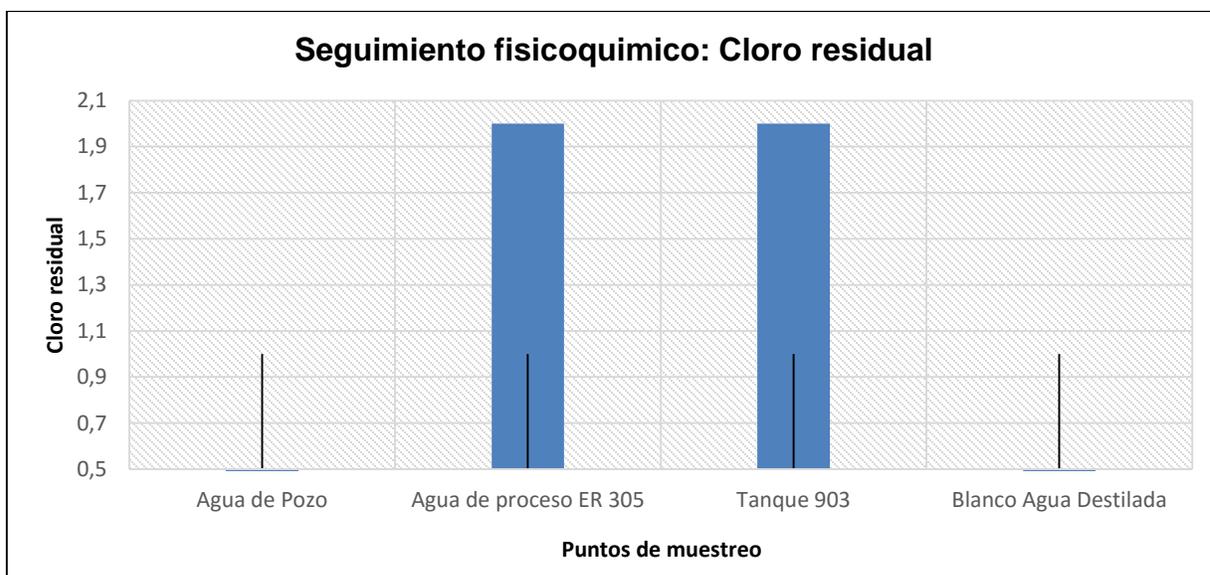
<i>Variable estadística</i>	<i>Agua de pozo</i>	<i>Agua proceso ER 305</i>	<i>Tanque 903</i>	<i>Blanco</i>
Media o promedio	418.2	369.1	371.8	55.8
Desviación estándar	16.4	15.2	23.4	25.8
Varianza	270.3	232.0	547.7	670.4

Ilustración 12. Promedio de los 7 ensayos realizados evaluando la variable Dureza en cada uno de los puntos de muestreo.



<i>Variable estadística</i>	<i>Agua de pozo</i>	<i>Agua proceso ER 305</i>	<i>Tanque 903</i>	<i>Blanco</i>
Media o promedio	386.3	349.6	347.2	25.1
Desviación estándar	12.6	25.8	22.8	16.6
Varianza	160.5	669.4	519.9	277.9

Ilustración 13. Promedio de los 7 ensayos realizados evaluando la variable Alcalinidad en cada uno de los puntos de muestreo.



<i>Variable estadística</i>	<i>Agua de pozo</i>	<i>Agua proceso ER 305</i>	<i>Tanque 903</i>	<i>Blanco</i>
<i>Media o promedio</i>	0	2.0	2.0	0
<i>Desviación estándar</i>	0	0.37	0.37	0
<i>Varianza</i>	0	0.14	0.14	0

Ilustración 14. Promedio de los 7 ensayos realizado evaluando la variable Cloro residual en cada uno de los puntos de muestreo.

10.2. EFECTO DE CLORO RESIDUAL PRESENTE EN EL AGUA DE PROCESO SOBRE LA ACTIVIDAD FERMENTATIVA EN LAS ETAPAS DE PROPAGACIÓN Y FERMENTACIÓN.

Para determinar el efecto del cloro residual del cloro sobre la levadura se partió de un stock de cloro de 1000 ppm y a partir de esta se prepararon las concentraciones respectivas de 1.5, 2.0 y 2.5 ppm de cloro, es importante anotar que estas soluciones se prepararon con agua destilada estéril para asegurar que realmente contuvieran la concentración real a ensayar de cloro.

A continuación, en las ilustraciones 15 y 16 se muestran las soluciones preparadas y las mediciones respectivas de cloro.

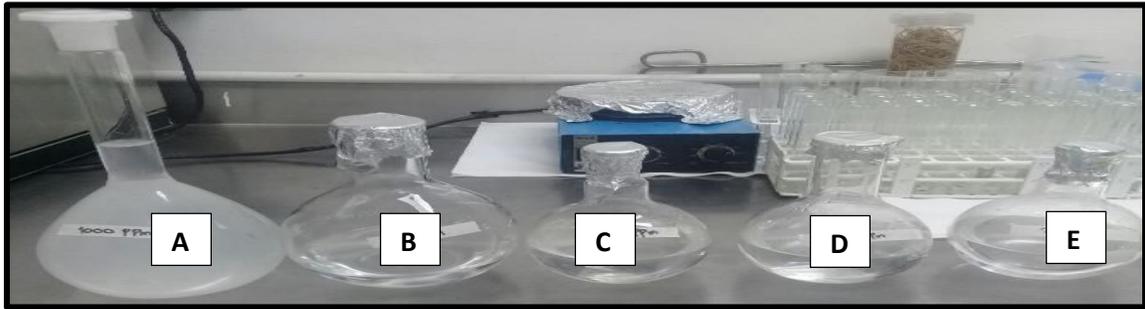


Ilustración 15. Soluciones de cloro. A) Solución stock 1000 ppm B) Solución control C) Solución 1.5 ppm D) Solución 2.0 ppm y E) Solución 2.5 ppm.

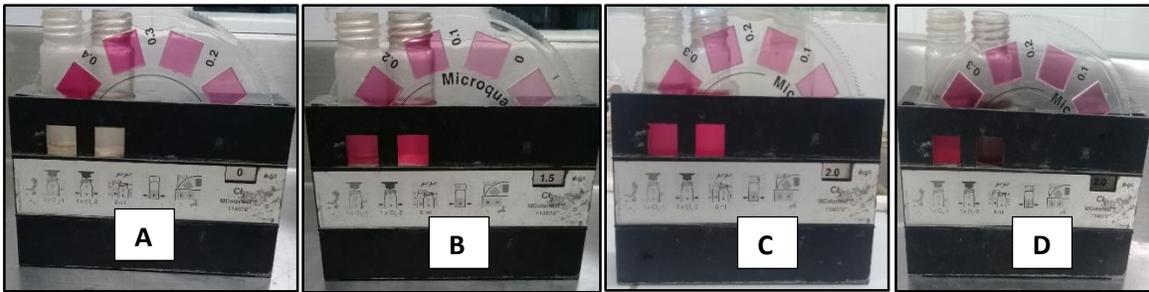


Ilustración 16. Mediciones de cloro residual de las soluciones de cloro preparadas a partir del stock de 1000 ppm, para ser utilizadas en los ensayos. A) Control 0 ppm B) 1.5 ppm C) 2.0 ppm, D) 2.5 ppm.

Una limitación del equipo de medición de cloro residual, es que tiene una escala de concentración de solo hasta 2.0 ppm. Por tal motivo se asumió que la concentración de 2.5 ppm sería mayor a la de 2.0 ppm en cuanto a la escala de tonalidad.

10.2.1. EFECTO DEL CLORO EN LA ETAPA DE PROPAGACIÓN.

10.2.1.1. Variables iniciales del medio de propagación.

Se establecieron los valores iniciales de azúcares fermentables de la mezcla y del medio de propagación para evidenciar gradualmente mediante el paso de las horas de incubación el consumo de azúcar del sustrato por parte de la levadura y establecer así cual concentración de cloro es la ideal para llevar a cabo el desarrollo celular.

Es importante mencionar que para llegar al grado °Brix del medio de propagación (8 %) se realizó una dilución de la mezcla que contaba con un °Brix de (61.80 %) de azúcares fermentables.

Tabla 11. Valores iniciales del alimento para iniciar el proceso de propagación.

Variable inicial del medio de propagación	Valor
°Brix mezcla	61.80 %
Azúcares fermentables iniciales de mezcla	51.93 %
°Brix de medio de propagación	8.0%
Azúcares fermentables iniciales del medio de propagación	6.40 %
Inoculo escala inicial Mc farland 10^6	100×10^6 cel / ml
pH de marcha de propagación	4.5

Los ajustes del medio se realizaron según el balance del proceso. Ver balance en anexos.

10.2.1.2. Seguimiento de las variables fisicoquímicas y microbiológicas en la etapa de propagación.

10.2.1.3. Seguimiento de variables microbiológicas.

10.2.1.3.1. Viabilidad celular de la levadura mediante recuento en cámara de Neubauer.

Una vez realizado el montaje de la etapa de propagación con las diferentes concentraciones de cloro residual presentes en el agua, se realizó el monitoreo de las variables microbiológicas de: Viabilidad celular y estado morfológico en los tiempos (T0, T8 y T24).

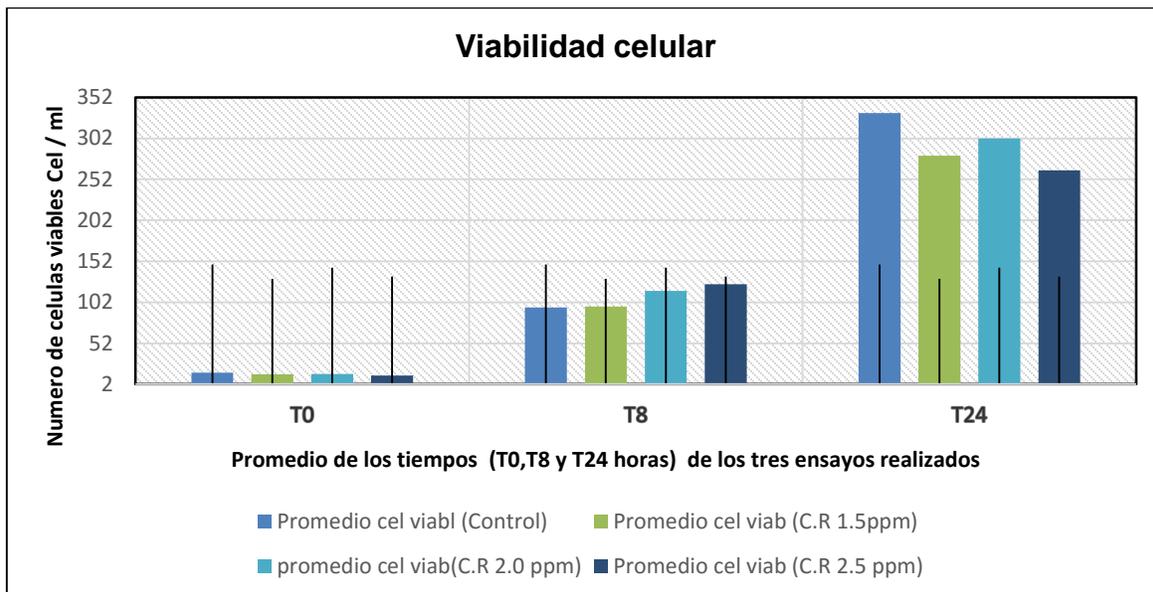
En la tabla 12 se muestra el monitoreo de la variable microbiológica de: Viabilidad celular en los tiempos establecidos en la metodología (capítulo 8).

Tabla 12. Viabilidad celular en la etapa de propagación.

VARIABLES MICROBIOLÓGICAS PROPAGACION: VIABILIDAD CELULAR										
Tiempos y concentración de cloro residual		Ensayo 1			Ensayo 2			Ensayo 3		
		Población celular	% viabilidad	Células viables	Población celular	% viabilidad	Células viables	Población celular	% viabilidad	Células viables
T0	Control	10	90%	9	14	93%	13	27	96 %	26
	1.5 ppm	6	90%	5	15	93%	14	25	96%	24
	2.0 ppm	8	88%	7	14	92%	14	24	96%	23
	2.5 ppm	7	85%	6	13	92%	12	21	95%	20
T8	Control	127	94%	119	100	99%	99	70	99%	69
	1.5 ppm	119	92%	109	114	99%	112	71	99%	70
	2.0 ppm	192	97%	186	102	99%	100	65	98%	63
	2.5 ppm	229	96%	219	106	98%	103	52	98%	50
T24	Control	289	98%	283	352	99%	348	380	97%	368
	1.5 ppm	236	95%	224	304	99%	300	333	96%	320
	2.0 ppm	273	94%	256	300	98%	297	365	97%	354
	2.5 ppm	261	93%	242	281	98%	275	280	97%	271

Se realizaron 3 ensayos para la etapa de propagación, donde se evaluaron 3 tiempos (T0, T8 y T24) en cada uno de estos tiempos se realizó: Conteo de población celular en cámara de Neubauer que hace referencia al número de células presentes en los 25 cuadrantes y partir de este número de células se calculó el porcentaje de viabilidad y número de células viables. Ver ecuaciones 4 ,5 y 6.

En la ilustración 17 y 18 se muestra el promedio de las variables microbiológicas: (Viabilidad celular y número de células viables) de los tres (3) ensayos realizados en esta etapa.

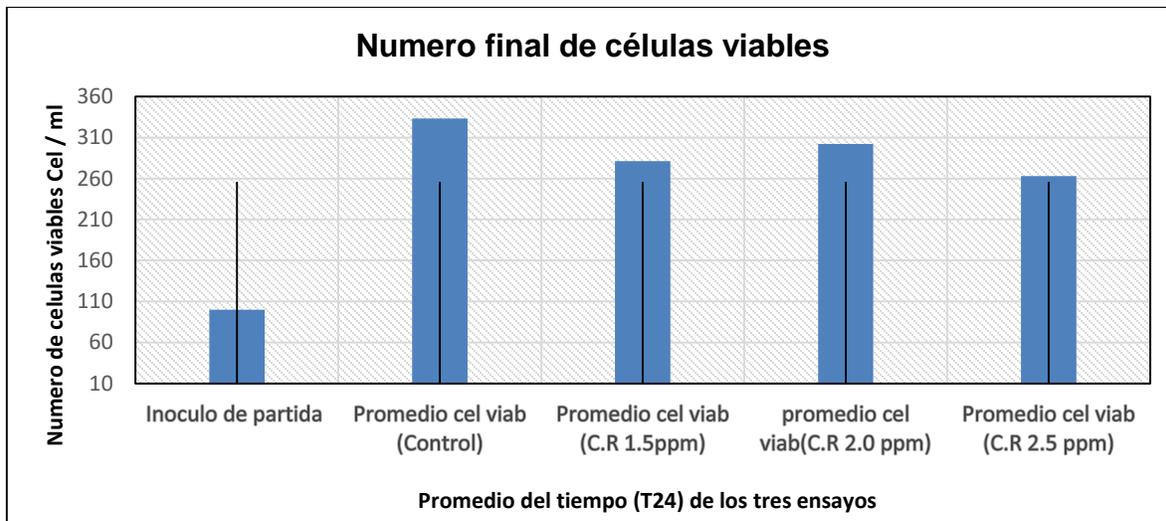


Variable estadística	T0				T8				T 24			
	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5
Media o promedio	17.5	14.3	14.6	12.6	95.6	97.0	116	124	333	281.3	302.3	262.6
Desviación estándar	8.5	7.7	6.5	5.7	20.5	19.1	51.5	70.57	36.2	41.3	40.1	14.7
Varianza	72.2	60.2	42.8	32.8	422.2	366.0	2654.8	4980.6	1316.6	1710.2	1614.8	216.2

Con: Control; 1.5: Cloro residual (C.R 1.5 ppm); 2.0: Cloro residual (C.R 2.0 ppm); 2.5: Cloro residual (C.R 2.5 ppm)

Ilustración 17. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando Variables microbiológicas en la etapa de propagación: Viabilidad celular en los tiempos T0, T8 y T24 horas.

En la ilustración 17, se puede observar la variable número de células viables con las diversas concentraciones de cloro residual al cual fueron expuestas, se puede decir que la concentración de 2.5 ppm de cloro residual es la que más afecta la reproducción celular, ya que afecta bioquímicamente su metabolismo inactivando enzimas que son indispensables para la multiplicación celular según lo expone los autores (Estrela et al., 2002; Venkobachar et al., 1977) aseguran que concretamente es la forma no dissociada del cloro la que presenta mayor capacidad germicida. Se postula que la eficacia antimicrobiana del cloro, está basado en su alto pH. El alto pH del cloro interfiere en la integridad de la membrana citoplasmática con una inhibición enzimática irreversible, alteraciones de biosíntesis en el metabolismo celular y degradación de fosfolípidos.



Variable estadística	T 24			
	Con	1.5	2.0	2.5
Media o promedio	333.0	281.3	302.3	262.6
Desviación estándar	36.2	41.3	40.1	14.7
Varianza	1316.6	1710.2	1614.8	216.2

Con: Control; 1.5: Cloro residual (C.R 1.5 ppm); 2.0: Cloro residual (C.R 2.0 ppm); 2.5: Cloro residual (C.R 2.5 ppm)

Ilustración 18. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables microbiológicas en la etapa de propagación: Número final de células viables partiendo del inoculo de 100 cel / ml en el tiempo final T24 Horas.

Se evidencia una clara disminución de las células, donde la muestra control presenta 333 células viables comparada con la muestra de 2.5 ppm de cloro residual que al final de la propagación presenta 262.6 células viables.

10.2.1.3.2. Estado morfológico.

En la ilustración 19 se puede evidenciar la coloración de las células según el estado morfológico de las mismas.

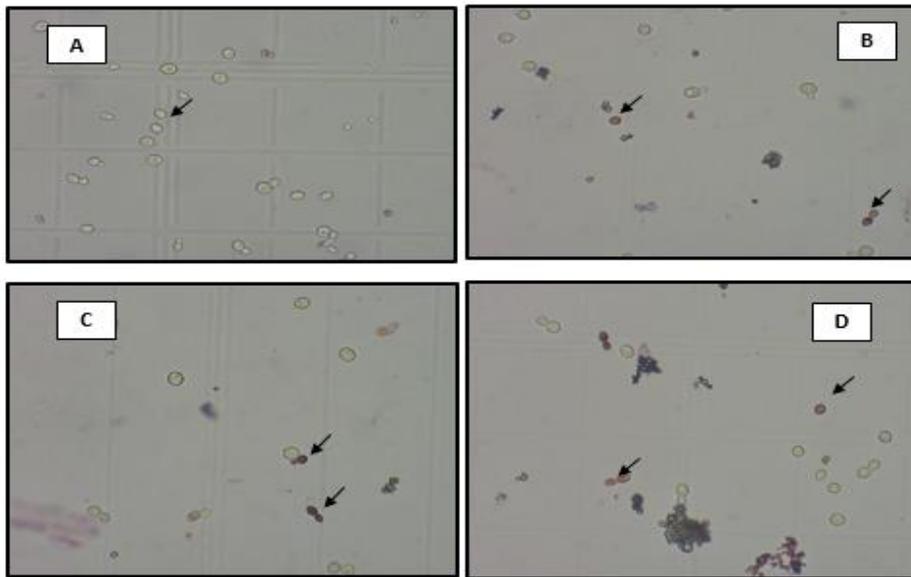


Ilustración 19. Tonalidades de la coloración diferencial para evidenciar el estadio morfológico de la levadura. A) Células Azules o blancas, B y C) Células rojas), D) Células rosadas.

El recuento del estado morfológico de la levadura se realizó en cámara de Neubauer contando solo 5 cuadrantes, y en cada cuadrante se contó el número de células según el color presente (Blanco, rosadas, marrones o rojas) como se menciona en el apartado metodológico.

Tabla 13. Estado morfológico de la levadura alcohólica (ENSAYO 1,2,3).

VARIABLES MICROBIOLÓGICAS PROPAGACION: ESTADO MORFOLÓGICO DE LA LEVADURA ALCOHÓLICA.			
Ensayo 1			
Tiempo 24 horas	Coloración	Número de células	% porcentaje de células
Control	Blanco	101	97%
	Rosado	3	3%
	Marrón	0	0%
	Rojo	0	0%
Cloro residual 1.5 ppm	Blanco	72	96%
	Rosado	3	4%
	Marrón	0	0%
	Rojo	0	0%
Cloro residual 2.0 ppm	Blanco	74	97%
	Rosado	2	3%
	Marrón	0	0%
	Rojo	0	0%
Cloro residual 2.5 ppm	Blanco	65	96%
	Rosado	3	4.4%
	Marrón	0	0%
	Rojo	0	0%

VARIABLES MICROBIOLÓGICAS PROPAGACION: ESTADO MORFOLÓGICO DE LA LEVADURA ALCOHÓLICA.			
Ensayo 2			
Tiempo 24 horas	Coloración	Número de células	% porcentaje de células
Control	Blanco	79	100%
	Rosado	0	0%
	Marrón	0	0%
	Rojo	0	0%
Cloro residual 1.5 ppm	Blanco	88	100%
	Rosado	0	0%
	Marrón	0	0%
	Rojo	0	0%
Cloro residual 2.0 ppm	Blanco	83	97%
	Rosado	3	3.5%
	Marrón	0	0%
	Rojo	0	0%
Cloro residual 2.5 ppm	Blanco	63	93%
	Rosado	5	7.35%
	Marrón	0	0%
	Rojo	0	0%

VARIABLES MICROBIOLÓGICAS PROPAGACION: ESTADO MORFOLÓGICO DE LA LEVADURA ALCOHÓLICA.			
Ensayo 3			
Tiempo 24 horas	Coloración	Número de células	% porcentaje de células
Control	Blanco	88	98.8%
	Rosado	1	1.12%
	Marrón	0	0%
	Rojo	0	0%
Cloro residual 1.5 ppm	Blanco	97	97%
	Rosado	1	1%
	Marrón	2	2%
	Rojo	0	0%
Cloro residual 2.0 ppm	Blanco	82	97%
	Rosado	3	3.5%
	Marrón	0	0%
	Rojo	0	0%
Cloro residual 2.5 ppm	Blanco	73	96%
	Rosado	1	1.31%
	Marrón	2	2.6%
	Rojo	0	0%

y para determinar el cálculo de porcentaje de células de la tabla 13 este se realizó de la siguiente manera: Ejemplo.

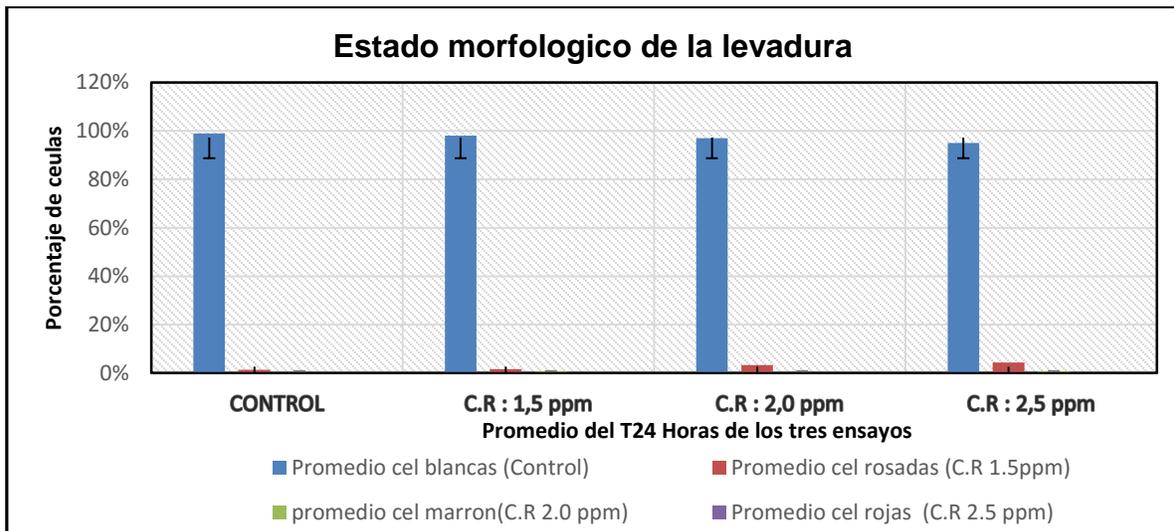
Recuento cloro residual 1,5 ppm (Ensayo 1)

Recuento total: 72 + 3: 75 células esto corresponde al 100 % (Sumatoria de todas las células presentes en los 5 cuadrantes)

Recuento de células blancas: 72 esto corresponde al 96 % del 100% del recuento total

Recuento de células rosadas: 3 esto corresponde al 4 % del 100% del recuento total

En la ilustración 20 se muestra el promedio de la variable microbiológica: Estado morfológico de la levadura alcohólica de los tres (3) ensayos realizados en esta etapa.



Variable estadística	T 24				T 24			
	Células Blancas				Células Rosadas			
	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5
Media o promedio	89.3	85.6	79.6	67.0	1.33	1.33	2.66	3.0
Desviación estándar	9.03	10.3	4.02	4.32	1.24	1.24	0.47	1.63
Varianza	81.5	106.8	16.2	18.6	1.55	1.55	0.22	2.66

Con: Control; 1.5: Cloro residual (C.R 1.5 ppm); 2.0: Cloro residual (C.R 2.0 ppm); 2.5: Cloro residual (C.R 2.5 ppm)

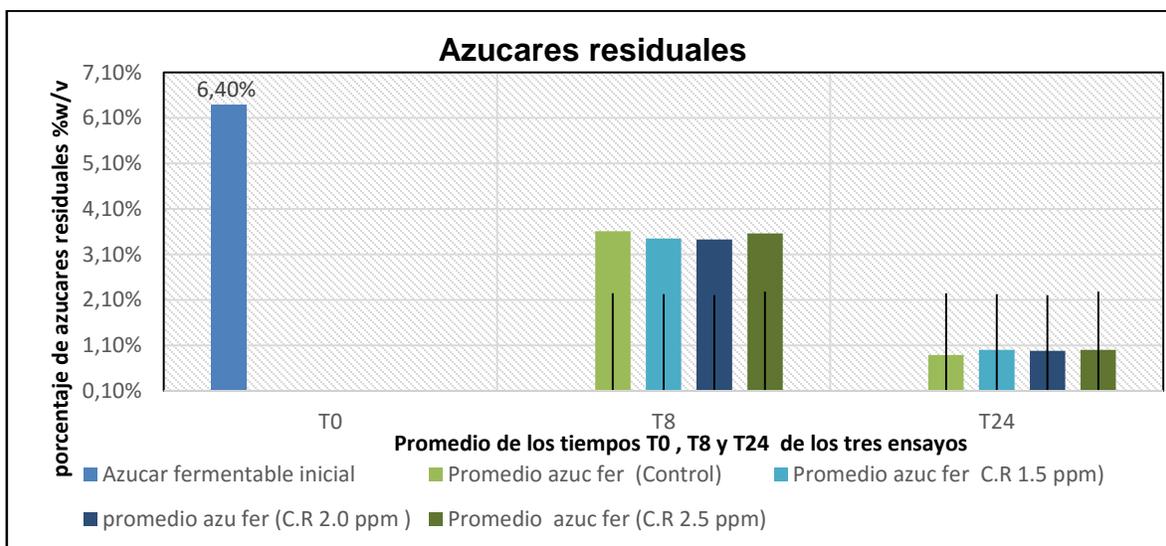
Ilustración 20. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables microbiológicas en la etapa de propagación: Morfología celular en el tiempo 24 horas.

Se puede observar que en las concentraciones de cloro residual de 2.0 y 2.5 ppm hay un aumento de células rosadas (células en bajo estado de deterioro), también se logra observar una disminución leve de células blancas en cada concentración de cloro residual.

10.2.1.4. Seguimiento de variables fisicoquímicas.

En la tabla 35 (ver anexos) se evidencia las variables fisicoquímicas de la etapa de propagación, en cada uno de los tiempos informados en la metodología (capítulo 8). Cabe mencionar que el grado alcohólico en esta etapa no debe ser mayor a 4 % v/v de etanol, ya que en esta etapa la levadura utiliza los azúcares fermentables del sustrato para realizar desarrollo celular y así poder contar con un inóculo considerable para iniciar la fermentación. En este punto cabe resaltar que se partió de un azúcar fermentable del medio de propagación del 6.40 % y a partir de este se medirá el efecto del cloro sobre la levadura en la productividad de etanol.

En las ilustraciones 21, 22, 23 y 24 se muestra el promedio de cada una de las variables fisicoquímicas de los tres (3) ensayos realizados en esta etapa.

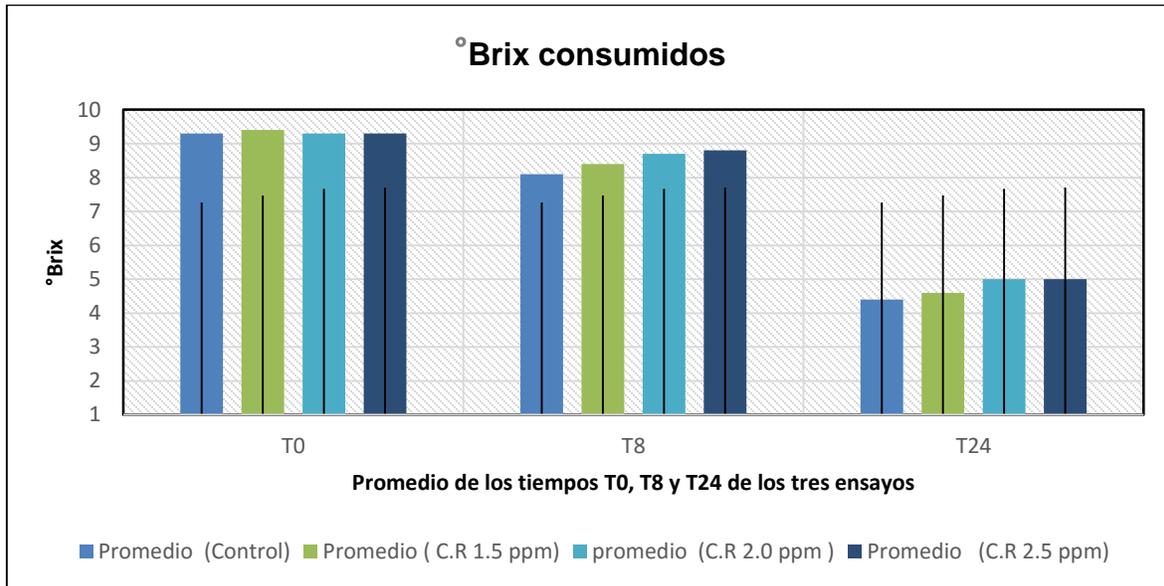


Variable estadística	T8				T 24			
	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5
Media o promedio	3.61	3.45	3.43	3.56	0.89	1.0	0.98	1.0
Desviación estándar	1.36	0.81	1.12	1.38	0.31	0.53	0.50	0.34
Varianza	1.85	0.66	1.25	1.92	0.13	0.28	0.25	0.11

Con: Control; 1.5: Cloro residual (C.R 1.5 ppm); 2.0: Cloro residual (C.R 2.0 ppm); 2.5: Cloro residual (C.R 2.5 ppm)

Ilustración 21. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables fisicoquímicas en la etapa de propagación: Azúcares residuales en los tiempos T8 y T 24 horas.

Se evidencia notoriamente el consumo de azúcar por parte de la levadura partiendo de un 6.40% de azúcar fermentable.

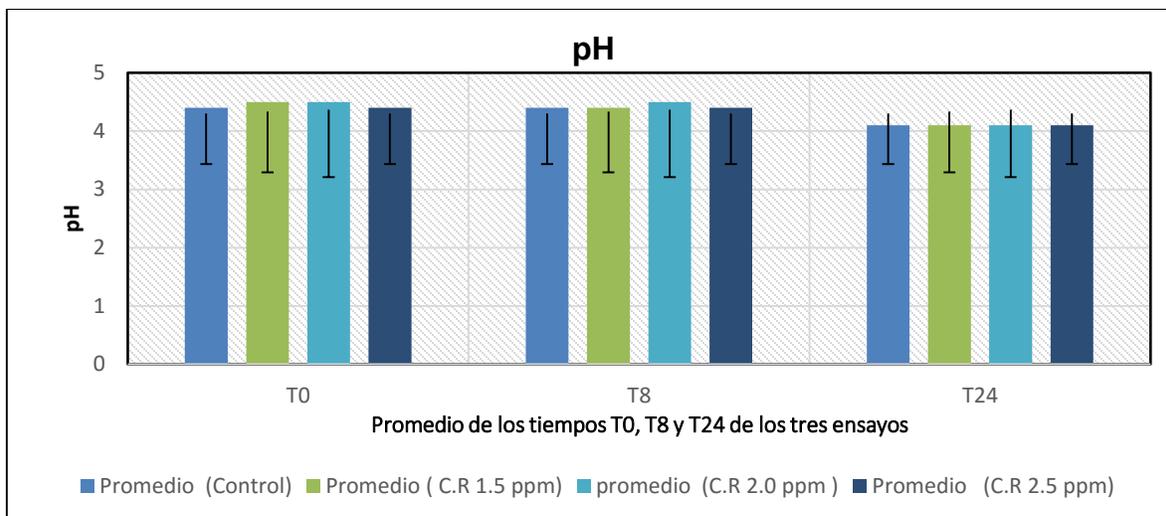


Variable estadística	T0				T8				T 24			
	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5
Media o promedio	9.3	9.43	9.30	9.30	8.16	8.40	8.76	8.80	4.40	4.63	5.0	5.0
Desviación estándar	1.60	1.44	1.34	1.35	1.32	1.34	1.46	1.41	0.78	0.84	0.89	1.17
Varianza	2.56	2.08	1.82	1.84	1.74	1.82	2.14	2.0	0.62	0.72	0.80	1.38

Con: Control; 1.5: Cloro residual (C.R 1.5 ppm); 2.0: Cloro residual (C.R 2.0 ppm); 2.5: Cloro residual (C.R 2.5 ppm)

Ilustración 22. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables fisicoquímicas en la etapa de propagación: °Brix en los tiempos T0, T8 y T 24 horas.

A medida que transcurre el tiempo de propagación los grados Brix deben disminuir ya que este es una medida indirecta del consumo de azúcar por parte de la levadura.

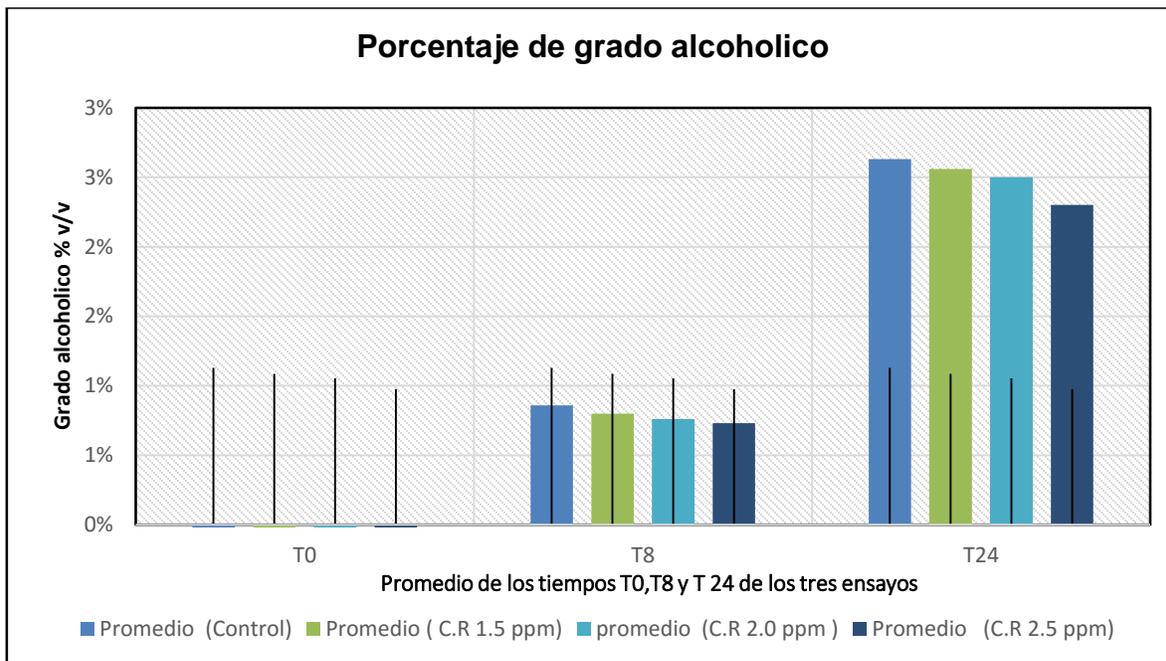


Variable estadística	T0				T8				T 24			
	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5
Media o promedio	4.4	4.5	4.5	4.4	4.4	4.4	4.5	4.4	4.1	4.1	4.1	4.1
Desviación estándar	0.04	0	0	0.04	0.04	0.04	0	0.04	0.08	0.12	0.08	0.12
Varianza	0.002	0	0	0.002	0.002	0.002	0	0.002	0.006	0.01	0.006	0.01

Con: Control; 1.5: Cloro residual (C.R 1.5 ppm); 2.0: Cloro residual (C.R 2.0 ppm); 2.5: Cloro residual (C.R 2.5 ppm)

Ilustración 23. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables fisicoquímicas en la etapa de propagación: pH en los tiempos T0, T8 y T 24 horas.

El pH es una medida que nos indica el grado de contaminación en la etapa de propagación y fermentación, a medida que desciende el pH nos indica que se están produciendo ácidos además del etanol y estos ácidos pueden ser producidos por bacterias contaminantes o por la misma levadura quien también produce ácidos en su ciclo metabólico.



Variable estadística	T8				T 24			
	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5
Media o promedio	0.96	0.90	0.86	0.83	2.7	2.6	2.6	2.4
Desviación estándar	0.75	0.72	0.81	0.77	0.74	0.77	0.74	0.65
Varianza	0.57	0.52	0.66	0.59	0.54	0.59	0.54	0.43

Con: Control; 1.5: Cloro residual (C.R 1.5 ppm); 2.0: Cloro residual (C.R 2.0 ppm); 2.5: Cloro residual (C.R 2.5 ppm)

Ilustración 24. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables fisicoquímicas en la etapa de propagación: %OH (v/v) en los tiempos T8 y T 24 horas.

Se observa que el grado alcohólico aumento al finalizar la propagación, el valor no paso del 4 % v/v, lo que indica que la levadura destino todo el azúcar presente en sustrato para su desarrollo celular.

10.2.2. EFECTO DE CLORO EN LA ETAPA DE FERMENTACIÓN.

10.2.2.1. Variables iniciales del medio de fermentación.

Se establecieron los valores iniciales de azúcares fermentables de la mezcla y del medio final de fermentación para evidenciar gradualmente mediante el paso de las horas de incubación el consumo de azúcar del sustrato por parte de la levadura y establecer así cual concentración de cloro es la ideal para llevar a cabo el desarrollo celular y poder así obtener el OH esperado según el balance.

Es importante mencionar que para llegar al grado °Brix del medio de fermentación (16.17%) se realizó una dilución de la mezcla que contaba con un °Brix de (61.80 %) de azúcares fermentables

Tabla 14. Valores iniciales del alimento para iniciar el proceso de fermentación.

Variable inicial del medio de fermentación	Valor
°Brix mezcla	61.80 %
Azúcares fermentables iniciales de mezcla	51.93 %
°Brix de medio de fermentación	16.17%
Azúcares fermentables iniciales del medio de fermentación	13.50 %
Inoculo de levadura proveniente de la propagación	10 %
Recirculación de vinaza	35 %
Agua de proceso	8%
pH de marcha de fermentación	4.5
Concentración alcohol - esperada	10.07%

Los ajustes del medio se realizaron según el balance del proceso. Ver balance en anexos.

10.2.2.2. Seguimiento de las variables fisicoquímicas y microbiológicas en la etapa de fermentación.

10.2.2.3. Seguimiento de variables microbiológicas.

10.2.2.3.1. Viabilidad celular de la levadura mediante recuento en cámara de Neubauer.

Una vez realizado el montaje de la etapa de fermentación con las diferentes concentraciones de cloro residual presentes en el agua, se realizó el monitoreo de

las variables microbiológicas de: Viabilidad celular y estado morfológico en los tiempos (T0, T8, T24 y T48).

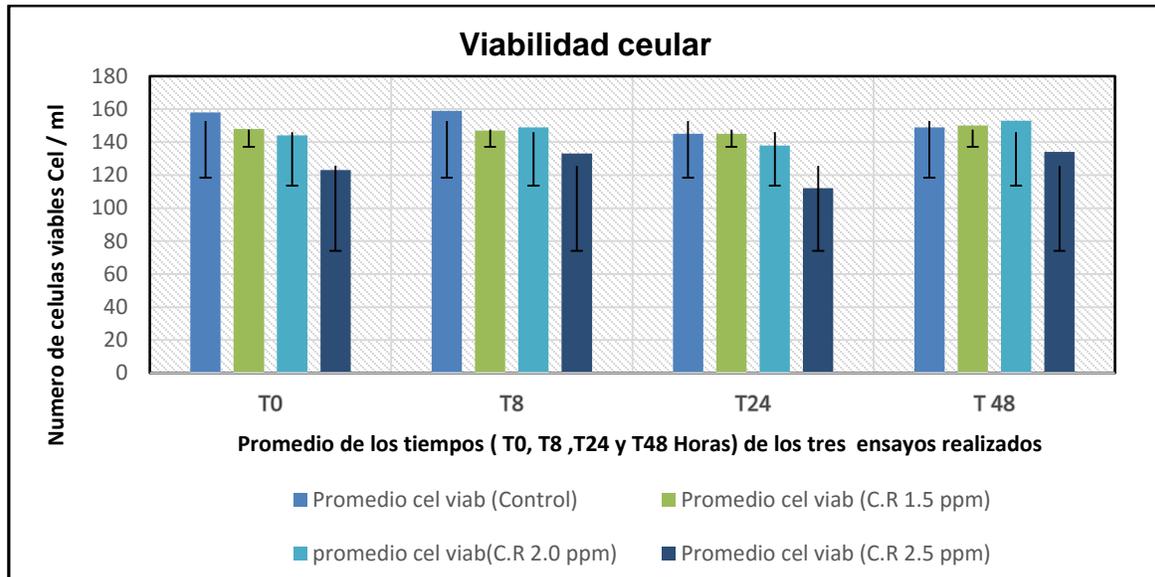
En la tabla 15 se muestra el monitoreo de la variable microbiológica de: Viabilidad celular en los tiempos establecidos en la metodología (capítulo 8).

Tabla 15. Viabilidad celular en la etapa de fermentación.

VARIABLES MICROBIOLÓGICAS FERMENTACION : VIABILIDAD CELULAR										
Tiempos y concentración de cloro residual		Ensayo 1			Ensayo 2			Ensayo 3		
		Población celular	% viabilidad	Células viables	Población celular	% viabilidad	Células viables	Población celular	% viabilidad	Células viables
T0	Control	166	95%	156	142	94%	133	191	97%	185
	1.5 ppm	154	95%	146	120	93%	112	188	98%	184
	2.0 ppm	152	94%	142	124	91%	113	181	98%	177
	2.5 ppm	130	94%	122	120	90%	108	141	98%	138
T8	Control	148	91%	135	168	92%	155	193	97%	187
	1.5 ppm	111	96%	107	170	94%	160	180	98%	176
	2.0 ppm	131	91%	119	177	90%	159	173	97%	168
	2.5 ppm	130	90%	117	165	90%	149	138	97%	134
T24	Control	153	92%	141	166	92%	157	142	97%	137
	1.5 ppm	170	93%	158	158	96%	152	130	97%	126
	2.0 ppm	168	97%	163	156	93%	145	110	97%	107
	2.5 ppm	120	94%	113	138	90%	124	105	95%	99
T48	Control	182	93%	169	156	91%	142	154	90%	138
	1.5 ppm	189	97%	183	148	89%	132	151	91%	137
	2.0 ppm	225	94%	212	173	84%	145	106	96%	102
	2.5 ppm	214	93%	199	143	77%	110	102	92%	94

Se realizaron 3 ensayos para la etapa de fermentación, donde se evaluaron 4 tiempos (T0, T8, T24 y T48) en cada uno de estos tiempos se realizó: Conteo de población celular en cámara de Neubauer que hace referencia al número de células presentes en los 25 cuadrantes y partir de este número de células se calculó el porcentaje de viabilidad y número de células viables. Ver ecuaciones 4, 5 y 6.

En la ilustración 25 se muestra el promedio de la variable microbiológica: (Viabilidad celular) de los tres (3) ensayos realizados en esta etapa.



Variable estadística	T0				T8				T24				T48			
	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5
Media o promedio	158.0	147.3	144.0	122.6	159.0	147.6	148.6	133.3	145.0	145.3	138.3	112.0	149.6	150.6	153.0	134.3
Desviación estándar	21.7	29.4	26.1	12.2	21.4	29.4	21.2	13.07	8.64	13.8	23.3	10.2	13.7	22.9	45.2	46.1
Varianza	452.6	864.8	684.6	150.2	458.6	869.5	453.5	170.8	74.6	192.8	544.8	104.6	189.5	526.8	2048.6	2133.5

Con: Control; 1.5: Cloro residual (C.R 1.5 ppm); 2.0: Cloro residual (C.R 2.0 ppm); 2.5: Cloro residual (C.R 2.5 ppm)

Ilustración 25. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables microbiológicas en la etapa de fermentación: Viabilidad celular en los tiempos T0, T8, T24 y T48 Horas.

En la etapa de fermentación el número de células viables se debe mantener constante es decir aquí la célula no utiliza el azúcar disponible para su desarrollo celular, sino que lo utiliza para realizar fermentación como una forma de obtención de energía ya que esta es en ausencia de oxígeno.

10.2.2.3.2. Estado morfológico.

El recuento del estado morfológico de la levadura se realizó en cámara de Neubauer contando solo 5 cuadrantes, y en cada cuadrante se contó el número de células según el color presente (Blanco, rosadas, marrones o rojas) como se menciona en el apartado metodológico.

Tabla 16. Estado morfológico de la levadura alcohólica (ENSAYO 1,2,3)

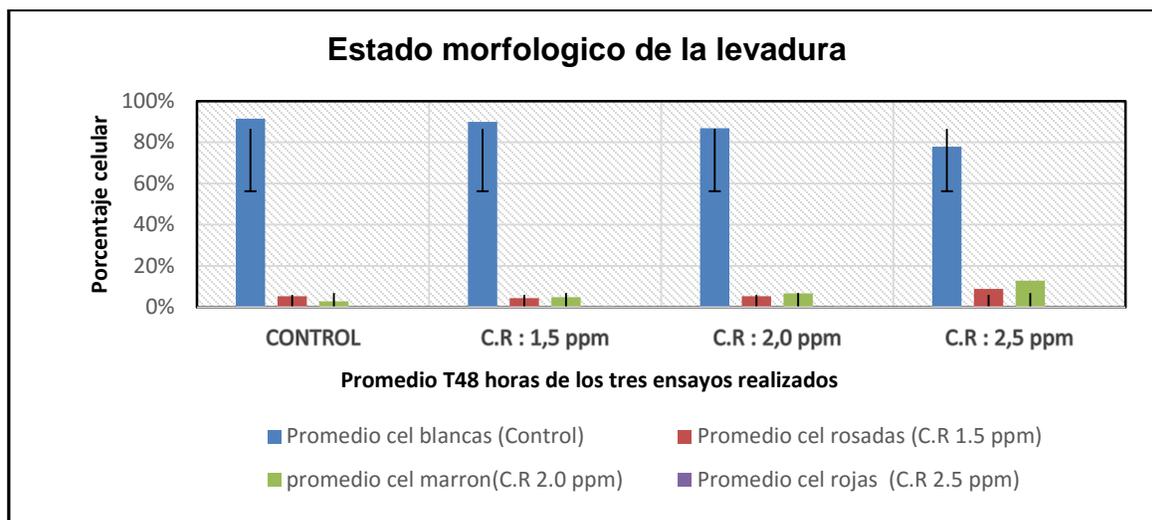
VARIABLES MICROBIOLÓGICAS FERMENTACION: ESTADO MORFOLÓGICO DE LA LEVADURA ALCOHÓLICA.			
Ensayo 1			
Tiempo 24 horas	Coloración	Número de células	% porcentaje de células
Control	Blanco	77	94%
	Rosado	5	6%
	Marrón	0	0%
	Rojo	0	0%
Cloro residual 1.5 ppm	Blanco	69	97%
	Rosado	2	2.8%
	Marrón	0	0%
	Rojo	0	0%
Cloro residual 2.0 ppm	Blanco	72	92%
	Rosado	6	7.7%
	Marrón	0	0%
	Rojo	0	0%
Cloro residual 2.5 ppm	Blanco	84	87%
	Rosado	13	13.4%
	Marrón	0	0%
	Rojo	0	0%

VARIABLES MICROBIOLÓGICAS FERMENTACION: ESTADO MORFOLÓGICO DE LA LEVADURA ALCOHÓLICA.			
Ensayo 2			
Tiempo 24 horas	Coloración	Número de células	% porcentaje de células
Control	Blanco	67	93%
	Rosado	5	7%
	Marrón	0	0%
	Rojo	0	0%
Cloro residual 1.5 ppm	Blanco	59	86%
	Rosado	4	5.8%
	Marrón	6	8.7%
	Rojo	0	0%
Cloro residual 2.0 ppm	Blanco	67	85%
	Rosado	4	5%
	Marrón	8	10.1%
	Rojo	0	0%
Cloro residual 2.5 ppm	Blanco	67	75%
	Rosado	5	5.6%
	Marrón	17	19.1%
	Rojo	0	0%

VARIABLES MICROBIOLÓGICAS FERMENTACION: ESTADO MORFOLÓGICO DE LA LEVADURA ALCOHÓLICA.			
Ensayo 3			
Tiempo 24 horas	Coloración	Número de células	% porcentaje de células
Control	Blanco	77	87.5%
	Rosado	3	3.4%
	Marrón	8	9.1%
	Rojo	0	0%
Cloro residual 1.5 ppm	Blanco	70	89%
	Rosado	4	5.1%
	Marrón	5	6.3%
	Rojo	0	0%
Cloro residual 2.0 ppm	Blanco	75	86%
	Rosado	3	3.5%
	Marrón	9	10.3%
	Rojo	0	0%
Cloro residual 2.5 ppm	Blanco	89	72.3%
	Rosado	10	8.1%
	Marrón	24	20%
	Rojo	0	0%

El cálculo de morfología celular de la tabla 16 se realizó como en la etapa de propagación.

En la ilustración 26 se muestra el promedio de la variable microbiológica: Estado morfológico de la levadura alcohólica de los tres (3) ensayos realizados en esta etapa.



Variable estadística	T 48				T 48				T 48			
	Células Blancas				Células Rosadas				Células Marrón			
	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5
Media o promedio	73.6	66.0	71.3	80.0	4.33	3.33	4.33	9.33	2.66	3.66	5.66	13.6
Desviación estándar	4.71	4.96	3.29	9.41	0.94	0.94	1.24	3.29	3.77	2.62	4.02	10.0
Varianza	22.2	24.6	10.8	88.6	0.88	0.88	1.55	10.8	14.2	6.88	16.2	101.5

Con: Control; 1.5: Cloro residual (C.R 1.5 ppm); 2.0: Cloro residual (C.R 2.0 ppm); 2.5: Cloro residual (C.R 2.5 ppm)

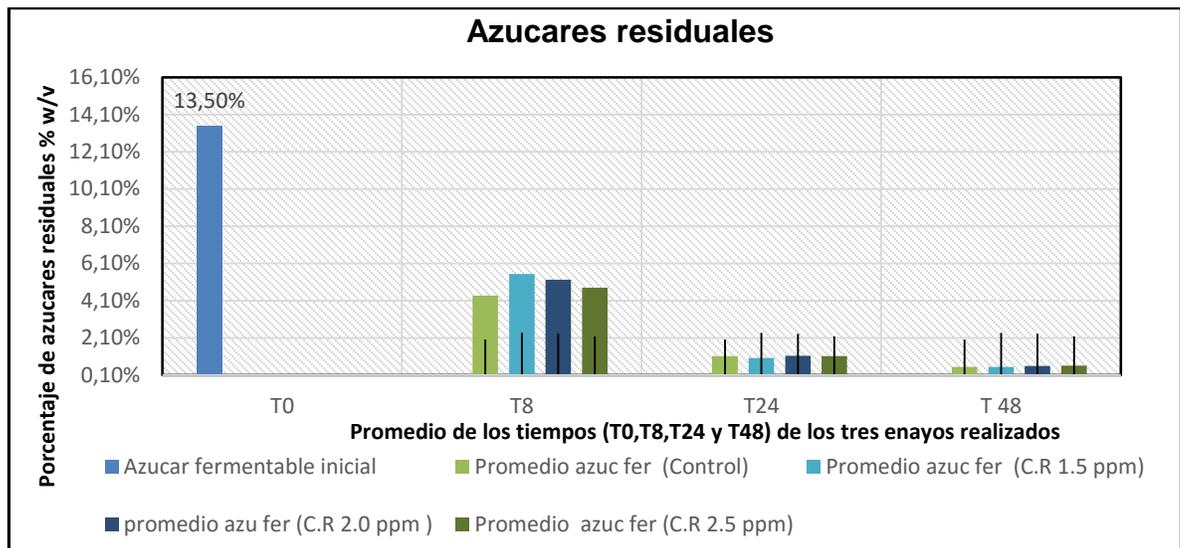
Ilustración 26. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables microbiológicas en la etapa de fermentación: Morfología celular en el tiempo final T48 Horas.

Se observa que en la etapa de fermentación el número de células blancas disminuyen considerablemente en cada concentración de cloro residual ensayadas, en comparación con la etapa de fermentación donde la disminución de células blancas es menor, además de evidenciar un aumento de células en alto y bajo estado de deterioro según (Prada & Castro,1995) en la concentración de cloro residual de 2.5 ppm.

10.2.2.4. Seguimiento de variables fisicoquímicas.

En la tabla 36 (ver anexos) se evidencia las variables fisicoquímicas de la etapa de fermentación, en cada uno de los tiempos informados en la metodología (capítulo 8). Cabe mencionar que el grado alcohólico en esta etapa debe ser similar al grado alcohólico esperado según la tabla 14 con un porcentaje de etanol del 10,07%v/v, ya que en esta etapa la levadura sintetiza etanol debido a las condiciones de anaerobiosis dadas y según el grado de alcohol que se obtenga se estipulara cual es la concentración de cloro que inciden en la productividad de etanol a lo largo de esta etapa.

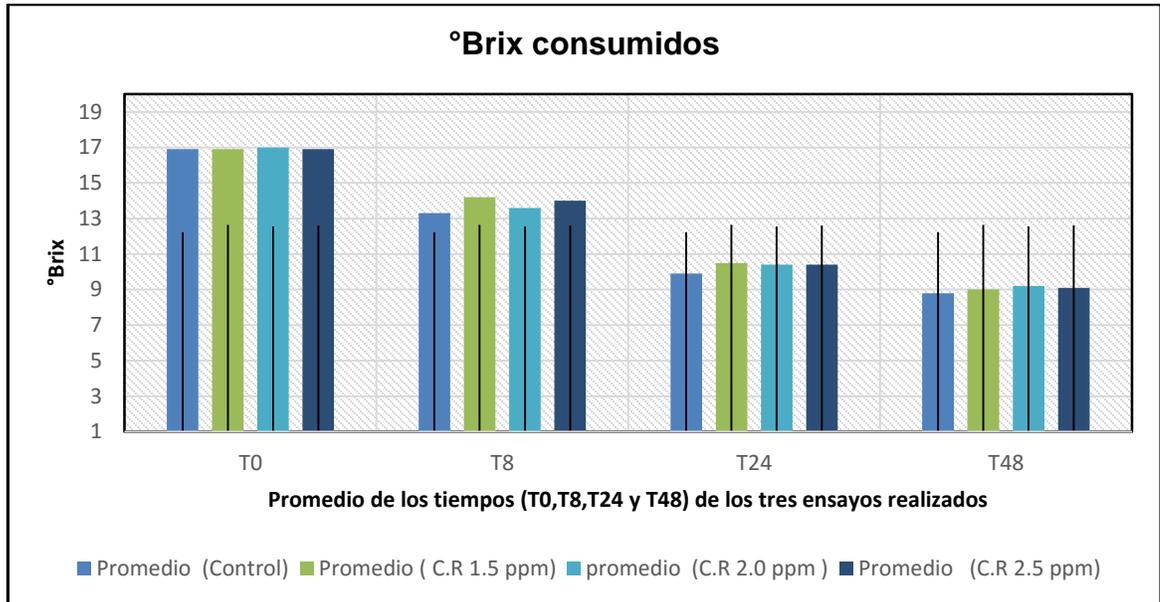
En las ilustraciones 27,28, 29 ,30 y 31 se muestra el promedio de cada una de las variables fisicoquímicas de los tres (3) ensayos realizados en esta etapa.



Variable estadística	T8				T 24				T 48			
	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5
Media o promedio	4.37	5.53	5.22	4.8	1.12	1.02	1.14	1.11	0.53	0.54	0.58	0.6
Desviación estándar	0.17	0.44	0.44	0.55	0.51	0.43	0.53	0.48	0.11	0.12	0.08	0.10
Varianza	0.03	0.00	0.19	0.30	0.26	0.18	0.28	0.23	0.01	0.01	0.00	0.01

Con: Control; 1.5: Cloro residual (C.R 1.5 ppm); 2.0: Cloro residual (C.R 2.0 ppm); 2.5: Cloro residual (C.R 2.5 ppm)

Ilustración 27. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables fisicoquímicas en la etapa de fermentación: Porcentaje de azúcares residuales en los tiempos T8, T24 y T48 Horas, teniendo en cuenta que se partió de un azúcar fermentable para esta etapa de 13.50 % de azúcar disponible en el medio, se evidencia claramente la reducción de azúcar en el medio de fermentación.

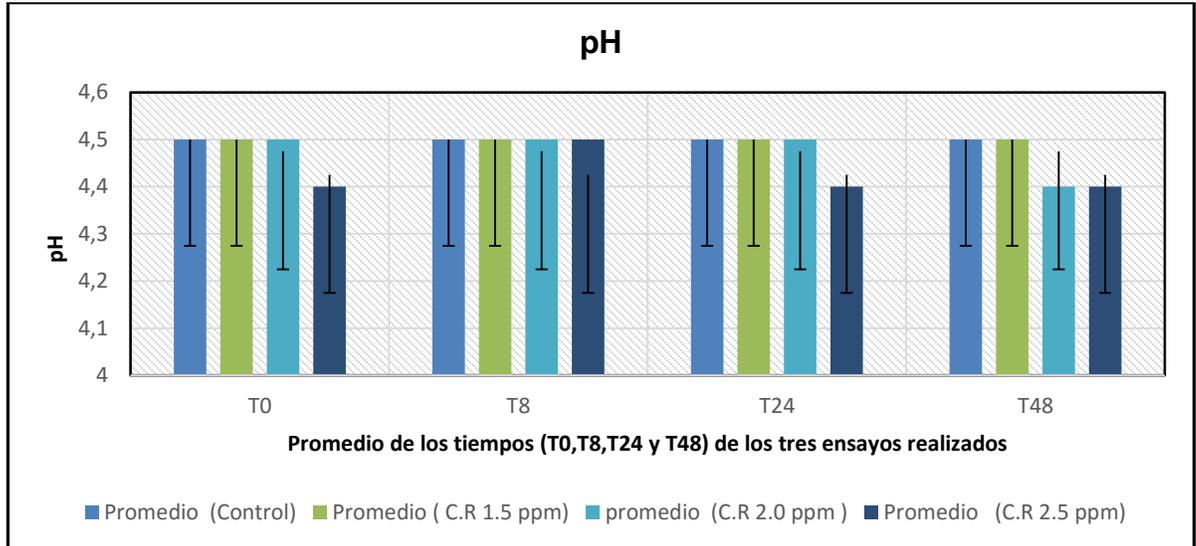


Variable estadística	T0				T8				T 24				T 48			
	Con	1.5	2.0	2.5												
Media o promedio	16.9	16.9	17.0	16.9	13.3	14.2	13.6	14.0	9.9	10.5	10.4	10.4	8.7	9.0	9.2	8.9
Desviación estándar	0.70	0.57	0.45	0.47	0.80	0.58	0.50	0.74	0.89	0.98	0.70	0.95	0.16	0.33	0.21	0.15
Varianza	0.49	0.32	0.20	0.22	0.64	0.34	0.26	0.54	0.80	0.96	0.49	0.91	0.02	0.11	0.04	0.02

Con: Control; 1.5: Cloro residual (C.R 1.5 ppm); 2.0: Cloro residual (C.R 2.0 ppm); 2.5: Cloro residual (2.5 ppm)

Ilustración 28. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables fisicoquímicas en la etapa de fermentación: °Brix en los tiempos T0, T8, T24 y T48 Horas.

Se puede evidenciar una disminución notoria en los grados Brix consumidos por parte de la levadura en el transcurso de la fermentación, siendo los mayores grados Brix en las concertaciones de cloro residual de 2.0 ppm y 2.5 ppm.

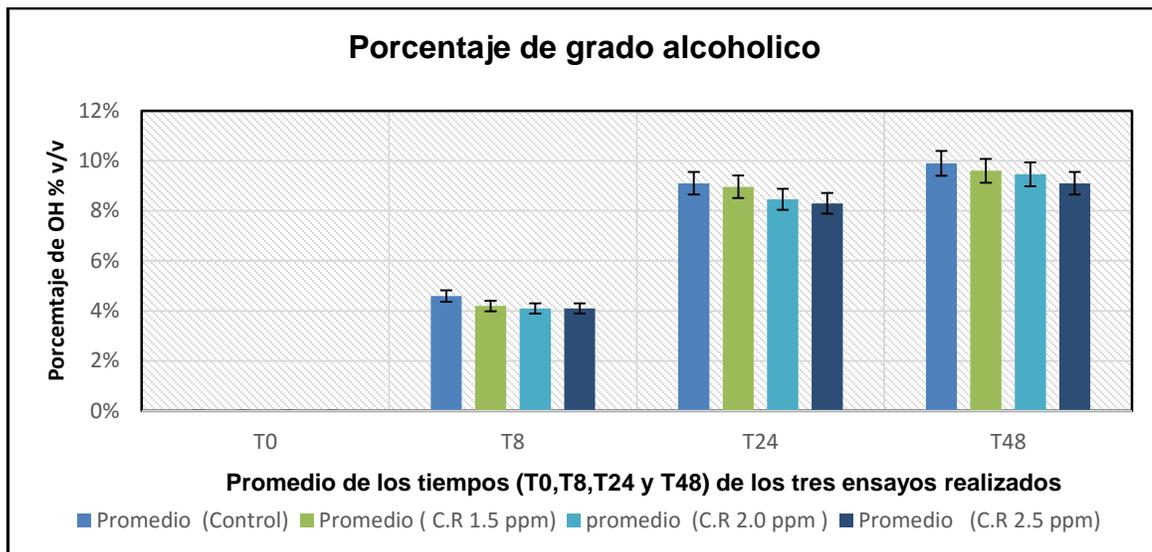


Variable estadística	T0				T8				T 24				T 48			
	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5
Media o promedio	4.5	4.5	4.5	4.4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.4	4.5	4.5	4.4	4.4
Desviación estándar	0.0	0.0	0.0	0.04	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.04	0.0	0.0	0.04	0.04
Varianza	0.0	0.0	0.0	0.002	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.002	0.0	0.0	0.002	0.002

Con: Control; 1.5: Cloro residual (C.R 1.5 ppm); 2.0: Cloro residual (C.R 2.0 ppm); 2.5: Cloro residual (C.R 2.5 ppm)

Ilustración 29. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables fisicoquímicas en la etapa de fermentación: pH en los tiempos T0, T8, T24 y T48 Horas.

En la fermentación además del etanol se producen una variedad de subproductos tales como: alcoholes superiores (amílico, isoamílico, butílico, aldehídos, glicerina) y ácidos orgánicos: ácido láctico, ácido acético, ácido succínico que generan que el pH del medio de fermentación disminuya.



Variable estadística	T8				T 24				T 48			
	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5	Con	1.5	2.0	2.5
Media o promedio	5.0	4.2	4.2	4.1	9.1	8.9	8.4	8.3	9.9	9.6	9.4	9.1
Desviación estándar	0.69	0.48	0.32	0.35	0.65	0.66	0.16	0.37	1.01	0.87	0.77	0.64
Varianza	0.48	0.24	0.10	0.12	0.80	0.44	0.02	0.14	1.02	0.76	0.59	0.42

Con: Control; 1.5: Cloro residual (C.R 1.5 ppm); 2.0: Cloro residual (C.R 2.0 ppm); 2.5: Cloro residual (C.R 2.5 ppm)

Ilustración 30. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables fisicoquímicas en la etapa de fermentación: %OH (v/v) en los tiempos T0, T8, T24 y T48 Horas.

En general se evidencia que el menor grado alcohólico se obtuvo en las concentraciones de cloro residual de 2.0 ppm y 2.5 ppm con un porcentaje de alcohol de 9.4 % v/v y 9,1 % v/v, con respecto a 1.5 ppm que fue de 9.6 % v/v respectivamente.

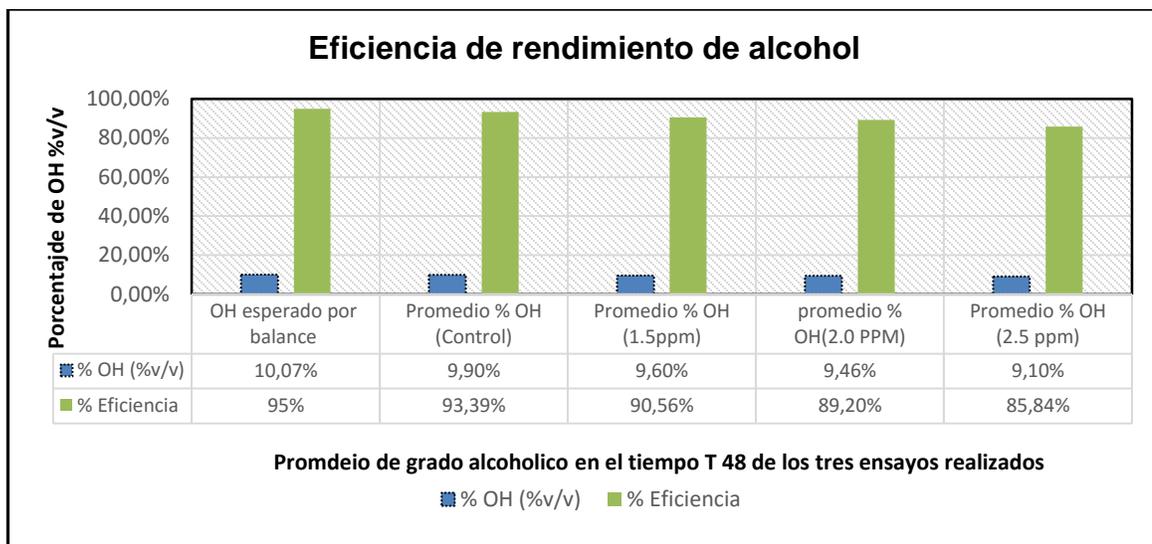


Ilustración 31. Promedio de los tres ensayos realizados evaluando variables fisicoquímicas en la etapa de fermentación: Eficiencia final de etanol en el tiempo final T 48 Horas.

En términos generales se evidencia que las concentraciones de cloro de 2.0 y 2.5 ppm si ejercen un efecto negativo sobre la eficiencia de %OH, mostrando que el menor grado alcohólico fue en 2.5 ppm de cloro residual con 9.10 % y una eficiencia del 85,84% comparándolo con el control que fue de 9,9% y una eficiencia de 93,39%.

10.3. ANALISIS ESTADISTICO DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO.

10.3.1. EVALUACIÓN FISICOQUÍMICA DEL AGUA DE PROCESO.

Tabla 17. Análisis de varianza de un factor VARIBALE DUREZA.

Resumen				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
BLANCO	7	391,5	55,9	782,2
TK 903	7	2602,7	371,8	639
ER305	7	2585,2	369,3	270,7
PZ	7	2927,4	418,2	315,4

Análisis de varianza						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	584368	7	83481,1	138,6	0	2,5
Dentro de los grupos	12043	20	602,2			
Total	596411	27				

Tabla 18. Estadística descriptiva de la VARIABLE DUREZA en cada punto de muestreo del agua de proceso.

BLANCO	TK 903	ER305	PZ
Media	55,9	Media 371,8	Media 369,3
Error típico	10,6	Error típico 9,6	Error típico 6,2
Mediana	65,9	Mediana 366,7	Mediana 370,8
Desviación estándar	28,0	Desviación estándar 25,3	Desviación estándar 16,5
Varianza de la muestra	782,2	Varianza de la muestra 639,0	Varianza de la muestra 270,7
Curtosis	-0,8	Curtosis -0,8	Curtosis 1,2
Coefficiente de asimetría	-0,5	Coefficiente de asimetría 0,5	Coefficiente de asimetría 1,0
Rango	79,0	Rango 69,1	Rango 49,8
Mínimo	11,6	Mínimo 343,4	Mínimo 349,9
Máximo	90,6	Máximo 412,5	Máximo 399,7
Suma	391,0	Suma 2602,7	Suma 2585,2
Cuenta	7,0	Cuenta 7,0	Cuenta 7,0
Nivel de confianza(95,0%)	25,9	Nivel de confianza(95,0%) 23,4	Nivel de confianza(95,0%) 15,2
			Nivel de confianza(95,0%) 16,4

Tabla 19. Análisis de varianza de un factor VARIABLE ALCALINIDAD

Resumen				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
BLANCO	7	176,6	25,1	324,3
TK 903	7	2430,5	347,2	606,6
ER305	7	2447,4	349,6	781,1
PZ	7	2704,7	386,4	187,3

Análisis de varianza						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	599215,2	7	85602,2	150,2	0	2,5
Dentro de los grupos	11395,2	20	569,8			
Total	610610,4	27				

Tabla 20. Estadística descriptiva de la VARIBALE ALCALINIDAD en cada punto de muestreo del agua de proceso.

	BLANCO	TK 903	ER305	PZ
Media	25,1	Media 347,2	Media 349,6	Media 386,4
Error típico	6,8	Error típico 9,3	Error típico 10,6	Error típico 5,2
Mediana	21,6	Mediana 349,2	Mediana 344,6	Mediana 390,1
Desviación estándar	18,0	Desviación estándar 24,6	Desviación estándar 27,9	Desviación estándar 13,7
Varianza de la muestra	324,3	Varianza de la muestra 606,6	Varianza de la muestra 781,1	Varianza de la muestra 187,3
Curtosis	3,4	Curtosis -0,1	Curtosis 1,6	Curtosis 5,5
Coficiente de asimetría	1,5	Coficiente de asimetría 0,0	Coficiente de asimetría 0,6	Coficiente de asimetría -2,2
Rango	58,0	Rango 74,7	Rango 90,8	Rango 39,7
Mínimo	3,6	Mínimo 310,0	Mínimo 309,1	Mínimo 356,5
Máximo	61,6	Máximo 384,7	Máximo 399,9	Máximo 396,2
Suma	176,0	Suma 2430,5	Suma 2447,4	Suma 2704,7
Cuenta	7,0	Cuenta 7,0	Cuenta 7,0	Cuenta 7,0
Nivel de confianza(95,0%)	16,7	Nivel de confianza(95,0%) 22,8	Nivel de confianza(95,0%) 25,8	Nivel de confianza(95,0%) 12,7

Tabla 21. Análisis de varianza de un factor VARIABLE CLORO RESIDUAL.

Resumen				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
BLANCO	7	0	0	0
TK 903	7	14	2	0,17
ER305	7	14	2	0,17
PZ	7	0	0	0

Análisis de varianza						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	28	5	5,6	61,6	0	2,66
Dentro de los grupos	2	22	0,09			
Total	30	27				

Tabla 22. Estadística descriptiva de la VARIABLE CLORO RESIDUAL en cada punto de muestreo del agua de proceso.

BLANCO	TK 903	ER305	PZ
Media	0	2,0	2,0
Error típico	0	0,15	0,15
Mediana	0	2,0	2,0
Desviación estándar	0	0,41	0,41
Varianza de la muestra	0	0,17	0,17
Curtosis	0	-1,20	-1,20
Coficiente de asimetría	0	0,0	0,0
Rango	0	1,0	1,0
Mínimo	0	1,5	1,5
Máximo	0	2,5	2,5
Suma	0	14,0	14,0
Cuenta	7	7,0	7,0
Nivel de confianza(95,0%)	0	0,38	0,38

10.3.2. EFECTO DEL CLORO RESIDUAL PRESENTE EN EL AGUA DE PROCESO SOBRE LA ACTIVIDAD FERMENTATIVA EN LAS ETAPAS DE PROPAGACION Y FERMENTACION.

10.3.2.1. ETAPA DE PROPAGACION.

10.3.2.1.1. Variables microbiológicas.

10.3.2.1.2. Viabilidad celular.

Tabla 23. Análisis de varianza de un factor etapa de propagación CELULAS VIABLES.

Resumen				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
E1	4	1005	251,3	619,6
E2	4	1220	305	946
E3	4	1313	328,3	1862,9

Análisis de varianza						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	12478,2	2	6239,1	5,5	0	4,3
Dentro de los grupos	10285,5	9	1142,8			
Total	22763,7	11				

Tabla 24. Estadística descriptiva etapa de propagación CELULAS VIABLES en cada uno de los tres ensayos realizados.

E1	E2	E3
Media	251,3	Media 328,3
Error típico	12,4	Error típico 21,6
Mediana	249,0	Mediana 337,0
Desviación estándar	24,9	Desviación estándar 43,2
Varianza de la muestra	619,6	Varianza de la muestra 1862,9
Curtosis	0,2	Curtosis -0,4
Coficiente de asimetría	0,5	Coficiente de asimetría -0,9
Rango	59,0	Rango 97,0
Mínimo	224,0	Mínimo 271,0
Máximo	283,0	Máximo 368,0
Suma	1005,0	Suma 1313,0
Cuenta	4,0	Cuenta 4,0
Nivel de confianza(95,0%)	39,6	Nivel de confianza(95,0%) 68,7

E1: Ensayo 1; E2: Ensayo 2; E3: Ensayo 3

10.3.2.1.3. Estado morfológico de la levadura.

Tabla 25. Análisis de varianza de un factor etapa de propagación ESTADO MORFOLOGICO.

Resumen				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
E1	4	100,1	25	2261
E2	4	101	25,3	2291,6
E3	4	98,6	24,7	2301,7

Análisis de varianza						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,7	2	0,4	0	1	4,3
Dentro de los grupos	20562,9	9	2284,8			
Total	20563,7	11				

Tabla 26. Estadística descriptiva etapa de propagación ESTADO MORFOLOGICO en cada uno de los tres ensayos realizados.

	E1	E2	E3
Media	25,0	Media	25,3
Error típico	23,7	Error típico	23,9
Mediana	1,9	Mediana	2,0
Desviación estándar	47,5	Desviación estándar	47,8
Varianza de la muestra	2261,0	Varianza de la muestra	2291,5
Curtosis	3,9	Curtosis	3,9
Coficiente de asimetría	1,9	Coficiente de asimetría	1,9
Rango	96,3	Rango	97,0
Mínimo	0	Mínimo	0
Máximo	96,3	Máximo	97,0
Suma	100,1	Suma	101,0
Cuenta	4	Cuenta	4
Nivel de confianza(95,0%)	75,6	Nivel de confianza(95,0%)	76,1
		Nivel de confianza(95,0%)	76,3

E1: Ensayo 1; E2: Ensayo 2; E3: Ensayo.

10.3.2.2. ETAPA DE FERMENTACION.

10.3.2.1. Variables microbiológicas.

10.3.2.2. Viabilidad celular.

Tabla 27. Análisis de varianza de un factor etapa de fermentación CELULAS VIABLES.

Resumen				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
E1	4	763	190,8	350,9
E2	4	529	132,3	250,9
E3	4	471	117,8	530,9

Análisis de varianza						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	11948,7	2	5974,3	15,8	0	4,3
Dentro de los grupos	3398,3	9	377,6			
Total	15346,9	11				

Tabla 28. Estadística descriptiva etapa de fermentación CÉLULAS VIABLES en cada uno de los tres ensayos realizados.

E1	E2	E3			
Media	190,8	Media	132,3	Media	117,8
Error típico	9,4	Error típico	7,9	Error típico	11,5
Mediana	191,0	Mediana	137,0	Mediana	119,5
Desviación estándar	18,7	Desviación estándar	15,8	Desviación estándar	23,0
Varianza de la muestra	350,9	Varianza de la muestra	250,9	Varianza de la muestra	530,9
Curtosis	-1,7	Curtosis	1,4	Curtosis	-5,4
Coficiente de asimetría	-0,1	Coficiente de asimetría	-1,3	Coficiente de asimetría	-0,1
Rango	43,0	Rango	35,0	Rango	44,0
Mínimo	169,0	Mínimo	110,0	Mínimo	94,0
Máximo	212,0	Máximo	145,0	Máximo	138,0
Suma	763,0	Suma	529,0	Suma	471,0
Cuenta	4,0	Cuenta	4,0	Cuenta	4,0
Nivel de confianza(95,0%)	29,8	Nivel de confianza(95,0%)	25,2	Nivel de confianza(95,0%)	36,7

E1: Ensayo 1; E2: Ensayo 2; E3: Ensayo.

10.3.2.3. Estado morfológico de la levadura.

Tabla 29. Análisis de varianza de un factor etapa de fermentación ESTADO MORFOLOGICO.

Resumen				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
E1	4	100	25	2009,3
E2	4	100,5	25,1	1466,1
E3	4	102,6	25,7	1589,6

Análisis de varianza						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1	2	0,5	0	1	4,3
Dentro de los grupos	15194,9	9	1688,3			
Total	15195,8	11				

Tabla 30. Estadística descriptiva etapa de fermentación ESTADO MORFOLOGICO en cada uno de los tres ensayos realizados.

E1	E2	E3
Media	25,0	Media 25,1
Error típico	22,4	Error típico 19,1
Mediana	4,0	Mediana 9,3
Desviación estándar	44,8	Desviación estándar 38,3
Varianza de la muestra	2009,3	Varianza de la muestra 1466,1
Curtosis	3,9	Curtosis 3,6
Coficiente de asimetría	2,0	Coficiente de asimetría 1,9
Rango	92,0	Rango 82,0
Mínimo	0,0	Mínimo 0,0
Máximo	92,0	Máximo 82,0
Suma	100,0	Suma 100,5
Cuenta	4,0	Cuenta 4,0
Nivel de confianza(95,0%)	71,3	Nivel de confianza(95,0%) 60,9

E1: Ensayo 1; E2: Ensayo 2; E3: Ensayo.

10.3.2.4. Variables fisicoquímicas.

10.3.2.4.1. Porcentaje de grado alcohólico.

Tabla 31. Análisis de varianza de un factor etapa de fermentación PORCENTAJE DE GRADO ALCOHOLICO.

Resumen				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
E1	4	33	8,3	0,3
E2	4	40	10	0,7
E3	4	41	10,3	0,3

Análisis de varianza						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	9,5	2	4,8	12,2	0	4,3
Dentro de los grupos	3,5	9	0,4			
Total	13	11				

Tabla 32. Estadística descriptiva etapa de fermentación PORCENTAJE DE GRADO ALCOHOLICO en cada uno de los tres ensayos realizados.

	E1	E2	E3
Media	8,3	Media	10,0
Error típico	0,3	Error típico	0,4
Mediana	8,0	Mediana	10,0
Desviación estándar	0,5	Desviación estándar	0,8
Varianza de la muestra	0,3	Varianza de la muestra	0,7
Curtosis	4,0	Curtosis	1,5
Coficiente de asimetría	2,0	Coficiente de asimetría	0,0
Rango	1,0	Rango	2,0
Mínimo	8,0	Mínimo	9,0
Máximo	9,0	Máximo	11,0
Suma	33,0	Suma	40,0
Cuenta	4,0	Cuenta	4,0
Nivel de confianza(95,0%)	0,8	Nivel de confianza(95,0%)	1,3

E1: Ensayo 1; E2: Ensayo 2; E3: Ensayo.

11. ANALISIS DE RESULTADOS.

El ingenio Mayagüez S.A., incluye dentro de sus procesos de fermentación alcohólica, un control estricto de los parámetros ajustándolos a un rango óptimo de producción, asegurando así su rendimiento.

Un gran número de factores pueden reducir el rendimiento de alcohol tales como: Temperatura, pH, Aireación; concentración de azúcares, calidad de la levadura, etc. Dentro de estas variables mencionadas se encuentra inmersa el agua de proceso que es empleada a lo largo del proceso de fermentación, por ello es importante conocer la calidad fisicoquímica y microbiología de la misma, ya que esta interviene en muchos puntos del sistema fermentativo (Nieto Galarza, 2009; Pérez, López, & Úbeda, 2013).

Los resultados de la (ilustración 8) evaluación microbiológica del agua de proceso, demuestran que todos los puntos de muestreo, presentan índices por fuera de la norma interna en el análisis de bacterias mesofilas y levaduras, debido posiblemente, a la deficiencia en el proceso de limpieza del tanque de almacenamiento de agua clorada (tanque 903) y que las tuberías de la red de conducción del agua son de material inadecuado (acero al carbono), favoreciendo la formación de biofilms, que su vez, se encuentran relacionados como causa del deterioro en la calidad organoléptica y microbiológica del agua, al actuar como barrera protectora de las bacterias que hayan sobrevivido a los procesos de cloración (Perez, Lopez, & Ubeda, 2013).

La caracterización fisicoquímica (ilustraciones 9, 10 ,11 ,12 ,13 y 14) permite establecer que, en los tres puntos de muestreo, las aguas son duras, alcalinas y de alta conductividad, lo cual es correspondiente con su origen subterráneo que la hace rica en iones metálicos divalentes (iones de calcio, estroncio, bario y magnesio en forma de bicarbonatos o carbonatos) siendo esta, la causa principal de la dureza y aumentando la conductividad del agua. Se ha reportado que aguas excesivamente duras con concentraciones mayores de 200 ppm de carbonato de calcio son indeseables porque retardan la fermentación dado que los iones disueltos impiden que las proteínas absorban agua, siendo este valor sobrepasado en los diferentes puntos de muestro del agua de proceso, con concentraciones de dureza promedio de 386 ppm CaCO₃, mg/ litro , comprometiendo así el proceso fermentativo y por ende el producto final (Kueck, 2017).

Por otra parte, el pH del agua del proceso es el único valor que no presenta variaciones extremas que influyan drásticamente en la capacidad fermentativa de la levadura al observarse valores que fluctúan entre 6.0 - 8.0 lo cual es correspondiente con valores reportados en otros estudios y al no encontrarse valores superiores a 8.0 no existe el riesgo de neutralización de la acidez normal generada durante la fermentación, producto de la actividad metabólica de la levadura (Venkobachar et al., 1977 , Kueck, 2017).

En la etapa de propagación podemos observar como concentraciones de cloro obtenidas inciden notablemente en el desarrollo y morfología de la levadura, es así, como la concentración de 2.5 ppm de cloro residual (ver ilustraciones 17-18-19 y 20) ejerce un efecto negativo, provocando alteraciones celulares que se encuentran relacionadas con modificaciones biosintéticas en el metabolismo, destrucción de fosfolípidos, la formación de cloraminas que interfieren en el metabolismo celular e inactivan enzimas (Estrela et al., 2002; Venkobachar et al., 1977), Cabe resaltar que es la etapa de fermentación (ver ilustraciones 25-26-31) la que más se ve afectada en las variables de viabilidad, morfología celular y porcentaje de grado alcohólico cuando se encuentra expuesta a la concentración de 2.5 ppm lo que indica que esta concentración de cloro tienen un efecto negativo en la actividad fermentativa, evidenciándose una baja producción de etanol.

Los resultados de recuento celular y estado morfológico obtenidos en la etapa de propagación y fermentación (ilustraciones 18 – 20 y 25 – 26, respectivamente) demuestran que estas variables microbiológicas están relacionadas inversamente de tal forma que el número de células viables disminuye a medida que el estado morfológico de células rosadas y marrones aumentan (células en bajo y alto estado de deterioro), condición que se encuentra relacionada con la exposición al cloro residual, siendo la concentración de 2.5 ppm la que menos células viables obtuvo con un aumento de células rosadas y marrones para la etapa de fermentación. Esta condición afecta directamente la producción de alcohol, como se evidencia en las contracciones de cloro residual de 2.0 y 2.5 ppm. Teniendo en cuenta que se partió de un balance de fermentación, donde se brindaron las condiciones ideales para alcanzar un grado alcohólico (OH) de 10.07 % (correspondiente con un rendimiento del 95%), podemos evidenciar que la concentración de 1.5 ppm de cloro residual fue la más cerca al OH objetivo, obteniéndose un valor de 9.6 % v/v, correspondiente a un rendimiento del 90,56% (Prada & Castro, 1995).

Aunque se demuestra una relación directa entre los cambios de morfología y la concentración de cloro residual, existen cambios normales en la morfología de la levadura producto de su crecimiento durante la fermentación, pero sí se ejemplifica, que según la concentración de cloro, hay una disminución en la capacidad fermentadora de la levadura (ilustración 31), de tal forma que las concentraciones de 2.0 ppm y 2.5 ppm presentaron los menores rendimientos en etanol (9.4 % v/v, 9.1% v/v) correspondientes a una eficiencia de 89,20 % y 85,85%, respectivamente, mientras que la concentración de 1.5 ppm obtuvo un 9,6 % v/v OH y una eficiencia de 90,56% (Belo, Pinheiro, & Mota, 2005; Vian, Carrascosa, & Gonza, 2005).

Los resultados obtenidos a partir de los análisis de azúcar residual, pH y °Brix corroboran la afectación en la capacidad fermentadora de la levadura por acción de la concentración de cloro, al no poder asimilar los azúcares, fuente indispensable en la producción de alcohol (ilustraciones 21-22-23-27-28 y 29), incidiendo directamente sobre la viabilidad y morfología de la levadura, por lo que se

recomienda una dosificación de 1.5 ppm de cloro residual en la planta del ingenio Mayagüez (Estrela et al., 2002; Venkobachar et al., 1977).

12. CONCLUSIONES.

- La calidad microbiológica y fisicoquímica del agua de proceso empleada en la fermentación se encuentra por fuera de los parámetros exigidos en la norma interna CCA-tbl-006, lo cual demuestra que el tratamiento del agua es deficiente.
- Dado a los resultados obtenidos en las variables de estudio calidad fisicoquímica del agua (Dureza, Alcalinidad), se puede concluir que estas variables tienen una notable incidencia en la actividad fermentativa afectando la viabilidad y morfología de la levadura alcohólica, debido a que estas se encuentran por fuera de los límites establecidos internamente.
- Según los resultados obtenidos de las viables de estudio de efecto del cloro residual sobre la actividad fermentativa (Viabilidad celular, estado morfológico y porcentaje de grado alcohólico) en las etapas de propagación y fermentación, se concluye que la etapa de fermentación es la que más se ve comprometida a exposiciones de cloro residual.
- Las concentraciones de cloro residual: 2.0 y 2.5 ppm, afecta la viabilidad y morfología celular en la etapa de fermentación y por consiguiente la eficiencia en la producción de etanol.
- Se puede establecer que la concentración máxima de cloro residual no debe ser superior a 1.5 ppm evitándose la afectación en la actividad fermentativa de la levadura alcohólica.

13. RECOMENDACIONES.

- Se recomienda mejorar la calidad fisicoquímica del agua de proceso, ya que es evidente que se está trabajando con aguas de deficiente calidad, lo que conlleva a una disminución en la productividad de etanol.
- Es recomendable realizar la dosificación de cloro a 1.5 ppm ya que a esta concentración no se vio ningún efecto negativo sobre la viabilidad y productividad de etanol.

14. BIBLIOGRAFIA.

- Amore, T. D., Russell, I., & Stewart, G. (1988). Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation. *Journal of Industrial Microbiology*, 2, 365–372.

- Bai, F. W., Anderson, W. A., & Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26(1), 89–105.
- Barrales, Ramon. R., Jiménez-Martínez, Juan., & Ibeas, Jose. I. (2009). Identificación de reguladores de FLO11, gen esencial en el dimorfismo y formación de biofilm en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Belo, I., Pinheiro, R., & Mota, M. (2005). Morphological and physiological changes in *Saccharomyces cerevisiae* by oxidative stress from hyperbaric air, 115, 397–404.
- Bleoanca, Iulia., & Bahrim, Gabriela. (2013). Overview on brewing yeast stress factors. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(5), 8559–8572.
- Cardona Carlos, Sanchez Oscar, Montoya Maria, Quintero Julian. (2005). Simulación de los procesos de obtención de etanol a partir de caña de azúcar y maíz. *Scientia Et Technica*, 11(0122–1701), 187–192.
- Ceccato-Antonini, Sandra. R., & Sudbery, Peter. E. (2004). Filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(3), 173–181.
- Estrela, Carlos. R., Estrela, Cyntia. R., Barbin, Eduardo. L., Spano, Julio. C., Marchesan, Melissa. A, & Pecora, Jesus . D. (2002). Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J*, 13, 113–117.
- Estrela, Carlos., Ribeiro, Rosane. G., Estrela, Cyntia. R. A., Pécora, Jesus. D., & Sousa-Neto, Monael. D. (2003). Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Brazilian Dental Journal*, 14(1), 58–62.
- FAJARDO CASTILLO, Erika; SARMIENTO FORERO, Sandra. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Bogotá, 2007, 120 pp. Trabajo de pregrado (optar al título de microbiólogo industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias básicas.
- Fukuzaki, Satochi. (2006). Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Science*, 11(4), 147–57.
- GARZÓN CASTAÑO, Sandra Catalina; HERNANDEZ LONDOÑO, Catalina. Estudio comparativo para la producción de etanol entre *saccharomyces Cerevisiae* Silvestre, *Saccharomyces Cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida Utilis* ATCC 9950. Bogotá, 2009, 132 pp. Trabajo de pregrado (optar al título de Químico industrial). Universidad tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías.
- Junli, H., Li, W., Nanqi, R., Fang, M., & Juli. (1997). Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Research*, 31(3), 607–613.
- Kueck, A. (2017). Influence of Water Chemistry on the Fermentation and Flavor Profiles of Traditional Mead. Obtenido de <http://www.homebrewersassociation.org/wpcontent/uploads/2015/04/Influence-of-Water-Chemistry-on-Mead-AHA-Research-Education-Fund.pdf>

- Laboratorio control calidad de destilería del ingenio Mayagüez S.A., CCA-tbl-006 (Plan de muestro e inspección y ensayo para materias primas, materiales en proceso, productos y subproductos de alcohol, Cali - Valle del cauca
- Laboratorio de destilería del ingenio Mayagüez S.A, manual práctico DES-pos-018: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PLANTA PTAR., Cali- Valle del cauca
- Laboratorio control calidad de destilería del ingenio Mayagüez S.A., CCA-pos-018 DETERMINACIÓN DE pH EN SOLUCIONES AZUCARADAS., Cali-Valle del cauca
- Laboratorio control calidad de destilería del ingenio Mayagüez S.A., CCA-pos-024 ° BRUX Y POL DETERMINACION EN PRODUCTOS DE TACHOS MELADURAS Y MIELES DE., Cali - Valle del cauca
- Laboratorio control calidad de destilería del ingenio Mayagüez S.A., CCA-for-031. Análisis Microbiológicos Destilería., Cali - Valle del cauca
- Laboratorio control calidad de destilería del ingenio Mayagüez S.A., CCA-pos-052: MUESTREO, IDENTIFICACION Y ANALISIS MICROBIOLOGICO., Cali - Valle del cauca
- Laboratorio control calidad de destilería del ingenio Mayagüez S.A., CCA-pos-062: ANÁLISIS DE CALDERA ALTA PRESIÓN, Cali - Valle del cauca.
- MARISCAL MORENO, Juan Pablo. Evaluación y selección de microorganismos para la producción de etanol a nivel industrial. Manizales, 2011, 99 pp. Trabajo de grado (optar al título de Magister en Ingeniería Química). Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales. Facultad de Ingeniería y Arquitectura.
- Mayagüez (2007). Documento informativo de procesos de elaboración de azúcar y etanol de la caña. Cali, Valle del cauca
- Meneghin, Silvana. P., Reis, Fabricia. C., De Almeida, Paulo. G., & Ceccato-Antonini, Sandra. R. (2008). Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(2), 337–343.
- Montoya, M. I., Cardona, C. A., & Quintero, J. A. (2004). Selección de tecnologías apropiadas para la producción de etanol carburante. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente*, 1(2),48-55.
- NIETO GALARZA, Hernán Oswaldo. Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol. Sangolqui, 2009, 142 pp. Trabajo de pregrado (optar al título de ingeniero en biotecnología). Escuela politécnica del ejército. Facultad de ingeniería en Biotecnología. Departamento de ciencias de la vida ingeniería en biotecnología.
- Ohnuki, Shinsuke., Enomoto, Kenichi., Yoshimoto, Hiroyuki., & Ohya, Yoshikazu. (2014). Dynamic changes in brewing yeast cells in culture revealed by statistical analyses of yeast morphological data. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(3), 278–284.

- Olguín, E. J., Doelel, H. W. & Mercado, G. 1995. Resource Recovery Through Recycling Of Sugar Processing By-Products And Residuals. *Resources, Conservation And Recycling*, 15, 85-94.
- Perez, C., Lopez, E., & Ubeda, J. (2013). Parámetros fisicoquímicos e indicadores microbiológicos en la depuración de aguas residuales de Ciudad Real: rendimientos en la EDAR para estudiar la posible reutilización de las aguas residuales depuradas. *Tecnología del agua*, 28-36.
- PEREZ AVILA, Alan Didier. Evaluación del proceso de producción de etanol carburante a partir de Caña azucarera, remolacha azucarera y maíz. Bogotá, 2012, 1-6pp. Trabajo de pregrado (optar al título de ingeniero químico). Universidad Nacional de Colombia. Grupo de Investigación en Procesos Químicos, Catalíticos y Biotecnológicos.
- PRADA, Guisele; CASTRO, Mónica. Açúcar e Álcool potências: Estudo das fermentos e dois Fatores que Afetam a Fermentação. (2) . Campinas, SP: Tropical Fundação de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1995.37.
- Pratt, Patricia. L., Bryce, James. H., & Stewart, Graham. G. (2003). The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. *Journal of the Institute of Brewing*, 109(3), 218–228.
- QUINTERO DALLOS, Viviana. Evaluación del potencial de producción de etanol combustible a partir de biomasa secundaria disponible en la agroindustria azucarera colombiana. Bucaramanga, 2009, 120pp. Trabajo de grado (optar al título de magister en ingeniería química). Universidad industrial de Santander. Facultad de ingeniería fisicoquímicas.
- QUINTERO SUAREZ, Julián Andrés. Design and evaluation of fuel alcohol production from lignocellulosic raw materials. Manizales, 2011, 178 pp. Trabajo de grado (optar al título de doctor en químico industrial). Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales. Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Departamento de Ingeniería Eléctrica, Electrónica y Computación.
- RAMIREZ NIETO, Gabriel Mauricio; PEDROZA FLOREZ, Julián Felipe. Desarrollo de una fermentación alcohólica a pH regulado y temperatura de 25°C en el biorreactor BioFlo 3000M y estudio inicial de fermentaciones en sistema continuo. Bogotá, 2001, 106pp. Trabajo de pregrado (optar al título de ingeniero de producción agroindustrial). Universidad de la Sabana. Facultad de ingeniería de producción agroindustrial.
- Venkobachar, C., Iyengar, L., & Prabhakara Rao, A. V. S. (1977). Mechanism of disinfection: Effect of chlorine on cell membrane functions. *Water Research*, 11(8), 727–729.
- Vian, A., Carrascosa, A. V, & Gonzalez, R. (2008). Note . Morphological Changes in *Saccharomyces cerevisiae* during the Second Fermentation of Sparkling Wines. *Food Sci Tech Int.*, 14(4), 393–398.
- Zabed, H., Faruq, G., Sahu, J. N., Azirun, M. S., Hashim, R., & Nasrulhaq Boyce, A. (2014). Bioethanol production from fermentable sugar juice. *The Scientific World Journal*, 2014.

Recursos electrónicos: THE VIRTUAL EDGE. *Saccharomyces cerevisiae*
http://www.uwyo.edu/virtual_edge/lab13/funji_results.htm Consultado el 7 de abril
2017

15. ANEXOS

Tabla 33. Resultados de la evaluación de la calidad microbiológica del agua de proceso en los diferentes puntos de muestreo.

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y FÍSICOQUÍMICA DEL AGUA DE PROCESO											
Seguimiento microbiológico											
	Fecha	Aerobios mesófilos (Ufc/ml)		Mohos y Levaduras (Ufc/ml)				Coliformes totales y fecales (Ufc/ml)			
				Mohos		Levaduras		Coliformes totales		Coliformes fecales	
		Recuento	Log	Recuento	Log	Recuento	Log	Recuento	Log	Recuento	Log
Agua de pozo	Marzo 8 /17	1.0E+03	3.0	0	0	4.7E+03	3.6	0	0	0	0
	Marzo 10 /17	2.6E+03	3.4	0	0	2.6E+02	2.4	0	0	0	0
	Marzo 13/ 17	2.7E+02	2.4	0	0	2.9E+02	2.4	0	0	0	0
	Marzo 21/ 17	0.0E+00	0.0	0	0	0.0E+00	0.0	0	0	0	0
	Marzo 23/17	3.8E+02	2.5	0	0	1.8E+02	2.2	0	0	0	0
	Marzo 28/17	6.3E+02	2.8	0	0	8.2E+02	2.9	0	0	0	0
	Marzo 30 / 17	0.0E+00	0.0	0	0	0.0E+00	0.0	0	0	0	0
	Promedio	6.9E+02	2.8	0	0	8.9E+02	3.0	0	0	0	0
Agua de proceso ER 305	Marzo 8 /17	2.6E+03	3.4	0	0	3.9E+03	3.5	0	0	0	0
	Marzo 10 /17	2.0E+02	2.3	0	0	2.6E+02	2.4	0	0	0	0
	Marzo 13/ 17	2.3E+03	3.3	0	0	1.1E+03	3.0	0	0	0	0
	Marzo 23/17	4.0E+02	2.6	0	0	3.0E+02	2.4	0	0	0	0
	Marzo 28/17	0.0E+00	0.0	0	0	0.0E+00	0.0	0	0	0	0
	Marzo 30 / 17	0.0E+00	0.0	0	0	0.0E+00	0.0	0	0	0	0
	Promedio	9.2E+02	3.0	0	0	9.3E+02	3.0	0	0	0	0

Tanque 903	Marzo 8 /17	3.0E+03	3.4	0	0	3.0E+02	2.4	0	0	0	0
	Marzo 10 /17	2.4E+02	2.3	0	0	1.9E+03	3.2	0	0	0	0
	Marzo 13/ 17	0.0E+00	0.0	0	0	0.0E+00	0.0	0	0	0	0
	Marzo 21/ 17	1.6E+03	3.2	0	0	6.0E+02	2.7	0	0	0	0
	Marzo 23 /17	0.0E+00	0.0	0	0	0.0E+00	0.0	0	0	0	0
	Marzo 28/17	0.0E+00	0.0	0	0	0.0E+00	0.0	0	0	0	0
	Marzo 30 / 17	0.0E+00	0.0	0	0	0.0E+00	0.0	0	0	0	0
	Promedio	6.9E+02	2.8	0	0	4.0E+02	2.6	0	0	0	0
Blanco (Agua destilada)	Marzo 8 /17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Marzo 10 /17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Marzo 13/ 17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Marzo 21/ 17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Marzo 23/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Marzo 28/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Marzo 30 / 17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Promedio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Límites establecidos de recuentos para el Agua de Proceso: Aerobios Mesófilos: < 100 Ufc /mL (log: 2); Mohos y levaduras: < 100 Ufc /ml (log: 2); Coliformes totales y fecales: Ausencia

Estos límites microbiológicos fueron establecidos según los parámetros de control internos del ingenio y descritos en el formato CCA-for-031. Análisis Microbiológicos Destilería.

Tabla 34. Resultados de la evaluación de la calidad fisicoquímica del agua de proceso en los diferentes puntos de muestreo.

CARACTERIZACION FISICOQUIMICA Y MICROBIOLOGIACA DEL AGUA DE PROCESO							
Seguimiento fisicoquímico							
Agua de pozo	Fecha	pH	Temperatura °C	Conductividad (µS/cm)	Dureza (CaCO3, mg/ litro)	Alcalinidad (CaCO3, mg/ litro)	Cloro residual (ppm)
	Marzo 8 /17	7.3	23.5	799	424.8	390.1	0
	Marzo 10 /17	7.4	23.2	804	413.7	387.8	0
	Marzo 13/ 17	7.3	24.5	851	394.4	356.5	0
	Marzo 21/ 17	7.3	23.1	802	410.6	395.7	0
	Marzo 23/17	7.7	22.5	798	415.1	392.0	0
	Marzo 28/17	7.3	24.7	804	416.1	386.4	0
	Marzo 30 /17	7.3	22.3	797	452.7	396.2	0
	Promedio	7.3	23.3	807.8	418.2	386.4	0
Agua de proceso ER 305	Fecha	pH	Temperatura °C	Conductividad (µS/cm)	Dureza (CaCO3, mg/ litro)	Alcalinidad (CaCO3, mg/ litro)	Cloro residual (ppm)
	Marzo 8 /17	8.0	23.2	713	370.8	361.5	2
	Marzo 10 /17	8.2	23.4	766	399.7	399.9	2.5
	Marzo 13/ 17	8.1	24.2	671	372.6	344.6	2
	Marzo 21 /17	8.0	24.2	709	349.9	357.1	1.5
	Marzo 23/17	7.9	23.5	704	358.0	336.0	1.5
	Marzo 28 / 17	7.9	25.8	684	376.4	339.2	2
	Marzo 30 /17	8.0	24.2	668	357.8	309.1	2.5
	Promedio	8.0	24.0	702.1	369.3	349.6	2

Tanque 903	Marzo 8 /17	7.8	23.3	719	366.7	349.2	2
	Marzo 10 /17	8.0	23.5	738	412.5	384.7	2.5
	Marzo 13/ 17	8.6	22.9	819	386.5	366.5	2
	Marzo 21/ 17	7.9	23.6	712	359.0	353.8	1.5
	Marzo 23/17	7.9	23.3	700	343.4	337.3	1.5
	Marzo 28/17	8.1	23.7	673	388.8	329.0	2
	Marzo 30 / 17	8.1	23.5	665	345.8	310.0	2.5
	Promedio	8.0	23.4	718.0	371.8	347.2	2
Blanco (Agua destilada)	Marzo 8 /17	7.1	23.5	9.0	65.9	24.7	0
	Marzo 10 /17	7.3	23.9	8.6	66.1	61.6	0
	Marzo 13 /17	7.1	23.1	8.9	45.8	15.1	0
	Marzo 21/ 17	6.6	22.2	12.9	30.8	21.6	0
	Marzo 23/17	6.3	21.6	4.3	11.6	3.6	0
	Marzo 28 /17	7.9	22.8	37.7	90.6	20.3	0
	Marzo 30 /17	7.4	22.8	19.2	80.2	29.1	0
	Promedio	7.1	22.8	14.4	55.9	25.2	0

Límites de dureza: Blanda 0-60 mg /L CaCO₃, Medianamente dura 60-120 mg /L CaCO₃, Dura 120-180 mg /L, Muy dura > 180 mg /L; Límites de alcalinidad: Baja < 75 mg /L CaCO₃, Media 75- 150 mg /L CaCO₃, Alta > 150 mg /L CaCO₃; Límites de cloro residual: 0.5 -2.0 ppm. Valores de pH: Deberán estar comprendidos entre 6.5 y 8.4. El valor aceptable para la conductividad debe ser de 300 y 700 microsiemens/cm. Valores de Temperatura: Deberán estar comprendidos entre 20 y 35 °C.

Estos límites fisicoquímicos de Dureza, Alcalinidad y cloro residual fueron establecidos según los parámetros de control internos del ingenio y descritos en el manual DES-pos-018: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PLANTA PTAR DESTILERIA DE MAYAGÜEZ S.A.

Tabla 35. Variables fisicoquímicas en la etapa de propagación.

VARIBLES FISICOQUIMICAS PROPAGACION																
Tiempos y concentración de cloro residual		Ensayo 1					Ensayo 2					Ensayo 3				
		Azúcar Ferm	Azúcar residual	°Brix	pH	% OH	Azúcar Ferm	Azúcar residual	°Brix	pH	% OH	Azúcar Ferm	Azúcar residual	°Brix	pH	% OH
T0	Control	6.40 %	N.A	7.4	4.4	0.0%	6.40 %	N.A	10.6	4.5	0.0%	6.40 %	N.A	9.9	4.5	0.0%
	1.5 ppm	N.A	N.A	7.4	4.5	0.0%	N.A	N.A	10.3	4.5	0.0%	N.A	N.A	10.6	4.5	0.0%
	2.0 ppm	N.A	N.A	7.4	4.5	0.0%	N.A	N.A	10.4	4.5	0.0%	N.A	N.A	10.1	4.5	0.0%
	2.5 ppm	N.A	N.A	7.4	4.4	0.0%	N.A	N.A	10.5	4.5	0.0%	N.A	N.A	10.0	4.5	0.0%
T8	Control	N.A	2.93 %	6.3	4.4	0.2%	N.A	2.40 %	9.0	4.4	2.0%	N.A	5.52 %	9.2	4.5	0.7%
	1.5 ppm	N.A	3.01 %	6.7	4.5	0.2%	N.A	2.76 %	8.5	4.4	1.9%	N.A	4.60 %	10.0	4.5	0.6%
	2.0 ppm	N.A	2.65 %	6.7	4.5	0.1%	N.A	2.63%	9.7	4.5	2.0%	N.A	5.02%	9.9	4.5	0.5%
	2.5 ppm	N.A	2.65 %	6.8	4.4	0.1%	N.A	2.51%	9.9	4.5	1.9%	N.A	5.52%	9.7	4.5	0.5%
T24	Control	N.A	1.39 %	3.3	4.2	1.7%	N.A	0.78%	4.8	4.0	3.1%	N.A	0.50 %	5.1	4.1	3.4%
	1.5 ppm	N.A	1.74 %	3.8	4.3	1.6%	N.A	0.77%	4.3	4.0	3.0%	N.A	0.49 %	5.8	4.1	3.4%
	2.0 ppm	N.A	1.68 %	3.8	4.2	1.6%	N.A	0.76%	5.8	4.0	3.0%	N.A	0.51%	5.6	4.1	3.3%
	2.5 ppm	N.A	1.50 %	3.4	4.3	1.5%	N.A	0.76 %	5.9	4.0	2.9 %	N.A	0.78%	5.9	4.1	2.9%

Ensayo que no aplica: N.A, Azúcar Fer: Azúcar fermentable

Tabla 36. Variables fisicoquímicas en la etapa de fermentación.

VARIBLES FISICOQUIMICAS FERMENTACION																
Tiempos y concentración de cloro residual		Ensayo 1					Ensayo 2					Ensayo 3				
		Azúcar. Fer	Azúcar residual	°Brix	pH	% OH	Azúcar. Fer	Azúcar residual	°Brix	pH	% OH	Azúcar. Fer	Azúcar residual	°Brix	pH	% OH
T0	Control	13.50 %	N.A	16.0	4.5	0.0%	13.50 %	N.A	17.7	4.5	0.0%	13.50 %	N.A	17.1	4.5	0.0%
	1.5 ppm	N.A	N.A	16.2	4.5	0.0%	N.A	N.A	17.0	4.5	0.0%	N.A	N.A	17.6	4.5	0.0%
	2.0 ppm	N.A	N.A	16.4	4.5	0.0%	N.A	N.A	17.5	4.5	0.0%	N.A	N.A	17.1	4.5	0.0%
	2.5 ppm	N.A	N.A	16.3	4.4	0.0%	N.A	N.A	17.2	4.5	0.0%	N.A	N.A	17.4	4.5	0.0%
T8	Control	13.50 %	4.63%	12.5	4.5	3.7%	13.50 %	4.25%	13.0	4.5	4.7%	13.50 %	4.25%	14.4	4.5	5.4%
	1.5 ppm	N.A	5.56%	14.4	4.5	3.6%	N.A	5.52%	13.4	4.5	4.2%	N.A	5.52%	14.8	4.5	4.8%
	2.0 ppm	N.A	5.56%	13.1	4.5	3.7%	N.A	4.60%	13.4	4.5	4.2%	N.A	5.52%	14.3	4.5	4.5%
	2.5 ppm	N.A	5.56%	14.7	4.5	3.6%	N.A	4.25%	13.0	4.5	4.3%	N.A	4.60%	14.4	4.5	4.4%
T24	Control	13.50 %	0.53%	8.8	4.5	8.4%	13.50 %	1.06%	10.0	4.5	10.0%	13.50 %	1.78%	11.0	4.5	9.0%
	1.5 ppm	N.A	0.53%	9.4	4.5	8.4%	N.A	0.97%	10.4	4.5	9.9%	N.A	1.58%	11.8	4.5	8.6%
	2.0 ppm	N.A	0.53%	9.5	4.5	8.3%	N.A	1.06%	10.6	4.4	8.7%	N.A	1.84%	11.2	4.5	8.4%
	2.5 ppm	N.A	0.53%	9.6	4.4	8.2%	N.A	1.08%	10.0	4.5	8.8%	N.A	1.72%	11.8	4.5	7.9%
T48	Control	13.50 %	0.44%	8.6	4.5	8.5%	13.50 %	0.46%	9.0	4.5	10.7%	13.50 %	0.69%	8.7	4.5	10.6%
	1.5 ppm	N.A	0.44%	9.2	4.5	8.4%	N.A	0.47%	9.4	4.5	10.2%	N.A	0.71%	8.6	4.5	10.3%
	2.0 ppm	N.A	0.50%	9.4	4.4	8.4%	N.A	0.55%	9.3	4.5	9.8%	N.A	0.70%	8.9	4.5	10.2%
	2.5 ppm	N.A	0.53%	9.5	4.4	8.2%	N.A	0.52%	9.1	4.5	9.4%	N.A	0.75%	8.8	4.4	9.7%

Ensayo que no aplica: N.A, Azúcar Fer: Azúcar fermentable

Tabla 37. Balance de fermentación.

PREPARACIÓN DEL MEDIO GENERAL		(Se prepara para las dos fases)
Brix mezcla (Medio preparado)		61,80
Azúcares fermentables (Medio)		51,93
PREPARACIÓN DEL MEDIO PARA PROPAGACIÓN		
Volumen de medio	ml	1.000,00
MEZCLA	ml	154,05
Brix final	%	9,52
Azúcares Fermentables	%	8,00
PREPARACIÓN DE MUESTRA PARA ENSAYO PROPAGACIÓN		
MUESTRA PARA ENSAYO	ml	1.000,00
VOLUMEN DE MEDIO PARA EL ENSAYO	ml	800,00
VOLUEN DE INÓCULO	ml	200,00
Brix mezcla (Medio preparado)	%	9,52
Azúcares fermentables Medio	%	6,40
Densidad de la mezcla	mg/ml	1,037
Azúcares fermentables disponibles	mg	5.309,13
SOLIDOS SUSPENDIDOS INICIAL	%	
SOLIDOS SUSPENDIDOS FINAL	%	
BIOMASA/AZUCAR	% w/w	
FERMENTACIÓN		
Volumen de medio	ml	1.000,0
PREPARACIÓN DE MUESTRA PARA ENSAYO FERMENTACIÓN		
MUESTRA PARA ENSAYO		1.000

VOLUMEN DE INÒCULO	%	100
Brix mezcla (Medio preparado)	%	61,80
Azucres fermentables (Medio)	%	51,93
Densidad de la mezcla	mg/ml	1,2996
Alimento	ml	260,00
Alimento	mg	337,90
% VINAZA EN EL AGUA DILUCIÓN	%	54,00
Vinaza Recirculación	ml	345,60
Agua	ml	294,40
Brix mezcla Final	%	16,17
Azucres fermentables Final	%	13,50
Azúcares fermentables disponibles	mg	175,47
Eficiencias fermentación	Kg/Kg	0,890
Relación estequiom. azúcar/alcohol	Kg/Lit	1,96
Densidad alcohol 100%	ml	0,793
Producción de alcohol	Lit	100,66
Concentración alcohol - esperada	%	10,07%

Tabla 38. Cronograma de actividades realizadas en la planta de destilería de Mayagüez S.A.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES																
Actividades	Meses	MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO		
	Semanas	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	22	23
1. Inducción en laboratorio de Microbiología y fisicoquímicas																
2. Análisis de rutina del laboratorio de microbiología y fisicoquímica en Destilería																
4. Evaluación de antibióticos																
5. Aislamiento y caracterización de bacterias contaminantes de materias primas (Miel B)																
6. Banco de conservación de bacterias ácido laticas y acéticas aisladas del sistema fermentativo																
Observaciones: Ninguna					Elaboro: Leidy Albiarez					Aprobó: Liliana Acosta						

