

Universidad Católica de Santa María
Escuela de Postgrado
Maestría en Planificación y Gestión Ambiental



**“EFECTO DEL pH Y LA INMOVILIZACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae* EN EL
TRATAMIENTO POR FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA SOBRE LAS
CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE UNA BEBIDA GASEOSA DE
DESCARTE”**

Tesis presentada por la Bachiller:

Córdova Barrios, Cinthia Cárol

Para optar el Grado académico de:

**Maestro en Planificación y
Gestión ambiental**

Asesor:

PhD. Cárdenas García, Jaime

Arequipa – Perú

2020

DEDICATORIA

Lo más importante que aprendí a través de la tesis, es que la distancia entre un sueño y la realidad se llama disciplina.

Agradezco a Dios por ser mi fortaleza, la fuerza necesaria para continuar luchando día tras día y seguir adelante.

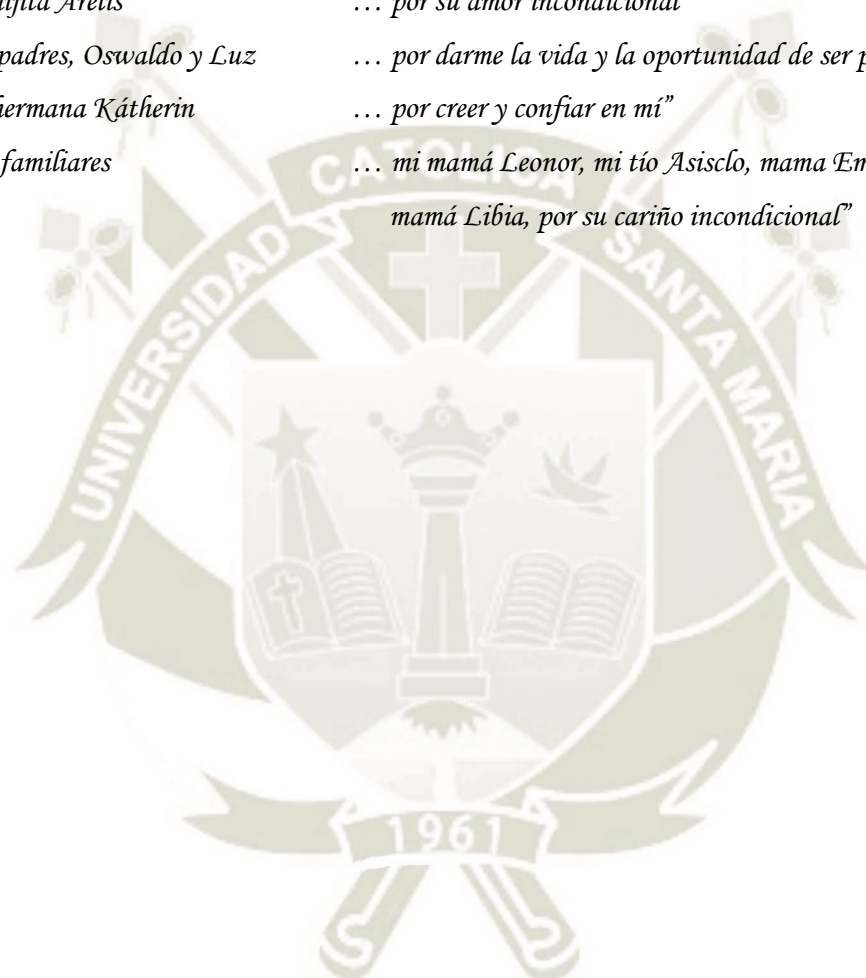
“A mi esposo ... por su comprensión, motivación y apoyo constante”

“A mi hijita Arelis ... por su amor incondicional”

“A mis padres, Oswaldo y Luz ... por darme la vida y la oportunidad de ser profesional”

“A mi hermana Kátherin ... por creer y confiar en mí”

“A mis familiares ... mi mamá Leonor, mi tío Asisclo, mama Emilia, papa Estilo y mamá Libia, por su cariño incondicional”



AGRADECIMIENTOS

En esta página quiero expresar mi profundo agradecimiento y gratitud a:

A mi esposo Maickool, por su comprensión, paciencia y apoyo constante.

A mi hijita Arelis, por su alegría, cariño y ser mi motivación.

A mis queridos padres, Oswaldo y Luz, por enseñarme el amor al estudio y ser un ejemplo.

A mi hermana Kátherin, por su compañía y palabras de aliento.

A mi mamá Leonor, mi tío Asisclo, mama Emilia, papa Estilo y mama Libia, por su cariño incondicional

A mis queridas tías, Norma y Eli, por su cariño y apoyo.

Al Dr. Jaime Cárdenas, por sus valiosos consejos y apoyo constante.

Al Dr. Alberto Briceño, por su confianza y por contribuir a mi empeño.

Al Dr. José Villanueva, por su amistad, apoyo y confianza

Al Dr. Cesar Bernabé, por su confianza y motivación.

A la Dra. Jannet Escobedo, por sus aportes y gentileza.

A mis amigas, Lilitiana, Elizabeth e Irma, por sus consejos.

A mis estimados alumnos, por su estímulo a la superación constante.

A la Universidad Católica de Santa María y en especial a mi facultad, por brindarme la oportunidad de formar parte de ella.

...y a todos aquellos que hicieron posible la realización del presente trabajo de investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

Muchas Gracias



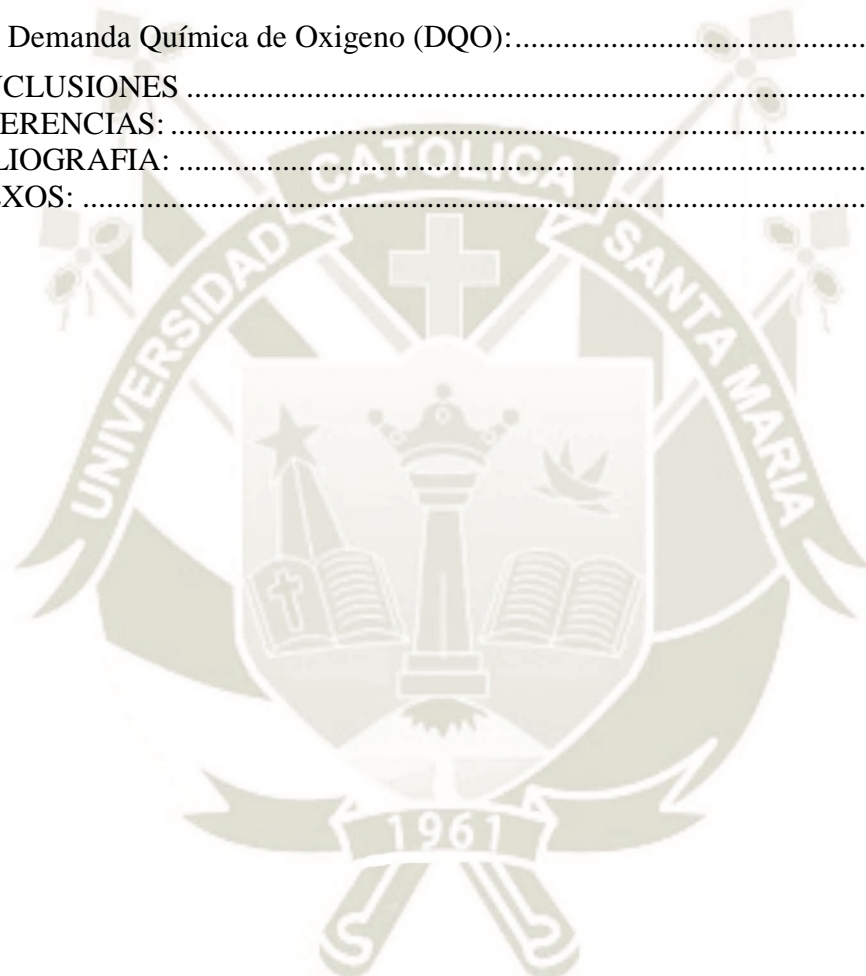
“Sé el cambio que quieres ver en el mundo”

Mahatma Gandhi

INDICE

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS:	4
CAPÍTULO I.....	5
MARCO TEÓRICO:.....	5
1.1 Tratamiento de efluentes industriales:	5
1.2 Remoción del color, carbohidratos y la DQO:	9
1.3 Biorremediación:.....	10
1.4 Bebidas carbonatadas:	13
1.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> :.....	21
1.6 Inmovilización:	23
1.7 Fermentación alcohólica:	26
1.8 Bioetanol:	29
1.9 Métodos experimentales:	31
CAPÍTULO II	34
METODOLOGÍA	34
2.1 LUGAR DE EJECUCION:.....	34
2.2 MATERIALES:	34
2.3 MÉTODOS:	36
2.3.1 Adquisición de la muestra:.....	36
2.3.2 Caracterización fisicoquímicamente de la bebida gaseosa de descarte:	36
2.3.3 Inmovilización de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en Alginato de calcio:	41
2.3.4 Evaluación del efecto del pH y la inmovilización de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la fermentación alcohólica de la bebida gaseosa de descarte:	41
2.3.5 Evaluación de la remoción de color y Demanda Química de Oxígeno (DQO) en la bebida gaseosa de descarte tratada por fermentación alcohólica:	44
2.3.6 Análisis estadístico:.....	44
CAPÍTULO III.....	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
3.1 Caracterización fisicoquímicamente de la bebida gaseosa de descarte:	45
3.2 Inmovilización de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en Alginato de calcio:	50
3.3 Evaluación del efecto del pH y la inmovilización de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la fermentación alcohólica de la bebida gaseosa de descarte:	52
3.3.1 Fermentación alcohólica de las bebidas gaseosas de descarte:	52
3.3.2 Determinación del pH durante la fermentación alcohólica de la bebida gaseosa de descarte:.....	54

3.3.3 Contenido de azúcares disueltos o °Brix durante la fermentación alcohólica de la bebida gaseosa de descarte:.....	58
3.3.4 Contenido de azúcares reductores por el método del DNS (Ácido 3,5 dinitrosalicílico) durante la fermentación alcohólica de la bebida gaseosa de descarte: ..	59
3.3.5 Concentración de bioetanol por el método enzimático durante la fermentación alcohólica de la bebida gaseosa de descarte:.....	66
3.4 Evaluación de la remoción de color y Demanda Química de Oxígeno (DQO) en la bebida gaseosa tratada por fermentación alcohólica:	70
3.4.1 Remoción de Color:	70
3.4.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO):.....	74
CONCLUSIONES	76
SUGERENCIAS:	77
BIBLIOGRAFIA:	78
ANEXOS:	83



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Requisitos fisicoquímicos de las aguas gaseosas con sabor.....	15
Tabla 1.2: Niveles máximos de conservantes permitidos según la Directiva Europea 95/2/EC.....	18
Tabla 1.3: Conservantes y sus sales.....	18
Tabla 1.4: Colorantes artificiales comúnmente utilizados.....	20
Tabla 1.5: Colorantes artificiales (sintéticos) permitidos en bebidas no alcohólicas.....	20
Tabla 1.6: Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
Tabla 2.1: Diluciones de glucosa a partir de una Solución stock de glucosa 50 mM	38
Tabla 2.2: Dilución de la muestra según la concentración estimada de etanol	39
Tabla 2.3: Ensayo para la cuantificación de etanol	40
Tabla 2.4: Tratamientos en la fermentación alcohólica de la bebida gaseosa de descarte con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
Tabla 3.1: Información nutricional de la bebida gaseosa de descarte seleccionada	45
Tabla 3.2: Análisis fisicoquímico de la bebida gaseosa de descarte en el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María	46
Tabla 3.3: Caracterización fisicoquímica de la bebida gaseosa de descarte	48
Tabla 3.4: Registro del pH durante la fermentación alcohólica de los tratamientos de la bebida gaseosa de descarte	55
Tabla 3.5: Registro del contenido de azúcares disueltos o °Brix durante la fermentación alcohólica de los tratamientos de la bebida gaseosa de descarte	58
Tabla 3.6: Descripción de los datos para la recta de calibración del método del DNS	60
Tabla 3.7: Contenido de azúcares reductores por el método del DNS durante la fermentación alcohólica de los tratamientos de la bebida gaseosa de descarte.....	62
Tabla 3.8: Relación entre el origen de las variaciones, los grados libertad, la suma de cuadrados y promedio de cuadrados.....	64
Tabla 3.9: Concentración de bioetanol (g/L) durante la fermentación alcohólica de los tratamientos de la bebida gaseosa de descarte	66
Tabla 3.10: Relación entre el origen de las variaciones, los grados libertad, la suma de cuadrados y promedio de cuadrados.....	68
Tabla 3.11: Registro del color de la bebida gaseosa de descarte antes y después de la fermentación alcohólica de los tratamientos	71
Tabla 3.12: Relación entre el origen de las variaciones, los grados libertad, la suma de cuadrados y promedio de cuadrados.....	72
Tabla 3.13: Registro de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) de la bebida gaseosa de descarte antes y después de la fermentación alcohólica de los tratamientos	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Tipos de Inmovilización celular.....	24
Figura 1.2: (a) Biorreactor tipo Tanque agitado (b) Biorreactor lecho compacto.....	26
Figura 1.3: Vía metabólica para la obtención de etanol	27
Figura 2.1: Dimensiones según la norma DIN	42
Figura 3.1: Registro del pH en la bebida la bebida gaseosa de descarte	48
Figura 3.2: Registro del contenido de azúcares disueltos o °Brix en la bebida gaseosa amarilla.....	49
Figura 3.3: Levaduras inmovilizadas en Alginato de calcio	50
Figura 3.4: Biorreactores configurados para la fermentación de la bebida gaseosa de descarte.....	53
Figura 3.5: pH durante la fermentación alcohólica de los tratamientos de la bebida gaseosa de descarte	56
Figura 3.6: Contenido de azúcares disueltos o °Brix durante la fermentación alcohólica de los tratamientos de la bebida gaseosa de descarte	59
Figura 3.7: Recta de calibración para el estándar de glucosa.....	61
Figura 3.8: Concentración de glucosa (g/L) durante la fermentación alcohólica de los tratamientos de la bebida gaseosa de descarte.....	63
Figura 3.9: Comparación de la concentración de glucosa (g/L) restante en los tratamientos	63
Figura 3.10: Matriz de relación entre tratamientos.....	65
Figura 3.11: Concentración de bioetanol (g/L) durante la fermentación alcohólica de los tratamientos de la bebida gaseosa de descarte.....	67
Figura 3.12: Comparación de la concentración de bioetanol (g/L) en los tratamientos	67
Figura 3.13: Comparación de la Remoción del color (%) en los tratamientos.....	71
Figura 3.14: Matriz de relación entre tratamientos.....	73
Figura 3.15: Comparación de la Remoción de la DQO (%) en los tratamientos	74

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto del pH y la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación alcohólica de los azúcares contenidos en una bebida gaseosa de descarte, para la obtención de bioetanol; así como la remoción de color y la determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO).

Se caracterizó fisicoquímicamente la bebida gaseosa de descarte seleccionada, luego se inmovilizó *Saccharomyces cerevisiae* en Alginato de calcio por el método de atrapamiento. Para la fermentación alcohólica, una muestra de la bebida gaseosa de descarte fue acondicionada, es decir desgasificada, esterilizada y su pH ajustado a 4 o 5, según el tratamiento; luego depositada en un Biorreactor tipo tanque agitado de 1.4 L configurado según la norma DIN 28131. Cada Biorreactor inoculado con *Saccharomyces cerevisiae* con y sin inmovilización se mantuvo en condiciones anaeróbicas, temperatura ambiente y agitación lenta (80 rpm) durante 16 horas. La bebida gaseosa de descarte se caracterizó en cuanto a: pH igual a 2.5, 10 °Brix o azúcares disueltos, 15.68 g/L de glucosa por el método del DNS y una concentración de etanol igual a 0.062 g/L por el método enzimático.

Se inmovilizó 10 g de *Saccharomyces cerevisiae* en Alginato de sodio, al 1 y 2%, obteniéndose aproximadamente 250 mL de perlas uniformes de 2 mm de diámetro, de color crema y consistencia blanda a una concentración al 2%. Mientras, se obtuvieron esferas indefinidas a una concentración al 1%.

En la caracterización fisicoquímica durante la fermentación alcohólica, el pH descendió paulatinamente en todos los tratamientos hasta un valor promedio igual a 3. El contenido de azúcares disueltos o °Brix, así como la concentración de glucosa disminuyó progresivamente, principalmente en el tratamiento acondicionado a un pH 4 sin inmovilización, hasta aproximadamente 3.1 °Brix y una concentración de glucosa restante igual a 2.47 g/L. La mayor concentración de bioetanol se produjo en el tratamiento acondicionado a pH 4 sin inmovilización, mientras que el tratamiento acondicionado a pH 5 con inmovilización produjo la menor concentración de bioetanol. Asimismo, se logró la remoción del color de la bebida gaseosa de descarte en un 70.6 % y una reducción de la DQO en un 54 % con el tratamiento acondicionado a pH 4 sin inmovilización.

Con base en estos resultados se puede señalar que es posible emplear bebidas gaseosas de descarte como sustrato fermentable para *Saccharomyces cerevisiae*.

Palabras Clave: Bebida gaseosa de descarte, *Saccharomyces cerevisiae*, pH, inmovilización, azúcares reductores, bioetanol, color, DQO.

ABSTRACT

In this research work, the effect of pH and the immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on the alcoholic fermentation of the sugars contained in a discarded soft drink was evaluated, in order to obtain bioethanol; as well as the removal of color and the determination of the Chemical Oxygen Demand (COD).

The selected discarded soft drink was physicochemically characterized, then *Saccharomyces cerevisiae* was immobilized in calcium alginate by the entrapment method. For alcoholic fermentation, a sample of the discarded soft drink was conditioned, that is to say degassed, sterilized and its pH adjusted to 4 or 5, depending on the treatment; then deposited in a 1.4 L stirred tank bioreactor configured according to DIN 28131. Each bioreactor inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* with and without immobilization was maintained under anaerobic conditions, ambient temperature and slow agitation (80 rpm) for 16 hours. The discarded soft drink was characterized in terms of: pH equal to 2.5, 10 ° Brix or dissolved sugars, 15.68 g/L glucose by the DNS method and an ethanol concentration equal to 0.062 g/L by the enzymatic method.

10 g of *Saccharomyces cerevisiae* were immobilized in 1% and 2% sodium alginate, obtaining approximately 250 mL of uniform pearls of 2 mm in diameter, cream colored and soft consistency at a concentration of 2%. Meanwhile, undefined spheres were obtained at a concentration of 1%.

In physicochemical characterization during alcoholic fermentation, the pH gradually decreased in all treatments to an average value equal to 3. The content of dissolved sugars or °Brix, as well as the concentration of glucose decreased progressively, mainly in the treatment conditioned at a pH 4 without immobilization, up to approximately 3.1 °Brix and a remaining glucose concentration equal to 2.47 g/L. The highest concentration of bioethanol occurred in the treatment conditioned at pH 4 without immobilization, while the treatment conditioned at pH 5 with immobilization produced the lowest concentration of bioethanol. Likewise, the removal of the color of the discarded soft drink by 70.6% and a COD reduction by 54% was achieved with the treatment conditioned at pH 4 without immobilization.

Based on these results, it can be noted that it is possible to use discarded soft drinks as a fermentable substrate for *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: *discarded soft drink, Saccharomyces cerevisiae, pH, immobilization, reducing sugars, bioethanol, color, COD.*

INTRODUCCIÓN

Según Euromonitor ¹, en el balance del consumo per cápita y del crecimiento de ventas de diversas categorías de bebidas no alcohólicas entre 2012 y 2017, se incrementó la venta de bebidas no alcohólicas como bebidas gaseosas, energizantes, jugos y té verde. La venta de bebidas gaseosas creció un 16%, el consumo per cápita pasó de 47.4 litros en 2012 a 51.5 en 2017 (+9%). Las marcas más vendidas, fueron Coca-Cola, Inka Kola y Kola Real.

Aun cuando las bebidas gaseosas siguen dominando el mercado global de bebidas, su cuota de mercado está disminuyendo, esto a consecuencia del rápido crecimiento en volúmenes de consumo de las bebidas funcionales y el agua mineral embotellada ². Una porción de las bebidas producidas (2-5%) se descarta durante el proceso de embotellado debido a políticas de calidad, o son devueltas del mercado ³.

La no conformidad de los parámetros normados para estas bebidas no alcohólicas es la principal causa de su descarte ². Este descarte se origina por diferentes factores como: niveles inadecuados de gas en la botella, deficiente sellado del envase, renovar el lote ⁴, el cumplimiento de la fecha de caducidad, fallas en el envasado y errores en el etiquetado ².

Los desechos de bebidas son una fuente importante de sustrato orgánico en áreas metropolitanas ⁵. Las bebidas residuales como gaseosas, consisten principalmente de agua con aproximadamente 10-12% p/v de carbono disuelto, principalmente en forma de azúcar ⁶. El volumen de residuos de bebidas producidos anualmente es enorme. Alrededor de 4500 millones m³/año de residuos de bebidas se produce en Argentina, mientras que en el Reino Unido, se estima que 200000 millones de m³ de los residuos de bebidas en el 2012 ^{6, 7}. No se informa la cantidad de desechos, pero puede alcanzar al menos el 1% con un rango estacional entre 1 y 3% de las cantidades totales producidas en esta industria ⁸.

La eliminación de los residuos de producción de bebidas normalmente implica la dilución en aguas residuales municipales ⁵.

El contenido de azúcar de estas bebidas (60-150 g/L) confiere a los efluentes resultantes una alta demanda química de oxígeno (DQO), que puede alcanzar niveles de aproximadamente 150000 mg de O₂/L ³, además de una pérdida en el potencial de energía recuperable que puede resultar en contaminación ambiental ⁵. Por lo tanto, los efluentes deben ser tratados antes de su descarga al medio ambiente. Los tratamientos convencionales implican procesos anaeróbicos con altos tiempos de residencia y la

cantidad de efluente depende de la naturaleza estacional de la producción y consumo de bebidas no alcohólicas ³.

En consecuencia, es de interés emplear microorganismos capaces de usar estos desechos como fuente energética en procesos fermentativos, tales como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual es capaz de metabolizar azúcares simples y adicionalmente reducir los costos derivados del manejo de estos residuos, disminuyendo el impacto ambiental de los mismos ².

Además, es necesario identificar sustratos baratos y renovables, para su uso como sustratos fermentables en la producción de biocombustibles como Bioetanol ^{6,9}.

Las bebidas gaseosas de descarte contienen azúcar que puede ser transformada en alcohol mediante un proceso de fermentación alcohólica ⁴. Por lo tanto, las bebidas carbonatadas como sustratos no convencionales constituyen una fuente de azúcares para la producción de Bioetanol ⁹.

El bioetanol se puede rectificar para producir un producto de calidad alimentaria o puede ser deshidratado para su uso como biocombustible ³. El bioetanol es un combustible ideal para sustituir a la gasolina y la producción de etanol por fermentación ha recibido especial atención porque la crisis energética mundial ha aumentado el interés en fuentes de energía renovable ¹⁰.

El CO₂ producido, también es un producto con valor agregado, entre otros usos, es una materia prima importante para la industria de bebidas carbonatadas, donde se agrega para obtener una concentración de CO₂ disuelto en refrescos en el rango de 5-10 g/L ³.

Además, las bebidas no alcohólicas descartadas pueden emplearse en procesos fermentativos para la obtención de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* ², la cual no debe considerarse como un material de desecho porque se usa levadura en formulaciones de alimentos para animales ³.

Es por ello, que el presente trabajo de investigación pretende evaluar un proceso de tratamiento alternativo que comprende la fermentación alcohólica de los azúcares contenidos en una bebida gaseosa de descarte utilizando *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención de etanol; así como la remoción de color y la determinación de la Demanda Química de Oxígeno, considerando el efecto del pH en el proceso de fermentación y la actividad del conservante; así como la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* en Alginato de calcio para conservar la viabilidad celular de la levadura.

HIPÓTESIS

Si la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de metabolizar azúcares simples, es posible el tratamiento por fermentación alcohólica de los azúcares contenidos en una bebida gaseosa de descarte, evaluando el pH y la inmovilización de la levadura sobre el contenido de azúcares reductores, concentración de etanol, remoción de color y la Demanda Química de oxígeno.



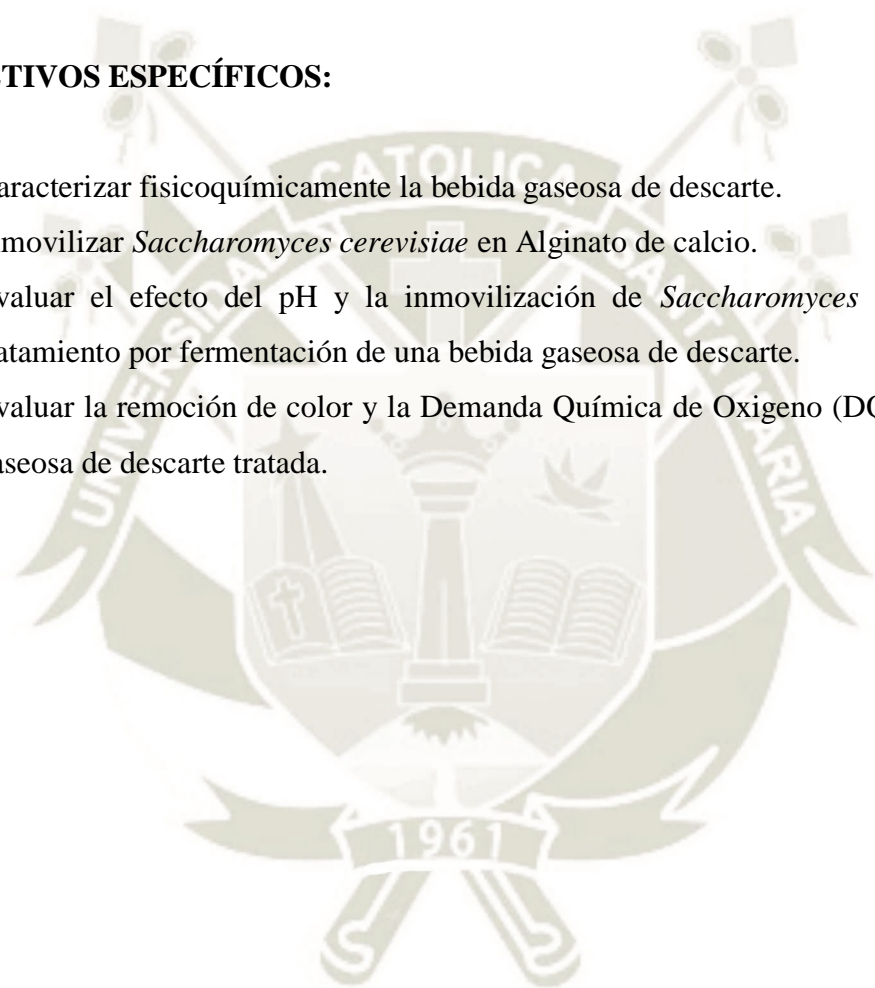
OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto del pH y la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* en el tratamiento por fermentación alcohólica sobre las características fisicoquímicas de una bebida gaseosa de descarte

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Caracterizar fisicoquímicamente la bebida gaseosa de descarte.
2. Inmovilizar *Saccharomyces cerevisiae* en Alginato de calcio.
3. Evaluar el efecto del pH y la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* en el tratamiento por fermentación de una bebida gaseosa de descarte.
4. Evaluar la remoción de color y la Demanda Química de Oxígeno (DQO) en la bebida gaseosa de descarte tratada.



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO:

1.1 Tratamiento de efluentes industriales:

A lo largo de las cuatro últimas décadas, el tema ambiental ha despertado un gran interés en la sociedad. El consumidor se vuelve cada día más consciente de que el consumo de productos manufacturados y el uso de servicios afectan la calidad del medio ambiente y ocasionan en general una reducción de los recursos naturales. Además, es de conocimiento general que estos efectos ocurren a lo largo de todo el ciclo de vida de un producto, y que incluye no sólo los procesos productivos inherentes a la producción, sino también, actividades de consumo o utilización y disposición final del mismo, en forma de residuo ¹¹.

Las diversas actividades del hombre producen importantes residuos industriales y domésticos que son vertidos a los cuerpos de agua ocasionando graves problemas de contaminación ¹².

El deterioro ambiental que cada día se agudiza como consecuencia del desarrollo de actividades humanas sin cuidado por el medio ambiente, pone cada vez retos más importantes en áreas de la ciencia como la ingeniería ambiental. Uno de estos retos es la depuración de las aguas residuales ¹³.

El tratamiento de las aguas residuales es una práctica que, si bien se lleva realizando desde la antigüedad, hoy por hoy resulta algo fundamental para mantener nuestra calidad de vida. Son muchas las técnicas de tratamiento con larga tradición y, evidentemente, se ha mejorado mucho en el conocimiento y diseño de las mismas a lo largo de los años. Pero no por eso han dejado de ser técnicas imprescindibles a la hora de tratar aguas industriales. Una de las formas más utilizadas es en función de los contaminantes presentes en el agua residual, o también en función del fundamento del tratamiento (químico, físico o biológico). Una forma de intentar aunar ambas formas de clasificación puede considerar que los contaminantes en el agua pueden estar como materia en suspensión, materia coloidal o materia disuelta ¹¹.

Entre la variedad de sustancias contaminantes descargadas, es posible relacionar desde metales pesados, compuestos, hidrocarburos, materia orgánica, hasta compuestos que producen la coloración de los efluentes ¹³.

La palabra efluente deriva del latín *effluente* que significa que emana o que fluye; son todos los residuos fluidos (líquidos y gaseosos) provenientes de las diversas actividades humanas, cuando son desechados en el medio ambiente. Los efluentes industriales son las descargas residuales derivadas de los procesos industriales, como así también los vertidos originados por distintos usos del agua industrial. Los efluentes industriales son portadores de sustancias que pueden interferir seriamente en el proceso biológico natural de autodepuración en el cuerpo receptor ¹¹.

Las aguas industriales contienen sustancias disueltas y en suspensión. Dentro de las sustancias disueltas hay elementos orgánicos que pueden ser biodegradables o no biodegradables, y/o elementos inorgánicos; como también elementos tóxicos. En los materiales en suspensión también puede haber sustancias orgánicas y /o sustancias inorgánicas. Debido a la gran diversidad de composiciones de las aguas residuales, que dependen del tipo de proceso industrial en el cual se regeneran y de las materias primas e insumos utilizados, se hace imprescindible la caracterización de dichas aguas y la cuantificación volumétrica. Para determinar la calidad del líquido, es preciso realizar análisis fisicoquímicos y biológicos ¹¹.

Los parámetros físicos de la calidad del agua definen las características del agua que responden a los sentidos de la vista, el tacto, gusto y olfato como, por ejemplo: los sólidos suspendidos, turbiedad, color, sabor, olor y temperatura. Los parámetros químicos de la calidad del agua están relacionados con la capacidad del agua para disolver diversas sustancias entre las que podemos mencionar a los sólidos disueltos totales, alcalinidad, dureza, fluoruros, metales, materia orgánica y nutriente. Mientras que los parámetros biológicos de la calidad del agua están relacionados a la presencia o ausencia de especies biológicas diversas que llevan a cabo su ciclo vital, desde el organismo unicelular hasta especies de gran tamaño ¹⁴.

Los efluentes industriales vertidos al medio ambiente provocan diferente impacto sobre éste en función de su naturaleza. En este sentido depende de los sólidos en suspensión, carga iónica, toxicidad y color. El color, pocas veces considerado una forma de contaminación a pesar de los daños que provoca, puede estar asociado a la presencia de compuestos tóxicos y grupos cromóforos o polímeros de alto peso molecular como la lignina. Durante el tratamiento de un residuo coloreado se debe prestar atención a la reducción o eliminación del color, contribuyendo de esta forma a reducir el impacto sobre los ecosistemas donde son vertidos ¹⁵.

El impacto ambiental generado por la industria de las bebidas gaseosas se caracteriza por no ser significativo respecto a los residuos sólidos y prácticamente nulos respecto a los de tipo gaseoso; el impacto ambiental de esta industria radica en los efluentes ¹⁶. Entre los parámetros más importantes a evaluar se considera:

Color:

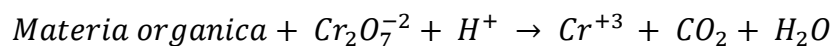
Las sustancias que producen la coloración de las aguas residuales, pueden ser agrupadas en dos categorías: compuestos de origen sintético y compuestos naturales. Los colorantes sintéticos presentan propiedades únicas como su alta solidez en medio húmedo, generación de tonos brillantes en las superficies y su relativo bajo costo de producción, además de su buena solubilidad, resistencia a la luz solar, al contacto con el agua y al ataque de una variedad de compuestos químicos, por lo cual resultan atractivas para las industrias textiles, de cueros, imprenta y pinturas. Los colorantes naturales se presentan en menor proporción a los sintéticos. Generalmente son polímeros con una amplia variedad de grupos funcionales y estructuras químicas orgánicas complejas (como ciclos y grupos aromáticos) que pueden afectar también los ecosistemas acuáticos y la salud humana ¹³.

Carbohidratos:

Grupo de compuestos de carbono, hidrogeno y oxígeno, en los cuales el hidrogeno y el oxígeno están en la misma relación que en el agua; muy comunes en agua residuales y en la industria de la madera, papel, textiles y alimentos. Incluye azúcares, almidones, celulosa y hemicelulosa ¹⁷.

Demanda química de oxígeno (DQO):

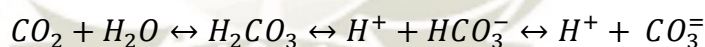
La Demanda química de oxígeno (DQO) se usa para medir el oxígeno equivalente a la materia oxidable químicamente mediante un agente químico oxidante fuerte, por lo general Dicromato de potasio, en un medio ácido y a alta temperatura. Para la oxidación de ciertos compuestos orgánicos resistentes se requiere la ayuda de un catalizador como el Sulfato de plata. Compuestos inorgánicos que interfieren con el ensayo, como los cloruros, pueden causar resultados erróneos de DQO. La interferencia por cloruros se elimina agregando Sulfato mercuríco para formar $HgCl_2$ y prevenir el consumo de Dicromato de potasio por el ion cloruro. La reacción principal puede representarse de la manera siguiente ¹⁷:

**Acidez:**

La acidez de un agua es su capacidad cuantitativa de neutralizar una base fuerte a un pH de 8.2. La titulación con NaOH mide la concentración de ácidos minerales como el ácido sulfúrico, de CO₂ disuelto y de sales de hidrolisis acida. La acidez se origina en la disolución de CO₂ atmosférico, en la oxidación biológica de la materia orgánica o en la descarga de aguas residuales industriales. Su efecto corrosivo en aguas residuales es de gran importancia, así como su posible efecto destructor o alterador de la flora y fauna de fuentes receptoras. Algunos residuos industriales, por su contenido de acidez mineral, pueden requerir pretratamiento de neutralización antes del tratamiento biológico ¹⁷.

Dióxido de carbono:

Generalmente proviene de la atmosfera y de la descomposición microbial de sustancias orgánicas; disuelto en el agua reacciona para formar ácido carbónico. Cuando el pH del agua es mayor de 4.5 el ácido carbónico se ioniza para formar bicarbonato, el cual, a su vez, se transforma en carbonato cuando el pH es mayor de 8.3 ¹⁷.



Los requerimientos de la calidad del agua varían de acuerdo con el uso que se les vaya a dar, por ejemplo, para agricultura, pesca, propagación de vida silvestre, usos recreativos o industriales específicos o generación de energía. Algunas características del agua adecuadas para un fin pueden no serlo para otro. Es importante mencionar que no se debe confundir los requerimientos de la calidad del agua con los estándares de calidad del agua. Los primeros están basados en la experiencia del uso y los segundos son cantidades establecidas por instituciones gubernamentales. Los Índices de Calidad del Agua (ICA) se definen como la evaluación de su naturaleza química, física y biológica en relación con la calidad natural, los efectos humanos y usos posibles¹⁴.

Para simplificar la interpretación de los datos de su monitoreo, existen Índices de Calidad de Agua (ICA) e Índices de Contaminación (ICO), los cuales reducen una gran cantidad de parámetros a una expresión simple de fácil interpretación entre técnicos, administradores ambientales y el público en general ¹⁴.

1.2 Remoción del color, carbohidratos y la DQO:

Entre los sectores productivos más importantes que tienen presencia en el Área Metropolitana, se pudo establecer que los sectores que más impacto pueden ofrecer sobre cuerpos de agua en términos de vertimientos coloreados, tanto por su cantidad como calidad son: el sector textil, de alimentos y bebidas, curtiembres, productos químicos, etc.¹³.

Entre los procesos de tratamiento más utilizados en la actualidad para la remoción de colorantes y pigmentos presentes en aguas residuales, se destacan los sistemas de oxidación y mineralización avanzada, pertenecientes a la categoría de procesos químicos, estos comprenden: la reacción de Fenton (óptima para la decoloración de efluentes con presencia de colorantes y pigmentos), la ozonación (aplicada en estado gaseoso, la cual no incrementa el volumen de tratamiento) y la electrocoagulación, entre otras. Estas tecnologías producen en general, grandes volúmenes de lodos que podrían ser reducidos a partir de la implementación de reactores fotocatalíticos y la tecnología de ultrasonido (efectiva en el rompimiento de estructuras moleculares cíclicas, entre otras). Otro grupo de tecnologías apropiadas para la remoción de color, en particular de pigmentos, corresponde a los procesos físicos para el tratamiento de efluentes coloreados, entre ellos, los sistemas de filtración y los procesos de adsorción mediante el uso de materiales como carbón activado, residuos agroindustriales (viruta, aserrín, bagazo de caña, cascarilla de arroz, entre otros); los cuales pueden ser selectivos y óptimos para un grupo particular de colorantes ¹⁸. La biosorción surge como una estrategia innovadora, eficiente, económica y con impacto ambiental favorable. La biosorción es la captación de compuestos por medio de una biomasa (viva o muerta), a través de mecanismos fisicoquímicos como la adsorción o el intercambio iónico, involucrando una fase sólida (adsorbente) y una fase líquida (disolvente) que contiene las especies que van a ser adsorbidas (adsorbato). Algunas variables que influyen en la adsorción son: la relación adsorbente/disolución, el tamaño de partícula y el pH ¹⁹.

Los procesos biológicos aplicados en el tratamiento de colorantes y pigmentos se subdividen teniendo en cuenta el tipo de aceptor final de electrones, de esta manera se presentan procesos biológicos aerobios y anaerobios, cuyas desventajas se asocian a los grandes tiempos de operación requeridos para alcanzar tasas óptimas de remoción de color ¹⁸.

El proceso anaerobio o fermentación es la descomposición u oxidación de compuestos orgánicos, en ausencia de oxígeno libre, para obtener la energía requerida para el crecimiento y mantenimiento de los organismos anaerobios. Los carbohidratos contienen oxígeno que puede emplearse como aceptor de los electrones; una porción del carbohidrato es oxidado, en CO₂ y ácidos orgánicos mientras que otra porción es reducida en aldehídos, cetonas y alcoholes. En el tratamiento anaerobio se pueden considerar, por tanto, que ocurren los procesos básicos de la descomposición anaerobia, es decir, desnitrificación de nitratos, respiración de sulfatos, hidrolisis y fermentación acetogénica y metanogénica ¹⁷.

1.3 Biorremediación:

En las últimas décadas, la liberación de contaminantes al ambiente, producida principalmente como consecuencia del desarrollo industrial, ha superado con creces los mecanismos naturales de reciclaje y autodepuración de los ecosistemas receptores. Este hecho ha conducido a una evidente acumulación de contaminantes en los distintos ecosistemas hasta niveles preocupantes. Por ello, a fin de reducir en todo lo posible la liberación de contaminantes, hoy en día existe la necesidad de indagar en la búsqueda de procesos que aceleren la degradación de los contaminantes presentes en el ambiente. Así, se reducirían de forma progresiva los efectos perniciosos que producen sobre los ecosistemas y la salud humana. En este contexto, la biorremediación, proceso que utiliza las habilidades catalíticas de los organismos vivos para degradar y transformar contaminantes tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos, presenta un enorme potencial en la mitigación de la contaminación ambiental ²⁰.

Estos sistemas de descontaminación se basan en la digestión de las sustancias orgánicas por los microorganismos, de la cual obtienen la fuente de carbono necesaria para el crecimiento de sus células y una fuente de energía para llevar a cabo todas las funciones metabólicas que necesitan sus células para su crecimiento. Para que estos procesos metabólicos se lleven a cabo, y puedan ser utilizados como una técnica

remediativa, será necesario que existan en el medio unas condiciones fisicoquímicas óptimas ²¹.

La tecnología de la biorremediación basada en la utilización de los microorganismos y su potencial metabólico biodegradador para eliminar o transformar los contaminantes del medio en productos inocuos tiene ciertas ventajas respecto a los métodos fisicoquímicos tanto por su menor coste económico, como por la no afectación de otros compartimentos ambientales y la optimización de los recursos ²².

La biorremediación es un fenómeno común en la naturaleza cuando en un ambiente o ecosistema se produce una alteración del equilibrio, en este caso, los factores físicos y bióticos tratan de reponer el daño. Cabe remarcar que cuanto más diversidad biológica exista en un ecosistema con mayor eficiencia podrá autodepurarse. Las técnicas de biorremediación pueden ser clasificadas según el tratamiento y a la fase usada. Si el sitio permanece prácticamente inalterado durante el tratamiento y la biorremediación es *in situ*. En general existen dos estrategias para ayudar a un ecosistema a remediarse: La primera es agregar nutrientes de forma de estimular las poblaciones naturales y así aumentando su actividad y la segunda es introduciendo microorganismos exógenos dentro del ecosistema como forma de remediación. En este último caso con las nuevas técnicas de la ingeniería genética se pueden emplear microorganismos genéticamente modificados haciéndolos más eficientes en la biorremediación ²³.

La biorremediación se ha centrado en la explotación de la diversidad genética y versatilidad metabólica que caracteriza a las bacterias para transformar contaminantes en productos inocuos o, en su defecto, menos tóxicos, que pueden entonces integrarse en los ciclos biogeoquímicos naturales. No obstante, existen casos aislados de utilización de otros tipos de organismos como, por ejemplo, los hongos y, más recientemente, las plantas ²⁰.

El tratamiento biológico constituye una serie de importantes procesos de tratamiento que tienen en común la utilización de microorganismos para llevar a cabo la eliminación de componentes indeseables del agua, aprovechando la actividad metabólica de los mismos sobre esos componentes. La aplicación tradicional consiste en la eliminación de materia orgánica biodegradable, tanto soluble como coloidal, así como la eliminación de compuestos que contienen elementos nutrientes (N y P). Es uno de los tratamientos más habituales, no solo en el caso de aguas residuales urbanas, sino en buena parte de las aguas industriales. En la mayor parte de los casos, la materia orgánica constituye la fuente de energía y de carbono que necesitan los

microorganismos para su crecimiento ¹¹. La actividad metabólica de los microorganismos puede ser optimizada con la adición de co-sustratos o fuentes de carbono y energía secundarias ¹³.

Para la remoción de color, carbohidratos y la DQO, los procesos biológicos implementados, evalúan la influencia de factores como el modo de operación del reactor (*batch*, *feedbatch* o continuo), de variables como la temperatura del medio, el pH, la concentración inicial de colorante y la concentración de microorganismos, la adición de co-sustratos o fuentes de carbono y energía, además de la presencia de oxígeno en el sistema. Los tratamientos biológicos permiten obtener porcentajes de remoción de color y carbono orgánico total (COT) significativos, sin embargo, se realizan a bajas velocidades lo que incrementa sustancialmente los tiempos de tratamiento. En condiciones adecuadas, los organismos pueden reducir una diversidad de sustancias químicas recalcitrantes. La diversidad biológica hace posible encontrar enzimas y microorganismos especializados en la degradación de colorantes específicos. Entre los procesos aplicados para el tratamiento biológico de efluentes con presencia de colorantes y pigmentos, los tratamientos anaerobios producen una remoción de color y DQO entre el 80 y 100% en periodos que oscilan entre los 2 y 58 días ¹³.

Los reactores de flujo ascendentes de película fija (anaerobios) acoplados por sistemas de reactores aeróbicos pueden alcanzar cinéticas de remoción de color y DQO, superiores al 98 y 95% respectivamente, durante 16 horas de operación. La secuencia de tratamiento anaerobia - aerobia a partir de consorcios microbianos, presenta rendimientos en los valores de remoción de color, DQO y DBO sobre el 60, 80 y 90%, respectivamente, con la utilización de co-sustratos como almidón, glucosa y ácido acético y, en tiempos de residencia hidráulicos de 16 horas y 8 días ¹³.

El filtro anaerobio de flujo ascendente es un proceso de crecimiento adherido propuesto por Young y McCarty en 1969, para el tratamiento de residuos solubles. De los sistemas de tratamiento anaerobio es el más sencillo de mantener porque la biomasa permanece como una película microbial adherida y porque como el flujo es ascensional, el riesgo de taponamiento es mínimo. El filtro anaerobio está constituido por un tanque o columna, relleno con un medio sólido para soporte del crecimiento biológico anaeróbico ¹⁷.

1.4 Bebidas carbonatadas:

Las bebidas refrescantes nacieron con el fin de saciar la sed de manera placentera y agradable al paladar. Su origen es muy antiguo: los primeros refrescos conocidos se elaboraban a base de agua natural o aguas gaseosas naturales, que se combinaban con frutos y edulcorantes como la miel u otros jugos azucarados. Las primeras bebidas refrescantes fueron creadas por farmacéuticos. El primer paso que dio lugar a la elaboración de los refrescos modernos se produjo a finales del siglo XVIII, cuando comenzó a utilizarse el término “soda” para denominar a una bebida elaborada a partir de agua, bicarbonato sódico y anhídrido carbónico.²⁴

Las bebidas carbonatadas son, hoy en día, una de las bebidas más consumidas en todo el mundo. Se las conoce en diferentes países como gaseosa, refresco, refresco con gas, soda o *softdrink*.²⁵

En la actualidad, las bebidas refrescantes son, como desde sus orígenes, bebidas analcohólicas. La fórmula es, en apariencia, sencilla: el ingrediente básico de cualquier bebida refrescante es el agua, que puede estar carbonatada o no. A ella se le añade un jarabe o preparado básico que proporciona el sabor y que resulta de mezclar distintos componentes como azúcares, zumos de frutas y aromas. Además, dependiendo del tipo de refresco, pueden contener cafeína, quinina, vitaminas, minerales y edulcorantes sin calorías²⁴.

Bebida gasificada es una disolución de edulcorantes naturales y gas carbónico en agua tratada, pudiendo adicionarse esencias naturales o jugos artificiales, extractos vegetales, jugos de frutas, ácidos, colorantes y agentes conservadores permitidos. Las bebidas no alcohólicas carbonatadas, cuyo representante característico es la “gaseosa”, generalmente están azucaradas, aromatizadas, acidificadas, coloreadas, carbonatadas artificialmente, y a veces conservadas químicamente. Son bebidas compuestas por agua tratada, anhídrido carbónico (CO₂), azúcares y/o edulcorantes artificiales, saborizantes, colorantes y otros aditivos autorizados²⁶.

Según la Norma Técnica Peruana - NTP 241.001²⁷, define a la bebida gasificada jarabeada (bebida carbonatada) como el producto obtenido por disolución de edulcorantes nutritivos y dióxido de carbono en agua potable tratada, pudiendo estar adicionada de saborizantes naturales y/o artificiales, jugos de frutas, acidulantes, conservadores, emulsionantes y estabilizantes, antioxidantes, colorantes,

amortiguadores, agentes de enturbiamiento, antiespumantes y espumantes, u otros aditivos alimentarios permitidos por la Autoridad sanitaria ²⁷

La mayoría de las bebidas contienen agua carbonatada y acidulantes como el ácido fosfórico o el ácido cítrico, entre otros. La cantidad y características de los ácidos adicionados a las distintas bebidas determinan el sabor y la calidad de estas ²⁸

El agua mineral o soda deberá contener un mínimo de un volumen de gas absorbido en un volumen de agua. El volumen de gas, es el volumen dióxido de carbono (anhídrido carbónico) que absorbe el agua a la presión atmosférica normal (760 mmHg) y a temperatura de 15.56 °C ²⁵.

Agua: El agua es el componente mayoritario de las bebidas gaseosas, suponiendo el 90 al 92% del total ²⁵. Es el ingrediente principal usado en las bebidas carbonatadas, el cual debe ser de alta pureza ²⁹. Debe cumplir con los estrictos requisitos de calidad y no interferir con el sabor, la apariencia, la carbonatación u otras propiedades de la bebida ³⁰.

La calidad de agua empleada en la elaboración tiene una repercusión directa sobre la calidad del producto final, por lo que siempre se necesita someterla a un pretratamiento ²⁵.

La potabilidad del agua no es la única cualidad que ésta debe presentar para la elaboración de las bebidas refrescantes. De hecho, las industrias analizan el agua de entrada a la planta y, frecuentemente, la tratan con el fin de adecuar sus características a la fabricación de bebidas ²⁴

La naturaleza de este pretratamiento varía de acuerdo con la fuente del agua y con su composición química ²⁵.

En el agua tratada se debe remover cuatro tipos de contaminantes (material inorgánicos, compuestos orgánicos, contaminación microbiológica y partículas) que pueden afectar el sabor, olor y apariencia de la bebida final ²⁹.

Los principales tratamientos que experimenta el agua al llegar a la fábrica son la filtración (filtros de arena, filtros de carbón y filtros pulidores) y la desaireación. Esta última permite que la posterior carbonatación sea efectiva y evita que el aire ocluido en el agua deteriore la calidad sensorial de los productos por su oxidación. Otros tratamientos que suelen llevarse a cabo son la reducción de alcalinidad y la desinfección ²⁴.

Por lo tanto, el agua debe estar libre de altos niveles de elementos y sales minerales, material orgánico, oxígeno disuelto y microorganismos, además de no presentar color, olor ni sabor ³⁰.

Los requisitos fisicoquímicos de las aguas gaseosas se presentan en la Tabla 1.1

Tabla 1.1: Requisitos fisicoquímicos de las aguas gaseosas con sabor ²⁷

Características	Mínimo	Máximo
pH	2.4	4.5
Grado Brix (% de sólidos solubles como sacarosa).	8.0	15.0
Porcentaje de alcohol en volumen a 15.56 °C.	0	0.5
Volumen de Dióxido de carbono absorbido por cada volumen de agua.	1.0	5.0
Acidez expresada en g de ácido cítrico anhídrido en 100 cm ³ de muestra.	0.003	0.5

Edulcorantes: El azúcar es el disacárido sacarosa, que es el punto de referencia para otros tipos de edulcorantes ³⁰.

El término edulcorante se utiliza para los azúcares cuyo nivel suele ser del 7-12% en las bebidas carbonatadas ³⁰.

Los edulcorantes usados en las bebidas carbonatadas pueden ser o nutritivo o no nutritivo. La calidad del edulcorante es uno de los parámetros más importantes que afecta la calidad de la bebida ²⁹.

Edulcorantes nutritivos: Estos incluyen sacarosa granulada, sacarosa en solución, azúcar invertido, dextrosa y jarabe de maíz de alta fructosa. La sacarosa, obtenida a partir de caña de azúcar o remolacha, en presencia de ácidos y en solución acuosa, se hidroliza a fructosa (levulosa) y dextrosa (glucosa); esta mezcla se llama azúcar invertido. El jarabe de maíz de alta fructosa se deriva de almidón de maíz a través de un proceso que incluye la descomposición del almidón en glucosa, la conversión enzimática de glucosa en fructosa, la separación de los azúcares y mezcla de los

azúcares para producir diversas concentraciones de fructosa y glucosa. La elección de edulcorantes depende de la dulzura definitiva deseada y la formulación de la bebida en particular ²⁹.

Edulcorantes no nutritivos: En el caso de las bebidas de bajo contenido calórico, se reemplaza el azúcar del jarabe por edulcorantes intensos ²⁴, ingredientes no nutritivos de bajas o con cero calorías. Son compuestos químicos que endulzan muchas veces más que el azúcar ³¹, tales como: isomalta, manitol, sorbitol, sacarina ³², acesulfame de potasio, aspartamo y sucralosa ³¹.

Actualmente, el aspartamo, la sacarina, sucralosa y acesulfame son los únicos edulcorantes no nutritivos aprobados para su uso en bebidas por la *Food and Drug Administration* de EEUU. La sacarina era mezclada con sacarosa y usada en gaseosas durante la Primera Guerra Mundial, debido a la escasez de edulcorantes nutritivos, ésta es entre 300 y 400 veces más dulce que la sacarosa. El aspartamo es el primer edulcorante no nutritivo usado en las bebidas carbonatadas, y es aproximadamente 200 veces más dulce que la sacarosa. Algunas fuentes consideran al aspartame como un edulcorante nutritivo. La sucralosa (*Splenda*) es el edulcorante no nutritivo que más se asemeja al sabor de la sacarosa. Y el acesulfame se asemeja a la sacarina en estructura y perfil de sabor ²⁹.

Dióxido de carbono (CO₂): El dióxido de carbono ofrece a la bebida un sabor picante, ácido y espumoso. También actúa como conservante contra la levadura, el moho y las bacterias. Este debe ser de calidad alimentaria y libre de impurezas que pueden afectar el sabor o el olor del producto final ²⁹.

La unidad de medida del CO₂ disuelto es volúmenes del gas corregidos a la temperatura y presión normal (T = 0 °C y P = 101.325 kPa), por volumen de líquido. Más recientemente, se ha expresado como gramos por litro ³⁰.

La solubilidad del CO₂ en el agua varía en función de la temperatura del agua y la presión del gas. Disminuye con el aumento de la temperatura y aumenta con mayor presión ³⁰.

Las bebidas carbonatadas se formulan típicamente para estar en el rango de 2 a 3 volúmenes disueltos de gas. El efecto de la disolución es formar ácido carbónico (H₂CO₃), y esto a su vez se disocia en parte para formar iones de bicarbonato y carbonato ³⁰.

Aunque el dióxido de carbono no se agrega específicamente como conservante, contribuye a la inhibición del crecimiento de microorganismos y, junto con otros factores a la estabilidad de la bebida. Se considera efectivo en concentraciones superiores a 2.5-3.0 volúmenes, y por esta razón la incidencia de deterioro en las bebidas carbonatadas es menor que en las versiones no carbonatadas ³⁰.

El gas carbónico (CO₂) se almacena en forma líquida en tanques y antes de su utilización, se filtra para garantizar una calidad óptima. La preparación de la bebida terminada se realiza en un mezclador; éste combina el jarabe terminado, el agua tratada y el gas carbónico. En algunas plantas, el agua tratada es previamente carbonatada antes de mezclarse con el jarabe terminado ²⁴.

En ambos procesos de fabricación, se introduce el gas de dióxido de carbono bajo presión al sistema. La carbonatación de la bebida depende de la presión de dióxido de carbono y la temperatura de la mezcla. Las concentraciones de dióxido de carbono varían dependiendo de la formulación de la bebida ³⁰.

Conservantes: Es cualquier sustancia capaz de inhibir, retardar o detener el crecimiento de microorganismos o de enmascarar la evidencia de tal deterioro ³⁰. La NTP 214.00 autoriza el uso de sorbato y/o benzoato en una proporción no mayor del 0.1% en masa ²⁷.

El Benzoato de sodio o potasio a una concentración de 0.05% y un pH entre 2.0 y 4.0 es universalmente utilizado como agente conservante contra la levadura y el moho. Sin embargo, en concentraciones más altas, también es efectivo contra las bacterias ²⁹.

El Sorbato sódico o potásico; los conservantes son eficaces a valores de pH bajo; sin embargo, el Sorbato de potasio inhibe el crecimiento de levaduras y mohos; y es más efectivo por debajo de pH 6.5 ²⁹.

En Europa se ha definido los niveles máximos de conservantes permitidos. Para las bebidas no alcohólicas consumibles sin dilución, la directiva pertinente es la Directiva Europea No. 95/2 /EC ³⁰, tal como se muestra en la Tabla 1.2

Tabla 1.2: Niveles máximos de conservantes permitidos según la Directiva Europea 95/2/EC ³⁰

Conservantes	mg/L	E N°
Dióxido de azufre	20	E220
Ácido benzoico	150	E210
Ácido sórbico	300	E200
Ácido benzoico B/ Ácido sórbico	150/250	E210/E200

En la Tabla 1.3 se presenta los conservantes más utilizados con sus respectivas sales.

Tabla 1.3: Conservantes y sus sales ³⁰

Conservante	E-N°	Formas alternativas utilizadas en un nivel equivalente	E-N°
Ácido benzoico	E-210	Benzoato de sodio	E-211
C_6H_5COOH		Benzoato de potasio	E-212
Ácido benceno carboxílico		Benzoato de calcio	E-213
Punto de fusión: 122 °C			
Ácido sórbico	E-200	Sorbato de sodio	E-201
$CH_3CH=H_2-CH_2=CHCOOH$		Sorbato de potasio	E-202
Ácido 2,4-hexadienoico		Sorbato de calcio	E-203
Punto de fusión: 133 °C			
Dióxido de azufre (gas)	E-220	Sulfito de sodio	E-221
SO_2		Bisulfito de sodio	E-222
Anhídrido sulfuroso		Metabisulfito de sodio	E-223
		Metabisulfito de potasio	E-224
		Sulfito de calcio	E-226
		Bisulfito de calcio	E-227
		Bisulfito de potasio	E-228

La carbonatación y el contenido de ácido en bebidas de cola y lima-limón generalmente actúan como preservantes adecuados contra el crecimiento microbiano. Benzoato o sales de sorbato a menudo se agregan a otras bebidas para la protección ²⁹. Los conservadores que se disocian en solución acuosa deben su acción antimicrobiana a la parte no disociada, que es la que puede atravesar la membrana celular y desarrollar su actividad a nivel enzimático y a los hidrógenos liberados en la solución o alimento que provocan la disminución del pH. Este tipo de conservantes son más activos cuanto menor sea el pH del medio ³³.

Acidulantes: Los acidulantes le dan a la bebida un sabor agrio o amargo, ajustan el pH para facilitar la función del benzoato como conservante, reducen la susceptibilidad microbiológica y actúan como catalizadores para el proceso de inversión hidrolítica en bebidas endulzadas con sacarosa ²⁹. Los acidulantes pueden prevenir indirectamente la decoloración y rancidez ³⁰.

Los acidulantes de bebidas carbonatadas primarias son ácido fosfórico y ácido cítrico. El ácido fosfórico de grado alimenticio está disponible comercialmente en concentraciones de 75%, 80% y 85% y es uno de los acidulantes más económicos. El ácido cítrico se puede agregar durante el proceso de fabricación de jarabe como un polvo o como una solución al 50%. Otros acidulantes incluyen ácido ascórbico, tartárico, málico y adípico ²⁹.

Colorantes: El color proporciona un medio para presentar correctamente una bebida al consumidor, de modo que los atributos organolépticos percibidos se ordenan correctamente en una secuencia de apreciación. Tanto la calidad como la cantidad de color son importantes, y ciertos colores evocarán, o quizás complementarán, un sabor particular ³⁰.

Los colorantes se usan en bebidas para proporcionar atractivo sensorial. Se enumeran cinco colores artificiales aprobados por la FDA comúnmente utilizados en bebidas no alcohólicas ²⁹, tal como se observa en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4: Colorantes artificiales comúnmente utilizados ²⁹

Designación FD & C	Nombre común
Amarillo #5	Tartrazina
Amarillo #6	Amarillo crepúsculo
Rojo #40	Rojo Allura AC
Verde #3	Verde rápido FCF
Azul #1	Azul brillante FCF

Los colores de los alimentos se dividen ampliamente en dos clases: naturales y artificiales. En los EE.UU. Se enumeran como "exentos de certificación" o "colorantes certificados"³⁰. En la Tabla 1.5 se describen los colorantes artificiales (sintéticos) permitidos en bebidas no alcohólicas con un nivel máximo de 100 mg/L ³⁰.

Tabla 1.5: Colorantes artificiales (sintéticos) permitidos en bebidas no alcohólicas ³⁰

Colorante	E -N°	Contribución del color
Amarillo de quinoleína	E104	Amarillo verdoso
Tartrazina	E102	Amarillo limón
Amarillo crepusculo	E110	Naranja calabaza
Azorrubina	E122	Rojo azulado
Ponceau 4R	E124	Rojo brillante
Azul patentado V	E131	Azul brillante
Carmín de índigo	E132	Rojo oscuro azulado
Azul brillante	E133	Azul verdoso
Verde S	E142	Azul verdoso

Nota: Los niveles individuales de E110, E122 y E124 no deben exceder los 50 mg/L.

El ajuste del color también puede ser necesario para asegurar la uniformidad del producto y para compensar las variaciones naturales en el tono de color y la intensidad, asociados con el tipo de jugo empleado en la formulación de la bebida.

Sobre todo, el color es un parámetro importante en la evaluación de la calidad, que sirve para estandarizar el producto durante la producción ³⁰.

1.5 *Saccharomyces cerevisiae*:

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es probablemente el microorganismo más ampliamente utilizado por el hombre a través del tiempo; aunque no se tuviera, en un principio, conciencia plena de la participación del microorganismo en la elaboración de diversos alimentos como el pan o las bebidas alcohólicas ³⁴.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto que ha sido ampliamente estudiado dada su importancia en la industria panadera y vitivinícola, así como por su capacidad de producir etanol ³⁵.

La clasificación taxonómica se describe en la Tabla 1.6.

Tabla 1.6: Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae* ³⁶

Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.	
Reino	Hongo
División	<i>Amastogomycota</i>
Clase	<i>Ascomycetes</i>
Subclase	<i>Hemiascomycetidae</i>
Orden	<i>Endomycetales</i>
Familia	<i>Saccharomycetaceae</i>
Subfamilia	<i>Saccharomycetidae</i>
Genero	<i>Saccharomyces</i>
Especie	<i>Cerevisiae</i>

Saccharomyces cerevisiae, es una levadura que constituye el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad; su nombre deriva del vocablo *Saccharo* (azúcar), *myces* (hongo) y *cerevisiae* (cerveza). Es una levadura heterótrofa, que obtiene la energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa ³⁴.

Presenta forma esférica, elíptica y cilíndrica, cuyo diámetro oscila de 2 a 8 micras ³⁶.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es anaerobia facultativa, de modo que crece tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, es capaz de emplear un amplio rango de sustratos entre mono-, di-, y oligo-sacáridos, así como etanol, acetato, glicerol y hasta lactatos; siendo la glucosa su fuente de carbón preferida, la cual metaboliza a etanol mediante la ruta metabólica estándar para la glucólisis o Embden-Meyerhoff-Parnass (EMP) y el metabolismo anaeróbico del piruvato ³⁷.

La velocidad de crecimiento de las levaduras depende directamente de la concentración del sustrato. Este comportamiento se describe generalmente mediante la ecuación de Monod. Este modelo sugiere que el desarrollo de las levaduras depende de una máxima velocidad de crecimiento y una concentración de saturación, el cual es válido para un amplio rango de organismos y nutrientes, donde todos cuentan con un límite superior de concentración sobre el cual se genera una disminución de la velocidad de crecimiento, lo que se conoce como inhibición ³⁷.

Este microorganismo muestra 5 fases de crecimiento bien definidas cuando es cultivado en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: la fase lag, la fase logarítmica, el cambio diáuxico, la fase postdiáuxica y la fase estacionaria. La fase lag es un periodo de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse ³⁵. La fase lag depende tanto del número de células, como del sistema metabólico. Cuando esta fase se prolonga la presencia de tóxicos o una pobre o inadecuada inoculación puede ser la razón ³⁷.

Luego se presenta un crecimiento exponencial que ocurre a una máxima velocidad, la duración de esta fase depende de la concentración inicial del sustrato limitante; así como de la habilidad del microorganismo para adaptarse a la disminución de la concentración de sustrato ³⁷.

Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo del que se produce etanol. Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el cambio diáuxico, un periodo breve de tiempo en el cual no hay división, y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. En la fase postdiáuxica las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica e incrementan su resistencia al estrés gradualmente; en tanto que la fase estacionaria se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular. En esta fase, las células acumulan carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, alcanzan el máximo

nivel de resistencia a estrés y su pared celular se vuelve más gruesa y resistente a la digestión por liticasa ³⁵.

Saccharomyces cerevisiae es la levadura más comúnmente utilizada en la producción de etanol a nivel industrial debido a sus características deseables, tales como bajo costo, osmotolerante, fácil de manejar, no requiere alta nutrición, produce una alta concentración de etanol con bajo nivel de subproductos, tiene una alta viabilidad para reutilizarse y puede tolerar una alta concentración de azúcar y etanol. Además, *S. cerevisiae* es reconocida como un organismo seguro o GRAS (*Generally Regarded as Safe*) ³⁸.

Sin embargo, condiciones estresantes como un aumento en la concentración de etanol, temperatura, estrés osmótico y contaminación bacteriana son las razones por las que la levadura no puede sobrevivir durante la fermentación ³⁹.

Las células de levadura se ven sometidas a varios tipos de estrés a medida que las condiciones del medio cambian, tanto en situaciones naturales como durante procesos industriales. Tanto el daño provocado por el estrés como la respuesta de la levadura al mismo, depende del tipo y grado del estrés, y del estado de desarrollo de la levadura al momento en que curre el estímulo. Sin embargo, en general, las condiciones adversas a las que se enfrenta este organismo afectan principalmente a las estructuras celulares y a las diferentes macromoléculas, especialmente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, las cuales sufren modificaciones estructurales que dañan su función ³⁵.

Es un producto del proceso de producción de alcohol, que a su vez constituye una valiosa fuente de proteínas y vitaminas para la alimentación animal ³⁴.

1.6 Inmovilización:

La inmovilización se define como el confinamiento físico de las células intactas a una región del espacio, con la conservación de la actividad biológica ⁴⁰.

La inmovilización es un proceso que consiste en la localización de una enzima o un microorganismo completo, en un espacio definido sin perder su actividad catalítica ó viabilidad. Esto supone la selección de un soporte que no afecte el metabolismo celular, albergue cantidades importantes de células, posea estabilidad a la temperatura y el pH, además de transparencia y porosidad para permitir la difusión de los nutrientes, así como un bajo costo ¹².

Aunque se han desarrollado muchas tecnologías para la inmovilización celular en las últimas décadas, la mayoría de ellas pueden ser agrupadas, principalmente, en las cuatro categorías principales, como se ilustra en la Figura 1.1 (a), (b) y (c) utilizando materiales de apoyo para restringir físicamente a las células, tales como el atrapamiento de células con geles, la oclusión de células dentro de los poros internos de materiales porosos y la adsorción de células sobre superficies sólidas; (d) auto inmovilización de células por su floculación o agregación espontánea; (e) encapsulación de células; y (f) retención de células con membranas ⁴¹.

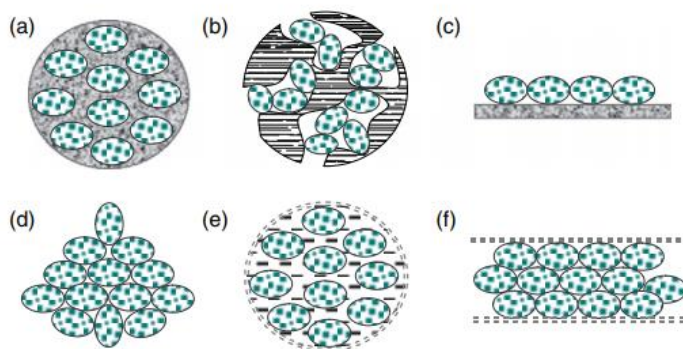


Figura 1.1: Tipos de Inmovilización celular ⁴¹

En la inmovilización de células por atrapamiento, las células precultivadas se dispersan en la solución de geles tales como agar y alginato que pueden gelificar en el tamaño y forma final (perlas). Controlando el proceso de gelificación para sustratos de bajo peso molecular y metabolitos, la difusión dentro y fuera de las perlas, la alta viabilidad puede ser mantenida para las células inmovilizadas. Es importante, la selección de materiales de atrapamiento, procedimientos de inmovilización, caracterización de las células inmovilizadas, propiedades de transferencia de masa interna y externa y comportamientos cinéticos, y la producción de las células inmovilizadas a pequeña escala para investigación de laboratorio y grandes escalas para aplicaciones industriales ⁴¹.

El uso de estas metodologías para la fermentación alcohólica (AF) ofrece muchas ventajas sobre el uso de los métodos convencionales que utilizan células de levadura libres, además, diferentes sistemas de inmovilización se han propuesto para diferentes aplicaciones, como la elaboración del vino. Los métodos más estudiados para la inmovilización de la levadura, incluye el uso de soportes naturales, soportes orgánicos

(por ejemplo, Alginato), inorgánicos (por ejemplo, cerámicas porosas), sistemas de membranas y agentes multifuncionales ⁴⁰.

La productividad del etanol puede mejorarse mediante la inmovilización de células de levadura en matrices poliméricas ³⁸.

El sistema de células inmovilizadas tiene varias ventajas, como un menor riesgo de contaminación microbiana debido a altas densidades celulares y actividad de fermentación, mayor tasa de absorción de sustrato, mayor productividad y rendimiento de etanol, actividad prolongada y estabilidad de las células, la capacidad de reciclar el biocatalizador, aumento de la tolerancia a una alta concentración de sustrato, inhibición reducida de los productos finales, protección de las células de los inhibidores, fácil recuperación del producto y costos mínimos de producción ⁴². Además, permite un mejor control y reproducibilidad de los procesos, así como la reutilización de los sistemas de inmovilización para fermentaciones discontinuas y tecnologías de fermentación continua.⁴⁰

Se han reportado varias técnicas para la inmovilización celular, como adsorción, atrapamiento, entrecruzamiento, por enlace covalente y encapsulación. Entre estas técnicas, el atrapamiento en perlas de Alginato de calcio es el más utilizado porque es de fácil preparación, económico y no tóxico ⁴², además de efectivo para reducir el efecto inhibitor de impurezas o inhibidores de la fermentación en la célula crecimiento. ⁴³

Los biorreactores utilizados más comúnmente para células inmovilizadas, particularmente para células inmovilizadas por atrapamiento de gel, son tanques agitados (Figura 1.2 (a)), que pueden operar en modo continuo o por lotes. En condiciones de operación por lotes, el caldo de fermentación se drena al final de cada lote, pero las células inmovilizadas permanecerán para la siguiente operación, que se puede iniciar rápidamente mediante la alimentación de sustrato fresco, sin la necesidad de inoculación que requiere el cultivo y la fermentación con células libres. Para evitar la inhibición del sustrato en las células, se puede aplicar una estrategia de lote alimentado al sistema. En cuanto a la operación continua, el medio fresco se puede alimentar a mayores tasas de dilución, sin preocuparse por el lavado, y el caldo de fermentación sin o con pocas células se descarga correspondientemente ⁴¹.

En comparación con los biorreactores de tanque agitado, los biorreactores de lecho compacto (Figura 1.2 (b)) son simples de construir y operar con baja costos; son adecuados para células microbianas inmovilizadas por materiales soporte,

particularmente inmovilizados por matrices porosas preformados, con buena resistencia mecánica para soportar el peso de la cama. Como la aireación no es eficiente, biorreactores de lecho compacto se utilizan principalmente para células inmovilizadas en condiciones anaeróbicas ⁴¹.

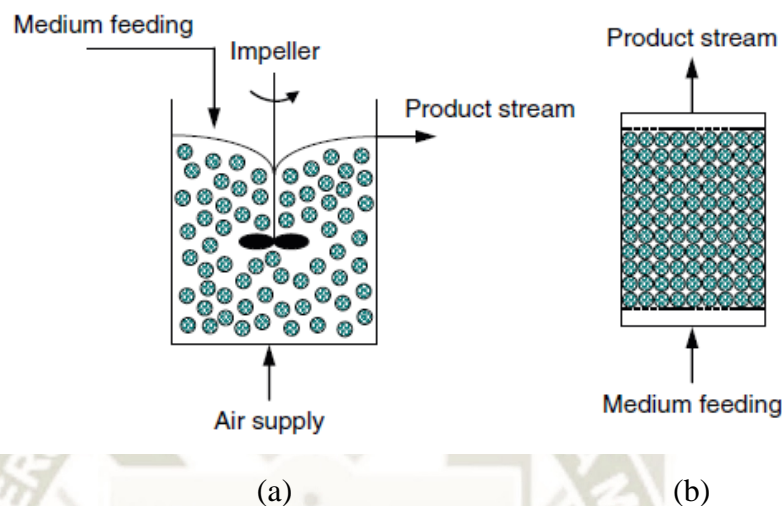


Figura 1.2: (a) Biorreactor tipo Tanque agitado (b) Biorreactor lecho compacto ⁴¹

1.7 Fermentación alcohólica:

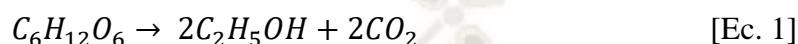
Las vías para la oxidación de los compuestos orgánicos y la conservación de la energía en el ATP se puede dividir en dos procesos principales: 1) Fermentación, en el cual el proceso de óxido reducción se efectúa en ausencia de cualquier aceptor terminal de electrones; 2) Respiración, en el cual el oxígeno molecular o cualquier otro oxidante actúa como el aceptor oxidante de electrones ³⁶.

En términos generales la fermentación se describe como un proceso de oxidación en el que la transformación de moléculas complejas a moléculas simples, lleva 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. ³⁷

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. La energía se sintetiza como ATP a partir de un proceso de glicólisis al que sigue el metabolismo del piruvato. De este modo la fermentación complementa la glucólisis y hace posible producir energía en ausencia de oxígeno.³⁷

La fermentación alcohólica es una bioreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la Ecuación 1:⁴⁴



La degradación de la glucosa se la puede dividir en tres etapas: La etapa I es una serie de reacciones de re-acomodación que no implica oxidación-reducción y no se libera energía, pero que conducen a la producción de dos moléculas de un compuesto intermedio, el gliceraldehido-3-fosfato. En la etapa II hay oxido-reducción, se produce un enlace fosfato alto en energía en forma de ATP y se forman dos moléculas de piruvato. En la etapa III, ocurre una segunda reacción de óxido-reducción y se forman los productos de fermentación (etanol y CO₂). La vía metabólica de la glucosa a piruvato se llama glucólisis (ruptura de la glucosa) que se llama vía de *Embder-Meyerhof*, por su descubridor³⁶.

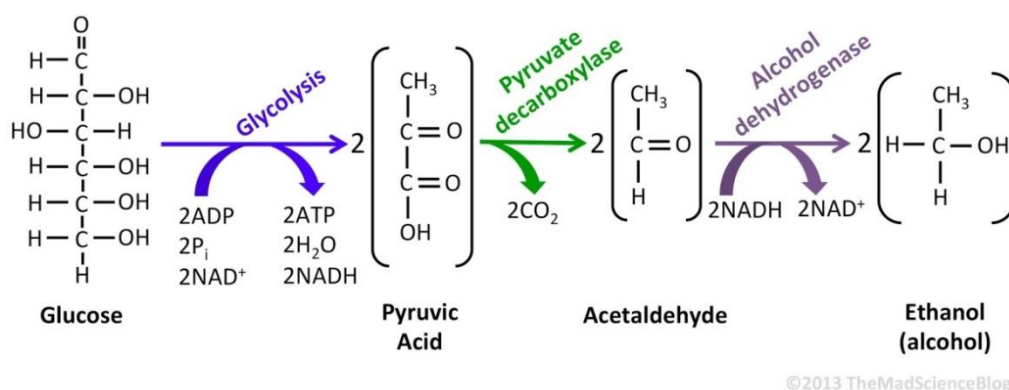


Figura 1.3: Vía metabólica para la obtención de etanol⁴⁵

Las principales responsables de esta transformación son las levaduras. La *Saccharomyces cerevisiae*, es la especie de levadura usada con más frecuencia. Por supuesto que existen estudios para producir alcohol con otros hongos y bacterias, como la *Zymomonas mobilis*, pero la explotación a nivel industrial es mínima. A pesar

de parecer, a nivel estequiométrico, una transformación simple, la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos moléculas de dióxido de carbono es un proceso muy complejo, pues al mismo tiempo la levadura utiliza la glucosa y nutrientes adicionales para reproducirse. Para evaluar esta transformación, se usa el rendimiento biomasa/producto y el rendimiento producto/ substrato ⁴⁴.

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanoles de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO₂ por 1 g de glucosa. Este valor fue cuantificado por Gay Lussac. En la realidad es difícil lograr este rendimiento, porque como se señaló anteriormente, la levadura utiliza la glucosa para la producción de otros metabolitos. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g/g. Los rendimientos en la industria varían entre 87 y 93% del rendimiento teórico. Otro parámetro importante es la productividad (g/h/L), la cual se define como la cantidad de etanol producido por unidad de tiempo y de volumen ⁴⁴.

La fermentación del bioetanol se puede llevar a cabo en lote o *batch*, en lote alimentado (*fed-batch*), lote repetido o modo continuo. En el proceso por lote, el sustrato es proporcionado al comienzo del proceso sin adición o eliminación del medio. Es conocido como el sistema de biorreactor más simple con múltiples recipientes y un control flexible y fácil del proceso. El proceso de fermentación se lleva a cabo en un sistema de circuito cerrado con alto contenido de azúcares y concentración de inhibidores al inicio y con alta concentración del producto al final. Hay varios beneficios del sistema por lotes que incluye, la esterilización completa, fácil manejo de las materias primas, control fácil y flexible. Sin embargo, la productividad es baja y necesita de altos costos de mano de obra intensiva. La presencia de concentración de azúcares en el medio de fermentación puede conducir a la inhibición por sustrato, que resulta en la inhibición del crecimiento celular y la producción de etanol. ³⁹

La fermentación discontinua de reciclaje celular es un método estratégico para la producción efectiva de etanol, ya que reduce el tiempo y el costo de la preparación del inóculo. Las otras ventajas del proceso de lotes repetidos, es la fácil recolección de las células, operación estable y productividad a largo plazo. Las células de levadura inmovilizadas se utilizan para facilitar separación de las células para el reciclado celular ³⁹.

1.8 Bioetanol:

Debido a los recientes aumentos en los precios del petróleo, así como a las crecientes preocupaciones sobre los problemas ambientales y la necesidad de una fuente de energía limpia pero ambientalmente segura que sea renovable y barata, la investigación sobre la producción de biocombustibles, como el bioetanol y el biodiesel, como alternativas para las fuentes de energía convencionales actuales ha crecido ⁹.

A pesar de su gran potencial, los biocombustibles aún sufren algunos inconvenientes que limitan su producción a gran escala. El principal problema que enfrentan los biocombustibles es su alto precio de producción, lo que los hace incapaces de competir con otras fuentes de energía, especialmente el petróleo crudo, aunque hay otros problemas involucrados, como el uso de la tierra y la seguridad energética, la mayor parte que contribuye al alto costo de producción es el precio de los sustratos fermentables utilizados por los microorganismos. En consecuencia, diferentes grupos de investigación están intentando identificar sustratos baratos y renovables, como los productos de desecho agrícolas y alimenticios, para su uso como sustratos fermentables en la producción de biocombustibles ⁹.

Cualquier combustible producido a partir de materiales biológicos generalmente se conoce como biocombustible. El término generalmente se refiere a combustibles líquidos para el transporte. Las características principales de un biocombustible adecuado son: tiene el potencial de reemplazar los combustibles fósiles, el proceso de producción debe tener un balance energético neto positivo y debe tener un impacto ambiental negativo. En Brasil, la caña de azúcar es la principal materia prima para la producción de bioetanol. En los Estados Unidos, el almidón (y últimamente lignocelulósicos) es la materia prima primaria ⁴⁶.

Se estima que la población mundial aumentará en aproximadamente 3.000 millones de personas a mediados del siglo XXI. Con este aumento de la población, la demanda y el costo de los combustibles fósiles aumentarán considerablemente. Se necesitan nuevas tecnologías para la extracción de combustible utilizando materias primas que no amenacen la seguridad alimentaria, causen una pérdida mínima o nula de los hábitats naturales de los animales y reduzcan la erosión del suelo. Además, se debe mejorar la gestión de los desechos y se debe minimizar o eliminar la contaminación ambiental. Muchas de las reservas actuales de petróleo se encuentran en regiones políticamente inestables (por ejemplo, Medio Oriente y partes de África), lo que podría dar lugar a

fluctuaciones considerables en el suministro mundial de petróleo y el precio del barril de petróleo crudo ⁴⁶.

A diferencia de los combustibles fósiles, el bioetanol es un recurso de energía renovable y no aumenta los niveles atmosféricos de dióxido de carbono. El etanol se mezcla con gasolina para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero. La tecnología de producción de etanol ha sido un foco de científicos e industria por razones tecnológicas, económicas y ambientales. Los procesos de producción de etanol abarcan muchas técnicas diferentes y muchas materias primas diferentes, principalmente caña de azúcar y maíz. La elección del proceso de producción de etanol depende de la disponibilidad del cultivo y la ubicación geográfica ⁴⁷

El bioetanol es un biocombustible líquido prometedor generado a partir de diversas materias primas de biomasa a través de tecnologías de conversión. Es el biocombustible más utilizado debido a sus propiedades renovables, no tóxicas, biodegradables y oxigenadas que reducen la emisión de partículas en los motores de encendido por compresión. Se utiliza como combustible sustituto para reducir la dependencia de los combustibles fósiles, garantizar la seguridad energética y reducir el impacto negativo del consumo de combustibles fósiles para la economía y el medio ambiente ³⁸.

El bioetanol es una energía renovable con alta eficiencia y bajo impacto ambiental. El etanol es una fuente de energía renovable porque se produce a través de la fermentación microbiana mediante el uso de carbohidratos como el almidón, el azúcar o la celulosa con microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*. El maíz ha sido tradicionalmente el principal cultivo utilizado para la producción de etanol. Sin embargo, otros cultivos potenciales necesitan ser evaluados para la producción de etanol ambiental, social y económicamente racional. Las biomásas más utilizadas para la producción de etanol son el maíz, la caña de azúcar o el trigo. Otros incluyen granos, suero de queso y desechos de las industrias de bebidas, cervecería y vino. En todo el mundo, se produjeron alrededor de 12 mil millones de galones de etanol en 2005. Los dos principales productores de etanol son Brasil y Estados Unidos, y cada uno representa alrededor del 35 por ciento de la producción mundial ⁴⁸.

Actualmente, los residuos lignocelulósicos representan fuentes renovables atractivas para la producción de bioetanol. Sin embargo, la tecnología asociada no está suficientemente desarrollada. Además, la gran cantidad de aguas residuales producidas

por la fermentación de biomasa lignocelulósica plantea un problema para la producción a gran escala. En este escenario, las aguas residuales azucaradas emergen como una alternativa atractiva para la producción de etanol. Debido a que las bebidas azucaradas se producen en grandes cantidades (por ejemplo, 6000 millones de litros al año en Argentina), las aguas residuales de bebidas azucaradas también se generan en grandes cantidades. La industria de los refrescos es el actor más importante en el sector de bebidas azucaradas, ya que produce aproximadamente el 75% de todas las bebidas azucaradas. Una parte de las bebidas producidas (2.5–5.0%) se descarta debido a las prácticas de control de calidad o se devuelve de las tiendas minoristas debido a la falta de gas o producto vencido. Desde un punto de vista económico, esta agua residual de bebidas endulzadas con azúcar es una materia prima interesante para la producción de bioetanol debido a su alto contenido de azúcar (60–180 g/L) y al hecho de que los azúcares consisten en sacarosa y / o una mezcla de glucosa y fructosa (proporcionado en forma de jarabe de maíz alto en fructosa) ⁴⁷.

1.9 Métodos experimentales:

Determinación de azúcares disueltos utilizando el refractómetro:

La determinación de Brix se realiza midiendo el índice de refracción de una solución. El Índice de Refracción es una característica óptica de una sustancia y del número de partículas disueltas en ella. El Índice de Refracción se define como el ratio de la velocidad de la luz en espacio vacío a la velocidad de la luz en la sustancia. Un resultado de esta propiedad es que la luz cambiará de trayectoria cuando viaje a través de una sustancia con un índice de refracción diferente. Esto se denomina refracción.

Al pasar de un material con un índice de refracción más alto a uno con más bajo, hay un ángulo crítico en el que el haz de luz incidente ya no puede refractar, sino que se reflejará en la interfaz. ⁴⁹

El ángulo crítico puede ser usado para calcular fácilmente el índice de refracción según la Ecuación 2:

$$\text{sen } \theta_{\text{critical}} = n_2/n_1 \quad [\text{Ec. 2}]$$

Donde n_2 es el índice de refracción del medio con densidad más baja; n_1 es el índice de refracción del medio con densidad más alta.

En el refractómetro la luz procedente de un LED pasa a través de un prisma en contacto con la muestra. Un sensor de imagen determina el ángulo crítico al que la luz ya no refracta a través de la muestra. Aplica automáticamente la compensación de temperatura y convierte el índice de refracción de la muestra a concentración de sacarosa en unidades de porcentaje (por peso) Brix ⁴⁹.

El principio de medición se basa en la refracción de la luz creada por la naturaleza y la concentración de los solutos. Es por esto que un refractómetro mide indirectamente la densidad de los líquidos. La unidad de grados Brix lleva el nombre de Adolf F. Brix, un científico del siglo XIX. Según esa escala, 1 °Brix correspondería a un índice de refracción de una solución de sacarosa en agua al 1%. ⁵⁰.

Determinación de los azúcares reductores:

Sumner ⁵¹, desarrolló un método utilizando el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para calcular la concentración de azúcares reductores en distintos materiales. El procedimiento se basa en una reacción redox que ocurre entre el DNS y los azúcares reductores presentes en la muestra. ⁵¹

El método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) ⁵², cuya presencia puede detectarse por lectura de la absorbancia en la zona de 540-570 nm. Se aplica el método DNS a una gama de soluciones patrón de glucosa con el objeto de obtener la correspondiente curva de calibración que se utilizará bien directamente, o mediante el coeficiente de extinción deducido de la misma, para determinar los equivalentes de glucosa formados en el medio de reacción. ⁵³

Determinación de la concentración de etanol:

La cuantificación del etanol requiere de dos reacciones enzimáticas, la primera reacción (Ecuación 3) es catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), en la cual el etanol es oxidado a acetaldehído con la reducción de concomitante de la nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD⁺) ⁵⁴.



Sin embargo, dado que el equilibrio de la reacción se produce a favor del etanol y NAD^+ , se requiere de una reacción adicional (Ecuación 4) para atrapar los productos. Esto se logra por la oxidación cuantitativa del acetaldehído en ácido acético en presencia de la enzima aldehído deshidrogenasa (Al-DH) y NAD^+ ⁵⁴.



Por estequiometría, la cantidad de NADH es el doble de la cantidad de etanol; es la coenzima reducida, la que es medida por el incremento de la absorbancia a 340 nm ⁵⁴.

Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO):

Según la NMX-AA-030-SCFI-2001 ⁵⁵, se entiende por Demanda Química de Oxígeno (DQO), a la cantidad de materia orgánica e inorgánica en un cuerpo de agua susceptible de ser oxidada por un oxidante fuerte. Una gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos son oxidados con una mezcla de ácido crómico y sulfúrico a ebullición. La muestra se coloca a reflujo en una disolución de ácido fuerte con un exceso conocido de Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$). Después de la digestión, el dicromato no reducido se mide por titulación o espectrofotométricamente para determinar la cantidad de dicromato consumido y calcular la materia oxidable en términos de oxígeno equivalente.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 LUGAR DE EJECUCION:

Los ensayos experimentales se realizaron en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María.

2.2 MATERIALES:

2.2.1 Material biológico:

Levadura seca instantánea, *Saccharomyces cerevisiae* (FLEISCHMANN)

2.2.2 Insumos:

Bebida gaseosa de descarte: Gaseosa amarilla.

2.2.3 Reactivos:

- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (SIGMA - ALDRICH).
- Alginato de sodio (MERK).
- Carbón activado.
- *Ethanol test Kit* (MEGAZYME).
- Cloruro de calcio (CHARLAU)
- Hidróxido de sodio (MACRON)
- Suero fisiológico (B. BRAUN MEDICAL)
- Tartrato sódico potásico (PAN REAC&APPLICHEM)

2.2.4 Material de vidrio:

- Beakers, 50, 150, 1000 mL.
- Bureta, 10 mL.
- Celdas de vidrio con tapa, 1 cm.
- Fiola, 10, 50, 100, 250 y 500 mL
- Pipeta Pasteur.
- Probeta, 100 y 500 mL.

- Tubos de vidrio con tapa de rosca de 13x100 (PYREX N°9825)

2.2.5 Otros:

- Bernier.
- Espátula.
- Gradilla de tubos.
- Filtros de jeringa 0.45 μm (NALGENE)
- Jeringa hipodérmica, 20 mL (ALFY MEDIX)
- Micropipeta, 10 – 100, 100 – 1000 μL (BOECO)
- Piceta.
- Pipetas de plástico.
- Tips.
- Tubos de centrifuga, 15 mL.

2.2.6 Aparatos y equipos:

- Autoclave (KINTEL XFS-280MB 18L)
- Balanza analítica (OHAUS TRAVELER TA302)
- Biorreactores.
- Centrífuga (TOPSCIEN SPINPLUS – 8)
- Cocina eléctrica (IMACO HP1400)
- Espectrofotómetro (BIOBASE BK-V1000)
- Frigobar 93 L (MABE RMF04PRBX0)
- pHmetro portátil (HANNA HI 98130)
- Refractómetro digital (HANNA HI96801)
- Baño de ultrasonido de 2.6 L (SELECTA 3000683)

2.3 MÉTODOS:

2.3.1 Adquisición de la muestra:

En establecimientos de venta por mayor, se adquirió bebidas gaseosas de descarte cuya fecha de vencimiento se encontraba excedida.

Se seleccionó la bebida gaseosa de descarte que según la Información nutricional del etiquetado presentaban mayor contenido de azúcares y que además incluía en su composición un conservante.

2.3.2 Caracterización fisicoquímica de la bebida gaseosa de descarte:

Una muestra de la bebida gaseosa de descarte se analizó fisicoquímicamente en el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María en cuanto a su contenido de Benzoato de sodio por HPLC, contenido de azúcares reductores por el método de Fehling y Demanda Química de Oxígeno (DQO).

La bebida gaseosa de descarte desgasificada por sonicación, fue caracterizada fisicoquímicamente en cuanto a: pH, contenido de azúcares disueltos o °Brix, contenido de azúcares reductores por el método del DNS (Ácido 3,5 dinitrosalicílico) y concentración de etanol.

A. pH:

En un beaker, se depositó 50 mL de la bebida gaseosa de descarte desgasificada. Se calibró el potenciómetro portátil HANNA HI 98130 con las soluciones buffer de pH 4.0 y 7.0. Se enjuagó el electrodo con agua destilada y luego se secó con papel absorbente. Se introdujo el electrodo en la bebida gaseosa de descarte. Se registró la lectura de pH. Después de cada medición del pH se enjuagó el electrodo con agua destilada y se secó con papel absorbente.

B. Contenido de azúcares disueltos o °Brix:

Se determinó el contenido de azúcares disueltos en la bebida gaseosa de descarte desgasificada utilizando el refractómetro digital HANNA HI96801 según el Manual de Instrucciones.

Con una pipeta de plástico, se depositó agua destilada en la celda de medición, se cubrió ésta durante la calibración, luego se pulsó la tecla ZERO, y se verificó que el instrumento fue calibrado. Se absorbió suavemente el agua destilada con

papel absorbente suave, se limpió y secó completamente la superficie del prisma situado en la parte inferior de la celda de medición. El instrumento está listo para medir la muestra.

Utilizando una pipeta de plástico, se depositó gota a gota la muestra sobre la superficie del prisma, llenado la cavidad completamente, luego se pulsó la tecla READ (LECTURA) y se registró la medición, la cual se muestra en unidades de % BRIX. Se retiró la muestra de la celda de medición con papel absorbente suave, se enjuagó el prisma y la celda de medición con agua destilada, se secó con papel absorbente.

C. Contenido de azúcares reductores por el método del DNS:

Preparación del reactivo Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS):

Según Tena, 2008⁵³; el reactivo está constituido por Ácido 3,5-dinitrosalicílico al 0.1 % (p/v), Tartrato de sodio y potasio al 30 % (p/v) en NaOH 0.4 M.

Se disolvió 0.1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y 30 g de Tartrato de sodio y potasio en 20 mL de Hidróxido de sodio 2 M (16 g de NaOH en 200 mL de agua destilada), luego se enrasó hasta 100 mL con agua destilada. El reactivo se conservó a 4 °C en un recipiente de color ámbar.

Preparación de la Solución stock de glucosa 50 mM:

Se disolvió 0.901 g de glucosa en 100 mL de agua destilada. La solución se conservó a 4 °C en un recipiente de color ámbar.

Recta de calibración:

A partir de una solución stock de glucosa 50 mM, en fioles de 10 mL se preparó diluciones con las siguientes concentraciones: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 y 50 mM, tal como se muestra en la Tabla 2.1.

De cada tubo se retiró 0.2 mL y se depositó en un tubo de vidrio con tapa de rosca. Se añadió 2 mL del reactivo DNS, incubándose posteriormente la mezcla en un baño de agua hirviente durante 10 minutos; luego se enfrió a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 570 nm, utilizando como blanco la mezcla del tubo 0. El ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 2.1: Diluciones de glucosa a partir de una Solución stock de glucosa 50 mM

Tubo	Concentración mM	Sol. de Glucosa 50 mM (mL)	Agua destilada (mL)
0	0	0.0	10.0
1	2	0.4	9.6
2	4	0.8	9.2
3	6	1.2	8.8
4	8	1.6	8.4
5	10	2.0	8.0
6	20	4.0	6.0
7	30	6.0	4.0
8	40	8.0	2.0
9	50	10.0	0.0

Preparación de la muestra:

La muestra de bebida gaseosa de descarte desgasificada, fue decolorada con carbón activado (0.2 g por cada 10 mL de muestra) y luego filtrada con filtros de jeringa de 0.45 μ m.

Se realizó una dilución de 1:10, se retiró 0.2 mL y se depositó en un tubo de vidrio con tapa de rosca, luego se añadió 2 mL del reactivo DNS, incubándose posteriormente la mezcla en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos; luego se enfrió a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 570 nm.

D. Concentración de etanol:

Para la cuantificación de etanol se utilizó el *Ethanol test Kit* de *Megazyme*, según las especificaciones del *Assay Procedure* disponible en https://www.megazyme.com/documents/Booklet/K-ETOH_DATA.pdf.

Preparación de la muestra:

Una muestra de la bebida gaseosa de descarte desgasificada, fue decolorada con carbón activado (0.8 g por cada 30 mL de muestra), luego filtrada utilizando filtros de jeringa y ajustada a pH 9 con una solución de NaOH 2 M. Luego se

realizó diluciones de 1:100 y 1:1000, según la concentración estimada de etanol, tal como se muestra en la Tabla 2.2

Tabla 2.2: Dilución de la muestra según la concentración estimada de etanol

Concentración estimada de etanol (g/L)	Dilución con agua	Factor de dilución
<0.12	No requiere dilución	1
0.12 – 1.2	1 + 9	10
1.20 – 12.0	1 + 99	100
12.0 – 120.0	1 + 999	1000
>120	1 + 9999	10000

Composición del *Ethanol test Kit*

Botella 1: Buffer (pH 9.0) más azida de sodio 0.02 % (w/v) como conservante.

Botella 2: Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺).

Botella 3: Solución de la enzima aldehído deshidrogenasa (Al-DH).

Botella 4: Solución de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH).

Botella 5: Solución estándar de etanol (5 mg/mL).

Preparación de las soluciones de reactivos y suspensiones:

- Se utilizó el contenido de la Botella 1 según se suministró.
- Se disolvió el contenido de la Botella 2 en 12.4 mL de agua destilada.
- Se utilizó el contenido de la Botella 3 y 4 según se suministró, con agitación previa antes de su uso.
- Se disolvió 0.5 mL del contenido de la botella 5 en 50 mL de agua destilada.

Procedimiento:

Se mezcló los componentes del 1 al 5 de la muestra y el blanco, según la Tabla 2.3. Se incubó la mezcla en un Baño María a 37 °C durante 2 minutos, luego se midió la absorbancia a la longitud de onda de 340 nm. Se registró la absorbancia como A_1 , y se inició la reacción por la adición del componente 6, luego se mezcló e incubó a 37 °C durante 5 minutos; finalmente se registró

nuevamente la absorbancia como A_2 . Se procesaron tres muestras simultáneamente con su respectivo blanco.

Tabla 2.3: Ensayo para la cuantificación de etanol ⁵⁴

Componentes		Blanco (mL)	Muestra (mL)
1	Agua destilada	2.10	2.00
2	Muestra	-	0.10
3	Botella 1 (Buffer)	0.20	0.20
4	Botella 2 (NAD ⁺)	0.20	0.20
5	Botella 3 (Al-DH)	0.05	0.05
<i>Mezclar e incubar a 37 °C durante 2 minutos, luego leer la absorbancia a 340 nm como A_1</i>			
6	Botella 4 (ADH)	0.02	0.02
<i>Mezclar e incubar a 37 °C durante 5 minutos, leer la absorbancia como A_2</i>			

Cálculos:

Se determinó la diferencia de absorbancias $A_2 - A_1$ para el blanco y la muestra, luego se restó la diferencia de absorbancia del blanco de la diferencia de absorbancia de la muestra, y se obtuvo la diferencia ΔA_{ETOH} .

La concentración de etanol, C se determinó con la Ecuación 5

$$C = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v \times 2} \times \Delta A_{ETOH} \quad [\text{Ec. 5}]$$

Dónde:

V = Volumen final (2.57 mL).

MW = Peso molecular del etanol (46.07 g/mol).

ε = Coeficiente de extinción de NADPH a 340 nm (6300 L.mol⁻¹.cm⁻¹)

d = Trayecto óptico (cm).

v = Volumen de la muestra (mL).

2 = 2 moles de NADPH producido por cada mol de etanol.

Si la muestra fue diluida durante la preparación, el resultado debe ser multiplicado por el factor de dilución, D .

Los cálculos pueden ser simplificados utilizando la hoja del cálculo de Megazyme Mega-Calc™ (www.megazyme.com).

Es imprescindible, que el ensayo se realice posterior al proceso de fermentación, ya que el etanol volátil es un interferente en el método.

2.3.3 Inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* en Alginato de calcio:

La inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* se realizó por el método de atrapamiento.

Se resuspendió 10 g de levadura seca instantánea *Fleischmann* en 200 mL de suero fisiológico estéril a 37 °C.

Se disolvió el Alginato de sodio en la suspensión de levadura, hasta obtener una solución al 1 y 2 %.

Con una jeringa hipodérmica, se tomó 20 mL de la mezcla y se dejó caer gota a gota en un beaker que contiene la Solución de Cloruro de calcio al 2%. Se repitió el paso anterior hasta agotar la mezcla.

Se separó los pellets por filtración y se lavaron con la Solución de Cloruro de calcio al 2%. Se caracterizaron morfológicamente los pellets obtenidos.

2.3.4 Evaluación del efecto del pH y la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación alcohólica de la bebida gaseosa de descarte:

Fermentación alcohólica de la bebida gaseosa de descarte:

Se configuro un biorreactor para la fermentación de la bebida gaseosa de descarte según la norma DIN 28131⁵⁶, que establece los requerimientos dimensionales y operativos de los agitadores, tales como las relaciones entre el diámetro del tanque (d_1), el nivel de la mezcla en el tanque (h_1), el diámetro del impulsor, el ancho de las paletas (d_2), la altura de impulsor al fondo (h_2). Estas relaciones sirven como guía para obtener los parámetros de funcionamiento óptimos para cada tipo de mezcla. En la Figura 2.1 se muestra un esquema con las variables mencionadas, considerando las siguientes relaciones:

$$h_1/d_1 = 1.0$$

$$d_2/d_1 = 0.33$$

$$h_2/d_1 = 0.33$$

A su vez se consideró, un sistema de agitación tipo hélice, una minibomba sumergible de agua para la toma de muestras del sistema y un airlock o sello de aire.

La bebida gaseosa de descarte fue acondicionada; desgasificada por sonicación y ajustada al pH de 4 o 5 con una Solución de NaOH 1 N.

Se depositó 1 L de la bebida gaseosa de descarte acondicionada en un biorreactor, y se esterilizó en el autoclave a 121 °C, 0.1 MPa durante 15 minutos.

En los tratamientos con inmovilización (4C y 5C), se inoculó los pellets en las bebidas gaseosas de descarte, mientras que en los tratamientos sin inmovilización (4S y 5S) se inoculó directamente la levadura con una concentración de 10 g/L.

Se establecieron 04 tratamientos para evaluar el efecto del pH e inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae*. Cada tratamiento fue designado por un número y una letra, el número hace referencia al pH y la letra a la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae*, tal como se muestra en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4: Tratamientos en la fermentación alcohólica de la bebida gaseosa de descarte con *Saccharomyces cerevisiae*

Tratamientos	Condiciones			
	pH 4		pH 5	
	Con inmovilización	Sin inmovilización	Con inmovilización	Sin inmovilización
Bebida gaseosa	4C	4S	5C	5S

Todos los tratamientos se incubaron en condiciones anaeróbicas, temperatura ambiente y agitación de 80 rpm por 16 h en un Biorreactor de 1.1 L. Cada tratamiento se realizó por duplicado.

Durante 16 h se tomaron muestra de cada tratamiento, cada 2 h; las cuales fueron centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos, luego filtradas a través de un filtro de jeringa de 0.45 µm, antes de su caracterización fisicoquímica.

Se determinó el pH, contenido de azúcares disueltos o °Brix por el refractómetro, contenido de los azúcares reductores por el método del DNS (Ácido 3,5 dinitrosalicílico) y el contenido de etanol por el método enzimático.

2.3.5 Evaluación de la remoción de color y Demanda Química de Oxígeno (DQO) en la bebida gaseosa de descarte tratada por fermentación alcohólica:

Remoción de Color:

El color de la bebida gaseosa de descarte desgasificada fue medido por espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro SHIMADZU UV/V SPEC 1700.

Se depositó agua destilada en una celda o cubeta, se situó está en el espectrofotómetro y se efectuó la puesta a cero de la absorbancia.

Se depositó la muestra en otra celda y se midió la absorbancia en un intervalo de longitudes de onda fijado. Se estableció dónde se encuentra el máximo de absorción y se obtuvo la representación gráfica de los resultados obtenidos en el barrido de longitudes de onda.

La determinación del color en los diferentes tratamientos de la bebida gaseosa de descarte se realizó registrando la absorbancia al inicio A_i y final A_f de la fermentación alcohólica; además se determinó el % de Remoción del mismo con la Ecuación 6:

$$\% \text{ Remocion: } \frac{A_i - A_f}{A_f} \times 100 \quad [\text{Ec. 6}]$$

Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Al finalizar el periodo de evaluación del proceso de fermentación, de cada tratamiento se tomó una muestra de 30 mL, la cual fue centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos, luego filtrada a través de un filtro de jeringa de 0.45 μm , conservada a 4 °C y llevada al Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María para la determinación de la Demanda Química de Oxígeno por el método de digestión con Dicromato de potasio. Además, se determinó el % de Remoción de la DQO con la Ecuación 6.

2.3.6 Análisis estadístico:

Se realizó el análisis de varianza para un experimento factorial 2x2 en un diseño de bloques completamente al azar. Asimismo, la comparación múltiple de promedios se realizó con la prueba de Tukey. El nivel de significancia aplicada a las pruebas estadísticas fue del 5%. Adicionalmente, la representación gráfica se realizó mediante Gráficos de barra con los promedios de cada una de las combinaciones. El procesamiento de los datos se realizó en Microsoft Excel 2016.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización fisicoquímicamente de la bebida gaseosa de descarte:

La bebida gaseosa de descarte caracterizada por el color amarillo fue seleccionada por presentar el mayor contenido de azúcares según la Información nutricional del etiquetado; tal como se observa en la Tabla 3.1.

Otro criterio de selección fue considerar que la bebida gaseosa de descarte presente dentro de su composición un conservante, con la finalidad de evaluar el efecto del pH durante la fermentación.

Tabla 3.1: Información nutricional de la bebida gaseosa de descarte seleccionada

Bebida gaseosa de descarte	Carbohidratos g/L	Tipo de conservante
Amarilla	105	Benzoato de sodio

Cabe resaltar que Dwidar et al. ⁹, evaluaron el uso de cuatro productos, incluyendo dos colas, una cola dietética y una bebida con sabor a lima-limón de dos grandes distribuidores en todo el mundo y un distribuidor local, como fuentes de azúcar fermentativas.

Mientras Matute et al. ², realizaron pruebas experimentales utilizando como sustrato fermentable líquido, dos bebidas no alcohólicas descartadas: una cola negra identificada como P y una bebida isotónica con sabor a naranja, designada como G (ambas bebidas descartadas, fueron suministradas por la Planta de concentrados Pepsi-Cola Venezuela, C.A., Venezuela). La bebida isotónica (G) presentó en su composición, principalmente: ácido cítrico, sales y 7% de azúcares. Mientras que la cola negra (P) era una bebida a base de: agua carbonatada, ácido fósfórico, cafeína y 12% de azúcares.

También, Cussianovich ⁴, trabajó con dos mostos para cada bebida de descarte y de la mezcla de ellas. Uno de los mostos fue fermentado directamente sin

acondicionamiento, mientras que el otro mosto fue acondicionado (corregido a pH 4.5 y se le adicionó 0.2 g/L de Fosfato de amonio).

Isla et al.⁶, evaluaron la capacidad de las levaduras para fermentar los azúcares contenidos en los refrescos de cola, naranja y lima-limón producidos por una marca líder mundial.

Mediante el análisis fisicoquímico de la bebida gaseosa de descarte en el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María, se determinó el contenido de Benzoato de sodio por HPLC, contenido de azúcares reductores por el método de Fehling y Demanda Química de Oxígeno (DQO), tal como se muestra en la Tabla 3.2. El Informe del Ensayo se muestra en el Anexo 1.

Tabla 3.2: Análisis fisicoquímico de la bebida gaseosa de descarte en el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María

Bebida gaseosa de descarte	Benzoato de sodio (mg/L)	Azúcares reductores directos y totales (g/L)	Demanda Química de Oxígeno (DQO) (mg/L)
Amarilla	21.94	76.00	113859.50

Se determinó la concentración del conservante Benzoato de sodio en la bebida gaseosa de descarte por HPLC. La curva de calibración se detalla en el Anexo 2.

El Benzoato de sodio o potasio a una concentración de 0.05 % y un pH entre 2.0 y 4.0 es universalmente utilizado como agente conservante contra la levadura y el moho. Sin embargo, en concentraciones más altas, también es efectivo contra las bacterias²⁹. Es la forma libre o no disociada de ácido benzoico que exhibe acción conservadora y, por lo tanto, su uso solo es efectivo a valores de pH bajos, idealmente por debajo de pH 3, donde el grado de disociación se reduce a menos del 10%³⁰.

Si las bebidas gaseosas proporcionan un sustrato ideal para el crecimiento de muchos microorganismos, brindando el adecuado suministro de los nutrientes requeridos³⁰; y la actividad de los conservantes se ve influenciada por factores físicos y químicos del sustrato y por ciertos constituyentes de los alimentos a conservar, es decir por

sustancias que cambian el valor del pH o la actividad del agua ³³, el acondicionamiento de la bebida gaseosa de descarte podría garantizar la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación alcohólica.

La bebida gaseosa de descarte presenta el conservante Benzoato de sodio a una concentración menor a 0.02 %, el cual será efectivo en el pH de la bebida gaseosa de descarte y podría interferir en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y, por lo tanto, en el tratamiento por fermentación de los azúcares contenidos en la bebida gaseosa, sin embargo, a pH 4 y 5, la actividad del conservante se ve influenciada negativamente.

Las bebidas carbonatadas tienen un alto contenido de azúcar, es decir, aproximadamente 110 g/L de carbohidratos para la mayoría, estos azúcares están principalmente en forma de glucosa, fructosa y sacarosa, ya que la mayoría de compañías usan azúcar de caña o jarabe de maíz alto en fructosa, que consiste en 55% de fructosa y 45% de glucosa en peso, en sus fórmulas ⁹.

La bebida gaseosa de descarte presentó 76 g/L de azúcares reductores directos y totales. La determinación se realizó por el Método de Fehling según las Normas mexicanas NMX-F-312-1978, un ensayo cualitativo que indica la presencia de azúcares reductores, donde el ión cuproso (Cu^{+1}) producido forma un precipitado rojizo de óxido cuproso.

Ya que los monosacáridos pueden ser oxidados por agentes oxidantes relativamente suaves tales como el ion cúprico (Cu^{+2}), el carbono carbonílico se oxida a grupo carboxílico. La glucosa y otros azúcares capaces de reducir iones cúpricos se denominan azúcares reductores. Esta propiedad es la base de la reacción de Fehling, También es posible estimar la concentración del azúcar a partir de la medición de la cantidad de agente oxidante que se reduce por la acción de una solución de azúcar. ⁵⁷ Según el método de ensayo para la determinación de azúcares reductores directos y azúcares reductores totales de acuerdo a la norma NMX-V-006-NORMEX-2013 ⁵⁸, los Azúcares reductores totales (ART), son monosacáridos que poseen grupos carbonilos libres, que se obtienen de la hidrólisis ácida y térmica de los polisacáridos. Todas las aldosas son azúcares reductores debido a que contienen un grupo aldehído, pero también algunas cetosas son azúcares reductores ⁵⁹.

A su vez se determinó la Demanda Química de Oxígeno (DQO) de la bebida gaseosa de descarte, alcanzando niveles de 113859.50 mg de O₂/L. Mientras que Matute y col., reportaron una DQO igual a 126000 mg de O₂/L para una cola negra identificada como P y 70600 mg de O₂/L para la bebida isotónica con sabor a naranja, designada como G.

Comelli et al.³, mencionan que el contenido de azúcar de las bebidas gaseosas (60-150 g/L) confiere a los efluentes resultantes una alta demanda química de oxígeno (DQO), que puede alcanzar niveles de aproximadamente 150000 mg de O₂/L.

La muestra desgasificada por sonicación fue caracterizada fisicoquímicamente en cuanto a: pH, contenido de azúcares disueltos o °Brix, contenido de azúcares reductores por el método del DNS (Ácido 3,5 dinitrosalicílico) y concentración de etanol, tal y como se muestra en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3: Caracterización fisicoquímica de la bebida gaseosa de descarte

Bebida gaseosa de descarte	pH	°Brix	Contenido de azúcares reductores (g/L Glucosa)	Concentración de etanol (g/L)
Amarilla	2.50	10.0	15.68	0.062

La bebida gaseosa de descarte presento un pH igual a 2.5, tal como se observa en la Tabla 3.3 y en la Figura N 3.1.



Figura 3.1: Registro del pH en la bebida la bebida gaseosa de descarte

La acidez es una función de los acidulantes que ajustan el pH para facilitar la función del benzoato como conservante²⁹.

Según la Norma Técnica Peruana (NTP)²⁷, el contenido de pH en bebidas gaseosas se encuentra en el rango de 2.5 a 4.0²⁷.

La bebida gaseosa de descarte presento un contenido de azúcares disueltos igual a 10 °Brix, tal como se muestra en la Tabla 3.3 y Figura 3.2.



Figura 3.2: Registro del contenido de azúcares disueltos o °Brix en la bebida gaseosa amarilla

Según Steen et al.³⁰, una bebida gaseosa típica tendrá un 10% de azúcar, normalmente definido como el nivel de °Brix, que es el porcentaje en peso del peso de sacarosa presente.

Es decir, 1 °Brix correspondería a un índice de refracción de una solución de sacarosa en agua al 1%⁵⁰.

Se debe considerar que la bebida gaseosa de descarte contiene además de sacarosa, otros azúcares, ácidos, sales y aditivos que aportan la viscosidad y pueden afectar el índice de refracción.

Blanco y Carbajal, al analizar 20 muestras de bebidas carbonatadas, reportaron valores de °Brix entre 10 y 11, valores que se encuentran dentro del rango permitido por la Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense de Bebidas Carbonatadas.

La bebida gaseosa de descarte presento un contenido de azúcares reductores por el método del DNS igual a 15.8 g/L de glucosa, tal como se muestra en la Tabla 3.3.

Según, Morrow et al.²⁹, los endulzantes utilizados en las bebidas carbonatadas pueden ser sacarosa granulada, sacarosa en solución, azúcar invertido, dextrosa y jarabe de maíz alto en fructosa.

La mayoría de compañías usan azúcar de caña o jarabe de maíz alto en fructosa, que consiste en 55% de fructosa y 45% de glucosa en peso, en sus fórmulas ⁹.

Se puede lograr un perfil de dulzura deseada mediante la combinación selectiva de estos diferentes tipos de carbohidratos ³⁰

La bebida gaseosa de descarte presento una concentración de etanol igual a 0.062 g/L, tal como se muestra en la Tabla 3.3.

Según la NTP 214.001²⁷, el límite máximo de alcohol en las bebidas gasificadas jarabeadas es igual a 0.5% v/v.

Ferrel ⁶⁰, reporta concentraciones de etanol en bebidas gasificadas jarabeadas (gaseosas) entre 0.0038 y 0.23 g/L.

3.2 Inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* en Alginato de calcio:

Se inmovilizo 10 g de levadura en Alginato de sodio al 2%, obteniéndose aproximadamente 250 mL de perlas uniformes de aproximadamente 2 mm de diámetro, de color crema y consistencia flexible y estable, tal como se muestra en la Figura 3.3.

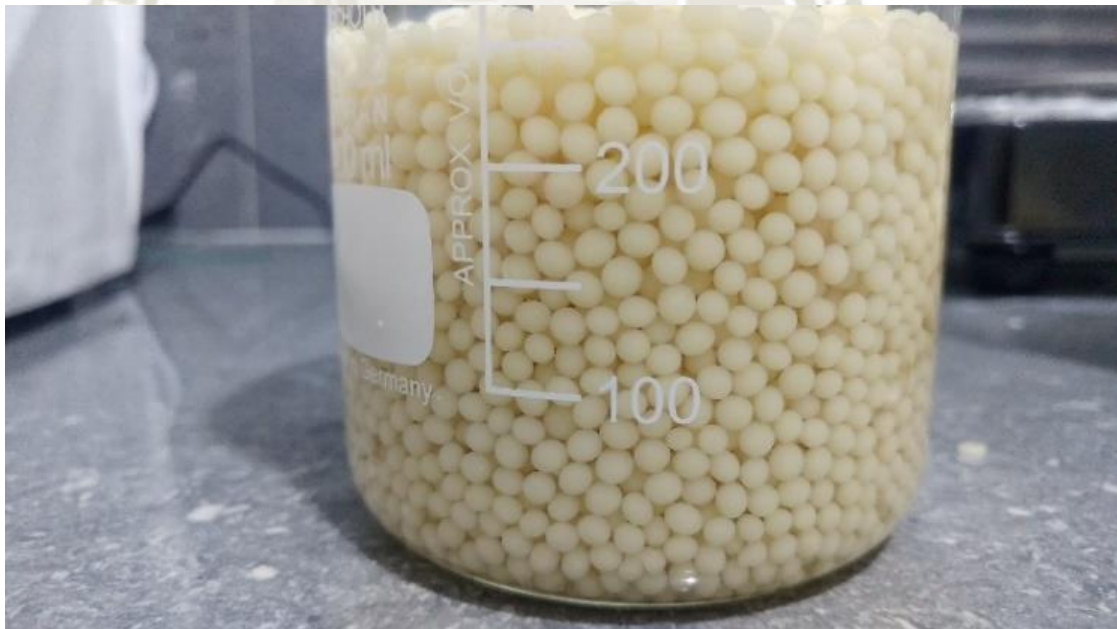


Figura 3.3: Levaduras inmovilizadas en Alginato de calcio

Cabe mencionar, que se obtuvieron esferas indefinidas y frágiles a una concentración de Alginato de sodio al 1%.

La levadura seca instantánea (Fleischmann) se resuspendió en suero fisiológico estéril a 37 °C, ya que Salmon y col.⁶¹, mencionan que las levaduras activas deshidratadas (LAD) se obtienen industrialmente mediante el secado y granulación de la pasta de las levaduras hasta que los contenidos en agua lleguen a valores del 6 al 8 %. En este estricto paso de secado se induce una reducción del volumen celular interno. En estas condiciones, la LAD conserva una elevada viabilidad después del secado. Antes de usarse, la LAD necesita, pues, ser rehidratada con agua (generalmente a 37 °C, durante 30 minutos). La fase de rehidratación es imprescindible para devolver el agua a los contenidos habituales del interior de las células (aproximadamente el 99 %).

Najafpour et al.⁶², realizaron la preparación de células inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* al 1.5%, 2%, 3% y 6% de alginato, concluyendo que la concentración adecuada de alginato basada en la actividad de las perlas para la producción de etanol fue del 2%. Las perlas con bajo contenido de alginato (1.5%) eran demasiado suaves y fácilmente rompibles, mientras que las perlas con alto contenido de alginato (6%) eran muy duras y rígidas para la penetración del sustrato.

Ercan et al.⁶³, estudiaron tres concentraciones diferentes (2%, 2.5% y 3%) de alginato de calcio para observar el efecto de este parámetro en la fermentación de extracto de vaina de algarroba utilizando *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada. Sus resultados indican claramente que las concentraciones más altas de alginato de calcio mostraron valores más bajos de rendimiento de etanol, posiblemente porque las superficies de las perlas de alginato de calcio contenían agregaciones más densas de las células de *S. cerevisiae*, disminuyendo el área de superficie total disponible y por lo tanto haciendo más difícil que la glucosa, fructosa y sacarosa puedan infiltrarse en los poros celulares para su consumo.

También, Lee et al.⁶⁴, mencionan que la concentración de alginato de sodio al 2% proporcionó el mejor equilibrio entre porosidad y resistencia, reportando que la ultraestructura de las perlas de alginato de calcio por TEM corresponde al modelo de "caja de huevos".

Mohd Azhar et al.³⁸ inmovilizaron células de levadura usando diferentes concentraciones de PVA y Alginato de sodio, obteniendo perlas esféricas uniformes

utilizando PVA al 10% y Alginato de sodio al 2% con un diámetro medio de 2.89 mm; mencionando que el Alginato de sodio afecta la formación de gel reticulado, mientras que el PVA mejora la estabilidad de las perlas de gel, y que por lo tanto, el aumento de la concentración de Alginato de sodio y PVA mejora el área de la superficie, elimina la aglomeración de perlas de hidrogel y mantiene la estabilidad y la resistencia mecánica de las células atrapadas.

Sin embargo, Yuvadtkun et al. ⁴³, mencionan que además del atrapamiento de células en la matriz de inmovilización, la inmovilización de células por adsorción en portadores sólidos es otro método ampliamente utilizado. Los soportes que se han utilizado ampliamente fueron materiales lignocelulósicos como tallos de sorgo dulce, luffa, bagazo de sorgo, bagazo de caña de azúcar y fibra prensada de palma. La adsorción celular en materiales lignocelulósicos tiene varias ventajas que incluyen un bajo costo del portador, la simplicidad del procedimiento de inmovilización, una alta resistencia del portador y durabilidad.

3.3 Evaluación del efecto del pH y la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación alcohólica de la bebida gaseosa de descarte:

3.3.1 Fermentación alcohólica de las bebidas gaseosas de descarte:

Se configuro un biorreactor para la fermentación de la bebida gaseosa de descarte según la norma DIN 28131⁵⁶, a partir de un recipiente de vidrio de 1400 mL de 12 cm de diámetro (d_1) y 16 cm de altura, en cuya tapa se perforo 03 agujeros: uno central de aproximadamente 0.5 cm y dos agujeros a cada lado del mismo, uno de 1 cm y el otro de aproximadamente 1.2 cm.

En el agujero central se encuentra el eje del motor DC de 6 V acoplado a una hélice de 4 cm de largo (d_2) y 1.3 cm de ancho (h_3) para el sistema de agitación, ubicada a 3 cm de la base (h_2).

En el agujero lateral de 1 cm se encuentran dos conectores de manguera, uno hacia el exterior, al que se ajustó 35 cm de manguera de plástico de ¼" de diámetro, y otro hacia el interior al que se ajustó 10 cm de manguera de plástico del mismo diámetro, para acoplar a ésta una minibomba sumergible de agua de 5 V con una potencia de 0.4 a 1.5 W, acondicionada con una malla filtrante, para la toma de muestra del sistema.

En el agujero lateral de 1.2. cm, se acoplo un conector de manguera hacia el exterior, y al que se ajustó 7 cm de manguera de plástico de 3/8'' de diámetro, para acoplar a ésta, un airlock o sello de aire, dispositivo que permite que un recipiente cerrado libere gases, e impide que el aire pueda entrar en el recipiente.

El sistema de agitación y la toma de muestra se realizó de forma manual a través de un sistema electrónico con Arduino Mega.

Cada biorreactor contiene 1 L de la bebida gaseosa de descarte acondicionada al pH a evaluar y con el inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* al 1 %, con o sin inmovilización, alcanzando una altura de 12 cm.

Todos los tratamientos se incubaron en condiciones anaeróbicas, temperatura ambiente y agitación de 80 rpm por 16 h.

Se configuro una réplica del biorreactor, ambos se muestran en la Figura 3.4

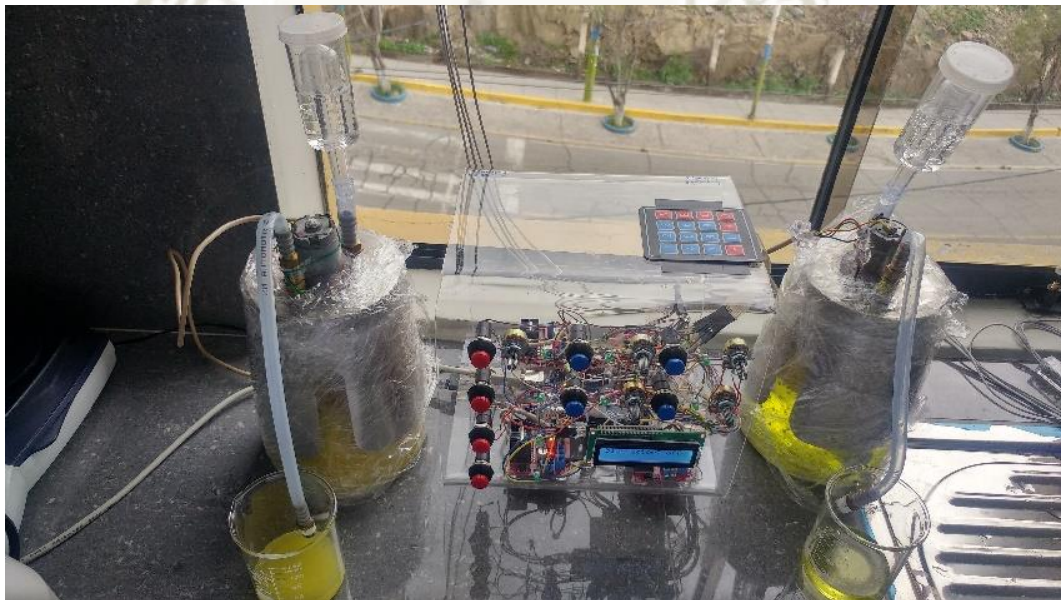


Figura 3.4: Biorreactores configurados para la fermentación de la bebida gaseosa de descarte.

Según Conelli et al.⁴⁷, los azúcares fermentables simples pueden usarse directamente en fermentaciones sin necesidad de precondicionamiento de medios. Sin embargo, Turhan et al.⁴⁸, considera que un medio de fermentación suplementado con una fuente de N favorece la producción de etanol.

Mohd Azhar et al.³⁸ evaluaron la fermentación discontinua de galactosa a etanol, utilizando el 1 % de *Saccharomyces cerevisiae* de tipo salvaje inmovilizada en perlas de alginato PVA.

Mientras que Turhan et al.⁴⁸ evaluaron el tamaño del inóculo, 1%, 3% o 5% de inóculo sobre los parámetros cinéticos en la fermentación de algarrobo. La concentración máxima de etanol (42.90 g/L) se obtuvo con un inóculo inicial del 3%.

Oziyci et al.⁶⁵, evaluaron el efecto de la agitación en la fermentación del extracto de vaina de algarrobo en la obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada, obteniéndose mayor rendimiento de etanol a una agitación de 150 rpm.

Leal Granadillo y col.⁶⁶, realizaron los estudios de fermentación del mosto de *Agave cocui* en un Biorreactor marca Bioflo 110 el cual posee agitador, bombas de líquidos, rotámetro, válvulas para agua de enfriamiento, así como sensores de temperatura, agitación, flujo de aire, pH-metro, oxígeno disuelto y el efecto antiespumante. Por la parte lateral dispone de un dispensador de muestras con vial de recolección. Todo controlado automáticamente.

Ercan et al.⁶³, realizaron la optimización de la producción de etanol a partir del extracto de vaina de algarrobo utilizando células inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* en un biorreactor de tanque agitado. Los experimentos de fermentación por lotes se realizaron en un biorreactor (Sartorius Biostat B Plus, Alemania) con un recipiente de 5 L (volumen de trabajo de 3 L). La temperatura se ajustó 30 °C y el pH se controló entre pH 5.0, 5.5 y 6.0. Después de transferir células inmovilizadas asépticamente al recipiente del biorreactor, se realizó la fermentación de etanol durante 36 h, con muestras tomadas cada 2/3 h durante las primeras 15 h y cada 6 h durante el período de tiempo restante.

3.3.2 Determinación del pH durante la fermentación alcohólica de la bebida gaseosa de descarte:

Durante la fermentación alcohólica, las células de levadura se exponen progresivamente a un ambiente muy estresante debido al gran decrecimiento del pH externo y al aumento de acumulación de etanol en el medio exterior. Un ambiente así,

induce progresivamente a una leve reducción de la viabilidad de la célula, relacionado con las alteraciones de la membrana plasmática celular, la cual, en condiciones de estrés, como por ejemplo, disminución de nutrientes y temperaturas de fermentación altas o bajas, podría llevar a una caída brusca de la viabilidad de la célula hasta cero, antes que la fermentación alcohólica se hubiese completado ⁶¹.

Durante la fermentación de la bebida gaseosa de descarte acondicionada a un pH 4 y pH 5 se registró el pH.

En la Tabla 3.4 se muestra el promedio de los valores de pH de dos ensayos por tratamiento.

Tabla 3.4: Registro del pH durante la fermentación alcohólica de los tratamientos de la bebida gaseosa de descarte

Muestra	Tiempo (h)	pH			
		4C	4S	5C	5S
0	0	4.00	4.00	5.00	5.00
I	2	3.28	3.72	3.91	4.33
II	4	3.19	3.47	3.81	4.08
III	6	3.13	3.33	3.65	3.88
IV	8	3.03	3.28	3.52	3.82
V	10	2.99	3.25	3.44	3.69
VI	12	2.97	3.23	3.36	3.66
VII	14	2.97	3.22	3.34	3.63
VIII	16	2.97	3.21	3.30	3.58

Leal Granadillo y col.⁶⁶, mencionan que el nivel de acidez o basicidad que contenga el medio que contendrán las levaduras que promoverán la producción de alcohol, determinará el nivel de consumo de sustrato, así como la velocidad de fermentación. La actividad de las levaduras disminuye cuando se encuentra a niveles de pH bajos. Por lo que en un pH óptimo es donde el metabolismo de las levaduras es satisfactorio para promover un buen consumo del sustrato. Según varias investigaciones el pH óptimo

para el crecimiento de las levaduras en la fermentación alcohólica oscila en el rango de 3 y 5.

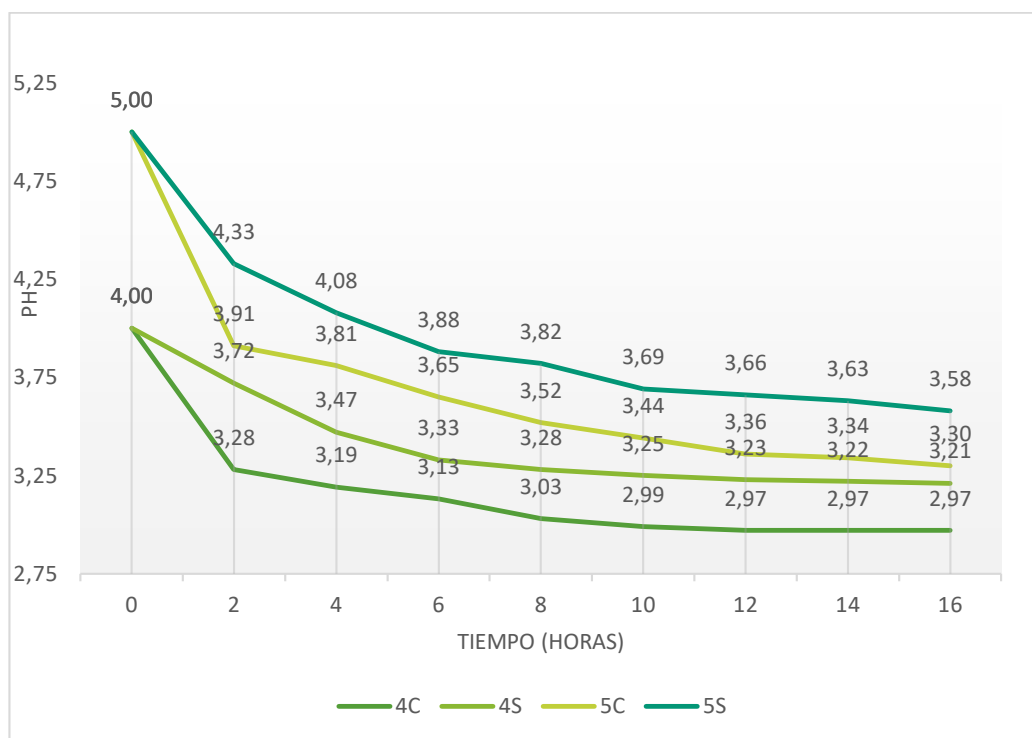


Figura 3.5: pH durante la fermentación alcohólica de los tratamientos de la bebida gaseosa de descarte

En la Figura 3.5, se observa el descenso del valor del pH, principalmente durante las 2 primeras horas de la fermentación de la bebida gaseosa de descarte, esto se evidencia en la pendiente que describe la curva. Durante las siguientes horas el pH de todos los tratamientos desciende paulatinamente hasta aproximadamente las 14 horas. Se presume que la disminución del pH es producto de la conversión de azúcares en etanol, además de la producción de ácidos orgánicos.

Suarez Machín y col.³⁴ mencionan que las levaduras tienen la ventaja de soportar, medios más ácidos, que otros microorganismos, lo que es aprovechado en los procesos industriales para mantener el medio controlado de bacterias que puedan competir por el sustrato.

Salmon y col.⁶¹, mencionan que la membrana citoplasmática es la única barrera existente entre el citoplasma celular y el medio exterior. Dicha parte subcelular de la

célula tiene un papel importante en la interfase, puesto que ayuda a la célula a luchar contra los efectos perjudiciales del etanol y de la acidez del mosto, la membrana plasmática está constituida mayoritariamente por una bicapa lipídica formada por un equilibrio de fluidos de diferentes clases de fosfolípidos, creando un ambiente marcadamente apolar que envuelve a la célula de la levadura. Por ella misma, dicha membrana no es fácilmente permeable a diferentes macromoléculas e iones, con la excepción de los protones (iones H^+). La acumulación de etanol en el medio, durante la fermentación alcohólica, interactúa intensamente con el funcionamiento de la membrana plasmática como interfase entre dicho medio y la parte interna de la célula. Sus principales efectos deletéreos son la pérdida de protones por la membrana plasmática y la inhibición parcial de la actividad enzimática ATPasa de bombeo de protones. Por lo tanto, las células de levadura tienen la obligación de consumir más energía (en forma de ATP), para mantener la homeostasis del pH, hasta que el equilibrio entre la entrada pasiva de protones y su expulsión por la actividad ATPasa de bombeo de protones no pudiese sostenerse, llevando la célula hacia la muerte. El efecto tóxico del etanol se ve incrementado por temperaturas bajas (por debajo de los 8-10 °C) e intermedias (en el intervalo de los 20-30 °C), dependiendo de la concentración de etanol. Los esteroides de membrana tienen una función importante en estabilizar la membrana plasmática y en fortalecerla contra dicho efecto tóxico del etanol.

Turhan et al. ⁴⁸, evaluaron el efecto del control del pH a 5.5 en la producción de etanol a partir de extracto de algarrobo mediante el uso de *Saccharomyces cerevisiae*. La fermentación con control de pH resultó en una productividad de etanol ligeramente mayor (3.37 g/L/h) en comparación con, sin control de pH (3.26 g/L/h). Además, mientras que la tasa de crecimiento máxima fue de 0.54 g/L/h con control de pH, fue de 0.10 g/L/h sin control de pH.

Mientras que Ercal et al. ⁶³, al evaluar el efecto del pH en la optimización de la producción de etanol a partir de extracto de vaina de algarrobo utilizando células inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* en un biorreactor de tanque agitado, no encontraron que los cambios en los valores de pH 5.0, 5.5 y 6.0 en este rango tuvieran un efecto significativo sobre la fermentación de etanol.

3.3.3 Contenido de azúcares disueltos o °Brix durante la fermentación alcohólica de la bebida gaseosa de descarte:

Se registró el contenido de azúcares disueltos o °Brix durante la fermentación de la bebida gaseosa de descarte acondicionada. En la Tabla 3.5 se muestra el promedio de los valores del contenido de azúcares disueltos o °Brix de dos ensayos por tratamiento.

Tabla 3.5: Registró del contenido de azúcares disueltos o °Brix durante la fermentación alcohólica de los tratamientos de la bebida gaseosa de descarte

Muestra	Tiempo (h)	° Brix			
		4C	4S	5C	5S
0	0	10.0	10.0	10.0	10.0
I	2	8.7	9.7	8.9	9.9
II	4	8.1	8.5	8.6	9.5
III	6	7.2	6.9	7.9	8.4
IV	8	6.0	5.4	6.9	7.2
V	10	5.0	4.2	5.9	6.0
VI	12	4.2	3.5	4.7	4.8
VII	14	3.6	3.1	3.8	3.9
VIII	16	3.1	3.1	3.3	3.4

Una vez obtenido el resultado en °Brix se puede obtener fácilmente el grado alcohólico probable de la muestra mediante la aplicación de la siguiente Ecuación 7⁶⁷:

$$\%vol = (0.6757 \times \text{°Brix}) - 2.0839 \quad [\text{Ec. 7}]$$

Por lo tanto, a partir de una muestra igual a 10 °Brix es posible obtener aproximadamente 4.67 %vol de etanol.

Según Mariam et al.⁶⁸, la concentración de azúcar es crítica en el proceso de fermentación, influye tanto en la tasa de producción y el rendimiento final de etanol y en el crecimiento fisiológico de la levadura.

Rojas y col.⁶⁹, mencionan que los sistemas de fermentación de las levaduras requieren como principales nutrientes una fuente de carbono o glucosa. Sin embargo, una alta concentración de este último sustrato puede inhibir el crecimiento de la levadura y la fermentación como resultado de una elevada presión osmótica.

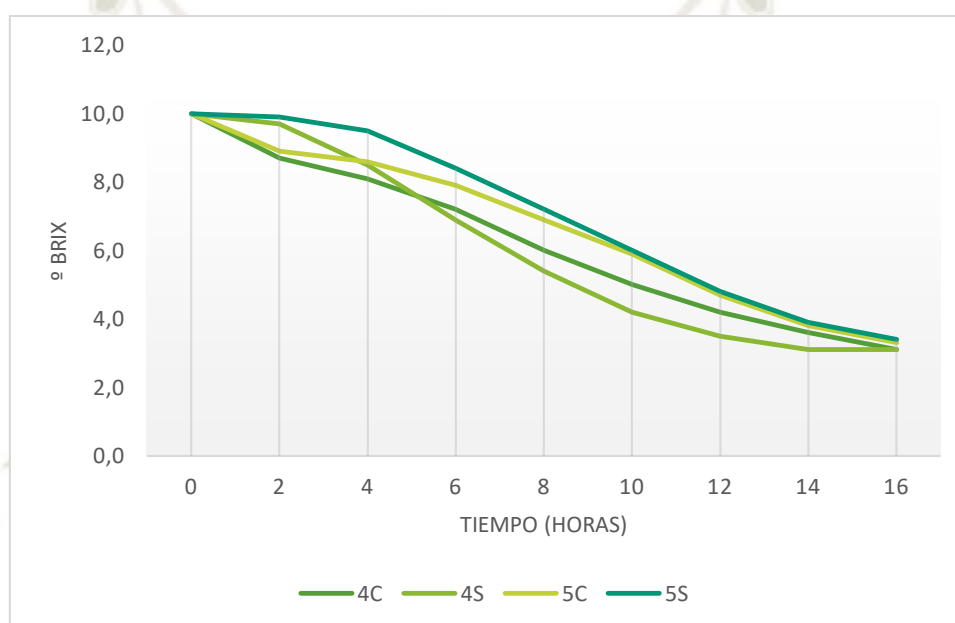


Figura 3.6: Contenido de azúcares disueltos o °Brix durante la fermentación alcohólica de los tratamientos de la bebida gaseosa de descarte

En la Figura 3.6, se observa el descenso del contenido de azúcares disueltos o °Brix durante la fermentación de la bebida gaseosa de descarte, principalmente en el tratamiento acondicionado a un pH 4 sin inmovilización.

3.3.4 Contenido de azúcares reductores por el método del DNS (Ácido 3,5 dinitrosalicílico) durante la fermentación alcohólica de la bebida gaseosa de descarte:

Según el método Miller⁷⁰, los azúcares reductores pueden reducir al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) bajo determinadas condiciones. Cuando el ácido 3,5-

dinitrosalicílico es reducido en presencia de calor, por los azúcares reductores que entran en contacto con él, se desarrolla un cambio de color parecido al café (con variaciones de amarillo hasta café). El cambio de coloración puede entonces determinarse por lecturas de densidad óptica, leídas por espectrofotometría a una determinada longitud de onda. La concentración de los azúcares reductores totales liberados en la muestra se determina haciendo una interpolación en la curva patrón del azúcar utilizado, graficando la absorbancia en función de la concentración.

Para la determinación del contenido de azúcares reductores por el método del DNS (Ácido 3,5 dinitrosalicílico) se elaboró la recta de calibración a partir de una serie de diluciones de la solución stock de glucosa 50 mM y el valor promedio (\bar{X}) de la absorbancia (A), tal como se observa en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6: Descripción de los datos para la recta de calibración del método del DNS

Tubo	Concentración de glucosa (mM)	Absorbancia (A)			\bar{X}
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	
1	2	0.044	0.044	0.044	0.044
2	4	0.106	0.103	0.105	0.105
3	6	0.152	0.134	0.140	0.142
4	8	0.223	0.212	0.218	0.218
5	10	0.245	0.252	0.251	0.249
6	20	0.585	0.583	0.580	0.583
7	30	0.928	0.920	0.925	0.924
8	40	1.212	1.169	1.175	1.185
9	50	1.554	1.434	1.450	1.480

Finalmente, se elaboró la recta de calibración con la concentración del estándar de glucosa (mM) y su correspondiente valor promedio de la absorbancia, como se muestra en la Figura 3.7

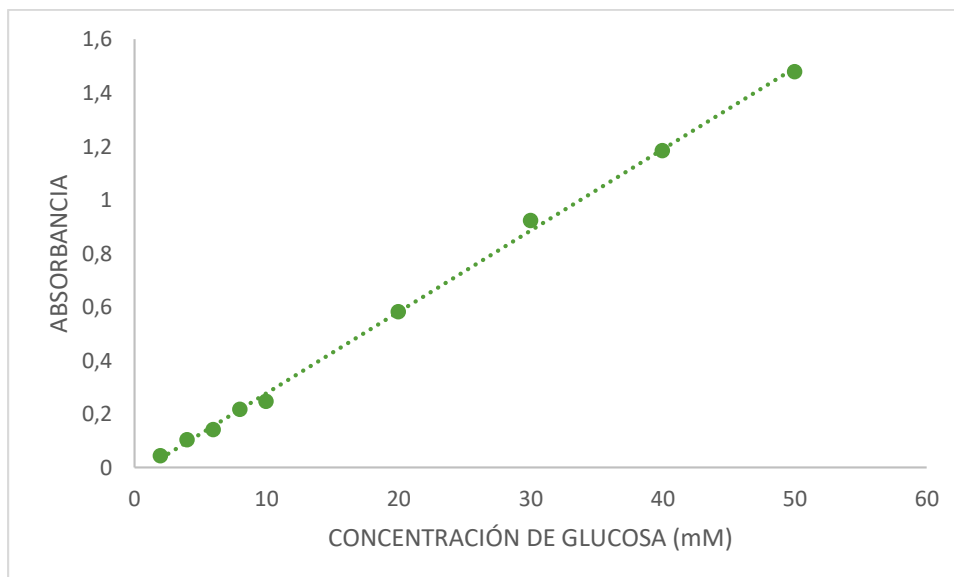


Figura 3.7: Recta de calibración para el estándar de glucosa

Por regresión lineal, se obtuvo el coeficiente de correlación, r igual a 0.9987, es decir, que todos los puntos tienen correlación respecto a una línea de pendiente positiva.

La curva de calibración del presenta la siguiente ecuación:

$$y = 0.0304x - 0.0266$$

Con los siguientes parámetros; a es la ordenada en el origen de la recta y b la pendiente de la recta:

$$a = -0.0266$$

$$b = 0.0304$$

Ávila y col. ⁷¹, determinaron la concentración de los azúcares reductores por el método del DNS en muestras de extracto de piñas crudas, piñas cocidas y hojas de *Agave cocui* haciendo una interpolación en la curva patrón de glucosa, graficando la absorbancia en función de la concentración, encontrando un $r = 0.9999$.

El cálculo de la concentración de glucosa (g/L) en los diferentes tratamientos se realizó considerando la relación entre la concentración conocida del estándar y el promedio de la absorbancia (A) correspondiente. En la Tabla 3.7 se muestra el promedio de los valores de la concentración de glucosa (mM y g/L) de dos ensayos por tratamiento.

Tabla 3.7: Contenido de azúcares reductores por el método del DNS durante la fermentación alcohólica de los tratamientos de la bebida gaseosa de descarte

Concentración de glucosa (g/L) en los diferentes tratamientos													
Muestra	Tiempo (h)	4C			4S			5C			5S		
		A	mM	g/L	A	mM	g/L	A	mM	g/L	A	mM	g/L
I	2	1.416	474.54	85.49	1.554	519.93	93.67	1.356	454.80	81.94	1.626	543.62	97.94
II	4	1.280	429.80	77.43	1.294	434.41	78.26	1.337	448.55	80.81	1.520	508.75	91.65
III	6	1.058	356.78	64.28	0.902	305.46	55.03	1.177	395.92	71.33	1.276	428.49	77.19
IV	8	0.808	274.54	49.46	0.537	185.39	33.40	0.880	298.22	53.73	0.944	319.28	57.52
V	10	0.520	179.80	32.39	0.264	95.59	17.22	0.670	229.14	41.28	0.680	232.43	41.87
VI	12	0.292	104.80	18.88	0.108	44.28	7.98	0.395	332.76	24.98	0.366	129.14	23.27
VII	14	0.164	62.70	11.30	0.036	20.59	3.71	0.207	76.84	13.84	0.185	69.61	12.54
VIII	16	0.061	28.82	5.19	0.015	13.68	2.47	0.081	35.39	6.38	0.073	32.76	5.90

Ávila y col⁷¹. mencionan que la cuantificación de azúcares es importante porque el alcohol obtenido en la fermentación depende de la cantidad de azúcares reductores presentes.

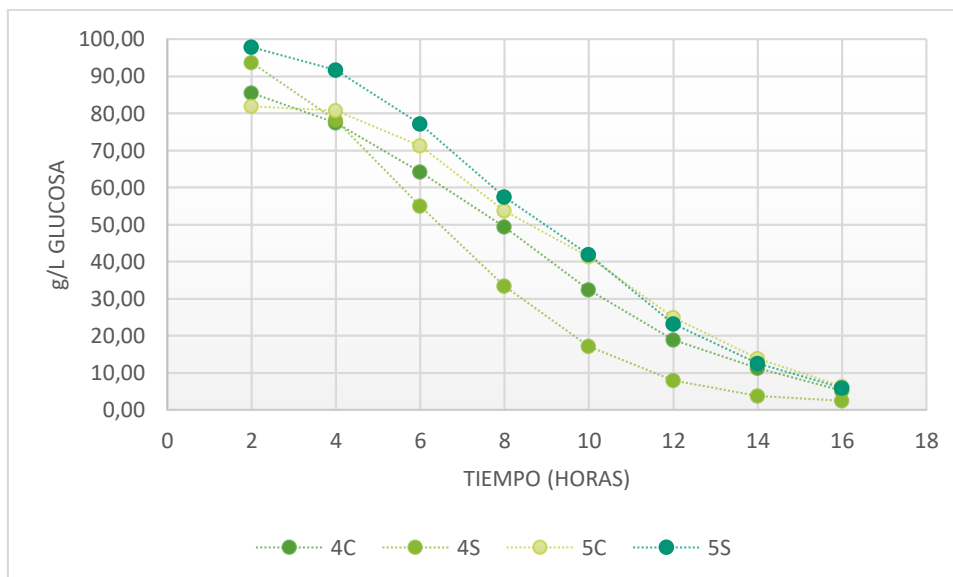


Figura 3.8: Concentración de glucosa (g/L) durante la fermentación alcohólica de los tratamientos de la bebida gaseosa de descarte

En la Figura 3.8, se observa el descenso de la concentración de glucosa (g/L) durante la fermentación alcohólica de los tratamientos de la bebida gaseosa de descarte principalmente en los tratamientos acondicionados a un pH 4 con y sin inmovilización.

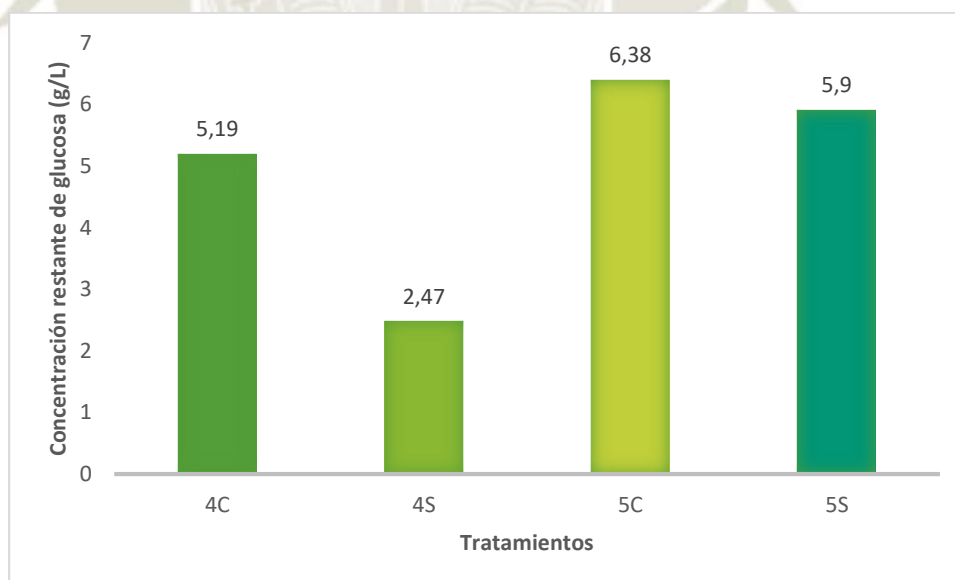


Figura 3.9: Comparación de la concentración de glucosa (g/L) restante en los tratamientos

En la Figura 3.9 se observa que el tratamiento acondicionado a un pH igual a 4 y sin inmovilización presenta la menor concentración de glucosa restante igual a 2.47 g/L.

Mariam et al. ⁶⁸ al evaluar producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* GC-HB31 libre e inmovilizada al 0.67 % en cultivo estacionario, determinaron que el consumo de azúcar después de 12 h por las células libres fue de 1.36%, mientras que en las células inmovilizadas fue de 0,92%.

Sin embargo, Lee et al ⁶⁴, demostraron que la fermentación discontinua con levadura inmovilizada en perlas de alginato de calcio requirió menos tiempo de fermentación para convertir glucosa en etanol que las células en fermentación discontinua. El tiempo de fermentación para consumir la glucosa por las células libres fue de aproximadamente 23 h, mientras que las células inmovilizadas con perlas de alginato de calcio al 2% y 2,5% requirieron 20 y 22 h, respectivamente.

Se aplicó un Análisis de varianza (ANOVA), con el fin de hacer una comparación de medias y evaluar si hay diferencia significativa entre los diferentes tratamientos, tal como se muestra en el Anexo 4 y en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8: Relación entre el origen de las variaciones, los grados libertad, la suma de cuadrados y promedio de cuadrados

Origen de las variaciones	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados
Entre grupos	3	17.456	5.819
Dentro de grupos	4	0.100	0.025

Para contrastar, si la estimación entre muestras es significativamente más grande, se utilizó un contraste F de una cola ($P = 0.05$).

El valor calculado de F es igual a:

$$F = \frac{\text{Promedio de cuadrados entre grupos (CME)}}{\text{Promedio de cuadrados dentro de grupos (CMD)}}$$

Por tanto, el valor calculado de F es igual a 232,532 mientras que el valor crítico de F es igual a 6.591.

Puesto que, el valor calculado de F es mayor que el valor crítico, y el valor de P igual a $6.083 \cdot 10^{-5}$ es menor que 0.05, se rechaza la hipótesis nula, por tanto, las medias

muestrales difieren significativamente, es decir al menos en un tratamiento el promedio es distinto con un 95 % de confiabilidad.

Por lo tanto se realiza el test *HSD* de Tukey para identificar los tratamientos que hacen la diferencia.

El test *HSD* (Honestly-significant-difference) de Tukey es igual a:

$$HSD = q\alpha(\sqrt{MSe/n})$$

$q\alpha (V_1, V_2)$ según la Tabla de valores críticos; es igual a la intersección entre V_1 ; número de grupos o tratamientos y V_2 ; grados libertad dentro de los grupos, es decir $q\alpha (4,4)$ es igual 5.76 al 95% de confiabilidad.

MSe o cuadrado del error medio, es igual al cociente entre la suma de cuadrados y los Grados libertad dentro de los grupos, es decir 0.025.

n es igual al tamaño de muestra de cada grupo o tratamiento, es decir igual a 2.

Por lo tanto, *HSD* es igual a 0.6443.

Se construye una matriz relacionando el cociente entre los valores promedio de cada tratamiento, tal como se observa en la Figura 3.10.

Si el valor del cociente es mayor al valor del *HSD*, los tratamientos son significativamente diferentes, por el contrario, si el valor del cociente es menor al valor del *HSD* no hay diferencia significativa entre los tratamientos.

	4C	4S	5C	5S
4C		2.73	1.19	0.71
4S			3.91	3.44
5C				0.47
5S				

Figura 3.10: Matriz de relación entre tratamientos

Por lo tanto, el contenido de glucosa (g/L) es significativamente diferente entre los tratamientos 4C:4S, 4C:5C, 4C:5S, 4S:5C, 4S:5S y . Mientras que no hay diferencia significativa entre los tratamientos 5C:5S.

3.3.5 Concentración de bioetanol por el método enzimático durante la fermentación alcohólica de la bebida gaseosa de descarte:

La concentración de bioetanol C (g/L) se determinó a través del Megazyme Mega-Calc™, que resume los cálculos de la Ecuación 3, ΔA_{ETOH} , diferencia de absorbancias $A_2 - A_1$ para el blanco y la muestra y dilución, D . La hoja de cálculo Megazyme Mega-Calc™, se detalla en el Anexo 3. En la Tabla 3.9 se muestra el promedio de los valores de la concentración de bioetanol (g/L) de dos ensayos por tratamiento.

Tabla 3.9: Concentración de bioetanol (g/L) durante la fermentación alcohólica de los tratamientos de la bebida gaseosa de descarte

Concentración de bioetanol (g/L) en los diferentes tratamientos													
Muestra	Tiempo (h)	4C			4S			5C			5S		
		ΔA_{Et}	D	C (g/L)	ΔA_{Et}	D	C (g/L)	ΔA_{Et}	D	C (g/L)	ΔA_{Et}	D	C (g/L)
0	0	0.6640	1	0.062	0.6640	1	0.062	0.6640	1	0.062	0.6640	1	0.062
I	2	0.1997	100	1.876	0.3590	100	3.374	0.1400	100	1.316	0.1953	100	1.836
II	4	0.0437	1000	4.103	0.0957	1000	8.990	0.0320	1000	3.007	0.0400	1000	3.759
III	6	0.0787	1000	7.392	0.1890	1000	17.760	0.0770	1000	7.236	0.0953	1000	8.958
IV	8	0.1230	1000	11.558	0.2705	1000	25.419	0.1007	1000	9.460	0.1747	1000	16.413
V	10	0.1997	1000	18.763	0.3250	1000	30.540	0.1730	1000	16.257	0.2627	1000	24.683
VI	12	0.2487	1000	23.367	0.3663	1000	34.424	0.2413	1000	22.678	0.3053	1000	28.661
VII	14	0.2620	1000	24.620	0.3937	1000	36.993	0.3053	1000	28.692	0.3887	1000	36.523
VIII	16	0.3897	1000	36.617	0.4020	1000	37.776	0.3400	1000	31.950	0.3973	1000	37.337

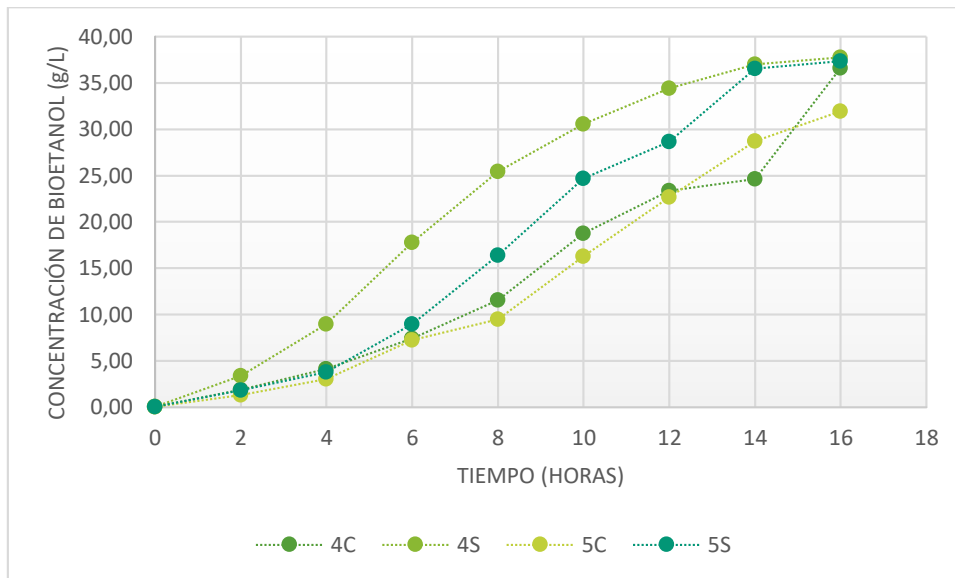


Figura 3.11: Concentración de bioetanol (g/L) durante la fermentación alcohólica de los tratamientos de la bebida gaseosa de descarte

En la Figura 3.11 se muestra como fue la producción de bioetanol durante el tiempo de fermentación.

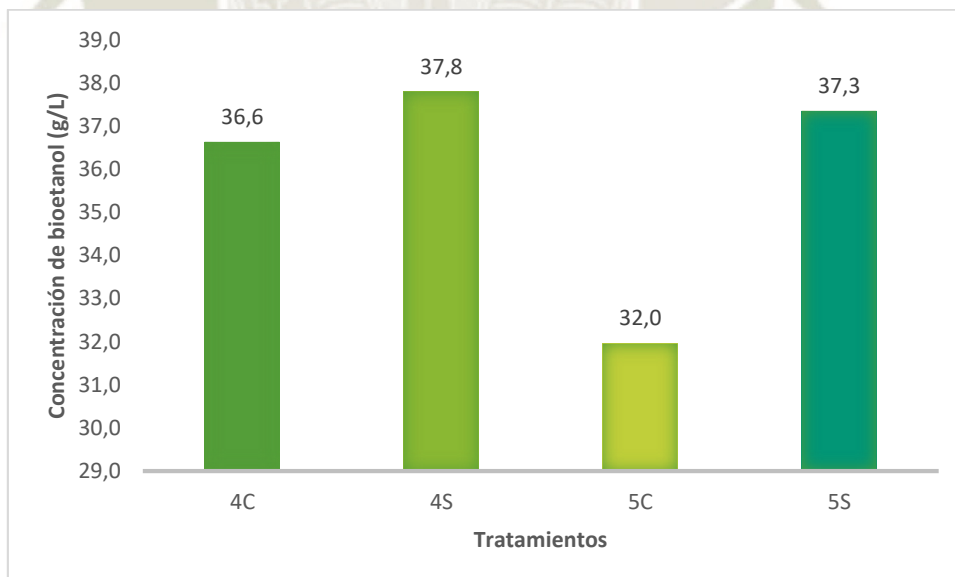


Figura 3.12: Comparación de la concentración de bioetanol (g/L) en los tratamientos

Como se observa en la Figura 3.12, el tratamiento acondicionado a pH 4 sin inmovilización produjo la mayor concentración de bioetanol, mientras que el

tratamiento acondicionado a pH 5 con inmovilización produjo la menor concentración de bioetanol.

Se aplicó un Análisis de varianza (ANOVA), con el fin de hacer una comparación de medias y evaluar si hay diferencia significativa entre los diferentes tratamientos, tal como se muestra en el Anexo 5 y en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10: Relación entre el origen de las variaciones, los grados libertad, la suma de cuadrados y promedio de cuadrados

Origen de las variaciones	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados
Entre grupos	3	43.393	14.464
Dentro de grupos	4	10.864	2.716

Para contrastar, si la estimación entre muestras es significativamente más grande, se utilizó un contraste F de una cola ($P = 0.05$).

El valor calculado de F es igual a:

$$F = \frac{\text{Promedio de cuadrados entre grupos (CME)}}{\text{Promedio de cuadrados dentro de grupos (CMD)}}$$

Por tanto, el valor calculado de F es igual a 5.325 mientras que el valor crítico de F es igual a 6.591.

Puesto que, el valor calculado de F es menor que el valor crítico, y el valor de P igual a 0.069 es mayor que 0.05, se acepta la hipótesis nula, por tanto, las medias muestrales no difieren significativamente.

Por lo tanto, no hay diferencia significativa en la concentración de bioetanol entre los tratamientos.

Mariam et al.⁶⁸, informaron que el rendimiento de etanol obtenido por las células libres fue 7.3% mayor que el rendimiento obtenido de las células inmovilizadas. Además, demostraron que la tasa máxima de conversión de azúcar a etanol por las células libres e inmovilizadas se logró con un pH de 4.5.

Leal Granadillo y col.⁶⁶, evaluaron el efecto de la temperatura y el pH en la fermentación del mosto de *Agave cocui* mediante el consumo de azúcares y la producción de etanol. Se estudiaron procesos de fermentación controlada a las temperaturas de 27, 31, 33, 35 y 37°C, manteniendo el pH constante. Seguidamente se evaluó el proceso fermentativo a pH 3, 4 y 5, manteniendo la temperatura constante. Los resultados encontrados indican que la temperatura y el pH óptimos de fermentación fueron de 33°C y 4, respectivamente. En estas condiciones se obtuvo una concentración de etanol de 7.42 % después de 52.5 horas de fermentación lo que corresponde a una productividad de etanol de 1.14 g/L.h, y un porcentaje de rendimiento de 81.5%.

Según Mohd Azhar et al.³⁸, la productividad del etanol se puede mejorar mediante la inmovilización de células de levadura en matrices poliméricas. La inmovilización ofrece varias ventajas sobre las células libres, incluida la protección contra condiciones ambientales adversas, la fácil separación de la levadura del producto, la reutilización, la alta densidad celular y la reducción del riesgo de contaminación.

Yuvadatkun et al.⁴³, en su estudio sobre la producción de etanol por *Candida shehatae* ATCC 22984 inmovilizada en diversos materiales de soporte como: perlas de terracota, brácteas de coco y elote durante la fermentación discontinua en medio de hidrolizado de paja de arroz; encontraron que la concentración promedio de etanol entre las células inmovilizadas en los diversos materiales de soporte no fue estadísticamente diferente. Estos resultados también se compararon con el lote repetido usando células libres y no se observaron diferencias significativas en el etanol producido.

Behera et al.⁷², compararon el potencial de las células de *S. cerevisiae* inmovilizadas en agar agar y alginato de calcio en la producción de bioetanol a partir de flores de *Madhuca latifolia* L. (Mahula) y cuyos resultados evidenciaron que la concentración de etanol obtenida con las células inmovilizadas (25.2 y 25.75 g/L usando agar agar y alginato de calcio, respectivamente) fue ligeramente mayor que la de las células libres (24.83 g/L), mientras que la absorción volumétrica del sustrato era más en el caso de las células libres (0.581 g/L h) que en el de las células inmovilizadas (0.552 y 0.554 g/L h).

Suarez Machín y col. ³⁴ mencionan que la productividad típica de un proceso discontinuo clásico en batch es de 1.8 a 2.5 g de etanol por litro de fermentador en una hora.

Mohd Azhar et al. ³⁸, evaluaron la reutilización de *S. cerevisiae* tipo salvaje inmovilizada en 4 ciclos de fermentación en lotes repetidos. La concentración máxima de etanol (9.69 g/L) con 100% de actividad relativa de la levadura se obtuvo en el primer ciclo del lote fermentación. La concentración de etanol y la actividad relativa disminuyeron significativamente desde el primer hasta el tercer ciclo, lo que indicó que *S. cerevisiae* inmovilizada todavía era estable y se podía reutilizar para la siguiente fermentación. Sin embargo, la concentración de etanol se redujo significativamente después del tercer ciclo y se obtuvo la concentración más baja de etanol, 7.66 g/L, con una actividad relativa de la levadura del 79.07% en el cuarto ciclo de fermentación. También se observó que el uso repetido de *S. cerevisiae* hizo que las esferas se volvieran frágiles y fácilmente rompibles por una sobrecarga de las células microbianas.

Mariam et al. ⁶⁸, reportaron que la producción máxima de etanol por células de levadura inmovilizadas se obtuvo en el cuarto lote, después de lo cual disminuyó notablemente.

3.4 Evaluación de la remoción de color y Demanda Química de Oxígeno (DQO) en la bebida gaseosa tratada por fermentación alcohólica:

3.4.1 Remoción de Color:

La bebida gaseosa de descarte caracterizada por el color amarillo tuvo un máximo de absorbancia a 429 nm. La representación gráfica del barrido de longitudes de onda se muestra en el Anexo 6.

La bebida gaseosa de descarte según su información nutricional, presenta a la tartrazina como colorante.

La Tartrazina es uno de los colorantes artificiales más utilizados en la industria de alimentos y pertenece a la familia de los colorantes azoicos; dicho colorante le confiere a los alimentos y bebidas un tono amarillo, más o menos anaranjado,

dependiendo de la cantidad añadida, adicionalmente se emplea para obtener colores verdes al mezclarlo con colorantes azules ⁷³.

Matute et al. ², emplearon una longitud de onda de 425 nm para medir el color amarillo de una bebida isotónica con sabor a naranja, designada como G.

La determinación del color de la bebida gaseosa de descarte se realizó registrando la absorbancia al inicio y final de la fermentación alcohólica; además se determinó el % de Remoción del mismo, tal como se muestra en la Tabla 3.11.

En la Tabla 3.11 se muestra el promedio de los valores de dos ensayos por tratamiento.

Tabla 3.11: Registro del color de la bebida gaseosa de descarte antes y después de la fermentación alcohólica de los tratamientos

Color				
Absorbancia (A)	4C	4S	5C	5S
Inicio	0.582	0.582	0.594	0.594
Final	0.189	0.171	0.281	0.276
Remoción (%)	67.5	70.6	52.7	53.5

En la Figura 3.13 se muestra la remoción del color amarillo en los diferentes tratamientos al finalizar la fermentación.

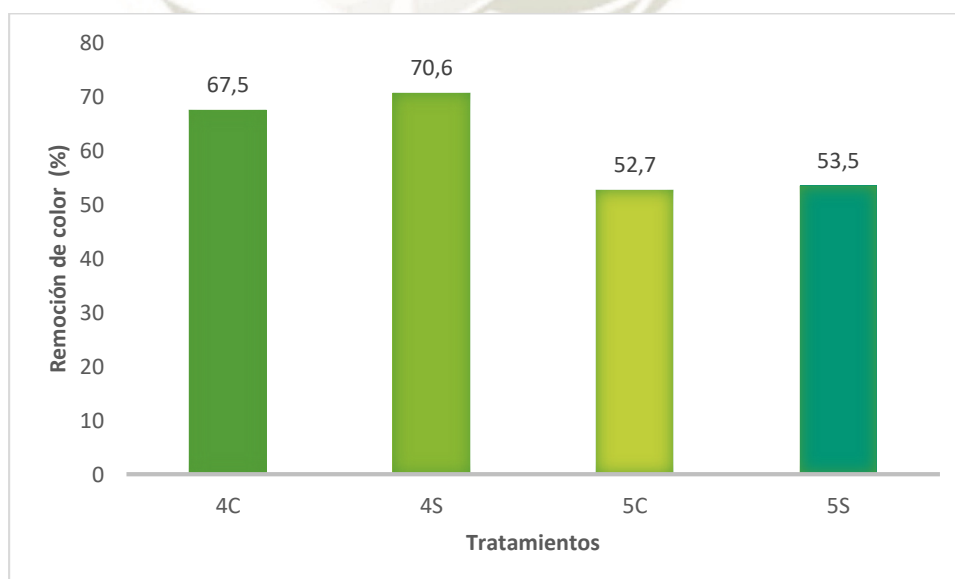


Figura 3.13: Comparación de la Remoción del color (%) en los tratamientos

Se aplicó un Análisis de varianza (ANOVA), con el fin de hacer una comparación de medias y evaluar si hay diferencia significativa entre los diferentes tratamientos, tal como se muestra en el Anexo 7 y en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12: Relación entre el origen de las variaciones, los grados libertad, la suma de cuadrados y promedio de cuadrados

Origen de las variaciones	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados
Entre grupos	3	519.055	173.0183
Dentro de grupos	4	18.7	4.675

Para contrastar, si la estimación entre muestras es significativamente más grande, se utilizó un contraste F de una cola ($P = 0.05$).

El valor calculado de F es igual a:

$$F = \frac{\text{Promedio de cuadrados entre grupos (CME)}}{\text{Promedio de cuadrados dentro de grupos (CMD)}}$$

Por tanto, el valor calculado de F es igual a 37.009 mientras que el valor crítico de F es igual a 6.591.

Puesto que, el valor calculado de F es mayor que el valor crítico, y el valor de P igual a 0.0022 es menor que 0.05, se rechaza la hipótesis nula, por tanto, las medias muestrales difieren significativamente, es decir al menos en un tratamiento el promedio es distinto con un 95 % de confiabilidad.

Por lo tanto se realiza el test HSD de Tukey para identificar los tratamientos que hacen la diferencia.

El test HSD (Honestly-significant-difference) de Tukey es igual a:

$$HSD = q\alpha(\sqrt{MSe/n})$$

$q\alpha(V_1, V_2)$ según la Tabla de valores críticos; es igual a la intersección entre V_1 ; número de grupos o tratamientos y V_2 ; grados libertad dentro de los grupos, es decir $q\alpha(4,4)$ es igual 5.76 al 95% de confiabilidad.

MSe o cuadrado del error medio, es igual al cociente entre la suma de cuadrados y los Grados libertad dentro de los grupos, es decir 4.675

n es igual al tamaño de muestra de cada grupo o tratamiento, es decir igual a 2.

Por lo tanto, HSD es igual a 8.8064.

Se construye una matriz relacionando el cociente entre los valores promedio de cada tratamiento, tal como se observa en la Figura 3.14.

Si el valor del cociente es mayor al valor del HSD , los tratamientos son significativamente diferentes, por el contrario, si el valor del cociente es menor al valor del HSD no hay diferencia significativa entre los tratamientos.

	4C	4S	5C	5S
4C		3.10	14.8	14.0
4S			17.9	17.1
5C				0.8
5S				

Figura 3.14: Matriz de relación entre tratamientos

Por lo tanto, la remoción de color (%) es significativamente diferente entre los tratamientos 4C:5C, 4C:5S, 4S:5C y 4S:5S. Mientras que no hay diferencia significativa entre los tratamientos 4C:4S y 5C:5S.

En los tratamientos acondicionados a pH 4 se realizó la mayor la remoción del color, destacando el tratamiento sin inmovilización en un 70.6 %.

Matute y col.,² en su estudio de evaluación de productos de descarte de una empresa de bebidas no alcohólicas para ser usados como sustrato fermentable por *Saccharomyces cerevisiae*, registró la clarificación de las bebidas no alcohólicas descartadas empleadas como sustratos, con un 80% de remoción en el color, demostrándose la capacidad de *S. cerevisiae* como biosorbente.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha reportado como capaz de biorremediar colorantes. La levadura *S. cerevisiae* tiene enzimas azoreductasas que catalizan compuestos en presencia de varias coenzimas reductoras como FADH₂, NADH y NADPH, mostrando su versatilidad y su potencial uso como agente degradador de colorantes, y gracias a su complejo enzimático se utiliza en otros procesos. Este

complejo enzimático podría ser responsable de la biorremediación o biodegradación de compuestos como los colorantes azoicos ⁷⁴.

3.4.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO):

La determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) de la bebida gaseosa de descarte se realizó al inicio, tal como se muestra en el Anexo 1 y al final de la fermentación alcohólica, tal como se muestra en el Anexo 8. En la Tabla 3.13 se muestran los resultados de dos ensayos por tratamiento.

Tabla 3.13: Registro de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) de la bebida gaseosa de descarte antes y después de la fermentación alcohólica de los tratamientos

DQO				
DQO (mg/L)	4C	4S	5C	5S
Inicio	113859.50	113859.50	113859.50	113859.50
Final	51289.15	52181.81	96672.10	97173.60
Remoción (%)	54.95	54.16	15.09	14.65

En la Figura 3.15 se muestra la remoción de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) en los diferentes tratamientos al finalizar la fermentación.

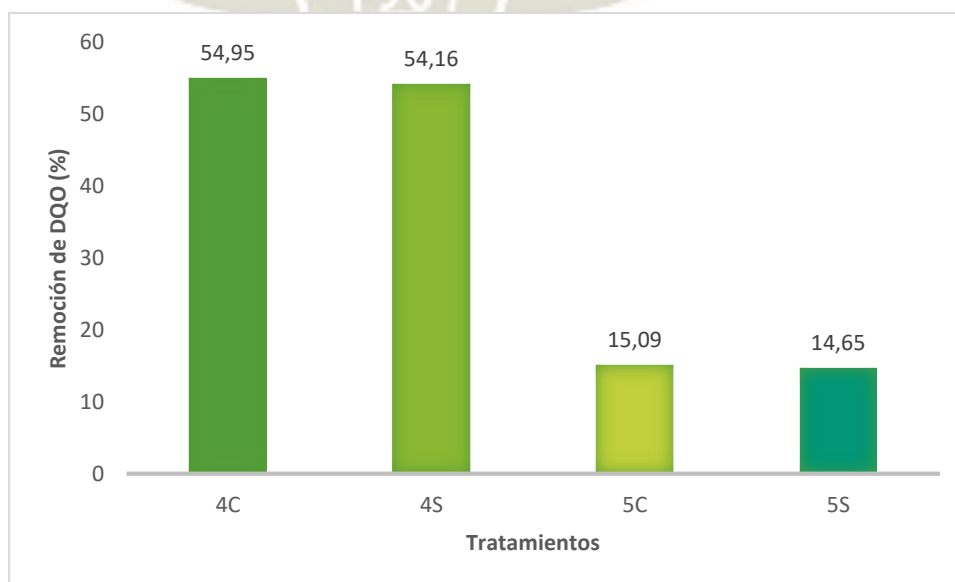


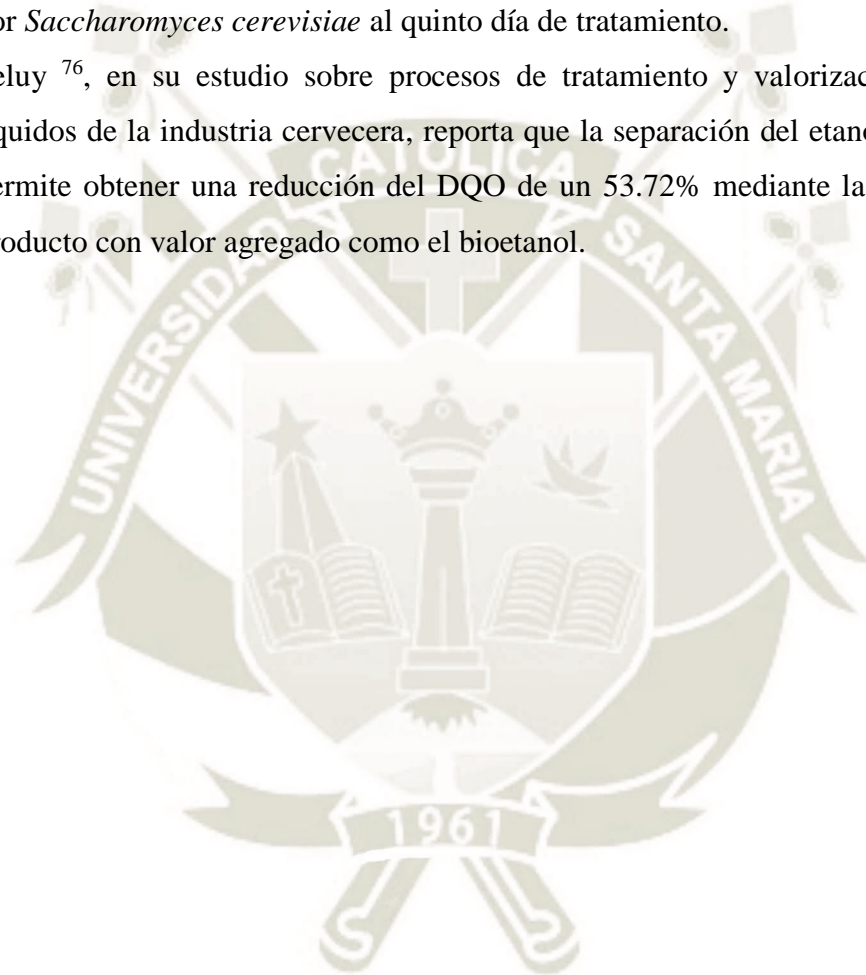
Figura 3.15: Comparación de la Remoción de la DQO (%) en los tratamientos

Se logró la reducción de la Demanda Química de oxígeno (DQO) en un 54 % en los tratamientos acondicionados a pH 4.

Matute et al.², registraron una disminución de aproximadamente 10% del DQO en los líquidos fermentados al comparárseles con los DQO de las bebidas no alcohólicas antes de la fermentación en un máximo de 8 h incubación.

Singh et al.⁷⁵, en su estudio sobre la producción de proteína unicelular y la eliminación de la DQO del agua residual láctea, reportaron la reducción de la misma en un 40% por *Saccharomyces cerevisiae* al quinto día de tratamiento.

Seluy⁷⁶, en su estudio sobre procesos de tratamiento y valorización de efluentes líquidos de la industria cervecera, reporta que la separación del etanol por destilación permite obtener una reducción del DQO de un 53.72% mediante la obtención de un producto con valor agregado como el bioetanol.



CONCLUSIONES

PRIMERA: La bebida gaseosa de descarte se caracterizó fisicoquímicamente; pH igual a 2.5, 10 °Brix o azúcares disueltos utilizando el refractómetro, 15.68 g/L de glucosa por el método del DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) y una concentración de etanol igual a 0.062 g/L por el método enzimático.

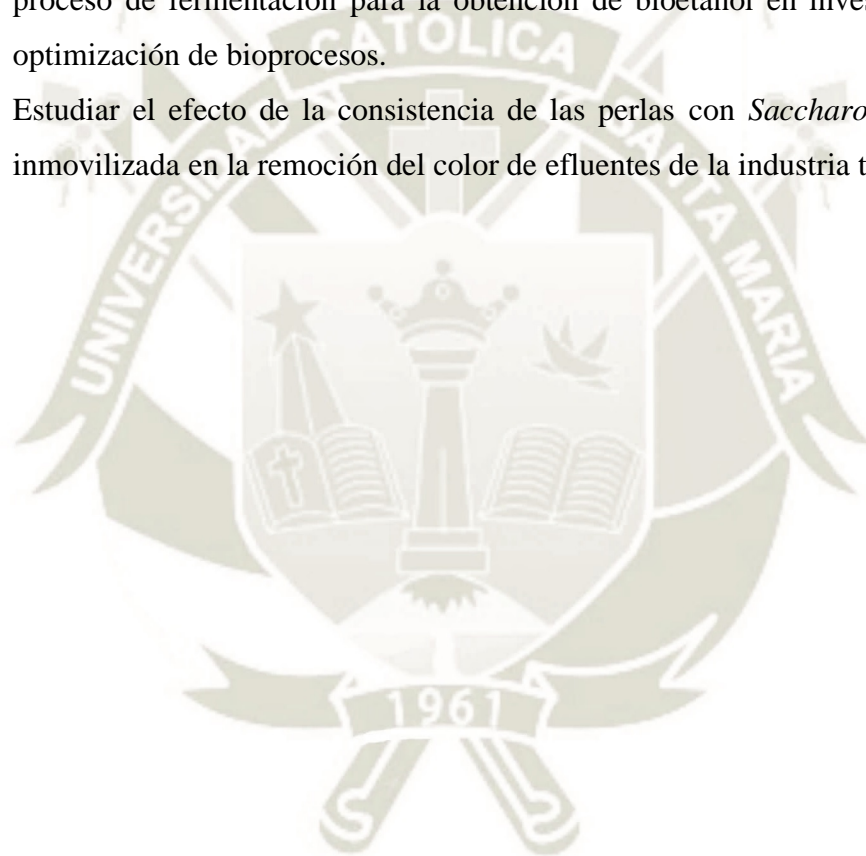
SEGUNDA: Se inmovilizó 10 g de levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae* en Alginato de calcio, al 1 y 2% de Alginato de sodio, por el método de atrapamiento, obteniéndose aproximadamente 250 mL de perlas uniformes de aproximadamente 2 mm de diámetro, de color crema y consistencia blanda a una concentración de Alginato de sodio al 2%. Sin embargo, se obtuvieron esferas indefinidas a una concentración de Alginato de sodio al 1%.

TERCERA: Se evaluó el efecto del pH y la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* sobre las características fisicoquímicas de la bebida gaseosa de descarte durante la fermentación, encontrándose que el valor del pH descendió paulatinamente durante la fermentación en todos los tratamientos hasta un valor promedio igual a 3. El contenido de azúcares disueltos o °Brix, así como la concentración de glucosa disminuyó progresivamente, principalmente en el tratamiento acondicionado a un pH 4 sin inmovilización, hasta aproximadamente 3.1 °Brix y una concentración de glucosa restante igual a 2.47 g/L. La mayor concentración de bioetanol se produjo en el tratamiento acondicionado a pH 4 sin inmovilización, mientras que el tratamiento acondicionado a pH 5 con inmovilización produjo la menor concentración de bioetanol.

CUARTA: Se logró la remoción del color de la bebida gaseosa de descarte en un 70.6 % y una reducción de la Demanda Química de oxígeno (DQO) en un 54 % con el tratamiento acondicionado a pH 4 sin inmovilización.

SUGERENCIAS:

1. Realizar una propuesta a las empresas de bebidas gaseosas locales sobre el tratamiento de sus efluentes por fermentación alcohólica para la obtención de bioetanol.
2. Empresas relacionadas al rubro de la producción de bioetanol a través de sus investigaciones podrían estudiar el efecto de la reutilización de las levaduras inmovilizadas en la obtención de bioetanol y en la viabilidad celular de las células.
3. Evaluar el efecto de la adición de nutrientes, la agitación y la temperatura en el proceso de fermentación para la obtención de bioetanol en investigaciones sobre optimización de bioprocesos.
4. Estudiar el efecto de la consistencia de las perlas con *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en la remoción del color de efluentes de la industria textil.



BIBLIOGRAFIA:

1. EUROMONITOR. Ránking de las bebidas no alcohólicas más vendidas en el Perú. El Comercio. 2018 Mayo 11.
2. Matute-Almeida L, Galindo-Sandoval Y, Delahais I. Evaluación de productos de descarte de una empresa de bebidas no alcohólicas para ser usados como sustrato fermentable por *Saccharomyces cerevisiae*. Evaluation of discard products of a soft drinks industry to be used as fermentable substrate by *Saccharomyces cerevisiae*. 2017;9(18):1-20.
3. Comelli RN, Seluy LG, Grossmann IE, Isla MA. Treatment of High-Strength Wastewater from the Sugar-Sweetened Beverage Industry by an Alcoholic Fermentation Process. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2015;54(31):7687-93.
4. Cussianovich Aguirre KA. Obtención y caracterización de aguardiente de 40° G.L. a partir de gaseosas y néctar de descarte [Tesis de Pregrado]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2016.
5. Wickham R, Xie S, Galway B, Bustamante H, Nghiem LD. Anaerobic digestion of soft drink beverage waste and sewage sludge. *Bioresource Technology*. 2018;262:141-7.
6. Isla MA, Comelli RN, Seluy LG. Wastewater from the soft drinks industry as a source for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2013;136:140-7.
7. Quested T, Ingle R, Parry A. Household Food and Drink Waste in the United Kingdom 2012. UK: WRAP; 2013.
8. Kasmi M, Chatti A, Hamdi M, Trabelsi I. Eco-friendly process for soft drink industries wastewater reuse as growth medium for *Saccharomyces cerevisiae* production. *Clean Technologies and Environmental Policy*. 2016;18(7):2265-78.
9. Dwidar M, Lee S, Mitchell RJ. The production of biofuels from carbonated beverages. *Applied Energy*. 2012;100:47-51.
10. Swain MR, Kar S, Sahoo AK, Ray RC. Ethanol fermentation of mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers using free and immobilized yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Research*. 2007;162(2):93-8.
11. Ruiz H, Wong O. Evaluación Físico - Químicos del Efluente industrial de Embotelladora la Selva S.A en comparación con el Valor máximo admisible de descargas residuales No domesticas de alcantarillado sanitario de la Ciudad de Iquitos [Tesis de Maestría]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana 2013.
12. Roa Parra AL, Cañizares Villanueva RO. Bioremediacion de aguas con fosfatos y nitratos utilizando *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado. *Bistua Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. 2013;10(1).
13. Barrios-Ziolo LF, Gaviria-Restrepo LF, Agudelo EA, Cardona Gallo SA. Tecnologías para la remoción de colorantes y pigmentos presentes en aguas residuales 2015. 2015;82(191):9.
14. Salamanca E. Tratamiento de aguas para el consumo humano. Módulo Arquitectura CUC. 2016;17(2):29-48.
15. Rodríguez S, Fernández M, Bermúdez RC, Morris H. Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. *Rev Iberoam Micol*. 2003;20:164-8.
16. Quevedo Rojas DP. Determinación de las cargas ambientales de la bebida gaseosa "Colombiana" de 350 mL retornable mediante el Análisis de Ciclo de Vida (ACV) [Tesis de Pregrado]. Bogotá: Universidad Distrital Francisco José de Caldas; 2016.
17. Romero JA. Tratamiento de aguas residuales. Teoría y principios de diseño. Ingeniería ECd, editor. Colombia 2010.

18. Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*. 2001;77(3):247-55.
19. Barreda-Reyes KL, Mendoza-Calderón EI, Ortega-Regules AE, Martínez-de-Santos MdL, Netzahuatl-Muñoz AR. Biosorción de colorante naranja ácido 10 por biomasa de levadura aislada de suelo contaminado %J *Revista Cubana de Química*. 2015;27:216-27.
20. Garbisu C, Amézaga I, Alkorta I. Biorremediación y Ecología. *Ecosistemas*. 2002;3:1-2.
21. Maroto M, Rogel J. Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. *MMWR* URL disponible [En línea] En: <http://aguasigmees/igme/publica/pdflib15/028.pdf>, [Consulta: 03 de septiembre de 2010] 2002. 2002.
22. Viñas Canals M. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica: Universitat de Barcelona; 2005.
23. Cantero RAP, Reséndiz MHA, Ramírez JMT, Luis J, Ríos S, Jiménez IB. Utilización de levaduras como procedimiento de bioremediación inicial de aguas residuales de planta procesadora agroindustrial. *Artículos sin extenso*. 2013:354.
24. ANFABRA. *El Libro Blanco de las Bebidas refrescantes*. Madrid: ANFABRA; 2006.
25. Blanco V, Carbajal S. Determinación microbiológica, pH, acidez y grados Brix en bebidas carbonatadas de máquinas dispensadoras en los Food court de Metrocentro, San Salvador. San Salvador: Universidad de El Salvador; 2013.
26. Otazu A, Pacompia R. Evaluación y determinación del contenido en °Brix, pH y colorante utilizados en la elaboración de bebidas gaseosas, expandidas en el mercado de la ciudad de Juliaca [Tesis de Pregrado]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2012.
27. Norma Técnica Peruana NTP 214.001, Bebidas Gasificadas Jarabeadas. Requisitos, (1985. Revisada el 2012).
28. Sanchez C. *El daño que producen las bebidas gaseosas*. Universidad de Finis Terrae. 2013.
29. Morrow RS, Quinn CM. Carbonated beverages. *Kirk - Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* 2000.
30. Steen DP, Ashurst PR. *Carbonated Soft Drinks: Formulation and Manufacture*. USA: Blackwell Publishing; 2006.
31. Zapata L. *Bebidas de Fantasía (Gaseosas del Tipo Cola)*. Estudio Comparativo de Bebidas Gaseosas regulares, Light y Zero. Chile: ODECU; 2012.
32. Martínez López DE, Noyola Mendoza ET. Determinación del contenido de ácido fosfórico y cafeína en bebidas de cola de mayor consumo en los cafetines de la Universidad de El Salvador. San Salvador Universidad de El Salvador; 2012.
33. Villada Moreno JJ. *Conservadores químicos utilizados en la industria alimentaria [Monografía de Pregrado]*. Mexico: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2010.
34. Suárez Machín C, Garrido Carralero NA, Guevara Rodríguez CA. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 2016;50(1):20-8.
35. Folch-Mallol JL, Garay-Arroyo A, Lledías F, Covarrubias A. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista latinoamericana de microbiología*. 2004;46(1-2):24-46.

36. Nieto Galarza HO. Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol. [Tesis de Pregrado]. Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército 2009.
37. Acosta Romero C. Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel [Tesis de Maestría]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2012.
38. Mohd Azhar SH, Abdulla R. Bioethanol production from galactose by immobilized wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2018;14:457-65.
39. Mohd Azhar SH, Abdulla R, Jambo SA, Marbawi H, Gansau JA, Mohd Faik AA, et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2017;10:52-61.
40. Moreno-García J, García-Martínez T, Mauricio JC, Moreno J. Yeast Immobilization Systems for Alcoholic Wine Fermentations: Actual Trends and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9(241).
41. Bai FW, Zhao XQ, Xu J. Immobilization Technology: Cells. In: Moo-Young M, editor. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. Burlington: Academic Press; 2011. p. 477-89.
42. Nuanpeng S, Thanonkeo S, Klanrit P, Thanonkeo P. Ethanol production from sweet sorghum by *Saccharomyces cerevisiae* DBKKUY-53 immobilized on alginate-loofah matrices. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2018.
43. Yuvadatkun P, Reungsang A, Boonmee M. Comparison between free cells and immobilized cells of *Candida shehatae* in ethanol production from rice straw hydrolysate using repeated batch cultivation. *Renewable Energy*. 2018;115:634-40.
44. Vázquez HJ, Dacosta O. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, investigación y tecnología*. 2007;8:249-59.
45. Chem in Italy. Fermentation. USA: University of Oklahoma; 2013 [cited 2018 05 Set]. [Internet]. Available from: <https://cheminitaly.markmorvant.com/fermentation/>.
46. Stewart GG. Bioethanol. *Brewing and Distilling Yeasts*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 167-87.
47. Comelli RN, Seluy LG, Isla MA. Performance of several *Saccharomyces* strains for the alcoholic fermentation of sugar-sweetened high-strength wastewaters: Comparative analysis and kinetic modelling. *New Biotechnology*. 2016;33(6):874-82.
48. Turhan I, Bialka KL, Demirci A, Karhan M. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. 2010;101(14):5290-6.
49. HANNA. Manual de Instrucciones HI 96801. Refractómetro para mediciones de sacarosa HANNA, editor. USA.
50. GmbH AKO. Informe de Aplicación: Refractómetro – Medición Brix en la industria de bebidas y zumos. Alemania.
51. Sumner JB, Graham V. Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *J Biol Chem*. 1921;47(1):5-9.
52. Chaplin M, White C, Kennedy J. Carbohydrate analysis: a practical approach. IRL Press, Oxford, UK Google Scholar. 1986:38.
53. Tena M, Jorrín J. Extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería. Córdoba: Universidad de Córdoba 2008.
54. Megazyme. Ethanol. Assay Procedure. 2018.
55. NMX-AA-030-SCFI-2001. Análisis de Agua - Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en Aguas Naturales, Residuales y Residuales tratadas - Método de Prueba, (2001).

56. DIN 28131. Agitators and baffles for agitator vessels; types, terms and main dimensions, (1992-09).
57. Nelson DL, Cox ML. Lehniger. Principios de la Bioquímica. Sexta ed. Barcelona: Ediciones Omega; 2009.
58. NMX-V-006-NORMEX-2013. Método de ensayo para la determinación de azúcares reductores directos y azúcares reductores totales., MOE-AR-05 (28-05-2013).
59. McMurry J. Química Orgánica. Séptima ed. Mexico: Cengage Learning; 2008.
60. Ferrel Quispe MP. Determinación de etanol en bebidas refrescantes por método enzimático [Pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2011.
61. Salmon J-M, Julien Ortiz A. Mejora de la fermentación alcohólica en condiciones extremas. ACE: Revista de enología. 2008(97):1.
62. Najafpour G, Younesi H, Syahidah Ku Ismail K. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresource Technology. 2004;92(3):251-60.
63. Ercan Y, Irfan T, Mustafa K. Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor. Bioresource Technology. 2013;135:365-71.
64. Lee KH, Choi IS, Kim Y-G, Yang D-J, Bae H-J. Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads. Bioresource Technology. 2011;102(17):8191-8.
65. Oziyci HR, Yatmaz E, Turhan IJCOiB. Effect of agitation on ethanol production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in carob pod extract. 2011(22):S147.
66. Leal Granadillo I, Tarantino Rodríguez G, Hernández Motzezak R, Morán Guillén H. Efecto de la temperatura y el pH en la fermentación del mosto de Agave cocui. Multiciencias. 2014;14(4):375-81.
67. Cazorla JG, Vayreda MX, Romero RA. Técnicas usuales de análisis en enología: Panreac Química; 2005.
68. Mariam I, Manzoor K, Ali S, Ul-Haq IJPJB. Enhanced production of ethanol from free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* under stationary culture. 2009;41(2):821-33.
69. Rojas S, Alendes A, Mendoza E, Celi L, Escudero M. Optimización de parámetros del proceso de elaboración de chicha de jora. Campus. 2018;23:11-28.
70. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry. 1959;31(3):426-8.
71. Ávila Núñez R, Rivas Pérez B, Hernández Motzezak R, Chirinos M. Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease. Multiciencias. 2012;12(2):129-35.
72. Behera S, Kar S, Mohanty RC, Ray RC. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Ca-alginate matrices. Applied Energy. 2010;87(1):96-100.
73. Arroyave Roja JA, Garcés Giraldo LF, Arango Ruiz ÁdJ, Agudelo López CM. La Tartrazina, un colorante de la industria agroalimentaria, degradado mediante procesos de oxidación avanzada. Revista Lasallista de Investigación. 2008;5(1):20-7.
74. Jaramillo Flórez MC, Quiroz Betancur M, Jaramillo Ciro M, Medina Betancur S. Biorremediación del Colorante Negro Azoico por Levadura Inmovilizada en Gelatina. Ingenierías USBMed. 2018;9(1):30-8.
75. Singh J, Meshram R, Ramteke D. Production of Single cell protein and removal of 'COD' from dairy waste water. European Journal of Experimental Biology. 2011;1:209-15.


76. Seluy L. Procesos de tratamiento y valorización de efluentes líquidos de la industria cervecera [Tesis de doctorado]. Argentina: Universidad Nacional del Litoral; 2015



ANEXOS:



ANEXO 1:

Análisis fisicoquímico de la bebida gaseosa de descarte



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José SIN Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERU

INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA25F18.003408B


Nombre del Cliente	: Cinthia Córdoba Barrios
Dirección del Cliente	: Urb El Palacio II D-8 Departamento 101 Sachaca
RUC	: No corresponde
Condición del Muestreado	: Por el cliente
Descripción	: Gaseosa amarilla
Tamaño de muestra	: 1000 mL
Fecha de Recepción	: 25/06/2018
Fecha de Inicio del Ensayo	: 25/06/2018
Fecha de Emisión de Informe	: 05/06/2018
Página	: 1 de 1


I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE VITAMINA C (mg %) Determinación de vitamina C. Método volumétrico diclorofenol indofenol	< 0,10
DETERMINACIÓN DE REDUCTORES DIRECTOS Y TOTALES EN ALIMENTOS (g/L) Method of Test for Total and Direct Reducing Substances in Food. Normas mexicanas. NMX-F-312-1978.	76,00
DETERMINACIÓN DE BENZOATO DE SODIO (mg/L) Determinación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	21,94
DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUIMICA DE OXIGENO (DQO mg/L) NMX-AA-030-SCFI-2001	113859,50

OBSERVACIONES:

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL –DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad


 P. Ricardo A. Abril Ramírez
 QIFDA 00824
 ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC

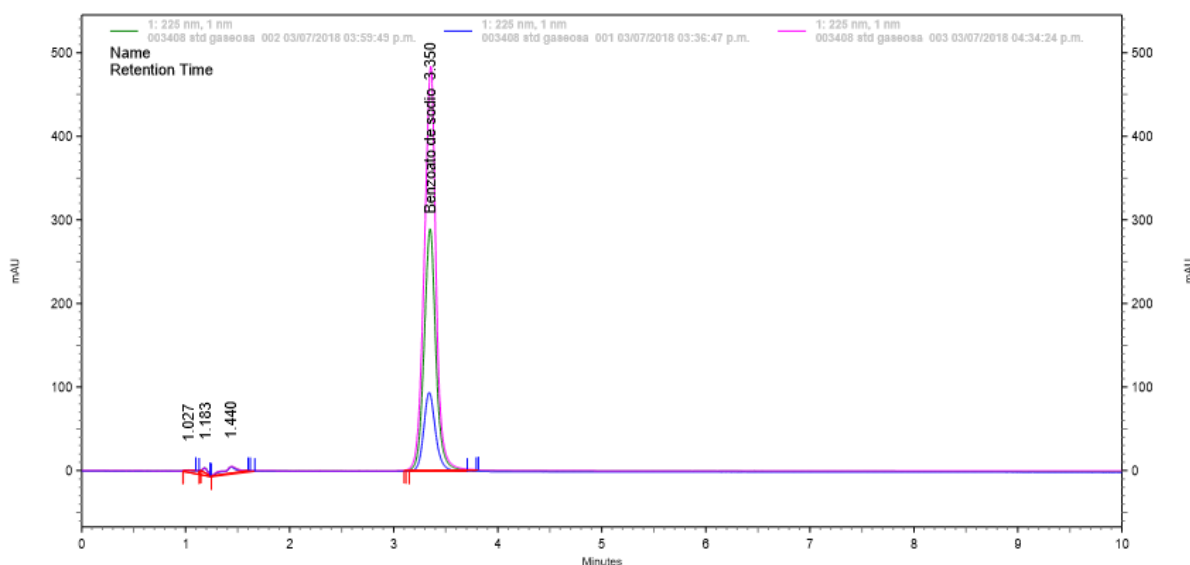


ANEXO 2: Recta de calibración para la determinación de Benzoato de sodio por HPLC

Universidad Católica de Santa María
Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad
Area de Análisis Instrumental - HPLC

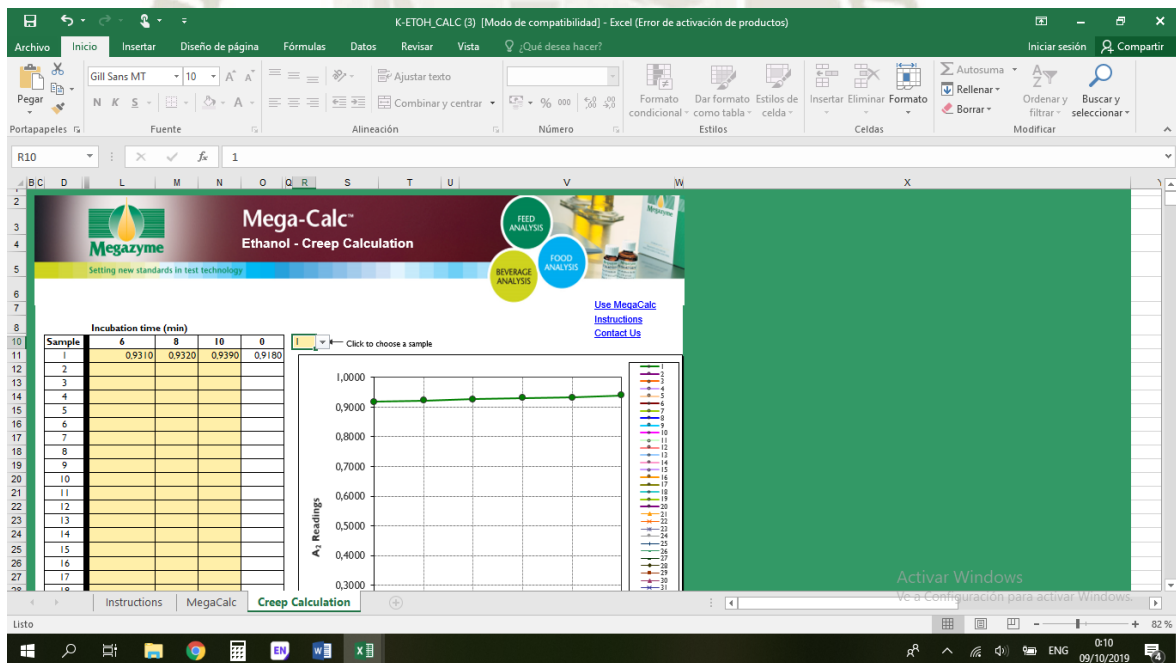
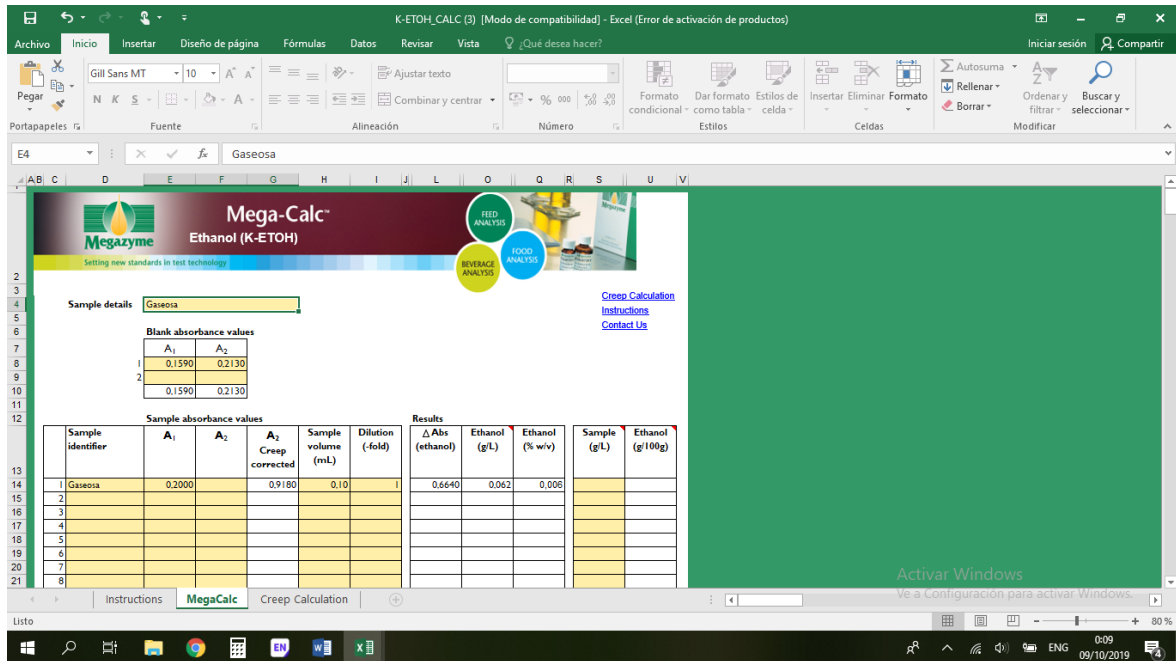
Secuencia D:\PROYECTOS HPLC\CONTROL DE CALIDAD\Control de Calidad\Data\muestras control\003408 gaseosa\003408 gaseosa.seq
Analista analista

1: 225 nm, 1 nm					Benzoato de sodio	Benzoato de sodio	Benzoato de sodio
Sample ID	Sa...	Vial	Vol...	Total Fa...	Retention Time	Area	ESTD Concentration
003408 std gas...	1	1	20	1.0000	3.34	2990891.00	10.0000
003408 std gas...	1	1	20	1.0000	3.34	2983519.00	10.0000
003408 std gas...	1	2	20	1.0000	3.35	9038731.00	30.0000
003408 std gas...	1	2	20	1.0000	3.35	9023033.00	30.0000
003408 std gas...	1	3	20	1.0000	3.36	15148919.00	50.0000
003408 std gas...	1	3	20	1.0000	3.36	15126085.00	50.0000
					Min:	2983519.00	10.0000
					Max:	15148919.00	50.0000
					Mean:	9051863.00	30.0000
					Std Dev:	5433809.88	17.8885
					%RSD:	60.03	59.6285



ANEXO 3: Datos para los cálculos de la concentración de bioetanol (g/L) a través de Mega – Cal Ethanol (K-ETOH)

Bebida gaseosa de descarte



Tratamiento: 4C

K-ETOH_CALC (3) [Modo de compatibilidad] - Excel (Error de activación de productos)

Archivo Inicio Insertar Diseño de página Fórmulas Datos Revisar Vista ¿Qué desea hacer? Iniciar sesión Compartir

Tabla dinámica Tablas Tablas dinámicas recomendadas Tabla Imágenes en línea Ilustraciones Mis complementos Gráficos recomendados Gráficos Gráfico dinámico Mapa 3D Paseos Línea Columna +/- Segmentación de datos Filtros Escala de tiempo Hipervínculo Texto Simbología

D14 A4CI

Mega-Calc[®]
Ethanol (K-ETOH)
Setting new standards in test technology

FEED ANALYSIS
BEVERAGE ANALYSIS
FOOD ANALYSIS

Sample details: A4C

Blank absorbance values

	A ₁	A ₂
1	0.2040	0.2680
2	0.2040	0.2680

Creep Calculation
Instructions
Contact Us

Sample absorbance values

Sample Identifier	A ₁	A ₂	A ₂ Creep corrected	Sample volume (mL)	Dilution (-fold)	Δ Abs (ethanol)	Ethanol (g/L)	Ethanol (% w/v)	Sample (g/L)	Ethanol (g/100g)
1 A4CI	0.1880	0.4517	0.10	1000	0.1997	1.876	0.188			
2 A4CII	0.2050	0.3127	0.10	1000	0.0437	4.103	0.410			
3 A4CIII	0.1940	0.3367	0.10	1000	0.0787	7.392	0.738			
4 A4CIV	0.1780	0.3820	0.10	1000	0.1400	13.156	1.316			
5 A4CV	0.1800	0.4607	0.10	1000	0.2167	20.360	2.036			
6 A4CVII	0.1800	0.5097	0.10	1000	0.2657	24.965	2.496			
7 A4CVIII	0.1850	0.5500	0.10	1000	0.3010	28.285	2.828			
8 A4CVIII	0.2620	0.7547	0.10	1000	0.4287	40.282	4.028			

Activar Windows
Ve a Configuración para activar Windows.

Lista Promedio: 65,01279331 Recuento: 36 Suma: 2145,422179 80%

K-ETOH_CALC (3) [Modo de compatibilidad] - Excel (Error de activación de productos)

Archivo Inicio Insertar Diseño de página Fórmulas Datos Revisar Vista ¿Qué desea hacer? Iniciar sesión Compartir

Tabla dinámica Tablas Tablas dinámicas recomendadas Tabla Imágenes en línea Ilustraciones Mis complementos Gráficos recomendados Gráficos Gráfico dinámico Mapa 3D Paseos Línea Columna +/- Segmentación de datos Filtros Escala de tiempo Hipervínculo Texto Simbología

D17 A4CIV

Mega-Calc[®]
Ethanol (K-ETOH)
Setting new standards in test technology

FEED ANALYSIS
BEVERAGE ANALYSIS
FOOD ANALYSIS

Sample details: A4C

Blank absorbance values

	A ₁	A ₂
1	0.2000	0.2810
2	0.2000	0.2810

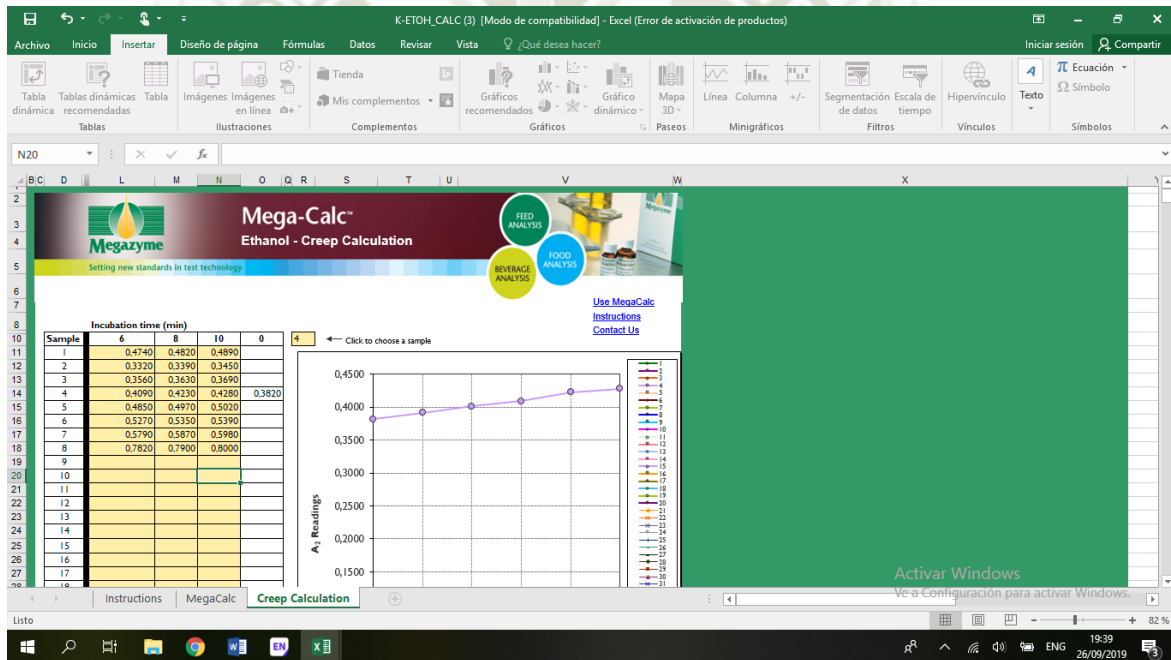
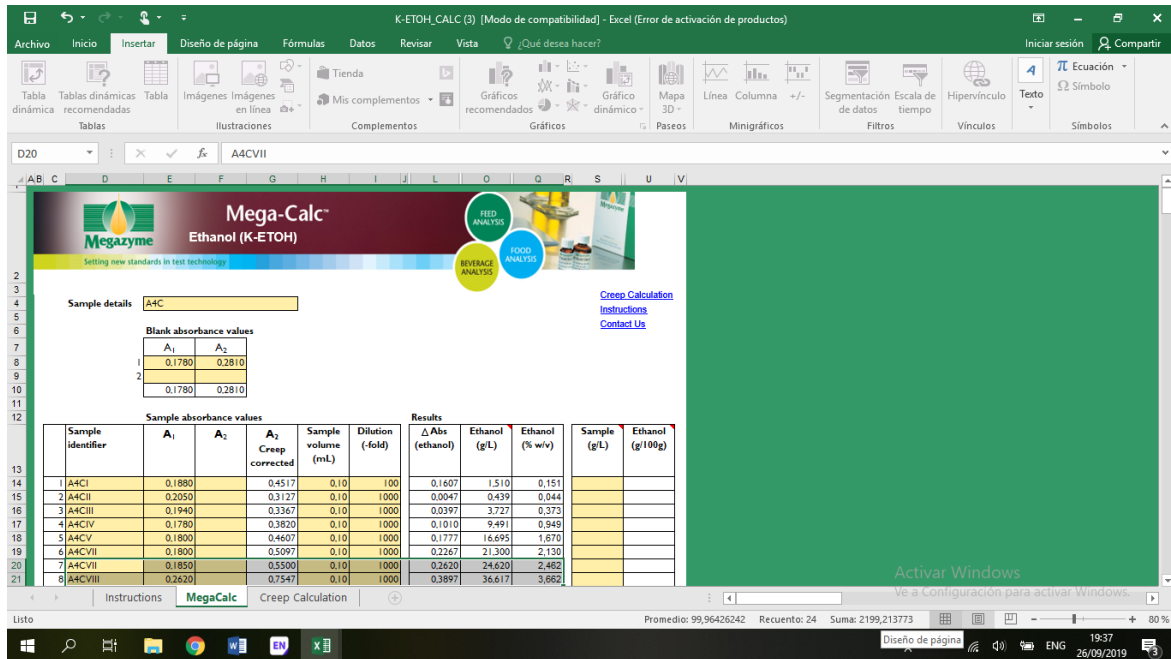
Creep Calculation
Instructions
Contact Us

Sample absorbance values

Sample Identifier	A ₁	A ₂	A ₂ Creep corrected	Sample volume (mL)	Dilution (-fold)	Δ Abs (ethanol)	Ethanol (g/L)	Ethanol (% w/v)	Sample (g/L)	Ethanol (g/100g)
1 A4CI	0.1880	0.4517	0.10	1000	0.1827	1.717	0.172			
2 A4CII	0.2050	0.3127	0.10	1000	0.0267	2.506	0.251			
3 A4CIII	0.1940	0.3367	0.10	1000	0.0617	5.795	0.578			
4 A4CIV	0.1780	0.3820	0.10	1000	0.1230	11.558	1.156			
5 A4CV	0.1800	0.4607	0.10	1000	0.1997	18.763	1.876			
6 A4CVII	0.1800	0.5097	0.10	1000	0.2487	23.367	2.337			
7 A4CVIII	0.1850	0.5500	0.10	1000	0.2840	26.687	2.668			
8 A4CVIII	0.2620	0.7547	0.10	1000	0.4117	38.684	3.868			

Activar Windows
Ve a Configuración para activar Windows.

Lista Promedio: 96,21621875 Recuento: 36 Suma: 3175,135219 80%



Tratamiento: 4S

Mega-Calc[®] Ethanol (K-ETOH)
Setting new standards in test technology

Sample details: A4S1

Blank absorbance values

	A ₁	A ₂
1	0.1780	0.2680
2	0.1780	0.2680

Sample absorbance values

Sample identifier	A ₁	A ₂	A ₂ Creep corrected	Sample volume (mL)	Dilution (-fold)	Δ Abs (ethanol)	Ethanol (g/L)	Ethanol (% w/v)	Sample (g/L)	Ethanol (g/100g)
1 A4S1	0.1790	0.6280	0.10	1000	0.3590	3.274	0.337			
2 A4SII	0.2000	0.3857	0.10	1000	0.0957	8.990	0.898			
3 A4SIII	0.1820	0.4610	0.10	1000	0.1890	17.760	1.776			
4 A4SIV	0.1690	0.6525	0.10	1000	0.3935	36.977	3.698			
5 A4SV	0.1730	0.7583	0.10	1000	0.4953	46.546	4.655			
6 A4SVI	0.1800	0.7625	0.10	1000	0.4925	46.277	4.628			
7 A4SVII	0.1760	0.7547	0.10	1000	0.4887	45.920	4.592			
8 A4SVIII	0.1780	0.7650	0.10	1000	0.4970	46.703	4.670			

Mega-Calc[®] Ethanol (K-ETOH)
Setting new standards in test technology

Sample details: A4SIV

Blank absorbance values

	A ₁	A ₂
1	0.1860	0.3990
2	0.1860	0.3990

Sample absorbance values

Sample identifier	A ₁	A ₂	A ₂ Creep corrected	Sample volume (mL)	Dilution (-fold)	Δ Abs (ethanol)	Ethanol (g/L)	Ethanol (% w/v)	Sample (g/L)	Ethanol (g/100g)
1 A4S1	0.1790	0.6280	0.10	1000	0.2360	2.218	0.222			
2 A4SII	0.2000	0.3857	0.10	1000	-0.0273	-2.569	-0.257			
3 A4SIII	0.1820	0.4610	0.10	1000	0.0660	6.202	0.620			
4 A4SIV	0.1690	0.6525	0.10	1000	0.2705	25.419	2.542			
5 A4SV	0.1730	0.6900	0.10	1000	0.2970	27.909	2.791			
6 A4SVI	0.1730	0.7583	0.10	1000	0.3723	34.988	3.498			
7 A4SVII	0.1760	0.7547	0.10	1000	0.3657	34.362	3.436			
8 A4SVIII	0.1780	0.7650	0.10	1000	0.3740	35.145	3.514			

K-ETOH_CALC (3) [Modo de compatibilidad] - Excel (Error de activación de productos)

Inicio Insertar Diseño de página Fórmulas Datos Revisar Vista ¿Qué desea hacer?

Portapapeles Fuente Alineación Número Formato condicional Dar formato como tabla Estilos de celdas Insertar Eliminar Formato Celdas Autosuma Rellenar Ordenar y filtrar Buscar y seleccionar

D18 A4SV

Sample details A4S

Blank absorbance values

	A ₁	A ₂
1	0.1750	0.3600
2	0.1750	0.3600

Sample absorbance values

Sample identifier	A ₁	A ₂	A ₂ Creep corrected	Sample volume (mL)	Dilution (-fold)	Δ Abs (ethanol)	Ethanol (g/L)	Ethanol (% w/v)	Sample (g/L)	Ethanol (g/100g)
1 A4SI	0.1790		0.6280	0.10	100	0.2640	2.481	0.248		
2 A4SII	0.2000		0.3857	0.10	1000	0.0007	0.063	0.006		
3 A4SIII	0.1820		0.4610	0.10	1000	0.0940	8.833	0.883		
4 A4SIV	0.1690		0.6525	0.10	1000	0.3985	28.050	2.805		
5 A4SV	0.1800		0.6900	0.10	1000	0.3250	30.540	3.054		
6 A4SVI	0.1730		0.7583	0.10	1000	0.4003	37.619	3.762		
7 A4SVII	0.1740		0.7547	0.10	1000	0.3937	36.993	3.699		
8 A4SVIII	0.1780		0.7650	0.10	1000	0.4020	37.776	3.778		

Instructions MegaCalc Creep Calculation

Promedio: 99,9408 Recuento: 12 Suma: 1099,3488

23-13 05/10/2019

K-ETOH_CALC (3) [Modo de compatibilidad] - Excel (Error de activación de productos)

Inicio Insertar Diseño de página Fórmulas Datos Revisar Vista ¿Qué desea hacer?

Portapapeles Fuente Alineación Número Formato condicional Dar formato como tabla Estilos de celdas Insertar Eliminar Formato Celdas Autosuma Rellenar Ordenar y filtrar Buscar y seleccionar

D19 A4SVI

Mega-Calc[™]
Ethanol (K-ETOH)

Setting new standards in test technology

Sample details A4S

Blank absorbance values

	A ₁	A ₂
1	0.1750	0.3940
2	0.1750	0.3940

Sample absorbance values

Sample identifier	A ₁	A ₂	A ₂ Creep corrected	Sample volume (mL)	Dilution (-fold)	Δ Abs (ethanol)	Ethanol (g/L)	Ethanol (% w/v)	Sample (g/L)	Ethanol (g/100g)
1 A4SI	0.1790		0.6280	0.10	100	0.2300	2.161	0.216		
2 A4SII	0.2000		0.3857	0.10	1000	-0.0333	-3.132	-0.313		
3 A4SIII	0.1820		0.4610	0.10	1000	0.0600	5.638	0.564		
4 A4SIV	0.1690		0.6525	0.10	1000	0.2645	24.855	2.486		
5 A4SV	0.1800		0.6900	0.10	1000	0.2910	27.345	2.735		
6 A4SVI	0.1730		0.7583	0.10	1000	0.3663	34.424	3.442		
7 A4SVII	0.1740		0.7547	0.10	1000	0.3597	33.798	3.380		
8 A4SVIII	0.1780		0.7650	0.10	1000	0.3680	34.581	3.458		

Instructions MegaCalc Creep Calculation

Promedio: 101,083809 Recuento: 12 Suma: 1111,921899

23-13 05/10/2019

K-ETOH_CALC (3) [Modo de compatibilidad] - Excel (Error de activación de productos)

Inicio Insertar Diseño de página Fórmulas Datos Revisar Vista ¿Qué desea hacer?

Inicio sesión Compartir

Portapapeles Fuente Alineación Número Formato condicional Dar formato como tabla Estilos de celda Insertar Eliminar Formato Celdas Autosuma Rellenar Ordenar y filtrar Buscar y seleccionar Modificar

U20 =SI(ESERROR(Concentration_gg;"",Concentration_gg)

Mega-Calc[™]
Ethanol (K-ETOH)

Setting new standards in test technology

FEED ANALYSIS
BEVERAGE ANALYSIS
FOOD ANALYSIS

Sample details A45

Blank absorbance values

	A ₁	A ₂
1	0.1750	0.3600
2	0.1750	0.3600

Creep Calculation
Instructions
Contact Us

Sample absorbance values

Sample identifier	A ₁	A ₂	A ₂ Creep corrected	Sample volume (mL)	Dilution (-fold)	Δ Abs (ethanol)	Ethanol (g/L)	Ethanol (% w/v)	Sample (g/L)	Ethanol (g/100g)
1 A45I	0.1790		0.6280	0.10	100	0.2640	2.481	0.248		
2 A45II	0.2000		0.3857	0.10	1000	0.0007	0.063	0.006		
3 A45III	0.1820		0.4610	0.10	1000	0.0940	8.833	0.883		
4 A45IV	0.1690		0.6525	0.10	1000	0.2985	28.950	2.895		
5 A45V	0.1890		0.6900	0.10	1000	0.2250	30.540	3.054		
6 A45VI	0.1730		0.7583	0.10	1000	0.4003	37.619	3.762		
7 A45VII	0.1760		0.7547	0.10	1000	0.3937	36.993	3.699		
8 A45VIII	0.1780		0.7650	0.10	1000	0.4020	37.776	3.778		

Activar Windows

Recuento: 28 23:17 05/10/2019

K-ETOH_CALC (3) [Modo de compatibilidad] - Excel (Error de activación de productos)

Inicio Insertar Diseño de página Fórmulas Datos Revisar Vista ¿Qué desea hacer?

Inicio sesión Compartir

Portapapeles Fuente Alineación Número Formato condicional Dar formato como tabla Estilos de celda Insertar Eliminar Formato Celdas Autosuma Rellenar Ordenar y filtrar Buscar y seleccionar Modificar

R10 =1

Mega-Calc[™]
Ethanol - Creep Calculation

Setting new standards in test technology

FEED ANALYSIS
BEVERAGE ANALYSIS
FOOD ANALYSIS

Use MegaCalc
Instructions
Contact Us

Incubation time (min)

Sample	6	8	10	0
1	0.6500	0.6590	0.6650	0.6280
2	0.4060	0.4150	0.4200	
3	0.4800	0.4880	0.4930	
4	0.6540	0.6545	0.6550	
5	0.7020	0.7060	0.7100	
6	0.7630	0.7640	0.7660	
7	0.7610	0.7620	0.7650	
8	0.7710	0.7730	0.7750	
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				

Click to choose a sample

A₂ Readings

Activar Windows

Recuento: 28 23:29 05/10/2019

Tratamiento: 5C

Mega-Calc[®] Ethanol (K-ETOH)
Setting new standards in test technology

Sample details: ASCI

Blank absorbance values:

	A ₁	A ₂
1	0.1990	0.2630
2	0.1990	0.2630

Sample absorbance values:

Sample identifier	A ₁	A ₂	A ₂ Creep corrected	Sample volume (mL)	Dilution (-fold)	Δ Abs (ethanol)	Ethanol (g/L)	Ethanol (% w/v)	Sample (g/L)	Ethanol (g/100g)
1 ASCI	0.1920	0.3960	0.10	1000	0.1400	1.316	0.132			
2 ASCII	0.2000	0.2960	0.10	1000	0.0320	3.007	0.301			
3 ASCIII	0.2060	0.3470	0.10	1000	0.0770	7.236	0.724			
4 ASCIV	0.1900	0.3507	0.10	1000	0.0967	9.084	0.908			
5 ASCV	0.1900	0.4230	0.10	1000	0.1690	15.881	1.588			
6 ASCVI	0.1870	0.4883	0.10	1000	0.2373	22.302	2.230			
7 ASCVII	0.2180	0.5773	0.10	1000	0.2953	27.752	2.775			
8 ASCVIII	0.2000	0.5940	0.10	1000	0.3300	31.010	3.101			

Summary statistics: Promedio: 64,83095733 Recuento: 36 Suma: 2139,421592

Mega-Calc[®] Ethanol (K-ETOH)
Setting new standards in test technology

Sample details: ASCI

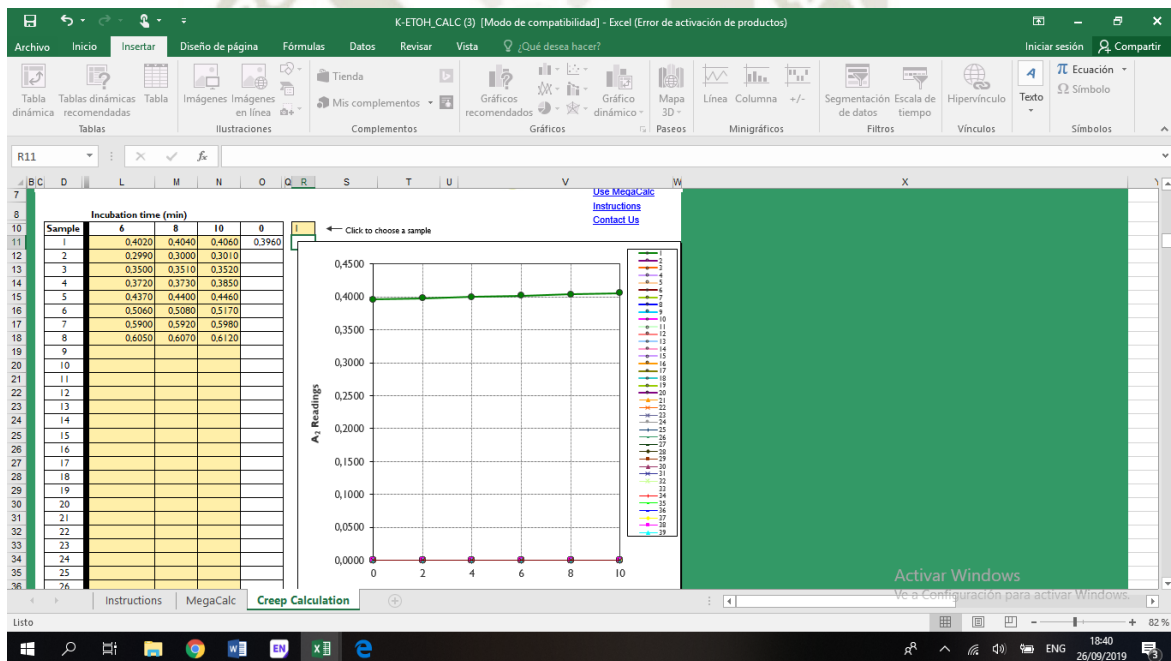
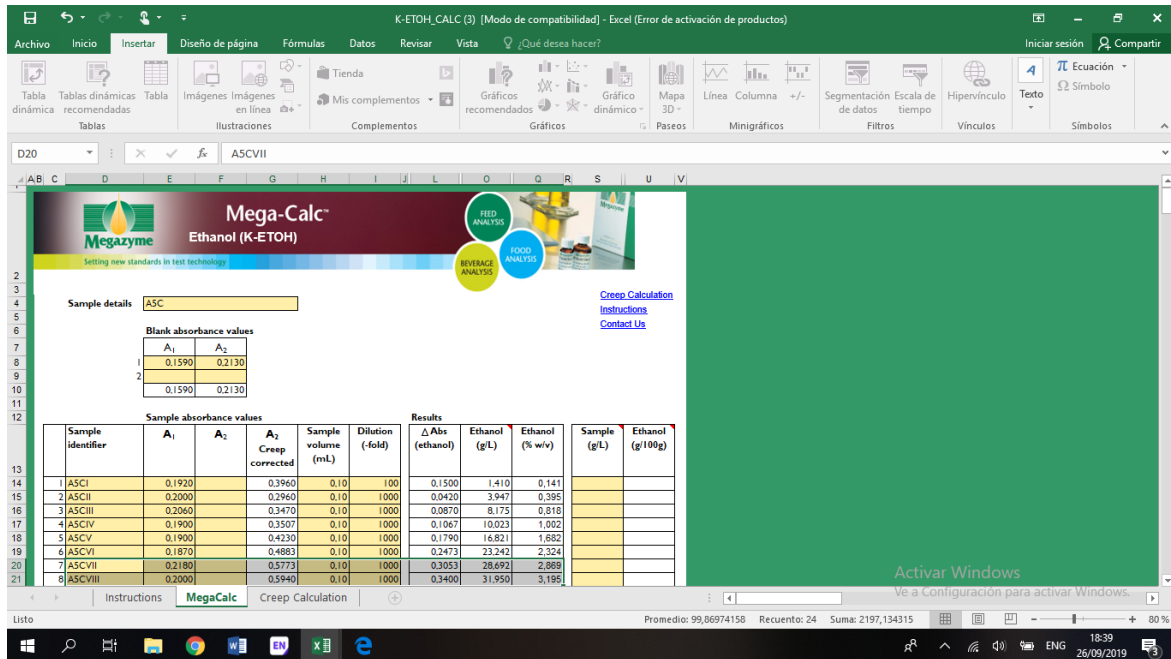
Blank absorbance values:

	A ₁	A ₂
1	0.2160	0.2760
2	0.2160	0.2760

Sample absorbance values:

Sample identifier	A ₁	A ₂	A ₂ Creep corrected	Sample volume (mL)	Dilution (-fold)	Δ Abs (ethanol)	Ethanol (g/L)	Ethanol (% w/v)	Sample (g/L)	Ethanol (g/100g)
1 ASCI	0.1920	0.3960	0.10	1000	0.1440	1.353	0.135			
2 ASCII	0.2000	0.2960	0.10	1000	0.0360	3.383	0.338			
3 ASCIII	0.2060	0.3470	0.10	1000	0.0810	7.612	0.761			
4 ASCIV	0.1900	0.3507	0.10	1000	0.1007	9.460	0.946			
5 ASCV	0.1900	0.4230	0.10	1000	0.1730	16.257	1.626			
6 ASCVI	0.1870	0.4883	0.10	1000	0.2413	22.678	2.268			
7 ASCVII	0.2180	0.5773	0.10	1000	0.2993	28.128	2.813			
8 ASCVIII	0.2000	0.5940	0.10	1000	0.3340	31.386	3.138			

Summary statistics: Promedio: 95,69762303 Recuento: 36 Suma: 3158,02156



Tratamiento: 5S

K-ETOH_CALC (3) [Modo de compatibilidad] - Excel (Error de activación de productos)

Inicio Insertar Diseño de página Fórmulas Datos Revisar Vista ¿Qué desea hacer?

Inicio sesión Compartir

Gill Sans MT 10 Ajustar texto

Portapapeles Pegar Fuente Alineación Combinar y centrar Número Formato condicional Dar formato como tabla Estilos de celdas Estilos Insertar Eliminar Formato Autosuma Rellenar Ordenar y filtrar Buscar y seleccionar

D14

AB C D E F G H I J L O Q R S U V

Mega-Calc[™]
Ethanol (K-ETOH)
Setting new standards in test technology

FEED ANALYSIS
BEVERAGE ANALYSIS
FOOD ANALYSIS

Sample details: ASSI

Blank absorbance values

	A ₁	A ₂
1	0.1860	0.2540
2	0.1860	0.2540

Creep Calculation Instructions Contact Us

Sample absorbance values

Sample identifier	A ₁	A ₂	A ₂ Creep corrected	Sample volume (mL)	Dilution (-fold)	Δ Abs (ethanol)	Ethanol (g/L)	Ethanol (% w/v)	Sample (g/L)	Ethanol (g/100g)
1 ASSI	0.2130	0.4867	0.10	1000	0.2057	1.933	0.193			
2 ASSII	0.2100	0.3180	0.10	1000	0.0400	3.759	0.375			
3 ASSIII	0.1880	0.3513	0.10	1000	0.0953	8.958	0.896			
4 ASSIV	0.1920	0.4407	0.10	1000	0.1807	16.977	1.698			
5 ASSV	0.1900	0.5267	0.10	1000	0.2687	25.247	2.525			
6 ASSVI	0.2170	0.5960	0.10	1000	0.3110	29.225	2.922			
7 ASSVII	0.1880	0.6797	0.10	1000	0.4237	39.812	3.981			
8 ASSVIII	0.1840	0.6843	0.10	1000	0.4323	40.262	4.063			

Activar Windows

Recuento: 42 80%

11:55 06/10/2019

K-ETOH_CALC (3) [Modo de compatibilidad] - Excel (Error de activación de productos)

Inicio Insertar Diseño de página Fórmulas Datos Revisar Vista ¿Qué desea hacer?

Inicio sesión Compartir

Gill Sans MT 10 Ajustar texto

Portapapeles Pegar Fuente Alineación Combinar y centrar Número Formato condicional Dar formato como tabla Estilos de celdas Estilos Insertar Eliminar Formato Autosuma Rellenar Ordenar y filtrar Buscar y seleccionar

D17

AB C D E F G H I J L O Q R S U V

Mega-Calc[™]
Ethanol (K-ETOH)
Setting new standards in test technology

FEED ANALYSIS
BEVERAGE ANALYSIS
FOOD ANALYSIS

Sample details: ASSIV

Blank absorbance values

	A ₁	A ₂
1	0.1910	0.2650
2	0.1910	0.2650

Creep Calculation Instructions Contact Us

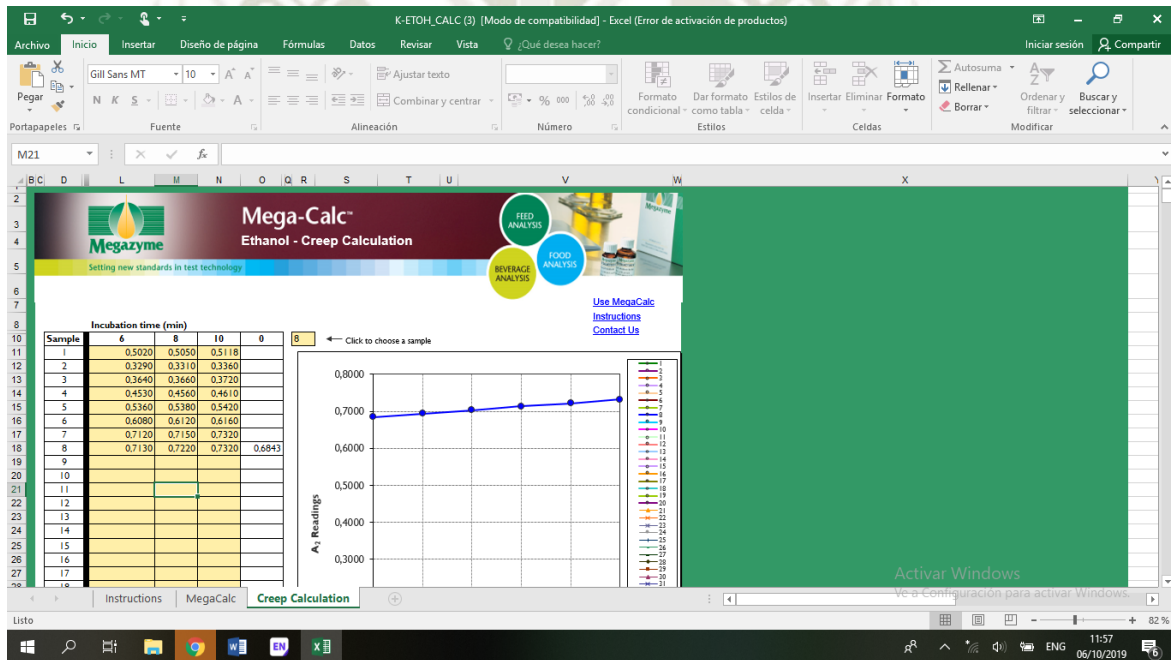
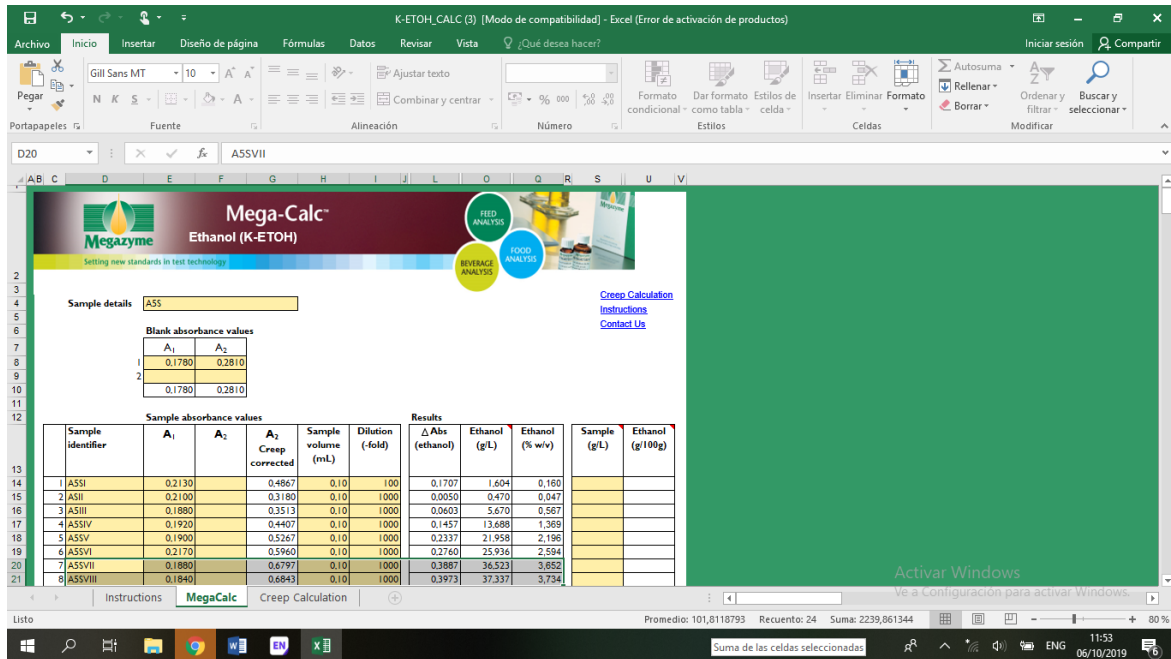
Sample absorbance values

Sample identifier	A ₁	A ₂	A ₂ Creep corrected	Sample volume (mL)	Dilution (-fold)	Δ Abs (ethanol)	Ethanol (g/L)	Ethanol (% w/v)	Sample (g/L)	Ethanol (g/100g)
1 ASSI	0.2130	0.4867	0.10	1000	0.1997	1.876	0.188			
2 ASSII	0.2100	0.3180	0.10	1000	0.0340	3.195	0.319			
3 ASSIII	0.1880	0.3513	0.10	1000	0.0893	8.395	0.835			
4 ASSIV	0.1920	0.4407	0.10	1000	0.1747	16.413	1.641			
5 ASSV	0.1900	0.5267	0.10	1000	0.2627	24.683	2.468			
6 ASSVI	0.2170	0.5960	0.10	1000	0.3050	28.661	2.866			
7 ASSVII	0.1880	0.6797	0.10	1000	0.4177	39.248	3.925			
8 ASSVIII	0.1840	0.6843	0.10	1000	0.4263	40.063	4.006			

Activar Windows

Recuento: 42 80%

11:56 06/10/2019



ANEXO 4: ANOVA para la determinación de la concentración de glucosa (g/L) restante

Análisis de varianza
de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
4C	2	10,38267474	5,191337368	0,007023932
4S	2	5,108370789	2,554185395	0,001755983
5C	2	12,75314842	6,376574211	0,028095727
5S	2	11,80495895	5,902479474	0,063215387

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	17,45578766	3	5,818595886	232,5321637	6,08302E-05	6,591382116
Dentro de los grupos	0,100091029	4	0,025022757			
Total	17,55587869	7				

ANEXO 5: ANOVA para la determinación de la concentración de bioetanol (g/L)

Análisis de varianza
de un factor

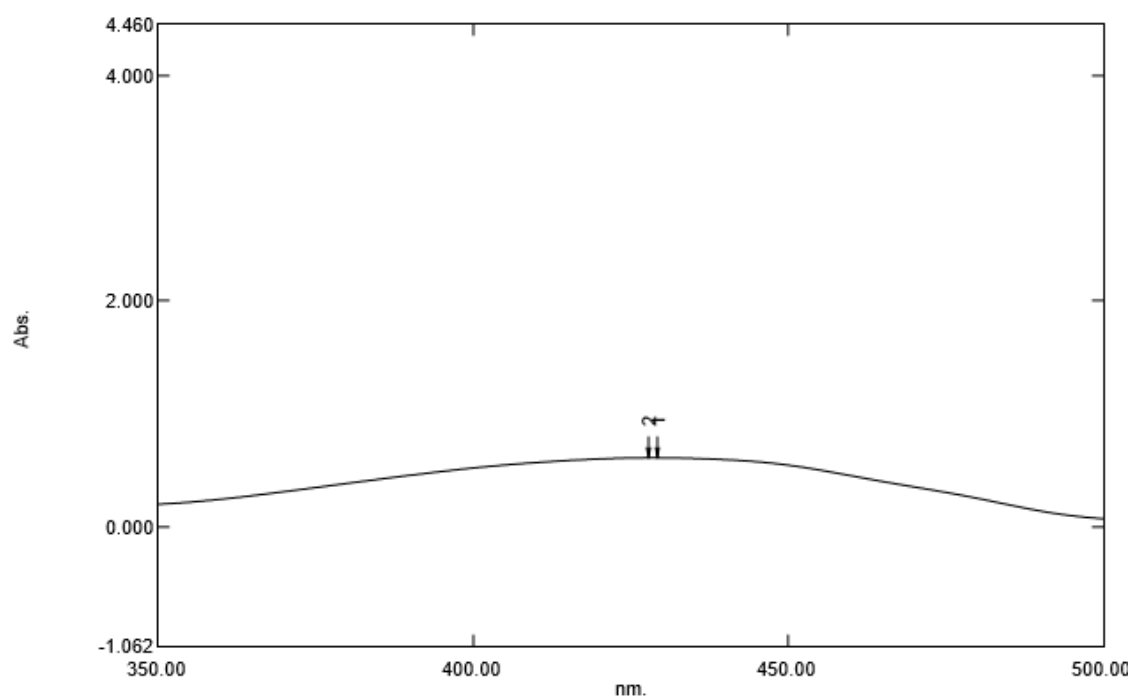
RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	2	73,2388	36,6194	4,92540498
Columna 2	2	75,5505	37,77525	2,136864645
Columna 3	2	63,8984	31,9492	2,585538
Columna 4	2	74,6671	37,33355	1,216644005

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	43,39297495	3	14,46432498	5,325376918	0,069956116	6,591382116
Dentro de los grupos	10,86445163	4	2,716112908			
Total	54,25742658	7				

ANEXO 6: Representación gráfica del barrido de longitudes de onda para la bebida gaseosa de descarte



No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	⊕	429.30	0.609	
2	⊕	427.90	0.609	



ANEXO 7: ANOVA para la remoción de color (%)

Análisis de varianza
de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
4C	2	135	67,5	4,5
4S	2	141,2	70,6	3,92
5C	2	105,4	52,7	5,78
5S	2	107	53,5	4,5

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	519,055	3	173,0183333	37,00926916	0,002240879	6,591382116
Dentro de los grupos	18,7	4	4,675			
Total	537,755	7				

ANEXO 8: Informes de ensayo de DQO




UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD
 Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1186
 ✉ laboratorioensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1350
 AREQUIPA - PERÚ



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA15C19.003864

Nombre del Cliente	: Cinthia Cordova Barrios
Dirección del Cliente	: Urb El Palacio II D8 Dpto 101 A Sachaca
RUC	: No corresponde
Condición del Muestreado	: Por el cliente
Descripción	: Muestras varias
Tamaño de muestra	: 40 mL
Fecha de Recepción	: 15/03/2019
Fecha de Inicio del Ensayo	: 15/03/2019
Fecha de Emisión de Informe	: 20/03/2019
Página	: 1 de 1

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUIMICA DE OXIGENO (DQO mg/L) NMX -AA-030-SCFI-2001	
Muestra A4S	52181,81
Muestra A4C	51289,15

OBSERVACIONES:

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL –DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



Q.F. Ricardo A. Abril Ramírez
 CQFDA 03624
 ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC





UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1350
AREQUIPA - PERÚ



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA13B19.003829A

Nombre del Cliente : Cinthia Córdoba Barrios
Dirección del Cliente : Urb El Palacio II D-8 Departamento 101 Sachaca
RUC : No corresponde
Condición del Muestreado : Por el cliente
Descripción : 5°C VIII
Tamaño de muestra : 30 mL
Fecha de Recepción : 13/02/2019
Fecha de Inicio del Ensayo : 13/02/2019
Fecha de Emisión de Informe : 15/02/2019
Página : 1 de 1

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUIMICA DE OXIGENO (DQO mg/L) NMX -AA-030-SCFI-2001	96672,10

OBSERVACIONES:

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL –DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

Q.F. Liliana Delgado Alvarado
COFDA 0172
SUPERVISORA ASEGURAMIENTO
DE LA CALIDAD LECC





UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1350
AREQUIPA - PERÚ



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA13B19.003829B

Nombre del Cliente : Cinthia Córdoba Barrios
Dirección del Cliente : Urb El Palacio II D-8 Departamento 101 Sachaca
RUC : No corresponde
Condición del Muestreado : Por el cliente
Descripción : 5 S VIII
Tamaño de muestra : 30 mL
Fecha de Recepción : 13/02/2019
Fecha de Inicio del Ensayo : 13/02/2019
Fecha de Emisión de Informe : 15/02/2019
Página : 1 de 1

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUIMICA DE OXIGENO (DQO mg/L) NMX -AA-030-SCFI-2001	97173,60

OBSERVACIONES:

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL –DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

Q.F. Liliana Delgado Alvarado
CQFDA 0172
SUPERVISORA ASEGURAMIENTO
DE LA CALIDAD LECC



ANEXO 9: Registro fotográfico



Figura 1: Desgasificación de la bebida gaseosa de descarte por sonicación



Figura 2: Determinación de los °Brix a través del refractómetro digital



Figura 3: Determinación del pH de los tratamientos (pH 4 y pH 5)



Figura 4: Esterilización de la bebida gaseosa de descarte en el autoclave



Figura 5: Inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* en Alginato de calcio



Figura 6: Inoculación de las perlas de *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada



Figura 7: Fermentación alcohólica de la bebida gaseosa de descarte

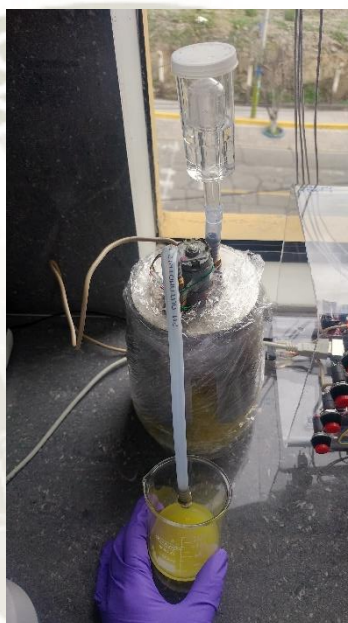


Figura 8: Toma de muestra del proceso de fermentación alcohólica

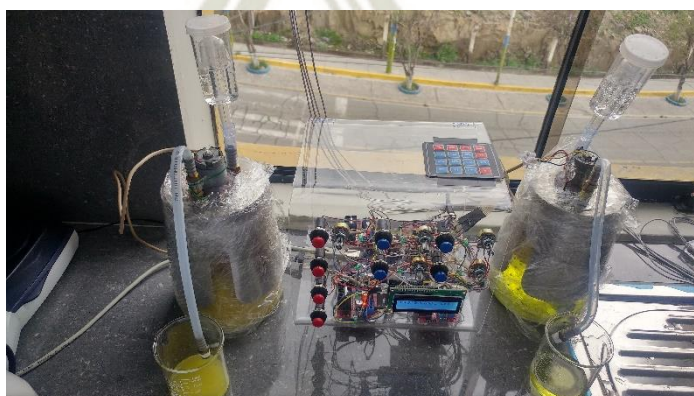


Figura 9: Toma de muestra de cada biorreactor durante 16 horas



Figura 10: Centrifugación y microfiltración de las muestras de cada tratamiento



Figura 11: Decoloración de las muestras de cada tratamiento

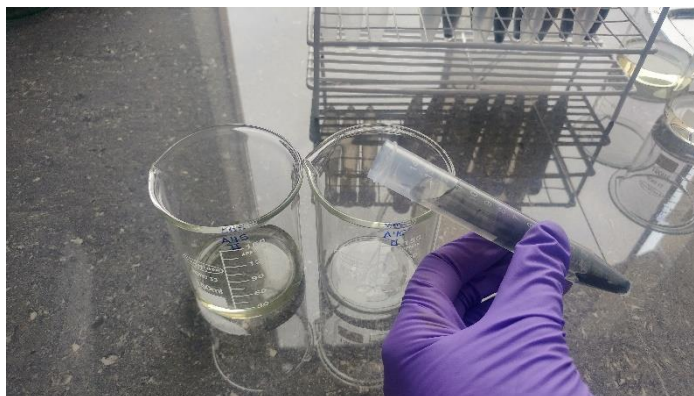


Figura 12: Separación del carbón activado post decoloración



Figura 13: Microfiltración y dilución de las muestras para el método del DNS



Figura 14: Adición del reactivo DNS a las diluciones de las muestras

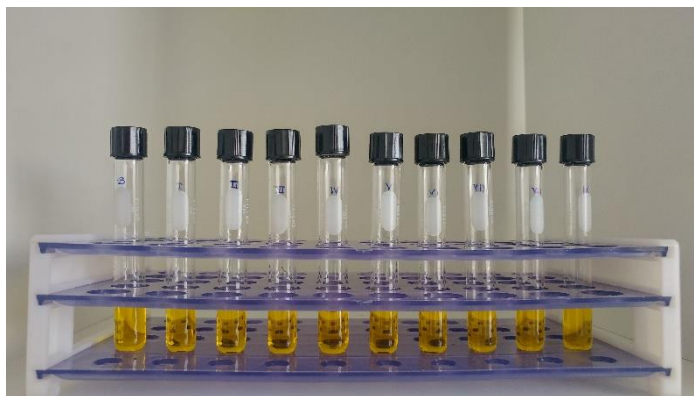


Figura 15: Estándares de glucosa para la elaboración de recta de calibración del DNS (antes de la incubación)

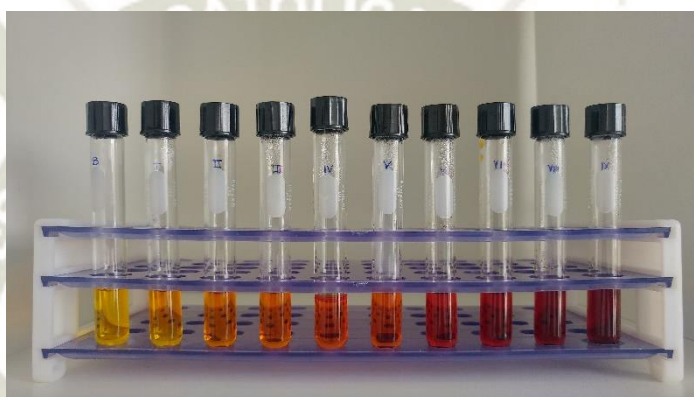


Figura 16: Estándares de glucosa para la elaboración de recta de calibración del DNS (después de la incubación)



Figura 17: Determinación de la absorbancia a 570 nm de los estándares



Figura 21: Incubación de las muestras y componentes del *Ethanol test Kit* en la cuantificación de etanol

