

Universidad del Valle de Guatemala

Facultad de Ingeniería



Propuesta de modelos estadísticos para la evaluación de condiciones de fermentación de melaza con *Rhizopus oryzae*.

Trabajo de graduación en modalidad de Trabajo Profesional presentado por Heraldo Alfonso Hurtado Chang para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Química

Guatemala
2022

Universidad del Valle de Guatemala

Facultad de Ingeniería



Propuesta de modelos estadísticos para la evaluación de condiciones de fermentación de melaza con *Rhizopus oryzae*.

Trabajo de graduación en modalidad de Trabajo Profesional presentado por Heraldo Alfonso Hurtado Chang para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Química

Guatemala
2022

Vo. Bo.:

(f) Carlo Martínez

Lic. Carlo Roberto Martínez Joaquín

Tribunal Examinador:

(f) Carlo Martínez

Lic. Carlo Roberto Martínez Joaquín

(f) _____

M. Sc. Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano

(f) _____

Ing. Carmen Alicia Ortiz Pineda

Fecha de aprobación: Guatemala 14 de junio del 2022.

PREFACIO

Este trabajo nació del deseo de mejorar mis habilidades en el área de la carrera que menos dominaba. Con esta pequeña investigación me vi obligado a aprender desde técnicas básicas como preparar medios de cultivo, hasta adquirir competencias más complejas como lo es entender un poco el metabolismo de los microorganismos. Los guías principales en este camino fueron el Licenciado Carlo Martínez y el Licenciado Cristian Ruiz, quienes siempre estuvieron dispuestos a compartir su conocimiento y experiencia conmigo, cuestión por la cual este trabajo también es, en gran medida, fruto de su buena voluntad. Asimismo, debo reconocer la ayuda del Licenciado Ángel Ramírez, la Licenciada Ana Luisa Mendizabal y la Ingeniera Ingrid Yurrita porque nunca me negaron el acceso a reactivos y equipos que necesité en momentos puntuales de la experimentación.

Por otro lado, muchas personas han influido de manera indirecta en la elaboración de este trabajo; me atrevería a decir que todas las personas que he conocido desde mi ingreso a la universidad en aquel lejano enero del 2016. Sin afán de menospreciar a alguien, debo referirme en particular al Licenciado José Carlos Chiquín, de no ser por él este sería el prólogo de un trabajo totalmente distinto; distinto no sólo en el tema, también en la pasión que guarda cada una de estas páginas. Ahora bien, con tal de no aburrir al lector seré más breve de ahora en adelante. Agradezco al Ingeniero Zambrano, al Ingeniero Lam y al Ingeniero Núñez del Departamento de Ingeniería Química por todos los permisos que me concedieron para poder trabajar. A todos mis amigos porque, aunque ellos no lo crean, han sido uno de mis grandes soportes durante varios años.

Por último, agradezco el apoyo de quienes menos palabras necesitan, porque ni con todas las oraciones habidas y por haber lograría expresar una décima parte de todo lo que se merecen... A mi familia.

ÍNDICE

	Página
PREFACIO	ix
LISTA DE CUADROS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
LISTA DE ECUACIONES.....	xxv
RESUMEN	xxvii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS	3
A. General.....	3
B. Específicos	3
III. JUSTIFICACIÓN	5
IV. MARCO TEÓRICO.....	7
A. Melaza.....	7
B. Etanol.....	7
C. Ácido acético	8
D. Ácido láctico	8
E. Fermentación.....	10
F. Fermentación láctica	12
G. Microorganismos empleados en fermentaciones lácticas.	14
H. <i>Rhizopus oryzae</i>	15
I. Productos de biosíntesis del <i>Rhizopus oryzae</i>	15
1. Efecto de la Temperatura.	16
2. Efecto del pH.	17
3. Efecto de la concentración de sustrato.	17
J. Experimentos diseñados.....	18
1. Planificación de un experimento.....	19
2. Cribado de un experimento.	19
3. Optimización de un experimento.	19
4. Verificación de un experimento.....	19
K. Diseños de superficie de respuesta.....	20
L. Diseño Box-Behnken.....	23
V. ANTECEDENTES	25

VI.	METODOLOGÍA	27
A.	Materiales.....	27
B.	Equipo	27
C.	Preparación de soluciones.....	27
D.	Preparación de caldo de melaza.....	28
E.	Propagación del microorganismo <i>Rhizopus oryzae</i>	28
F.	Preparación del inóculo.....	29
G.	Determinación de la humedad inicial del inóculo.....	31
H.	Fermentaciones iniciales para generar modelos estadísticos.....	31
I.	Determinación de ácido láctico, etanol y ácido acético por HPLC.....	32
J.	Determinación de consumo de sustrato durante las fermentaciones.....	33
K.	Análisis de diseño de superficie de respuestas.....	33
L.	Fermentaciones finales para verificar los modelos estadísticos.....	34
VII.	RESULTADOS.....	37
VIII.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	55
IX.	CONCLUSIONES	65
X.	RECOMENDACIONES	67
XI.	BIBLIOGRAFÍA	69
XII.	ANEXOS	73
A.	Datos originales	73
B.	Cálculos de muestra	80
C.	Datos Calculados	91
D.	Análisis de Error	99
E.	Imágenes adicionales	113
XIII.	GLOSARIO	174

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Resumen de las características de algunos diseños Box-Behnken.....	23
Cuadro 2. Valores reales y codificados de temperatura, pH inicial y concentración de sustrato empleados en las fermentaciones.....	32
Cuadro 3. Cantidad de producto para las fermentaciones utilizadas para generar los modelos estadísticos.....	37
Cuadro 4. Cantidad estimada de consumo de azúcares, producción de CO ₂ y otros compuestos, y crecimiento de microorganismo para las fermentaciones utilizadas para generar los modelos estadísticos.....	38
Cuadro 5. Rendimiento de los productos para las fermentaciones utilizadas para generar los modelos estadísticos.....	39
Cuadro 6. Características del diseño Box-Behnken empleado para el análisis de superficie de respuestas.....	40
Cuadro 7. Resumen de indicadores del modelo propuesto para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	40
Cuadro 8. Análisis de los términos del modelo propuesto para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	40
Cuadro 9. Análisis de multicolinealidad en el modelo propuesto para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	41
Cuadro 10. Análisis de varianza del modelo propuesto para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	41
Cuadro 11. Valor P para los factores del modelo propuesto para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	42
Cuadro 12. Resumen de indicadores del modelo propuesto para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	44
Cuadro 13. Análisis de los términos del modelo propuesto para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	45
Cuadro 14. Análisis de multicolinealidad en el modelo propuesto para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	45
Cuadro 15. Análisis de varianza del modelo propuesto para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	45

Cuadro 16. Valor P para los factores del modelo propuesto para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	46
Cuadro 17. Resumen de indicadores del modelo propuesto para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	48
Cuadro 18. Análisis de los términos del modelo propuesto para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	49
Cuadro 19. Análisis de multicolinealidad en el modelo propuesto para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	49
Cuadro 20. Análisis de varianza del modelo propuesto para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	49
Cuadro 21. Valor P para los factores del modelo propuesto para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	50
Cuadro 22. Condiciones que favorecen a los productos de fermentación según los modelos estadísticos propuestos.	52
Cuadro 23. Predicción de concentración de productos de fermentación a las condiciones favorables para la biosíntesis de ácido láctico.	52
Cuadro 24. Predicción de concentración de productos de fermentación a las condiciones favorables para la biosíntesis de etanol.	53
Cuadro 25. Predicción de concentración de productos de fermentación a las condiciones favorables para la biosíntesis de ácido acético.	53
Cuadro 26. Concentraciones promedio de los productos obtenidas en las fermentaciones utilizadas para validar los modelos.	53
Cuadro 27. Cantidad promedio de producto para las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.	53
Cuadro 28. Cantidad promedio estimada de consumo de azúcares para las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.	54
Cuadro 29. Cantidad promedio estimada de producción de CO ₂ y otros compuestos, y crecimiento de microorganismo para las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.	54
Cuadro 30. Rendimiento promedio de los productos para las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.	54
Cuadro 31. Tiempos de retención para los compuestos analizados por HPLC en columna cromatográfica Hyplex H a las condiciones de operación utilizadas.	73

Cuadro 32. Condiciones de fermentación establecidas para las fermentaciones utilizadas para generar los modelos estadísticos.....	73
Cuadro 33. Pesos registrados para determinar la humedad promedio del inóculo.	73
Cuadro 34. Resumen de análisis HPLC sobre la concentración de azúcares presentes en muestras diluidas al 6% v/v de los caldos preparados a distintas concentraciones de melaza.	74
Cuadro 35. Cantidad de inóculo utilizada en las fermentaciones utilizadas para generar los modelos estadísticos.....	74
Cuadro 36. Cantidad de inóculo utilizada en las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.....	75
Cuadro 37. Peso seco de la biomasa al final de las fermentaciones utilizadas para generar los modelos estadísticos.....	75
Cuadro 38. Peso seco de la biomasa al final de las fermentaciones que favorecen la biosíntesis de los productos analizados utilizadas para generar los modelos estadísticos.....	76
Cuadro 39. Resumen del análisis HPLC sobre la concentración de azúcares en muestras de fermentaciones diluidas al 30% v/v, utilizadas para generar los modelos estadísticos.....	77
Cuadro 40. Resumen del análisis HPLC sobre la concentración de productos en muestras de fermentaciones diluidas al 60% v/v, utilizadas para generar los modelos estadísticos.....	78
Cuadro 41. Resumen del análisis HPLC sobre la concentración de azúcares en muestras de fermentaciones diluidas al 30% v/v, utilizadas para validar los modelos estadísticos.	79
Cuadro 42. Resumen del análisis HPLC sobre la concentración de productos en muestras de fermentaciones diluidas al 60% v/v, utilizadas para validar los modelos estadísticos.	80
Cuadro 43. Humedad de muestras de inóculo.....	91
Cuadro 44. Concentración de azúcares presente en los caldos de melaza preparados a distintas concentraciones.....	91
Cuadro 45. Concentración de azúcares presente en las fermentaciones utilizadas para generar los modelos estadísticos.....	92
Cuadro 46. Concentración de productos de fermentación presente en las fermentaciones utilizadas para generar los modelos estadísticos.....	93
Cuadro 47. Concentración de azúcares presente en las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.....	94
Cuadro 48. Concentración de productos de fermentación presente en las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.....	95

Cuadro 49. Cantidad de producto para las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.	96
Cuadro 50. Cantidad estimada de consumo de azúcares, producción de CO ₂ y otros compuestos, y crecimiento de microorganismo para las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.	97
Cuadro 51. Rendimiento de los productos para las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.....	98

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química del etanol.	7
Figura 2. Estructura química del ácido acético.	8
Figura 3. Estructura química del ácido láctico.	9
Figura 4. Estructura química del ácido L láctico	9
Figura 5. Estructura química del ácido D láctico.	9
Figura 6. Posibles rutas catabólicas generales para el piruvato formado en el proceso de glucólisis.	10
Figura 7. Esquema del proceso de glucólisis, a) fase preparatoria b) fase de pago.	11
Figura 8. Esquema del proceso de una fermentación láctica a partir de glucosa.	12
Figura 9. Estructura química de la D-Glucosa (a), D-Galactosa (b) y D-Fructuosa (c).	13
Figura 10. Estructura química de la celulosa (monómero entre corchetes).	13
Figura 11. Esquema de rutas metabólicas para la formación de algunos productos de biosíntesis del <i>R. oryzae</i>	16
Figura 12. Efecto de la concentración de melaza sobre la producción de ácido láctico en fermentaciones con <i>R. oryzae</i> (●-75g melaza/litro; □-150g melaza/litro; ▲-300g melaza/litro; ◆-400g melaza/litro).	18
Figura 13. Ejemplo de un esquema gráfico de una superficie de respuesta sin curvatura.	21
Figura 14. Ejemplo de un esquema gráfico de una superficie de respuesta con curvatura.	22
Figura 15. Gráfica normal de efectos estandarizados con nivel de confianza del 95% para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	42
Figura 16. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados con nivel de confianza del 95% para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	43
Figura 17. Gráfica de efectos principales para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	43
Figura 18. Gráfica de interacción de efectos para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	44
Figura 19. Gráfica normal de efectos estandarizados con nivel de confianza del 95% para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	46
Figura 20. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados con nivel de confianza del 95% para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	47

Figura 21. Gráfica de efectos principales para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	47
Figura 22. Gráfica de interacción de efectos para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	48
Figura 23. Gráfica normal de efectos estandarizados con nivel de confianza del 95% para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	50
Figura 24. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados con nivel de confianza del 95% para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	51
Figura 25. Gráfica de efectos principales para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	51
Figura 26. Gráfica de interacción de efectos para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	52
Figura 27. Gráfica de contorno para la concentración de ácido láctico en función del pH inicial y temperatura en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	113
Figura 28. Gráfica de contorno para la concentración de ácido láctico en función de la concentración de sustrato y temperatura en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	113
Figura 29. Gráfica de contorno para la concentración de ácido láctico en función de la concentración de sustrato y pH inicial en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i> . ..	114
Figura 30. Gráfica de contorno para la concentración de etanol en función del pH inicial y temperatura en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	114
Figura 31. Gráfica de contorno para la concentración de etanol en función de la concentración de sustrato y temperatura en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	115
Figura 32. Gráfica de contorno para la concentración de etanol en función de la concentración de sustrato y pH inicial en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	115
Figura 33. Gráfica de contorno para la concentración de ácido acético en función del pH inicial y temperatura en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	116
Figura 34. Gráfica de contorno para la concentración de ácido acético en función de la concentración de sustrato y temperatura en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	116
Figura 35. Gráfica de contorno para la concentración de ácido acético en función de la concentración de sustrato y pH inicial en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i> . ..	117
Figura 36. Ficha técnica de la melaza empleada durante la experimentación.	117

Figura 37. Autoclave utilizada durante la experimentación.....	118
Figura 38. Balanza utilizada durante la experimentación.	118
Figura 39. Balanza semi analítica utilizada durante la experimentación.	119
Figura 40. Centrífuga utilizada durante la experimentación.....	119
Figura 41. Estufa con agitación utilizada durante la experimentación.	120
Figura 42. Horno para peso seco utilizada durante la experimentación.	120
Figura 43. Incubadora sin agitación utilizada durante la experimentación.....	121
Figura 44. Incubadora con agitación utilizada durante la experimentación.....	121
Figura 45. Caja petri con <i>Rhizopus oryzae</i> sembrado en agar PDA.	122
Figura 46. Cromatograma HPLC de la muestra del caldo con concentración de 350 g melaza por litro, diluida al 6% v/v.	122
Figura 47. Cromatograma HPLC de la muestra del caldo con concentración de 433 g melaza por litro, diluida al 6% v/v.	122
Figura 48. Cromatograma HPLC de la muestra del caldo con concentración de 450 g melaza por litro, diluida al 6% v/v.	123
Figura 49. Cromatograma HPLC de la muestra del caldo con concentración de 550 g melaza por litro, diluida al 6% v/v.	123
Figura 50. Cromatograma HPLC de la muestra -1,-1,0 (réplica 1) diluida al 60% v/v.	123
Figura 51. Cromatograma HPLC de la muestra -1,-1,0 (réplica 2) diluida al 60% v/v.	124
Figura 52. Cromatograma HPLC de la muestra -1,0,-1 (réplica 1) diluida al 60% v/v.	124
Figura 53. Cromatograma HPLC de la muestra -1,0,-1 (réplica 2) diluida al 60% v/v.	124
Figura 54. Cromatograma HPLC de la muestra -1,0,1 (réplica 1) diluida al 60% v/v.....	125
Figura 55. Cromatograma HPLC de la muestra -1,0,1 (réplica 2) diluida al 60% v/v.....	125
Figura 56. Cromatograma HPLC de la muestra -1,1,0 (réplica 1) diluida al 60% v/v.....	125
Figura 57. Cromatograma HPLC de la muestra -1,1,0 (réplica 2) diluida al 60% v/v.....	126
Figura 58. Cromatograma HPLC de la muestra 0,-1,-1 (réplica 1) diluida al 60% v/v.	126
Figura 59. Cromatograma HPLC de la muestra 0,-1,-1 (réplica 2) diluida al 60% v/v.	126
Figura 60. Cromatograma HPLC de la muestra 0,-1,1 (réplica 1) diluida al 60% v/v.....	127
Figura 61. Cromatograma HPLC de la muestra 0,-1,1 (réplica 2) diluida al 60% v/v.....	127
Figura 62. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 1) diluida al 60% v/v.....	127
Figura 63. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 2) diluida al 60% v/v.....	128
Figura 64. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 3) diluida al 60% v/v.....	128
Figura 65. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 4) diluida al 60% v/v.....	128

Figura 66. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 5) diluida al 60% v/v.....	129
Figura 67. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 6) diluida al 60% v/v.....	129
Figura 68. Cromatograma HPLC de la muestra 0,1,-1 (réplica 1) diluida al 60% v/v.....	129
Figura 69. Cromatograma HPLC de la muestra 0,1,-1 (réplica 2) diluida al 60% v/v.....	130
Figura 70 Cromatograma HPLC de la muestra 0,1,1 (réplica 1) diluida al 60% v/v.....	130
Figura 71. Cromatograma HPLC de la muestra 0,1,1 (réplica 2) diluida al 60% v/v.....	130
Figura 72 Cromatograma HPLC de la muestra 1,-1,0 (réplica 1) diluida al 60% v/v.....	131
Figura 73. Cromatograma HPLC de la muestra 1,-1,0 (réplica 2) diluida al 60% v/v.....	131
Figura 74. Cromatograma HPLC de la muestra 1,0,-1 (réplica 1) diluida al 60% v/v.....	131
Figura 75. Cromatograma HPLC de la muestra 1,0,-1 (réplica 2) diluida al 60% v/v.....	132
Figura 76. Cromatograma HPLC de la muestra 1,0,1 (réplica 1) diluida al 60% v/v.....	132
Figura 77. Cromatograma HPLC de la muestra 1,0,1 (réplica 2) diluida al 60% v/v.....	132
Figura 78. Cromatograma HPLC de la muestra 1,1,0 (réplica 1) diluida al 60% v/v.....	133
Figura 79. Cromatograma HPLC de la muestra 1,1,0 (réplica 2) diluida al 60% v/v.....	133
Figura 80. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 1) diluida al 60% v/v..	133
Figura 81. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 2) diluida al 60% v/v..	134
Figura 82. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 3) diluida al 60% v/v..	134
Figura 83. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 4) diluida al 60% v/v..	134
Figura 84. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 5) diluida al 60% v/v..	135
Figura 85. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 6) diluida al 60% v/v..	135
Figura 86. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 7) diluida al 60% v/v..	135
Figura 87. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 8) diluida al 60% v/v..	136
Figura 88. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 1) diluida al 60% v/v.....	136
Figura 89. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 2) diluida al 60% v/v.....	136
Figura 90. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 3) diluida al 60% v/v.....	137
Figura 91. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 4) diluida al 60% v/v.....	137
Figura 92. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 5) diluida al 60% v/v.....	137
Figura 93. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 6) diluida al 60% v/v.....	138
Figura 94. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 7) diluida al 60% v/v.....	138
Figura 95. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 8) diluida al 60% v/v.....	138
Figura 96. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 1) diluida al 60% v/v. ..	139
Figura 97. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 2) diluida al 60% v/v. ..	139
Figura 98. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 3) diluida al 60% v/v. ..	139

Figura 99. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 4) diluida al 60% v/v. ...	140
Figura 100. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 5) diluida al 60% v/v. ...	140
Figura 101. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 6) diluida al 60% v/v. ...	140
Figura 102. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 7) diluida al 60% v/v. ...	141
Figura 103. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 8) diluida al 60% v/v. ...	141
Figura 104. Cromatograma HPLC de la muestra -1,-1,0 (réplica 1) diluida al 30% v/v.	141
Figura 105. Cromatograma HPLC de la muestra -1,-1,0 (réplica 2) diluida al 30% v/v.	142
Figura 106. Cromatograma HPLC de la muestra -1,0,-1 (réplica 1) diluida al 30% v/v.	142
Figura 107. Cromatograma HPLC de la muestra -1,0,-1 (réplica 2) diluida al 30% v/v.	142
Figura 108. Cromatograma HPLC de la muestra -1,0,-1 (réplica 1) diluida al 30% v/v.	143
Figura 109. Cromatograma HPLC de la muestra -1,0,-1 (réplica 2) diluida al 30% v/v.	143
Figura 110. Cromatograma HPLC de la muestra -1,1,0 (réplica 1) diluida al 30% v/v.....	143
Figura 111. Cromatograma HPLC de la muestra -1,1,0 (réplica 2) diluida al 30% v/v.....	144
Figura 112. Cromatograma HPLC de la muestra 0,-1,-1 (réplica 1) diluida al 20% v/v.	144
Figura 113. Cromatograma HPLC de la muestra 0,-1,-1 (réplica 2) diluida al 30% v/v.	144
Figura 114. Cromatograma HPLC de la muestra 0,-1,1 (réplica 1) diluida al 30% v/v.....	145
Figura 115. Cromatograma HPLC de la muestra 0,-1,1 (réplica 2) diluida al 30% v/v.....	145
Figura 116. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 1) diluida al 30% v/v.....	145
Figura 117. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 2) diluida al 30% v/v.....	146
Figura 118. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 3) diluida al 30% v/v.....	146
Figura 119. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 4) diluida al 30% v/v.....	146
Figura 120. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 5) diluida al 30% v/v.....	147
Figura 121. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 6) diluida al 30% v/v.....	147
Figura 122. Cromatograma HPLC de la muestra 0,1,-1 (réplica 1) diluida al 30% v/v.....	147
Figura 123. Cromatograma HPLC de la muestra 0,1,-1 (réplica 2) diluida al 30% v/v.....	148
Figura 124. Cromatograma HPLC de la muestra 0,1,1 (réplica 1) diluida al 30% v/v.....	148
Figura 125. Cromatograma HPLC de la muestra 0,1,1 (réplica 2) diluida al 30% v/v.....	148
Figura 126. Cromatograma HPLC de la muestra 1,-1,0 (réplica 1) diluida al 30% v/v.....	149
Figura 127. Cromatograma HPLC de la muestra 1,-1,0 (réplica 2) diluida al 30% v/v.....	149
Figura 128. Cromatograma HPLC de la muestra 1,0,-1 (réplica 1) diluida al 30% v/v.....	149
Figura 129. Cromatograma HPLC de la muestra 1,0,-1 (réplica 2) diluida al 30% v/v.....	150
Figura 130. Cromatograma HPLC de la muestra 1,0,1 (réplica 1) diluida al 30% v/v.....	150
Figura 131. Cromatograma HPLC de la muestra 1,0,1 (réplica 2) diluida al 30% v/v.....	150

Figura 132. Cromatograma HPLC de la muestra 1,1,0 (réplica 1) diluida al 30% v/v.....	151
Figura 133. Cromatograma HPLC de la muestra 1,1,0 (réplica 2) diluida al 30% v/v.....	151
Figura 134. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 1) diluida al 30% v/v.	151
Figura 135. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 2) diluida al 30% v/v.	152
Figura 136. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 3) diluida al 30% v/v.	152
Figura 137. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 4) diluida al 30% v/v.	152
Figura 138. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 5) diluida al 30% v/v.	153
Figura 139. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 6) diluida al 30% v/v.	153
Figura 140. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 7) diluida al 30% v/v.	153
Figura 141. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 8) diluida al 30% v/v.	154
Figura 142. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 1) diluida al 30% v/v.....	154
Figura 143. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 2) diluida al 30% v/v.....	154
Figura 144. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 3) diluida al 30% v/v.....	155
Figura 145. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 4) diluida al 30% v/v.....	155
Figura 146. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 5) diluida al 30% v/v.....	155
Figura 147. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 6) diluida al 30% v/v.....	156
Figura 148. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 7) diluida al 30% v/v.....	156
Figura 149. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 8) diluida al 30% v/v.....	156
Figura 150. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 1) diluida al 30% v/v.	157
Figura 151. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 2) diluida al 30% v/v.	157
Figura 152. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 3) diluida al 30% v/v.	157
Figura 153. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 4) diluida al 30% v/v.	158
Figura 154. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 5) diluida al 30% v/v.	158
Figura 155. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 6) diluida al 30% v/v.	158
Figura 156. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 7) diluida al 30% v/v.	159
Figura 157. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 8) diluida al 30% v/v.	159
Figura 158. Biomasa en peso seco de la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).	159
Figura 159. Biomasa en peso seco de la fermentación -1,-1,0 (réplica 2).	160
Figura 160. Biomasa en peso seco de la fermentación -1,0,-1 (réplica 1).	160
Figura 161. Biomasa en peso seco de la fermentación -1,0,-1 (réplica 2).	160
Figura 162. Biomasa en peso seco de la fermentación -1,0,1 (réplica 1).....	160
Figura 163. Biomasa en peso seco de la fermentación -1,0,1 (réplica 2).....	161
Figura 164. Biomasa en peso seco de la fermentación -1,1,0 (réplica 1).....	161

Figura 165. Biomasa en peso seco de la fermentación -1,1,0 (réplica 2).....	161
Figura 166. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,-1,-1 (réplica 1)	161
Figura 167. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,-1,-1 (réplica 2).	162
Figura 168. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,-1,1 (réplica 1).....	162
Figura 169. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,-1,1 (réplica 2).....	162
Figura 170. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,0,0 (réplica 1).....	162
Figura 171. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,0,0 (réplica 2).....	163
Figura 172. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,0,0 (réplica 3).....	163
Figura 173. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,0,0 (réplica 4).....	163
Figura 174. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,0,0 (réplica 5).....	163
Figura 175. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,0,0 (réplica 6).....	164
Figura 176. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,1,-1 (réplica 1).....	164
Figura 177. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,1,-1 (réplica 2).....	164
Figura 178. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,1,1 (réplica 1).....	164
Figura 179. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,1,1 (réplica 2).....	165
Figura 180. Biomasa en peso seco de la fermentación 1,-1,0 (réplica 1).....	165
Figura 181. Biomasa en peso seco de la fermentación 1,-1,0 (réplica 2).....	165
Figura 182. Biomasa en peso seco de la fermentación 1,0,-1 (réplica 1).....	165
Figura 183. Biomasa en peso seco de la fermentación 1,0,-1 (réplica 2).....	166
Figura 184. Biomasa en peso seco de la fermentación 1,0,1 (réplica 1).....	166
Figura 185. Biomasa en peso seco de la fermentación 1,0,1 (réplica 2).....	166
Figura 186. Biomasa en peso seco de la fermentación 1,1,0 (réplica 1).....	166
Figura 187. Biomasa en peso seco de la fermentación 1,1,0 (réplica 2).....	167
Figura 188. Biomasa en peso seco de la fermentación AcLacMax (réplica 1).....	167
Figura 189. Biomasa en peso seco de la fermentación AcLacMax (réplica 2).....	167
Figura 190. Biomasa en peso seco de la fermentación AcLacMax (réplica 3).....	167
Figura 191. Biomasa en peso seco de la fermentación AcLacMax (réplica 4).....	168
Figura 192. Biomasa en peso seco de la fermentación AcLacMax (réplica 5).....	168
Figura 193. Biomasa en peso seco de la fermentación AcLacMax (réplica 6).....	168
Figura 194. Biomasa en peso seco de la fermentación AcLacMax (réplica 7).....	168
Figura 195. Biomasa en peso seco de la fermentación AcLacMax (réplica 8).....	169
Figura 196. Biomasa en peso seco de la fermentación EtMax (réplica 1).....	169
Figura 197. Biomasa en peso seco de la fermentación EtMax (réplica 2).....	169

Figura 198. Biomasa en peso seco de la fermentación EtMax (réplica 3).	169
Figura 199. Biomasa en peso seco de la fermentación EtMax (réplica 4).	170
Figura 200. Biomasa en peso seco de la fermentación EtMax (réplica 5).	170
Figura 201. Biomasa en peso seco de la fermentación EtMax (réplica 6).	170
Figura 202. Biomasa en peso seco de la fermentación EtMax (réplica 7).	170
Figura 203. Biomasa en peso seco de la fermentación EtMax (réplica 8).	171
Figura 204. Biomasa en peso seco de la fermentación AcAcMax (réplica 1).	171
Figura 205. Biomasa en peso seco de la fermentación AcAcMax (réplica 2).	171
Figura 206. Biomasa en peso seco de la fermentación AcAcMax (réplica 3).	171
Figura 207. Biomasa en peso seco de la fermentación AcAcMax (réplica 4).	172
Figura 208. Biomasa en peso seco de la fermentación AcAcMax (réplica 5).	172
Figura 209. Biomasa en peso seco de la fermentación AcAcMax (réplica 6).	172
Figura 210. Biomasa en peso seco de la fermentación AcAcMax (réplica 7).	172
Figura 211. Biomasa en peso seco de la fermentación AcAcMax (réplica 8).	173

LISTA DE ECUACIONES

	Página
Ecuación 1. Modelo general de primer orden para diseño de superficie de respuesta con k cantidad de variables independientes.....	21
Ecuación 2. Modelo general cuadrático para un diseño de superficie de respuesta con k cantidad de variables independientes.	22
Ecuación 3. Humedad del inóculo a partir de su peso húmedo y su peso seco.....	31
Ecuación 4. Modelo propuesto para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	40
Ecuación 5. Modelo propuesto para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	44
Ecuación 6. Modelo propuesto para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con <i>Rhizopus oryzae</i>	48

RESUMEN

Rhizopus oryzae (*R. oryzae*) es un hongo filamentoso que en la actualidad se utiliza para producir sustancias químicas como ácido láctico y etanol; sustancias que en los últimos años han visto un aumento en su demanda mundial, esto por las diversas aplicaciones que ambas sustancias poseen, que van desde la industria alimenticia y de polímeros para el ácido láctico, o el farmacéutico y clínico para el etanol. Además, posee la capacidad de crecer en subproductos industriales como, por ejemplo, melaza; subproducto de fácil acceso en Guatemala debido a que el país posee un fuerte sector azucarero. Por estas características del microorganismo, se estudió el impacto que tienen la temperatura de fermentación, el pH del medio y la concentración inicial de sustrato sobre la producción de ácido láctico, etanol y ácido acético, utilizando modelos estadísticos. Estos modelos indicaron que entre 33 y 41 °C la temperatura de fermentación no posee un efecto significativo sobre la producción de ácido láctico ni de ácido acético, pero sí sobre la producción de etanol; además, en los rangos de estudio, cambios en el pH del medio y en la concentración de sustrato afectaron de manera significativa la producción de los compuestos como lo muestran los Diagramas de Pareto, las gráficas normales de efectos estandarizados y las gráficas de efectos principales obtenidas. Por otra parte, con los modelos propuestos se obtuvieron condiciones sugeridas de fermentación para favorecer al ácido láctico, etanol y ácido acético, condiciones que según los rendimientos calculados con balances de masa mejoran la producción hasta valores de 0.468 ± 0.022 g ácido acético/g sustrato; 0.162 ± 0.011 g etanol/g sustrato; 0.157 ± 0.005 g ácido acético/g sustrato. Además, las concentraciones esperadas a estas condiciones coincidieron con los resultados experimentales por lo que se consideran a los modelos como una propuesta válida para evaluar las condiciones de fermentación de melaza con *R. oryzae*.

I. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo indica la manera en que se evaluó, usando modelos estadísticos, el efecto de la temperatura de fermentación, el pH del medio y la concentración de sustrato sobre fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*. La fermentación es un proceso que ayuda a descomponer grandes moléculas orgánicas a través de la acción de microorganismos en otras más simples. Este proceso es utilizado actualmente para la producción de sustancias de interés tales como etanol, ácido málico, ácido láctico, ácido acético y ciertos productos aromáticos. Las tendencias más recientes involucran el uso de subproductos industriales como sustrato para una fermentación con tal de adoptar modelos más económicos y amigables con el ambiente (Ahmad, Fawzi y Taher, 2020).

El hongo *Rhizopus oryzae* es capaz de producir varios compuestos orgánicos por medio de una fermentación, entre los cuales destacan el ácido láctico y etanol. Algunas de las ventajas de producir ácido láctico por fermentación es que no se obtienen mezclas racémicas del compuesto (Ghosh y Rani, 2011); por otro lado, el etanol actualmente se produce por fermentaciones de azúcares, pero el *R. oryzae* presenta la ventaja de poder usar subproductos industriales como fuentes de carbono, capacidad que otros microorganismos no poseen. Entre los subproductos de interés se encuentra la melaza por su contenido total de azúcares, entre 50 y 60 %, y porque es un subproducto de fácil acceso debido a Guatemala es un país con un fuerte sector azucarero (Melgar y colaboradores, 2014). Además, en la literatura se ha reportado que cambios en la temperatura de fermentación, el pH del medio y en la concentración de sustrato tienen un efecto sobre las concentraciones que se obtienen de los productos de biosíntesis. Por consiguiente, investigar las condiciones a las que se favorece la biosíntesis de etanol y ácido láctico durante una fermentación de melaza con *Rhizopus oryzae* podría brindar una mejora en la producción de estos compuestos.

Para estudiar estas condiciones se realizaron fermentaciones de melaza con *R. oryzae* a escala laboratorio variando la temperatura de fermentación, el pH del medio y la concentración inicial del medio entre 33-41°C, 7-11 y 350-550 g melaza/L; respectivamente. Las concentraciones de los productos de biosíntesis obtenidos en estas fermentaciones fueron analizadas con ayuda del software Minitab, versión 21, utilizando un diseño Box-Behnken de Superficie de Respuesta, para obtener las condiciones a las que se favorece cada compuesto. Al conocer estas condiciones, se realizaron otras fermentaciones para verificar los resultados obtenidos con los diseños propuestos. Cabe destacar que el rendimiento de cada fermentación su estimado por medio de balances de masa.

Al finalizar la experimentación se determinó que los modelos estadísticos generados son válidos como una propuesta para evaluar las condiciones de fermentación de melaza con *R. oryzae* puesto que los resultados experimentales en las fermentaciones coinciden con los intervalos de predicción de los modelos propuestos. Asimismo, se determinó el efecto que cada factor (temperatura de fermentación, pH del medio y concentración inicial de sustrato) tiene sobre los productos de biosíntesis estudiados. Además, las fermentaciones a las condiciones sugeridas por los modelos estadísticos presentaron un mayor rendimiento que las fermentaciones a otras condiciones.

II. OBJETIVOS

A. General

Proponer modelos estadísticos para fermentaciones a escala laboratorio con *Rhizopus oryzae*, empleando melaza como fuente de carbono, para determinar las condiciones que favorecen la biosíntesis de productos de fermentación.

B. Específicos

- Realizar fermentaciones a escala laboratorio con *Rhizopus oryzae* empleando melaza como sustrato, variando temperatura de fermentación, pH del medio y concentración inicial de sustrato.
- Generar modelos estadísticos con los cuales determinar las condiciones, dentro del rango de estudio, que favorecen la biosíntesis de productos de fermentación del *Rhizopus oryzae* y pronosticar la producción de estos.
- Comparar los pronósticos a las condiciones que favorecen la biosíntesis de los productos de fermentación con resultados obtenidos en fermentaciones a escala laboratorio, a esas condiciones, para verificar los modelos.

III. JUSTIFICACIÓN

Productos químicos como el etanol y el ácido láctico son cada vez más demandados por distintos sectores industriales. En el año 2000, la producción mundial de etanol fue de 17.25 mil millones de litros y aumentó a un volumen de más de 74 mil millones de litros en 2009 (Balat y Balat, 2009). Esta tendencia se ha mantenido en los últimos años; además, la situación sanitaria actual ha aumentado la demanda del etanol debido a su uso clínico como desinfectante. El mercado mundial de ácido l-(+)-láctico en el año 2000 superó las 100,000 toneladas, mientras que para el 2012 aumentó a 259,000 toneladas (Ahmad; Fawzi y Taher, 2020). Actualmente esta demanda ha aumentado considerablemente porque el ácido láctico es el monómero empleado en la producción de ácido poliláctico (PLA por sus siglas en inglés), compuesto que está tomando auge por ser un polímero biodegradable; además, el ácido l-(+)-láctico se utiliza actualmente como acidulante y conservante para alimentos, pero también se puede utilizar en el mercado de disolventes, o productos químicos oxigenados. Esta creciente demanda provoca que se deban buscar formas para mejorar la producción actual, ya sea sintética o biotecnológica de los mencionados compuestos.

Rhizopus oryzae es un hongo capaz de producir etanol, ácido l-(+)-láctico, entre otros compuestos, por medio de una fermentación. Las fuentes de carbono ya comprobadas para fermentaciones con *Rhizopus oryzae* son glucosa, maltosa, sacarosa o subproductos industriales como melaza y suero de queso, o algún subproducto agrícola (Bulut; Elibol y Ozer, 2004). En Guatemala, la melaza es uno de los mayores subproductos industriales, debido a la importancia del sector azucarero en el país. Según datos del Ingenio La Union, sólo este ingenio tiene una producción estimada de 122,855 toneladas métricas de melaza al año. Debido a la alta cantidad de melaza en la industria azucarera, buena parte de este subproducto se destina a la industria licorera o se comercializa como suplemento alimenticio para ganado; no obstante, aún existe una cantidad de excedente significativa.

Debido a la alta disponibilidad, existe oportunidad para utilizar la melaza de manera biotecnológica como una fuente de carbono de bajo costo, que al combinarse con la capacidad del *Rhizopus oryzae* de producir etanol y ácido láctico, y con la creciente demanda de ambos compuestos, genera un gran potencial para la producción de las mencionadas sustancias químicas empleando este microorganismo. Cuestión por la cual, investigar las condiciones de fermentación a las que se obtiene un mayor rendimiento resulta de interés.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Melaza

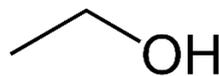
La melaza también es conocida como miel final o “miel c”. Se trata de un producto líquido espeso derivado de la caña de azúcar, que se obtiene como residuo del proceso de producción de azúcar. Físicamente es similar a la miel, aunque de color es más oscuro, prácticamente negro y posee un bajo contenido de agua. Se elabora mediante la cocción del jugo de la caña de azúcar hasta la evaporación parcial del agua que contiene, formándose un producto meloso (Melgar y colaboradores, 2014).

La melaza tiene un contenido porcentual promedio de azúcares fermentables de alrededor del 50% (típicamente 33% de sacarosa, 9% de glucosa y 8% de fructosa). Hoy en día la melaza es la más aprovechada para fines diferentes al azúcar, generalmente para la producción de bebidas alcohólicas como el ron y la producción industrial de etanol. Cabe mencionar que la producción de melaza en Guatemala es de 0.03 toneladas por tonelada de caña molida, cantidad equivalente a 0.24 toneladas de melaza por tonelada de azúcar producida (Melgar y colaboradores, 2014).

B. Etanol

El etanol, de fórmula química $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, es el principal componente de las bebidas alcohólicas. Es soluble en agua y tiene una densidad de 789 gramos por litro a 20 °C (Gnansounou y Dauriat, 2005: 815). Se produce por fermentación, por lo general de fermentación de levadura, el cual es un proceso biotecnológico para convertir el azúcar en productos de interés (Onuki y colaboradores, 2008). Aunque la levadura produce principalmente etanol, también produce subproductos que deben eliminarse para obtener etanol puro. Algunos de estos subproductos son ésteres, ácidos orgánicos, alcoholes superiores, entre otros (Onuki y colaboradores, 2008).

Figura 1. Estructura química del etanol.

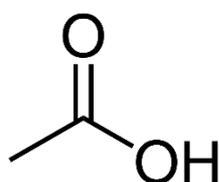


El uso más conocido del etanol es como componente de bebidas alcohólicas; no obstante, también posee aplicaciones clínicas por su capacidad de desinfección y en la industria de productos químicos se usa como materia prima en la producción de otros compuestos de mayor peso molecular (Rosales-Calderón y Arantes, 2019).

C. Ácido acético

El ácido acético es un importante compuesto químico y se utiliza tradicionalmente como conservante de alimentos. Es un ácido carboxílico transparente, incoloro y corrosivo con sabor agrio y olor acre. Se produce tanto sintéticamente como por medios biotecnológicos. Su producción sintética depende principalmente de materias primas derivadas del petróleo, como metanol, acetaldehído, butano o etileno. Hoy en día, la ruta biológica representa solo alrededor del 10 por ciento de la producción mundial. Sigue siendo importante para la producción de vinagre, porque muchas de las leyes mundiales de pureza alimentaria estipulan que el vinagre utilizado en los alimentos debe ser de origen biológico (Vidra y Németh, 2018).

Figura 2. Estructura química del ácido acético.



El ácido acético se ha producido a partir del etanol en forma de vinagre desde la antigüedad mediante la fermentación del vino y la cerveza. Hay un proceso de fermentación de dos etapas para producir vinagre, consisten en fermentación alcohólica y acética. Los azúcares fermentables se convierten en etanol por la acción de microorganismos, normalmente cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Luego, el etanol es oxidado por la acción de enzimas en ácido acético (Vidra y Németh, 2018).

D. Ácido láctico

El ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanoico) es un ácido orgánico ampliamente distribuido en la naturaleza. Es el ácido 2-hidroxicarboxílico más simple, tiene un átomo de carbono quiral y existe en dos formas enantioméricas (Castillo y colaboradores, 2013). El ácido L-láctico dextrorrotatorio se encuentra en el músculo y la sangre de animales, mientras que la forma D producida por microorganismos se encuentra en productos lácteos, por ejemplo (Koolman; Röhm y Robertson, 2005). El comportamiento químico del ácido láctico está determinado por sus propiedades físicoquímicas, entre las que se encuentran: carácter ácido en medio acuoso; reactividad bifuncional asociada a la presencia de un grupo carboxilo e hidroxilo, lo que le confiere una gran versatilidad de reacción; actividad óptica asimétrica de su carbono 2, entre otras propiedades (Castillo y colaboradores, 2013).

Figura 3. Estructura química del ácido láctico.

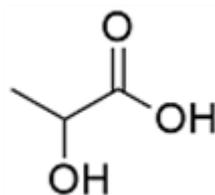


Figura 4. Estructura química del ácido L láctico

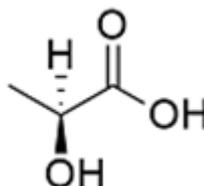
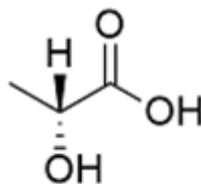


Figura 5. Estructura química del ácido D láctico.



Debido a estas propiedades, el ácido láctico es un producto industrial importante que se utiliza como precursor de compuestos pequeños (propilenglicol) o grandes (polímeros acrílicos) (San-Martin; Pazos y Coca, 1992). Además, el ácido láctico se puede convertir en ácido poliláctico (PLA), que son polímeros ecológicos, biodegradables que se utilizan normalmente para producir materiales de embalaje, fibras y espumas. Sin embargo, a nivel industrial, la producción de materiales de embalaje a partir de PLA todavía se considera una tecnología inmadura en comparación con las materias primas petroquímicas (Ahmad; Fawzi y Taher, 2020). Estos polímeros también son biocompatibles, siendo útiles para la fabricación de dispositivos protésicos, suturas y dosificación interna de fármacos (Chahal y Starr, 2006).

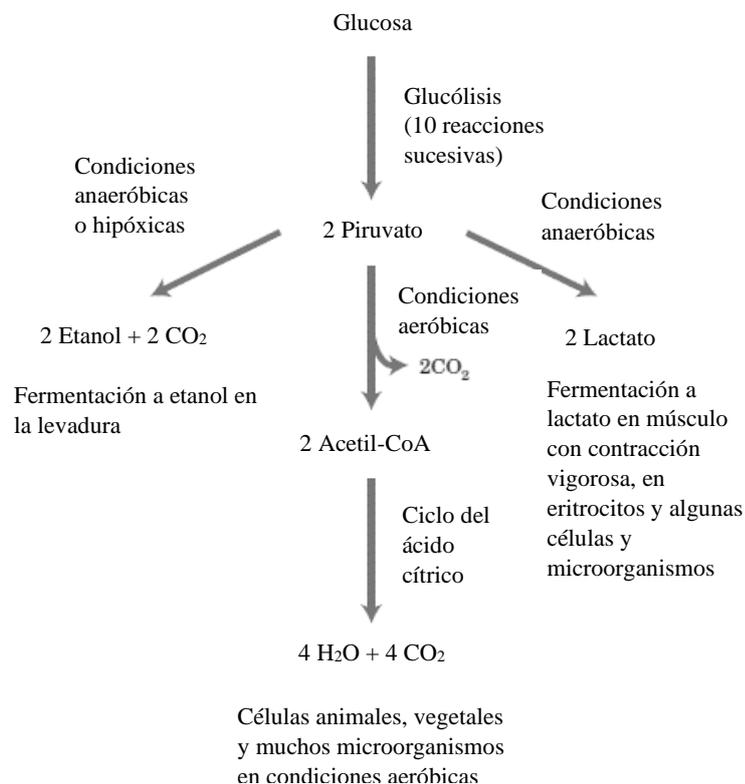
La demanda mundial de ácido láctico en 2007 se estimó en 130.000 y 150.000 toneladas métricas por año, con precios comerciales de ácido láctico de grado alimenticio que oscilan entre 1,38 dólares americanos por kilogramo (50% de pureza) y 1,54 dólares americanos por kilogramo para más purezas elevadas (88% de pureza) (Rojan; Nampoothiri y Pandey, 2007).

E. Fermentación

La fermentación es un término general para la degradación anaeróbica de glucosa u otros nutrientes orgánicos para obtener energía, conservada como ATP. En una fermentación, metabólicamente, primero ocurre una fase de glucólisis (descomposición de la glucosa de seis carbonos en dos moléculas del piruvato de tres carbonos), que se divide en dos fases, la fase preparatoria y la fase de pago. La glucólisis difiere entre las especies solo en los detalles de su regulación y en el destino metabólico posterior del piruvato formado (Nelson y Cox, 2017).

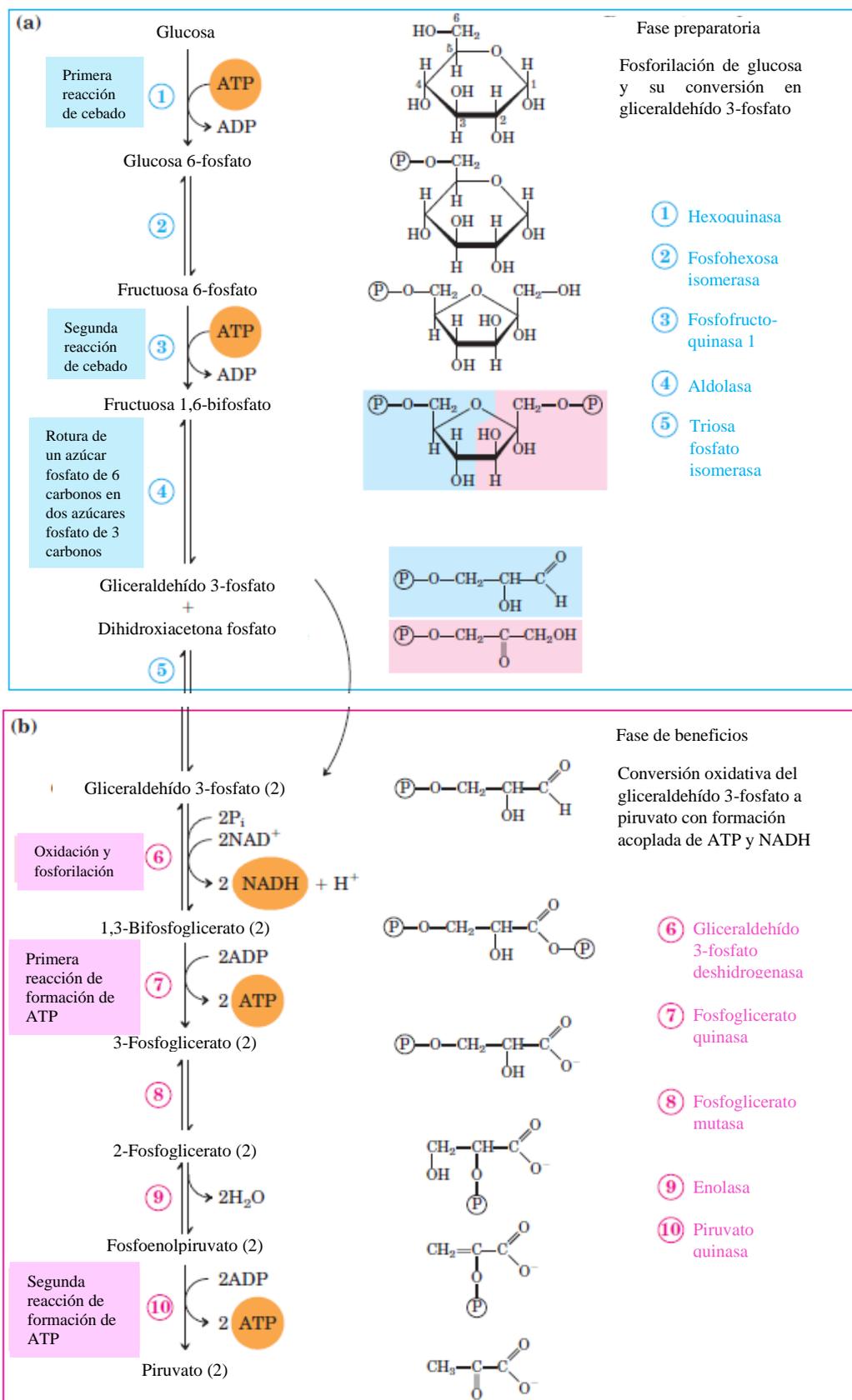
Una vez formado el piruvato, este puede seguir tres rutas distintas dependiendo de las condiciones, que pueden ser aeróbicas o anaeróbicas, y del organismo que esté llevando a cabo el mencionado proceso. La primera ruta, posible bajo condiciones aeróbicas, consiste en la respiración celular, en donde a partir del piruvato se sintetiza ATP en las mitocondrias de las células. La segunda y tercera ruta son fermentaciones en condiciones anaeróbicas, con las cuales se obtiene etanol o ácido láctico como producto principal para la segunda y tercera, respectivamente (Nelson y Cox, 2017).

Figura 6. Posibles rutas catabólicas generales para el piruvato formado en el proceso de glucólisis.



Elaboración propia basada en (Nelson y Cox, 2017)

Figura 7. Esquema del proceso de glucólisis, a) fase preparatoria b) fase de pago.

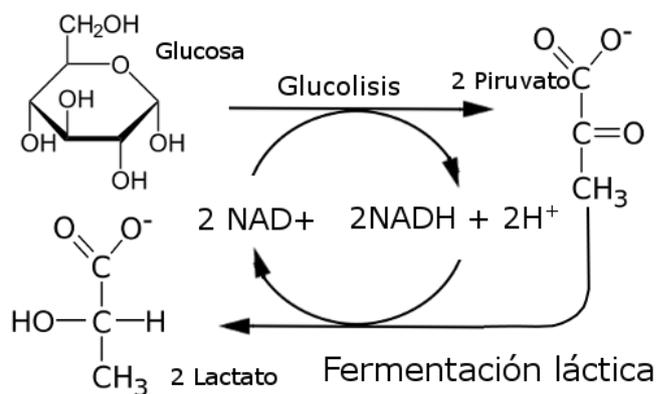


Elaboración propia basada en (Nelson y Cox, 2017)

F. Fermentación láctica

El ácido láctico puede ser producido por medio de una fermentación láctica. La fermentación láctica es relativamente rápida, tiene altos rendimientos y puede conducir, selectivamente, a uno de los dos estereoisómeros del ácido láctico o a su mezcla racémica (Axelsson, 2004). Después de la suplementación de nutrientes, las soluciones de azúcar se inoculan con el microorganismo seleccionado y tiene lugar la fermentación. Es necesario seleccionar las condiciones de fermentación más favorables, en cuanto a temperatura, pH, aireación, agitación, etc., las cuales varían según el microorganismo (Castillo y colaboradores, 2013).

Figura 8. Esquema del proceso de una fermentación láctica a partir de glucosa.

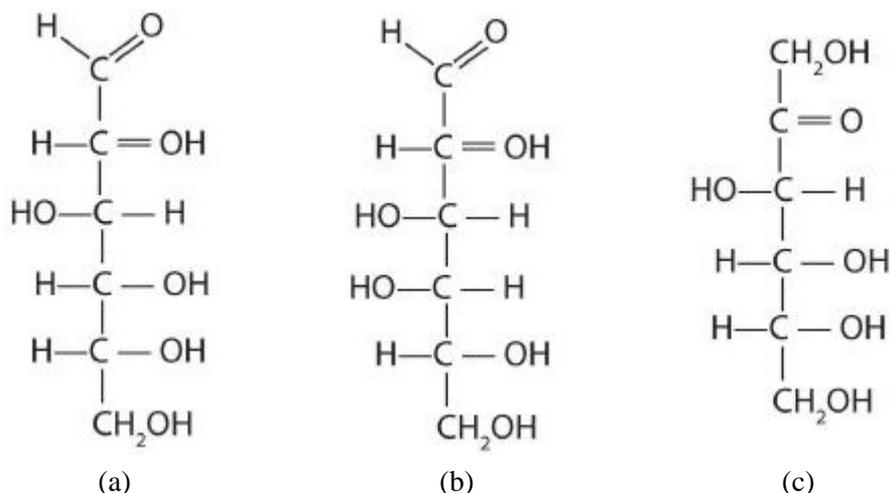


(Castillo y colaboradores, 2013)

La búsqueda de materias primas de bajo costo (sustratos) para ser utilizados en la producción de ácido láctico por fermentación ha venido impulsando el desarrollo de procesos competitivos. Las materias más utilizadas para este fin se pueden clasificar en dos grupos. El grupo de monosacáridos y disacáridos, y el grupo de sustratos poliméricos (Castillo y colaboradores, 2013).

El grupo de monosacáridos y disacáridos contiene a los carbohidratos que contienen hexosas o pentosas en su estructura molecular. Tres hexosas son particularmente abundantes: D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa. La D-glucosa, generalmente denominada simplemente glucosa, es el azúcar más abundante que se encuentra en la naturaleza; la D-galactosa no se encuentra en la naturaleza en estado no combinado, se libera cuando se hidroliza la lactosa, un disacárido que se encuentra en la leche; la D-fructosa es la cetohexosa más abundante (Nelson y Cox, 2017). Su estructura es similar a la de la glucosa; de hecho, son isómeros. Se encuentra, junto con la glucosa y la sacarosa, en la miel (que es un 40% de fructosa) y en las frutas dulces. Ejemplos de pentosas son: ribosa, arabinosa, xilosa y xilosa. La ribosa y la desoxirribosa son componentes de nucleótidos y ácidos nucleicos (Nelson y Cox, 2017).

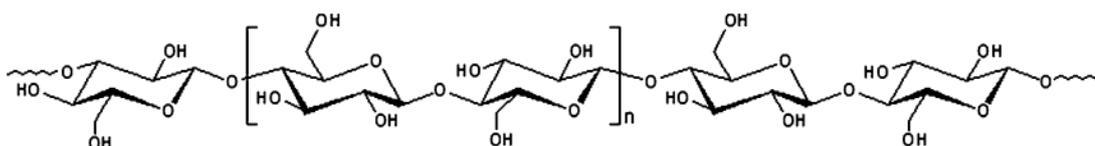
Figura 9. Estructura química de la D-Glucosa (a), D-Galactosa (b) y D-Fructuosa (c).



Además, esta categoría de fuentes de carbono incluye subproductos del sector industrial como la melaza. Las melazas tienen un alto contenido de sacarosa y son baratas y abundantes (Kotzamanidis; Roukas y Skaracis, 2002). La melaza de caña de azúcar, residuo del proceso de producción de azúcar, ha sido descrito como un sustrato favorable para la producción de ácido láctico debido a su alta fuente de carbono (Ahmad; Fawzi y Taher, 2020). Según el estudio de Nancib y colaboradores (2001), otro subproducto que se ha utilizado con éxito como sustrato para la producción de ácido láctico es el jugo de dátil, cuestión que es confirmada según Nancib, A; Nacib y Boudrant (2009). Cabe mencionar que estos dos estudios utilizaron cepas de *Lactobacillus*.

En el grupo de sustratos poliméricos se encuentran los polisacáridos. Los polisacáridos son polímeros de carbohidratos formados por diferentes unidades de monosacáridos y se encuentran principalmente en plantas que de hecho producen más del 90% del total de polisacáridos en la Tierra (Di Donato y colaboradores, 2014). El polisacárido estructural principal y más abundante que se encuentra en el reino vegetal es la celulosa, que es un polisacárido de alto peso molecular formado por unidades de celobiosa repetidas que forman una estructura lineal (Di Donato y colaboradores, 2014).

Figura 10. Estructura química de la celulosa (monómero entre corchetes).



Los componentes polisacáridos de las materias primas agrícolas residuales se pueden utilizar, mediante bioconversión, para la producción de productos químicos como ácidos orgánicos (ácido cítrico y ácido láctico) o moléculas de construcción, enzimas y biopolímeros que a su vez se emplean en una amplia gama. de campos industriales (Di Donato et al., 2014). Estos sustratos, en la mayoría de los casos no pueden ser asimilados directamente por microorganismos, requiriendo una etapa anterior de hidrólisis (Castillo y colaboradores, 2013).

La fermentación tipo batch en erlenmeyer se usa típicamente para la producción de ácido láctico, pero también se han reportado fermentaciones en procesos continuos y por lotes alimentados. La tasa de conversión más alta de ácido láctico se ha publicado en la fermentación en modo batch en comparación con la fermentación continua, pero esto da como resultado una menor producción volumétrica (Ahmad; Fawzi y Taher, 2020).

G. Microorganismos empleados en fermentaciones lácticas.

Los hongos y las bacterias son los microorganismos más utilizados para la producción de ácido láctico. Las principales familias de bacterias son *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*. En cuanto levaduras y mohos, se han usado especies de *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Geotrichium*, *Mucor*, *Penicillium* y *Rhizopus* (Sharma y colaboradores, 2020).

Las principales ventajas del uso de hongos como agentes fermentadores son su capacidad para liberar amilasas, que son enzimas capaces de hidrolizar materiales almidonados, por lo que no requieren ninguna etapa previa de hidrólisis (Deng y colaboradores, 2012). Asimismo, Jin y colaboradores (2005) han demostrado la conveniencia de emplear hongos del género *Rhizopus* en fermentaciones de desechos de la industria de procesamiento de alimentos puesto que este género es capaz de metabolizar azúcares complejas y su biomasa se puede separar fácilmente del medio debido a la formación de micelio. Estos hongos, que pertenecen al género *Rhizopus*, producen especialmente el isómero L (+) del ácido láctico (Wang y colaboradores, 2005).

H. *Rhizopus oryzae*

Rhizopus oryzae (*R. oryzae*) es un hongo filamentoso clasificado en el orden de Mucorales, filo Zygomycota. El género *Rhizopus* se estableció por primera vez en 1820 por la descripción de *Rhizopus nigricans* y es conocido por la formación de productos de fermentación como etanol, L-(+)-ácido láctico, fumárico y, en menor medida, L-(+)-ácido málico. Puede crecer bien en un amplio rango de temperatura (hasta 40°C) y rango de pH (de 4 a 9), lo que indica un comportamiento robusto y un potencial ampliamente aplicable (Meussen y colaboradores, 2012).

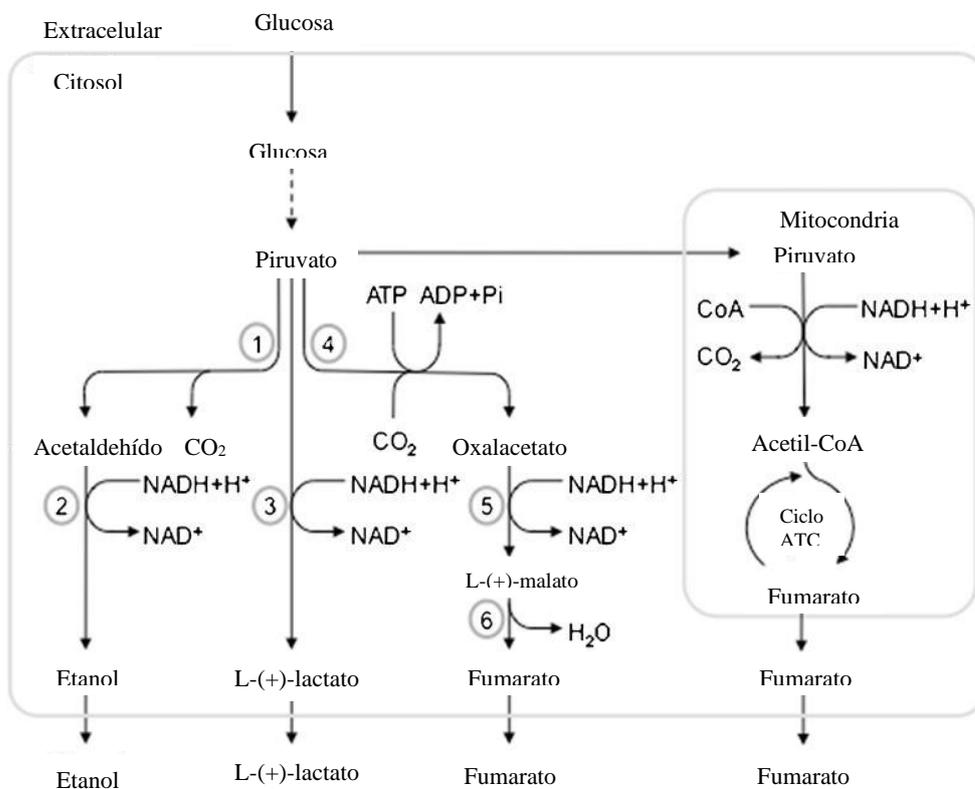
Las cepas de *R. oryzae* se utilizan a menudo en Asia para la fermentación de alimentos para la fabricación de bebidas alcohólicas, ragi o tempeh, y las cepas generalmente se consideran seguras (Meussen y colaboradores, 2012). Este microorganismo es capaz de crecer en una amplia gama de fuentes de carbono, por ejemplo, glicerol, etanol, ácido láctico, glucosa, manosa, fructosa, sacarosa, xilosa, celobiosa, ácidos grasos y aceites; y se ha demostrado que todos los azúcares mencionados son un sustrato para la producción de ácido L-(+)-láctico o fumárico según los estudios realizados por Ban y colaboradores (2001); Maas y colaboradores (2006); Park; Anh y Okuda (2004); y Skory (2000). Se prefieren las fermentaciones con cepas de *Rhizopus* a los sistemas bacterianos como *Lactobacillus spp.* para minimizar los riesgos nutricionales (Lin y colaboradores, 2007); además, *Rhizopus* solo sintetiza un isómero de ácido láctico mientras que *Lactobacillus spp.* generalmente producen una mezcla racémica (Oda y colaboradores, 2003).

I. Productos de biosíntesis del *Rhizopus oryzae*.

Para el *R. oryzae*, las vías de los principales productos de fermentación están vinculadas entre sí por la disponibilidad de piruvato. En *R. oryzae*, todas las fuentes de carbono fermentables se metabolizan a piruvato; posteriormente, el piruvato se canaliza a una serie de vías, incluidas las vías responsables de la formación de productos finales de fermentación. Esta unión se denomina punto de ramificación de piruvato (Meussen y colaboradores, 2012). El oxígeno disuelto en el medio influye en el flujo de piruvato desde el punto de ramificación. En condiciones (micro) anaeróbicas, el flujo de carbono se dirige hacia la formación de etanol, mientras que, en condiciones aeróbicas, con exceso de sustrato de carbono, el flujo se dirige hacia la producción de ácidos orgánicos (Meussen y colaboradores, 2012).

Estudios realizados por Wright; Longacre y Reimers (1996), así como los realizados por Toneya y Sato (1980) muestran que la vía fermentativa del etanol está presente para permitir el crecimiento durante cortos períodos de tiempo en ausencia de oxígeno (Wright *et al.* 1996; Yoneya y Sato 1980). Se presume que la producción de ciertos ácidos orgánicos sólo se da bajo altas concentraciones de azúcar (Maas y colaboradores, 2006). Generalmente solo se produce ácido láctico puesto que no se encuentra exceso de sustrato en muestras ambientales, pero al tener altas concentraciones de azúcar se fomenta la producción de otros ácidos orgánicos (Maas y colaboradores. 2006).

Figura 11. Esquema de rutas metabólicas para la formación de algunos productos de biosíntesis del *R. oryzae*.



Elaboración propia basado en (Meussen y colaboradores, 2012)

1. Efecto de la temperatura.

La temperatura afecta la actividad biológica de los microorganismos a través de la influencia de la movilidad de la membrana celular y la actividad de la macromolécula biológica. Se han optimizado una serie de variables de procedimiento en la producción de ácido láctico con *R. oryzae* utilizando residuos de materias primas como sustrato. Se ha encontrado que la productividad se ve afectada por la temperatura, el tiempo de fermentación y el nivel de sustrato (Ghaffar y colaboradores, 2014).

Según Zhou y colaboradores (2005), la producción de ácido L-láctico tiende a aumentar con el aumento de temperatura. Sin embargo, el rendimiento máximo obtenido de ácido L-láctico logra a temperaturas cercanas a 38 °C. Los resultados sugieren que el rango de temperatura factible es 36-38 °C, siendo 38 °C el óptimo.

2. Efecto del pH.

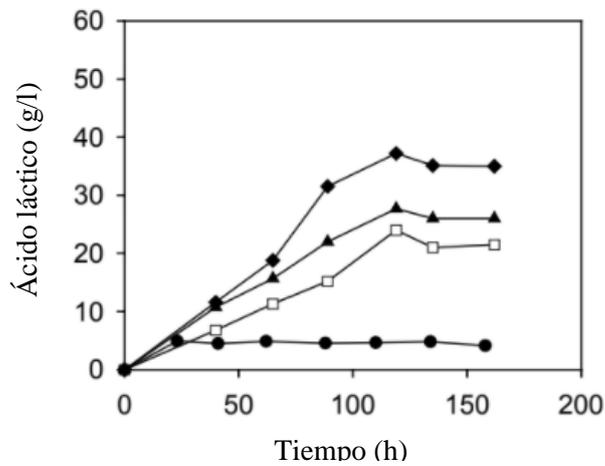
El valor del pH durante las fermentaciones con *R. oryzae* se reduce debido a la producción de ácido láctico durante la fermentación. Esta reducción provoca un efecto inhibitorio sobre los microorganismos y una disminución de la productividad de ácido láctico (Londoño-Hernández y colaboradores, 2017). Domínguez y Vázquez (1999), confirman este efecto inhibitorio puesto que en su estudio se muestra que la influencia del pH inicial del medio en el rango de 3.5 a 6 no es significativa cuando no se añade un buffer que regule el pH del medio; ya que en estos casos se obtuvo una concentración final de ácido láctico similar.

El estudio de Domínguez y Vázquez (1999), demuestra que la adición de un agente (como CaCO₃ o algún buffer) es importante para evitar la disminución del pH. Añadir alguno de estos agentes al inicio o a diferentes momentos de la fermentación evita la inhibición por el descenso del pH y su influencia da lugar a productividades de ácido láctico significativamente mayores.

3. Efecto de la concentración de sustrato.

El estudio llevado a cabo por Bulut; Elibol y Ozer (2004), demuestra que la producción de ácido láctico se ve afectada por las fuentes de carbono utilizadas en el proceso de fermentación debido a las diferentes concentraciones de azúcares que se pueden tener. Los azúcares como la glucosa y la sacarosa son fuentes de carbono adecuadas para la producción de ácido láctico, por lo que el uso de subproductos industriales que contengan estos azúcares es apropiado para fermentaciones lácticas con *R. oryzae*. Para el caso de la melaza, la concentración que se obtiene de ácido láctico aumenta conforme aumenta la concentración de sustrato en el medio para concentraciones entre 75 y 400 g/L.

Figura 12. Efecto de la concentración de melaza sobre la producción de ácido láctico en fermentaciones con *R. oryzae* (●-75g melaza/litro; □-150g melaza/litro; ▲-300g melaza/litro; ◆-400g melaza/litro).



Elaboración propia basado en (Bulut; Elibol y Ozer, 2004)

J. Experimentos diseñados

Un experimento es una prueba o una serie de pruebas. Los experimentos se realizan en todas las disciplinas científicas y de ingeniería y son una parte importante de la forma en que se aprende sobre cómo funcionan los sistemas y procesos. La validez de las conclusiones que se extraen de un experimento depende en gran medida de cómo se llevó a cabo el experimento. Por lo tanto, el diseño del experimento juega un papel importante en la eventual solución del problema que motivó inicialmente el experimento (Montgomery y Runger, 2012).

Un experimento diseñado es una serie de corridas, o pruebas, en las que se realizan cambios intencionales en las variables de entrada al mismo tiempo y observa las respuestas. En la industria, los experimentos diseñados se pueden utilizar para investigar sistemáticamente las variables de proceso o producto que afectan la calidad del producto. Después de identificar las condiciones del proceso y los componentes del producto que afectan la calidad de este, se dirigen los esfuerzos de mejora a optimizar la manufacturabilidad, fiabilidad, calidad y rendimiento del producto (Minitab Inc., s.f.).

Los experimentos diseñados normalmente se realizan en cuatro fases: planificación, cribado (también conocido como caracterización del proceso), optimización y verificación (Minitab Inc., s.f.).

1. Planificación de un experimento.

La fase de planificación es de importancia puesto que la planeación cuidadosa puede ayudar a evitar problemas que pueden presentarse durante la ejecución del plan experimental. Por ejemplo, personal, disponibilidad de equipos, financiamiento y los aspectos mecánicos del sistema pueden afectar su capacidad para realizar el experimento. La preparación que se debe realizar antes de iniciar el experimento depende del problema. Se recomienda completar los siguientes pasos: Definir el problema, definir el objetivo, desarrollar un plan experimental que ofrezca información significativa y asegurarse de que el proceso y los sistemas de medición estén bajo control (Minitab Inc., s.f.).

2. Cribado de un experimento.

En muchas aplicaciones de desarrollo de procesos y de manufactura, el número de variables potenciales (factores) es grande. El cribado (caracterización del proceso) se utiliza para reducir el número de factores mediante la identificación de los factores más importantes que afectan la calidad del producto. Esta reducción permite centrar los esfuerzos de mejora del proceso en los factores más importantes (Minitab Inc., s.f.).

3. Optimización de un experimento.

Después de identificar los términos importantes utilizando el cribado, debe determinar los valores óptimos para los factores experimentales. Los valores óptimos de los factores dependen del objetivo del proceso. Por ejemplo, es probable que usted desee maximizar el rendimiento del proceso o reducir la variabilidad del producto (Minitab Inc., s.f.).

4. Verificación de un experimento.

La verificación implica realizar un experimento subsiguiente con las condiciones óptimas pronosticadas para confirmar los resultados de la optimización. Por ejemplo, usted puede ejecutar algunas corridas de verificación con la configuración óptima y luego obtener un intervalo de confianza para la respuesta media (Minitab Inc., s.f.).

K. Diseños factoriales

Cuando varios factores son de interés en un experimento, se debe utilizar un diseño experimental factorial; en estos experimentos los factores varían juntos. Por experimento factorial se dice que en cada ensayo completo o réplica del experimento se investigan todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores (Montgomery y Runger, 2012).

Los diseños factoriales se usan con frecuencia en experimentos que involucran varios factores donde es necesario estudiar el efecto conjunto de los factores en una respuesta. Sin embargo, varios casos especiales del diseño factorial general son importantes porque se emplean ampliamente en trabajos de investigación y porque forman la base de otros diseños de considerable valor práctico (Montgomery y Runger, 2012).

El más importante de estos casos especiales es el de k factores, cada uno en solo dos niveles, diseño que se denomina 2^k . Estos niveles pueden ser cuantitativos, como dos valores de temperatura, presión o tiempo; o pueden ser cualitativos, como dos máquinas, dos operadores, los niveles “alto” y “bajo” de un factor, o tal vez la presencia y ausencia de un factor. Una réplica completa de dicho diseño requiere $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ observaciones y se denomina diseño factorial de 2^k . Este diseño es particularmente útil en las primeras etapas del trabajo experimental, cuando es probable que se investiguen muchos factores. Proporciona el número más pequeño de corridas para las cuales se pueden estudiar k factores en un diseño factorial completo. Debido a que solo hay dos niveles para cada factor, debemos suponer que la respuesta es aproximadamente lineal en el rango de los niveles de los factores elegidos (Montgomery y Runger, 2012). Una alternativa al diseño factorial que se usa en la práctica es cambiar los factores uno por uno en lugar de variarlos simultáneamente, alternativa menos confiable porque no considera la interacción entre los factores (Montgomery y Runger, 2012).

L. Diseños de superficie de respuesta.

Un diseño de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos que ayudan a entender mejor y optimizar la respuesta. La metodología del diseño de superficie de respuesta se utiliza con frecuencia para refinar los modelos después de haber determinado los factores importantes utilizando diseños de cribado o diseños factoriales, especialmente si se sospecha que existe curvatura en la superficie de respuesta (Minitab Inc., s.f.). Las aplicaciones más comunes de RSM se encuentran en las ciencias industriales, biológicas y clínicas, ciencias sociales, ciencias de los alimentos y ciencias físicas y de la ingeniería (Morshedi y Arkabian, 2014).

Uno de los principales objetivos del diseño de superficie de respuesta es la determinación de los ajustes óptimos de las variables de control que dan como resultado una respuesta máxima (o mínima) en una determinada región de interés. Esto requiere tener un modelo de ajuste 'bueno' que proporcione una representación adecuada de la respuesta media porque dicho modelo se utilizará para determinar el valor del óptimo. Las técnicas de optimización utilizadas dependen de la naturaleza del modelo ajustado (Morshedi y Arkabian, 2014).

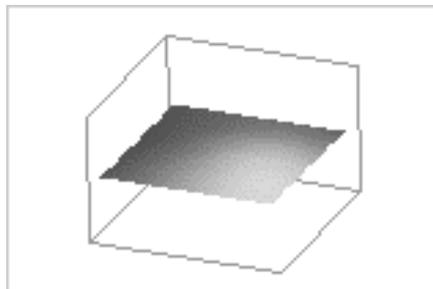
Cuando las variables x_1 y x_2 son variables independientes donde la respuesta y depende de ellas, la variable dependiente y es una función de x_1 , x_2 y el término de error experimental, denotado como e . Si la respuesta puede definirse mediante una función lineal de variables independientes, entonces la función de aproximación es un modelo de primer orden (Montgomery y Runger, 2012). El modelo general de primer orden, donde k indica el número de variables independientes, tiene la siguiente forma:

Ecuación 1. Modelo general de primer orden para diseño de superficie de respuesta con k cantidad de variables independientes.

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_kx_k + e$$

Este modelo es apropiado para describir una superficie plana con o sin superficies inclinadas. Por lo general, un modelo de primer orden ajusta los datos por mínimos cuadrados. Una vez que se obtiene la ecuación estimada, un experimentador puede examinar la gráfica normal, los efectos principales, la gráfica de contorno y las estadísticas ANOVA (prueba F, prueba t, R^2 , R^2 ajustado, etc.) para determinar la idoneidad del modelo ajustado (Montgomery y Runger, 2012).

Figura 13. Ejemplo de un esquema gráfico de una superficie de respuesta sin curvatura.



(Minitab Inc., s.f.)

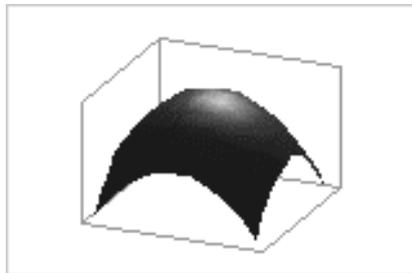
Si hay una curvatura en la superficie de respuesta, se debe utilizar un polinomio de grado superior. El más común es el modelo de segundo orden, el cuál introduce una relación cuadrática en las variables (Montgomery y Runger, 2012). La forma general para este modelo es:

Ecuación 2. Modelo general cuadrático para un diseño de superficie de respuesta con k cantidad de variables independientes.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + e$$

La diferencia entre una ecuación de superficie de respuesta y la ecuación de un diseño factorial es la adición de los términos elevados al cuadrado (o cuadráticos) que permiten modelar la curvatura en la respuesta, lo que hace la hace útil para: 1. Entender o mapear una región de una superficie de respuesta. Las ecuaciones de superficie de respuesta modelan cómo los cambios en las variables afectan una respuesta de interés. 2. Hallar los niveles de las variables que optimizan una respuesta. 3. Seleccionar las condiciones operativas para cumplir con las especificaciones (Minitab Inc., s.f.).

Figura 14. Ejemplo de un esquema gráfico de una superficie de respuesta con curvatura.



(Minitab Inc., s.f.)

Existen dos tipos principales de diseños de superficie de respuesta: Diseños centrales compuestos y Diseños de Box-Behnken. Los diseños centrales compuestos pueden ajustarse a un modelo cuadrático completo. Suelen utilizarse cuando el plan del diseño requiere de un experimento secuencial, porque estos diseños pueden incluir información de un experimento factorial planificado correctamente (Minitab Inc., s.f.).

M. Diseño Box-Behnken.

Un diseño de Box-Behnken es un tipo de diseño de superficie de respuesta que no tiene un diseño factorial o factorial fraccionado incrustado. Para un diseño de Box-Behnken, los puntos de diseño se sitúan en combinaciones de los niveles altos y bajos de los factores y sus puntos medios, además tienen combinaciones de tratamiento que están en los puntos medios de los bordes del espacio experimental y requieren al menos tres factores continuos (Minitab Inc., s.f.).

Estos diseños permiten una estimación eficiente de los coeficientes de primer y segundo orden. Como los diseños de Box-Behnken suelen tener menos puntos de diseño, pueden ser menos costosos de realizar que los diseños centrales compuestos con el mismo número de factores. Los diseños de Box-Behnken también pueden ser útiles si usted conoce la zona de operación segura de su proceso. Los diseños de Box-Behnken también aseguran que no se establezcan todos los factores en sus niveles altos al mismo tiempo (Minitab Inc., s.f.).

Cuadro 1. Resumen de las características de algunos diseños Box-Behnken.

Número de factores	Número de corridas	Número opcional de bloques	Número predeterminado de puntos centrales
3	15	1	3
4	27	3	3
5	46	2	3
6	54	2	6
7	62	2	6
9	130	5 o 10	10
10	170	2	10

V. ANTECEDENTES

Existen varias investigaciones sobre fermentaciones con *Rhizopus oryzae* en las que se intenta aprovechar distintas fuentes de carbono. Entre estas se encuentra la realizada por Maas y colaboradores (2006) quienes estudiaron la conversión por *R. oryzae* de monosacáridos como la xilosa en ácido láctico y etanol; esto porque la biomasa lignocelulósica se considera hoy en día como una materia prima de carbohidratos económicamente atractiva para fermentaciones a gran escala de productos químicos a granel como el ácido láctico. En este estudio se utilizó como sustrato un medio sintético rico en xilosa. Para estas fermentaciones se obtuvieron rendimientos entre 0.41 y 0.71 g de ácido láctico por gramo de sustrato; además, los subproductos fueron biomasa fúngica, xilitol, glicerol, etanol y dióxido de carbono.

Asimismo, Thongchul y colaboradores (2010) llevaron a cabo un estudio en el que favorecieron la producción de etanol sobre la producción de ácido láctico en fermentaciones de hidrolizados de pulpa de yuca con *R. oryzae*. Se observaron mayores rendimientos y productividad de etanol a partir de la fermentación con los hidrolizados en comparación con los de la fermentación con glucosa en la que el ácido láctico era el producto principal. Esto se debió a que el nitrógeno orgánico adicional en los hidrolizados promovió el crecimiento celular, lo cual aumentó el consumo de oxígeno y favoreció la ruta metabólica hacia la producción de etanol.

Por otro lado, en la recopilación bibliográfica de Ghosh y Rina (2011) sobre el *Rhizopus oryzae* y su capacidad para producir un amplio espectro de compuestos se menciona que este hongo filamentoso tiene la capacidad de producir ácido láctico en fermentaciones con elevadas temperaturas, y el estudio llevado a cabo por Wu y colaboradores (2011) indica que para fermentaciones de glucosa se obtienen mejores rendimientos de ácido láctico a temperaturas entre 32 y 34 °C, dependiendo de otros factores como el pH de fermentación, la cantidad de inóculo, entre otros.

Además, un estudio llevado a cabo por Sun y colaboradores (2012) en donde el estiércol de ganado lechero se usó como sustrato de fermentación para producir ácido láctico por *R. oryzae* sin ningún suplemento de fuente adicional de carbono y nitrógeno. Esta investigación utilizó un diseño Box-Behnken para establecer las mejores condiciones para el pretratamiento del estiércol. En estas fermentaciones el pH afectó la producción de ácido láctico y etanol. A valores alcalinos de pH se produjo más ácido láctico, mientras que a valores ácidos de pH bajo se favoreció la producción de etanol.

VI. METODOLOGÍA

A. Materiales.

- Agua desmineralizada, H₂O
- Fosfato dipotásico, K₂HPO₄
- Fosfato monopotásico, KH₂PO₄
- Bicarbonato de sodio, NaHCO₃
- Carbonato de sodio, Na₂CO₃
- Ácido sulfúrico, H₂SO₄
- Hidróxido de sodio en pellets, NaOH
- Melaza (ver ficha técnica en sección de anexos)
- Agar PDA
- Caldo glucosa 2% SABOURAUD
- Solución de etanol al 70% (v/v)
- Solución cloro al 10%
- Agitador magnético
- Mechero de alcohol
- Cuchilla microbiológica

B. Equipo

- Incubadora sin agitación, para propagar las cajas petri.
- Incubadora con agitación, para fermentar en erlenmeyers.
- Centrífuga
- Autoclave
- Cromatógrafo HPLC con columna Agilent Hi-Plex H
- Potenciometro
- Estufa con agitación
- Balanza semi analítica
- Horno

C. Preparación de soluciones.

1. Para la preparación de buffer pH 7, se pesaron y se disolvieron en 1 litro de agua desmineralizada 8.70 g de K₂HPO₄ y 6.80 g de KH₂PO₄.
2. Para la preparación de buffer pH 9, se pesaron y se disolvieron en 1 litro de agua desmineralizada 7.65 g de bicarbonato de sodio y 0.95 g de carbonato de sodio.
3. Para la preparación de buffer pH 11, se pesaron y se disolvieron en 1 litro de agua desmineralizada 1.05 g de bicarbonato de sodio y 9.27 g de carbonato de sodio.
4. Para preparar solución de H₂SO₄ al 15% (v/v) se midieron con pipeta graduada 158 ml de ácido sulfúrico al 95% (v/v) y se trasvasaron a un beaker con 0.7 L de agua desmineralizada.
5. Se esperó a que la solución se equilibrara térmicamente con el ambiente.
6. Se trasvasó el contenido del beaker a un balón aforado de 1 L y se aforó el balón con agua desmineralizada.

7. Para preparar solución de NaOH 10 N se pesaron 404 g de reactivo en pellets y se disolvieron en 0.7 L de agua destilada. Los 404 g de NaOH en pellets fueron pesados y disueltos en grupos de 25 g aproximadamente.
8. Esperar a que la solución se equilibre térmicamente con el ambiente.
9. Se trasvasó el contenido del beaker un balón aforado de 1 L y se aforó el balón con agua desmineralizada.
10. Las soluciones de NaOH y H₂SO₄ no se valoraron puesto que sólo fueron usadas para ajustar el pH del medio.

D. Preparación de caldo de melaza.

1. Se pesaron en beaker 175, 225 y 275 g de melaza y se ajustó el volumen hasta 500 ml con agua desmineralizada para luego homogenizar y obtener concentraciones de 350, 450 y 550 g/L, respectivamente.
2. Se calentaron los caldos de melaza preparados con anterioridad a punto de ebullición (< 105 °C). Se dejó ebullición por diez minutos para luego retirarlos de la fuente de calentamiento y dejar enfriar a temperatura ambiente.
3. Se repitió el proceso 2 veces para obtener 1.5 L de caldo de melaza a cada una de las concentraciones.
4. Estos caldos se trasvasaron a recipientes previamente esterilizados en autoclave (15 min a 115 °C), para ser almacenarlos hasta uso.

E. Propagación del microorganismo *Rhizopus oryzae*.

1. Se agregaron 9 g de polvo de Agar PDA en 300 ml de agua desmineralizada. Se mantuvo la agitación hasta disolver completamente el polvo y alcanzar el viraje del agar. Esto se realizó en un erlenmeyer, el cual fue cerrado con papel de aluminio y marcado con cinta testigo después del viraje del agar.
2. Para esterilizar el agar preparado, se introdujo el erlenmeyer a una autoclave que trabajó a un ciclo de esterilización de 15 min a una temperatura de 115 °C. Al finalizar el ciclo de la autoclave, se dejó enfriar ligeramente el erlenmeyer para permitir su manipulación.
3. Mientras el erlenmeyer con el agar se enfriaba, se desinfectó el área de trabajo utilizando etanol al 70% y cloro. Asimismo, se colocó un mechero de alcohol para mantener el área estéril.
4. Se colocaron cajas petri estériles en el área desinfectada alrededor del mechero. Cuando el erlenmeyer enfrió lo suficiente para ser esterilizado, se vertió el contenido en las cajas de petri.
5. Se esperó a que el medio solidificara.

6. Una vez solidificado, se sembró el hongo *Rhizopus oryzae* utilizando una caja petri que ya contenía el microorganismo y una cuchilla microbiológica esterilizada con el mechero.
7. Las cajas petri sembradas fueron colocadas en una incubadora a una temperatura de 37°C hasta el crecimiento del hongo. Luego de eso, las cajas fueron guardadas en refrigeración hasta su uso posterior en la preparación de inóculo.

F. Diseño de experimento

Se realizaron fermentaciones con *Rhizopus oryzae* por la capacidad del microorganismo de biosintetizar varios productos sin necesidad de cambiar las condiciones del medio, capacidad que algunos otros microorganismos no tienen, por lo que es posible analizar la producción de varios compuestos con un mismo conjunto de fermentaciones. Además, la morfología de la biomasa facilita su separación del medio.

Según la literatura, la temperatura de fermentación, el pH inicial del medio y la concentración inicial de sustrato son variables que afectan a la cantidad que se obtiene de los productos de biosíntesis del *R. oryzae* por lo que se requiere de un tipo de diseño estadístico que pueda modelarse son tres variables, entre los que destacan el diseño factorial y el diseño de superficie de respuesta. De estas dos opciones se considera más apropiada al diseño de superficie de respuesta sobre el diseño factorial porque: el diseño factorial se utiliza para identificar variables críticas, variables que se conocen en la literatura; el diseño de superficie de respuesta permite identificar puntos máximos o mínimos (locales) de respuesta en el modelo; y el diseño de superficie de respuesta agrega términos cuadráticos al modelo, lo que genera un mejor ajuste a los modelos reales.

Los diseños Central Compuesto y Box-Behnken son las dos opciones para realizar un diseño de superficie de respuesta. De estos se considera más apropiado al Diseño Box-Behnken porque son útiles cuando se conoce una zona sugerida de operación y requieren una menor cantidad de puntos, en este caso, de fermentaciones. Por otro lado, los diseños centrales compuestos requieren muchos más puntos y se utilizan cuando se desconoce la zona sugerida de operación.

Un diseño Box-Behnken para tres factores establece que se necesitan realizar 15 ensayos a diferentes condiciones con el mismo número de réplicas, cuestión que se encuentra predefinida por las características intrínsecas del tipo de diseño. Se realizó el doble de ensayos que el diseño de experimentos seleccionado requiere para mejorar la capacidad descriptiva del mismo.

G. Preparación del inóculo

1. Ya habiendo propagado el *R. oryzae*, se preparó Caldo Glucosa al 2% según SABOURAUD pesando y disolviendo 3 g de medio por cada 100 ml de agua desmineralizada. Para esto se utilizaron erlenmeyers que fueron cerrados con papel aluminio y marcados con cinta testigo.
2. Disuelto completamente el polvo, se esterilizó el caldo en una autoclave con un ciclo de esterilización de 10 min a una temperatura de 115 °C. Al terminar la esterilización se retiraron los erlenmeyers de la autoclave y se esperó a que el caldo se enfríe.
3. Mientras los erlenmeyers con el caldo se enfriaban, se desinfectó el área de trabajo utilizando etanol al 70% y cloro. Asimismo, se colocó un mechero de alcohol para mantener el área estéril.
4. El caldo frío se debe sembró con *Rhizopus oryzae* usando cuadros de 1x1 cm aproximadamente. Estos cuadros fueron recortados de las cajas petri con el *R. oryzae* propagado con una cuchilla microbiológica estéril. Se utilizó un cuadro por cada 100 ml de caldo preparados.
5. Ya sembrados los erlenmeyers, se les colocó Parafilm para asegurar el cierre de papel aluminio y evitar contaminación. Se dejaron incubando por una semana a 37 °C.
6. Tubos estériles para centrifuga fueron etiquetados con su peso. El peso de cada tubo fue registrado con una balanza semi analítica.
7. Pasado una semana, se retiraron los erlenmeyers con caldo y *R. oryzae* de la incubadora para separar el líquido del hongo propagado por decantación. Para ello, primero se desinfectó el área de trabajo con una solución de etanol al 70% y con cloro, y se colocó un mechero de alcohol para mantener el área estéril. Luego, se esterilizó la boquilla del Erlenmeyer con un mechero. Por último, se separó la biomasa del caldo. Dentro del erlenmeyer quedó biomasa húmeda de *R. oryzae*.
8. Después de haber separado el caldo de la biomasa húmeda, se esterilizó una cuchilla microbiológica.
9. Con la cuchilla estéril se hicieron cortes del hongo y se colocaron dentro de un tubo de centrifuga estéril con peso conocido.
10. Luego se colocó el tubo de centrifuga con biomasa húmeda en la balanza semi analítica para determinar la cantidad de biomasa húmeda dentro del tubo.
11. Repetir los pasos 9 y 10 hasta recolectar entre 1 y 1.7 g de biomasa húmeda dentro del tubo de centrifuga.
12. Esta biomasa húmeda fue utilizada como inóculo. También se utilizó biomasa recolectada de esta forma para determinar la humedad inicial del inóculo.

H. Determinación de la humedad inicial del inóculo.

1. Se recortaron 6 trozos de papel aluminio con dimensiones de 10x5 cm, aproximadamente. Cada trozo fue colocado en una balanza semi analítica para registrar su peso (Peso A).
2. Biomasa húmeda recolectada dentro del tubo de centrifuga fue colocada sobre este trozo de papel aluminio. Luego, se registró el peso de trozo de papel aluminio con biomasa húmeda (Peso B) haciendo uso de la misma balanza semi analítica.
3. Los trozos de papel aluminio con la biomasa húmeda fueron colocados dentro de un horno con temperatura interna de 60 °C y dejaron allí por una semana para eliminar la humedad de la biomasa.
4. Pasada una semana, se colocaron en la misma balanza semi analítica los trozos de papel aluminio con la biomasa seca y registró el peso (Peso C).
5. La humedad del inóculo fue determinada mediante la siguiente expresión.

Ecuación 3. Humedad del inóculo a partir de su peso húmedo y su peso seco.

$$Humedad_{Inóculo} = \frac{Peso B - Peso C}{Peso B - Peso A}$$

I. Fermentaciones iniciales para generar modelos estadísticos.

1. Se agregaron 75 ml del caldo de melaza de la concentración requerida en erlenmeyers de 250 ml.
2. 15 ml solución buffer del pH 7, 9 u 11 (según el caso) fueron agregados al erlenmeyer.
3. El valor de pH fue ajustado con la solución de ácido sulfúrico y/o de hidróxido de sodio (previamente preparados) usando pipetas pasteur. El valor de pH fue verificando con un potenciómetro.
4. Estos erlenmeyers fueron esterilizados en autoclave con un ciclo de esterilización de 15 min a 115 °C. Terminado el ciclo, se retiraron de la autoclave y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. La inoculación debe ser hasta que el erlenmeyer se enfríe para evitar que el inóculo muera a causa de una temperatura elevada.
5. Se inoculó el erlenmeyer con biomasa húmeda recolectada en un tubo de centrifuga como se describe en la sección “Preparación de inóculo”.
6. Los erlenmeyers inoculados se colocaron dentro de una incubadora con agitación, la cual agitaba a 150 rpm. La temperatura de la incubadora fue ajustada a la temperatura de fermentación de prueba (34, 37 o 41 °C según el caso).
7. Pasada una semana, se retiraron los erlenmeyers de la incubadora con agitación.
8. Para separar la biomasa del líquido fermentado se centrifugó el contenido de los erlenmeyers a 5000 rpm por 10 min. La biomasa queda en el fondo del tubo.

9. El líquido fermentado se vertió en un recipiente limpio, seco y etiquetado con la información de la prueba. El líquido recuperado se debe guardar en refrigeración para su posterior análisis.
10. La biomasa fue colocada en un trozo de papel aluminio de, aproximadamente, 10x5 cm. Esto se introdujo en un horno a 60 °C para determinar el peso seco después de la fermentación.
11. Se determinó el crecimiento, en términos másicos, del *Rhizopus oryzae* utilizando el peso seco después de la fermentación, la cantidad de inóculo empleada y la humedad del inóculo.

Las fermentaciones fueron llevadas a cabo a las siguientes condiciones.

Cuadro 2. Valores reales y codificados de temperatura, pH inicial y concentración de sustrato empleados en las fermentaciones.

Factores	Valores codificados		
	-1	0	1
Temperatura (°C)	33	37	41
pH	7	9	11
Concentración de sustrato (g/L)	350	450	550

J. Determinación de ácido láctico, etanol y ácido acético por HPLC.

1. Con una micropipeta, se tomaron 6 ml de una muestra de fermentado y se diluyeron en un balón de aforo de 10 ml utilizando agua desmineralizada. Luego se homogenizó la solución.
2. Se tomaron 0.5 ml del líquido de la dilución, utilizando jeringas con filtros Merck Millipore de 0.45 micras. El líquido filtrado fue colocado en viales de 1.5 ml, viales que luego fueron sellados.
3. Para el análisis HPLC se utilizó una columna Agilent Hi-Plex H, 7.7 x 300 mm, 8 µm (p/n PL1170-6830) y un detector de índice de refracción. Las temperaturas empleadas fueron 30, 40 y 40 °C en el automuestreador, columna y detector; respectivamente. Se utilizó agua grado HPLC como fase móvil a un flujo de 0.6 ml/min.
4. Las curvas calibración (ajustadas a cero) estaban previamente construidas con estándares al 1, 2, 3, 4 y 5 % (v/v) para las tres sustancias a analizar.
5. Para obtener los cromatogramas se esperó 30 minutos después de la inyección de la muestra en el equipo.
6. Con la curva calibración y el cromatograma de la muestra inyectada se obtuvo la concentración de Etanol, Ácido Láctico y Ácido Acético. Para obtener la concentración de las sustancias en el fermentado se realizó la corrección por la dilución al 60%.

K. Determinación de consumo de sustrato durante las fermentaciones.

1. Con una micropipeta, se tomaron 1.5 ml de muestra de caldo de melaza y se diluyeron en un balón de aforo de 25 ml utilizando agua desmineralizada. Se homogenizó la solución.
2. Se tomaron 0.5 ml del líquido de la dilución, utilizando jeringas con filtros Merck Millipore de 0.22 micras. El líquido filtrado fue colocado en viales de 1.5 ml, para luego sellar los recipientes.
3. Para el análisis HPLC se utilizó una columna Agilent Hi-Plex H, 7.7 x 300 mm, 8 μ m (p/n PL1170-6830) y un detector de índice de refracción. Las temperaturas empleadas fueron 30, 40 y 40 °C en el automuestreador, columna y detector; respectivamente. Se utilizó agua grado HPLC como fase móvil a un flujo de 0.6 ml/min.
4. Las curvas calibración (ajustadas a cero) para glucosa, sacarosa y fructuosa estaban previamente construidas con estándares al 1, 2, 3, 4 y 5 % (p/v).
5. Para obtener los cromatogramas se esperó 30 minutos después de la inyección de la muestra en el equipo.
6. Con las curvas calibración y el cromatograma de la muestra se obtuvo la concentración de glucosa, sacarosa y fructuosa en la muestra inyectada. Para obtener la concentración de las sustancias en el caldo de melaza se hizo la corrección por la dilución.
7. Para el análisis de las muestras fermentadas, se hizo la dilución usando 3 ml de muestra y aforado con agua desmineralizada en un balón de 10 ml; además, se realizó el mismo procedimiento para determinar la concentración de sustrato en las muestras fermentadas.
8. El sustrato consumido es la diferencia entre la cantidad de sustrato en el caldo de melaza y el fermentado.
9. Se realizó un balance de masa de cada fermentación llevada a cabo para estimar la cantidad másica producida de ácido láctico, etanol, ácido acético, CO₂ y otros compuestos no cuantificados y el rendimiento de cada producto de biosíntesis.

L. Análisis de diseño de superficie de respuestas.

1. Se ejecutó el software Minitab. En la barra de herramientas, se hizo click en “Estadísticas”, “DOE”, “Superficie de respuesta” y, por último, en “Crear diseño de superficie de respuesta...”.
2. Se escogió un diseño Box-Behnken con 3 factores continuos y 0 factores categóricos. Se dio click en “Factores...” y los nombres de los factores “A”, “B” y “C” se cambiaron a “Temperatura (°C)”, “pH Inicial” y “[Sustrato] (g/L)”; y los valores bajos y altos se cambiaron a “33” y “41”, “7” y “11”, “350” y “550”, respectivamente. Se dio click en

“Opciones...” para desactivar la aleatorización de las corridas. Se dio click en “Resultados...” para seleccionar la opción “tabla resumen y tabla de diseño”. Se dio click en “Diseños...” para cambiar el número de réplicas a 2. Después de realizar estos cambios, se dio click en “Aceptar”.

3. Esto generó una hoja de cálculo con los niveles de Temperatura de Fermentación, pH Inicial y Concentración Inicial de Sustrato. En esta hoja de cálculo se registraron, en columnas aparte, las concentraciones de ácido láctico, etanol y ácido acético de las réplicas correspondientes a las cada una de las condiciones.
4. En la barra de herramientas de Minitab se hizo clic en “Estadísticas”, “DOE”, “Superficie de Respuesta” y “Analizar diseño de superficie de respuesta...”. Se escogió como respuesta la concentración ácido láctico, luego se dio click en aceptar.
5. En la barra de herramientas de Minitab se hizo clic en “Estadísticas”, “DOE”, “Superficie de Respuesta” y “Gráficas de contorno...”. Se escogió como respuesta la concentración ácido láctico, luego se dio click en aceptar.
6. En la barra de herramientas de Minitab se hizo clic en “Estadísticas”, “DOE”, “Superficie de Respuesta” y “Optimizador de respuesta...”. Se escogió como respuesta la concentración ácido láctico y se configuró para “Maximizar”, luego se dio click en aceptar.
7. Se repitió el procedimiento anterior (Pasos 5 al 7), pero esta vez para el etanol y luego para el ácido acético. Se generó el modelo estadístico (coeficientes y resumen), el análisis de varianza (ANOVA), la ecuación del modelo, el análisis de multicolinealidad, la gráfica normal de efectos estandarizados, la gráfica de efectos principales, la gráfica de interacción de efectos y las condiciones que maximizan la respuesta; tanto para el etanol, el ácido láctico y el ácido acético.
8. Conociendo las condiciones que maximizan la concentración de ácido láctico, se realizó la predicción para las concentraciones de etanol y ácido acético usando la opción de predicción de Minitab, encontrada en “Estadísticas”, “DOE”, “Superficie de Respuesta” y “Predecir...”
9. Se repitió el paso anterior usando las condiciones que maximizan la concentración de etanol y las que maximizan la concentración de ácido acético.

M. Fermentaciones finales para verificar los modelos estadísticos.

1. Para preparar los caldos de melaza a la concentración requerida se utilizó el mismo procedimiento descrito en la sección “Preparación de caldo de melaza”, con la diferencia que se utilizaron 175, 216.5 y 275 g de melaza para obtener concentraciones de 350, 433 y 550 g/L.

2. Para preparar el medio de fermentación, se agregaron 75 ml del caldo de melaza (de la concentración requerida) en erlenmeyers de 250 ml.
3. Se añadieron al medio 15 ml solución buffer del pH más cercano al requerido al erlenmeyer (pH de 7, 7.12 o 7.61 según el caso). No hubo necesidad de preparar buffer de otro pH porque el valor de este parámetro fue ajustado después.
4. El valor de pH fue ajustado con la solución de ácido sulfúrico y/o de hidróxido de sodio (previamente preparados), verificando el valor con un potenciómetro.
5. Los erlenmeyers fueron esterilizados e inoculados como se describe en la sección “Fermentaciones iniciales para generar modelos estadísticos”.
6. Los erlenmeyers inoculados se colocaron dentro de una incubadora con agitación, la cual agitaba a 150 rpm. La temperatura de la incubadora fue ajustada a la temperatura de fermentación de prueba (33, 38.20 o 39.26 °C según el caso).
7. Pasada una semana, se retiraron los erlenmeyer de la incubadora con agitación.
8. La biomasa de *R. oryzae* y el líquido fermentado fueron separados como se describe en la sección “Fermentaciones iniciales para generar modelos estadísticos”.
9. Se determinó el peso seco de la biomasa como se describe en la sección “Fermentaciones iniciales para generar modelos estadísticos” y el líquido fermentado fue almacenado en refrigeración para su posterior análisis.
10. El trozo de papel aluminio con biomasa se debe introducir en el horno a 60°C para determinar el peso seco después de la fermentación.
11. Se repitió el procedimiento antes descrito para determinar la concentración de ácido láctico, etanol y ácido acético; y el consumo de glucosa, sacarosa y fructuosa por HPLC.
12. Se obtuvo la concentración promedio para los productos de fermentación (ácido láctico, etanol y ácido acético) y para el consumo de sustrato (glucosa, fructuosa y sacarosa), así como su desviación estándar.
13. Se realizó un balance de masa de cada fermentación llevada a cabo para estimar la cantidad másica producida de ácido láctico, etanol, ácido acético, CO₂ y otros compuestos no cuantificados y el rendimiento de cada producto de biosíntesis.

VII. RESULTADOS

Cuadro 3. Cantidad de producto para las fermentaciones utilizadas para generar los modelos estadísticos.

Fermentación	Réplica	Producto (g)		
		Ácido Láctico	Etanol	Ácido Acético
-1,-1,0	1	2.57 ± 0.02	2.63 ± 0.02	0.95 ± 0.01
-1,-1,0	2	2.34 ± 0.02	1.79 ± 0.01	0.98 ± 0.01
-1,0,-1	1	1.95 ± 0.02	1.76 ± 0.01	0.95 ± 0.01
-1,0,-1	2	1.90 ± 0.01	1.74 ± 0.01	0.94 ± 0.01
-1,0,1	1	1.52 ± 0.01	1.20 ± 0.01	1.40 ± 0.01
-1,0,1	2	1.54 ± 0.01	1.17 ± 0.01	1.37 ± 0.01
-1,1,0	1	1.60 ± 0.01	0.12 ± 0.01	1.45 ± 0.01
-1,1,0	2	1.63 ± 0.01	0.15 ± 0.01	1.45 ± 0.01
0,-1,-1	1	5.00 ± 0.03	0.96 ± 0.01	0.74 ± 0.01
0,-1,-1	2	4.40 ± 0.03	0.95 ± 0.01	0.72 ± 0.01
0,-1,1	1	2.14 ± 0.02	1.04 ± 0.01	2.00 ± 0.01
0,-1,1	2	0.98 ± 0.01	0.93 ± 0.01	1.97 ± 0.01
0,0,0	1	1.29 ± 0.01	1.65 ± 0.01	1.13 ± 0.01
0,0,0	2	1.40 ± 0.01	1.57 ± 0.01	1.17 ± 0.01
0,0,0	3	1.51 ± 0.01	1.50 ± 0.01	1.10 ± 0.01
0,0,0	4	1.67 ± 0.01	1.90 ± 0.01	1.18 ± 0.01
0,0,0	5	2.60 ± 0.02	1.86 ± 0.01	1.14 ± 0.01
0,0,0	6	2.57 ± 0.02	1.68 ± 0.01	1.11 ± 0.01
0,1,-1	1	1.06 ± 0.01	-----	0.99 ± 0.01
0,1,-1	2	1.04 ± 0.01	-----	1.03 ± 0.01
0,1,1	1	1.56 ± 0.01	-----	1.61 ± 0.01
0,1,1	2	1.60 ± 0.01	-----	1.60 ± 0.01
1,-1,0	1	1.86 ± 0.01	-----	1.55 ± 0.01
1,-1,0	2	1.76 ± 0.01	-----	1.54 ± 0.01
1,0,-1	1	3.24 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.42 ± 0.01
1,0,-1	2	3.26 ± 0.02	0.40 ± 0.01	0.46 ± 0.01
1,0,1	1	1.59 ± 0.01	-----	1.58 ± 0.01
1,0,1	2	1.69 ± 0.01	-----	1.62 ± 0.01
1,1,0	1	1.45 ± 0.01	-----	1.44 ± 0.01
1,1,0	2	1.47 ± 0.01	-----	1.46 ± 0.01

Cuadro 4. Cantidad estimada de consumo de azúcares, producción de CO₂ y otros compuestos, y crecimiento de microorganismo para las fermentaciones utilizadas para generar los modelos estadísticos.

Fermentación	Réplica	Consumo de azúcares ($\pm 0.001g$)			CO ₂ y otros compuestos (g)	Crecimiento microorganismo (g)
		Sacarosa	Glucosa	Fructuosa		
-1,-1,0	1	14.218	3.958	0.725	11.34 \pm 0.03	1.406 \pm 0.015
-1,-1,0	2	13.564	2.940	0.687	10.63 \pm 0.03	1.449 \pm 0.017
-1,0,-1	1	9.632	2.219	0.436	7.31 \pm 0.03	0.315 \pm 0.013
-1,0,-1	2	9.475	1.908	0.296	6.95 \pm 0.02	0.157 \pm 0.010
-1,0,1	1	13.523	4.785	1.447	15.28 \pm 0.03	0.346 \pm 0.024
-1,0,1	2	11.911	5.435	2.119	15.15 \pm 0.03	0.244 \pm 0.018
-1,1,0	1	3.547	4.384	3.459	7.33 \pm 0.03	0.890 \pm 0.019
-1,1,0	2	3.631	7.441	5.898	13.03 \pm 0.03	0.711 \pm 0.017
0,-1,-1	1	10.131	1.058	0.672	4.92 \pm 0.04	0.238 \pm 0.019
0,-1,-1	2	10.239	0.826	0.690	5.61 \pm 0.04	0.071 \pm 0.023
0,-1,1	1	11.968	4.982	2.734	14.14 \pm 0.03	0.373 \pm 0.018
0,-1,1	2	13.002	4.685	2.396	15.94 \pm 0.03	0.269 \pm 0.026
0,0,0	1	13.899	1.792	0.994	11.89 \pm 0.03	0.723 \pm 0.017
0,0,0	2	13.257	2.130	0.055	10.75 \pm 0.02	0.564 \pm 0.013
0,0,0	3	13.883	2.427	0.217	11.72 \pm 0.03	0.695 \pm 0.021
0,0,0	4	14.007	2.027	1.002	11.60 \pm 0.03	0.678 \pm 0.017
0,0,0	5	14.131	2.734	0.343	10.85 \pm 0.03	0.764 \pm 0.017
0,0,0	6	14.086	2.686	0.493	11.34 \pm 0.04	0.568 \pm 0.029
0,1,-1	1	0.973	2.340	3.340	4.06 \pm 0.02	0.536 \pm 0.011
0,1,-1	2	1.880	2.076	3.185	4.46 \pm 0.02	0.616 \pm 0.015
0,1,1	1	2.559	7.914	6.046	11.65 \pm 0.03	1.697 \pm 0.018
0,1,1	2	2.318	6.961	5.535	10.44 \pm 0.03	1.177 \pm 0.018
1,-1,0	1	9.633	3.434	3.396	12.84 \pm 0.02	0.217 \pm 0.010
1,-1,0	2	8.656	5.785	5.139	16.04 \pm 0.02	0.241 \pm 0.011
1,0,-1	1	8.147	1.266	0.612	5.68 \pm 0.03	0.334 \pm 0.014
1,0,-1	2	8.808	0.850	0.436	5.64 \pm 0.03	0.333 \pm 0.016
1,0,1	1	7.168	11.159	7.780	22.57 \pm 0.02	0.367 \pm 0.011
1,0,1	2	8.806	9.302	6.808	21.22 \pm 0.02	0.386 \pm 0.011
1,1,0	1	8.413	7.462	7.621	20.19 \pm 0.02	0.414 \pm 0.011
1,1,0	2	8.046	7.238	7.642	19.53 \pm 0.02	0.463 \pm 0.010

Cuadro 5. Rendimiento de los productos para las fermentaciones utilizadas para generar los modelos estadísticos.

Fermentación	Réplica	Rendimiento de productos (g producto/1 g sustrato)			
		Ácido Láctico	Etanol	Ácido Acético	CO ₂ y otros compuestos
-1,-1,0	1	0.136 ± 0.001	0.139 ± 0.001	0.050 ± 0.001	0.600 ± 0.002
-1,-1,0	2	0.136 ± 0.001	0.104 ± 0.001	0.057 ± 0.001	0.619 ± 0.002
-1,0,-1	1	0.159 ± 0.001	0.143 ± 0.001	0.077 ± 0.001	0.595 ± 0.002
-1,0,-1	2	0.163 ± 0.001	0.149 ± 0.001	0.080 ± 0.001	0.595 ± 0.002
-1,0,1	1	0.077 ± 0.001	0.061 ± 0.001	0.071 ± 0.001	0.774 ± 0.002
-1,0,1	2	0.079 ± 0.001	0.060 ± 0.001	0.070 ± 0.001	0.778 ± 0.001
-1,1,0	1	0.140 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.127 ± 0.001	0.644 ± 0.002
-1,1,0	2	0.096 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.086 ± 0.001	0.768 ± 0.002
0,-1,-1	1	0.422 ± 0.003	0.081 ± 0.001	0.063 ± 0.001	0.414 ± 0.003
0,-1,-1	2	0.375 ± 0.002	0.081 ± 0.001	0.061 ± 0.001	0.477 ± 0.003
0,-1,1	1	0.109 ± 0.001	0.053 ± 0.001	0.101 ± 0.001	0.718 ± 0.002
0,-1,1	2	0.049 ± 0.001	0.046 ± 0.001	0.098 ± 0.001	0.794 ± 0.002
0,0,0	1	0.077 ± 0.001	0.099 ± 0.001	0.068 ± 0.001	0.713 ± 0.002
0,0,0	2	0.090 ± 0.001	0.101 ± 0.001	0.075 ± 0.001	0.696 ± 0.002
0,0,0	3	0.091 ± 0.001	0.091 ± 0.001	0.067 ± 0.001	0.709 ± 0.002
0,0,0	4	0.098 ± 0.001	0.112 ± 0.001	0.069 ± 0.001	0.681 ± 0.002
0,0,0	5	0.151 ± 0.001	0.108 ± 0.001	0.066 ± 0.001	0.630 ± 0.002
0,0,0	6	0.149 ± 0.001	0.097 ± 0.001	0.064 ± 0.001	0.657 ± 0.002
0,1,-1	1	0.159 ± 0.002	-----	0.149 ± 0.002	0.611 ± 0.003
0,1,-1	2	0.145 ± 0.002	-----	0.144 ± 0.001	0.624 ± 0.003
0,1,1	1	0.094 ± 0.001	-----	0.098 ± 0.001	0.705 ± 0.002
0,1,1	2	0.108 ± 0.001	-----	0.108 ± 0.001	0.705 ± 0.002
1,-1,0	1	0.113 ± 0.001	-----	0.094 ± 0.001	0.780 ± 0.001
1,-1,0	2	0.090 ± 0.001	-----	0.079 ± 0.001	0.819 ± 0.001
1,0,-1	1	0.323 ± 0.002	0.035 ± 0.001	0.042 ± 0.001	0.567 ± 0.003
1,0,-1	2	0.323 ± 0.002	0.040 ± 0.001	0.046 ± 0.001	0.558 ± 0.003
1,0,1	1	0.061 ± 0.001	-----	0.060 ± 0.000	0.865 ± 0.001
1,0,1	2	0.068 ± 0.001	-----	0.065 ± 0.001	0.852 ± 0.001
1,1,0	1	0.062 ± 0.001	-----	0.061 ± 0.001	0.859 ± 0.001
1,1,0	2	0.064 ± 0.001	-----	0.064 ± 0.001	0.852 ± 0.001

Cuadro 6. Características del diseño Box-Behnken empleado para el análisis de superficie de respuestas.

Diseño Box-Behnken		
Factores:	3 Réplicas:	2
Corridas base:	Total de corridas:	30
Bloques base:	Total de bloques:	1

Ecuación 4. Modelo propuesto para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

$$\begin{aligned} \text{Ácido Láctico (\% v/v)} = & 17.8 + 0.507 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) - 2.99 \text{ pH Inicial} \\ & - 0.0443 [\text{Sustrato}] \text{ (g/L)} \\ & - 0.0040 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) * \text{Temperatura } (^{\circ}\text{C}) \\ & + 0.0152 \text{ pH Inicial} * \text{pH Inicial} \\ & + 0.000030 [\text{Sustrato}] \text{ (g/L)} * [\text{Sustrato}] \text{ (g/L)} \\ & + 0.0140 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) * \text{pH Inicial} \\ & - 0.000703 \text{ Temperatura } (^{\circ}\text{C}) * [\text{Sustrato}] \text{ (g/L)} \\ & + 0.004252 \text{ pH Inicial} * [\text{Sustrato}] \text{ (g/L)} \end{aligned}$$

Cuadro 7. Resumen de indicadores del modelo propuesto para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

S	R ²	R ² (ajustado)	PRESS	R ² (pred)	AICc	BIC
0.484486	78.25%	68.47%	10.3393	52.10%	66.16	66.91

Cuadro 8. Análisis de los términos del modelo propuesto para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

Término	Coef	EE del coef.	IC de 95%
Constante	1.701	0.198	(1.288; 2.113)
Temperatura (°C)	0.074	0.121	(-0.178; 0.327)
pH Inicial	-0.559	0.121	(-0.811; -0.306)
[Sustrato] (g/L)	-0.534	0.121	(-0.787; -0.282)
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	-0.065	0.178	(-0.437; 0.307)
pH Inicial*pH Inicial	0.061	0.178	(-0.311; 0.433)
[Sustrato] (g/L)*[Sustrato] (g/L)	0.297	0.178	(-0.075; 0.669)
Temperatura (°C)*pH Inicial	0.112	0.171	(-0.245; 0.470)
Temperatura (°C)*[Sustrato] (g/L)	-0.281	0.171	(-0.638; 0.076)
pH Inicial*[Sustrato] (g/L)	0.850	0.171	(0.493; 1.208)

Cuadro 9. Análisis de multicolinealidad en el modelo propuesto para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

Factor	FIV
Constante	
Temperatura (°C)	1.00
pH Inicial	1.00
[Sustrato] (g/L)	1.00
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	1.01
pH Inicial*pH Inicial	1.01
[Sustrato] (g/L)*[Sustrato] (g/L)	1.01
Temperatura (°C)*pH Inicial	1.00
Temperatura (°C)*[Sustrato] (g/L)	1.00
pH Inicial*[Sustrato] (g/L)	1.00

Cuadro 10. Análisis de varianza del modelo propuesto para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

Factor	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.
Modelo	9	16.8926	78.25%	16.8926	1.87695
Lineal	3	9.6521	44.71%	9.6521	3.21735
Temperatura (°C)	1	0.0880	0.41%	0.0880	0.08801
pH Inicial	1	4.9934	23.13%	4.9934	4.99336
[Sustrato] (g/L)	1	4.5707	21.17%	4.5707	4.57069
Cuadrado	3	0.7221	3.35%	0.7221	0.24070
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	1	0.0608	0.28%	0.0309	0.03087
pH Inicial*pH Inicial	1	0.0108	0.05%	0.0275	0.02745
[Sustrato] (g/L)*[Sustrato] (g/L)	1	0.6505	3.01%	0.6505	0.65054
Interacción de 2 factores	3	6.5184	30.20%	6.5184	2.17281
Temperatura (°C)*pH Inicial	1	0.1009	0.47%	0.1009	0.10088
Temperatura (°C)*[Sustrato] (g/L)	1	0.6319	2.93%	0.6319	0.63188
pH Inicial*[Sustrato] (g/L)	1	5.7857	26.80%	5.7857	5.78567
Error	20	4.6945	21.75%	4.6945	0.23473
Falta de ajuste	3	2.4304	11.26%	2.4304	0.81012
Error puro	17	2.2642	10.49%	2.2642	0.13319
Total	29	21.5871	100.00%		

Cuadro 11. Valor P para los factores del modelo propuesto para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

Factor	Valor P
Modelo	0.000
Lineal	0.000
Temperatura (°C)	0.547
pH Inicial	0.000
[Sustrato] (g/L)	0.000
Cuadrado	0.402
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	0.721
pH Inicial*pH Inicial	0.736
[Sustrato] (g/L)*[Sustrato] (g/L)	0.112
Interacción de 2 factores	0.000
Temperatura (°C)*pH Inicial	0.520
Temperatura (°C)*[Sustrato] (g/L)	0.116
pH Inicial*[Sustrato] (g/L)	0.000
Error	
Falta de ajuste	0.005
Error puro	
Total	

Figura 15. Gráfica normal de efectos estandarizados con nivel de confianza del 95% para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

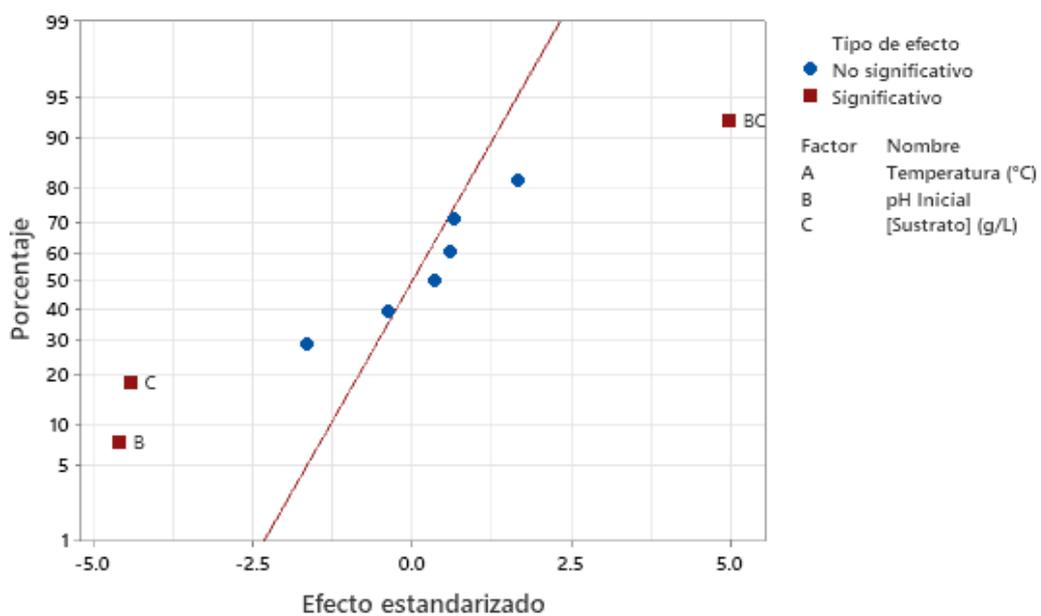


Figura 16. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados con nivel de confianza del 95% para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

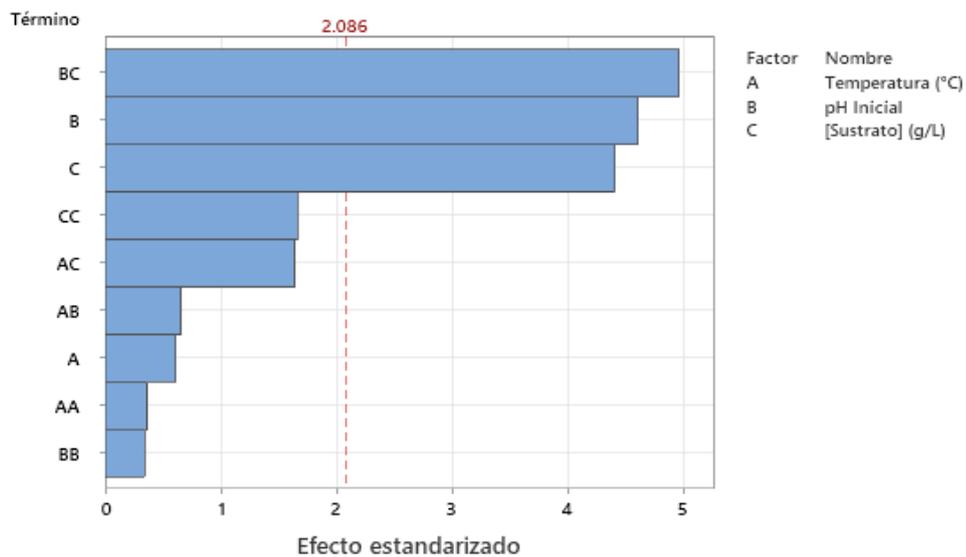


Figura 17. Gráfica de efectos principales para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

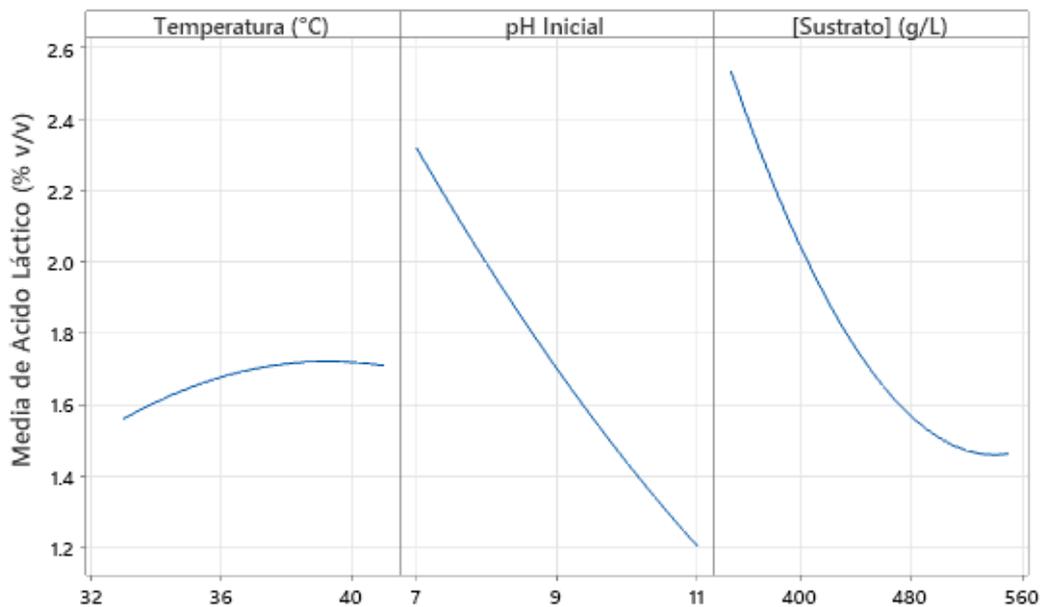
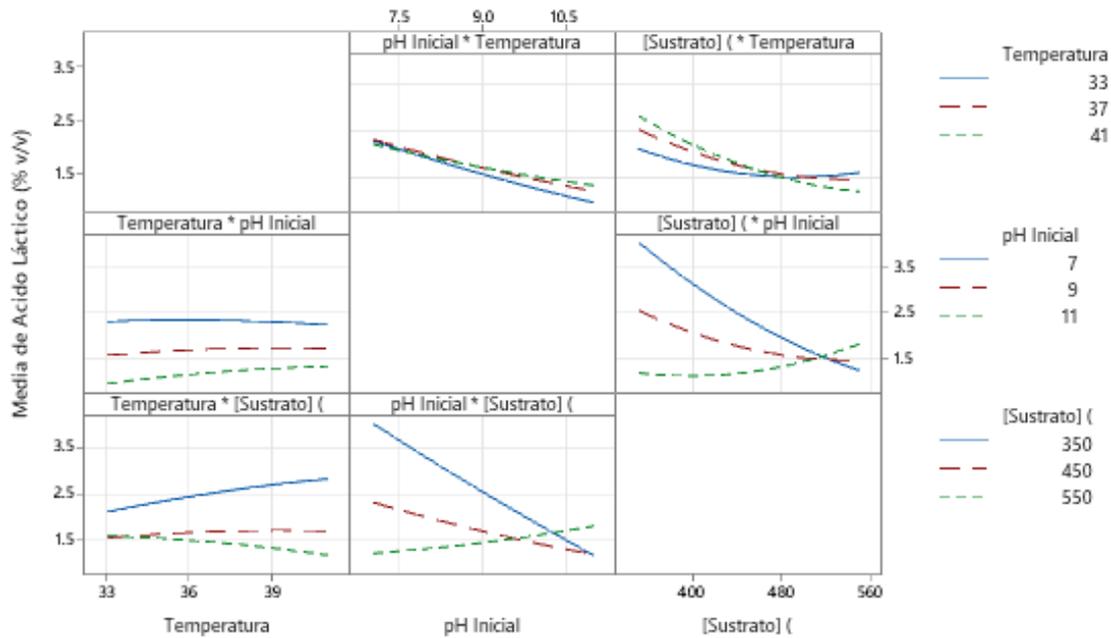


Figura 18. Gráfica de interacción de efectos para la concentración de ácido láctico en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.



Ecuación 5. Modelo propuesto para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

$$\begin{aligned}
 \text{Etanol (\% v/v)} = & -33.1 + 1.369 \text{ Temperatura (}^\circ\text{C)} + 0.881 \text{ pH Inicial} \\
 & + 0.0539 \text{ [Sustrato] (g/L)} \\
 & - 0.03355 \text{ Temperatura (}^\circ\text{C)} * \text{Temperatura (}^\circ\text{C)} \\
 & - 0.2551 \text{ pH Inicial} * \text{pH Inicial} \\
 & - 0.000068 \text{ [Sustrato] (g/L)} * \text{[Sustrato] (g/L)} \\
 & + 0.0913 \text{ Temperatura (}^\circ\text{C)} * \text{pH Inicial} \\
 & + 0.000168 \text{ Temperatura (}^\circ\text{C)} * \text{[Sustrato] (g/L)} \\
 & - 0.000044 \text{ pH Inicial} * \text{[Sustrato] (g/L)}
 \end{aligned}$$

Cuadro 12. Resumen de indicadores del modelo propuesto para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

S	R ²	R ² (ajustado)	PRESS	R ² (pred)	AICc	BIC
0.269353	96.16%	94.43%	3.43590	90.91%	30.93	31.68

Cuadro 13. Análisis de los términos del modelo propuesto para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

Término	Coef	EE del coef.	IC de 95%
Constante	2.384	0.110	(2.155; 2.614)
Temperatura (°C)	-0.8648	0.0673	(-1.0053; -0.7243)
pH Inicial	-0.7061	0.0673	(-0.8466; -0.5657)
[Sustrato] (g/L)	-0.1609	0.0673	(-0.3014; -0.0205)
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	-0.5368	0.0991	(-0.7436; -0.3300)
pH Inicial*pH Inicial	-1.0203	0.0991	(-1.2271; -0.8136)
[Sustrato] (g/L)*[Sustrato] (g/L)	-0.6820	0.0991	(-0.8888; -0.4753)
Temperatura (°C)*pH Inicial	0.7302	0.0952	(0.5316; 0.9289)
Temperatura (°C)*[Sustrato] (g/L)	0.0673	0.0952	(-0.1314; 0.2659)
pH Inicial*[Sustrato] (g/L)	-0.0087	0.0952	(-0.2074; 0.1899)

Cuadro 14. Análisis de multicolinealidad en el modelo propuesto para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

Factor	FIV
Constante	
Temperatura (°C)	1.00
pH Inicial	1.00
[Sustrato] (g/L)	1.00
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	1.01
pH Inicial*pH Inicial	1.01
[Sustrato] (g/L)*[Sustrato] (g/L)	1.01
Temperatura (°C)*pH Inicial	1.00
Temperatura (°C)*[Sustrato] (g/L)	1.00
pH Inicial*[Sustrato] (g/L)	1.00

Cuadro 15. Análisis de varianza del modelo propuesto para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

Factor	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.
Modelo	9	36.3422	96.16%	36.3422	4.0380
Lineal	3	20.3585	53.87%	20.3585	6.7862
Temperatura (°C)	1	11.9658	31.66%	11.9658	11.9658
pH Inicial	1	7.9783	21.11%	7.9783	7.9783
[Sustrato] (g/L)	1	0.4144	1.10%	0.4144	0.4144
Cuadrado	3	11.6812	30.91%	11.6812	3.8937
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	1	1.2872	3.41%	2.1280	2.1280
pH Inicial*pH Inicial	1	6.9591	18.41%	7.6882	7.6882
[Sustrato] (g/L)*[Sustrato] (g/L)	1	3.4349	9.09%	3.4349	3.4349
Interacción de 2 factores	3	4.3025	11.38%	4.3025	1.4342
Temperatura (°C)*pH Inicial	1	4.2656	11.29%	4.2656	4.2656
Temperatura (°C)*[Sustrato] (g/L)	1	0.0362	0.10%	0.0362	0.0362
pH Inicial*[Sustrato] (g/L)	1	0.0006	0.00%	0.0006	0.0006
Error	20	1.4510	3.84%	1.4510	0.0726
Falta de ajuste	3	0.4925	1.30%	0.4925	0.1642
Error puro	17	0.9586	2.54%	0.9586	0.0564
Total	29	37.7932	100.00%		

Cuadro 16. Valor P para los factores del modelo propuesto para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

Factor	Valor P
Modelo	0.000
Lineal	0.000
Temperatura (°C)	0.000
pH Inicial	0.000
[Sustrato] (g/L)	0.027
Cuadrado	0.000
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	0.000
pH Inicial*pH Inicial	0.000
[Sustrato] (g/L)*[Sustrato] (g/L)	0.000
Interacción de 2 factores	0.000
Temperatura (°C)*pH Inicial	0.000
Temperatura (°C)*[Sustrato] (g/L)	0.488
pH Inicial*[Sustrato] (g/L)	0.928
Error	
Falta de ajuste	0.065
Error puro	
Total	

Figura 19. Gráfica normal de efectos estandarizados con nivel de confianza del 95% para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

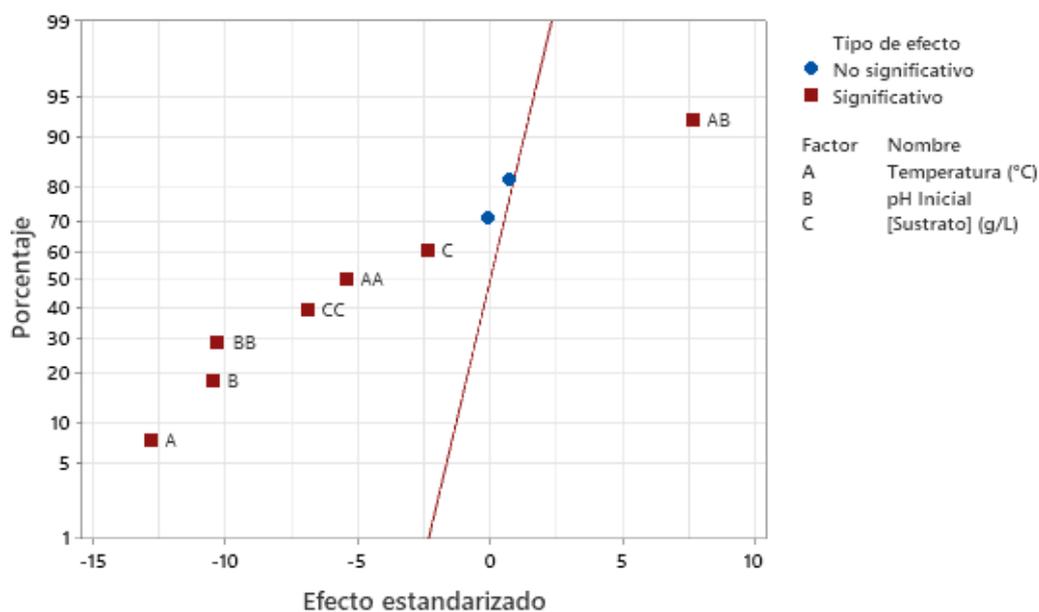


Figura 20. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados con nivel de confianza del 95% para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

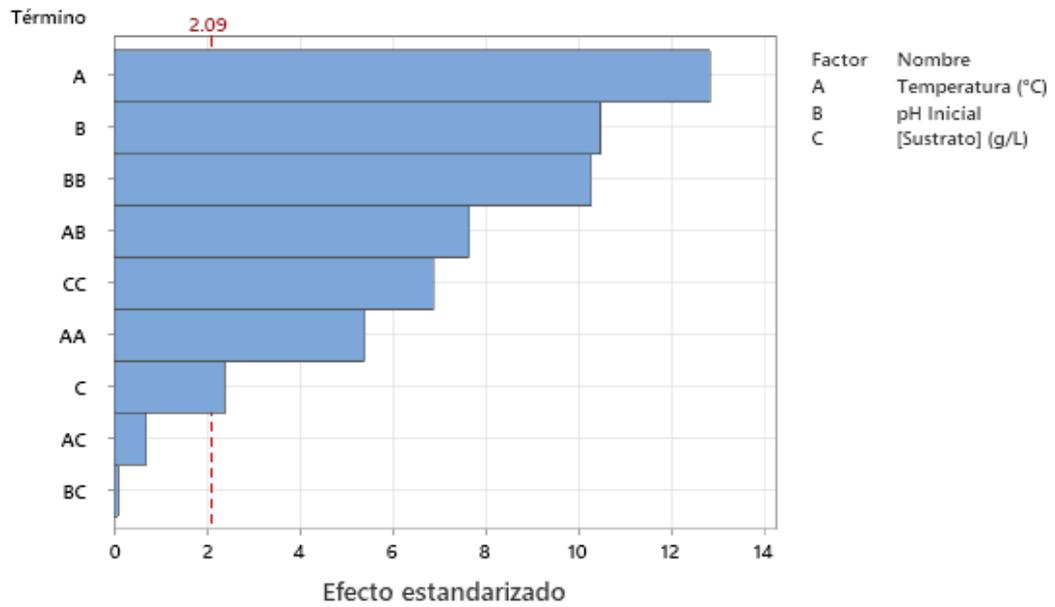


Figura 21. Gráfica de efectos principales para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

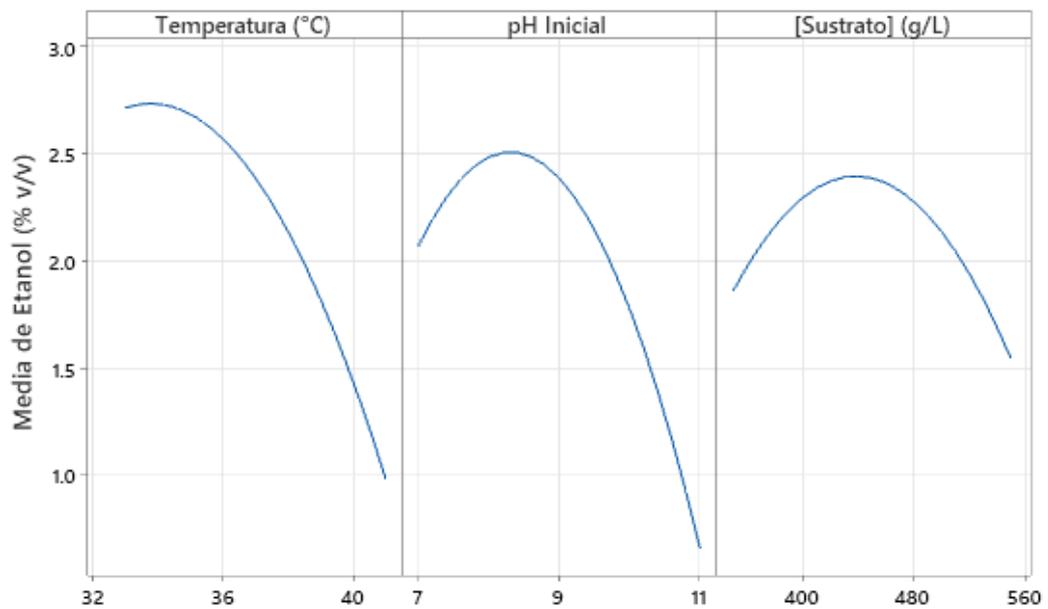
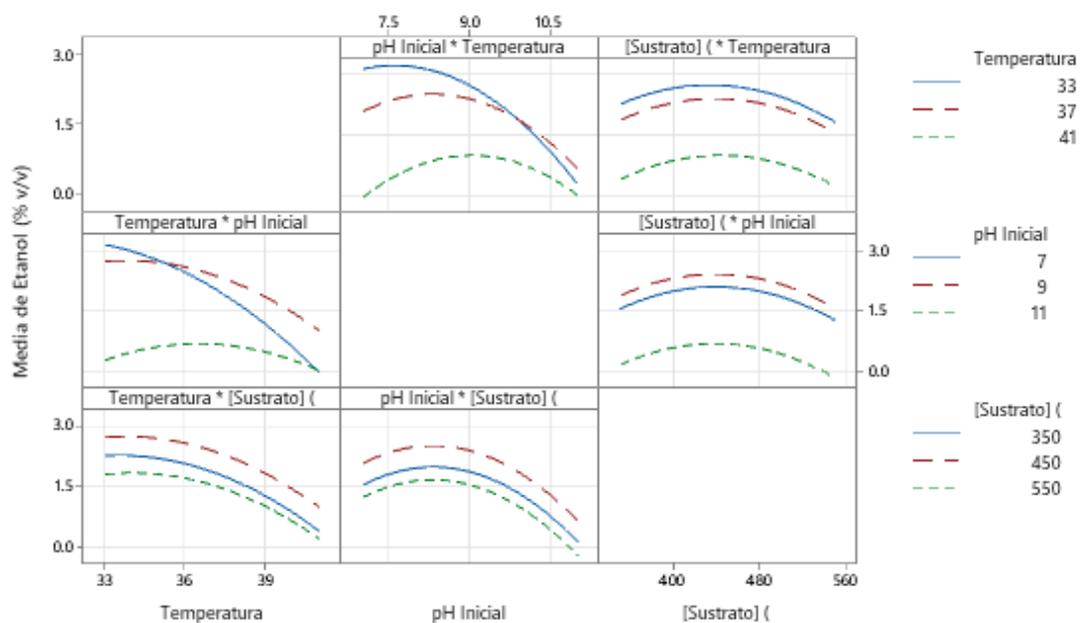


Figura 22. Gráfica de interacción de efectos para la concentración de etanol en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.



Ecuación 6. Modelo propuesto para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

$$\begin{aligned} \text{Ácido Acético (\% v/v)} = & -0.36 + 0.031 \text{ Temperatura (}^\circ\text{C)} + 0.033 \text{ pH Inicial} \\ & - 0.00199 \text{ [Sustrato] (g/L)} \\ & - 0.00085 \text{ Temperatura (}^\circ\text{C)} * \text{Temperatura (}^\circ\text{C)} \\ & + 0.0601 \text{ pH Inicial} * \text{pH Inicial} \\ & - 0.000004 \text{ [Sustrato] (g/L)} * \text{[Sustrato] (g/L)} \\ & - 0.01909 \text{ Temperatura (}^\circ\text{C)} * \text{pH Inicial} \\ & + 0.000474 \text{ Temperatura (}^\circ\text{C)} * \text{[Sustrato] (g/L)} \\ & - 0.000867 \text{ pH Inicial} * \text{[Sustrato] (g/L)} \end{aligned}$$

Cuadro 17. Resumen de indicadores del modelo propuesto para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

S	R ²	R ² (ajustado)	PRESS	R ² (pred)	AICc	BIC
0.123760	93.67%	90.82%	0.777972	83.93%	-15.73	-14.98

Cuadro 18. Análisis de los términos del modelo propuesto para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

Término	Coef	EE del coef.	IC de 95%
Constante	1.2044	0.0505	(1.0991; 1.3098)
Temperatura (°C)	0.0389	0.0309	(-0.0257; 0.1034)
pH Inicial	0.0393	0.0309	(-0.0253; 0.1038)
[Sustrato] (g/L)	0.4552	0.0309	(0.3907; 0.5197)
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	-0.0136	0.0455	(-0.1086; 0.0814)
pH Inicial*pH Inicial	0.2406	0.0455	(0.1456; 0.3356)
[Sustrato] (g/L)*[Sustrato] (g/L)	-0.0355	0.0455	(-0.1305; 0.0595)
Temperatura (°C)*pH Inicial	-0.1527	0.0438	(-0.2440; -0.0614)
Temperatura (°C)*[Sustrato] (g/L)	0.1896	0.0438	(0.0983; 0.2809)
pH Inicial*[Sustrato] (g/L)	-0.1733	0.0438	(-0.2646; -0.0821)

Cuadro 19. Análisis de multicolinealidad en el modelo propuesto para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

Factor	FIV
Constante	
Temperatura (°C)	1.00
pH Inicial	1.00
[Sustrato] (g/L)	1.00
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	1.01
pH Inicial*pH Inicial	1.01
[Sustrato] (g/L)*[Sustrato] (g/L)	1.01
Temperatura (°C)*pH Inicial	1.00
Temperatura (°C)*[Sustrato] (g/L)	1.00
pH Inicial*[Sustrato] (g/L)	1.00

Cuadro 20. Análisis de varianza del modelo propuesto para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.
Modelo	9	4.53374	93.67%	4.53374	0.50375
Lineal	3	3.36426	69.51%	3.36426	1.12142
Temperatura (°C)	1	0.02415	0.50%	0.02415	0.02415
pH Inicial	1	0.02468	0.51%	0.02468	0.02468
[Sustrato] (g/L)	1	3.31543	68.50%	3.31543	3.31543
Cuadrado	3	0.45503	9.40%	0.45503	0.15168
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	1	0.00595	0.12%	0.00136	0.00136
pH Inicial*pH Inicial	1	0.43980	9.09%	0.42745	0.42745
[Sustrato] (g/L)*[Sustrato] (g/L)	1	0.00928	0.19%	0.00928	0.00928
Interacción de 2 factores	3	0.71445	14.76%	0.71445	0.23815
Temperatura (°C)*pH Inicial	1	0.18656	3.85%	0.18656	0.18656
Temperatura (°C)*[Sustrato] (g/L)	1	0.28753	5.94%	0.28753	0.28753
pH Inicial*[Sustrato] (g/L)	1	0.24036	4.97%	0.24036	0.24036
Error	20	0.30633	6.33%	0.30633	0.01532
Falta de ajuste	3	0.29562	6.11%	0.29562	0.09854
Error puro	17	0.01071	0.22%	0.01071	0.00063
Total	29	4.84007	100.00%		

Cuadro 21. Valor P para los factores del modelo propuesto para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

Fuente	Valor p
Modelo	0.000
Lineal	0.000
Temperatura (°C)	0.224
pH Inicial	0.219
[Sustrato] (g/L)	0.000
Cuadrado	0.000
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	0.769
pH Inicial*pH Inicial	0.000
[Sustrato] (g/L)*[Sustrato] (g/L)	0.445
Interacción de 2 factores	0.000
Temperatura (°C)*pH Inicial	0.002
Temperatura (°C)*[Sustrato] (g/L)	0.000
pH Inicial*[Sustrato] (g/L)	0.001
Error	
Falta de ajuste	0.000
Error puro	
Total	

Figura 23. Gráfica normal de efectos estandarizados con nivel de confianza del 95% para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

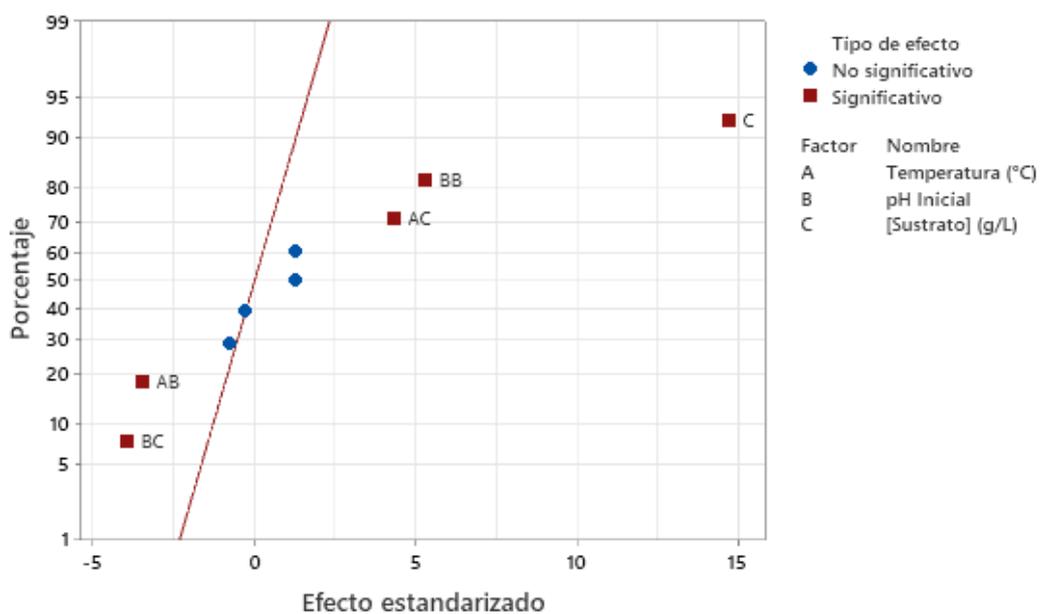


Figura 24. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados con nivel de confianza del 95% para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

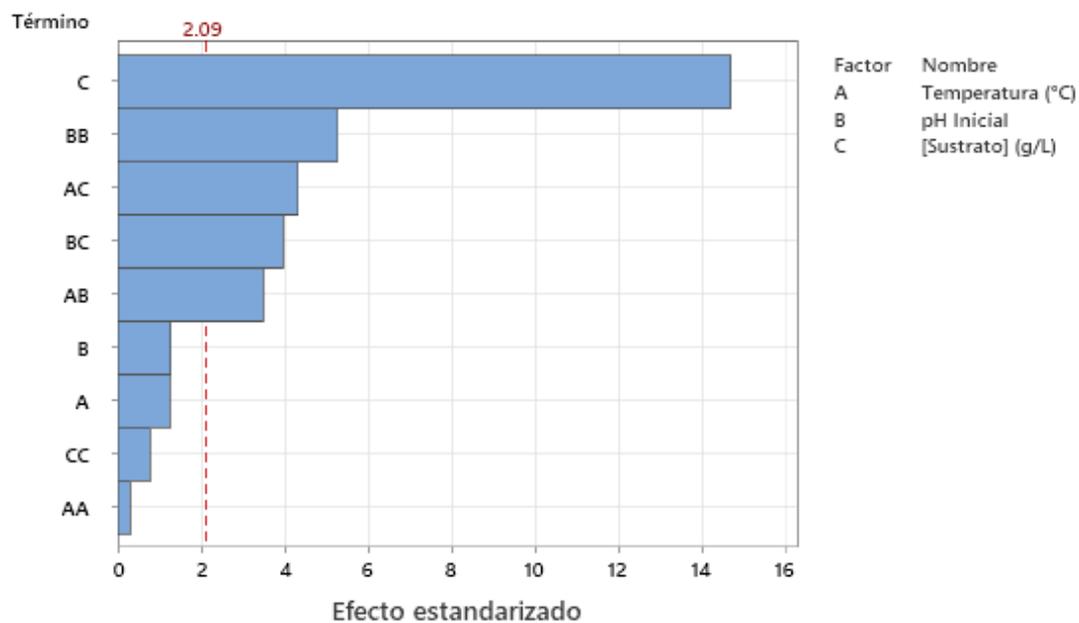


Figura 25. Gráfica de efectos principales para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

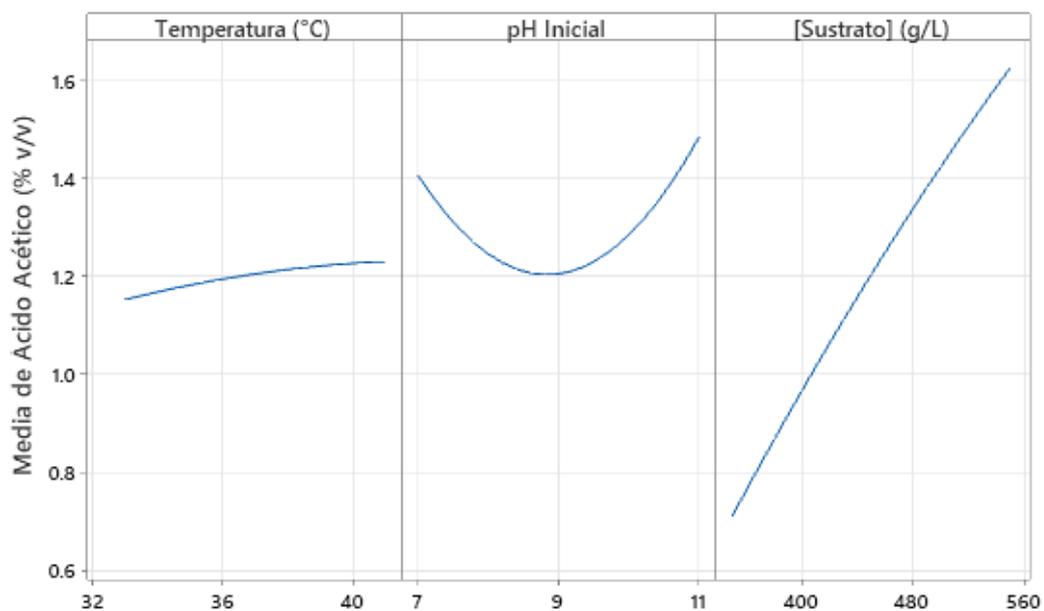
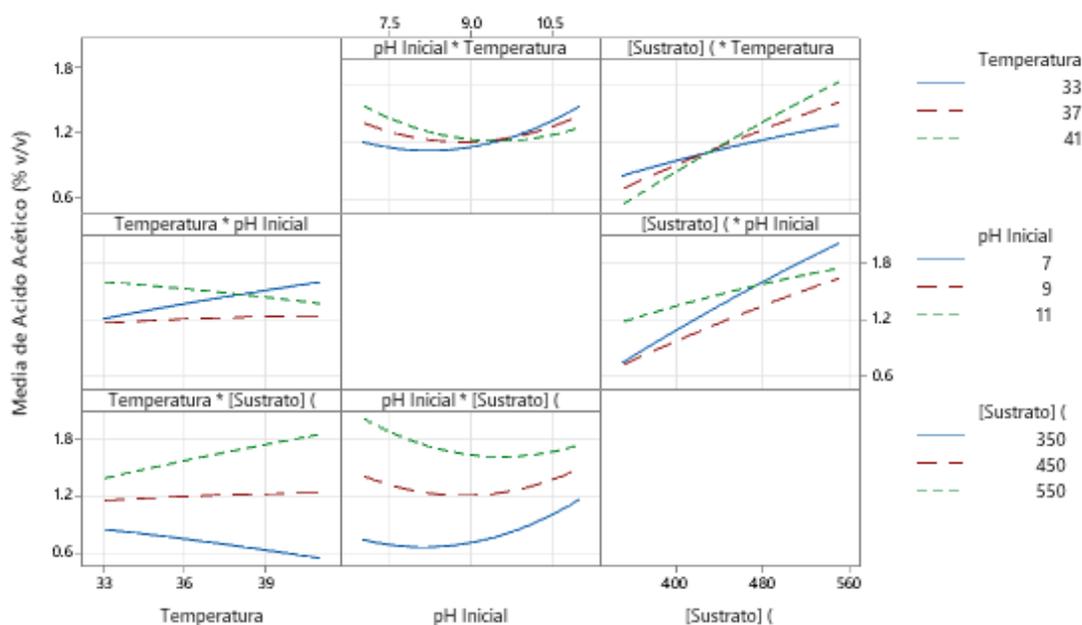


Figura 26. Gráfica de interacción de efectos para la concentración de ácido acético en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.



Cuadro 22. Condiciones que favorecen a los productos de fermentación según los modelos estadísticos propuestos.

Compuesto	Código de Fermentación	Temperatura (°C)	pH Inicial	[Sustrato] (g/L)	Deseabilidad Compuesta
Ácido Láctico	AcLacMax	39.26	7.12	350	0.838265
Etanol	EtMax	33.00	7.61	433	0.873783
Ácido Acético	AcAcMax	38.20	7.00	550	1.000000

Cuadro 23. Predicción de concentración de productos de fermentación a las condiciones favorables para la biosíntesis de ácido láctico.

Respuesta	Ajuste	EE de ajuste	IC de 95%	IP de 95%
Ácido Láctico (% v/v)	4.029	0.405	(3.336; 5.024)	(2.863; 5.497)
Etanol (% v/v)	0.509	0.172	(0.148; 0.869)	(0.000; 1.176)
Ácido Acético (% v/v)	0.721	0.080	(0.554; 0.888)	(0.413; 1.028)

Cuadro 24. Predicción de concentración de productos de fermentación a las condiciones favorables para la biosíntesis de etanol.

Respuesta	Ajuste	EE de ajuste	IC de 95%	IP de 95%
Ácido Láctico (% v/v)	2.214	0.244	(1.704; 2.723)	(1.082; 3.345)
Etanol (% v/v)	3.236	0.136	(2.953; 3.519)	(2.607; 3.865)
Ácido Acético (% v/v)	1.068	0.062	(0.938; 1.198)	(0.779; 1.357)

Cuadro 25. Predicción de concentración de productos de fermentación a las condiciones favorables para la biosíntesis de ácido acético.

Respuesta	Ajuste	EE de ajuste	IC de 95%	IP de 95%
Ácido Láctico (% v/v)	1.130	0.303	(0.496; 1.764)	(0.000; 2.323)
Etanol (% v/v)	0.729	0.168	(0.377; 1.081)	(0.066; 1.392)
Ácido Acético (% v/v)	2.366	0.103	(2.151; 2.582)	(2.030; 2.703)

Cuadro 26. Concentraciones promedio de los productos obtenidas en las fermentaciones utilizadas para validar los modelos.

Fermentación	Ácido Láctico (% v/v)	Etanol (% v/v)	Ácido Acético (% v/v)
AcLacMax	5.18 ± 0.28	1.05 ± 0.10	0.85 ± 0.04
EtMax	2.63 ± 0.07	3.48 ± 0.24	1.02 ± 0.12
AcAcMax	1.00 ± 0.11	1.27 ± 0.07	2.66 ± 0.07

Las incertidumbres corresponden a las desviaciones estándar

Cuadro 27. Cantidad promedio de producto para las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.

Fermentación	Producto (g)		
	Ácido Láctico	Etanol	Ácido Acético
AcLacMax	5.60 ± 0.30	0.74 ± 0.07	0.80 ± 0.04
EtMax	2.84 ± 0.07	2.47 ± 0.17	0.97 ± 0.11
AcAcMax	1.09 ± 0.12	0.90 ± 0.05	2.52 ± 0.07

Las incertidumbres corresponden a las desviaciones estándar

Cuadro 28. Cantidad promedio estimada de consumo de azúcares para las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.

Fermentación	Consumo de azúcares (g)					
	Sacarosa		Glucosa		Fructuosa	
AcLacMax	7.83	± 0.20	0.90	± 0.12	3.24	± 0.09
EtMax	11.77	± 0.15	2.90	± 0.16	0.56	± 0.08
AcAcMax	9.73	± 0.31	4.60	± 0.10	1.72	± 0.14

Las incertidumbres corresponden a las desviaciones estándar

Cuadro 29. Cantidad promedio estimada de producción de CO₂ y otros compuestos, y crecimiento de microorganismo para las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.

Fermentación	CO ₂ y otros compuestos (g)		Crecimiento microorganismo (g)	
AcLacMax	4.25	± 0.24	0.58	± 0.09
EtMax	8.58	± 0.40	0.38	± 0.29
AcAcMax	10.91	± 0.62	0.64	± 0.56

Cuadro 30. Rendimiento promedio de los productos para las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.

Fermentación	Rendimiento de productos (g producto/1 g sustrato)			
	Ácido Láctico	Etanol	Ácido Acético	CO ₂ y otros compuestos
AcLacMax	0.468 ± 0.022	0.062 ± 0.006	0.067 ± 0.003	0.355 ± 0.021
EtMax	0.186 ± 0.003	0.162 ± 0.011	0.064 ± 0.008	0.563 ± 0.024
AcAcMax	0.067 ± 0.007	0.056 ± 0.003	0.157 ± 0.005	0.680 ± 0.038

Las incertidumbres corresponden a las desviaciones estándar

VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El resumen en términos másicos de las fermentaciones realizadas variando la temperatura de fermentación, el pH inicial del medio y la concentración de sustrato se encuentra en el Cuadro 3 de la sección de resultados. Al analizar el cuadro, este se puede dividir en tres grandes bloques. En las fermentaciones -1,-1,0 y -1,0,-1 (el significado de los códigos se encuentra en el Cuadro 32 en la sección de Anexos) se obtuvieron cantidades equiparables de ácido láctico y etanol, entre 1.90-2.7 g y 1.74-2.63 g respectivamente; mientras que la cantidad de ácido acético fue menor en comparación entre 0.95 g. Para las fermentaciones entre la condición -1,0,1 y 0,0,0 se obtuvieron distintas proporciones para los 3 productos analizados, variando desde cantidades similares como 1.51 g de ácido láctico, 1.50 g de etanol y 1.10 g de ácido acético para el mismo ensayo, hasta 5.00 g ácido láctico, 0.96 g de etanol y 0.74 g de ácido acético. Esto sugiere que las condiciones que favorecen sus producciones pueden encontrarse cercanas a alguna de estas combinaciones de temperatura de fermentación, pH del medio y concentración de sustrato. Por último, se muestra que las condiciones utilizadas de la fermentación 0,1,-1 a la 1,1,0 no favorecen la producción de etanol con *R. oryzae* puesto que en la mayoría de esos casos no se produjo esta molécula, y cuando sí se produjo fue en pocas cantidades, entre 0.35-0.40 g respecto al ácido láctico que estuvo entre 3.24-3.26 g.

El consumo de sustrato cuantificado para las fermentaciones utilizadas para generar el modelo estadístico se encuentra en el Cuadro 4 de la sección de resultados. Para las primeras tres condiciones de fermentación (-1,-1,0; -1,0,-1; -1,0,1) la sacarosa fue el azúcar que más se consumió, a comparación de la glucosa y la fructuosa, siendo esta última el azúcar que presentó menor consumo. Este mismo comportamiento se observa para las fermentaciones 0,-1,-1; 0,-1,1 y 0,0,0; que podría explicarse con la proporción de azúcares en el medio. Al ser la sacarosa el azúcar más abundante, como se muestra en el Cuadro 44 en Datos Calculados de la sección Anexos, esta también es la más disponible para consumo. Cabe destacar que para las condiciones -1,-1,0 y 0,1,1 se registró un caso singular del crecimiento del microorganismo en el que la cantidad de este supera por casi el doble o más al crecimiento de las demás condiciones. Por otro lado, se observa que el consumo de azúcares fue similar para sacarosa, glucosa y fructuosa en las fermentaciones 1,0,1 y 1,1,0, casos para los cuales se determinó mayor generación de CO₂.

En el Cuadro 5 se observan los rendimientos en términos másicos para las fermentaciones analizadas previamente. Para el caso del ácido láctico, se obtuvo el mayor rendimiento en la fermentación 0,-1,-1; aunque se resalta que en las dos réplicas los rendimientos difieren entre ellos, a comparación de los demás rendimientos obtenidos para el ácido láctico. Esto podría indicar que la producción de ácido láctico presenta mayor sensibilidad a estas condiciones,

especialmente porque los rendimientos de etanol y ácido acético, en esa fermentación, son bastante cercanos entre sí. Para el caso del rendimiento del etanol, este fue mayor en la fermentación de -1,0,-1, no obstante, este rendimiento es similar al del ácido láctico. Un caso parecido se presenta en la condición 0,1,-1 para el rendimiento de ácido acético que, a pesar de ser el mayor rendimiento registrado, es similar al del ácido láctico, lo que sugiere que el ácido láctico estará presente en proporciones significativas sin importar las condiciones de fermentación. Esto podría deberse a que *R oryzae*, a pesar de producir variedad de metabolitos secundarios, el ácido láctico es mayoritario de todos.

Como se observa en el Cuadro 6, en la sección de resultados, se realizó un Análisis de Superficie de Respuesta utilizando un Diseño Box-Behnken para 3 factores en duplicado. Con este diseño se obtuvieron los modelos estadísticos, en función del pH inicial del medio, la concentración de sustrato y la temperatura de fermentación, que se presentan en la Ecuación 4, Ecuación 5 y Ecuación 6 para el ácido acético, etanol y ácido acético, respectivamente. Cabe mencionar que estos modelos se obtuvieron en términos de concentraciones (ver Cuadro 46, Datos Calculados en la sección de Anexos) para disminuir la dependencia de modelos estadísticos a la escala de fermentación, y porque para futuros procesos de separación es necesario conocer la concentración de los productos en el fermentado. Además, estos modelos son independientes entre sí, por lo que la capacidad de descriptiva y predictiva de uno no afecta a la de otro.

Para el modelo propuesto para el ácido láctico, se observa en el Cuadro 7, en la sección de resultados, un resumen de los indicadores para el modelo. Se obtuvo una desviación estándar del modelo (S) de 0.484486 que, a pesar de ser cercana a cero, es ligeramente grande considerando que se mide en unidades de la respuesta del modelo, en unidades de % v/v. Es decir, las concentraciones de ácido láctico utilizadas para generar el modelo están entre 0.907 y 4.632 % v/v (Cuadro 46 en la sección de Datos Calculados) y la desviación estándar del modelo representa alrededor de la mitad para los valores más pequeños y alrededor de una décima parte para los valores más grandes. No obstante, es aceptable puesto que este modelo pretende usarse para obtener las concentraciones más grandes posibles.

Por otro lado, el R^2 indica que el modelo describe significativamente al 78.25% de los datos, por lo que se considera aceptable. Al analizar el R^2 ajustado de 68.47% se puede observar que es menor al R^2 en aproximadamente diez unidades porcentuales, lo que sugiere que en el modelo se incluyen términos que no mejoran su capacidad descriptiva y predictiva. El Diagrama de Pareto asociado (Figura 16 en la sección de resultados) muestra que estos términos son los relacionados con la temperatura, lo que indica que cambios en la temperatura dentro del rango de estudio no provoca cambios significativos en la concentración obtenida de ácido

láctico; lo cual puede deberse a que las temperaturas a que estas temperaturas son el rango apropiado para obtener mayores concentraciones de ácido láctico según Zhou y colaboradores (2005). Se obtuvo un indicador PRESS de 10.3393, valor que se considera alto puesto que este indicador es una medida de la desviación entre los valores ajustados y los valores observados, y se utiliza para evaluar la capacidad de predicción de un modelo; por lo que se desea que sea lo más bajo posible. El valor alto del indicador PRESS se confirma con el valor del R^2 predictivo pues indica que el modelo propuesto sólo es capaz de predecir significativamente el 52.10% de las respuestas a nuevas observaciones. Sin embargo, estos desajustes del modelo se atribuyen a que, como se mencionó anteriormente, la desviación estándar del modelo representa alrededor de la mitad del valor de los valores más pequeños utilizados para generar el modelo, por lo que se espera que estas desviaciones no contribuyan a un error considerable sobre la predicción de las condiciones a las que se obtiene mayor concentración de ácido láctico.

En el Cuadro 9 se muestra el indicador FIV para cada factor incluido en el modelo propuesto para el ácido láctico. Ya que el FIV describe cuánta multicolinealidad (que es la correlación entre predictores) existe en un modelo, y entre más cercano su valor sea a 1, menor multicolinealidad existe entre los factores; se puede afirmar que el efecto de un factor no influye sobre otro. Esto indica que existe un valor de Temperatura de fermentación que mejora la producción de ácido láctico por *R. oryzae* y que no depende del valor del pH inicial del medio ni de la concentración de sustrato. De igual manera para el pH inicial y la concentración de sustrato.

En el Cuadro 8 de la sección de resultados se observa un análisis para los coeficientes del modelo propuesto para el ácido láctico. Para los términos de temperatura, el cuadrado del pH, el cuadrado de la temperatura y la interacción Temperatura-pH se puede observar que el error estándar del coeficiente (EE del coef.) es mayor que las magnitudes propias de los coeficientes siendo los coeficientes 0.074, 0.061, -0.065, 0.112; y los errores estándar 0.121, 0.178, 0.178, 0.171; respectivamente. Esto indica que dichos coeficientes poseen mucha variabilidad en su estimación, cuestión que se ve reflejada en el intervalo de confianza (IC de 95%) asociado a cada uno, puesto que son los términos con el intervalo de confianza más amplio; (-0.178; 0.327), (-0.311, 0.433), (-0.437; 0.307) y (-0.245; 0.470) para término de la temperatura, el cuadrado del pH, el cuadrado de la temperatura y la interacción Temperatura-pH, respectivamente. No obstante, esto no afecta al modelo porque como se puede apreciar en el Cuadro 10 en la sección de resultados, los factores temperatura, cuadrado del pH, cuadrado de la temperatura y la interacción Temperatura-pH sólo contribuyen en un 0.41%, 0.05%, 0.28% y 0.47% al modelo estadístico. Todo lo anterior sugiere que, en los rangos estudiados, un cambio en la temperatura no afecta significativamente a la producción de ácido láctico con *Rhizopus oryzae*. Esto puede deberse a que los rangos estudiados son muy similares a los ya

estudiados por Zhou y colaboradores en 2005, estudio en el que se menciona que el rango óptimo para realizar fermentaciones con *R. oryzae* está entre los 36 y 38 °C.

Para confirmar el análisis del Cuadro 8 y del Cuadro 10, se analizó el Valor P de cada coeficiente en el modelo propuesto, valores que se encuentran en el Cuadro 11 en la sección de resultados. Para un nivel de confianza del 95%, se puede observar que los factores: temperatura, cuadrado de la temperatura, cuadrado del pH inicial, cuadrado de la concentración de sustrato, la interacción Temperatura-pH y la interacción Temperatura-Sustrato no son significativos ($\alpha=0.05$) en el modelo propuesto. Lo que confirma que un cambio en la temperatura dentro del rango de estudio no afecta significativamente a la producción de ácido láctico y que puede deberse a que, según Zhou y colaboradores (2005), este es el rango más apropiado para realizar fermentaciones lácticas con *R. oryzae*.

En la Figura 15 en la sección de resultados se observa la gráfica normal de efectos estandarizados del modelo propuesto para la producción de ácido láctico. Aquí se confirma, por la posición en la gráfica, que en el rango de estudio el pH inicial del medio y la concentración de sustrato son los factores que más influyen en la producción de ácido láctico. Además, la interacción entre estos dos factores también es significativa. En el Diagrama de Pareto asociado (Figura 16 en la sección de resultados) se puede ver que tanto difiere la influencia de cada factor en el modelo y que tan sensible es el modelo a estos factores. Aquí se demuestra que para la interacción pH-Sustrato es más significativa que cada efecto por separado. Todo esto sugiere que dentro de los rangos estudiados para el pH inicial y la concentración de sustrato existe una zona que es significativamente más influyente sobre la concentración de ácido láctico que el resto del intervalo estudiado.

La gráfica de efectos principales para la concentración de ácido láctico se encuentra en la Figura 17 en la sección de resultados. Aquí se puede apreciar que, dentro del rango estudiado de temperatura, la respuesta de concentración de ácido láctico no tiene una pendiente tan pronunciada, pero se logra observar un punto máximo, que sería la mejor temperatura de fermentación para producir ácido láctico, alrededor de los 39 °C. Asimismo, se observa que la respuesta de ácido láctico al pH inicial tiene una pendiente negativa pronunciada, donde se evidencia que a un pH más bajo se favorece la producción de ácido láctico. No obstante, según Domínguez y Vázquez (1999), no existe diferencia significativa en la concentración final obtenida de ácido láctico cuando el pH inicial se mantiene entre 3.5 y 6; por lo que el valor más adecuado para producir ácido láctico con *R. oryzae* podría estar entre 6 y un valor ligeramente mayor a 7. En cuanto a la concentración de sustrato, se observa que conforme esta aumenta la concentración de ácido láctico obtenida es menor. Esto podría indicar envenenamiento por sustrato, que a concentraciones muy altas del caldo de melaza el microorganismo se encuentra

a condiciones que son severas para su crecimiento y producción de compuestos de biosíntesis, especialmente para valores por encima de 480 g/L que es cuando la curva comienza a verse plana.

La gráfica de interacción de efectos se muestra en la Figura 18 en la sección de resultados. Aquí se pueden observar de forma gráfica que las interacciones Temperatura-Sustrato y Temperatura-pH son poco significativas en el modelo porque las curvas para estas interacciones quedan muy cercanas entre sí. Asimismo, se evidencia la magnitud sobre la concentración de ácido láctico que tiene la interacción pH-Sustrato, pues las curvas de estas interacciones quedan bastante separadas entre ellas.

Los indicadores para el modelo propuesto para la concentración de etanol se encuentran en el Cuadro 12 de la sección de resultados. La desviación estándar para este modelo es de 0.269353, mucho menor que la obtenida para el modelo del ácido acético, pues esta representa menos de una décima parte de la concentración más alta obtenida para el etanol, que fue de 3.703 % v/v (Cuadro 46 en la sección de Datos Calculados). Además, se observa que los valores de R^2 y R^2 ajustado son casi un 100%; 96.16% y 94.43%, respectivamente. Esto indica que el modelo describe significativamente casi todos los datos y sugiere que todos los términos incluidos en el mismo contribuyen a la capacidad descriptiva y predictiva. Asimismo, se obtuvo un valor para el indicador PRESS de 3.43590 y un R^2 predictivo de 90.91%, lo que indica que el modelo cuenta con capacidad para predecir de manera significativa. Todo lo anterior indica que la mayoría de los términos incluidos en el modelo serán significativos. Por otro lado, en el Cuadro 14 en la sección de resultados, se muestra el análisis de multicolinealidad para los factores del modelo. Como el FIV para todos ellos es 1 o cercano a 1, se asegura que los efectos son independientes unos de otros.

El análisis de los coeficientes para el modelo propuesto para la concentración de etanol se encuentra en el Cuadro 13 de la sección de resultados. Se muestra que el error estándar es menor a la magnitud del coeficiente asociado, a excepción de los valores correspondientes a las interacciones Temperatura-Sustrato y pH-Sustrato. Esto indica que la mayoría de coeficientes fueron estimados con poca variabilidad, idea que se confirma al analizar el intervalo de confianza puesto que todos los coeficientes poseen un intervalo de confianza estrecho. Además, se puede observar en el Cuadro 15 que para este modelo los factores contribuyen en mayor medida para la respuesta a comparación con el modelo propuesto para el ácido láctico, siendo sólo: la concentración de sustrato, el cuadrado de la temperatura, el cuadrado del sustrato, la interacción Temperatura-Sustrato y la interacción pH-Sustrato los únicos factores cuya contribución al modelo es menor al 10%.

De los efectos incluidos en el modelo propuesto, únicamente las interacciones Temperatura-Sustrato y pH-Sustrato no son estadísticamente significativas, puesto que el Valor P de estas interacciones es mayor al 5% (valor de significancia empleado), como se muestra en el Cuadro 16. Esto se respalda al analizar la gráfica normal de efectos estandarizados (Figura 19) y el Diagrama de Pareto. En este último se puede observar que la temperatura de fermentación y el pH inicial del medio son los dos factores que más influencia tiene sobre la concentración de etanol. Esto indica que un cambio leve en alguna de estas condiciones de fermentación cambiará significativamente la concentración de etanol al final de la fermentación.

En la gráfica de efectos principales (Figura 21 de la sección de resultados) se puede apreciar que en los rangos estudiados se encuentra un punto máximo para la temperatura de fermentación, pH inicial del medio y la concentración de sustrato; estando alrededor de 34°C, pH de 8.5 y concentración de sustrato de 450 g/L, respectivamente. Se puede apreciar un descenso en la producción de etanol a partir de los 450 g/L lo cual también podría deberse a envenenamiento por sustrato. Para la curva del pH, se observa un descenso pronunciado a partir de un pH de 9, lo que sigue condiciones demasiado alcalinas para el microorganismo. Por otro lado, se observa que la temperatura de fermentación es un factor más significativo para la concentración de etanol, que para la concentración de ácido láctico. Esto confirma la idea de que *R. oryzae* produce ácido láctico y etanol por distintas rutas metabólicas y que la temperatura de fermentación tiene un impacto distinto sobre las rutas metabólicas en cuestión.

En cuanto a la gráfica de interacción de los efectos (Figura 22 de la sección de resultados), se observa que la interacción Temperatura-pH posee curvas muy distintas entre sí, lo que indica que esta interacción contribuye significativamente al modelo estadístico propuesto. Se puede observar que para valores bajos de esta interacción se obtiene una mayor respuesta para la concentración de etanol.

Cabe mencionar que el ajuste presentado por el modelo propuesto para evaluar la concentración de etanol es mejor que el ajuste presentado por el modelo propuesto para evaluar la concentración de ácido láctico, aunque ambos presentan un ajuste aceptable para modelar las concentraciones altas de los mencionados compuestos. Este hecho puede deberse a que, como se menciona en el estudio de Castillo y colaboradores (2013), los mencionados productos de biosíntesis se producen por distintas rutas metabólicas, por lo que la temperatura de fermentación, el pH inicial del medio y la concentración de sustrato impactarán de diferente manera.

El resumen de indicadores del modelo propuesto para la concentración de ácido acético se encuentra en el Cuadro 17 en la sección de resultados. Se puede observar que de los tres modelos este es el que presenta una menor desviación estándar, indicando que es el que tiene menor variación en la respuesta. Asimismo, se observa que el modelo describe significativamente el 93.67% de los datos empleados y que la mayoría de los términos en el modelo aportan en la capacidad descriptiva y predictiva del mismo; como lo sugieren el R^2 y el R^2 ajustado, respectivamente. En cuanto al indicado PRESS, para este caso resultó de 0.777972 que indica que de los tres modelos propuestos este es el que presenta menor desviación entre los datos, a pesar de no ser el que presenta un mayor R^2 o R^2 ajustado. Además, este presenta una buena capacidad predictiva porque predice significativamente el 83.93% de los datos, como lo indica el R^2 predictivo.

Algunos de los coeficientes del modelo propuesto para la concentración de ácido acético, como se muestra en el Cuadro 18 de la sección de resultados, presentan un error estándar elevado. Tal es el caso del coeficiente de la temperatura, el pH inicial, el cuadrado de la temperatura y el cuadrado de la concentración de sustrato. Esto indica que los coeficientes poseen demasiada variabilidad y que son los que mayor error incluyen en el modelo; lo cual se confirma al analizar el intervalo de confianza de estos puesto que presentan un intervalo de confianza bastante amplio siendo (-0.0257; 0.1034), (-0.0253; 0.1038), (-0.1086; 0.0814) y (-0.1305; 0.0595) para la temperatura, el pH inicial, el cuadrado de la temperatura y el cuadrado de la concentración de sustrato, respectivamente. Como estos son los coeficientes que incluyen mayor error en el modelo, también son los que menos contribuyen en el mismo, como se puede observar en el Cuadro 20; la contribución es de 0.50%, 0.51%, 0.12% y 0.19% para la temperatura, pH inicial, cuadrado de la temperatura y cuadrado de la concentración de sustrato, respectivamente.

El Valor P correspondiente a los coeficientes del modelo a cada efecto se encuentra en el Cuadro 21 de la sección de resultados. En este se muestra que el efecto de: la Temperatura, el pH inicial, el cuadrado de la temperatura y el cuadrado del sustrato no son significativos para el modelo propuesto. Esto sugiere poca dependencia de la temperatura y del pH inicial para la producción de ácido acético. A pesar de eso, los valores con indicador FIV para los factores del modelo indican que no existe multicolinealidad entre los mismos, pues los valores son cercanos a 1. Esto sugiere que los valores de pH, temperatura de fermentación y concentración de sustrato que mejoran la producción de ácido acético no se afectan entre sí.

La gráfica normal de efectos estandarizados correspondiente al modelo propuesto para el ácido acético se encuentra en la Figura 23. Aquí se confirma que, de los efectos principales estudiados, el más significativo es la concentración de sustrato. Por otro lado, se puede apreciar que las interacciones la temperatura de fermentación y el pH del medio también son significativas, esto indica que los efectos principales no deben de eliminarse del modelo propuesto. El Diagrama de Pareto asociado (Figura 24 en la sección de resultados) muestra que tanto el pH inicial y la temperatura tiene un efecto similar; sin embargo, como el efecto del cuadrado del pH es más significativo que el efecto de la interacción Temperatura-Sustrato, sugiere que después de la concentración de sustrato, el pH inicial del medio es la variable que más afecta a la producción de ácido acético.

En la gráfica de efectos principales (Figura 25 de la sección de resultados) se observa que la curva de la temperatura de fermentación es casi horizontal, lo que demuestra que, en el rango de estudio, la temperatura tiene poco efecto sobre la producción de ácido acético. Por otro lado, la curva del pH inicial del medio es cóncava hacia arriba. Lo anterior indica que en el rango de estudio se encuentra un valor que minimiza la producción de ácido acético. De la misma manera, sugiere que es más conveniente fermentar a valores de pH menores al valor correspondiente de ese mínimo, menores a 9 y cercanos a 7, porque en esos casos además de mejorar la producción de ácido acético, también se usaría menos reactivo para alcalinizar el medio. Asimismo, se observa que la curva para la concentración de sustrato es prácticamente una línea recta con pendiente positiva. Esto sugiere que el máximo se encuentra en concentraciones de sustrato mayores a las utilizadas en este estudio.

La interacción de los efectos se muestra en la Figura 26 de la sección de resultados. Aquí se muestra que las interacciones Temperatura-Sustrato y pH-Sustrato son las más significativas puesto que las curvas se encuentran bastante separadas entre sí, mientras que las curvas para la interacción Temperatura-pH se encuentran cercanas entre sí. Para entender de manera más sencilla las interacciones entre dos factores se encuentran en la sección de anexos gráficas de contorno para cada uno de los modelos propuestos (Figura 27-29, ácido láctico; Figura 30-32, etanol; Figura 33-35, ácido acético).

Con los tres modelos estadísticos se obtuvieron las condiciones que favorecen la producción de cada uno de los tres productos de biosíntesis analizados, las cuales se presentan en el Cuadro 22 de la sección de resultados. En este mismo cuadro se presenta la deseabilidad compuesta para combinación de condiciones. La deseabilidad compuesta, al indicar qué tan bien una combinación de variables satisface las metas que se definieron para las respuestas, se considera bastante alta para cada uno de los casos, siendo 0.838265, 0.873783 y 1.000000 para las condiciones que favorecen al ácido láctico, etanol y ácido acético, respectivamente. Esto se

evidencia en las predicciones que se muestran en los Cuadros 23-25 de la sección de resultados, ya que todos los errores estándar son menores al ajuste asociado. En estos mismos cuadros se observa que los intervalos de confianza y los intervalos de predicción más estrechos son los que corresponden a la concentración de ácido acético y que los intervalos más amplios son los correspondientes a la concentración de ácido láctico. Esto se debe a que, de los tres modelos propuestos, el modelo para la concentración de ácido acético presentó el mejor ajuste y el modelo para la concentración de ácido láctico presentó mayores desviaciones, pero a pesar de eso brindó una deseabilidad compuesta bastante significativa.

Para verificar los modelos propuestos, así como las condiciones sugeridas para favorecer la producción de los compuestos analizados, se realizaron 8 fermentaciones por conjunto de condiciones. Cabe mencionar que siempre se produjo ácido láctico, etanol y ácido acético, sin importar a cuál de las tres condiciones se fermentó. Las concentraciones promedio obtenidas para cada conjunto de condiciones se muestra en el Cuadro 26 de la sección de resultados. Aquí se observa que los resultados experimentales fueron cercanos entre sí puesto que las desviaciones estándar fueron bajas (la más alta es alrededor del 10% del promedio al que se asocia). También se observa que las concentraciones promedio de productos para la condición que favorece la producción de ácido láctico (AcLacMax) se encuentran en la parte superior de los intervalos indicados en las predicciones (Cuadro 23). Esta desviación positiva se atribuye a que el modelo para la concentración de ácido láctico fue el que presentó mayor desviación, por lo tanto, también las condiciones establecidas con ese modelo. En cuanto a las concentraciones promedio obtenidas para la condición EtMax, se observa que estas estuvieron más cercanas a los valores centrales de los intervalos de predicción correspondientes (Cuadro 24), lo que indica un buen ajuste de los datos experimentales con las predicciones establecidas con los modelos estadísticos. Para la condición AcAcMax, se observa que las concentraciones promedio de etanol y ácido acético tuvieron una desviación positiva, pero siempre dentro del intervalo de predicción; además, la concentración de ácido láctico quedó en los valores centrales del intervalo de predicción. Todo esto valida la predicción obtenida con los modelos.

Por otra parte, en el Cuadro 27 se encuentran las cantidades máxicas de ácido láctico, etanol y ácido acético correspondientes a las concentraciones presentadas en el Cuadro 26. Se puede observar que sí se logró obtener más sustrato a estas condiciones que a las condiciones usadas para generar los modelos. El rendimiento de ácido láctico, que se muestran en el Cuadro 30, es mayor a los dos rendimientos más altos presentados en el Cuadro 5 (0.468 g ácido láctico/g sustrato comparado con 0.422 y 0.375 g ácido láctico/g sustrato). De igual manera, el rendimiento de etanol obtenido a las condiciones de fermentación sugeridas es mayor a los rendimientos obtenidos en las fermentaciones utilizadas para generar el modelo estadístico (0.162 g etanol/g sustrato comparado con 0.143 y 0.149 g etanol/g sustrato), por una diferencia

de alrededor del 10%; de igual manera para el ácido acético al comparar el rendimiento obtenido en las fermentaciones para validar el modelo y los rendimientos más altos obtenidos previamente (0.157 g ácido acético/g sustrato comparado con 0.149 y 0.144 g ácido acético/g sustrato). Todo esto confirma que a las condiciones sugeridas por los modelos estadísticos se obtiene más producto que a las condiciones usadas para generarlos.

Por otro lado, se observa que para los casos de las últimas fermentaciones el azúcar con mayor consumo fue la sacarosa (ver Cuadro 28), tendencia similar a la vista en las fermentaciones iniciales. Cabe destacar que no se presentó ningún caso singular del crecimiento del microorganismo y que la cantidad producida de CO₂ y otros compuestos se encuentra dentro de los rangos observados en las fermentaciones iniciales.

IX. CONCLUSIONES

- Se realizaron fermentaciones a escala laboratorio las cuales indican que, en el rango estudiado de temperatura de fermentación, pH del medio y concentración inicial de sustrato se obtienen concentraciones de ácido láctico, etanol y ácido acético entre: 0.907 ± 0.009 y 4.632 ± 0.016 % v/v, 0 y 3.703 ± 0.014 % v/v, 0.445 ± 0.008 y 2.112 ± 0.010 % v/v; respectivamente.
- Se generaron modelos estadísticos de Superficie de Respuesta con un Diseño Box-Behnken, que describen significativamente los datos experimentales de las concentraciones finales de ácido láctico, etanol y ácido acético según lo muestran los indicadores de los modelos como R^2 , R^2 (ajustado), R^2 (predictivo), el análisis de los coeficientes de los modelos, y el valor-P de los factores del modelo (menores a 0.05), y estos modelos indican que las condiciones que favorecen la biosíntesis del ácido láctico, etanol y ácido acético son: 39.26 °C, pH de 7.12, 350 g melaza/L; 33.00 °C, pH de 7.61, 433 g melaza/L; 38.20 °C, pH de 7.00, 550 g melaza/L; respectivamente.
- Los modelos estadísticos generados son válidos como una propuesta para evaluar las condiciones de fermentación de melaza con *R. oryzae*, comprobado por los resultados experimentales puesto que las concentraciones de ácido láctico, etanol y ácido acético (5.18 ± 0.28 % v/v, 2.47 ± 0.17 % v/v, 2.52 ± 0.07 % v/v; respectivamente) a las condiciones sugeridas por el modelo coinciden con los intervalos de predicción de los modelos generados y porque a esas condiciones las fermentaciones mostraron un mayor rendimiento, en términos másicos.

X. RECOMENDACIONES

- Llevar a cabo las fermentaciones a las condiciones sugeridas por los modelos en un biorreactor con un volumen entre 1 y 5 L para verificar que estos sean aplicables a fermentaciones de volumen más grande.
- Determinar el consumo de oxígeno por medio del cambio en el oxígeno disuelto para evaluar su efecto sobre las concentraciones obtenidas de los productos analizados.
- Estudiar las rutas metabólicas por las cuales el *Rhizopus oryzae* sintetiza ácido láctico, etanol y ácido acético para conocer las etapas del mecanismo de reacción.
- Estudiar y proponer modelos cinéticos que describan la producción de ácido láctico, etanol y ácido acético por medio de fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*, que sean aplicables para el diseño y selección de reactores para el proceso.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, Ashfaq; Fawzi y Taher. 2020. <<A review on the lactic acid fermentation from low-cost renewable materials: Recent developments and challenges>>. *Environmental Technology & Innovation*. 20 (101138): 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101138>
- Axelsson. 2004. << Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology>>. En *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, de Salminen, Sepo; von Wright y Ouwehand. Nueva York: Marcel Dekker. Págs 1-67. <https://doi.org/10.1201/9780824752033.ch1>
- Balat, Mustafa; y H. Balat. << Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel>>. *Applied Energy*. 86: 2273-2282. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.03.015>
- Ban, Kazuhiro, *et al.* 2001. <<Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles>>. *Biochemical Engineering Journal*. 8: 39-43. [https://doi.org/10.1016/s1369-703x\(00\)00133-9](https://doi.org/10.1016/s1369-703x(00)00133-9)
- Bulut, Sule; M. Elibol y D. Ozer. 2004. <<Effect of different carbon sources on l(+) -lactic acid production by *Rhizopus oryzae*>>. *Biochemical Engineering Journal*. 21: 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.04.006>
- Castillo, Fabio, *et al.* 2013. <<Lactic acid properties, applications and production: A review>>. *Trends in Food Science & Technology*. 30: 70-83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.007>
- Chahal, Surinder; y J. Starr. 2006. <<Lactic Acid>>. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 20: 219-226. https://doi.org/10.1002/14356007.a15_097.pub2
- Deng, Yeufang, *et al.* 2012. <<Production of fumaric acid by simultaneous saccharification and fermentation of starchy materials with 2-deoxyglucose-resistant mutant strains of *Rhizopus oryzae*>>. *Bioresource Technology*. 107: 363-367. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.117>
- Di Donato, Paola, *et al.* 2014. <<Polysaccharides: Applications in Biology and Biotechnology/Polysaccharides from Bioagro-Waste New Biomolecules-Life>>. En *Polysaccharides, Bioactivity and Biotechnology*, de Ramawat, Kishan; y J. Mérillon. Suiza: Springer. págs. 1-29. https://doi.org/10.1007/978-3-319-03751-6_16-1
- Domínguez; y Vázquez. 1999. <<EFECTO DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE ACIDO L-LÁCTICO POR *Rhizopus oryzae*>>. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* [España]. 2: 113-118. <https://doi.org/10.1080/11358129909487590>
- Ghaffar, Tayyba, *et al.* 2014. <<Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification>>. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 7 (2): 222-229. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.03.002>

- Ghosh, Barnita ; y R. Rani. 2011. <<Current Commercial Perspective of *Rhizopus oryzae*: A Review>>. *Journal of Applied Sciences*. 11: 2470-2486. <https://dx.doi.org/10.3923/jas.2011.2470.2486>.
- Gnansounou, Edgard; y A. Dauriat. 2005. <<Ethanol fuel from biomass: A review>>. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 64: 809–821. <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/5372/1/JSIR%2064%2811%29%20809-821.pdf>
- Ingeño La Unión. *Ingenio La Unión, Cifras Importantes*. <https://www.launion.com.gt>. [10 de octubre de 2021].
- Jin, Bo, *et al.* 2005. <<Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus* fungi from food processing waste streams>>. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 32 (11–12): 678–686. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0045-4>
- Koolman, Jean; K. H. Röhm y M. Robertson. (2005). *Color Atlas of Biochemistry*. Alemania: Thieme.
- Kotzamanidis, C; T. Roukas y G. Skaracis. 2002. <<Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130>>. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [Países Bajos]. 18 (5): 441–448. <https://doi.org/10.1023/a:1015523126741>
- Lin, Jianíng, *et al.* 2007. <<Extractive fermentation of l-lactic acid with immobilized *Rhizopus oryzae* in a three-phase fluidized bed>>. *Chemical Engineering and Processing*. 46 (5): 369–374. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.06.015>
- Londoño-Hernández, Liliana, *et al.* 2017. <<*Rhizopus oryzae* –Ancient microbial resource with importance in modern food industry>>. *International Journal of Food Microbiology*. 257: 110–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.012>
- Maas, Ronald, *et al.* 2006. <<Lactic acid production from xylose by the fungus *Rhizopus oryzae*>>. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72 (5): 861–868. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0379-5>
- Melgar, Mario, *et al.* 2014. *El Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala*. 1ª ed. Guatemala: Librerías Artemis Edinter, S.A. <https://cengicana.org/files/20170103101309141.pdf>
- Meussen, Bas, *et al.* 2012. <<Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae* for the production of platform chemicals>>. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 94 (4): 875–886. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4033-0>
- Minitab Inc. *Fases de un experimento diseñado -Minitab*. <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/basics/phases-of-a-designed-experiment/>. [3 de abril de 2021].
- Minitab Inc. *¿Qué es un experimento diseñado? -Minitab*. <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/basics/what-is-a-designed-experiment/> [3 de abril de 2021].

- Minitab Inc. *¿Qué son los diseños de superficie de respuesta, los diseños centrales compuestos y los diseños de Box-Behnken? -Minitab.* <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/response-surface-designs/response-surface-central-composite-and-box-behnken-designs/> [3 de abril de 2021].
- Minitab Inc. *Resumen de diseños de Box-Behnken -Minitab.* <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/response-surface-designs/summary-of-box-behnken-designs/> [3 de abril de 2021].
- Montgomery, Douglas.; y G. Runger. 2012. *Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería*. 2ª ed. México: Limusa Wiley.
- Morshedi, Afsaneh; y M. Arkabian. 2014. <<APPLICATION OF RESPONSE SURFACE METHODOLOGY: DESIGN OF EXPERIMENTS AND OPTIMIZATION: A MINI REVIEW>>. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*. 4 (S4): 2434–2439. <https://www.cibtech.org/sp.ed/jls/2014/04/JLS-280-S4-282-AKBARIAN-APPLICATION-REVIEW.pdf>
- Nancib, Aicha; N. Nancib y J. Boudrant. 2009. <<Production of lactic acid from date juice extract with free cells of single and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*>>. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25 (8): 1423–1429. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0029-z>
- Nancib, Nabil, *et al.* 2001. <<The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus*>>. *Bioresource Technology*. 78 (2): 149–153. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00009-8](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00009-8)
- Nelson, David; y M. Cox. 2017. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7ª ed. Estados Unidos: W. H. Freeman.
- Oda, Y, *et al.* (2003). <<Differences of *Rhizopus oryzae* strains in organic acid synthesis and fatty acid composition>>. *Food Microbiology*. 20 (3): 371–375. [https://doi.org/10.1016/s0740-0020\(02\)00131-4](https://doi.org/10.1016/s0740-0020(02)00131-4)
- Onuki, Shinnosuke, *et al.* 2008. <<Ethanol production, purification, and analysis techniques: a review>>. *Agricultural and Biosystems Engineering Conference Proceedings and Presentations* [Rhode Island]. 68: 1–12. https://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1070&context=abe_eng_conf
- Park, Eoch; P. Anh y N. Okuda. 2004. <<Bioconversion of waste office paper to L(+)-lactic acid by the filamentous fungus *Rhizopus oryzae*>>. *Bioresource Technology*. 93: 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.08.017>
- Rojan, John; K. Nampoothiri y A. Pandey. 2007. <<Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives>>. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74 (3): 524–534. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0779-6>

- Rosales-Calderón, O; y V, Arantes. 2019. <<A review on commercial-scale high-value products that can be produced alongside cellulosic ethanol>>. *Biotechnol Biofuels*. 12 (1): 1-58. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1529-1>
- San-Martín, Marta; C. Pazos y J. Coca. 1992. <<Reactive extraction of lactic acid with Alamine 336 in the presence of salts and lactose>>. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 54 (1): 1–6. <https://doi.org/10.1002/jctb.280540102>
- Sharma, Ranjana, *et al.* 2020. <<Microbial Fermentation and Its Role in Quality Improvement of Fermented Foods>>. *Fermentation*. 6 (4): 106. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040106>
- Skory, Christopher. 2000. <<Isolation and Expression of Lactate Dehydrogenase Genes from *Rhizopus oryzae*>>. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (6): 2343–2348. <https://doi.org/10.1128/aem.66.6.2343-2348.2000>
- Sun, J; J. Zhu y W. Li. 2012. <<1-(+) lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using pretreated dairy manure as carbon and nitrogen source>>. *Biomass and Bioenergy*. 47: 442-450. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.011>
- Thongchul, Nuttha; S. Navankasattusas y S. Yang. 2010. <<Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* integrated with cassava pulp hydrolysis>>. *Bioprocess Biosyst Eng*. 33 (3): 407-416. <https://doi.org/10.1007/s00449-009-0341-x>
- Vidra, A; A. Németh. 2018. <<Bio-produced Acetic Acid: A Review>>. *Periodica Polytechnica, Chemical Engineering*. 62 (3): 245-256. <https://doi.org/10.3311/PPch.11004>
- Wang, Xuedong, *et al.* 2005. <<Reducing by-product formation in L-lactic acid fermentation by *Rhizopus oryzae*>>. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 32: 38–40. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0198-6>
- Wright, Barbara; A. Longacre y J. Reimers. 1996. <<Models of Metabolism in *Rhizopus oryzae*>>. *Journal of Theoretical Biology*. 182 (3): 453–457. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1996.0186>
- Wu, Xuefeng, *et al.* 2011. <<Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* using semicontinuous fermentation in bioreactor>>. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 38 (4): 565–571. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0804-8>
- Yoneya, Takefumi; y Y. Sato. 1980. <<Effect of Growth Conditions on the Formation of *Rhizopus* Alcohol Dehydrogenase>>. *Agricultural and Biological Chemistry*. 44 (8), 1949–1950. <https://doi.org/10.1080/00021369.1980.10864243>
- Zhou, Xiuhong, *et al.* 2005. <<Characteristics of L-lactic Acid Production by *Rhizopus oryzae* mutant RL6041>>. *Food Biotechnology*. 19 (3): 205–216. <https://doi.org/10.1080/08905430500316409>

XII. ANEXOS

A. Datos originales

Cuadro 31. Tiempos de retención para los compuestos analizados por HPLC en columna cromatográfica Hyplex H a las condiciones de operación utilizadas.

Compuesto	Tiempo de Retención (min)
Sacarosa	9.11
Fructuosa	11.18
Glucosa	10.37
Ácido Láctico	13.82
Ácido Acético	16.35
Etanol	21.50

Cuadro 32. Condiciones de fermentación establecidas para las fermentaciones utilizadas para generar los modelos estadísticos.

Identificación de fermentación	Temperatura de fermentación (°C)	pH inicial	Concentración Sustrato (g melaza/L)
-1,-1,0	33	7	450
-1,0,-1	33	9	350
-1,0,1	33	9	550
-1,1,0	33	11	450
0,-1,-1	37	7	350
0,-1,1	37	7	550
0,0,0	37	9	450
0,1,-1	37	11	350
0,1,1	37	11	550
1,-1,0	41	7	450
1,0,-1	41	9	350
1,0,1	41	9	550
1,1,0	41	11	450

Cuadro 33. Pesos registrados para determinar la humedad promedio del inóculo.

Réplica	Papel Aluminio (± 0.001 g)	Biomasa Húmeda + Papel Aluminio (± 0.001 g)	Biomasa Seco + Papel Aluminio (± 0.001 g)
1	0.237	1.551	0.308
2	0.208	1.914	0.291
3	0.264	1.307	0.293
4	0.223	1.597	0.275
5	0.213	2.527	0.313
6	0.260	2.097	0.341

Cuadro 34. Resumen de análisis HPLC sobre la concentración de azúcares presentes en muestras diluidas al 6% v/v de los caldos preparados a distintas concentraciones de melaza.

Concentración Sustrato (g melaza/L)	Concentración de azúcares (± 0.005 % p/v)		
	Sacarosa	Glucosa	Fructuosa
350	0.863	0.527	0.461
433	1.105	0.635	0.569
450	1.237	0.700	0.635
550	1.459	0.988	0.790

Cuadro 35. Cantidad de inóculo utilizada en las fermentaciones utilizadas para generar los modelos estadísticos.

Fermentación	Réplica	Inóculo (± 0.001 g)
-1,-1,0	1	1.683
-1,-1,0	2	1.845
-1,0,-1	1	1.454
-1,0,-1	2	1.099
-1,0,1	1	2.686
-1,0,1	2	1.946
-1,1,0	1	2.093
-1,1,0	2	1.858
0,-1,-1	1	2.037
0,-1,-1	2	2.526
0,-1,1	1	1.977
0,-1,1	2	2.861
0,0,0	1	1.895
0,0,0	2	1.464
0,0,0	3	2.257
0,0,0	4	1.810
0,0,0	5	1.843
0,0,0	6	3.242
0,1,-1	1	1.238
0,1,-1	2	1.629
0,1,1	1	2.016
0,1,1	2	1.960
1,-1,0	1	1.055
1,-1,0	2	1.170
1,0,-1	1	1.559
1,0,-1	2	1.719
1,0,1	1	1.175
1,0,1	2	1.238
1,1,0	1	1.156
1,1,0	2	1.125

Cuadro 36. Cantidad de inóculo utilizada en las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.

Fermentación	Réplica	Inóculo (± 0.001 g)
AcLacMax	1	1.715
AcLacMax	2	1.636
AcLacMax	3	1.161
AcLacMax	4	1.562
AcLacMax	5	1.737
AcLacMax	6	1.431
AcLacMax	7	1.527
AcLacMax	8	1.309
EtMax	1	1.992
EtMax	2	1.886
EtMax	3	1.502
EtMax	4	1.718
EtMax	5	1.890
EtMax	6	1.761
EtMax	7	1.611
EtMax	8	1.607
AcAcMax	1	1.387
AcAcMax	2	1.457
AcAcMax	3	1.371
AcAcMax	4	1.160
AcAcMax	5	1.557
AcAcMax	6	1.592
AcAcMax	7	1.531
AcAcMax	8	1.512

Cuadro 37. Peso seco de la biomasa al final de las fermentaciones utilizadas para generar los modelos estadísticos.

Fermentación	Réplica	Biomasa (± 0.010 g)
-1,-1,0	1	1.478
-1,-1,0	2	1.528
-1,0,-1	1	0.377
-1,0,-1	2	0.204
-1,0,1	1	0.460
-1,0,1	2	0.327
-1,1,0	1	0.979
-1,1,0	2	0.790
0,-1,-1	1	0.325
0,-1,-1	2	0.179
0,-1,1	1	0.457
0,-1,1	2	0.391
0,0,0	1	0.804

Continuación Cuadro 37

Fermentación	Réplica	Biomasa (± 0.010 g)
0,0,0	2	0.626
0,0,0	3	0.791
0,0,0	4	0.755
0,0,0	5	0.843
0,0,0	6	0.706
0,1,-1	1	0.589
0,1,-1	2	0.685
0,1,1	1	1.783
0,1,1	2	1.261
1,-1,0	1	0.262
1,-1,0	2	0.291
1,0,-1	1	0.400
1,0,-1	2	0.406
1,0,1	1	0.417
1,0,1	2	0.439
1,1,0	1	0.463
1,1,0	2	0.511

Cuadro 38. Peso seco de la biomasa al final de las fermentaciones que favorecen la biosíntesis de los productos analizados utilizadas para generar los modelos estadísticos.

Fermentación	Réplica	Biomasa (± 0.001 g)
AcLacMax	1	0.727
AcLacMax	2	0.697
AcLacMax	3	0.638
AcLacMax	4	0.494
AcLacMax	5	0.733
AcLacMax	6	0.515
AcLacMax	7	0.692
AcLacMax	8	0.627
EtMax	1	0.234
EtMax	2	0.453
EtMax	3	0.363
EtMax	4	1.144
EtMax	5	0.395
EtMax	6	0.29
EtMax	7	0.335
EtMax	8	0.434
AcAcMax	1	1.795
AcAcMax	2	0.349
AcAcMax	3	0.316
AcAcMax	4	0.344
AcAcMax	5	1.347
AcAcMax	6	0.667
AcAcMax	7	0.48
AcAcMax	8	0.353

Cuadro 39. Resumen del análisis HPLC sobre la concentración de azúcares en muestras de fermentaciones diluidas al 30% v/v, utilizadas para generar los modelos estadísticos.

Fermentación	Réplica	Concentración de azúcares (± 0.005 % p/v)		
		Sacarosa	Glucosa	Fructuosa
-1,-1,0	1	0.415	1.598	2.404
-1,-1,0	2	0.633	1.937	2.417
-1,0,-1	1	0.385	1.456	1.775
-1,0,-1	2	0.437	1.560	1.822
-1,0,1	1	1.571	2.522	2.809
-1,0,1	2	2.109	2.305	2.585
-1,1,0	1	3.972	1.455	1.493
-1,1,0	2	3.944	0.437	0.680
0,-1,-1	1	0.219	1.843	1.697
0,-1,-1	2	0.183	1.921	1.691
0,-1,1	1	2.090	2.456	2.380
0,-1,1	2	1.745	2.555	2.493
0,0,0	1	0.521	2.319	2.315
0,0,0	2	0.735	2.207	2.627
0,0,0	3	0.527	2.108	2.573
0,0,0	4	0.485	2.241	2.312
0,0,0	5	0.444	2.005	2.531
0,0,0	6	0.459	2.021	2.482
0,1,-1	1	3.272	1.416	0.808
0,1,-1	2	2.969	1.504	0.859
0,1,1	1	5.226	1.479	1.276
0,1,1	2	5.306	1.796	1.447
1,-1,0	1	1.943	1.772	1.514
1,-1,0	2	2.269	0.988	0.933
1,0,-1	1	0.880	1.774	1.717
1,0,-1	2	0.660	1.913	1.776
1,0,1	1	3.690	0.397	0.698
1,0,1	2	3.144	1.016	1.022
1,1,0	1	2.350	0.429	0.106
1,1,0	2	2.472	0.504	0.098

Cuadro 40. Resumen del análisis HPLC sobre la concentración de productos en muestras de fermentaciones diluidas al 60% v/v, utilizadas para generar los modelos estadísticos.

Fermentación	Réplica	Concentración de productos de fermentación (± 0.005 % v/v)		
		Ácido Láctico	Etanol	Ácido Acético
-1,-1,0	1	1.426	2.222	0.605
-1,-1,0	2	1.298	1.516	0.620
-1,0,-1	1	1.084	1.489	0.603
-1,0,-1	2	1.055	1.470	0.595
-1,0,1	1	0.846	1.018	0.889
-1,0,1	2	0.854	0.986	0.869
-1,1,0	1	0.887	0.105	0.919
-1,1,0	2	0.905	0.128	0.922
0,-1,-1	1	2.779	0.812	0.473
0,-1,-1	2	2.447	0.804	0.456
0,-1,1	1	1.189	0.875	1.267
0,-1,1	2	0.544	0.783	1.248
0,0,0	1	0.714	1.393	0.720
0,0,0	2	0.775	1.323	0.740
0,0,0	3	0.837	1.270	0.699
0,0,0	4	0.927	1.609	0.750
0,0,0	5	1.444	1.568	0.724
0,0,0	6	1.425	1.421	0.703
0,1,-1	1	0.589	-----	0.631
0,1,-1	2	0.577	-----	0.653
0,1,1	1	0.867	-----	1.024
0,1,1	2	0.888	-----	1.014
1,-1,0	1	1.035	-----	0.981
1,-1,0	2	0.976	-----	0.980
1,0,-1	1	1.800	0.293	0.267
1,0,-1	2	1.813	0.339	0.293
1,0,1	1	0.886	-----	1.000
1,0,1	2	0.939	-----	1.030
1,1,0	1	0.804	-----	0.915
1,1,0	2	0.814	-----	0.929

Cuadro 41. Resumen del análisis HPLC sobre la concentración de azúcares en muestras de fermentaciones diluidas al 30% v/v, utilizadas para validar los modelos estadísticos.

Fermentación	Réplica	Concentración de azúcares (± 0.005 % p/v)		
		Sacarosa	Glucosa	Fructuosa
AcLacMax	1	1.089	1.850	0.812
AcLacMax	2	0.949	1.890	0.869
AcLacMax	3	1.007	1.904	0.886
AcLacMax	4	1.054	1.834	0.865
AcLacMax	5	1.026	1.892	0.809
AcLacMax	6	0.900	1.940	0.829
AcLacMax	7	0.926	1.921	0.813
AcLacMax	8	0.934	1.940	0.847
EtMax	1	0.693	1.673	2.195
EtMax	2	0.738	1.626	2.207
EtMax	3	0.671	1.671	2.168
EtMax	4	0.637	1.635	2.212
EtMax	5	0.671	1.646	2.219
EtMax	6	0.610	1.653	2.152
EtMax	7	0.656	1.753	2.150
EtMax	8	0.760	1.767	2.164
AcAcMax	1	2.858	2.534	2.675
AcAcMax	2	2.784	2.588	2.801
AcAcMax	3	2.766	2.606	2.698
AcAcMax	4	2.863	2.553	2.767
AcAcMax	5	2.945	2.608	2.677
AcAcMax	6	2.812	2.589	2.690
AcAcMax	7	2.983	2.551	2.709
AcAcMax	8	2.664	2.638	2.733

Cuadro 42. Resumen del análisis HPLC sobre la concentración de productos en muestras de fermentaciones diluidas al 60% v/v, utilizadas para validar los modelos estadísticos.

Fermentación	Réplica	Concentración de productos de fermentación (± 0.005 % v/v)		
		Ácido Láctico	Etanol	Ácido Acético
AcLacMax	1	2.990	0.675	0.489
AcLacMax	2	2.962	0.603	0.487
AcLacMax	3	3.067	0.667	0.506
AcLacMax	4	3.059	0.548	0.512
AcLacMax	5	2.923	0.586	0.555
AcLacMax	6	3.394	0.671	0.482
AcLacMax	7	3.225	0.712	0.523
AcLacMax	8	3.262	0.566	0.528
EtMax	1	1.598	2.071	0.575
EtMax	2	1.574	1.902	0.544
EtMax	3	1.559	2.269	0.679
EtMax	4	1.633	2.194	0.544
EtMax	5	1.529	2.191	0.626
EtMax	6	1.624	2.040	0.555
EtMax	7	1.582	1.865	0.746
EtMax	8	1.526	2.152	0.643
AcAcMax	1	0.681	0.761	1.551
AcAcMax	2	0.542	0.733	1.556
AcAcMax	3	0.670	0.787	1.579
AcAcMax	4	0.556	0.799	1.568
AcAcMax	5	0.542	0.793	1.667
AcAcMax	6	0.681	0.734	1.606
AcAcMax	7	0.544	0.679	1.640
AcAcMax	8	0.599	0.800	1.605

B. Cálculos de muestra

Cálculo 1. Cantidad de reactivo necesaria para preparar solución de H₂SO₄ al 15% v/v.

Se deseaba preparar 1 litro de solución (V_f) H₂SO₄ al 15% v/v (C_f) a partir del reactivo a una pureza del 95% v/v (C_i). Se utiliza la ecuación de dilución para determinar la cantidad de reactivo requerida (V_i).

$$C_i V_i = C_f V_f$$

Despejando y sustituyendo valores

$$V_i = \frac{C_f V_f}{C_i} = \frac{(15 \% v/v)(1000 \text{ ml})}{95 \% v/v} = 156 \text{ ml}$$

Cálculo 2. Cantidad de reactivo necesaria para preparar solución de NaOH 10 N.

Se deseaba preparar 1 litro de solución NaOH 10 N a partir del reactivo a una pureza del 99% p/p. Por medio de estequiometría se determina la cantidad de reactivo requerida.

$$\text{Reactivo}_{\text{NaOH}}(g) = 1 \text{ L Solución} \left(\frac{10 \text{ eq OH}^-}{1 \text{ L Solución}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol NaOH}}{1 \text{ eq OH}^-} \right) \left(\frac{40 \text{ g NaOH}}{1 \text{ mol NaOH}} \right) \left(\frac{100 \text{ g reactivo}}{99 \text{ g NaOH}} \right)$$

Operando se obtiene la cantidad de reactivo requerida

$$\text{Reactivo}_{\text{NaOH}}(g) = 404 \text{ g reactivo con pureza de 99\% p/p.}$$

Cálculo 3. Cantidad de Agar PDA necesaria para preparar 12 cajas petri.

Cada caja petri contendría alrededor de 25 ml de agar, con la relación del fabricante de 30 g de polvo de agar por cada litro a preparar y usando estequiometría se obtiene la cantidad de agar en polvo requerida.

$$\text{Agar en polvo (g)} = 12 \text{ cajas petri} \left(\frac{25 \text{ ml agar}}{1 \text{ caja petri}} \right) \left(\frac{30 \text{ g agar en polvo}}{1000 \text{ ml agar}} \right) = 9 \text{ g agar en polvo}$$

Cálculo 4. Cantidad de melaza necesaria para preparar caldo de melaza con concentración de 350 g/L.

La cantidad de melaza que se debe diluir para obtener 1.5 L de caldo de melaza a una concentración establecida en 350 g/L se obtiene estequiométricamente.

$$\text{Melaza (g)} = 1500 \text{ ml Caldo} \left(\frac{350 \text{ g melaza}}{1000 \text{ ml Caldo}} \right) = 525 \text{ g melaza}$$

Como cada caldo se está preparando en fracciones de 500 ml, la cantidad a pesar por cada 500 ml es un tercio del valor determinado; es decir, 175 g melaza.

Se realizó el mismo procedimiento para determinar la cantidad de melaza requerida para preparar los demás caldos de melaza.

Cálculo 5. Cantidad de reactivo necesaria para preparar caldo Caldo Glucosa al 2% según SABOURAUD usado para la inoculación.

Para cada bloque de fermentaciones se prepararon 400 ml de Caldo Glucosa al 2% según SABOURAUD. La relación entre caldo en polvo y agua desmineralizada es de 30 g por cada litro según el fabricante. Usando estequiometría se obtiene la cantidad de caldo en polvo que se usó por cada bloque de fermentaciones.

$$\text{Caldo en polvo (g)} = 400 \text{ ml} \left(\frac{30 \text{ g caldo en polvo}}{1000 \text{ ml}} \right) = 12 \text{ g caldo en polvo}$$

Cálculo 6. Porcentaje de humedad de la muestra 1 de inóculo de *Rhizopus oryzae*.

Para el caso de la primera muestra, el trozo de papel de aluminio pesó 0.237 g (Peso A); para el trozo de papel aluminio con la muestra húmeda de inóculo, el peso registrado fue de 1.551 g (Peso B); mientras que para el trozo de papel aluminio con la muestra seca de inóculo fue de 0.308 g (Peso C).

Empleando la ecuación 1.

$$\text{Humedad}_{\text{inóculo}} = \frac{0.308 \text{ g} - 0.237 \text{ g}}{1.551 \text{ g} - 0.237 \text{ g}} = \frac{0.071 \text{ g agua}}{1.314 \text{ g inóculo húmedo}}$$

Cálculo 7. Concentración de ácido láctico presente en la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

El análisis por HPLC indica que la muestra -1,-1,0 diluida al 60% v/v contiene ácido láctico al 1.426% v/v. Realizando la corrección de las concentraciones por la dilución se obtiene.

$$[\text{Ácido Láctico}] = \frac{1.426 \% \text{ v/v}}{0.60} = 2.377 \% \text{ v/v}$$

La concentración de ácido láctico para todas las demás fermentaciones fue determinada de la misma manera.

Cálculo 8. Concentración de etanol presente en la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

El análisis por HPLC indica que la muestra -1,-1,0 diluida al 60% v/v contiene etanol y ácido acético al 2.222% v/v. Realizando la corrección de las concentraciones por la dilución se obtiene.

$$[\text{Etanol}] = \frac{2.222 \% \text{ v/v}}{0.60} = 3.703 \% \text{ v/v}$$

La concentración de etanol para todas las demás fermentaciones fue determinada de la misma manera.

Cálculo 9. Concentración de ácido acético presente en la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

El análisis por HPLC indica que la muestra -1,-1,0 diluida al 60% v/v contiene ácido acético al 0.605% v/v. Realizando la corrección de las concentraciones por la dilución se obtiene.

$$[\text{Ácido Acético}] = \frac{0.605 \% v/v}{0.60} = 1.008\% v/v$$

La concentración de ácido acético para todas las demás fermentaciones fue determinada de la misma manera.

Cálculo 10. Concentración de sacarosa presente en el caldo de melaza con concentración de 350 g/L.

El análisis por HPLC indica que la muestra de caldo de melaza (350 g/L) diluida al 6% v/v contiene sacarosa al 0.863% p/v. Realizando la corrección de las concentraciones por la dilución se obtiene.

$$[\text{Sacarosa}]_0 = \frac{1.237 \% p/v}{0.06} = 20.62\% p/v$$

La concentración de sacarosa para todos los demás caldos de melaza fue determinada de la misma manera.

Cálculo 11. Concentración de glucosa presente en el caldo de melaza con concentración de 350 g/L.

El análisis por HPLC indica que la muestra de caldo de melaza (350 g/L) diluida al 6% v/v contiene glucosa al 0.527% p/v. Realizando la corrección de las concentraciones por la dilución se obtiene.

$$[\text{Glucosa}]_0 = \frac{0.700 \% p/v}{0.06} = 11.67\% p/v$$

La concentración de glucosa para todos los demás caldos de melaza fue determinada de la misma manera.

Cálculo 12. Concentración de fructuosa presente en el caldo de melaza con concentración de 350 g/L.

El análisis por HPLC indica que la muestra de caldo de melaza (350 g/L) diluida al 6% v/v contiene fructuosa al 0.461% p/v. Realizando la corrección de las concentraciones por la dilución se obtiene.

$$[Fructuosa]_0 = \frac{0.635 \% p/v}{0.06} = 10.58\% p/v$$

La concentración de fructuosa para todos los demás caldos de melaza fue determinada de la misma manera.

Cálculo 13. Concentración de sacarosa presente en la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

El análisis por HPLC indica que la muestra de la fermentación -1,-1,0 diluida al 30% v/v contiene sacarosa al 0.415% p/v. Realizando la corrección de las concentraciones por la dilución se obtiene.

$$[Sacarosa]_f = \frac{0.415 \% p/v}{0.30} = 1.38\% p/v$$

La concentración de sacarosa para todas las demás fermentaciones fue determinada de la misma manera.

Cálculo 14. Concentración de glucosa presente en la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

El análisis por HPLC indica que la muestra de la fermentación -1,-1,0 diluida al 30% v/v contiene glucosa al 0.415% p/v. Realizando la corrección de las concentraciones por la dilución se obtiene.

$$[Glucosa]_f = \frac{1.598 \% p/v}{0.30} = 5,33\% p/v$$

La concentración de glucosa para todas las demás fermentaciones fue determinada de la misma manera.

Cálculo 15. Concentración de fructuosa presente en la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

El análisis por HPLC indica que la muestra de la fermentación -1,-1,0 diluida al 30% v/v contiene fructuosa al 2.404% p/v. Realizando la corrección de las concentraciones por la dilución se obtiene.

$$[Fructuosa]_f = \frac{2.404 \% p/v}{0.30} = 8.01\% p/v$$

La concentración de sacarosa para todas las demás fermentaciones fue determinada de la misma manera.

Cálculo 16. Crecimiento del microorganismo *Rhizopus oryzae* para la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

El crecimiento del microorganismo (*C.M*) durante la fermentación se determinó conociendo la cantidad de inóculo utilizada, así como el peso seco de la biomasa al de la fermentación. La cantidad de inóculo en este caso fue de 1.683 g, que poseía una humedad de 0.957 g agua por gramo de inóculo. El peso seco se determina conociendo la masa de papel aluminio (0.230 g) utilizado para introducir la biomasa al horno, así como el peso ambos (1.708 g), del papel aluminio y la biomasa, al finalizar el secado.

$$C.M = Biomasa - Inóculo Base Seca$$

$$Biomasa = 1.708 \text{ g} - 0.230 \text{ g} = 1.478 \text{ g}$$

$$Inóculo Base Seca = Inóculo \left(1 - \overline{Humedad}_{Inóculo}\right)$$

$$Inóculo Base Seca = 1.683 \text{ g} \left(1 - \frac{0.957 \text{ g agua}}{1 \text{ g inóculo}}\right) = 0.072 \text{ g}$$

$$C.M = 1.478 \text{ g} - 0.072 \text{ g} = 1.406 \text{ g}$$

El crecimiento del microorganismo fue determinado de igual manera para todas las fermentaciones realizadas.

Cálculo 17. Consumo de sacarosa durante la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

El consumo de sacarosa (*C.S*) es la diferencia entre la cantidad inicial y final de sacarosa en el medio. La cantidad inicial de sacarosa se calcula con el volumen (V_{caldo}) y la concentración de sacarosa ($[Sacarosa]_0$) del caldo de melaza usado para esta fermentación. La cantidad final de sacarosa se calcula con el volumen del fermentado (V_{fer}) y su concentración final de sacarosa ($[Sacarosa]_f$).

$$C.S = V_{caldo}[Sacarosa]_0 - V_{fer}[Sacarosa]_f$$

Sustituyendo valores

$$C.S = (75 \text{ ml})(20.62 \% p/v) - (90 \text{ ml})(1.38 \% p/v)$$

El porcentaje peso volumen es la cantidad en masa por cada 100 ml, entonces se obtiene.

$$C.S = (75 \text{ ml}) \left(\frac{20.62 \text{ g}}{100 \text{ ml}}\right) - (90 \text{ ml}) \left(\frac{1.38 \text{ g}}{100 \text{ ml}}\right) = 14.218 \text{ g sacarosa}$$

Los consumos de sacarosa para todas las demás fermentaciones fueron calculados de la misma manera.

Cálculo 18. Consumo de glucosa durante la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

El consumo de glucosa ($C.G$) es la diferencia entre la cantidad inicial y final de glucosa en el medio. La cantidad inicial de glucosa se calcula con el volumen (V_{caldo}) y la concentración de glucosa ($[Glucosa]_0$) del caldo de melaza usado para esta fermentación. La cantidad final de glucosa se calcula con el volumen del fermentado (V_{fer}) y su concentración final de glucosa ($[Glucosa]_f$).

$$C.G = V_{caldo}[Glucosa]_0 - V_{fer}[Glucosa]_f$$

Sustituyendo valores

$$C.G = (75 \text{ ml})(11.67 \% p/v) - (90 \text{ ml})(5.33 \% p/v)$$

El porcentaje peso volumen es la cantidad en masa por cada 100 ml, entonces se obtiene.

$$C.G = (75 \text{ ml})\left(\frac{11.67 \text{ g}}{100 \text{ ml}}\right) - (90 \text{ ml})\left(\frac{5.33 \text{ g}}{100 \text{ ml}}\right) = 3.958 \text{ g glucosa}$$

Los consumos de glucosa para todas las demás fermentaciones fueron calculados de la misma manera.

Cálculo 19. Consumo de fructuosa durante la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

El consumo de fructuosa ($C.F$) es la diferencia entre la cantidad inicial y final de fructuosa en el medio. La cantidad inicial de fructuosa se calcula con el volumen (V_{caldo}) y la concentración de fructuosa ($[Fructuosa]_0$) del caldo de melaza usado para esta fermentación. La cantidad final de fructuosa se calcula con el volumen del fermentado (V_{fer}) y su concentración final de fructuosa ($[Fructuosa]_f$).

$$C.F = V_{caldo}[Fructuosa]_0 - V_{fer}[Fructuosa]_f$$

Sustituyendo valores

$$C.F = (75 \text{ ml})(10.58 \% p/v) - (90 \text{ ml})(8.01 \% p/v)$$

El porcentaje peso volumen es la cantidad en masa por cada 100 ml, entonces se obtiene.

$$C.F = (75 \text{ ml})\left(\frac{10.58 \text{ g}}{100 \text{ ml}}\right) - (90 \text{ ml})\left(\frac{8.01 \text{ g}}{100 \text{ ml}}\right) = 0.725 \text{ g fructuosa}$$

Los consumos de fructuosa para todas las demás fermentaciones fueron calculados de la misma manera.

Cálculo 20. Cantidad másica producida de ácido láctico durante la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

La cantidad másica de ácido láctico ($Ac.L$) producido durante la fermentación se calcula con la concentración de ácido láctico obtenida en la fermentación ($[Ácido Láctico]$), el volumen del fermentado (V_{fer}) y la densidad del compuesto ($\rho_{Ac.L}$).

$$Ac.L = V_{fer}[Ácido Láctico]\rho_{Ac.L}$$

Sustituyendo valores

$$Ac.L = (90 \text{ ml})(2.377 \% v/v)(1.2 \text{ g/ml}) = 2.57 \text{ g ácido láctico}$$

Las cantidades másicas producidas de ácido láctico para todas las demás fermentaciones fueron calculadas de la misma manera.

Cálculo 21. Cantidad másica producida de etanol durante la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

La cantidad másica de etanol (Et) producido durante la fermentación se calcula con la concentración de etanol obtenida en la fermentación ($[Etanol]$), el volumen del fermentado (V_{fer}) y la densidad del compuesto (ρ_{Et}).

$$Et = V_{fer}[Etanol]\rho_{Et}$$

Sustituyendo valores

$$Et = (90 \text{ ml})(3.703 \% v/v)(0.789 \text{ g/ml}) = 2.63 \text{ g etanol}$$

Las cantidades másicas producidas de etanol para todas las demás fermentaciones fueron calculadas de la misma manera.

Cálculo 22. Cantidad másica producida de ácido acético durante la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

La cantidad másica de ácido acético ($Ac.A$) producido durante la fermentación se calcula con la concentración de ácido acético obtenida en la fermentación ($[Ácido Acético]$), el volumen del fermentado (V_{fer}) y la densidad del compuesto ($\rho_{Ac.A}$).

$$Ac.A = V_{fer}[Ácido Acético]\rho_{Ac.A}$$

Sustituyendo valores

$$Ac.A = (90 \text{ ml})(1.008 \% v/v)(1.05 \text{ g/ml}) = 0.95 \text{ g ácido acético}$$

Las cantidades másicas producidas de ácido acético para todas las demás fermentaciones fueron calculadas de la misma manera.

Cálculo 23. Estimación de la cantidad CO₂ y otros compuestos no cuantificados, producida durante la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

Haciendo un balance de masa sobre la fermentación se obtiene la siguiente expresión.

$$Masa\ Inicial = Masa\ Final$$

$$Masa\ Inicial = Sustrato\ Inicio + Inóculo\ Base\ Seca$$

$$Masa\ Final = Sustrato\ Final + Biomasa + Compuestos\ Cuantificados + CO_2\ y\ Otros$$

$$Sustrato\ Inicio + Inóculo\ Base\ Seca$$

$$= Sustrato\ Final + Biomasa + Compuestos\ Cuantificados + CO_2\ y\ Otros$$

Como el crecimiento del microorganismo es la resta entre la biomasa y el inóculo en base seca, se puede reescribir la expresión como.

$$Sustrato\ Inicio = Sustrato\ Final + (Biomasa - Inóculo\ Base\ Seca)$$

$$+ Compuestos\ Cuantificados + CO_2\ y\ Otros$$

$$Sustrato\ Inicio = Sustrato\ Final + C.M + Compuestos\ Cuantificados + CO_2\ y\ Otros$$

Despejando para estimar la cantidad producida de CO₂ y otros compuestos no cuantificados.

$$CO_2\ y\ otros = Sustrato\ Inicio - Sustrato\ Final - C.M - Compuestos\ Cuantificados$$

La resta entre el sustrato al inicio y el sustrato final es el sustrato consumido

$$Sustrato\ Inicio - Sustrato\ Final = Sustrato\ Consumido$$

$$CO_2\ y\ otros = Sustrato\ Consumido - C.M - Compuestos\ Cuantificados$$

En este caso, es el consumo de sacarosa (C.S), consumo de glucosa (C.G), consumo de fructuosa (C.F).

$$Sustrato\ Consumido$$

$$= Sacarosa\ Inicio - Sacarosa\ Final + Glucosa\ Inicio - Glucosa\ Final$$

$$+ Fructuosa\ Inicio - Fructuosa\ Final$$

$$Sustrato\ consumido = C.S + C.G + C.F$$

$$CO_2\ y\ otros = C.S + C.G + C.F - C.M - Compuestos\ Cuantificados$$

Los compuestos cuantificados son la suma de las cantidades másicas producidas de ácido láctico (Ac.L), etanol (Et) y ácido acético (Ac.A).

$$Compuestos\ Cuantificados = Ac.L + Et + Ac.A$$

$$CO_2\ y\ otros = C.S + C.G + C.F - C.M - (Ac.L + Et + Ac.A)$$

$$CO_2\ y\ otros = C.S + C.G + C.F - C.M - Ac.L - Et - Ac.A$$

Sustituyendo los valores correspondientes y operando.

$$CO_2 \text{ y otros} = 14.218g + 3.958g + 0.725g - 1.406g - 2.57g - 2.63g - 0.95g$$

$$CO_2 \text{ y otros} = 11.34g$$

La cantidad de CO_2 y otros compuestos no analizados para todas las demás fermentaciones fue estimada de la misma manera.

Cálculo 24. Conversión estimada de sustrato a ácido láctico para la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

Conociendo la cantidad másica de ácido láctico producido ($Ac.L$), así como los consumos de sacarosa ($C.S$), glucosa ($C.G$) y fructuosa ($C.F$) se puede conocer la conversión ($Y_{Ac.L}$) en términos másicos de sustrato a ácido láctico de la siguiente manera.

$$Y_{Ac.L} = \frac{Ac.L}{C.S + C.G + C.F} = \frac{2.57g}{14.218g + 3.958g + 0.725g} = 0.136g \text{ ácido láctico/g sustrato}$$

La conversión de sustrato a ácido láctico para todas las demás fermentaciones fue determinada de la misma manera.

Cálculo 25. Conversión estimada de sustrato a etanol para la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

Conociendo la cantidad másica de etanol producido (Et), así como los consumos de sacarosa ($C.S$), glucosa ($C.G$) y fructuosa ($C.F$) se puede conocer la conversión (Y_{Et}) en términos másicos de sustrato a etanol de la siguiente manera.

$$Y_{Et} = \frac{Et}{C.S + C.G + C.F} = \frac{2.63g}{14.218g + 3.958g + 0.725g} = 0.139g \text{ etanol/g sustrato}$$

La conversión de sustrato a etanol para todas las demás fermentaciones fue determinada de la misma manera.

Cálculo 26. Conversión estimada de sustrato a ácido acético para la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

Conociendo la cantidad másica de ácido acético producido ($Ac.A$), así como los consumos de sacarosa ($C.S$), glucosa ($C.G$) y fructuosa ($C.F$) se puede conocer la conversión ($Y_{Ac.A}$) en términos másicos de sustrato a ácido acético de la siguiente manera.

$$Y_{Ac.A} = \frac{Ac.A}{C.S + C.G + C.F} = \frac{0.95g}{14.218g + 3.958g + 0.725g} = 0.050g \text{ ácido acético/g sustrato}$$

La conversión de sustrato a ácido acético para todas las demás fermentaciones fue determinada de la misma manera.

Cálculo 27. Conversión estimada de sustrato a CO₂ y otros compuestos para la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

Conociendo la cantidad másica de CO₂ y otros compuestos producida (*CO₂ y otros*), así como los consumos de sacarosa (*C.S*), glucosa (*C.G*) y fructuosa (*C.F*) se puede conocer la conversión (*Y_{CO₂Otros}*) en términos másicos de sustrato a ácido acético de la siguiente manera.

$$Y_{CO_2Otros} = \frac{CO_2 \text{ y otros}}{C.S + C.G + C.F} = \frac{11.34 \text{ g}}{14.218\text{g} + 3.958\text{g} + 0.725\text{g}} = 0.600 \text{ g } CO_2 \text{ y otros/g sustrato}$$

La conversión de sustrato a CO₂ y otros compuestos para todas las demás fermentaciones fue determinada de la misma manera.

Cálculo 28. Porcentaje de humedad promedio del inóculo de *Rhizopus oryzae*.

Contando con 6 datos para la humedad del inóculo se determinó la humedad promedio del inóculo utilizado haciendo uso de la definición del promedio aritmético.

$$\overline{Humedad}_{Inóculo} = \frac{0.946 + 0.951 + 0.972 + 0.962 + 0.957 + 0.956}{6} \frac{\text{g agua}}{1\text{g inóculo}}$$

Operando se obtiene

$$\overline{Humedad}_{Inóculo} = \frac{0.957 \text{ g agua}}{1\text{g inóculo}}$$

Todos los demás valores promedio fueron determinados de la misma manera.

C. Datos calculados

Cuadro 43. Humedad de muestras de inóculo.

Réplica	Humedad (g agua/g inóculo)
1	0.946
2	0.951
3	0.972
4	0.962
5	0.957
6	0.956
Promedio	0.957
Desviación Estándar	0.009

Cuadro 44. Concentración de azúcares presente en los caldos de melaza preparados a distintas concentraciones.

Concentración Sustrato (g melaza/L)	Concentración de azúcares (% p/v)		
	Sacarosa	Glucosa	Fructuosa
350	14.38 ± 0.10	8.78 ± 0.09	7.68 ± 0.09
433	18.42 ± 0.11	10.58 ± 0.09	9.48 ± 0.09
450	20.62 ± 0.11	11.67 ± 0.09	10.58 ± 0.09
550	24.32 ± 0.12	16.47 ± 0.10	13.17 ± 0.10

Cuadro 45. Concentración de azúcares presente en las fermentaciones utilizadas para generar los modelos estadísticos.

Fermentación	Réplica	Concentración de azúcares (% p/v)		
		Sacarosa	Glucosa	Fructuosa
-1,-1,0	1	1.38 ± 0.02	5.33 ± 0.02	8.01 ± 0.03
-1,-1,0	2	2.11 ± 0.02	6.46 ± 0.03	8.06 ± 0.03
-1,0,-1	1	1.28 ± 0.02	4.85 ± 0.02	5.92 ± 0.02
-1,0,-1	2	1.46 ± 0.02	5.20 ± 0.02	6.07 ± 0.02
-1,0,1	1	5.24 ± 0.02	8.41 ± 0.03	9.36 ± 0.03
-1,0,1	2	7.03 ± 0.03	7.68 ± 0.03	8.62 ± 0.03
-1,1,0	1	13.24 ± 0.04	4.85 ± 0.02	4.98 ± 0.02
-1,1,0	2	13.15 ± 0.04	1.46 ± 0.02	2.27 ± 0.02
0,-1,-1	1	0.73 ± 0.02	6.14 ± 0.02	5.66 ± 0.02
0,-1,-1	2	0.61 ± 0.02	6.40 ± 0.03	5.64 ± 0.02
0,-1,1	1	6.97 ± 0.03	8.19 ± 0.03	7.93 ± 0.03
0,-1,1	2	5.82 ± 0.02	8.52 ± 0.03	8.31 ± 0.03
0,0,0	1	1.74 ± 0.02	7.73 ± 0.03	7.72 ± 0.03
0,0,0	2	2.45 ± 0.02	7.36 ± 0.03	8.76 ± 0.03
0,0,0	3	1.76 ± 0.02	7.03 ± 0.03	8.58 ± 0.03
0,0,0	4	1.62 ± 0.02	7.47 ± 0.03	7.71 ± 0.03
0,0,0	5	1.48 ± 0.02	6.68 ± 0.03	8.44 ± 0.03
0,0,0	6	1.53 ± 0.02	6.74 ± 0.03	8.27 ± 0.03
0,1,-1	1	10.91 ± 0.04	4.72 ± 0.02	2.69 ± 0.02
0,1,-1	2	9.90 ± 0.03	5.01 ± 0.02	2.86 ± 0.02
0,1,1	1	17.42 ± 0.05	4.93 ± 0.02	4.25 ± 0.02
0,1,1	2	17.69 ± 0.06	5.99 ± 0.02	4.82 ± 0.02
1,-1,0	1	6.48 ± 0.03	5.91 ± 0.02	5.05 ± 0.02
1,-1,0	2	7.56 ± 0.03	3.29 ± 0.02	3.11 ± 0.02
1,0,-1	1	2.93 ± 0.02	5.91 ± 0.02	5.72 ± 0.02
1,0,-1	2	2.20 ± 0.02	6.38 ± 0.03	5.92 ± 0.02
1,0,1	1	12.30 ± 0.04	1.32 ± 0.02	2.33 ± 0.02
1,0,1	2	10.48 ± 0.04	3.39 ± 0.02	3.41 ± 0.02
1,1,0	1	7.83 ± 0.03	1.43 ± 0.02	0.35 ± 0.02
1,1,0	2	8.24 ± 0.03	1.68 ± 0.02	0.33 ± 0.02

Cuadro 46. Concentración de productos de fermentación presente en las fermentaciones utilizadas para generar los modelos estadísticos.

Fermentación	Réplica	Concentración de productos de fermentación (% v/v)		
		Ácido Láctico	Etanol	Ácido Acético
-1,-1,0	1	2.377 ± 0.011	3.703 ± 0.014	1.008 ± 0.009
-1,-1,0	2	2.163 ± 0.011	2.527 ± 0.011	1.033 ± 0.009
-1,0,-1	1	1.807 ± 0.010	2.482 ± 0.011	1.005 ± 0.009
-1,0,-1	2	1.758 ± 0.010	2.450 ± 0.011	0.992 ± 0.009
-1,0,1	1	1.410 ± 0.009	1.697 ± 0.010	1.482 ± 0.009
-1,0,1	2	1.423 ± 0.009	1.643 ± 0.010	1.448 ± 0.009
-1,1,0	1	1.478 ± 0.009	0.175 ± 0.008	1.532 ± 0.010
-1,1,0	2	1.508 ± 0.009	0.213 ± 0.008	1.537 ± 0.010
0,-1,-1	1	4.632 ± 0.016	1.353 ± 0.009	0.788 ± 0.009
0,-1,-1	2	4.078 ± 0.015	1.340 ± 0.009	0.760 ± 0.009
0,-1,1	1	1.982 ± 0.010	1.458 ± 0.009	2.112 ± 0.010
0,-1,1	2	0.907 ± 0.009	1.305 ± 0.009	2.080 ± 0.010
0,0,0	1	1.190 ± 0.009	2.322 ± 0.011	1.200 ± 0.009
0,0,0	2	1.292 ± 0.009	2.205 ± 0.011	1.233 ± 0.009
0,0,0	3	1.395 ± 0.009	2.117 ± 0.010	1.165 ± 0.009
0,0,0	4	1.545 ± 0.010	2.682 ± 0.012	1.250 ± 0.009
0,0,0	5	2.407 ± 0.011	2.613 ± 0.011	1.207 ± 0.009
0,0,0	6	2.375 ± 0.011	2.368 ± 0.011	1.172 ± 0.009
0,1,-1	1	0.982 ± 0.009	-----	1.052 ± 0.009
0,1,-1	2	0.962 ± 0.009	-----	1.088 ± 0.009
0,1,1	1	1.445 ± 0.009	-----	1.707 ± 0.010
0,1,1	2	1.480 ± 0.009	-----	1.690 ± 0.010
1,-1,0	1	1.725 ± 0.010	-----	1.635 ± 0.010
1,-1,0	2	1.627 ± 0.010	-----	1.633 ± 0.010
1,0,-1	1	3.000 ± 0.012	0.488 ± 0.008	0.445 ± 0.008
1,0,-1	2	3.022 ± 0.012	0.565 ± 0.009	0.488 ± 0.008
1,0,1	1	1.477 ± 0.009	-----	1.667 ± 0.010
1,0,1	2	1.565 ± 0.010	-----	1.717 ± 0.010
1,1,0	1	1.340 ± 0.009	-----	1.525 ± 0.010
1,1,0	2	1.357 ± 0.009	-----	1.548 ± 0.010

Cuadro 47. Concentración de azúcares presente en las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.

Fermentación	Réplica	Concentración de azúcares (% p/v)		
		Sacarosa	Glucosa	Fructuosa
AcLacMax	1	3.630 ± 0.020	6.165 ± 0.025	2.708 ± 0.019
AcLacMax	2	3.162 ± 0.019	6.301 ± 0.025	2.896 ± 0.019
AcLacMax	3	3.355 ± 0.019	6.345 ± 0.025	2.953 ± 0.019
AcLacMax	4	3.514 ± 0.020	6.113 ± 0.025	2.882 ± 0.019
AcLacMax	5	3.421 ± 0.020	6.307 ± 0.025	2.697 ± 0.019
AcLacMax	6	3.000 ± 0.019	6.468 ± 0.026	2.763 ± 0.019
AcLacMax	7	3.086 ± 0.019	6.402 ± 0.025	2.709 ± 0.019
AcLacMax	8	3.113 ± 0.019	6.467 ± 0.026	2.824 ± 0.019
EtMax	1	2.309 ± 0.018	5.576 ± 0.024	7.318 ± 0.028
EtMax	2	2.461 ± 0.018	5.420 ± 0.023	7.358 ± 0.028
EtMax	3	2.235 ± 0.018	5.569 ± 0.024	7.227 ± 0.027
EtMax	4	2.123 ± 0.018	5.451 ± 0.023	7.374 ± 0.028
EtMax	5	2.235 ± 0.018	5.485 ± 0.023	7.396 ± 0.028
EtMax	6	2.035 ± 0.018	5.51 ± 0.023	7.172 ± 0.027
EtMax	7	2.188 ± 0.018	5.843 ± 0.024	7.165 ± 0.027
EtMax	8	2.535 ± 0.018	5.889 ± 0.024	7.212 ± 0.027
AcAcMax	1	9.526 ± 0.033	8.448 ± 0.030	7.918 ± 0.032
AcAcMax	2	9.281 ± 0.032	8.626 ± 0.031	9.338 ± 0.033
AcAcMax	3	9.220 ± 0.032	8.688 ± 0.031	8.993 ± 0.032
AcAcMax	4	9.543 ± 0.033	8.509 ± 0.031	9.223 ± 0.032
AcAcMax	5	9.816 ± 0.034	8.693 ± 0.031	8.924 ± 0.032
AcAcMax	6	9.374 ± 0.033	8.630 ± 0.031	8.966 ± 0.032
AcAcMax	7	9.943 ± 0.034	8.503 ± 0.031	9.031 ± 0.032
AcAcMax	8	8.879 ± 0.031	8.792 ± 0.031	9.111 ± 0.032

Cuadro 48. Concentración de productos de fermentación presente en las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.

Fermentación	Réplica	Concentración de productos de fermentación (% v/v)		
		Ácido Láctico	Etanol	Ácido Acético
AcLacMax	1	4.983 ± 0.017	1.125 ± 0.009	0.815 ± 0.009
AcLacMax	2	4.936 ± 0.017	1.005 ± 0.009	0.812 ± 0.009
AcLacMax	3	5.111 ± 0.017	1.111 ± 0.009	0.844 ± 0.009
AcLacMax	4	5.098 ± 0.017	0.913 ± 0.009	0.853 ± 0.009
AcLacMax	5	4.871 ± 0.017	0.976 ± 0.009	0.925 ± 0.009
AcLacMax	6	5.657 ± 0.019	1.119 ± 0.009	0.804 ± 0.009
AcLacMax	7	5.375 ± 0.018	1.187 ± 0.009	0.872 ± 0.009
AcLacMax	8	5.437 ± 0.018	0.943 ± 0.009	0.88 ± 0.009
EtMax	1	2.664 ± 0.012	3.452 ± 0.013	0.959 ± 0.009
EtMax	2	2.624 ± 0.011	3.170 ± 0.013	0.907 ± 0.009
EtMax	3	2.598 ± 0.011	3.782 ± 0.014	1.132 ± 0.009
EtMax	4	2.721 ± 0.012	3.657 ± 0.014	0.906 ± 0.009
EtMax	5	2.548 ± 0.011	3.652 ± 0.014	1.043 ± 0.009
EtMax	6	2.706 ± 0.012	3.400 ± 0.013	0.925 ± 0.009
EtMax	7	2.636 ± 0.011	3.108 ± 0.013	1.243 ± 0.009
EtMax	8	2.543 ± 0.011	3.586 ± 0.014	1.072 ± 0.009
AcAcMax	1	1.135 ± 0.009	1.269 ± 0.009	2.585 ± 0.011
AcAcMax	2	0.903 ± 0.009	1.222 ± 0.009	2.594 ± 0.011
AcAcMax	3	1.117 ± 0.009	1.312 ± 0.009	2.631 ± 0.011
AcAcMax	4	0.926 ± 0.009	1.332 ± 0.009	2.613 ± 0.011
AcAcMax	5	0.903 ± 0.009	1.321 ± 0.009	2.779 ± 0.012
AcAcMax	6	1.135 ± 0.009	1.223 ± 0.009	2.677 ± 0.012
AcAcMax	7	0.906 ± 0.009	1.131 ± 0.009	2.734 ± 0.012
AcAcMax	8	0.999 ± 0.009	1.333 ± 0.009	2.675 ± 0.012

Cuadro 49. Cantidad de producto para las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.

Fermentación	Réplica	Producto (g)		
		Ácido Láctico	Etanol	Ácido Acético
AcLacMax	1	5.38 ± 0.04	0.80 ± 0.01	0.77 ± 0.01
AcLacMax	2	5.33 ± 0.03	0.71 ± 0.01	0.77 ± 0.01
AcLacMax	3	5.52 ± 0.04	0.79 ± 0.01	0.80 ± 0.01
AcLacMax	4	5.51 ± 0.04	0.65 ± 0.01	0.81 ± 0.01
AcLacMax	5	5.26 ± 0.03	0.69 ± 0.01	0.87 ± 0.01
AcLacMax	6	6.11 ± 0.04	0.79 ± 0.01	0.76 ± 0.01
AcLacMax	7	5.81 ± 0.04	0.84 ± 0.01	0.82 ± 0.01
AcLacMax	8	5.87 ± 0.04	0.67 ± 0.01	0.83 ± 0.01
EtMax	1	2.88 ± 0.02	2.45 ± 0.02	0.91 ± 0.01
EtMax	2	2.83 ± 0.02	2.25 ± 0.02	0.86 ± 0.01
EtMax	3	2.81 ± 0.02	2.69 ± 0.02	1.07 ± 0.01
EtMax	4	2.94 ± 0.02	2.60 ± 0.02	0.86 ± 0.01
EtMax	5	2.75 ± 0.02	2.59 ± 0.02	0.99 ± 0.01
EtMax	6	2.92 ± 0.02	2.41 ± 0.02	0.87 ± 0.01
EtMax	7	2.85 ± 0.02	2.21 ± 0.02	1.17 ± 0.01
EtMax	8	2.75 ± 0.02	2.55 ± 0.02	1.01 ± 0.01
AcAcMax	1	1.23 ± 0.01	0.90 ± 0.01	2.44 ± 0.02
AcAcMax	2	0.98 ± 0.01	0.87 ± 0.01	2.45 ± 0.02
AcAcMax	3	1.21 ± 0.01	0.93 ± 0.01	2.49 ± 0.02
AcAcMax	4	1.00 ± 0.01	0.95 ± 0.01	2.47 ± 0.02
AcAcMax	5	0.98 ± 0.01	0.94 ± 0.01	2.63 ± 0.02
AcAcMax	6	1.23 ± 0.01	0.87 ± 0.01	2.53 ± 0.02
AcAcMax	7	0.98 ± 0.01	0.80 ± 0.01	2.58 ± 0.02
AcAcMax	8	1.08 ± 0.01	0.95 ± 0.01	2.53 ± 0.02

Cuadro 50. Cantidad estimada de consumo de azúcares, producción de CO₂ y otros compuestos, y crecimiento de microorganismo para las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.

Fermentación	Réplica	Consumo de azúcares ($\pm 0.001g$)			CO ₂ y otros compuestos (g)	Crecimiento microorganismo (g)
		Sacarosa	Glucosa	Fructuosa		
AcLacMax	1	7.521	1.039	3.325	4.97 \pm 0.04	0.654 \pm 0.016
AcLacMax	2	7.941	0.917	3.156	5.18 \pm 0.04	0.627 \pm 0.015
AcLacMax	3	7.768	0.877	3.105	4.70 \pm 0.04	0.589 \pm 0.011
AcLacMax	4	7.625	1.086	3.169	5.16 \pm 0.04	0.427 \pm 0.014
AcLacMax	5	7.708	0.911	3.335	5.12 \pm 0.04	0.659 \pm 0.016
AcLacMax	6	8.088	0.766	3.276	4.59 \pm 0.04	0.454 \pm 0.013
AcLacMax	7	8.010	0.826	3.324	4.65 \pm 0.04	0.627 \pm 0.014
AcLacMax	8	7.986	0.767	3.221	4.63 \pm 0.04	0.571 \pm 0.012
EtMax	1	11.735	2.919	0.526	9.24 \pm 0.03	0.149 \pm 0.018
EtMax	2	11.597	3.060	0.490	9.30 \pm 0.03	0.373 \pm 0.017
EtMax	3	11.801	2.925	0.608	8.90 \pm 0.03	0.299 \pm 0.014
EtMax	4	11.901	3.032	0.476	8.35 \pm 0.03	1.071 \pm 0.016
EtMax	5	11.801	3.001	0.456	9.04 \pm 0.03	0.314 \pm 0.017
EtMax	6	11.981	2.979	0.658	9.58 \pm 0.03	0.215 \pm 0.016
EtMax	7	11.843	2.679	0.664	9.11 \pm 0.03	0.266 \pm 0.015
EtMax	8	11.531	2.637	0.622	8.60 \pm 0.03	0.366 \pm 0.015
AcAcMax	1	9.664	4.747	1.849	11.78 \pm 0.03	1.736 \pm 0.013
AcAcMax	2	9.884	4.587	1.471	13.14 \pm 0.03	0.287 \pm 0.013
AcAcMax	3	9.939	4.531	1.781	13.13 \pm 0.03	0.258 \pm 0.013
AcAcMax	4	9.649	4.692	1.574	13.03 \pm 0.02	0.295 \pm 0.011
AcAcMax	5	9.403	4.526	1.843	11.83 \pm 0.03	1.281 \pm 0.014
AcAcMax	6	9.801	4.583	1.806	12.76 \pm 0.03	0.599 \pm 0.015
AcAcMax	7	9.289	4.697	1.747	12.86 \pm 0.03	0.415 \pm 0.014
AcAcMax	8	10.247	4.437	1.675	13.22 \pm 0.03	0.289 \pm 0.014

Cuadro 51. Rendimiento de los productos para las fermentaciones utilizadas para validar los modelos estadísticos.

Fermentación	Réplica	Rendimiento de productos (g producto/1 g sustrato)		
		Ácido Láctico	Etanol	Ácido Acético
AcLacMax	1	0.428 ± 0.003	0.064 ± 0.001	0.061 ± 0.001
AcLacMax	2	0.422 ± 0.003	0.057 ± 0.001	0.061 ± 0.001
AcLacMax	3	0.445 ± 0.003	0.064 ± 0.001	0.064 ± 0.001
AcLacMax	4	0.439 ± 0.003	0.052 ± 0.001	0.064 ± 0.001
AcLacMax	5	0.417 ± 0.003	0.055 ± 0.001	0.069 ± 0.001
AcLacMax	6	0.481 ± 0.003	0.063 ± 0.001	0.060 ± 0.001
AcLacMax	7	0.455 ± 0.003	0.066 ± 0.001	0.065 ± 0.001
AcLacMax	8	0.467 ± 0.003	0.053 ± 0.001	0.066 ± 0.001
EtMax	1	0.184 ± 0.001	0.157 ± 0.001	0.058 ± 0.001
EtMax	2	0.181 ± 0.001	0.144 ± 0.001	0.055 ± 0.001
EtMax	3	0.178 ± 0.001	0.170 ± 0.001	0.068 ± 0.001
EtMax	4	0.186 ± 0.001	0.164 ± 0.001	0.054 ± 0.001
EtMax	5	0.175 ± 0.001	0.165 ± 0.001	0.063 ± 0.001
EtMax	6	0.183 ± 0.001	0.151 ± 0.001	0.055 ± 0.001
EtMax	7	0.182 ± 0.001	0.141 ± 0.001	0.075 ± 0.001
EtMax	8	0.180 ± 0.001	0.167 ± 0.001	0.066 ± 0.001
AcAcMax	1	0.068 ± 0.001	0.050 ± 0.001	0.135 ± 0.001
AcAcMax	2	0.055 ± 0.001	0.049 ± 0.001	0.138 ± 0.001
AcAcMax	3	0.067 ± 0.001	0.052 ± 0.001	0.138 ± 0.001
AcAcMax	4	0.056 ± 0.001	0.053 ± 0.001	0.139 ± 0.001
AcAcMax	5	0.055 ± 0.001	0.053 ± 0.001	0.149 ± 0.001
AcAcMax	6	0.068 ± 0.001	0.048 ± 0.001	0.141 ± 0.001
AcAcMax	7	0.055 ± 0.001	0.046 ± 0.001	0.146 ± 0.001
AcAcMax	8	0.060 ± 0.001	0.052 ± 0.001	0.140 ± 0.001

D. Análisis de error

Cálculo 29. Desviación estándar del porcentaje de humedad del inóculo de *Rhizopus oryzae*.

Contando con 6 datos (n) para la humedad del inóculo (x_i) y el promedio (\bar{x}) calculado previamente, se determinó la desviación respectiva (σ).

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Sustituyendo valores y operando.

$$\sigma = \frac{0.009 \text{ g agua}}{1 \text{ g inóculo}}$$

Todas las demás desviaciones estándar fueron determinadas de la misma manera.

Cálculo 30. Incertidumbre de la concentración de ácido láctico presente en la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

La incertidumbre de la concentración de ácido láctico ($\Delta[\text{Ácido Láctico}]$) viene dada por la incertidumbre del resultado del análisis HPLC (ΔB), la incertidumbre del balón de aforo (ΔC), y la incertidumbre de la micropipeta (ΔD). Como todas las operaciones numéricas llevadas a cabo entre estas cantidades son multiplicaciones o divisiones, la forma de calcular la incertidumbre es la siguiente.

$$\Delta[\text{Ácido Láctico}] = [\text{Ácido Láctico}] \sqrt{\left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C}{C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta D}{D}\right)^2}$$

Sustituyendo valores y operando.

$$\Delta[\text{Ácido Láctico}] = 2.377\% v/v \sqrt{\left(\frac{0.005\% v/v}{1.426\% v/v}\right)^2 + \left(\frac{0.025 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{0.010 \text{ ml}}{6 \text{ ml}}\right)^2} = 0.011\% v/v$$

Todas las demás incertidumbres de las concentraciones de ácido láctico para las fermentaciones fueron calculadas de la misma manera.

Cálculo 31. Incertidumbre de la concentración de etanol presente en la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

La incertidumbre de la concentración de etanol ($\Delta[Etanol]$) viene dada por la incertidumbre del resultado del análisis HPLC (ΔB), la incertidumbre del balón de aforo (ΔC), y la incertidumbre de la micropipeta (ΔD). Como todas las operaciones numéricas llevadas a cabo entre estas cantidades son multiplicaciones o divisiones, la forma de calcular la incertidumbre es la siguiente.

$$\Delta[Etanol] = [Etanol] \sqrt{\left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C}{C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta D}{D}\right)^2}$$

Sustituyendo valores y operando.

$$\Delta[Etanol] = 3.703\% v/v \sqrt{\left(\frac{0.005\% v/v}{2.222\% v/v}\right)^2 + \left(\frac{0.025 ml}{10 ml}\right)^2 + \left(\frac{0.010 ml}{6 ml}\right)^2} = 0.014\% v/v$$

Todas las demás incertidumbres de las concentraciones de etanol para las fermentaciones fueron calculadas de la misma manera.

Cálculo 32. Incertidumbre de la concentración de ácido acético presente en la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

La incertidumbre de la concentración de ácido acético ($\Delta[\acute{A}cido Ac\acute{e}tico]$) viene dada por la incertidumbre del resultado del análisis HPLC (ΔB), la incertidumbre del balón de aforo (ΔC), y la incertidumbre de la micropipeta (ΔD). Como todas las operaciones numéricas llevadas a cabo entre estas cantidades son multiplicaciones o divisiones, la forma de calcular la incertidumbre es la siguiente.

$$\Delta[\acute{A}cido Ac\acute{e}tico] = \Delta[\acute{A}cido Ac\acute{e}tico] \sqrt{\left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C}{C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta D}{D}\right)^2}$$

Sustituyendo valores y operando.

$$\Delta[\acute{A}cido Ac\acute{e}tico] = 1.008\% v/v \sqrt{\left(\frac{0.005\% v/v}{0.605\% v/v}\right)^2 + \left(\frac{0.025 ml}{10 ml}\right)^2 + \left(\frac{0.010 ml}{6 ml}\right)^2} = 0.009\% v/v$$

Todas las demás incertidumbres de las concentraciones de ácido acético para las fermentaciones fueron calculadas de la misma manera.

Cálculo 33. Incertidumbre de la concentración de sacarosa presente en el caldo de melaza con concentración de 450 g/L.

La incertidumbre de la concentración de sacarosa ($\Delta[Sacarosa]_0$) viene dada por la incertidumbre del resultado del análisis HPLC (ΔB), la incertidumbre del balón de aforo (ΔC), y la incertidumbre de la micropipeta (ΔD). Como todas las operaciones numéricas llevadas a cabo entre estas cantidades son multiplicaciones o divisiones, la forma de calcular la incertidumbre es la siguiente.

$$\Delta[Sacarosa]_0 = [Sacarosa]_0 \sqrt{\left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C}{C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta D}{D}\right)^2}$$

Sustituyendo valores y operando.

$$\Delta[Sacarosa]_0 = 20.62\% v/v \sqrt{\left(\frac{0.005\% \frac{v}{v}}{1.237\% \frac{v}{v}}\right)^2 + \left(\frac{0.04 ml}{25 ml}\right)^2 + \left(\frac{0.005 ml}{1.500 ml}\right)^2} = 0.11\% v/v$$

Todas las demás incertidumbres para las concentraciones de sacarosa en los caldos de melaza fueron determinadas de la misma manera.

Cálculo 34. Incertidumbre de la concentración de glucosa presente en el caldo de melaza con concentración de 450 g/L.

La incertidumbre de la concentración de glucosa ($\Delta[Glucosa]_0$) viene dada por la incertidumbre del resultado del análisis HPLC (ΔB), la incertidumbre del balón de aforo (ΔC), y la incertidumbre de la micropipeta (ΔD). Como todas las operaciones numéricas llevadas a cabo entre estas cantidades son multiplicaciones o divisiones, la forma de calcular la incertidumbre es la siguiente.

$$\Delta[Glucosa]_0 = [Glucosa]_0 \sqrt{\left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C}{C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta D}{D}\right)^2}$$

Sustituyendo valores y operando.

$$\Delta[Glucosa]_0 = 11.67\% v/v \sqrt{\left(\frac{0.005\% \frac{v}{v}}{0.700\% \frac{v}{v}}\right)^2 + \left(\frac{0.04 ml}{25 ml}\right)^2 + \left(\frac{0.005 ml}{1.500 ml}\right)^2} = 0.09\% v/v$$

Todas las demás incertidumbres para las concentraciones de glucosa en los caldos de melaza fueron determinadas de la misma manera.

Cálculo 35. Incertidumbre de la concentración de fructuosa presente en el caldo de melaza con concentración de 450 g/L.

La incertidumbre de la concentración de fructuosa ($\Delta[\text{Fructuosa}]_0$) viene dada por la incertidumbre del resultado del análisis HPLC (ΔB), la incertidumbre del balón de aforo (ΔC), y la incertidumbre de la micropipeta (ΔD). Como todas las operaciones numéricas llevadas a cabo entre estas cantidades son multiplicaciones o divisiones, la forma de calcular la incertidumbre es la siguiente.

$$\Delta[\text{Fructuosa}]_0 = [\text{Fructuosa}]_0 \sqrt{\left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C}{C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta D}{D}\right)^2}$$

Sustituyendo valores y operando.

$$\Delta[\text{Fructuosa}]_0 = 10.58\% v/v \sqrt{\left(\frac{0.005\% v/v}{0.635\% v/v}\right)^2 + \left(\frac{0.04\text{ ml}}{25\text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{0.005\text{ ml}}{1.500\text{ ml}}\right)^2} = 0.09\% v/v$$

Todas las demás incertidumbres para las concentraciones de fructuosa en los caldos de melaza fueron determinadas de la misma manera.

Cálculo 36. Incertidumbre de la concentración de sacarosa presente en la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

La incertidumbre de la concentración de sacarosa ($\Delta[\text{Sacarosa}]_f$) viene dada por la incertidumbre del resultado del análisis HPLC (ΔB), la incertidumbre del balón de aforo (ΔC), y la incertidumbre de la micropipeta (ΔD). Como todas las operaciones numéricas llevadas a cabo entre estas cantidades son multiplicaciones o divisiones, la forma de calcular la incertidumbre es la siguiente.

$$\Delta[\text{Sacarosa}]_f = \Delta[\text{Sacarosa}]_f \sqrt{\left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C}{C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta D}{D}\right)^2}$$

Sustituyendo valores y operando.

$$\Delta[\text{Sacarosa}]_f = 1.38\% v/v \sqrt{\left(\frac{0.005\% v/v}{0.415\% v/v}\right)^2 + \left(\frac{0.025\text{ ml}}{10\text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{0.005\text{ ml}}{3\text{ ml}}\right)^2} = 0.02\% v/v$$

Todas las demás incertidumbres para las concentraciones de sacarosa en las fermentaciones fueron determinadas de la misma manera.

Cálculo 37. Incertidumbre de la concentración de glucosa presente en la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

La incertidumbre de la concentración de glucosa ($\Delta[Glucosa]_f$) viene dada por la incertidumbre del resultado del análisis HPLC (ΔB), la incertidumbre del balón de aforo (ΔC), y la incertidumbre de la micropipeta (ΔD). Como todas las operaciones numéricas llevadas a cabo entre estas cantidades son multiplicaciones o divisiones, la forma de calcular la incertidumbre es la siguiente.

$$\Delta[Glucosa]_f = [Glucosa]_f \sqrt{\left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C}{C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta D}{D}\right)^2}$$

Sustituyendo valores y operando.

$$\Delta[Glucosa]_f = 5.33\% v/v \sqrt{\left(\frac{0.005\% v/v}{1.598\% v/v}\right)^2 + \left(\frac{0.025\text{ ml}}{10\text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{0.005\text{ ml}}{3\text{ ml}}\right)^2} = 0.02\% v/v$$

Todas las demás incertidumbres para las concentraciones de glucosa en las fermentaciones fueron determinadas de la misma manera.

Cálculo 38. Incertidumbre de la concentración de fructuosa presente en la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

La incertidumbre de la concentración de fructuosa ($\Delta[Fructuosa]_f$) viene dada por la incertidumbre del resultado del análisis HPLC (ΔB), la incertidumbre del balón de aforo (ΔC), y la incertidumbre de la micropipeta (ΔD). Como todas las operaciones numéricas llevadas a cabo entre estas cantidades son multiplicaciones o divisiones, la forma de calcular la incertidumbre es la siguiente.

$$\Delta[Fructuosa]_f = [Fructuosa]_f \sqrt{\left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C}{C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta D}{D}\right)^2}$$

Sustituyendo valores y operando.

$$\Delta[Fructuosa]_f = 8.01\% v/v \sqrt{\left(\frac{0.005\% v/v}{2.404\% v/v}\right)^2 + \left(\frac{0.025\text{ ml}}{10\text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{0.005\text{ ml}}{3\text{ ml}}\right)^2} = 0.03\% v/v$$

Todas las demás incertidumbres para las concentraciones de fructuosa en las fermentaciones fueron determinadas de la misma manera.

Cálculo 39. Incertidumbre del crecimiento del microorganismo *Rhizopus oryzae* durante la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

El crecimiento del microorganismo ($\Delta C.M$) fue calculado de la siguiente manera.

$$C.M = Biomasa - Inóculo Base Seca$$

Se observa que la incertidumbre del microorganismo se calcula como la incertidumbre de una resta.

$$\Delta C.M = \sqrt{\Delta Biomasa^2 + \Delta Inóculo Base Seca^2}$$

Donde la incertidumbre de la biomasa es la incertidumbre de la balanza semi analítica y la incertidumbre del inóculo se calcula de la siguiente manera.

$$Inóculo Base Seca = Inóculo(1 - \overline{Humedad}_{Inóculo}) = Inóculo - Inóculo(\overline{Humedad}_{Inóculo})$$

$$\Delta Inóculo Base Seca = \sqrt{\Delta Inóculo^2 + \Delta A^2}$$

Donde

$$A = Inóculo(\overline{Humedad}_{Inóculo})$$

$$\Delta A = A \sqrt{\left(\frac{\Delta Inóculo}{Inóculo}\right)^2 + \left(\frac{\sigma}{\overline{Humedad}_{Inóculo}}\right)^2}$$

$$\Delta A = (1.683 \text{ g})(0.957) \sqrt{\left(\frac{0.001 \text{ g}}{1.683 \text{ g}}\right)^2 + \left(\frac{0.009}{0.957}\right)^2} = 0.015$$

Sustituyendo valores y operando para determinar la incertidumbre del inóculo en base seca.

$$\Delta Inóculo Base Seca = \sqrt{(0.001 \text{ g})^2 + (0.015)^2} = 0.015 \text{ g}$$

Sustituyendo valores y operando para determinar la incertidumbre del crecimiento del microorganismo.

$$\Delta C.M = \sqrt{(0.001 \text{ g})^2 + (0.015)^2} = 0.015 \text{ g}$$

Todas las incertidumbres en el crecimiento del microorganismo fueron determinadas de la misma manera.

Cálculo 40. Incertidumbre del consumo de sacarosa durante la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

El consumo de sacarosa fue calculado de la siguiente manera.

$$C.S = V_{caldo}[Sacarosa]_0 - V_{fer}[Sacarosa]_f$$

La incertidumbre del consumo de sacarosa se calcula como la incertidumbre de una resta de dos factores.

$$\Delta C.S = \sqrt{\Delta A^2 + \Delta B^2}$$

Donde

$$A = V_{caldo}[Sacarosa]_0$$

$$B = V_{fer}[Sacarosa]_f$$

La incertidumbre de A y B se calculan como la incertidumbre de una multiplicación, de la siguiente manera.

$$\Delta A = A \sqrt{\left(\frac{\Delta V_{caldo}}{V_{caldo}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta[Sacarosa]_0}{[Sacarosa]_0}\right)^2}$$

$$\Delta B = B \sqrt{\left(\frac{\Delta V_{fer}}{V_{fer}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta[Sacarosa]_f}{[Sacarosa]_f}\right)^2}$$

Sustituyendo valores y operando para conocer las incertidumbres de A y B.

$$\Delta A = (75 \text{ ml}) \left(\frac{20.617 \text{ g}}{100 \text{ ml}}\right) \sqrt{\left(\frac{0.5 \text{ ml}}{75 \text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{0.11\% \text{ p/v}}{20.62\% \text{ p/v}}\right)^2}$$

$$\Delta B = (90 \text{ ml}) \left(\frac{1.383 \text{ g}}{100 \text{ ml}}\right) \sqrt{\left(\frac{0.5 \text{ ml}}{90 \text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{0.02\% \text{ p/v}}{1.38\% \text{ p/v}}\right)^2}$$

$$\Delta A = 0.001 \text{ g}; \Delta B = 0.0002 \text{ g}$$

Con estos valores se determina la incertidumbre del consumo de sacarosa.

$$\Delta C.S = \sqrt{(0.001 \text{ g})^2 + (0.0002 \text{ g})^2} = 0.001 \text{ g}$$

Las incertidumbres de consumo de sacarosa para todas las demás fermentaciones fueron determinadas de la misma manera.

Cálculo 41. Incertidumbre del consumo de glucosa durante la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

El consumo de glucosa fue calculado de la siguiente manera.

$$C.G = V_{caldo}[Glucosa]_0 - V_{fer}[Glucosa]_f$$

La incertidumbre del consumo de glucosa se calcula como la incertidumbre de una resta de dos factores.

$$\Delta C.G = \sqrt{\Delta A^2 + \Delta B^2}$$

Donde

$$A = V_{caldo}[Glucosa]_0$$

$$B = V_{fer}[Glucosa]_f$$

La incertidumbre de A y B se calculan como la incertidumbre de una multiplicación, de la siguiente manera.

$$\Delta A = A \sqrt{\left(\frac{\Delta V_{caldo}}{V_{caldo}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta[Glucosa]_0}{[Glucosa]_0}\right)^2}$$

$$\Delta B = B \sqrt{\left(\frac{\Delta V_{fer}}{V_{fer}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta[Glucosa]_f}{[Glucosa]_f}\right)^2}$$

Sustituyendo valores y operando para conocer las incertidumbres de A y B.

$$\Delta A = (75 \text{ ml}) \left(\frac{11.67 \text{ g}}{100 \text{ ml}}\right) \sqrt{\left(\frac{0.5 \text{ ml}}{75 \text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{0.68\% \text{ p/v}}{11.67\% \text{ p/v}}\right)^2}$$

$$\Delta B = (90 \text{ ml}) \left(\frac{5.33 \text{ g}}{100 \text{ ml}}\right) \sqrt{\left(\frac{0.5 \text{ ml}}{90 \text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{0.02\% \text{ p/v}}{5.33\% \text{ p/v}}\right)^2}$$

$$\Delta A = 0.001 \text{ g}; \Delta B = 0.0002 \text{ g}$$

Con estos valores se determina la incertidumbre del consumo de glucosa.

$$\Delta C.G = \sqrt{(0.001 \text{ g})^2 + (0.0002 \text{ g})^2} = 0.001 \text{ g}$$

Las incertidumbres de consumo de glucosa para todas las demás fermentaciones fueron determinadas de la misma manera.

Cálculo 42. Incertidumbre del consumo de fructuosa durante la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

El consumo de fructuosa fue calculado de la siguiente manera.

$$C.F = V_{caldo}[Fructuosa]_0 - V_{fer}[Fructuosa]_f$$

La incertidumbre del consumo de fructuosa se calcula como la incertidumbre de una resta de dos factores.

$$\Delta C.F = \sqrt{\Delta A^2 + \Delta B^2}$$

Donde

$$A = V_{caldo}[Fructuosa]_0$$

$$B = V_{fer}[Fructuosa]_f$$

La incertidumbre de A y B se calculan como la incertidumbre de una multiplicación, de la siguiente manera.

$$\Delta A = A \sqrt{\left(\frac{\Delta V_{caldo}}{V_{caldo}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta [Fructuosa]_0}{[Fructuosa]_0}\right)^2}$$

$$\Delta B = B \sqrt{\left(\frac{\Delta V_{fer}}{V_{fer}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta [Fructuosa]_f}{[Fructuosa]_f}\right)^2}$$

Sustituyendo valores y operando para conocer las incertidumbres de A y B.

$$\Delta A = (75 \text{ ml}) \left(\frac{10.58 \text{ g}}{100 \text{ ml}}\right) \sqrt{\left(\frac{0.5 \text{ ml}}{75 \text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{0.61\% \text{ p/v}}{10.58\% \text{ p/v}}\right)^2}$$

$$\Delta B = (90 \text{ ml}) \left(\frac{8.01 \text{ g}}{100 \text{ ml}}\right) \sqrt{\left(\frac{0.5 \text{ ml}}{90 \text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{0.03\% \text{ p/v}}{8.01\% \text{ p/v}}\right)^2}$$

$$\Delta A = 0.46 \text{ g}; \Delta B = 0.05 \text{ g}$$

Con estos valores se determina la incertidumbre del consumo de fructuosa.

$$\Delta C.F = \sqrt{(0.001 \text{ g})^2 + (0.0003 \text{ g})^2} = 0.001 \text{ g}$$

Las incertidumbres de consumo de fructuosa para todas las demás fermentaciones fueron determinadas de la misma manera.

Cálculo 43. Incertidumbre de la cantidad másica producida de ácido láctico durante la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

La cantidad másica de ácido láctico producida durante la fermentación fue calculada de la siguiente manera.

$$Ac.L = V_{fer}[\text{Ácido Láctico}]\rho_{Ac.L}$$

La incertidumbre de la cantidad másica de ácido láctico se calcula como la incertidumbre de una multiplicación. Nótese que la densidad del ácido láctico no agrega incerteza al cálculo puesto que se toma como una constante.

$$\Delta Ac.L = Ac.L \sqrt{\left(\frac{\Delta V_{fer}}{V_{fer}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta[\text{Ácido Láctico}]}{[\text{Ácido Láctico}]}\right)^2}$$

Sustituyendo valores y operando.

$$\Delta Ac.L = (2.57 \text{ g}) \sqrt{\left(\frac{0.5 \text{ ml}}{90 \text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{0.011\% \text{ v/v}}{2.377\% \text{ v/v}}\right)^2} = 0.02 \text{ g}$$

La incertidumbre de la cantidad másica de ácido láctico para todas las demás fermentaciones fue calculada de la misma manera.

Cálculo 44. Incertidumbre de la cantidad másica producida de etanol durante la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

La cantidad másica de etanol producida durante la fermentación fue calculada de la siguiente manera.

$$Et = V_{fer}[\text{Etanol}]\rho_{Et}$$

La incertidumbre de la cantidad másica de etanol se calcula como la incertidumbre de una multiplicación. Nótese que la densidad del etanol no agrega incerteza al cálculo puesto que se toma como una constante.

$$\Delta Et = Et \sqrt{\left(\frac{\Delta V_{fer}}{V_{fer}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta[\text{Etanol}]}{[\text{Etanol}]}\right)^2}$$

Sustituyendo valores y operando.

$$\Delta Et = (2.63 \text{ g}) \sqrt{\left(\frac{0.5 \text{ ml}}{90 \text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{0.014\% \text{ v/v}}{3.703\% \text{ v/v}}\right)^2} = 0.02 \text{ g}$$

La incertidumbre de la cantidad másica de etanol para todas las demás fermentaciones fue calculada de la misma manera.

Cálculo 45. Incertidumbre de la cantidad másica producida de ácido acético durante la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

La cantidad másica de ácido acético producida durante la fermentación fue calculada de la siguiente manera.

$$Ac.A = V_{fer}[\text{Ácido Acético}]\rho_{Ac.A}$$

La incertidumbre de la cantidad másica de ácido acético se calcula como la incertidumbre de una multiplicación. Nótese que la densidad del ácido acético no agrega incerteza al cálculo puesto que se toma como una constante.

$$\Delta Ac.A = Ac.A \sqrt{\left(\frac{\Delta V_{fer}}{V_{fer}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta[\text{Ácido Acético}]}{[\text{Ácido Acético}]}\right)^2}$$

Sustituyendo valores y operando.

$$\Delta Ac.A = (0.95 \text{ g}) \sqrt{\left(\frac{0.5 \text{ ml}}{90 \text{ ml}}\right)^2 + \left(\frac{0.009\% \text{ v/v}}{1.008\% \text{ v/v}}\right)^2} = 0.01 \text{ g}$$

La incertidumbre de la cantidad másica de ácido acético para todas las demás fermentaciones fue calculada de la misma manera.

Cálculo 46. Incertidumbre de la estimación de la cantidad CO₂ y otros compuestos no cuantificados, producida durante la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

La cantidad de CO₂ y otros compuesto no cuantificados fue calculada de la siguiente manera.

$$CO_2 \text{ y otros} = C.S + C.G + C.F - C.M - Ac.L - Et - Ac.A$$

Al tratarse únicamente de sumas y restas, la forma de calcular la incertidumbre es la siguiente.

$$\Delta CO_2 \text{ y otros} = \sqrt{\Delta C.S^2 + \Delta C.G^2 + \Delta C.F^2 + \Delta C.M^2 + \Delta Ac.L^2 + \Delta Et^2 + \Delta Ac.A^2}$$

Sustituyendo valores y operando.

$$\Delta CO_2 \text{ y otros} = \sqrt{(0.001g)^2 + (0.001g)^2 + (0.001g)^2 + (0.015g)^2 + (0.02g)^2 + (0.02g)^2 + (0.01g)^2}$$

$$\Delta CO_2 \text{ y otros} = 0.03 \text{ g}$$

La incertidumbre de la estimación de CO₂ y otros compuestos no analizados para todas las demás fermentaciones fue calculada de la misma manera.

Cálculo 47. Incertidumbre de la conversión estimada de sustrato a ácido láctico para la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

La conversión de sustrato a ácido láctico fue calculada de la siguiente manera.

$$Y_{Ac.L} = \frac{Ac.L}{C.S + C.G + C.F}$$

La incertidumbre de la conversión se calcula como la incertidumbre de una multiplicación, de la siguiente manera.

$$\Delta Y_{Ac.L} = Y_{Ac.L} \sqrt{\left(\frac{\Delta Ac.L}{Ac.L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2}$$

Donde

$$B = C.S + C.G + C.F = 14.218 \text{ g} + 3.958 \text{ g} + 0.725 \text{ g} = 18.900 \text{ g}$$

La incertidumbre de B se calcula como la incertidumbre de una suma, siendo.

$$\Delta B = \sqrt{\Delta C.S^2 + \Delta C.G^2 + \Delta C.F^2} = \sqrt{(0.01 \text{ g})^2 + (0.01 \text{ g})^2 + (0.01 \text{ g})^2} = 0.02 \text{ g}$$

Sustituyendo valores y operando para calcular la incertidumbre de la conversión.

$$\Delta Y_{Ac.L} = \left(\frac{0.136 \text{ g ácido láctico}}{1 \text{ g de sustrato}}\right) \sqrt{\left(\frac{0.02 \text{ g}}{2.57 \text{ g}}\right)^2 + \left(\frac{0.002 \text{ g}}{18.900 \text{ g}}\right)^2} = \frac{0.001 \text{ g ácido láctico}}{1 \text{ g de sustrato}}$$

La incertidumbre de la conversión estimada de sustrato a ácido láctico para todas las demás fermentaciones fue calculada de la misma manera.

Cálculo 48. Incertidumbre de la conversión estimada de sustrato a etanol para la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

La conversión de sustrato a etanol fue calculada de la siguiente manera.

$$Y_{Et} = \frac{Et}{C.S + C.G + C.F}$$

La incertidumbre de la conversión se calcula como la incertidumbre de una multiplicación, de la siguiente manera.

$$\Delta Y_{Et} = Y_{Et} \sqrt{\left(\frac{\Delta Et}{Et}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2}$$

Donde

$$B = C.S + C.G + C.F = 14.218 \text{ g} + 3.958 \text{ g} + 0.725 \text{ g} = 18.900 \text{ g}$$

La incertidumbre de B se calcula como la incertidumbre de una suma, siendo.

$$\Delta B = \sqrt{\Delta C \cdot S^2 + \Delta C \cdot G^2 + \Delta C \cdot F^2} = \sqrt{(0.001 \text{ g})^2 + (0.001 \text{ g})^2 + (0.001 \text{ g})^2} = 0.002 \text{ g}$$

Sustituyendo valores y operando para calcular la incertidumbre de la conversión.

$$\Delta Y_{Et} = \left(\frac{0.139 \text{ g etanol}}{1 \text{ g de sustrato}} \right) \sqrt{\left(\frac{0.02 \text{ g}}{2.63 \text{ g}} \right)^2 + \left(\frac{0.002 \text{ g}}{18.900 \text{ g}} \right)^2} = \frac{0.01 \text{ g etanol}}{1 \text{ g de sustrato}}$$

La incertidumbre de la conversión estimada de sustrato a etanol para todas las demás fermentaciones fue calculada de la misma manera.

Cálculo 49. Incertidumbre de la conversión estimada de sustrato a ácido acético para la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

La conversión de sustrato a ácido acético fue calculada de la siguiente manera.

$$Y_{Ac.A} = \frac{Ac.A}{C.S + C.G + C.F}$$

La incertidumbre de la conversión se calcula como la incertidumbre de una multiplicación, de la siguiente manera.

$$\Delta Y_{Ac.A} = Y_{Ac.A} \sqrt{\left(\frac{\Delta Ac.A}{Ac.A} \right)^2 + \left(\frac{\Delta B}{B} \right)^2}$$

Donde

$$B = C.S + C.G + C.F = 14.218 \text{ g} + 3.958 \text{ g} + 0.725 \text{ g} = 18.900 \text{ g}$$

La incertidumbre de B se calcula como la incertidumbre de una suma, siendo.

$$\Delta B = \sqrt{\Delta C \cdot S^2 + \Delta C \cdot G^2 + \Delta C \cdot F^2} = \sqrt{(0.001 \text{ g})^2 + (0.001 \text{ g})^2 + (0.001 \text{ g})^2} = 0.002 \text{ g}$$

Sustituyendo valores y operando para calcular la incertidumbre de la conversión.

$$\Delta Y_{Ac.A} = \left(\frac{0.050 \text{ g etanol}}{1 \text{ g de sustrato}} \right) \sqrt{\left(\frac{0.01 \text{ g}}{0.95 \text{ g}} \right)^2 + \left(\frac{0.002 \text{ g}}{18.900 \text{ g}} \right)^2} = \frac{0.001 \text{ g ácido acético}}{1 \text{ g de sustrato}}$$

La incertidumbre de la conversión estimada de sustrato a ácido acético para todas las demás fermentaciones fue calculada de la misma manera.

Cálculo 49. Incertidumbre de la conversión estimada de sustrato a CO₂ y otros compuestos para la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).

La conversión de sustrato a ácido acético fue calculada de la siguiente manera.

$$Y_{Ac.A} = \frac{CO_2 \text{ y otros}}{C.S + C.G + C.F}$$

La incertidumbre de la conversión se calcula como la incertidumbre de una multiplicación, de la siguiente manera.

$$\Delta Y_{Ac.A} = Y_{Ac.A} \sqrt{\left(\frac{\Delta CO_2 \text{ y otros}}{CO_2 \text{ y otros}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2}$$

Donde

$$B = C.S + C.G + C.F = 14.218 \text{ g} + 3.958 \text{ g} + 0.725 \text{ g} = 18.900 \text{ g}$$

La incertidumbre de B se calcula como la incertidumbre de una suma, siendo.

$$\Delta B = \sqrt{\Delta C.S^2 + \Delta C.G^2 + \Delta C.F^2} = \sqrt{(0.001 \text{ g})^2 + (0.001 \text{ g})^2 + (0.001 \text{ g})^2} = 0.002 \text{ g}$$

Sustituyendo valores y operando para calcular la incertidumbre de la conversión.

$$\Delta Y_{Ac.A} = \left(\frac{0.600 \text{ g } CO_2 \text{ y otros}}{1 \text{ g de sustrato}}\right) \sqrt{\left(\frac{0.03 \text{ g}}{11.34 \text{ g}}\right)^2 + \left(\frac{0.002 \text{ g}}{18.900 \text{ g}}\right)^2} = \frac{0.002 \text{ g } CO_2 \text{ y otros}}{1 \text{ g de sustrato}}$$

La incertidumbre de la conversión estimada de sustrato a CO₂ y otros para todas las demás fermentaciones fue calculada de la misma manera.

E. Imágenes adicionales

Figura 27. Gráfica de contorno para la concentración de ácido láctico en función del pH inicial y temperatura en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

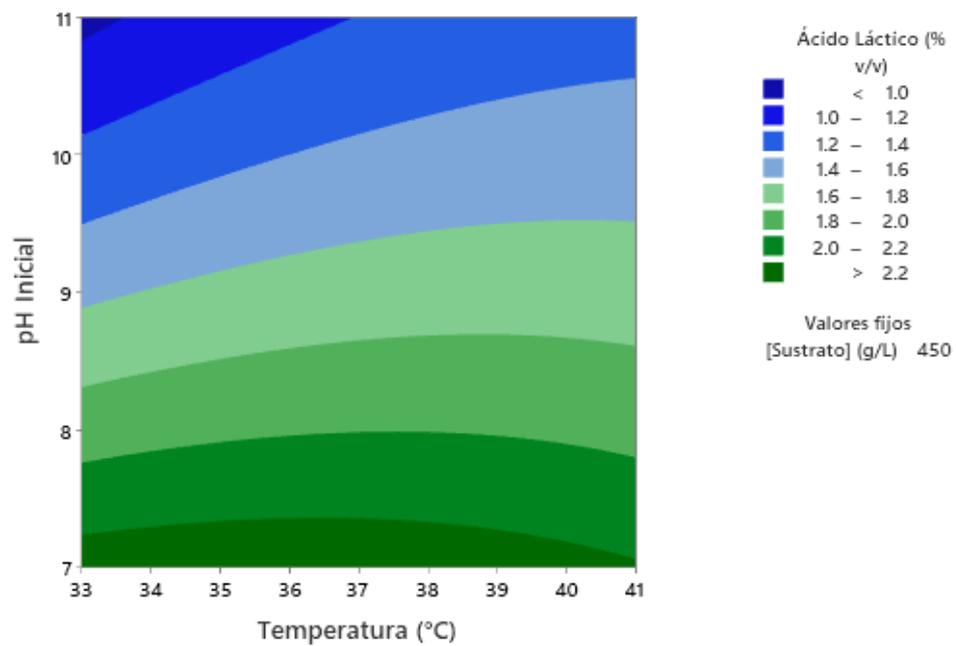


Figura 28. Gráfica de contorno para la concentración de ácido láctico en función de la concentración de sustrato y temperatura en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

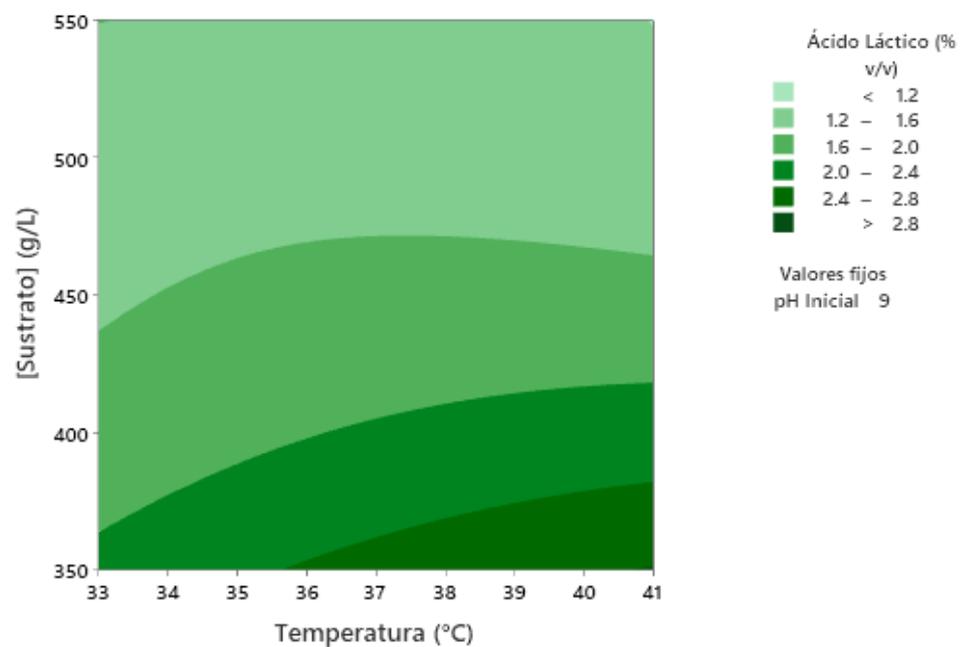


Figura 29. Gráfica de contorno para la concentración de ácido láctico en función de la concentración de sustrato y pH inicial en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

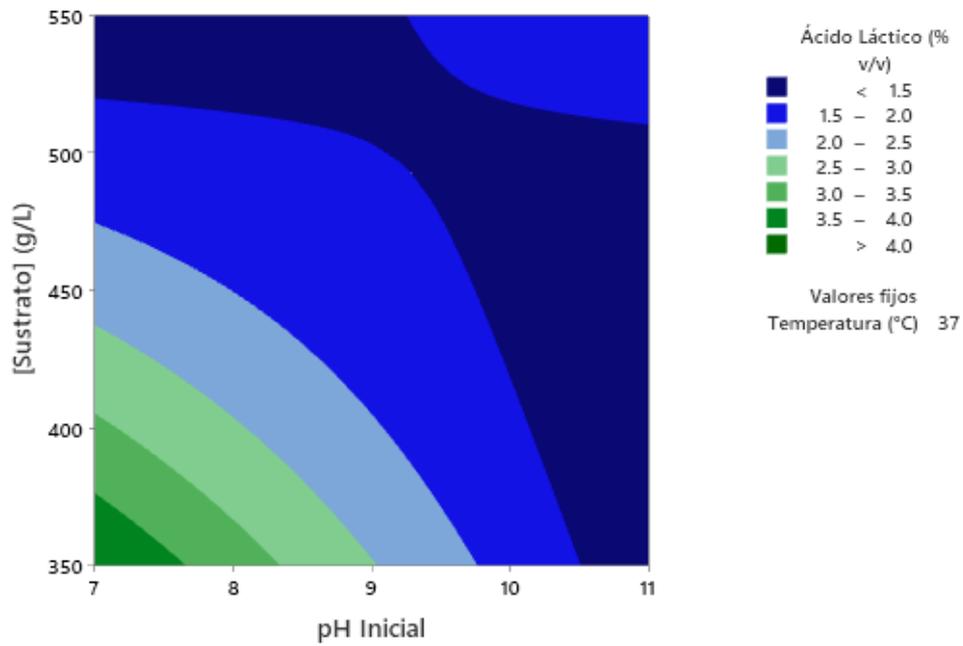


Figura 30. Gráfica de contorno para la concentración de etanol en función del pH inicial y temperatura en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

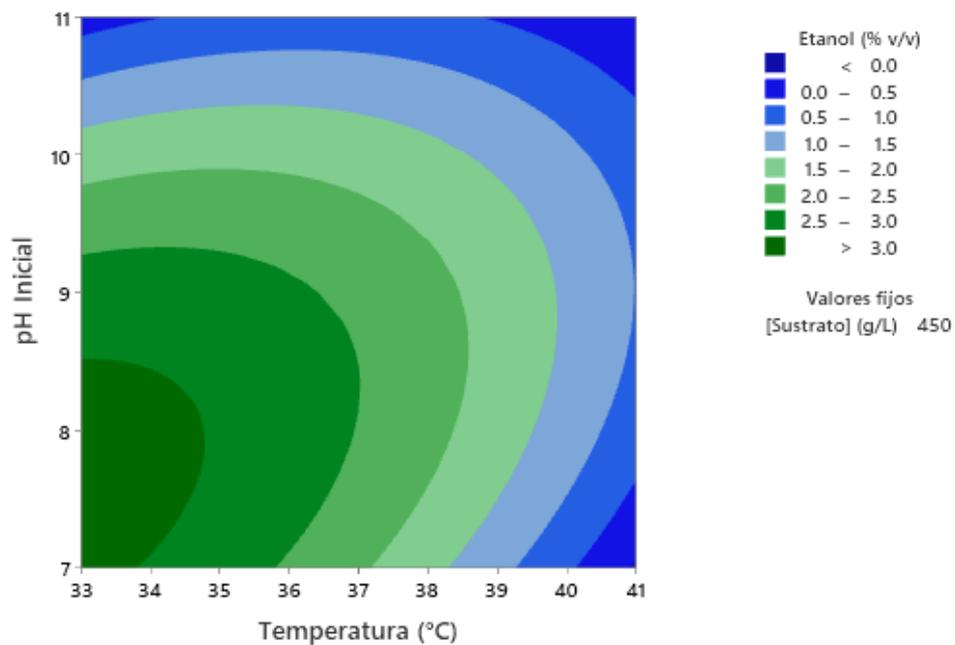


Figura 31. Gráfica de contorno para la concentración de etanol en función de la concentración de sustrato y temperatura en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

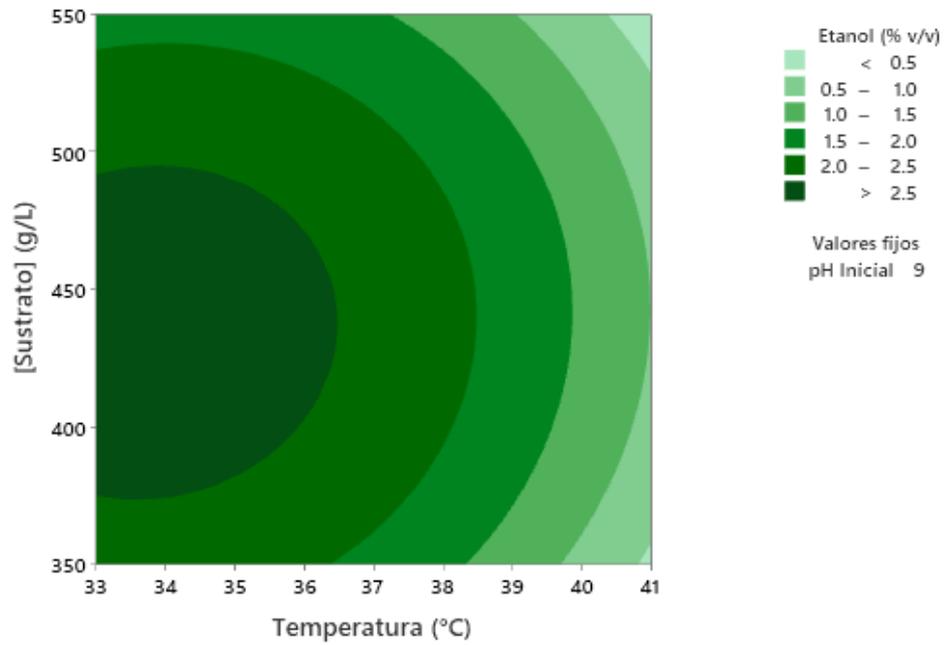


Figura 32. Gráfica de contorno para la concentración de etanol en función de la concentración de sustrato y pH inicial en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

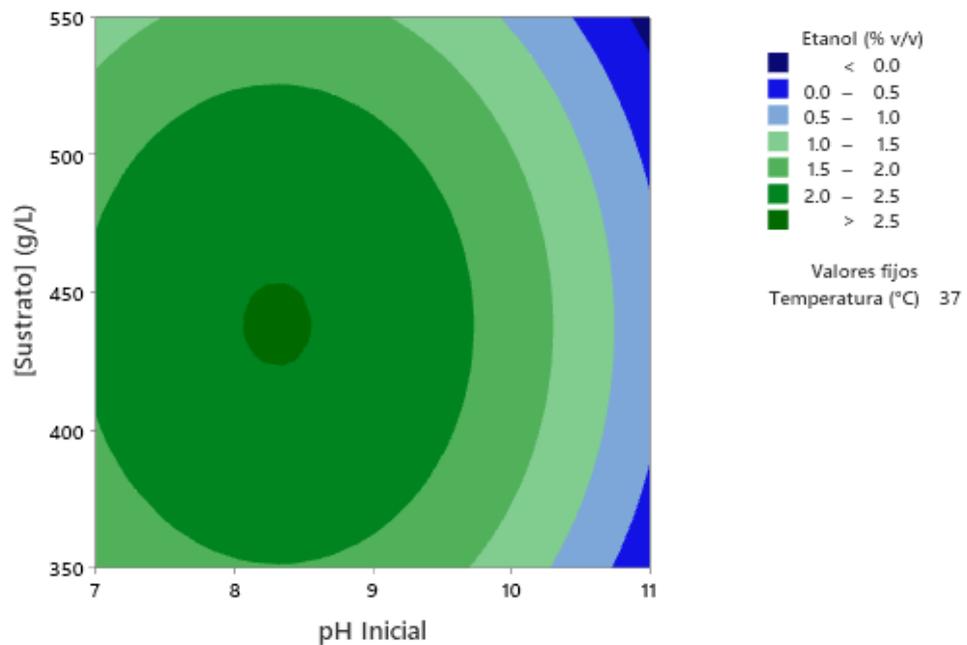


Figura 33. Gráfica de contorno para la concentración de ácido acético en función del pH inicial y temperatura en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

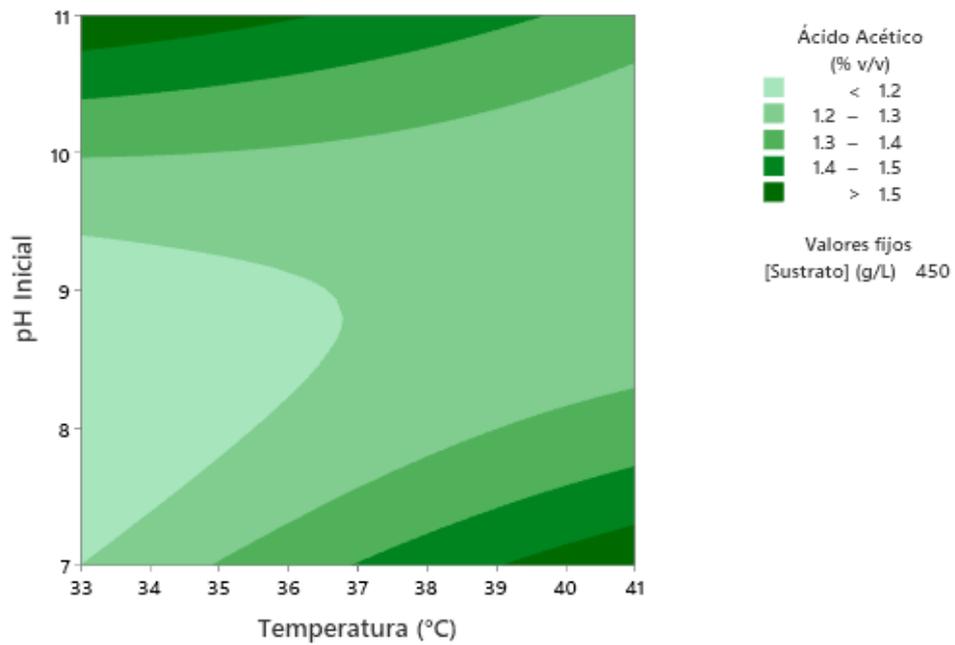


Figura 34. Gráfica de contorno para la concentración de ácido acético en función de la concentración de sustrato y temperatura en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

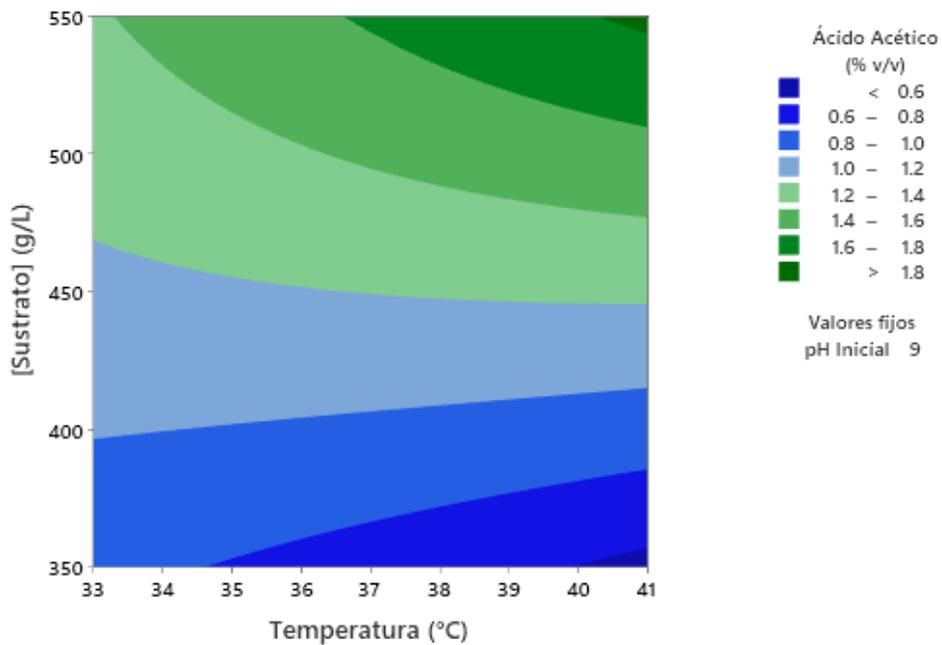


Figura 35. Gráfica de contorno para la concentración de ácido acético en función de la concentración de sustrato y pH inicial en fermentaciones de melaza con *Rhizopus oryzae*.

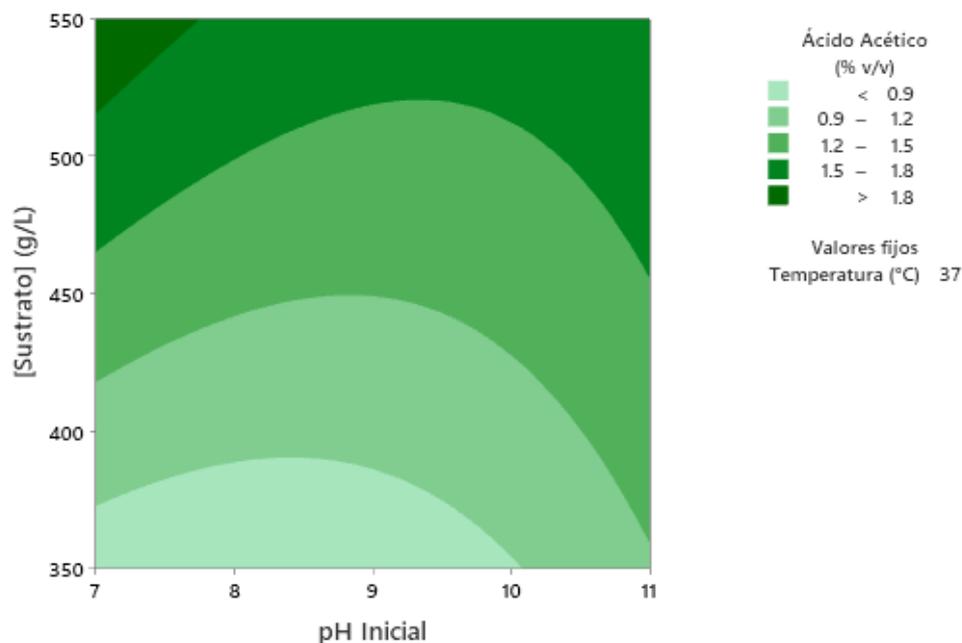


Figura 36. Ficha técnica de la melaza empleada durante la experimentación.



NUTRICIÓN ANIMAL

Melaza

DESCRIPCIÓN:

Es un producto derivado de la caña de azúcar, con olor a miel y con un color café oscuro.

Nutrientes principales: (Expresado como %)

BRIX	85.20%	
DENSIDAD	12.065	
HUMEDAD:	17.0 a 20.0%	MAX
CENIZA:	11.0%	MAX
VISCOSIDAD	Uniforme, 3,000 cps a 24°C aprox. Uniforme, 3,500 cps a 25°C aprox	

Manejo de Almacenamiento:

Manténgase en lugares frescos, secos. Alejados de fuentes de ignición, calor y luz solar directa. Se recomienda utilizar equipo de seguridad adecuado al manejar este producto, como guantes, lentes de seguridad, ropa de trabajo y botas.

Presentación:

Caneca de 5 galones, tonel de 54 galones.

Versión: 27/12/17

PBX 2502 8181
24 CALLE 19 05 ZONA 12 EL CORTIJO 3 BODEGA 926
GUATEMALA, GUATEMALA, C.A.
WEB: www.agroprocesos.sanmartin.com

Figura 37. Autoclave utilizada durante la experimentación.



Figura 38. Balanza utilizada durante la experimentación.



Figura 39. Balanza semi analítica utilizada durante la experimentación.



Figura 40. Centrífuga utilizada durante la experimentación.

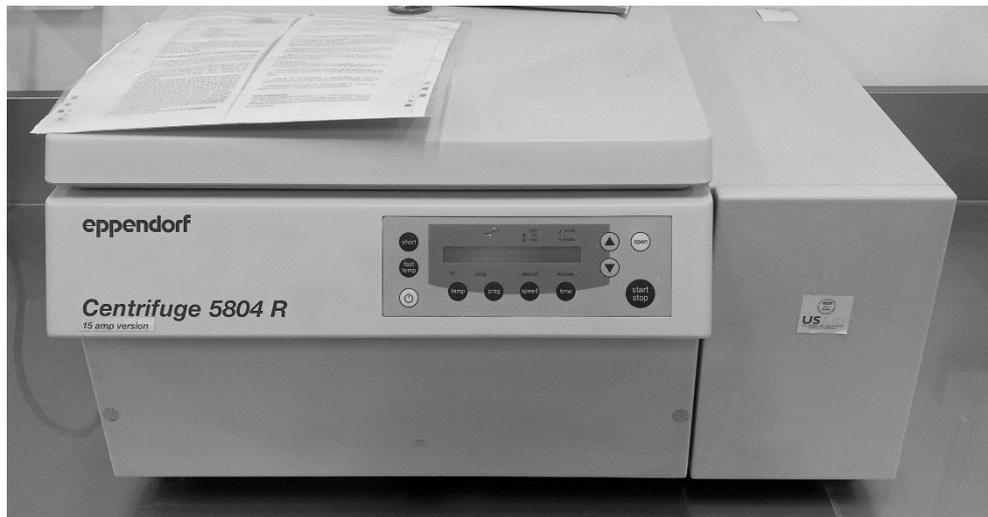


Figura 41. Estufa con agitación utilizada durante la experimentación.



Figura 42. Horno para peso seco utilizada durante la experimentación.



Figura 43. Incubadora sin agitación utilizada durante la experimentación.



Figura 44. Incubadora con agitación utilizada durante la experimentación.



Figura 45. Caja petri con *Rhizopus oryzae* sembrado en agar PDA.



Figura 46. Cromatograma HPLC de la muestra del caldo con concentración de 350 g melaza por litro, diluida al 6% v/v.

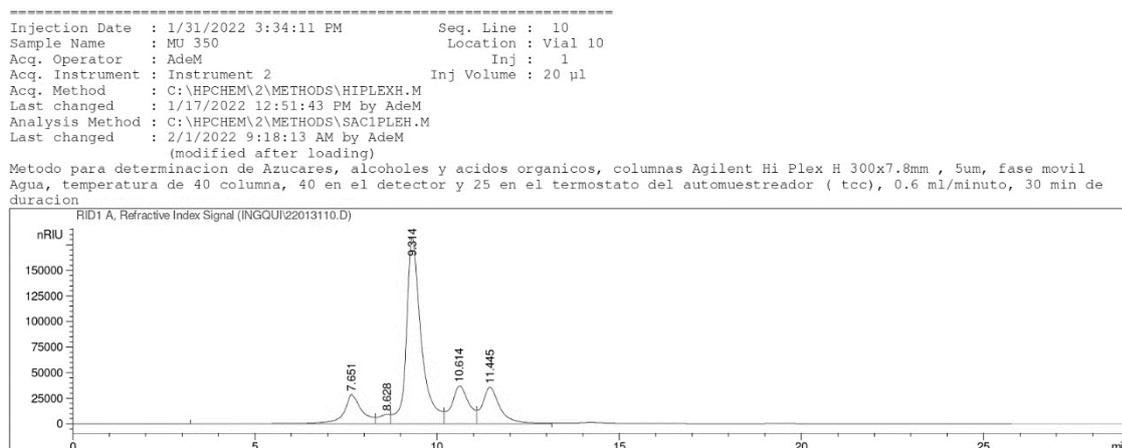


Figura 47. Cromatograma HPLC de la muestra del caldo con concentración de 433 g melaza por litro, diluida al 6% v/v.

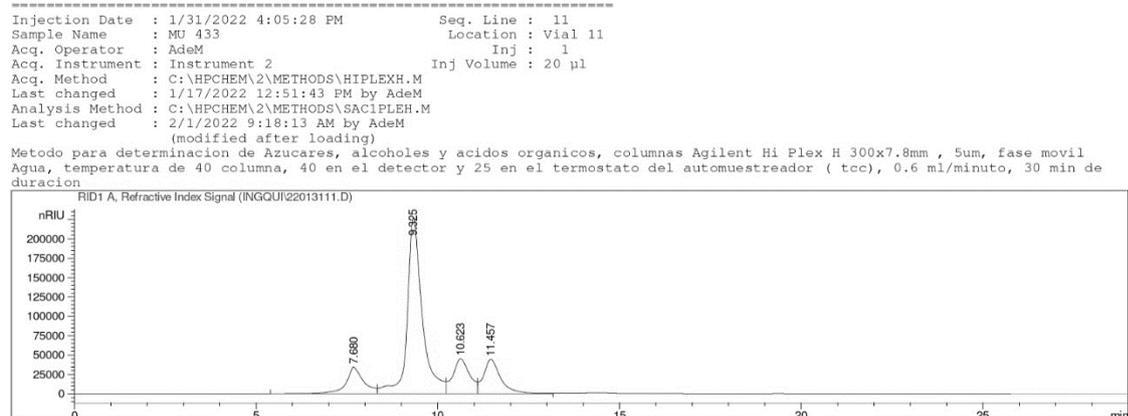


Figura 48. Cromatograma HPLC de la muestra del caldo con concentración de 450 g melaza por litro, diluida al 6% v/v.

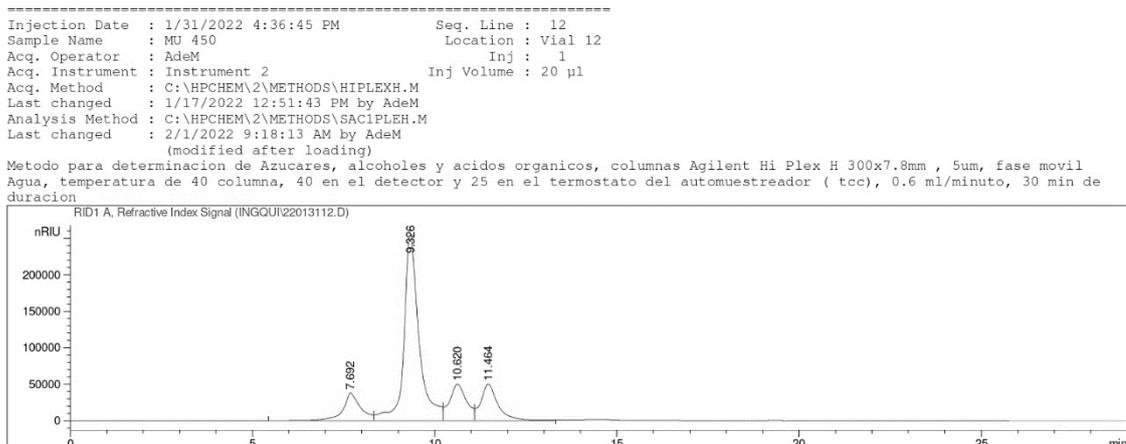


Figura 49. Cromatograma HPLC de la muestra del caldo con concentración de 550 g melaza por litro, diluida al 6% v/v.

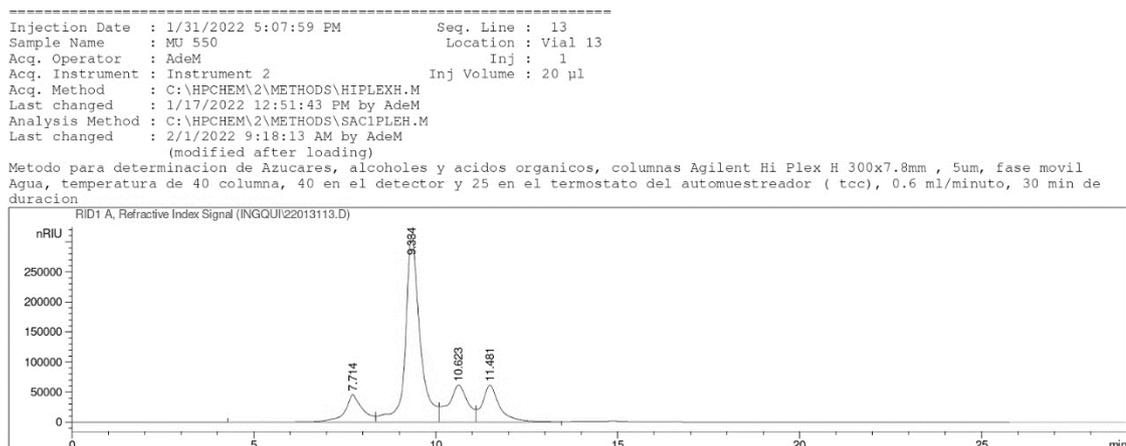


Figura 50. Cromatograma HPLC de la muestra -1,-1,0 (réplica 1) diluida al 60% v/v.

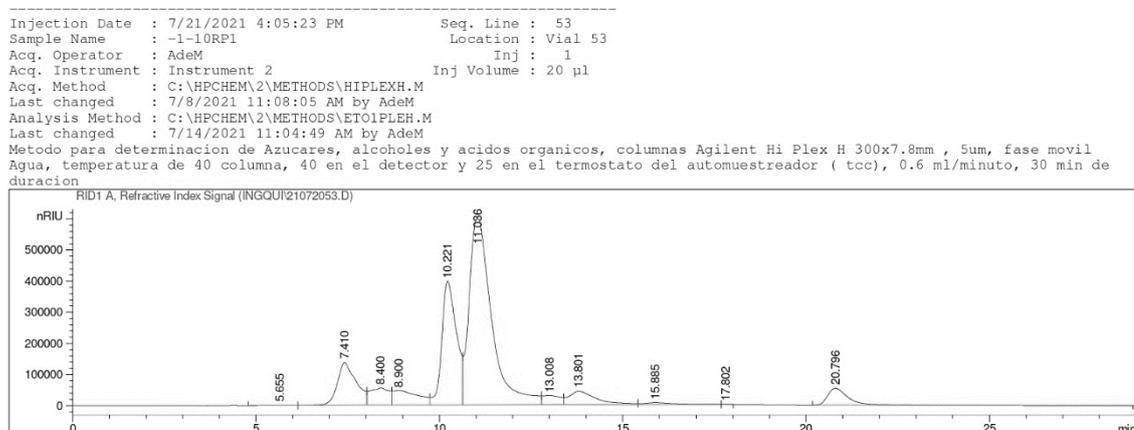


Figura 51. Cromatograma HPLC de la muestra -1,-1,0 (réplica 2) diluida al 60% v/v.

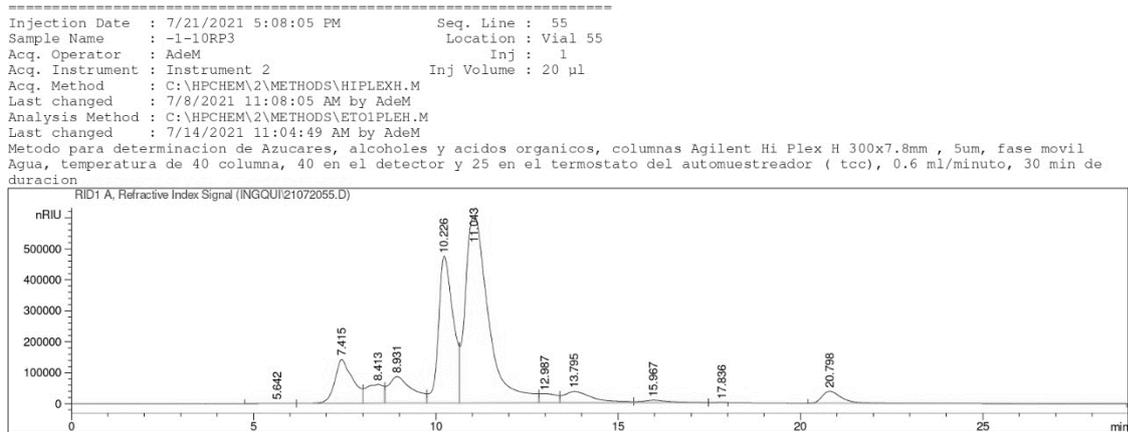


Figura 52. Cromatograma HPLC de la muestra -1,0,-1 (réplica 1) diluida al 60% v/v.

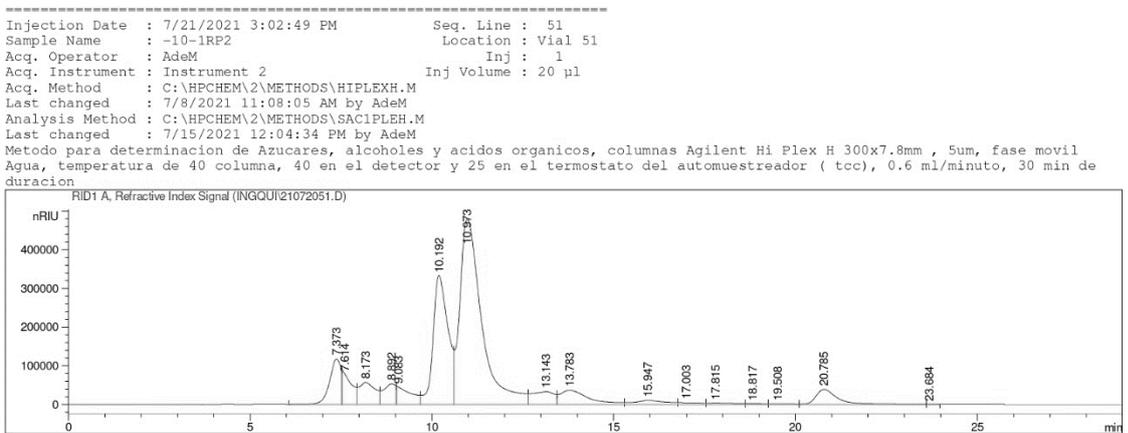


Figura 53. Cromatograma HPLC de la muestra -1,0,-1 (réplica 2) diluida al 60% v/v.

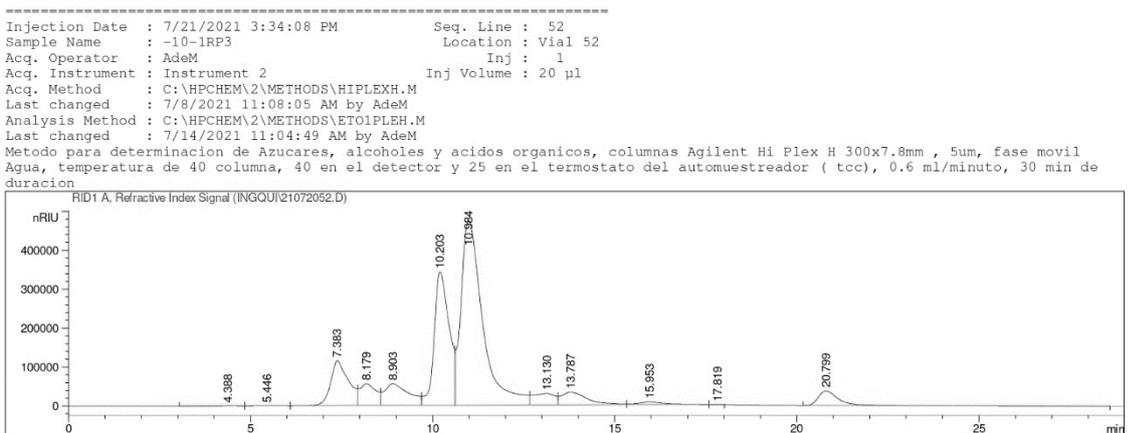


Figura 54. Cromatograma HPLC de la muestra -1,0,1 (réplica 1) diluida al 60% v/v.

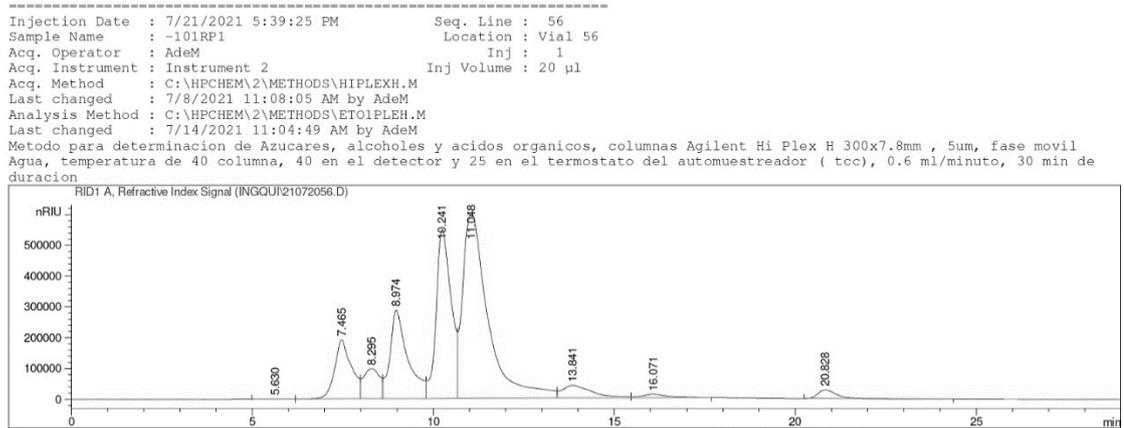


Figura 55. Cromatograma HPLC de la muestra -1,0,1 (réplica 2) diluida al 60% v/v.

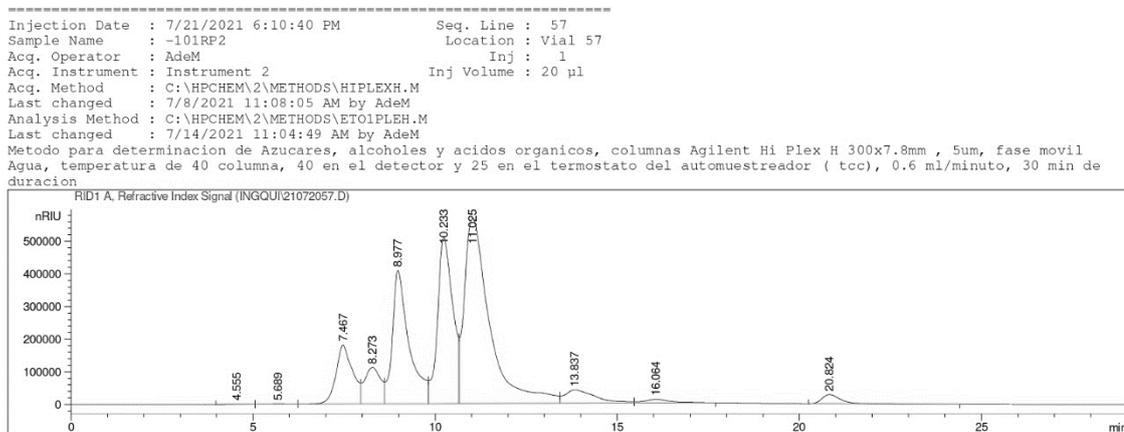


Figura 56. Cromatograma HPLC de la muestra -1,1,0 (réplica 1) diluida al 60% v/v.

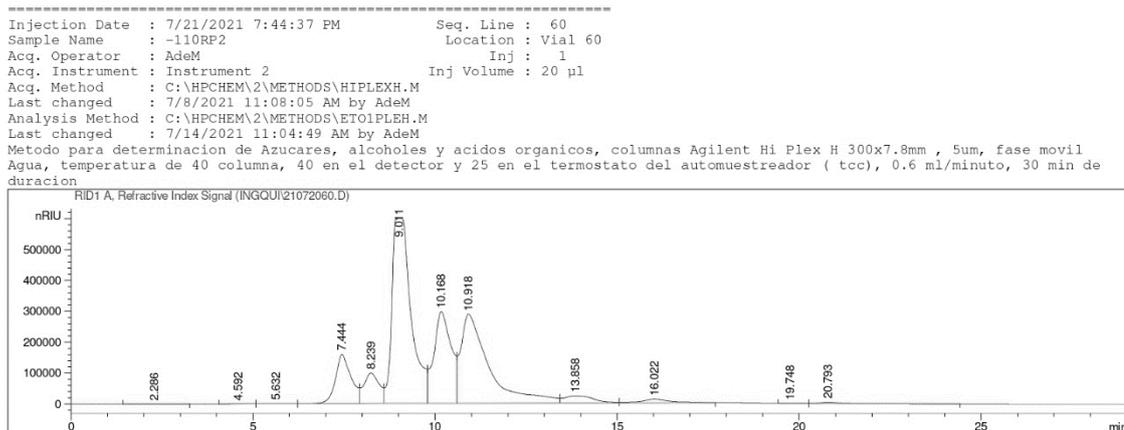


Figura 57. Cromatograma HPLC de la muestra -1,1,0 (réplica 2) diluida al 60% v/v.

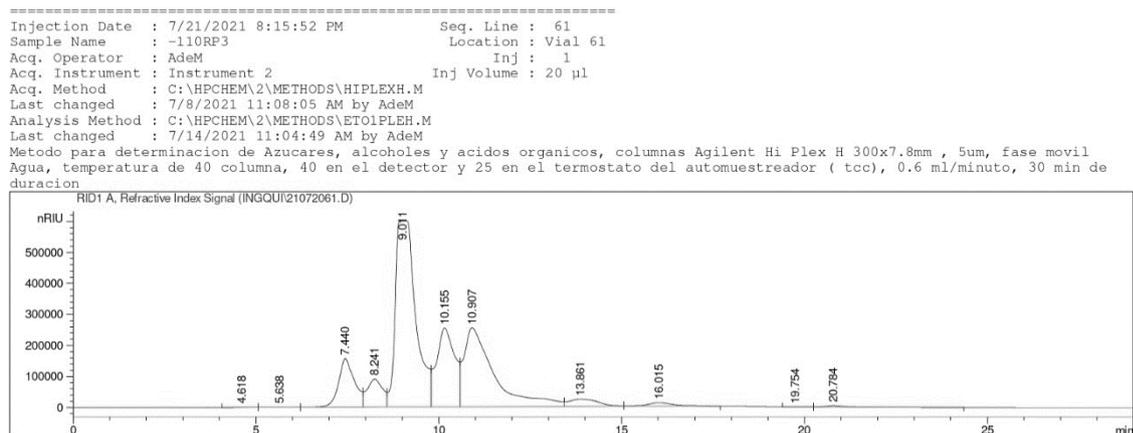


Figura 58. Cromatograma HPLC de la muestra 0,-1,-1 (réplica 1) diluida al 60% v/v.

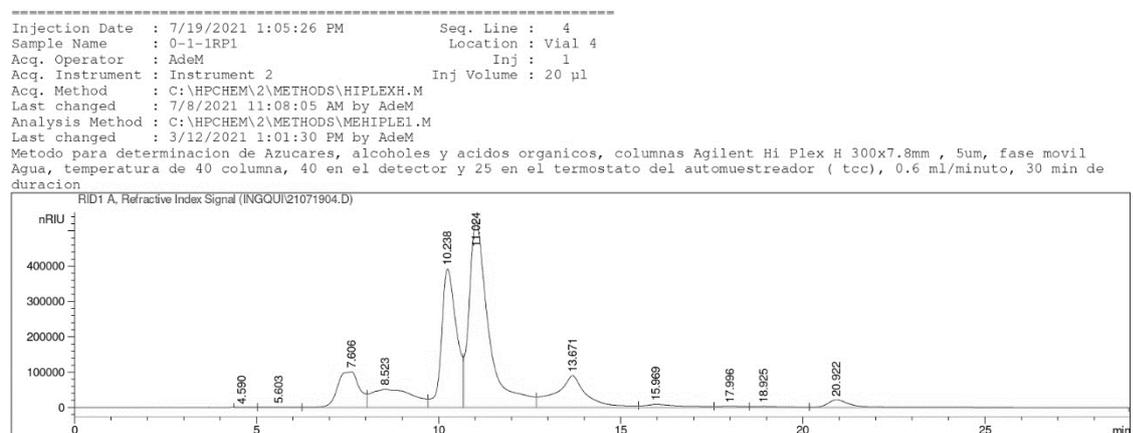


Figura 59. Cromatograma HPLC de la muestra 0,-1,-1 (réplica 2) diluida al 60% v/v.

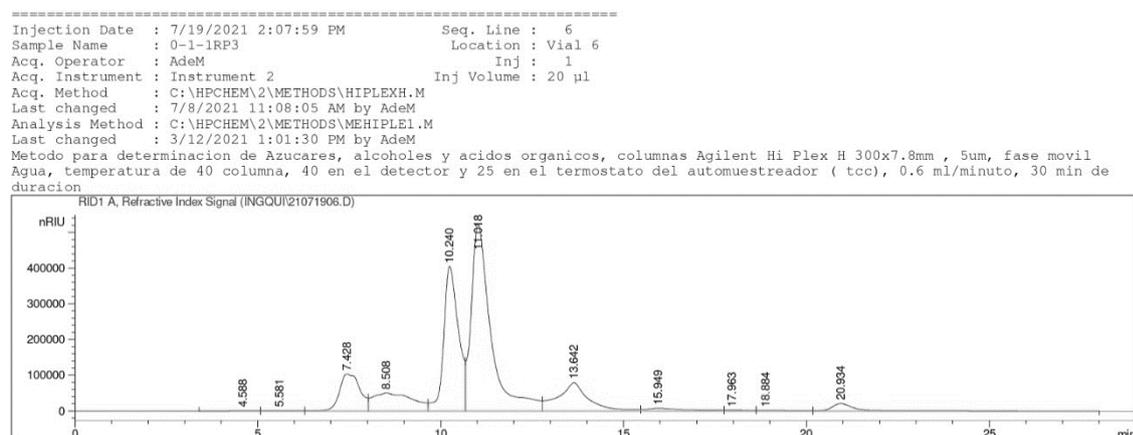


Figura 60. Cromatograma HPLC de la muestra 0,-1,1 (réplica 1) diluida al 60% v/v.

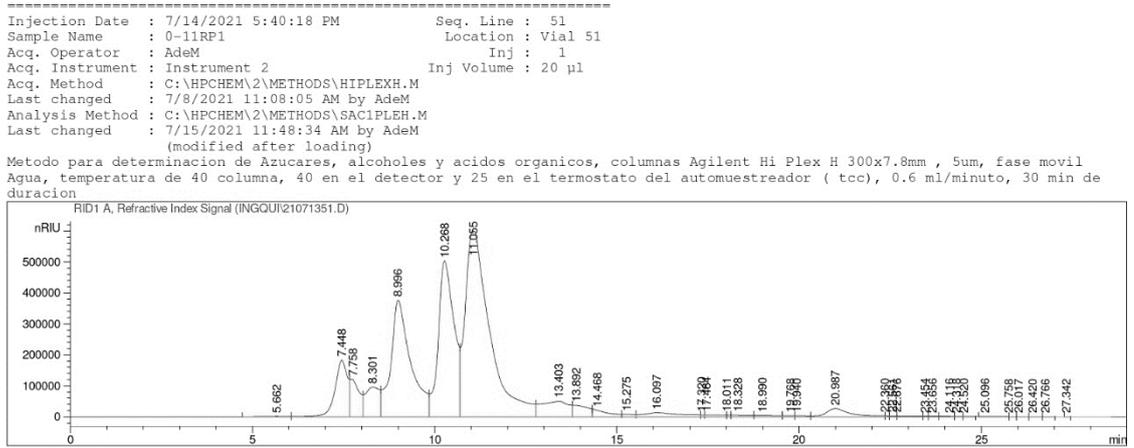


Figura 61. Cromatograma HPLC de la muestra 0,-1,1 (réplica 2) diluida al 60% v/v.

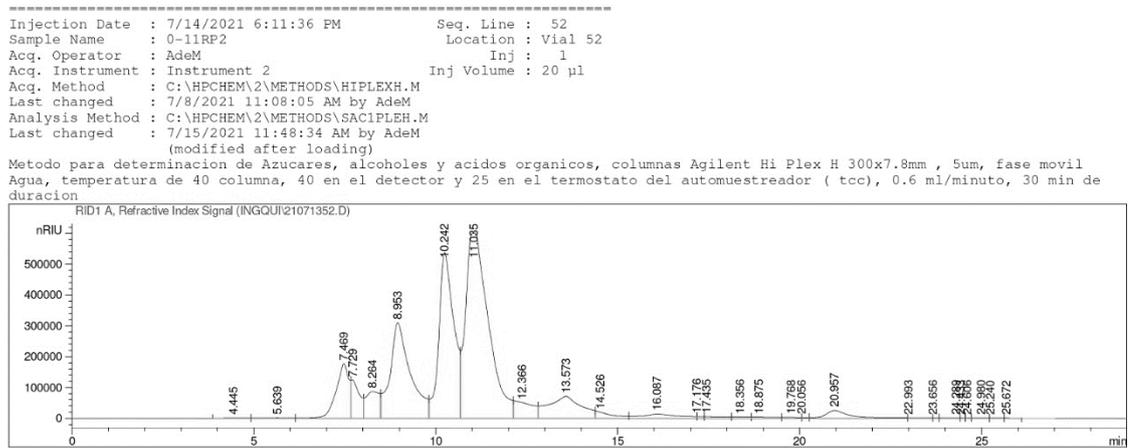


Figura 62. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 1) diluida al 60% v/v.

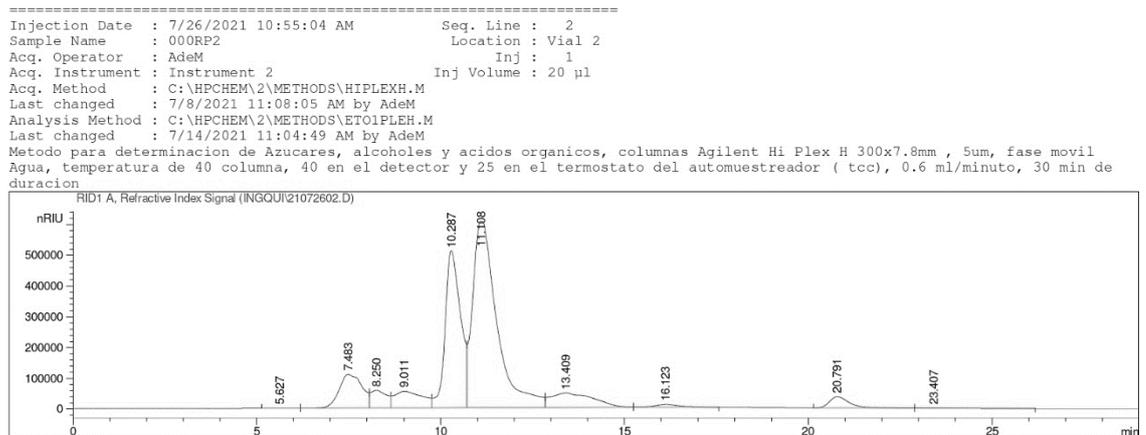


Figura 63. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 2) diluida al 60% v/v.

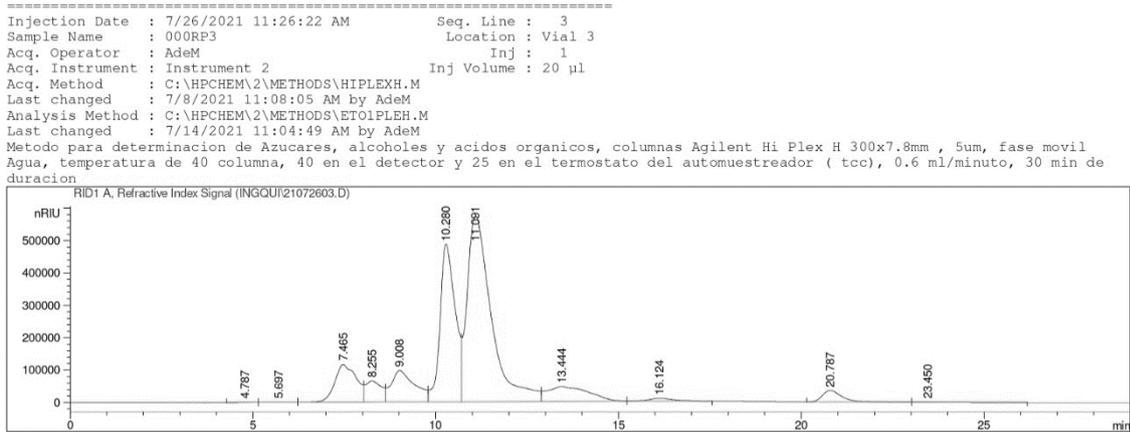


Figura 64. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 3) diluida al 60% v/v.

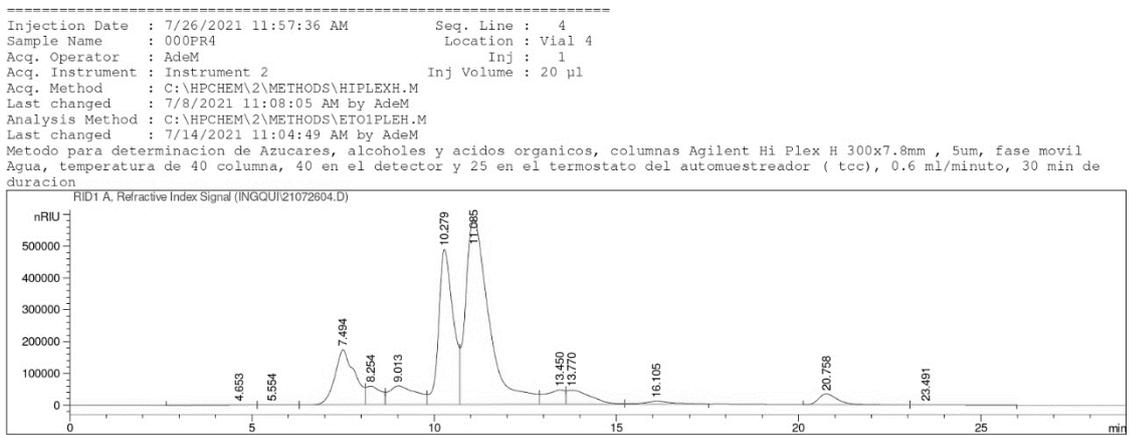


Figura 65. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 4) diluida al 60% v/v.

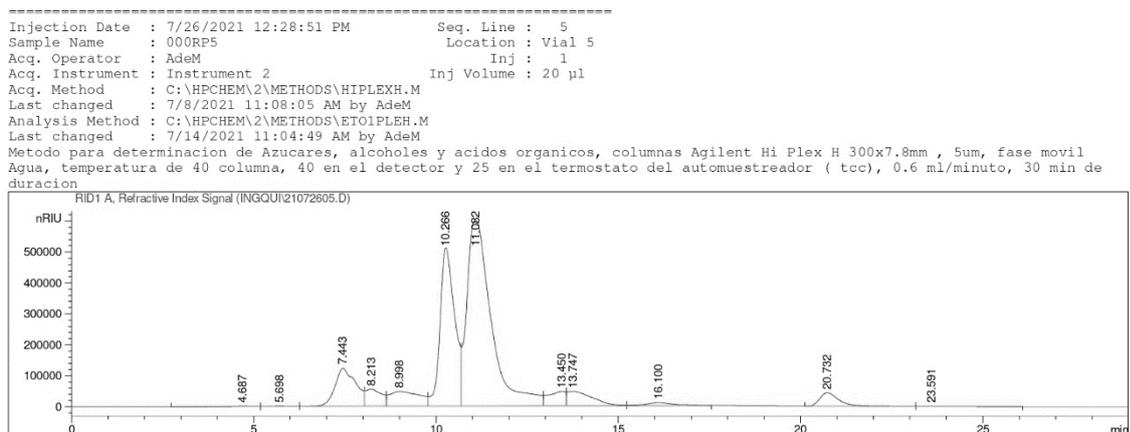


Figura 66. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 5) diluida al 60% v/v.

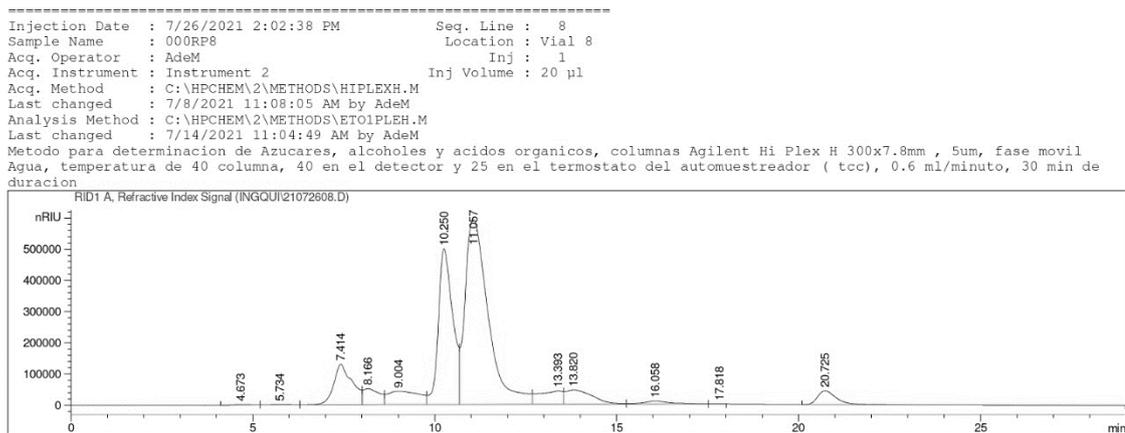


Figura 67. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 6) diluida al 60% v/v.

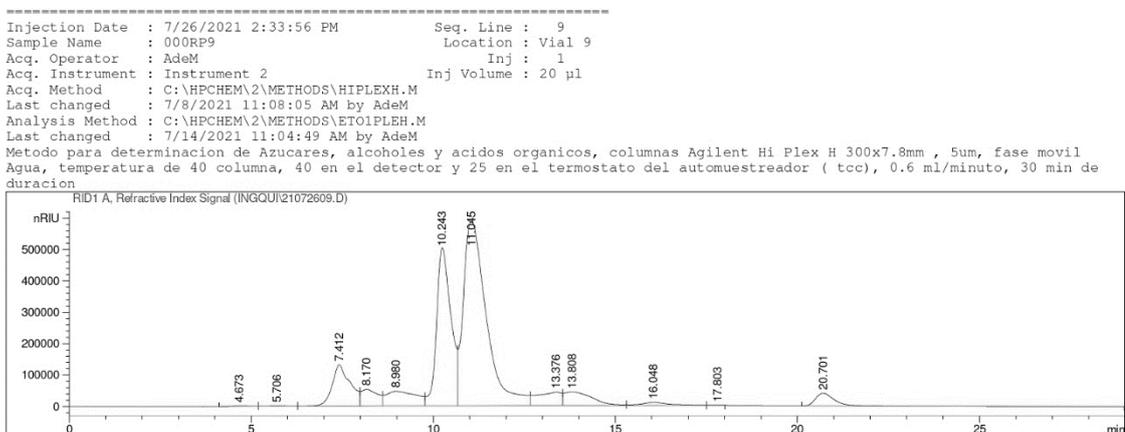


Figura 68. Cromatograma HPLC de la muestra 0,1,-1 (réplica 1) diluida al 60% v/v.

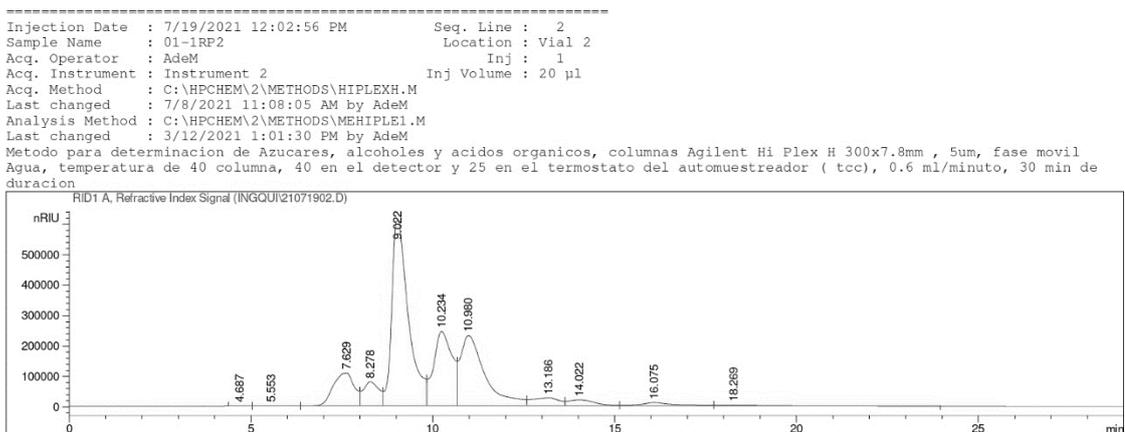


Figura 69. Cromatograma HPLC de la muestra 0,1,-1 (réplica 2) diluida al 60% v/v.

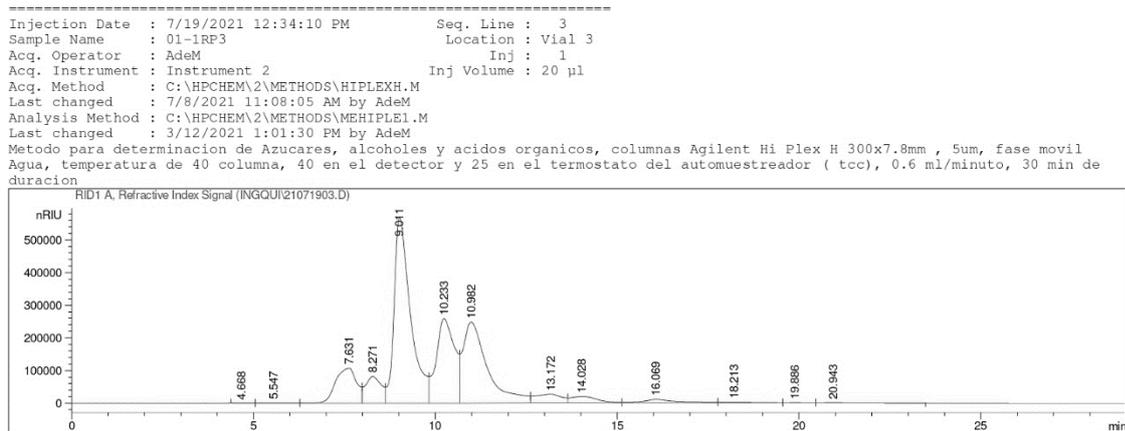


Figura 70 Cromatograma HPLC de la muestra 0,1,1 (réplica 1) diluida al 60% v/v.

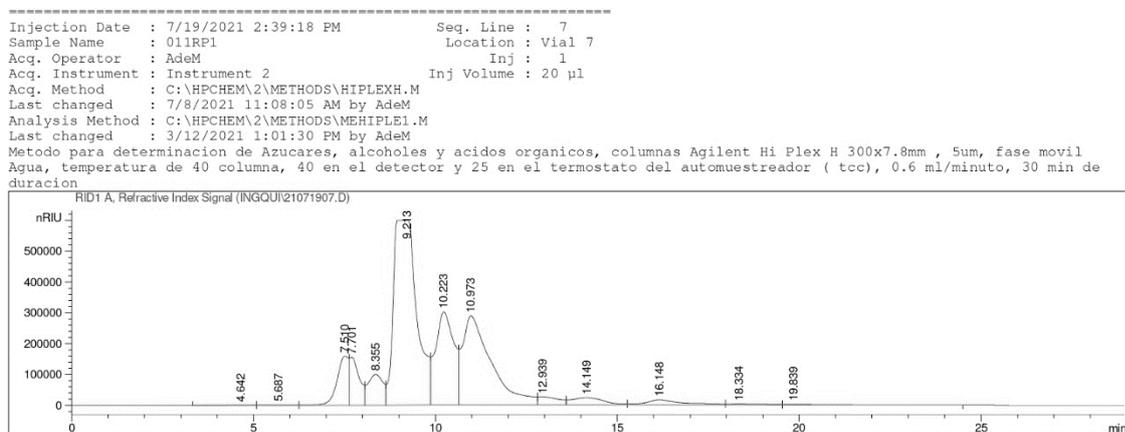


Figura 71. Cromatograma HPLC de la muestra 0,1,1 (réplica 2) diluida al 60% v/v.

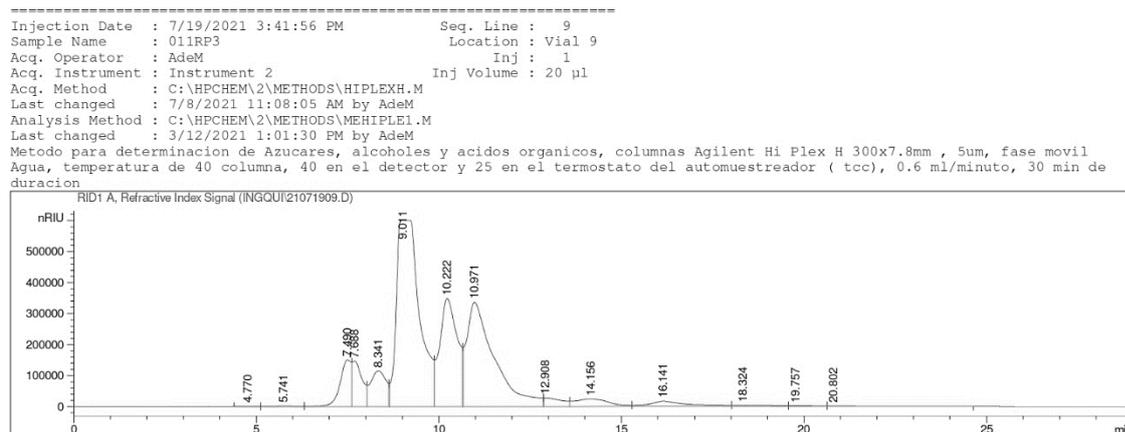


Figura 72 Cromatograma HPLC de la muestra 1,-1,0 (réplica 1) diluida al 60% v/v.

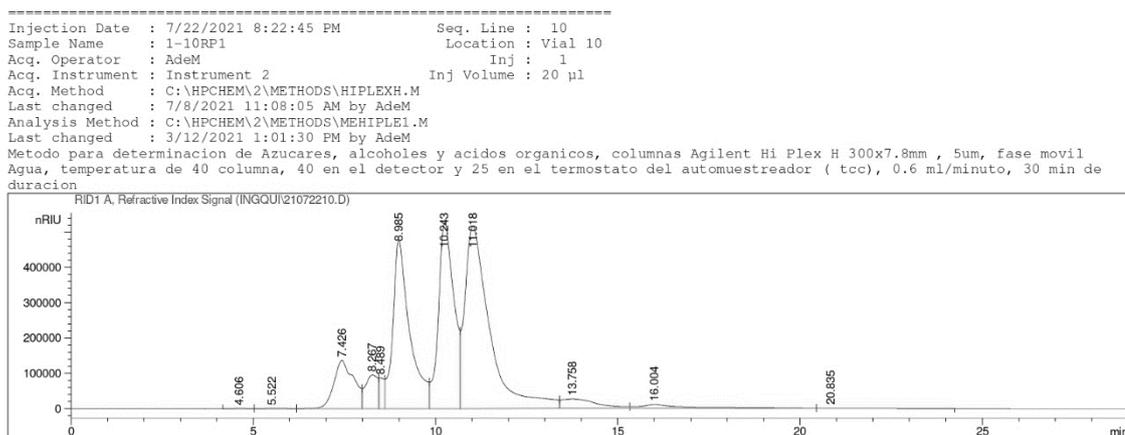


Figura 73. Cromatograma HPLC de la muestra 1,-1,0 (réplica 2) diluida al 60% v/v.

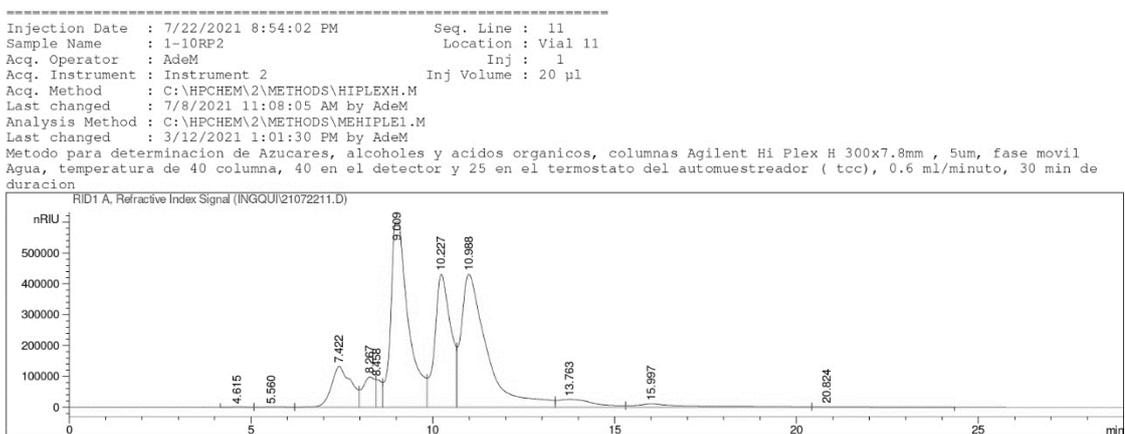


Figura 74. Cromatograma HPLC de la muestra 1,0,-1 (réplica 1) diluida al 60% v/v.

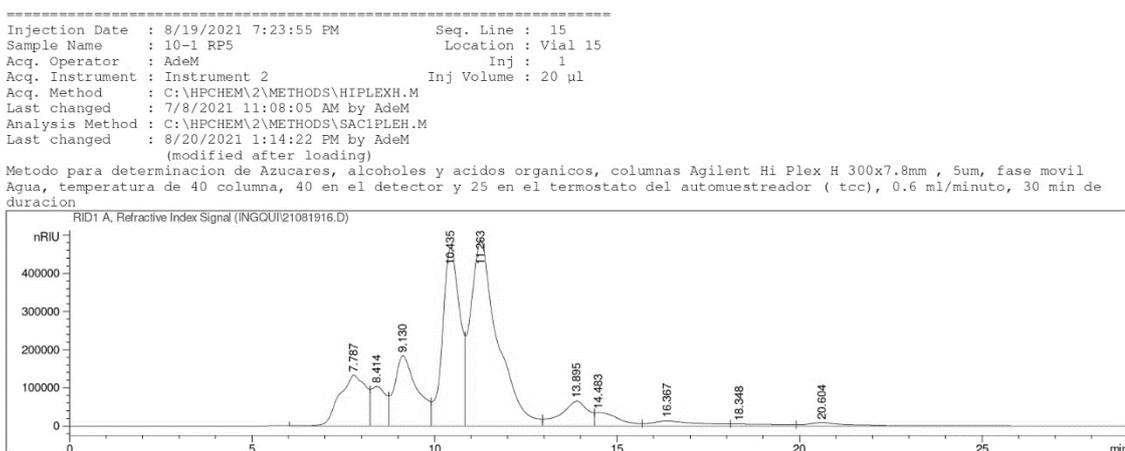


Figura 75. Cromatograma HPLC de la muestra 1,0,-1 (réplica 2) diluida al 60% v/v.

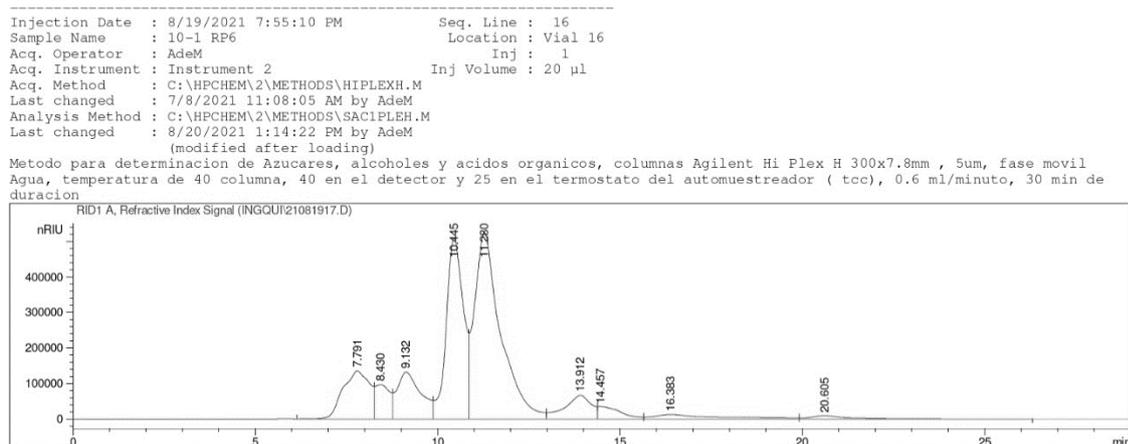


Figura 76. Cromatograma HPLC de la muestra 1,0,1 (réplica 1) diluida al 60% v/v.

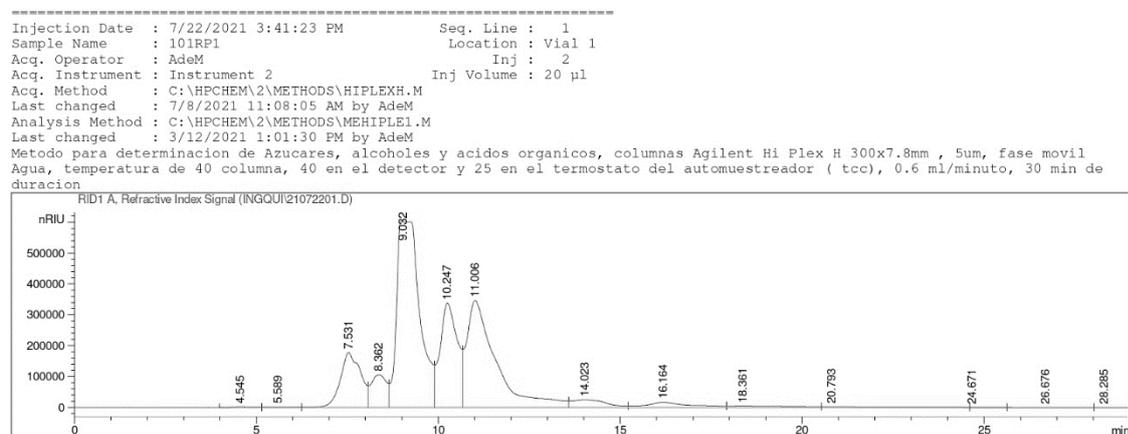


Figura 77. Cromatograma HPLC de la muestra 1,0,1 (réplica 2) diluida al 60% v/v.

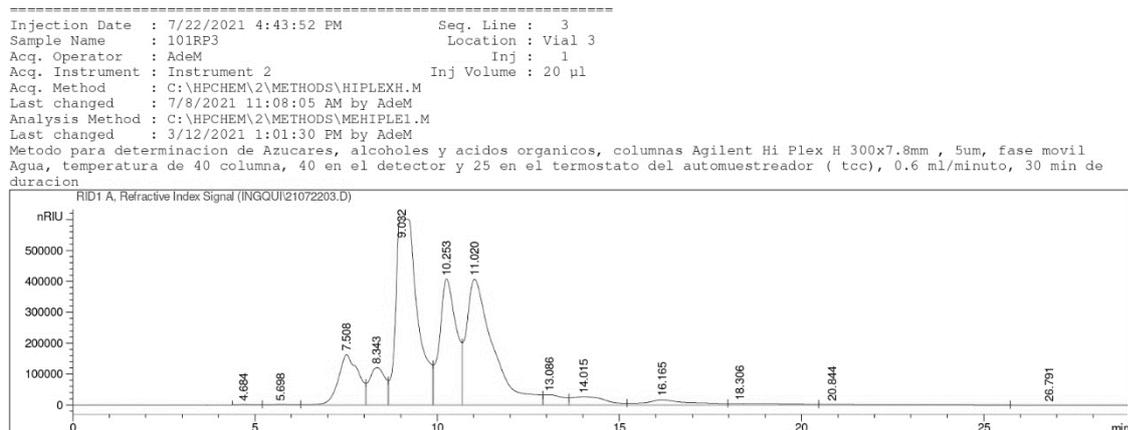


Figura 78. Cromatograma HPLC de la muestra 1,1,0 (réplica 1) diluida al 60% v/v.

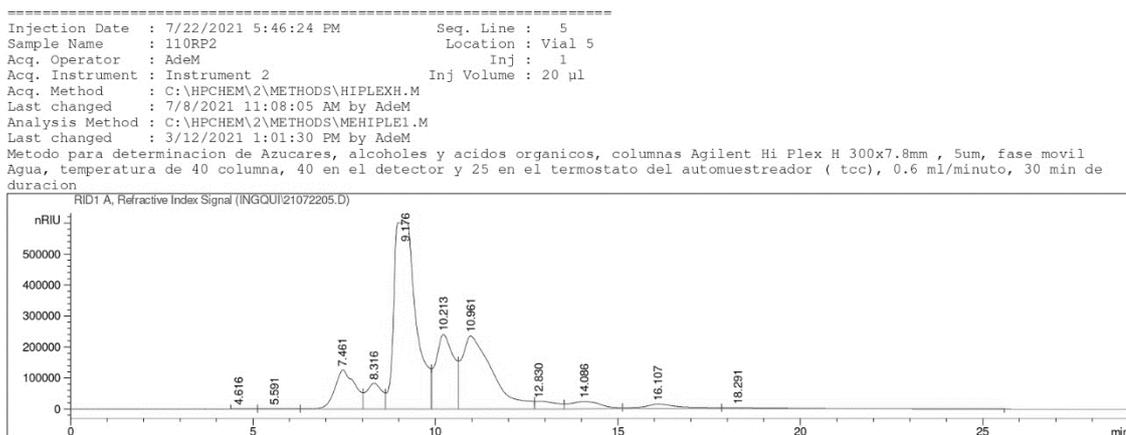


Figura 79. Cromatograma HPLC de la muestra 1,1,0 (réplica 2) diluida al 60% v/v.

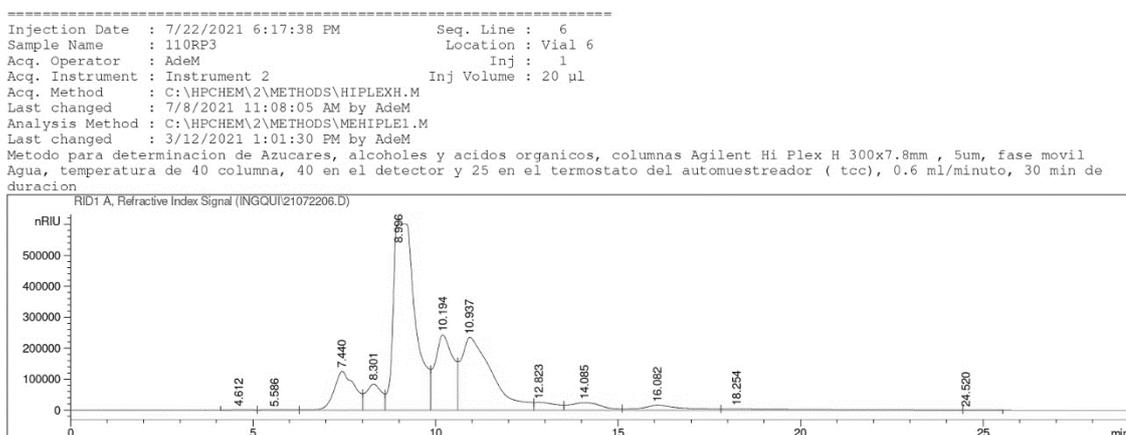


Figura 80. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 1) diluida al 60% v/v.

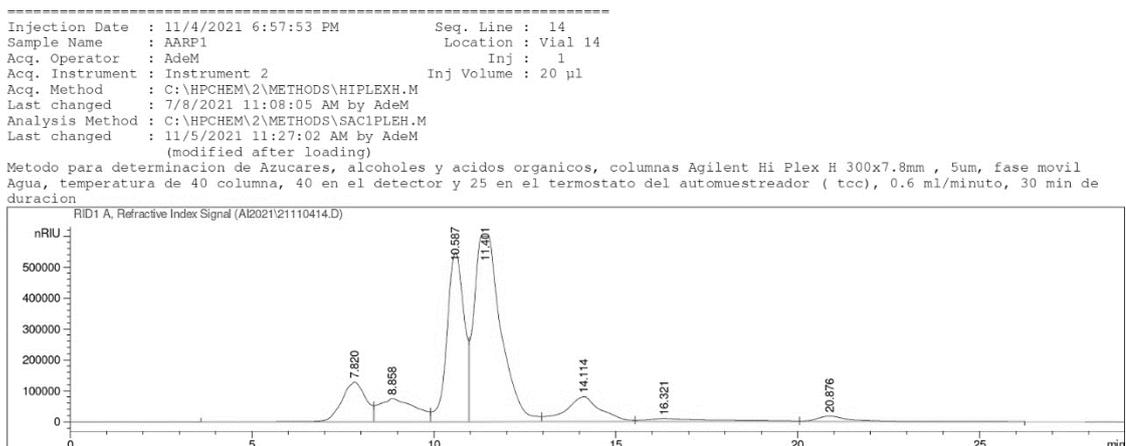


Figura 81. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 2) diluida al 60% v/v.

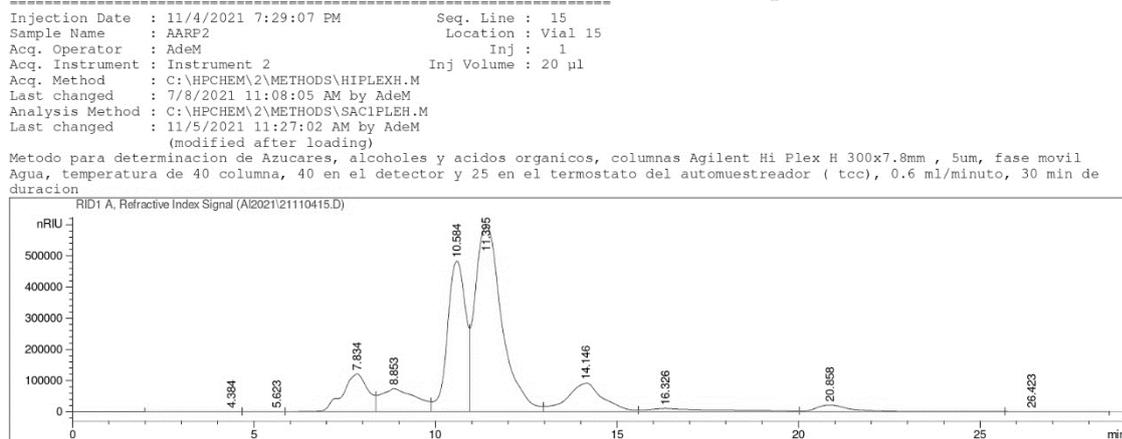


Figura 82. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 3) diluida al 60% v/v.

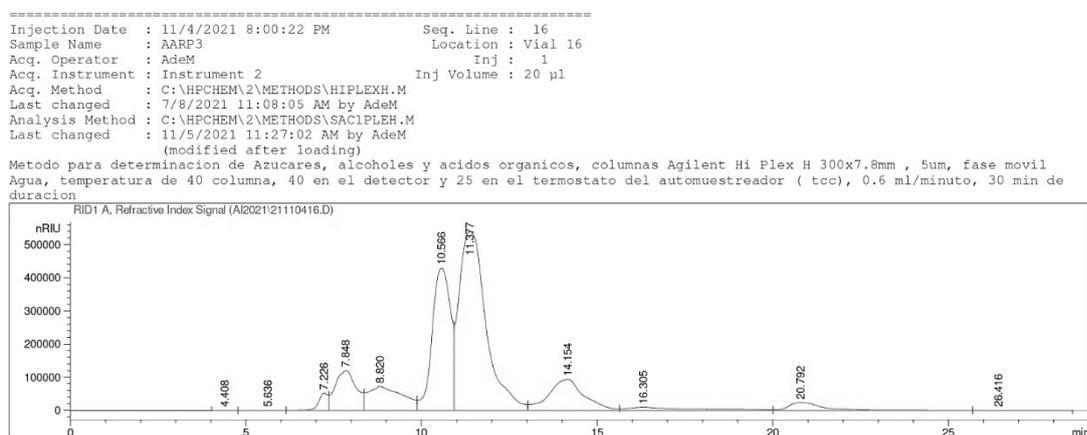


Figura 83. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 4) diluida al 60% v/v.

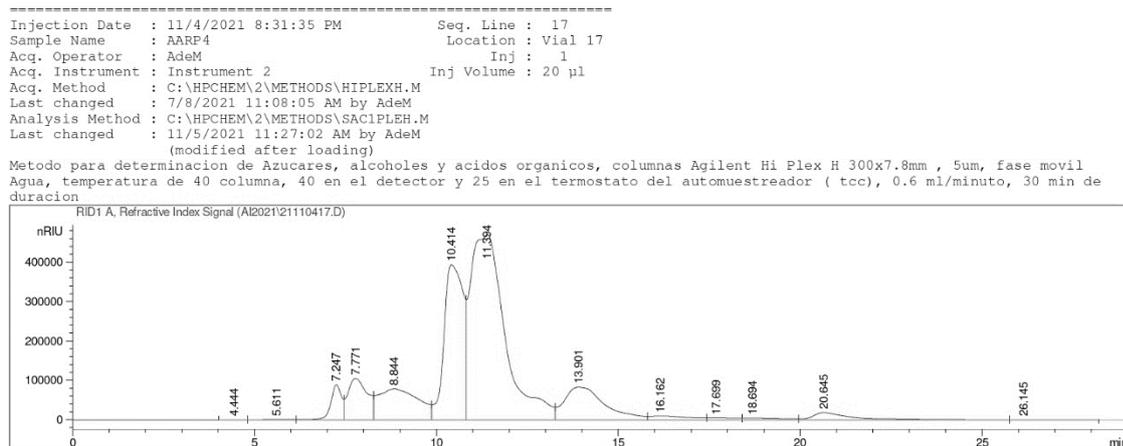


Figura 84. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 5) diluida al 60% v/v.

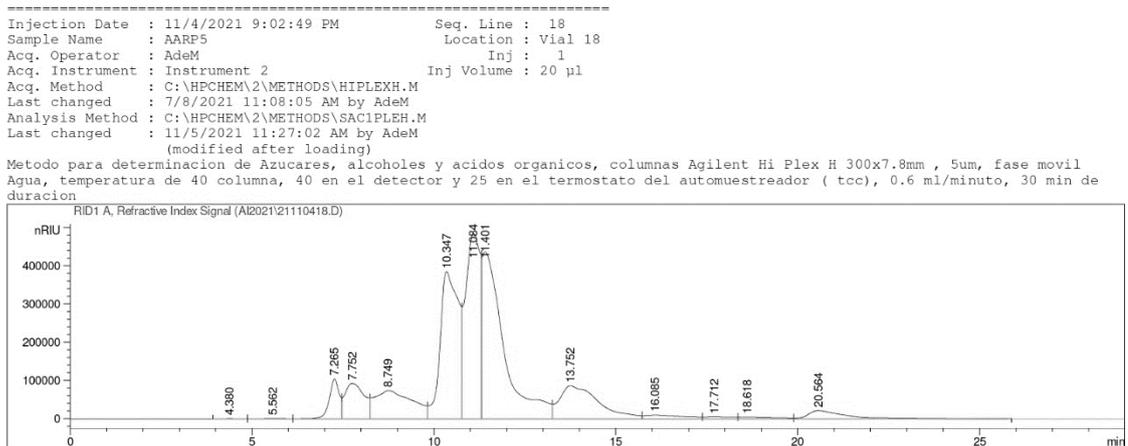


Figura 85. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 6) diluida al 60% v/v.

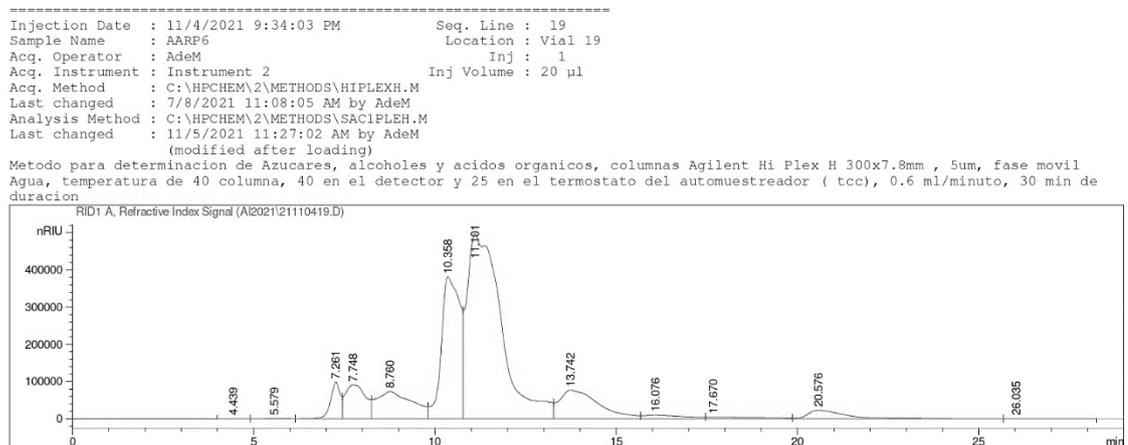


Figura 86. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 7) diluida al 60% v/v.

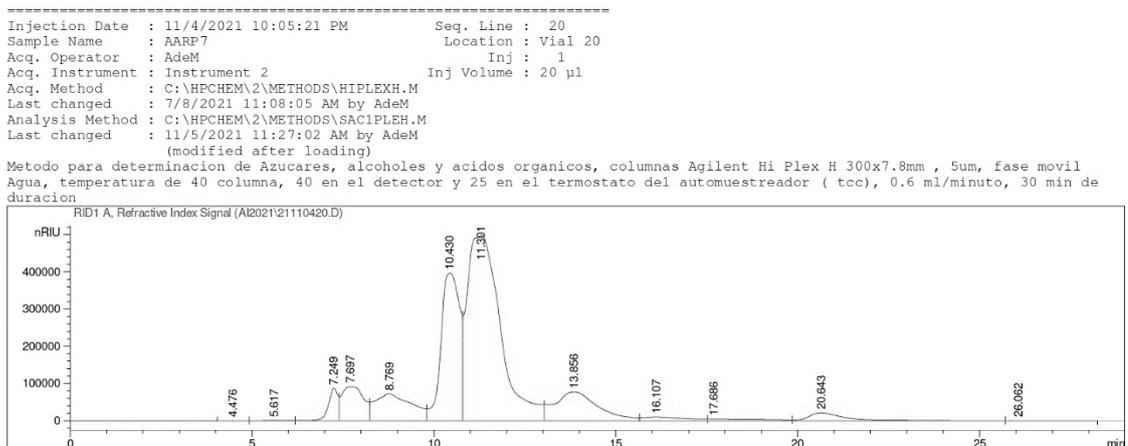


Figura 87. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 8) diluida al 60% v/v.

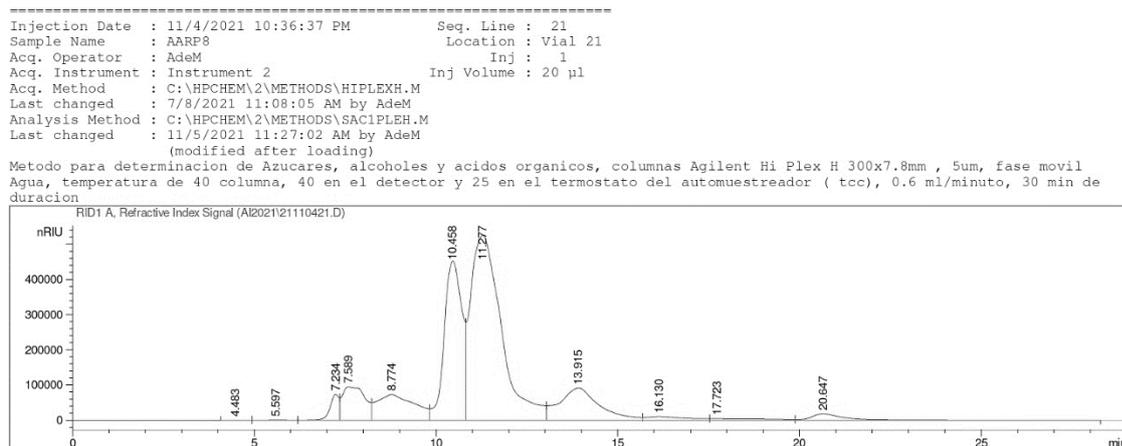


Figura 88. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 1) diluida al 60% v/v.

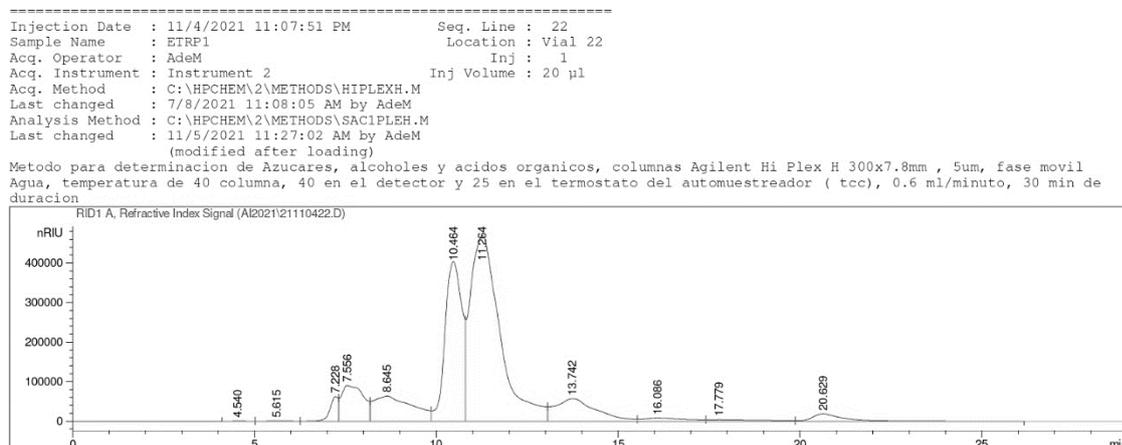


Figura 89. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 2) diluida al 60% v/v.

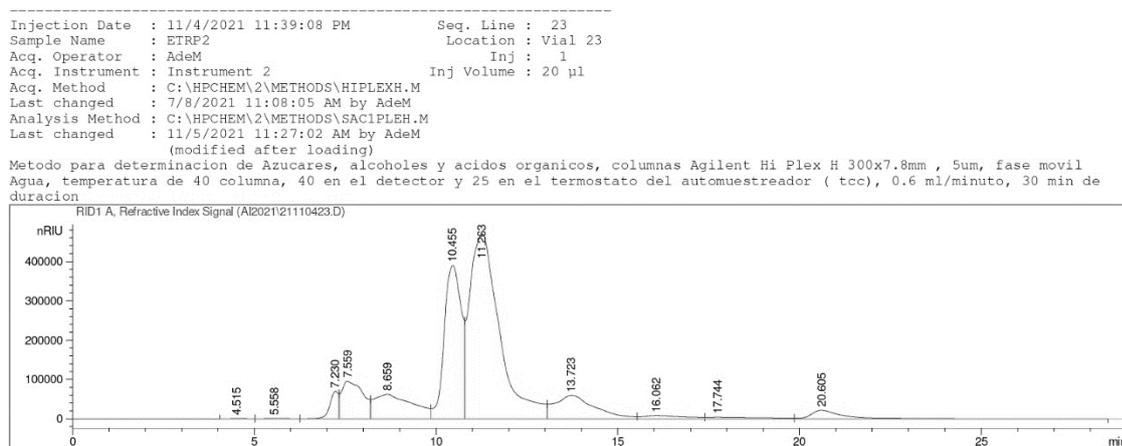


Figura 90. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 3) diluida al 60% v/v.

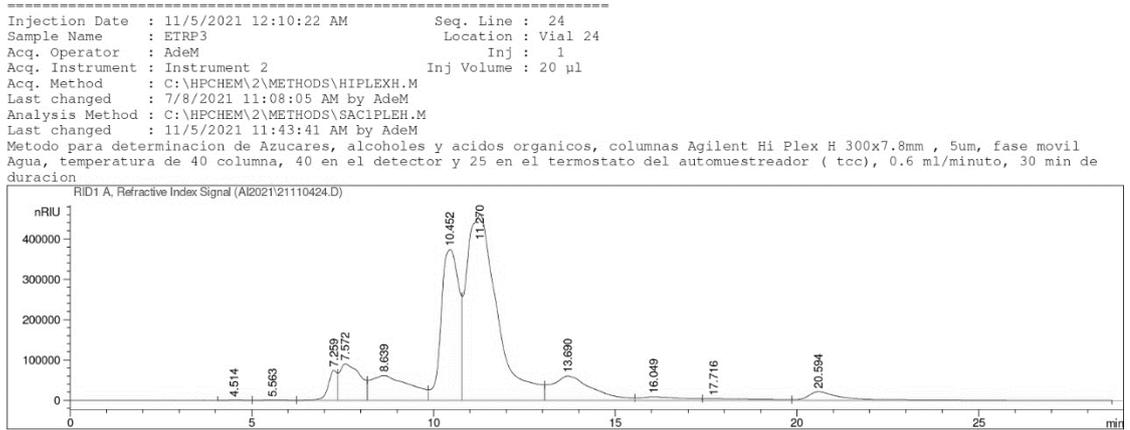


Figura 91. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 4) diluida al 60% v/v.

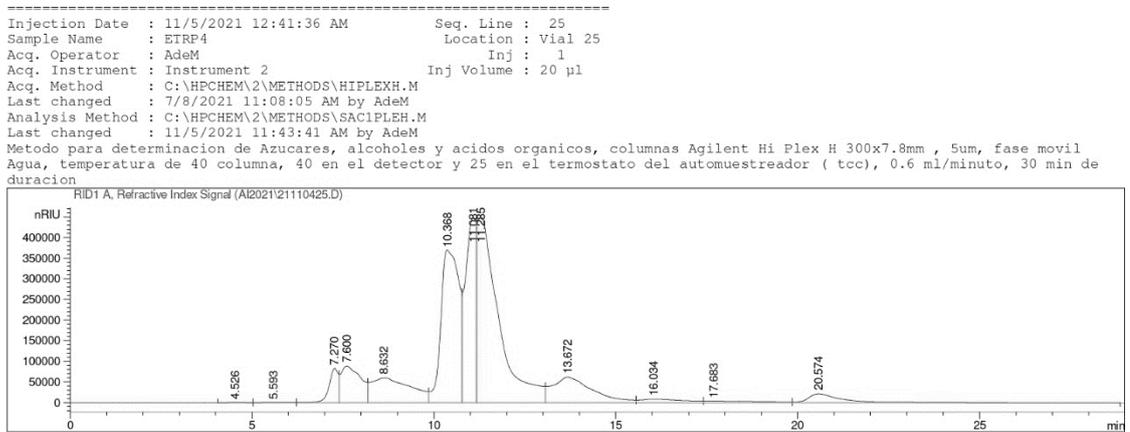


Figura 92. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 5) diluida al 60% v/v.

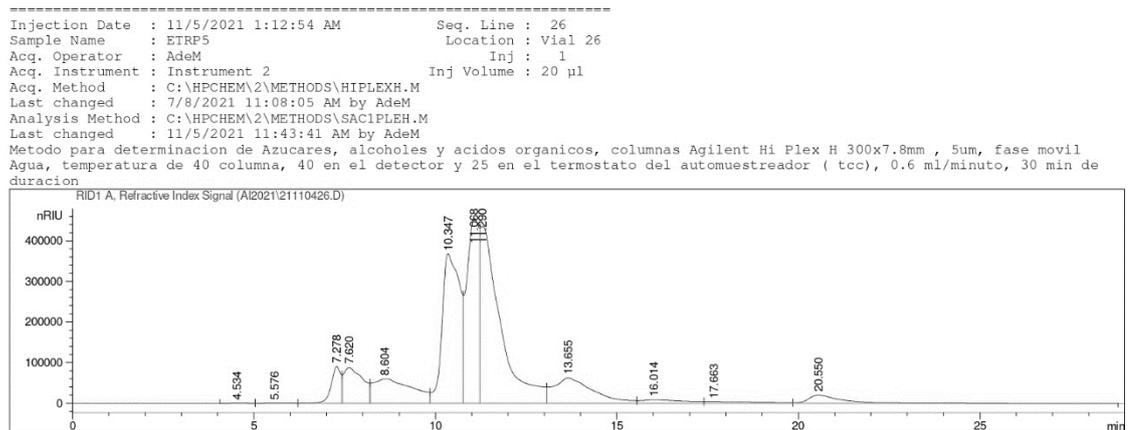


Figura 93. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 6) diluida al 60% v/v.

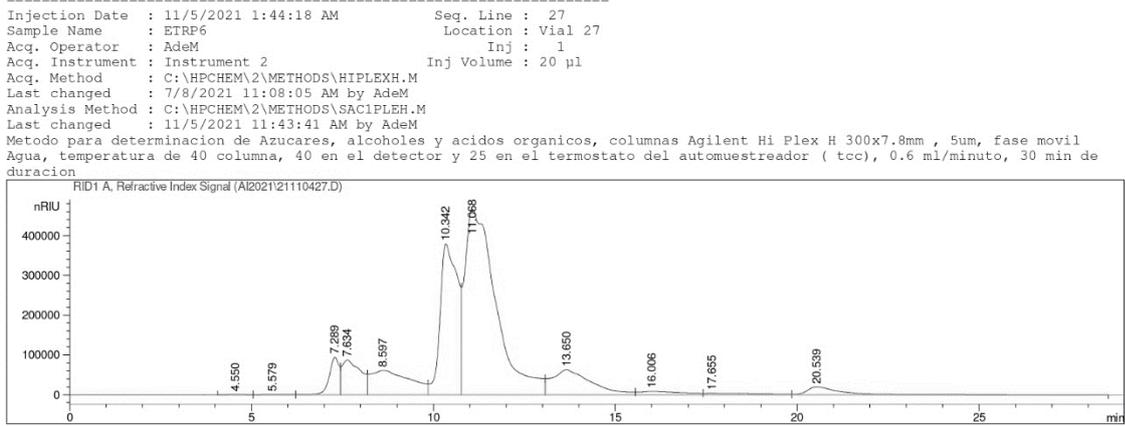


Figura 94. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 7) diluida al 60% v/v.

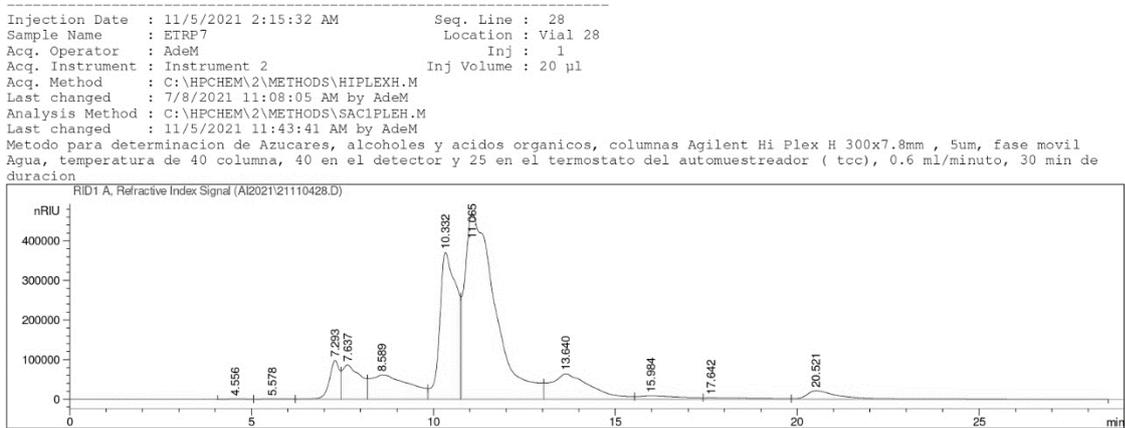


Figura 95. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 8) diluida al 60% v/v.

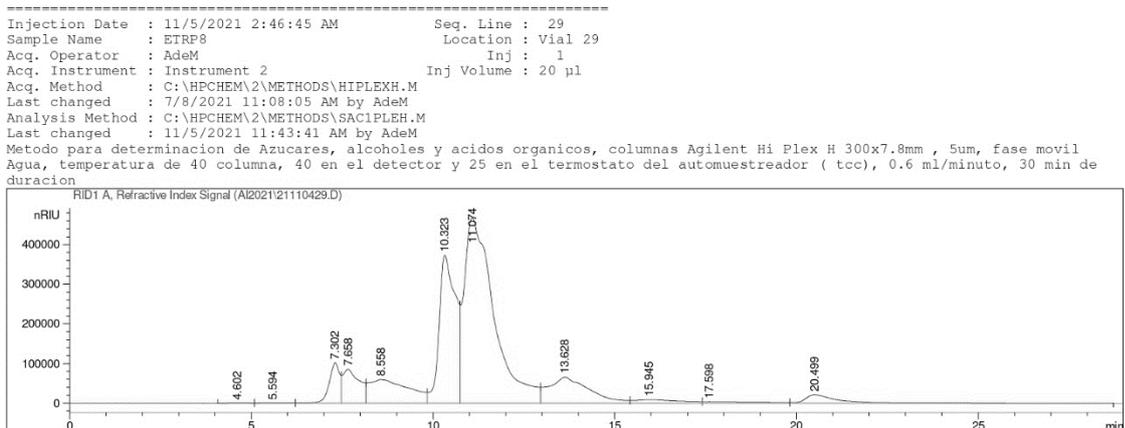


Figura 96. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 1) diluida al 60% v/v.

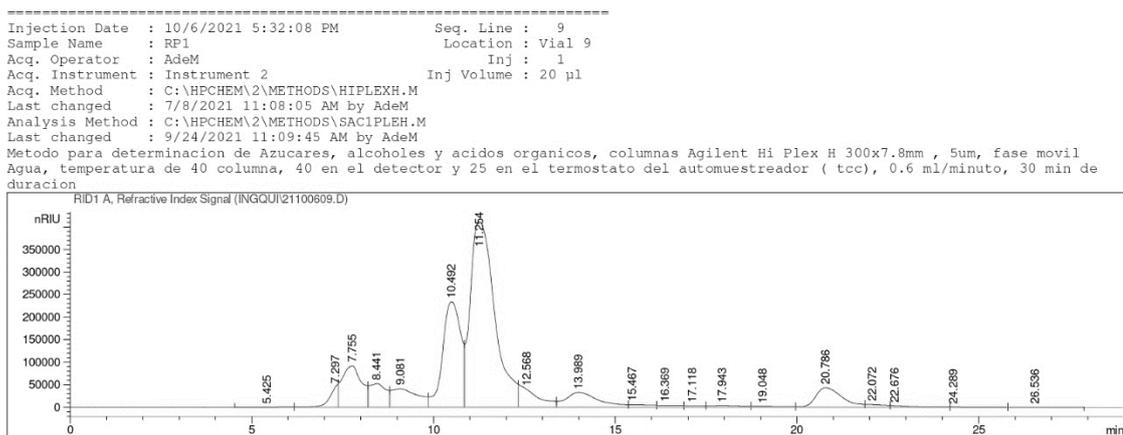


Figura 97. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 2) diluida al 60% v/v.

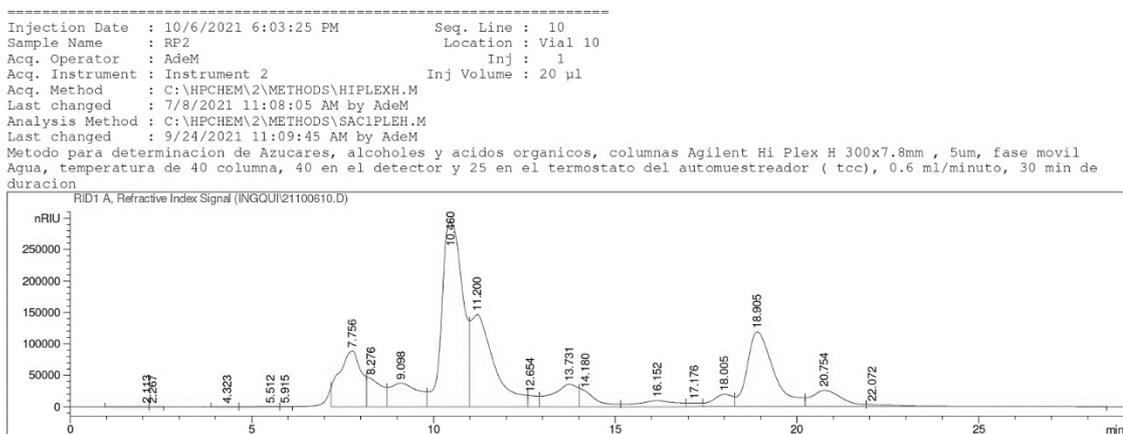


Figura 98. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 3) diluida al 60% v/v.

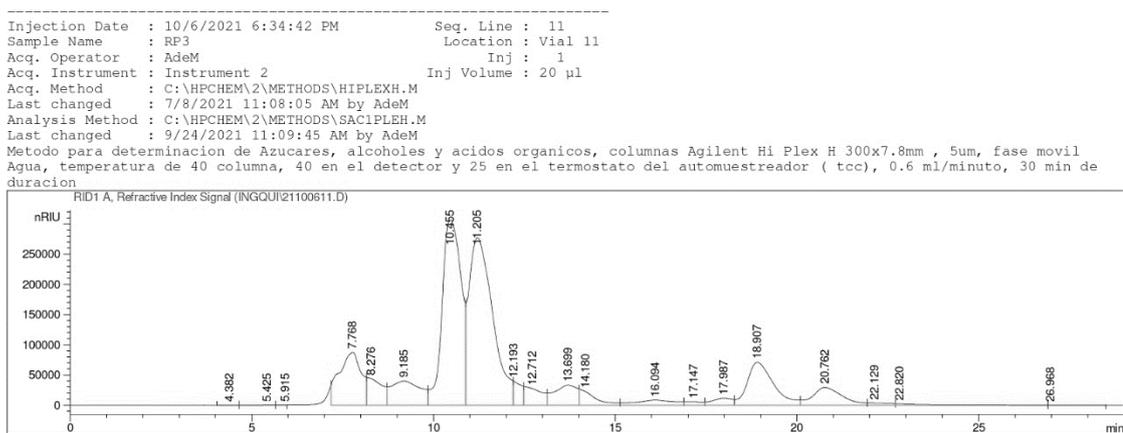


Figura 99. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 4) diluida al 60% v/v.

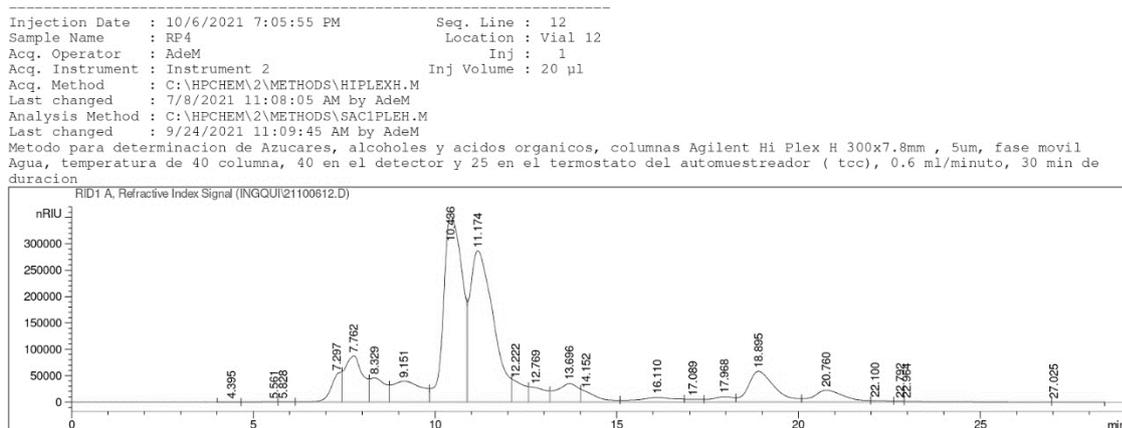


Figura 100. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 5) diluida al 60% v/v.

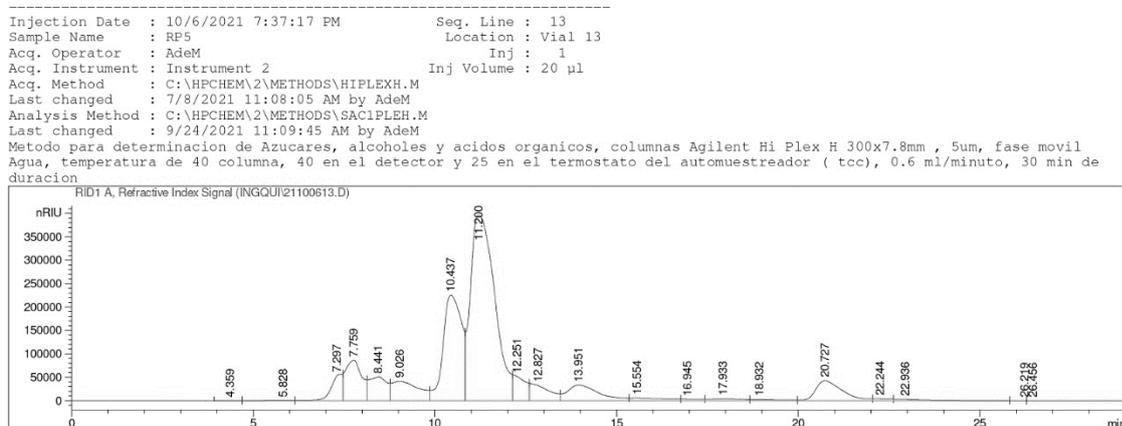


Figura 101. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 6) diluida al 60% v/v.

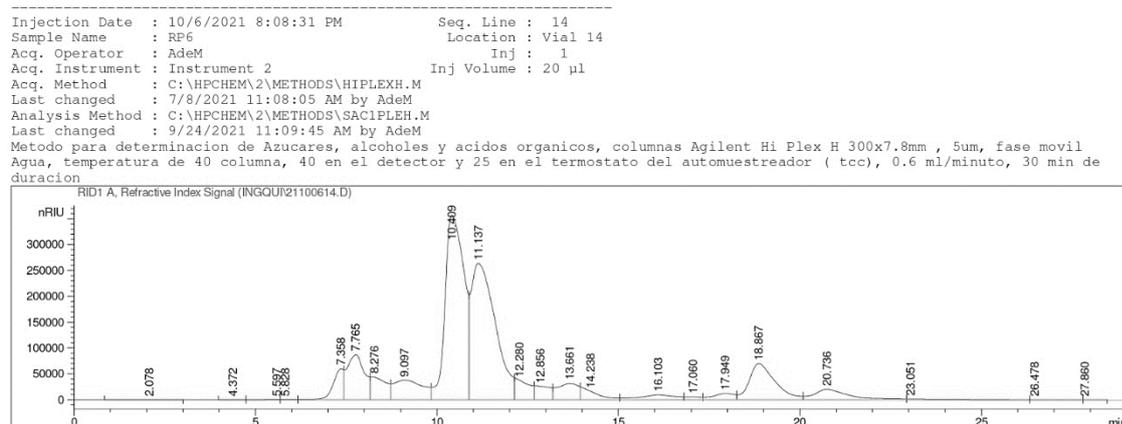


Figura 102. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 7) diluida al 60% v/v.

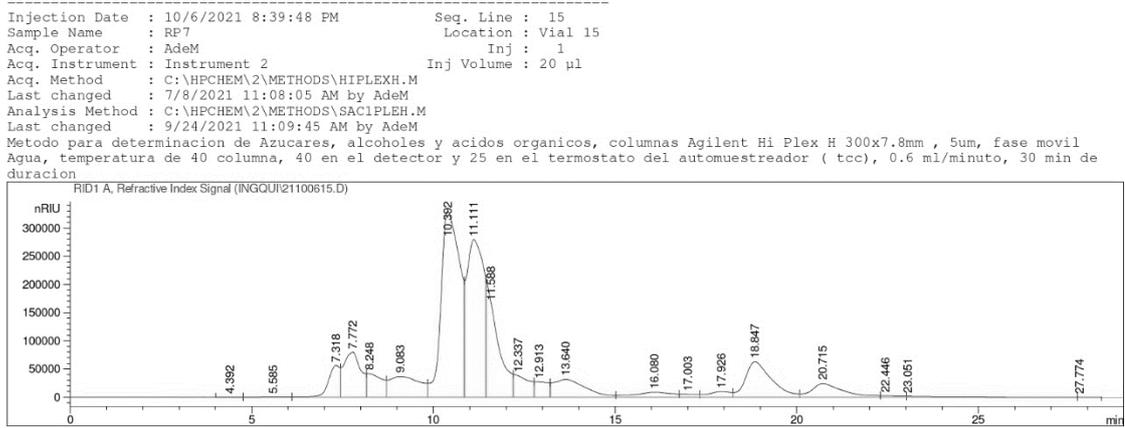


Figura 103. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 8) diluida al 60% v/v.

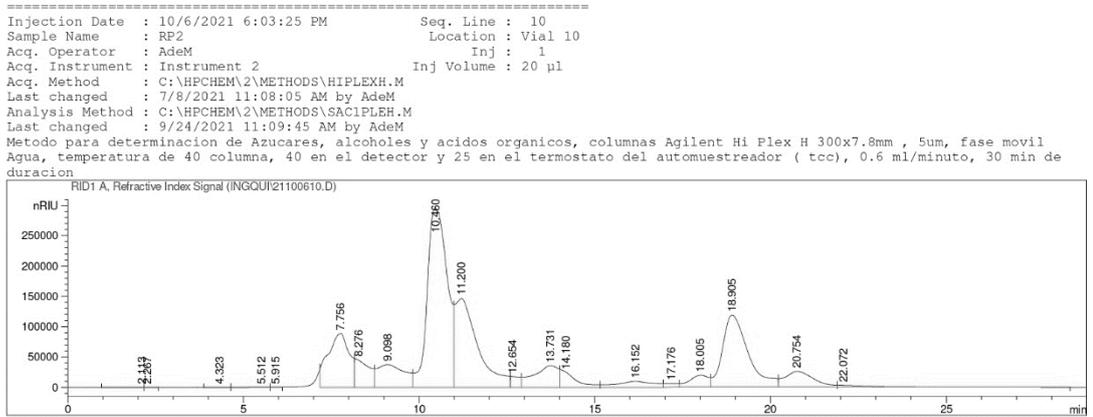


Figura 104. Cromatograma HPLC de la muestra -1,-1,0 (réplica 1) diluida al 30% v/v.

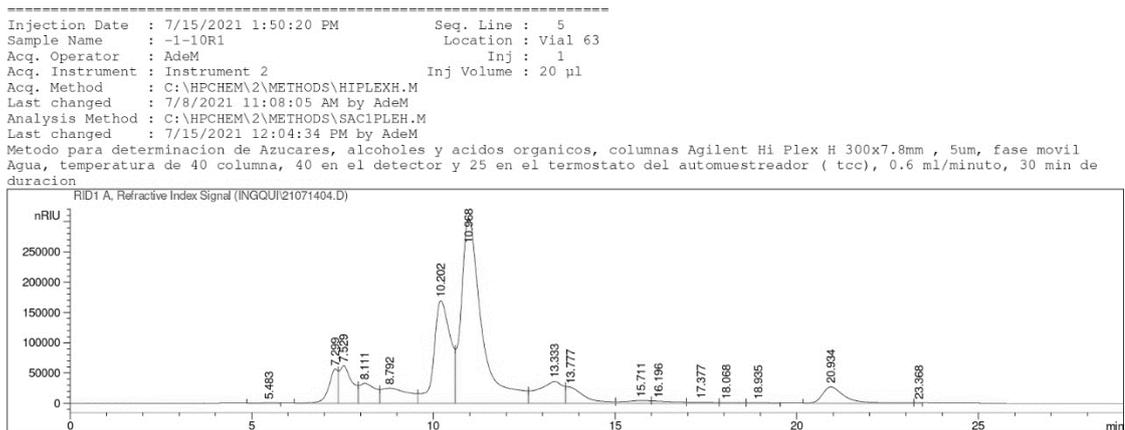


Figura 105. Cromatograma HPLC de la muestra -1,-1,0 (réplica 2) diluida al 30% v/v.

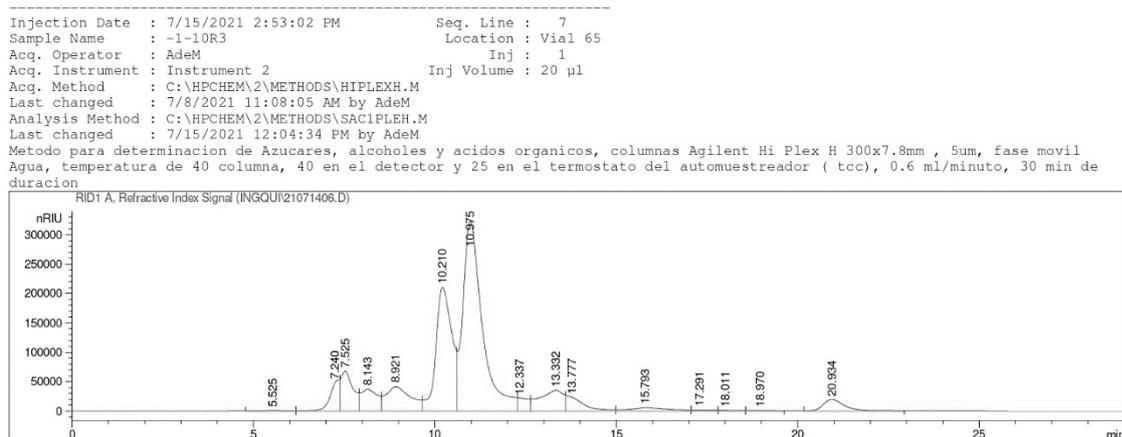


Figura 106. Cromatograma HPLC de la muestra -1,0,-1 (réplica 1) diluida al 30% v/v.

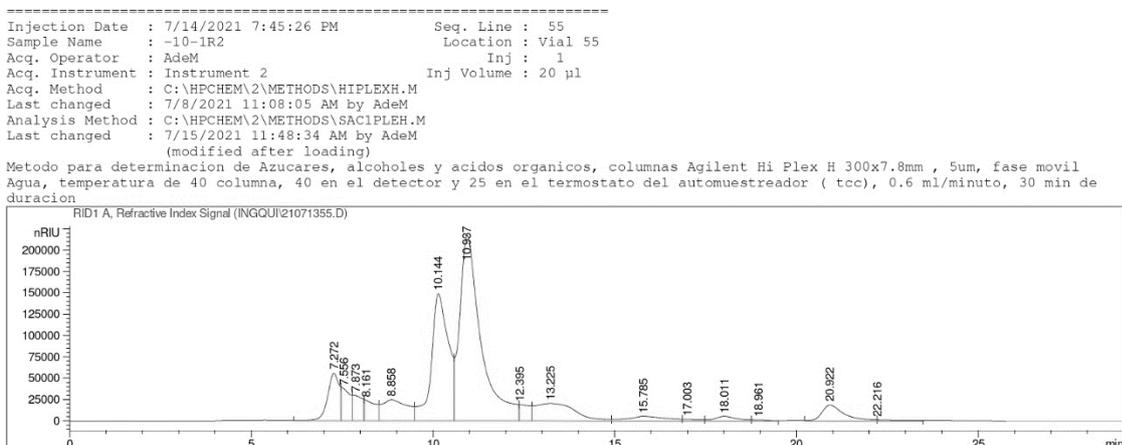


Figura 107. Cromatograma HPLC de la muestra -1,0,-1 (réplica 2) diluida al 30% v/v.

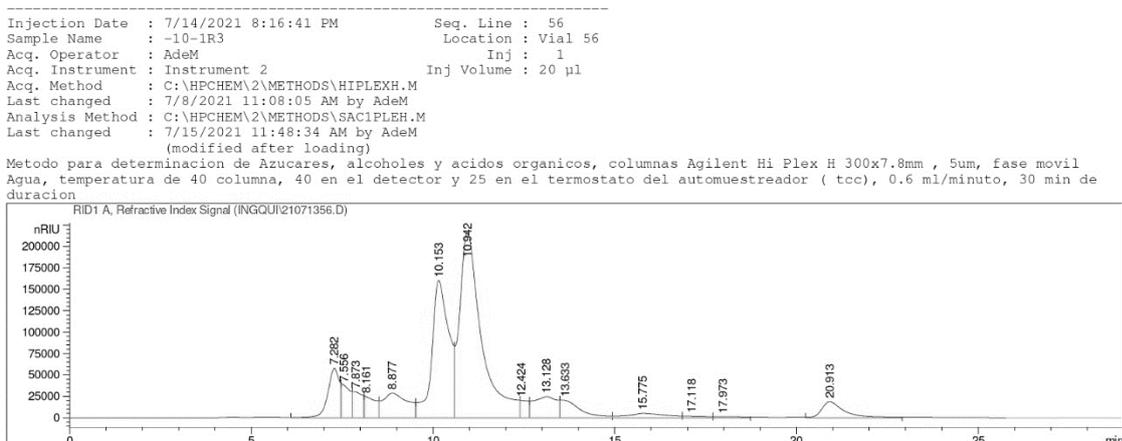


Figura 108. Cromatograma HPLC de la muestra -1,0,-1 (réplica 1) diluida al 30% v/v.

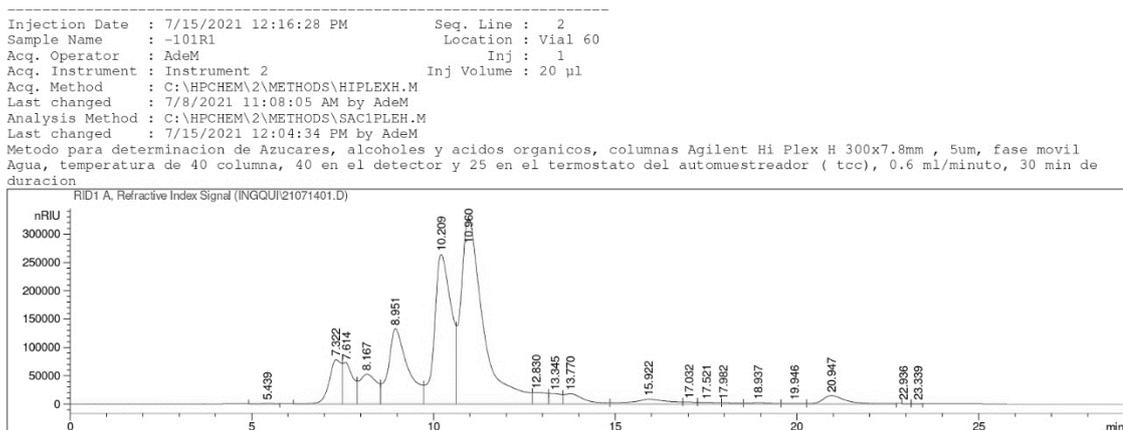


Figura 109. Cromatograma HPLC de la muestra -1,0,-1 (réplica 2) diluida al 30% v/v.

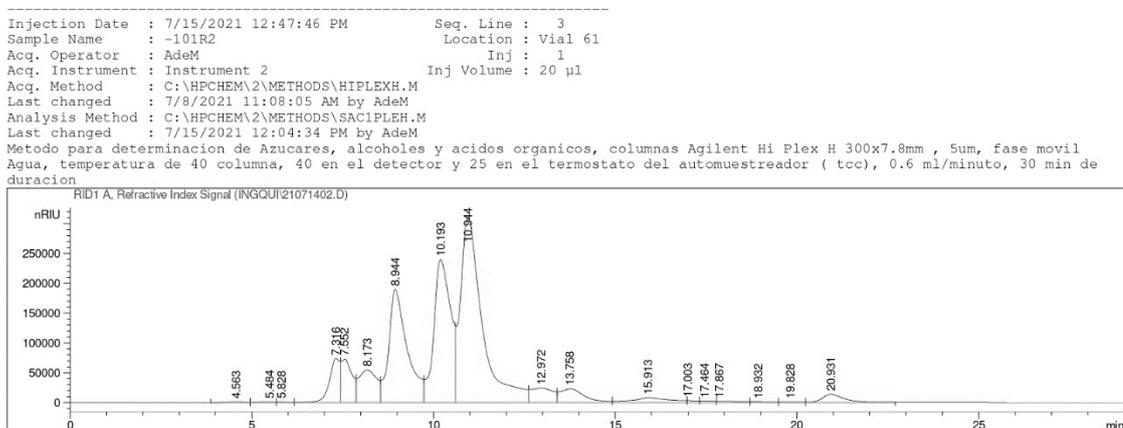


Figura 110. Cromatograma HPLC de la muestra -1,1,0 (réplica 1) diluida al 30% v/v.

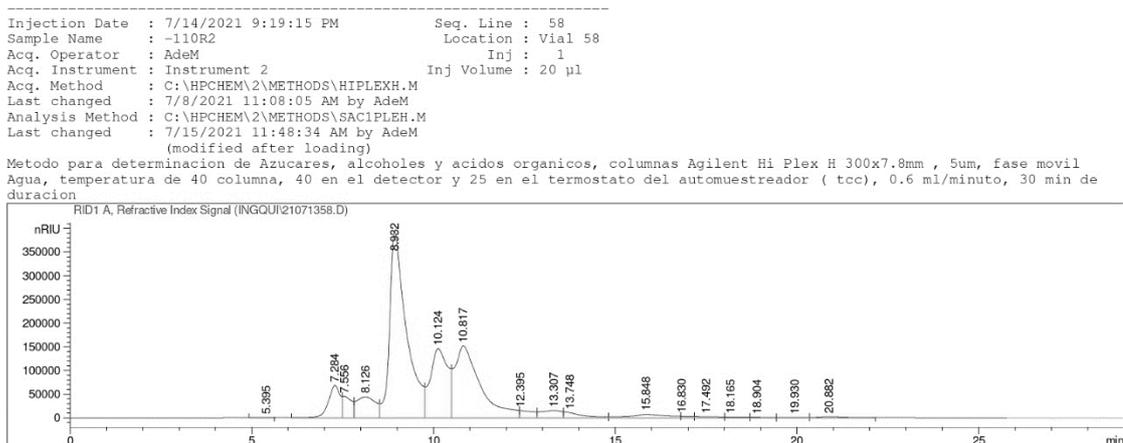


Figura 111. Cromatograma HPLC de la muestra -1,1,0 (réplica 2) diluida al 30% v/v.

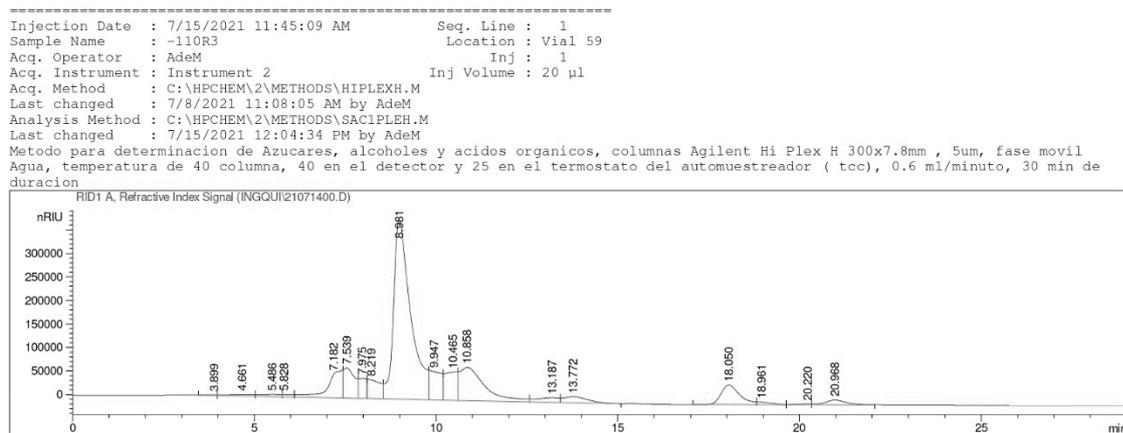


Figura 112. Cromatograma HPLC de la muestra 0,-1,-1 (réplica 1) diluida al 20% v/v.

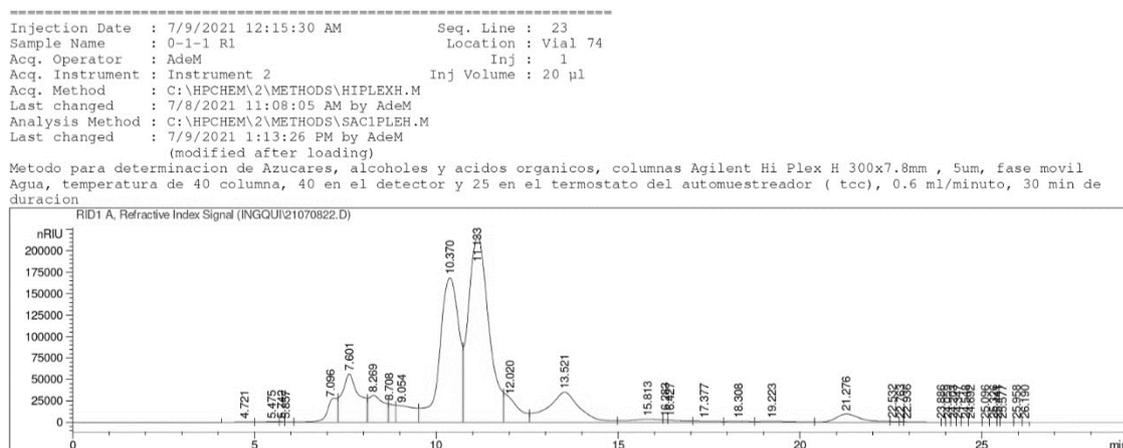


Figura 114. Cromatograma HPLC de la muestra 0,-1,1 (réplica 1) diluida al 30% v/v.

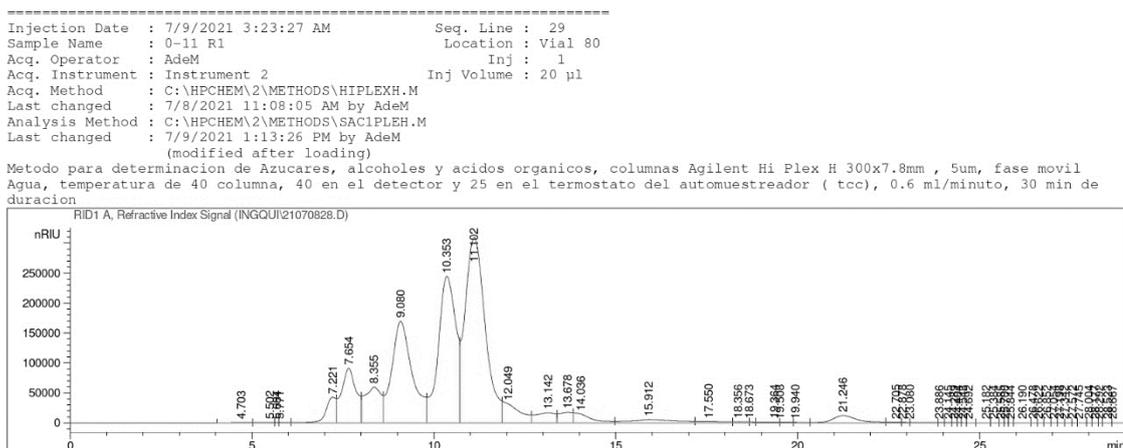


Figura 115. Cromatograma HPLC de la muestra 0,-1,1 (réplica 2) diluida al 30% v/v.

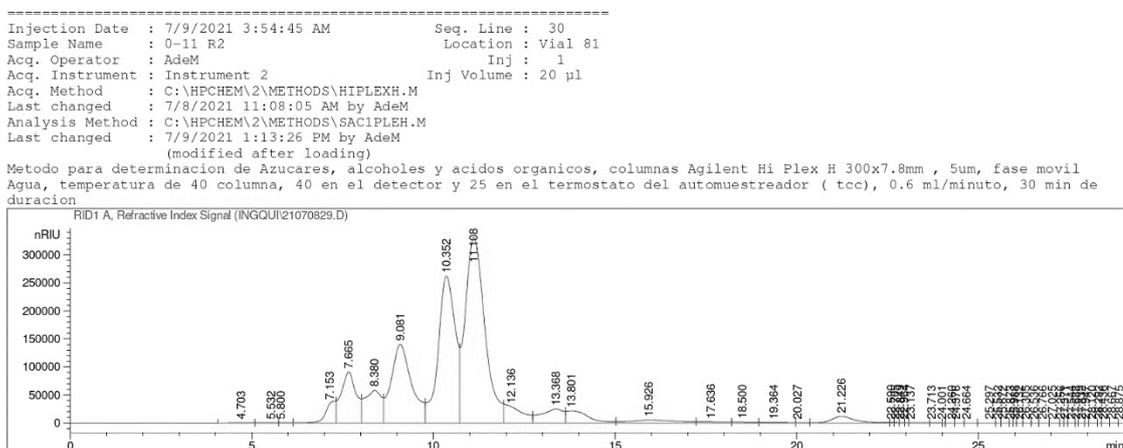


Figura 116. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 1) diluida al 30% v/v.

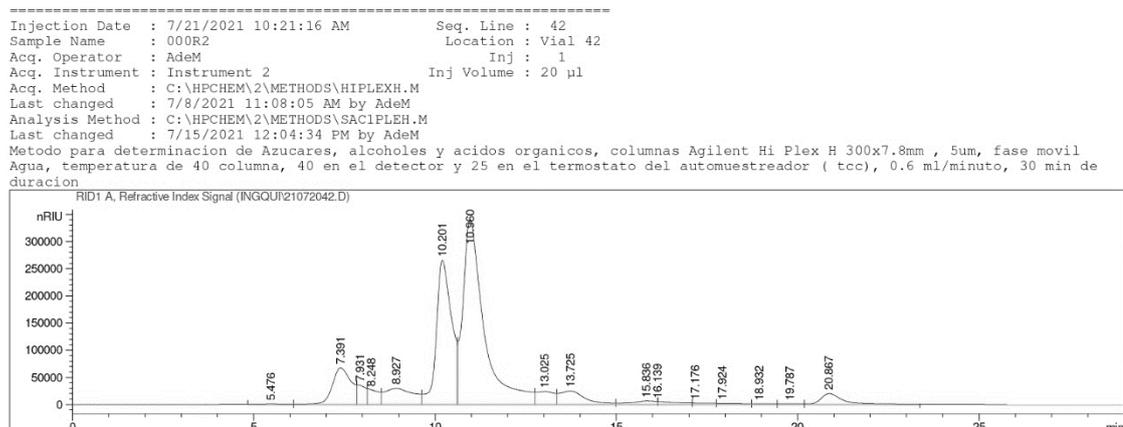


Figura 117. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 2) diluida al 30% v/v.

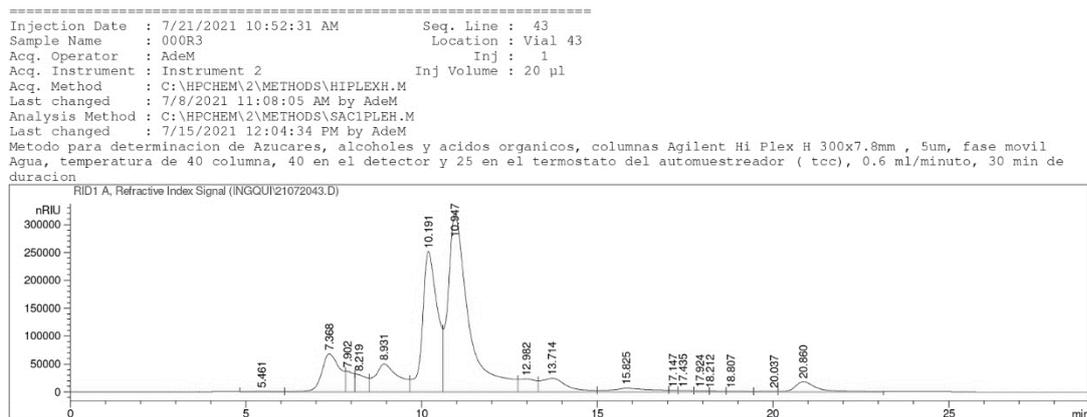


Figura 118. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 3) diluida al 30% v/v.

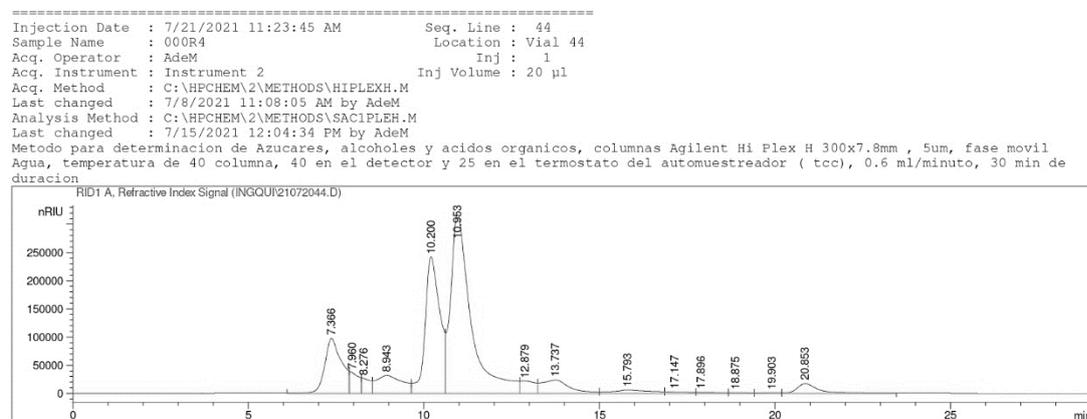


Figura 119. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 4) diluida al 30% v/v.

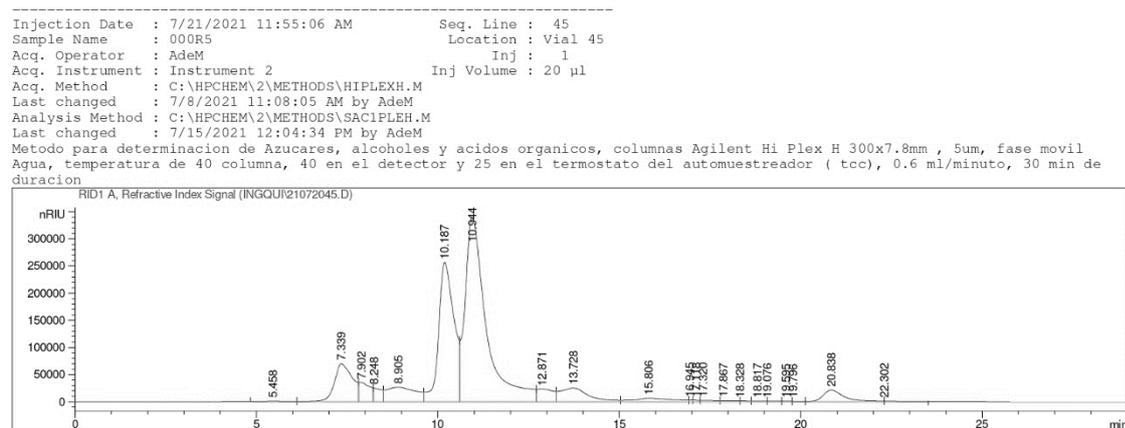


Figura 120. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 5) diluida al 30% v/v.

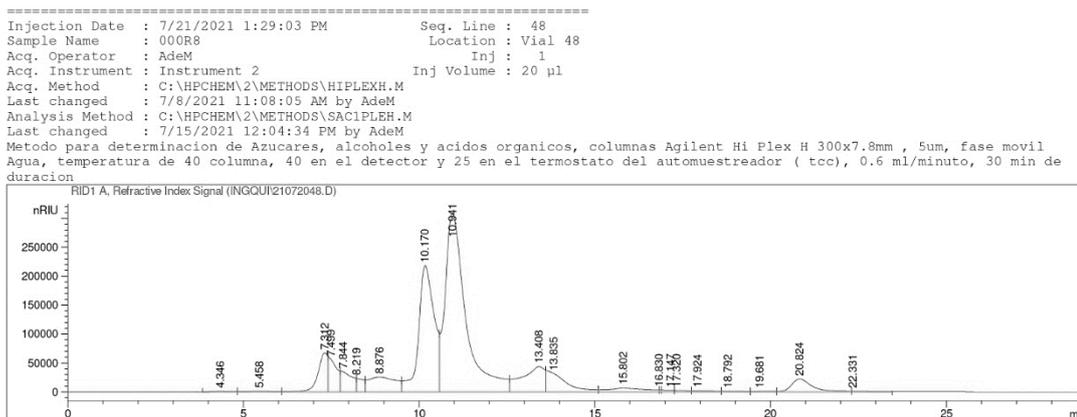


Figura 121. Cromatograma HPLC de la muestra 0,0,0 (réplica 6) diluida al 30% v/v.

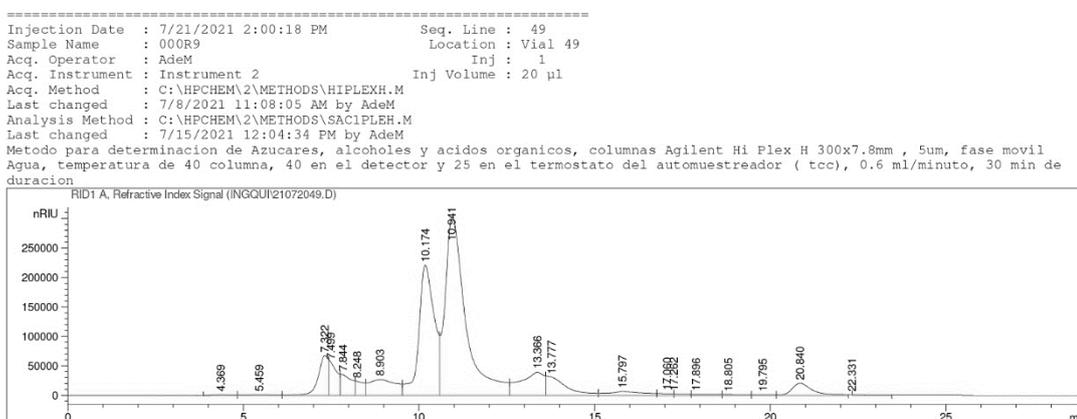


Figura 122. Cromatograma HPLC de la muestra 0,1,-1 (réplica 1) diluida al 30% v/v.

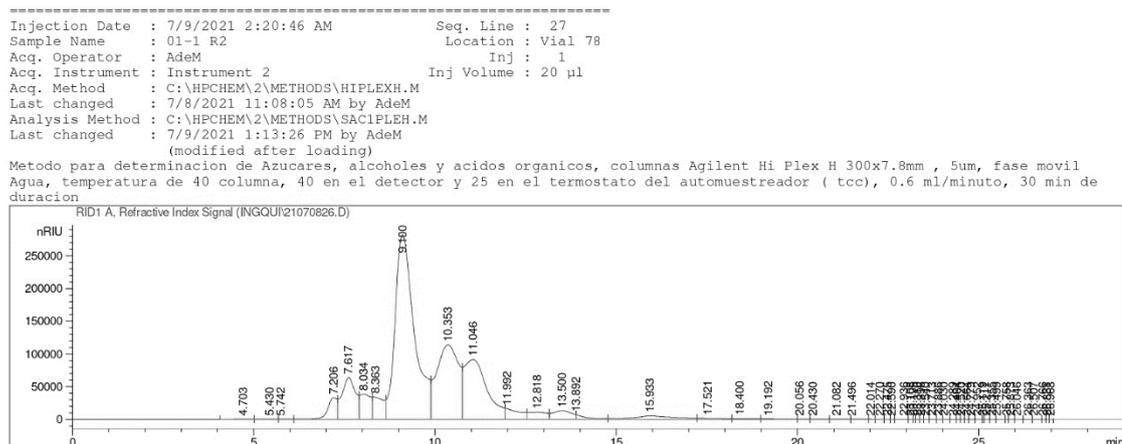


Figura 123. Cromatograma HPLC de la muestra 0,1,-1 (réplica 2) diluida al 30% v/v.

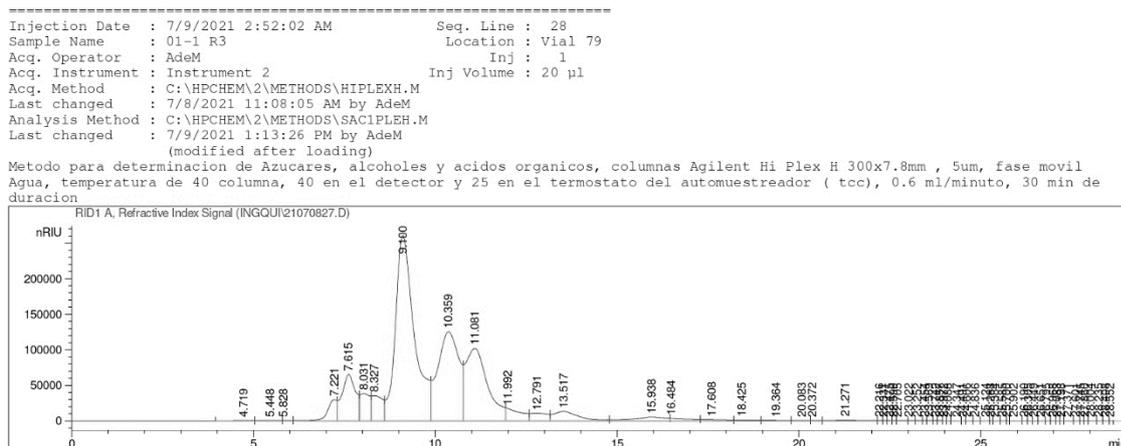


Figura 124. Cromatograma HPLC de la muestra 0,1,1 (réplica 1) diluida al 30% v/v.

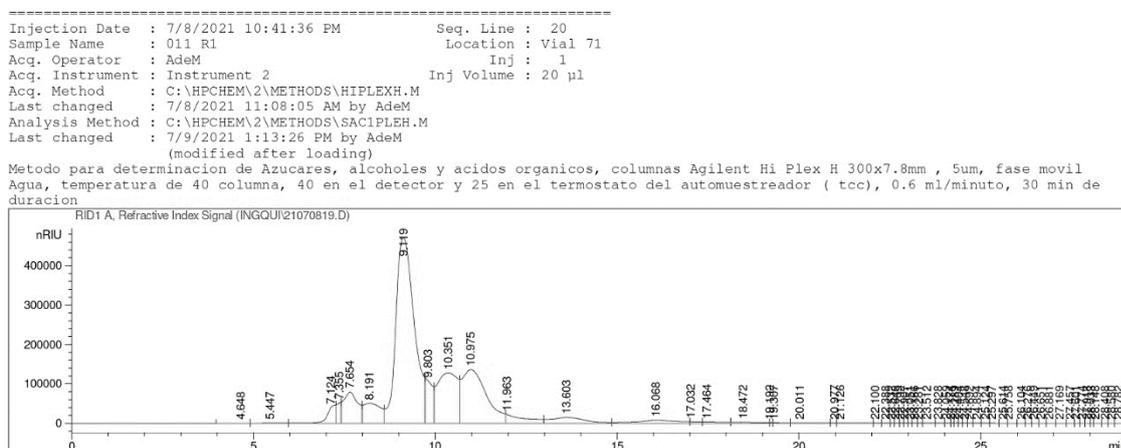


Figura 125. Cromatograma HPLC de la muestra 0,1,1 (réplica 2) diluida al 30% v/v.

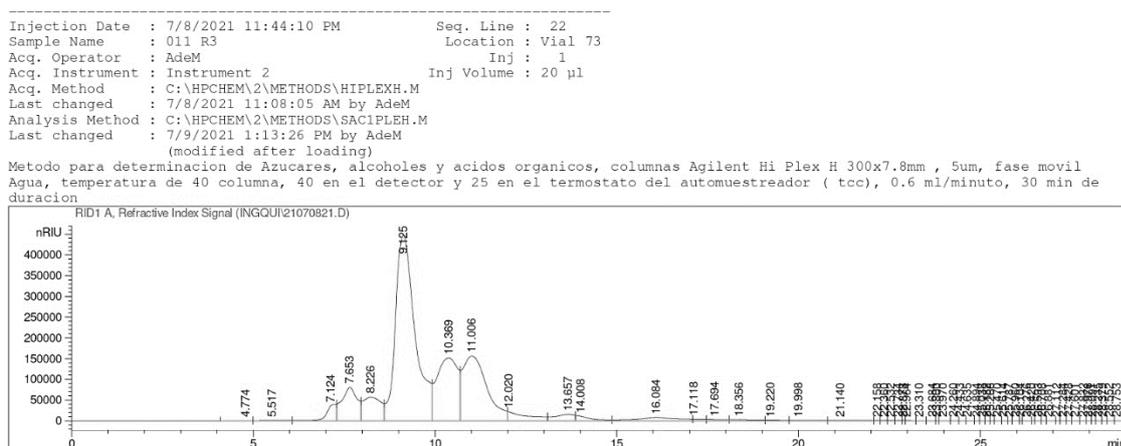


Figura 126. Cromatograma HPLC de la muestra 1,-1,0 (réplica 1) diluida al 30% v/v.

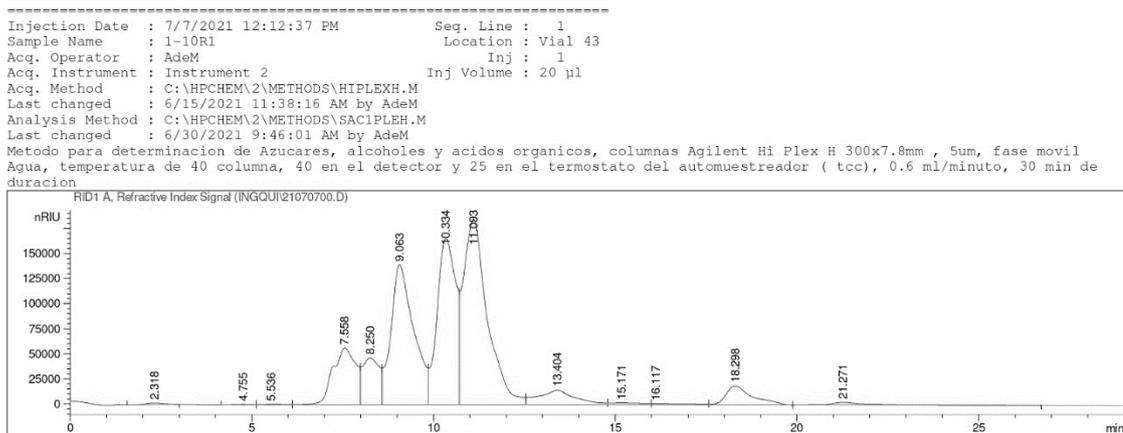


Figura 127. Cromatograma HPLC de la muestra 1,-1,0 (réplica 2) diluida al 30% v/v.

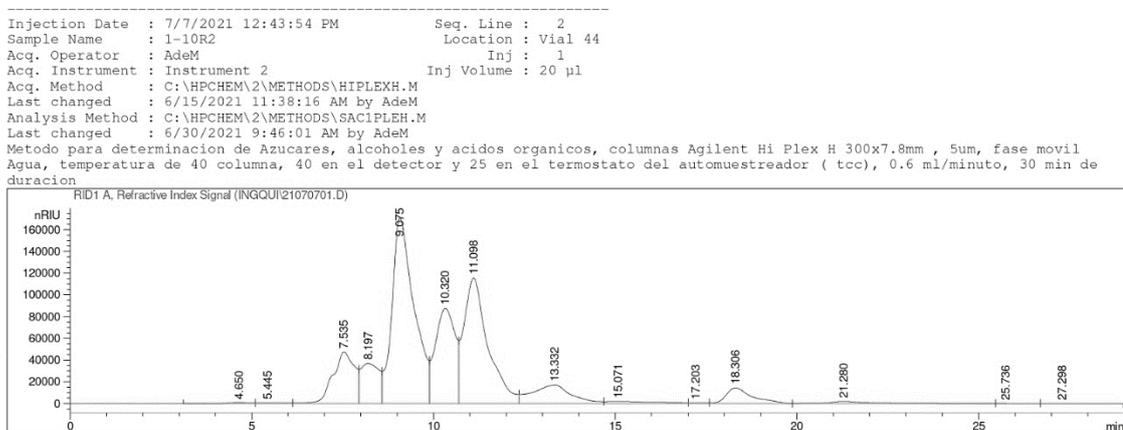


Figura 128. Cromatograma HPLC de la muestra 1,0,-1 (réplica 1) diluida al 30% v/v.

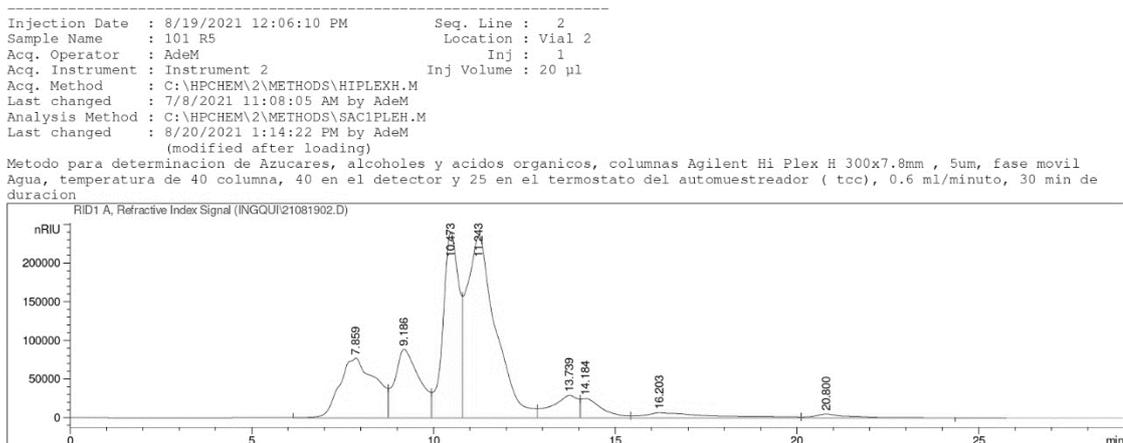


Figura 129. Cromatograma HPLC de la muestra 1,0,-1 (réplica 2) diluida al 30% v/v.

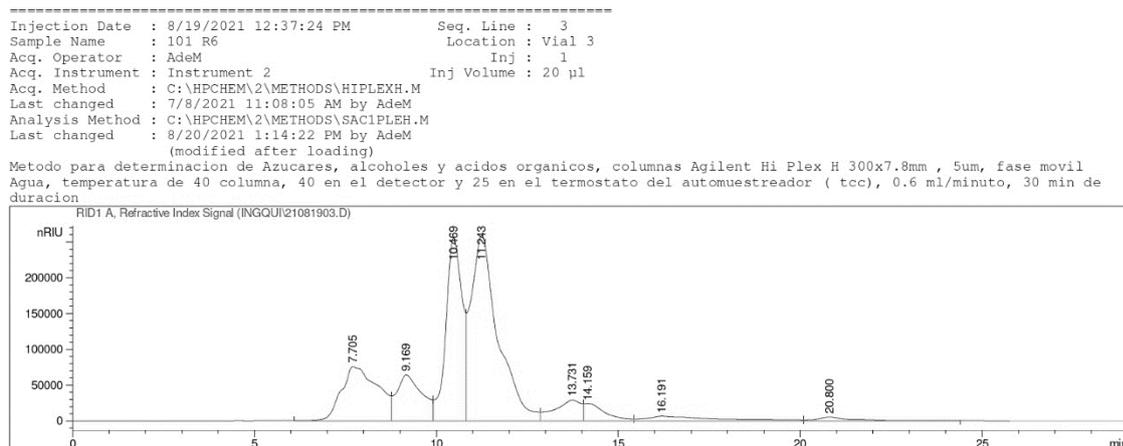


Figura 130. Cromatograma HPLC de la muestra 1.0,1 (réplica 1) diluida al 30% v/v.

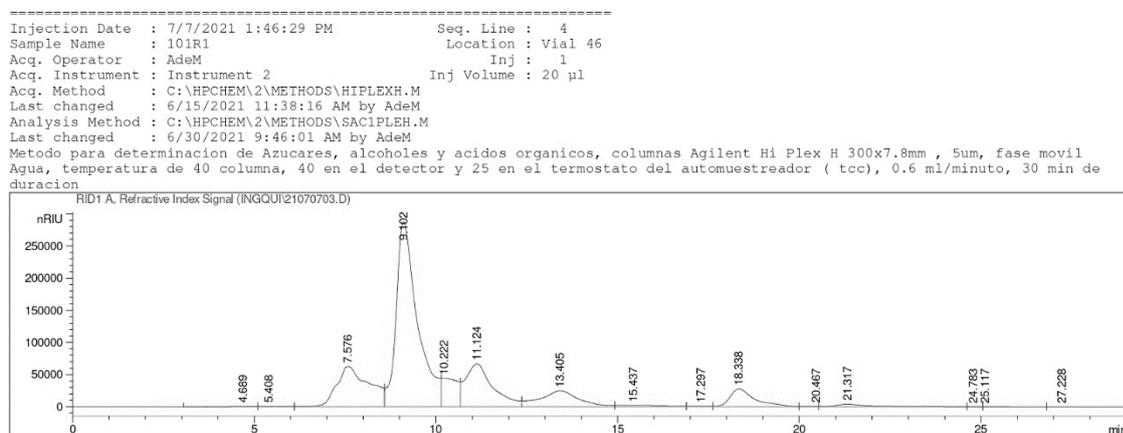


Figura 131. Cromatograma HPLC de la muestra 1,0,1 (réplica 2) diluida al 30% v/v.

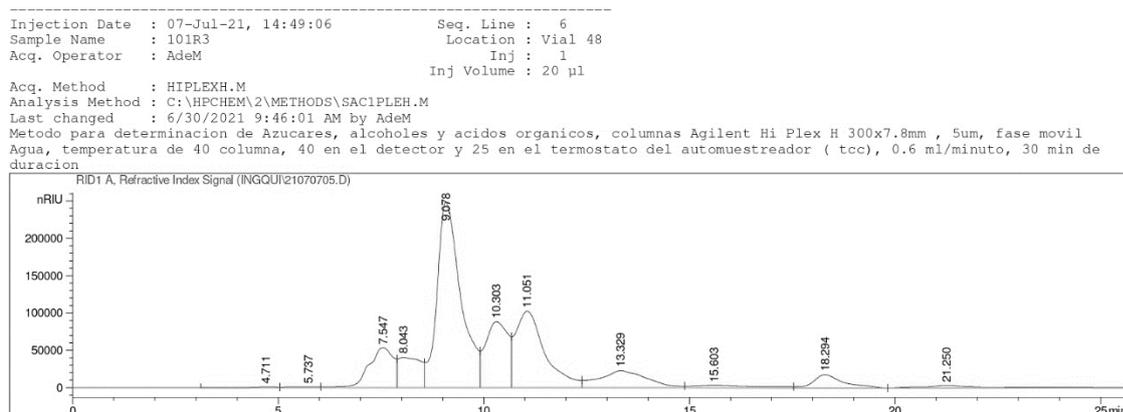


Figura 132. Cromatograma HPLC de la muestra 1,1,0 (réplica 1) diluida al 30% v/v.

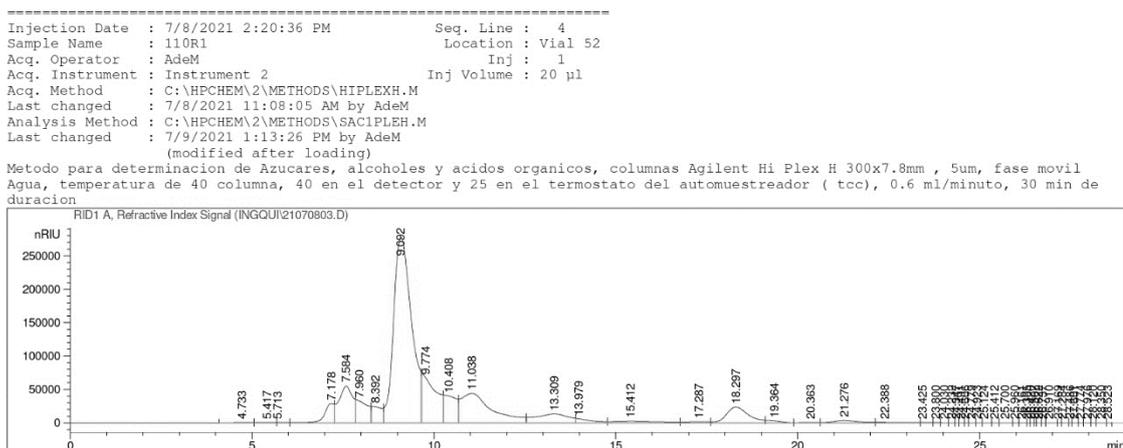


Figura 133. Cromatograma HPLC de la muestra 1,1,0 (réplica 2) diluida al 30% v/v.

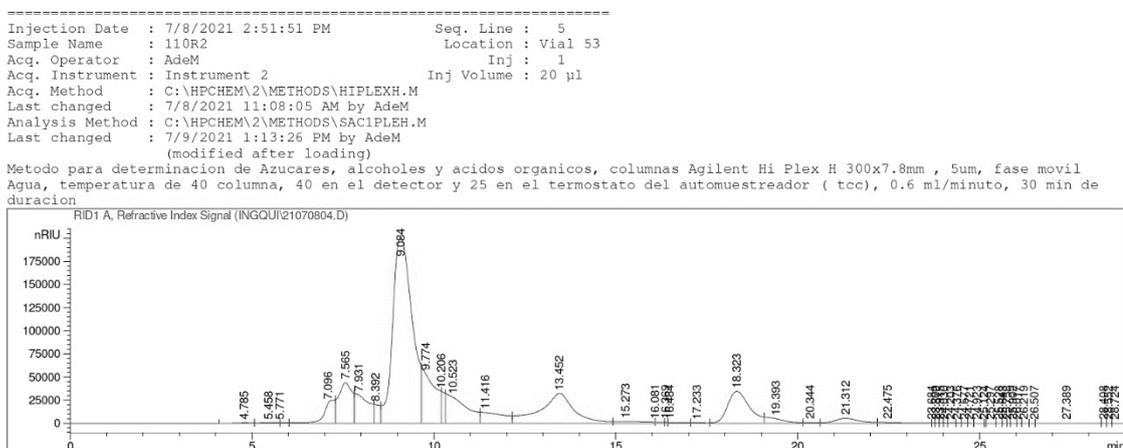


Figura 134. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 1) diluida al 30% v/v.

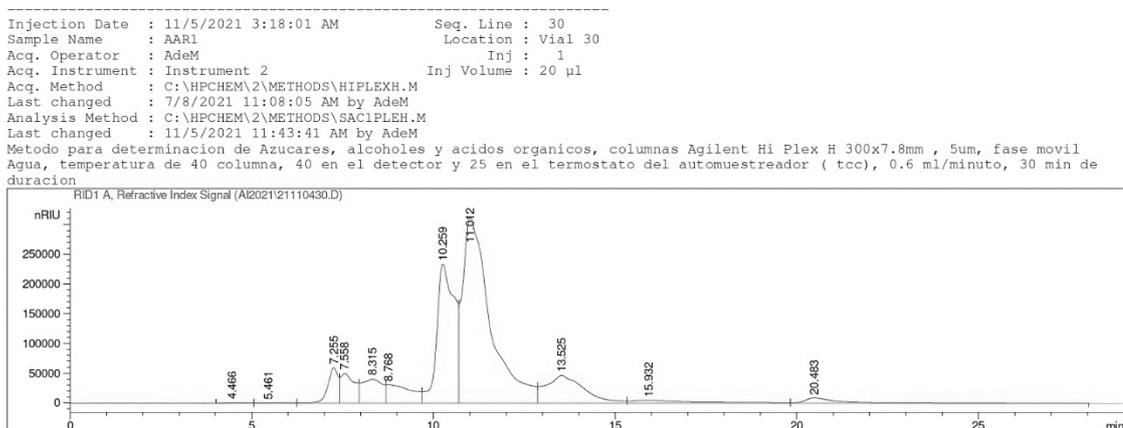


Figura 135. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 2) diluida al 30% v/v.

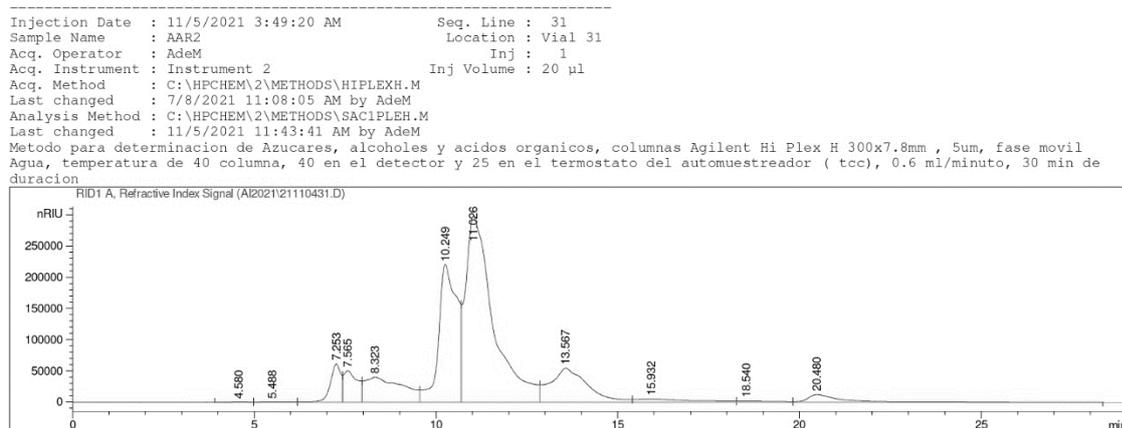


Figura 136. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 3) diluida al 30% v/v.

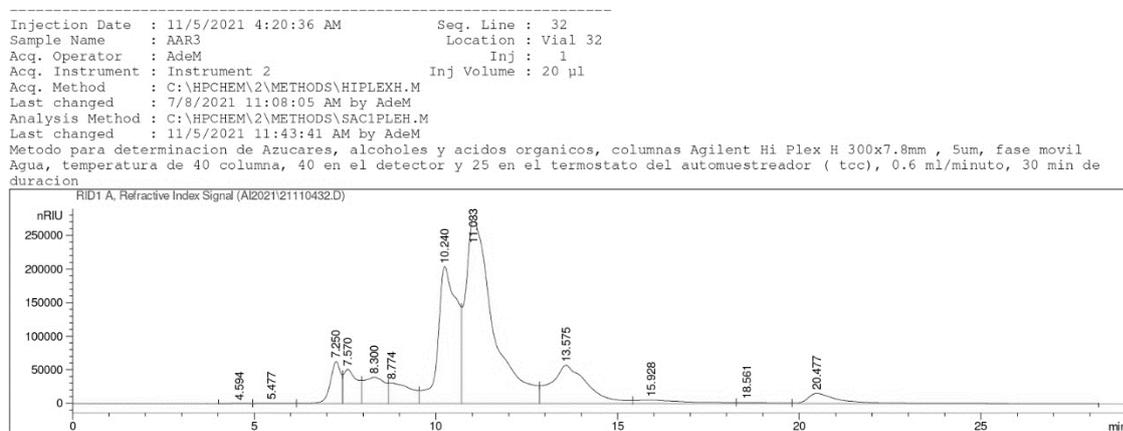


Figura 137. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 4) diluida al 30% v/v.

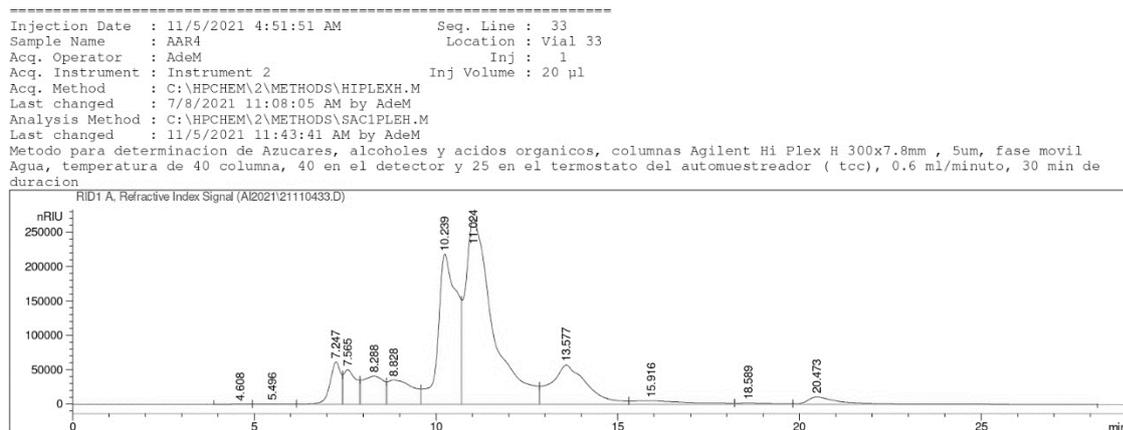


Figura 138. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 5) diluida al 30% v/v.

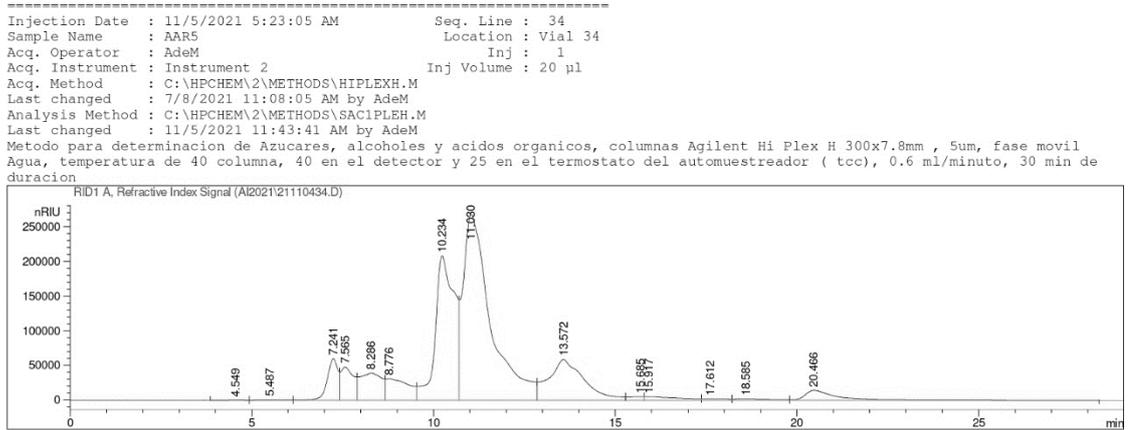


Figura 139. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 6) diluida al 30% v/v.

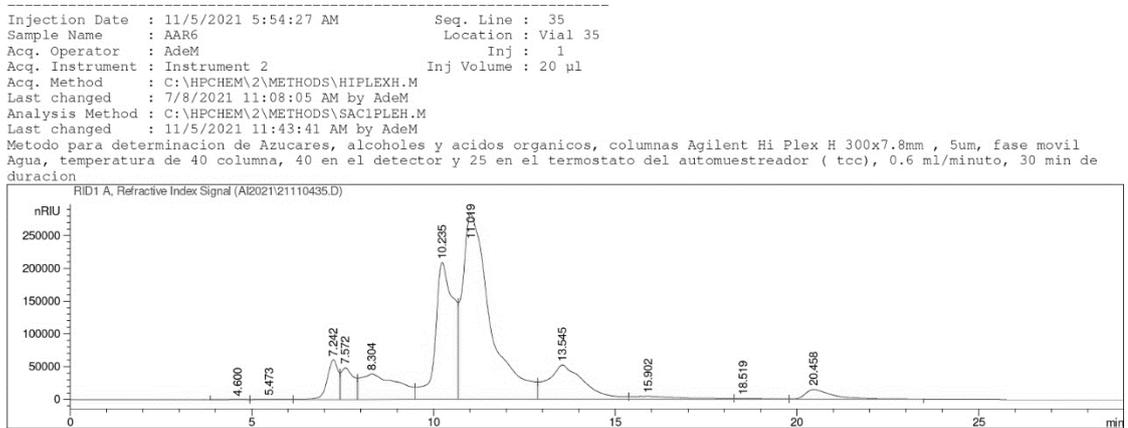


Figura 140. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 7) diluida al 30% v/v.

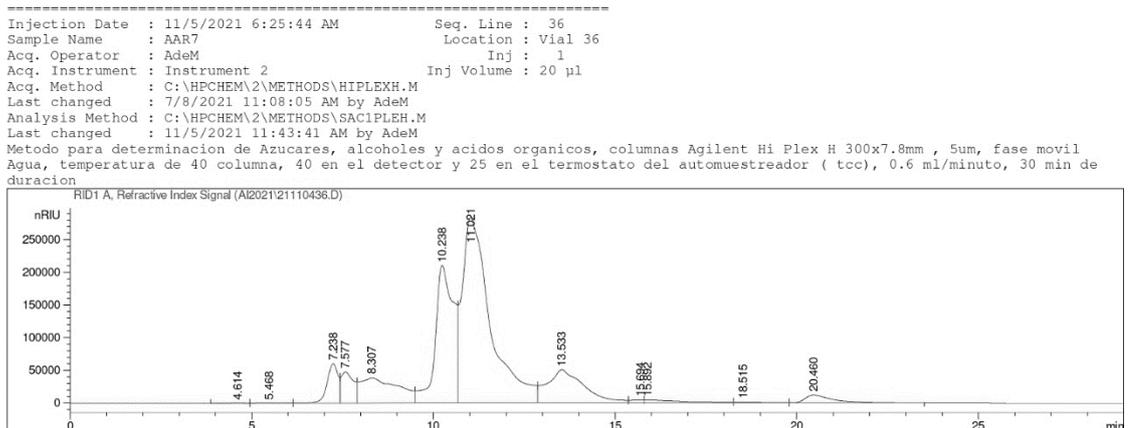


Figura 141. Cromatograma HPLC de la muestra AcLacMax (réplica 8) diluida al 30% v/v.

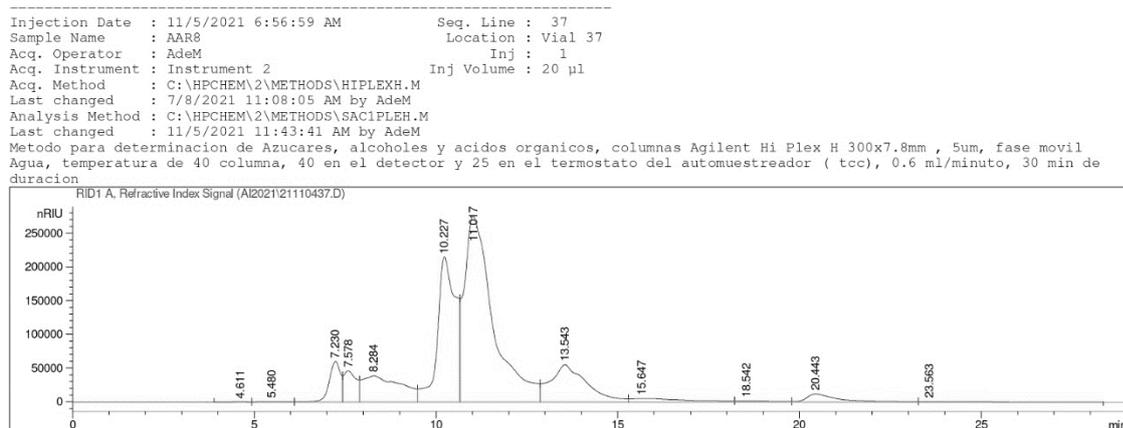


Figura 142. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 1) diluida al 30% v/v.

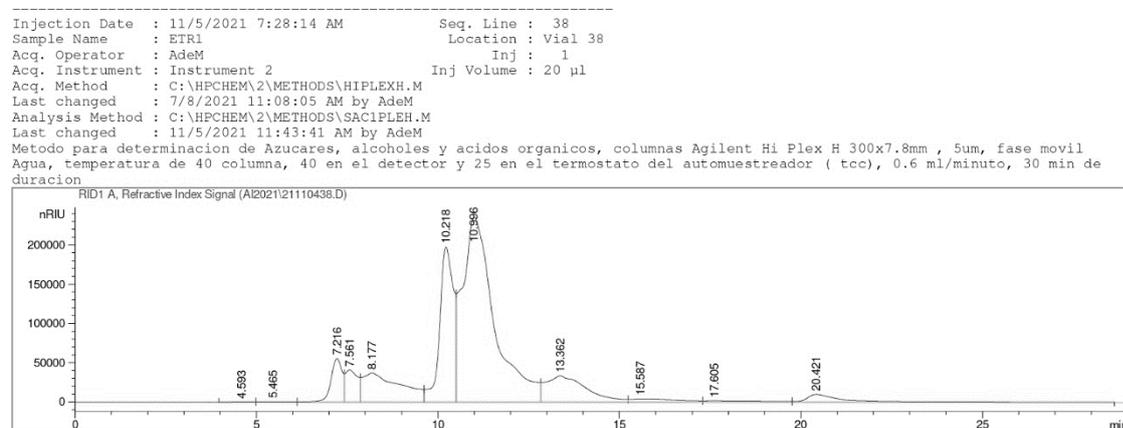


Figura 143. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 2) diluida al 30% v/v.

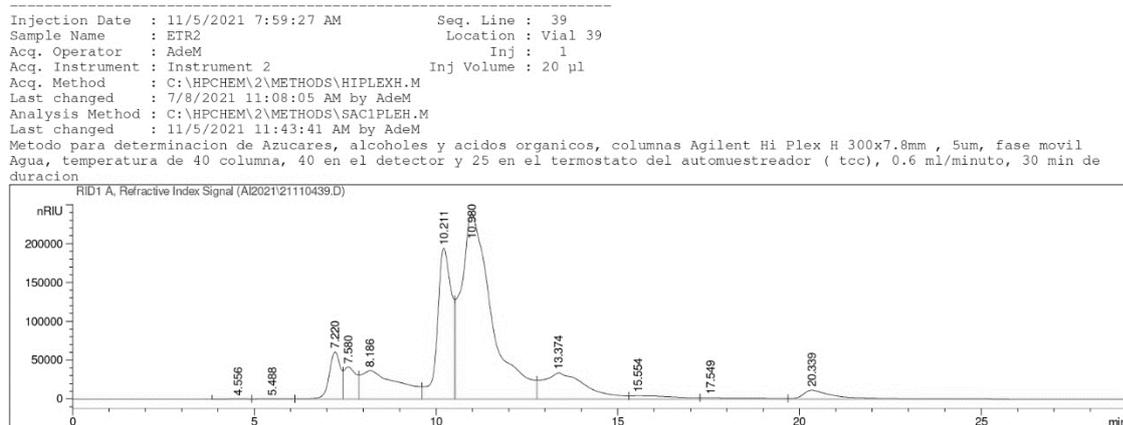


Figura 144. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 3) diluida al 30% v/v.

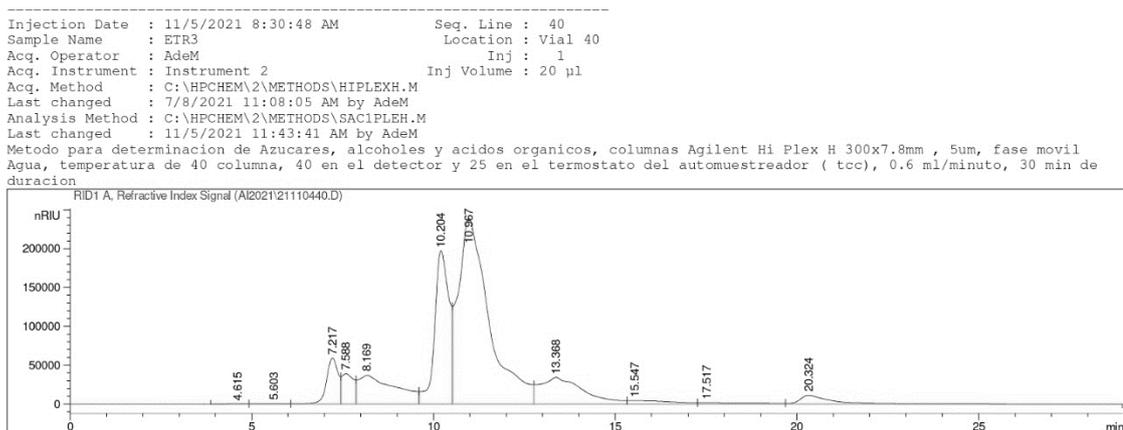


Figura 145. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 4) diluida al 30% v/v.

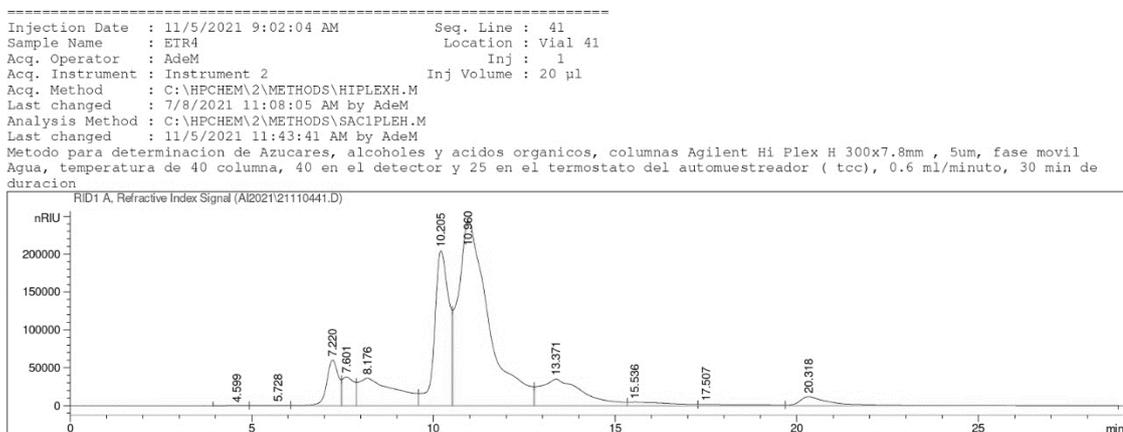


Figura 146. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 5) diluida al 30% v/v.

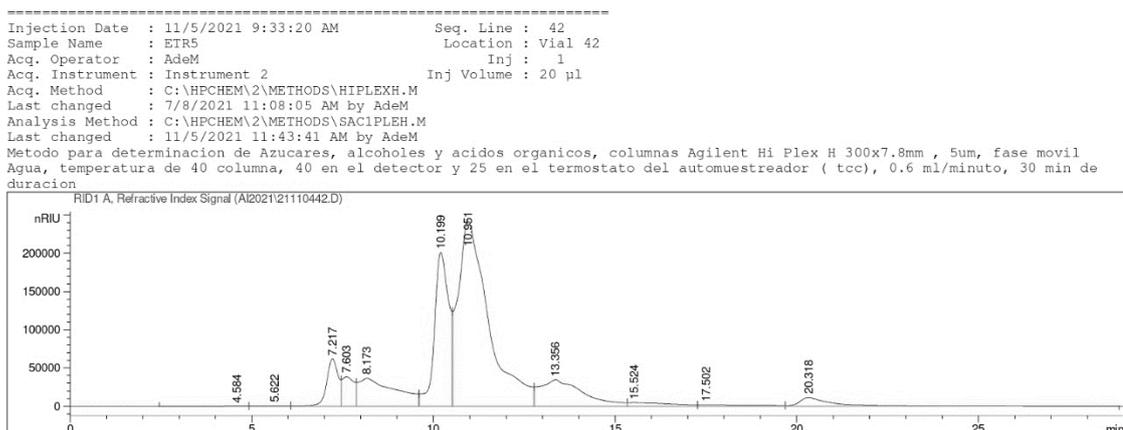


Figura 147. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 6) diluida al 30% v/v.

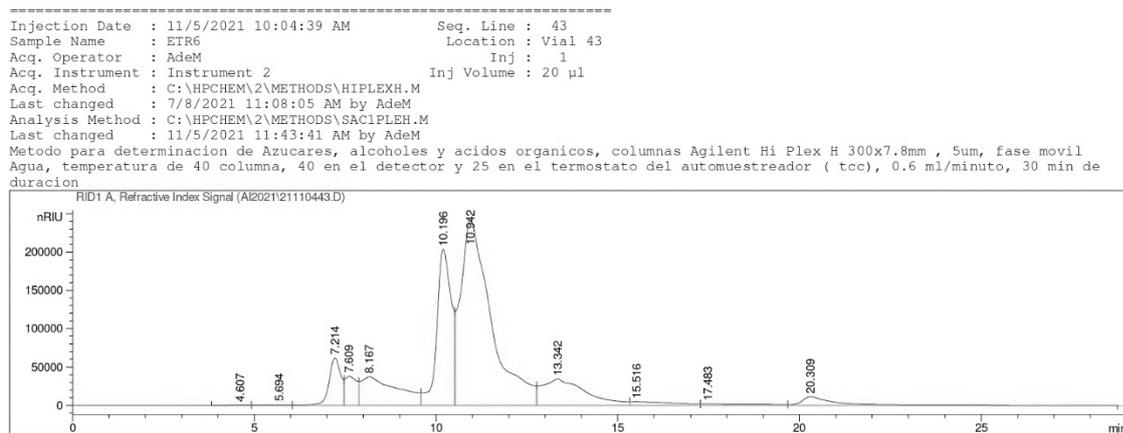


Figura 148. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 7) diluida al 30% v/v.

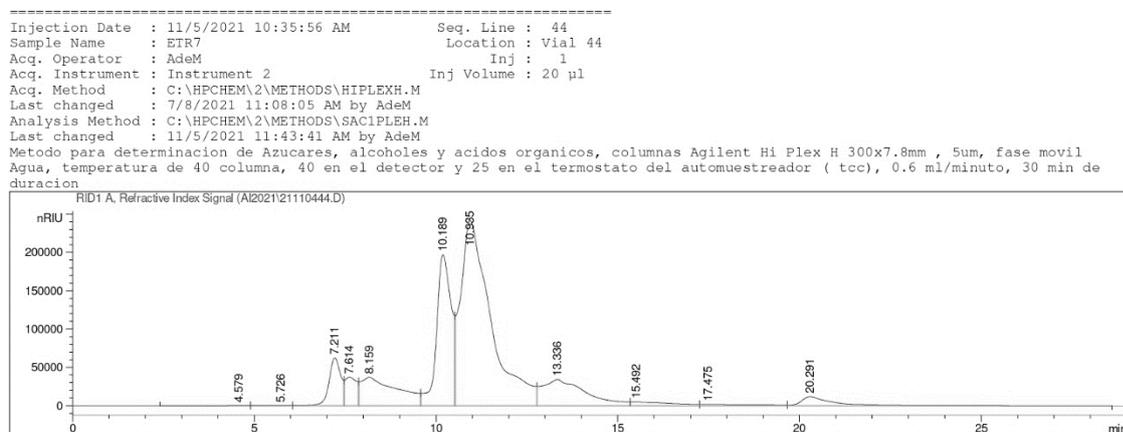


Figura 149. Cromatograma HPLC de la muestra EtMax (réplica 8) diluida al 30% v/v.

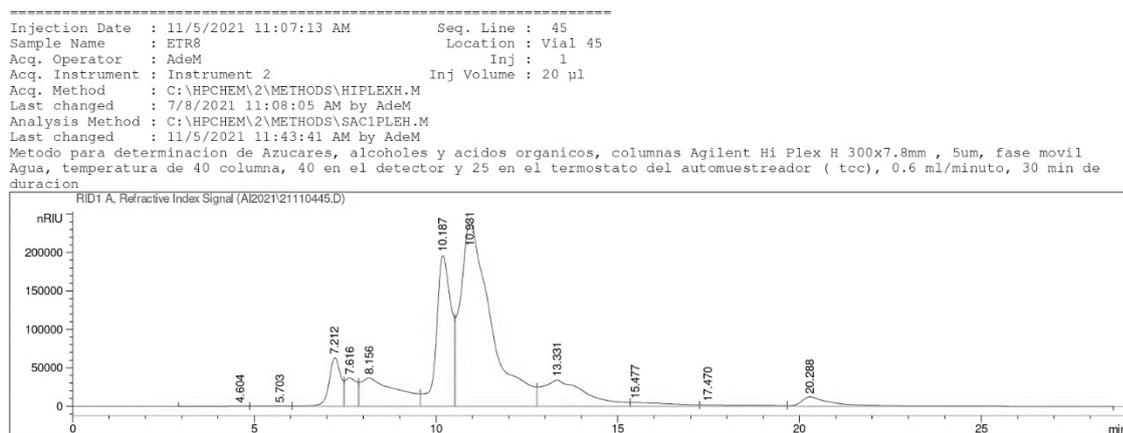


Figura 150. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 1) diluida al 30% v/v.

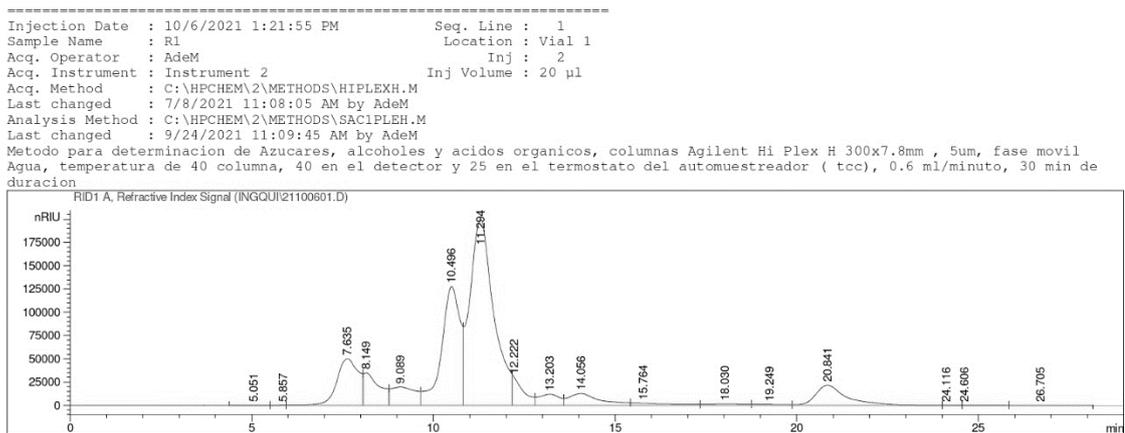


Figura 151. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 2) diluida al 30% v/v.

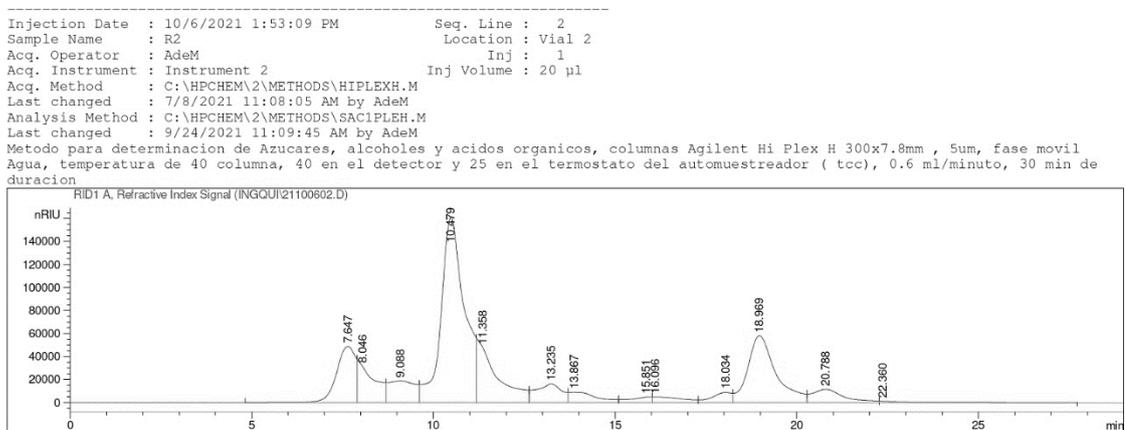


Figura 152. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 3) diluida al 30% v/v.

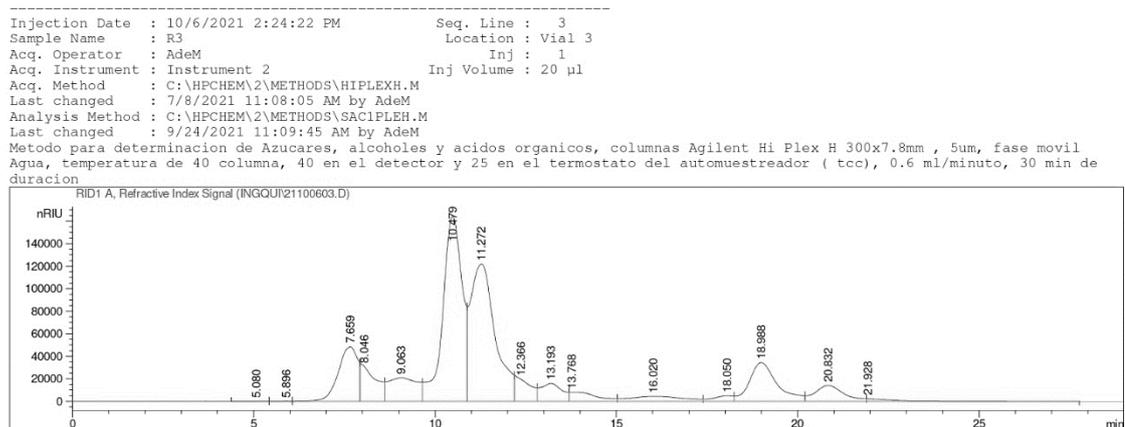


Figura 153. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 4) diluida al 30% v/v.

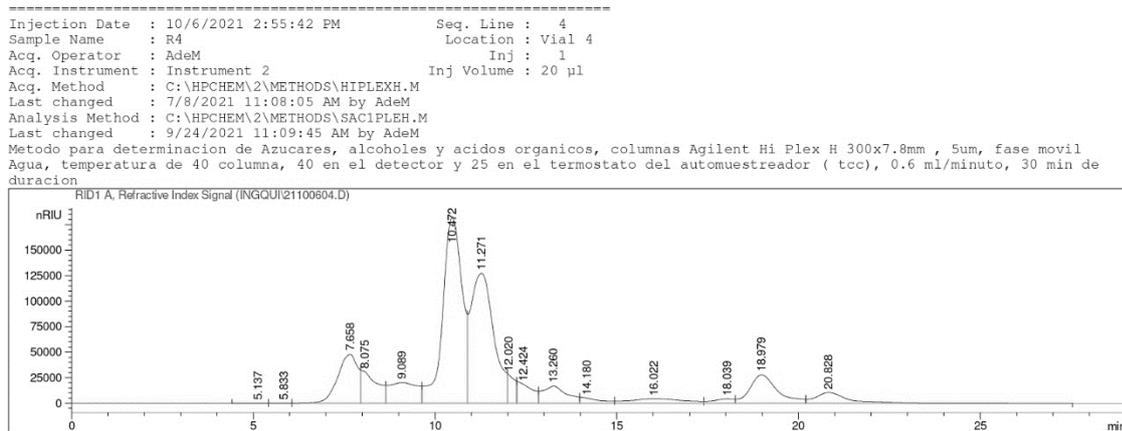


Figura 154. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 5) diluida al 30% v/v.

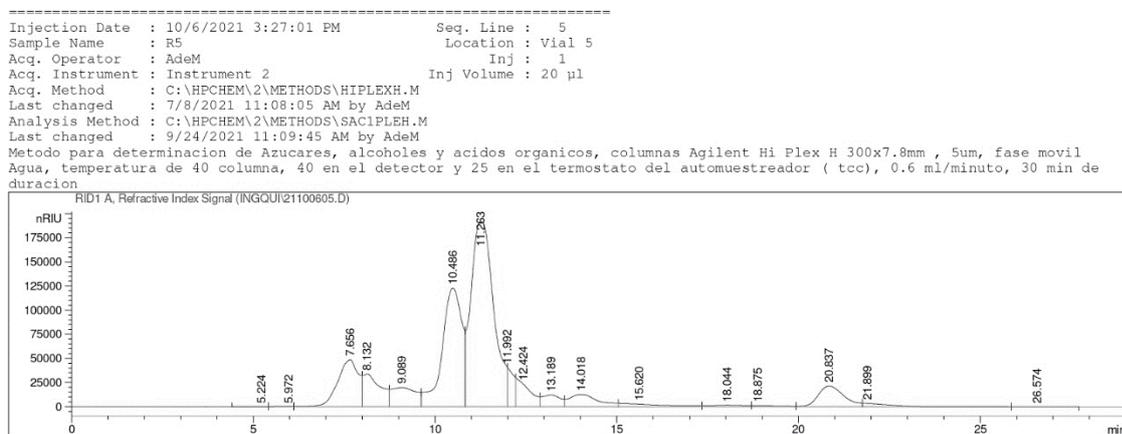


Figura 155. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 6) diluida al 30% v/v.

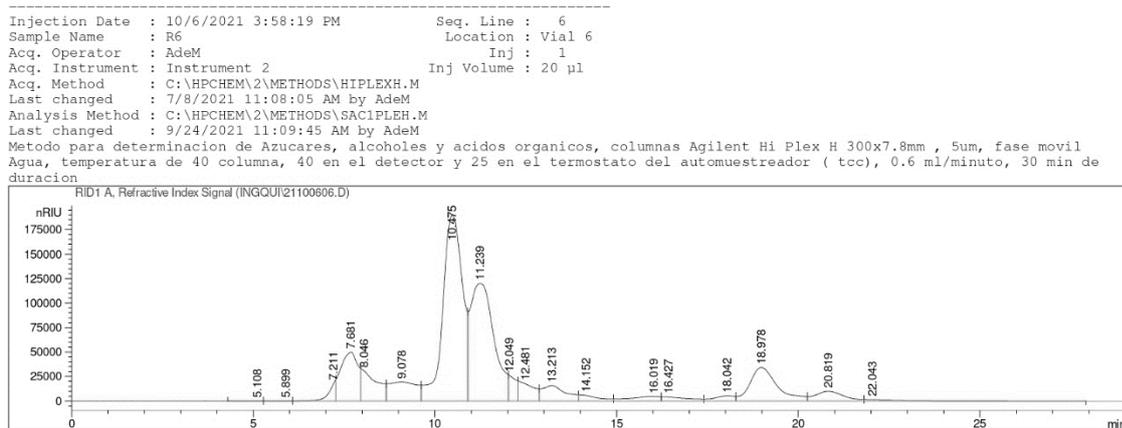


Figura 156. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 7) diluida al 30% v/v.

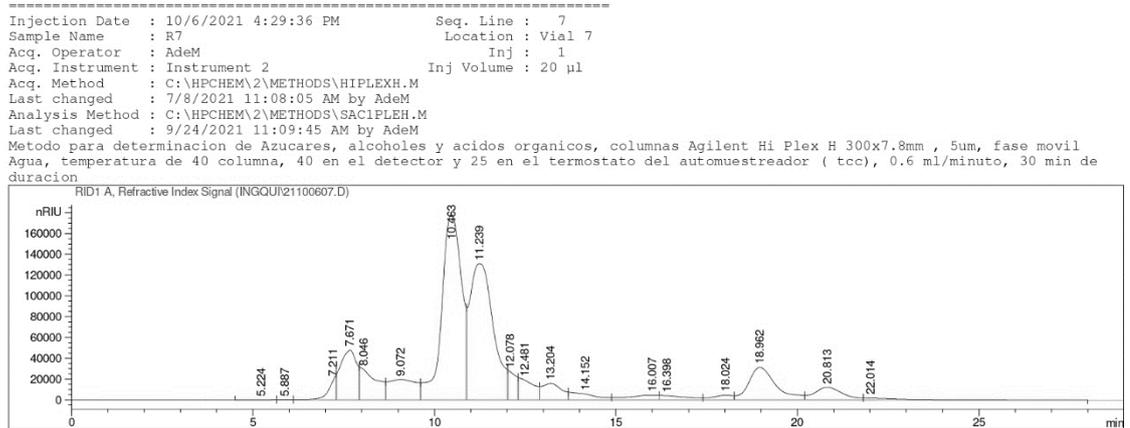


Figura 157. Cromatograma HPLC de la muestra AcAcMax (réplica 8) diluida al 30% v/v.

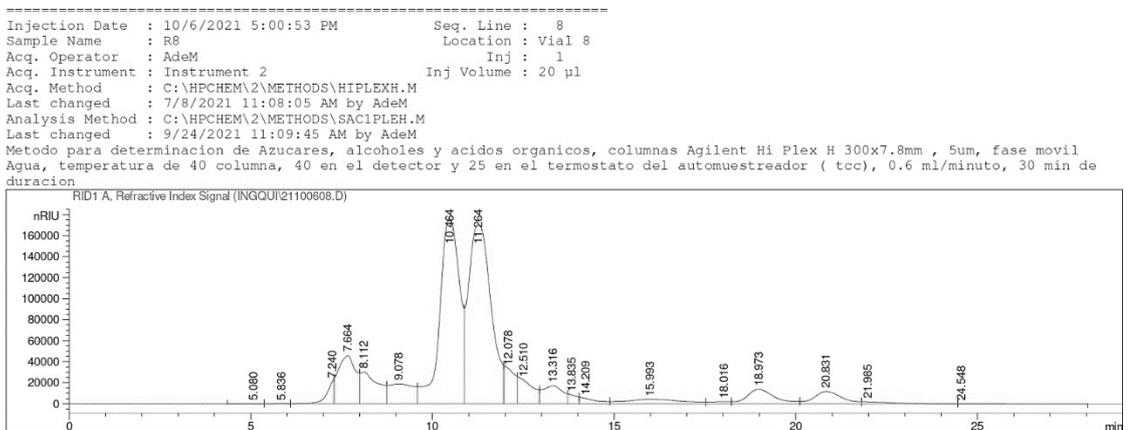


Figura 158. Biomasa en peso seco de la fermentación -1,-1,0 (réplica 1).



Figura 159. Biomasa en peso seco de la fermentación -1,-1,0 (réplica 2).



Figura 160. Biomasa en peso seco de la fermentación -1,0,-1 (réplica 1).



Figura 161. Biomasa en peso seco de la fermentación -1,0,-1 (réplica 2).

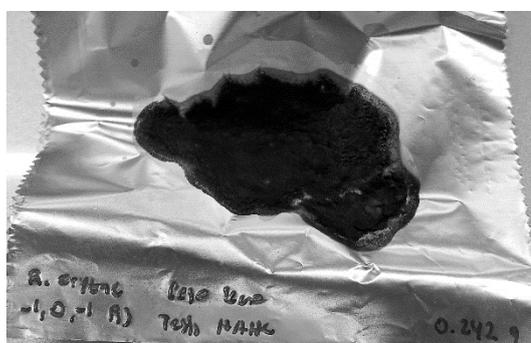


Figura 162. Biomasa en peso seco de la fermentación -1,0,1 (réplica 1).



Figura 163. Biomasa en peso seco de la fermentación -1,0,1 (réplica 2).



Figura 164. Biomasa en peso seco de la fermentación -1,1,0 (réplica 1).



Figura 165. Biomasa en peso seco de la fermentación -1,1,0 (réplica 2).



Figura 166. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,-1,-1 (réplica 1)

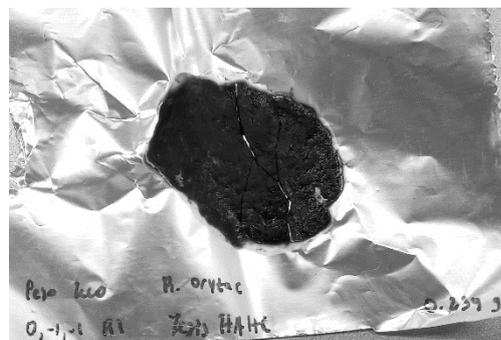


Figura 167. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,-1,-1 (réplica 2).



Figura 168. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,-1,1 (réplica 1).



Figura 169. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,-1,1 (réplica 2).



Figura 170. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,0,0 (réplica 1).



Figura 171. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,0,0 (réplica 2).



Figura 172. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,0,0 (réplica 3).



Figura 173. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,0,0 (réplica 4).



Figura 174. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,0,0 (réplica 5).

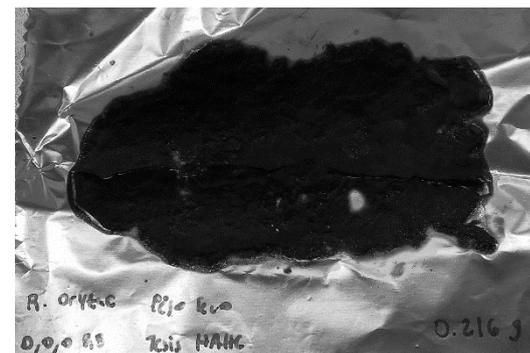


Figura 175. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,0,0 (réplica 6)

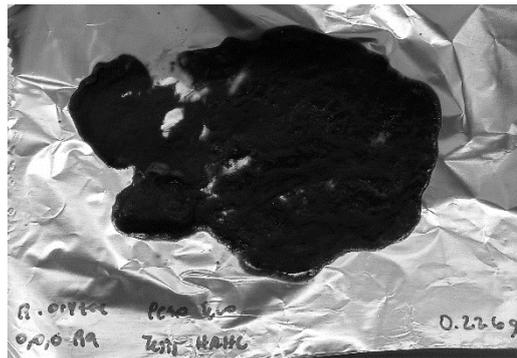


Figura 176. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,1,-1 (réplica 1)



Figura 177. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,1,-1 (réplica 2).



Figura 178. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,1,1 (réplica 1).



Figura 179. Biomasa en peso seco de la fermentación 0,1,1 (réplica 2).



Figura 180. Biomasa en peso seco de la fermentación 1,-1,0 (réplica 1).

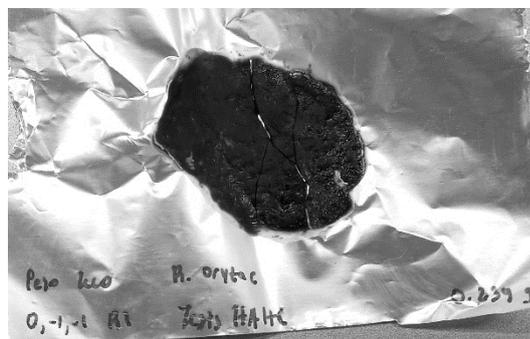


Figura 181. Biomasa en peso seco de la fermentación 1,-1,0 (réplica 2).



Figura 182. Biomasa en peso seco de la fermentación 1,0,-1 (réplica 1).



Figura 183. Biomasa en peso seco de la fermentación 1,0,-1 (réplica 2).



Figura 184. Biomasa en peso seco de la fermentación 1,0,1 (réplica 1).

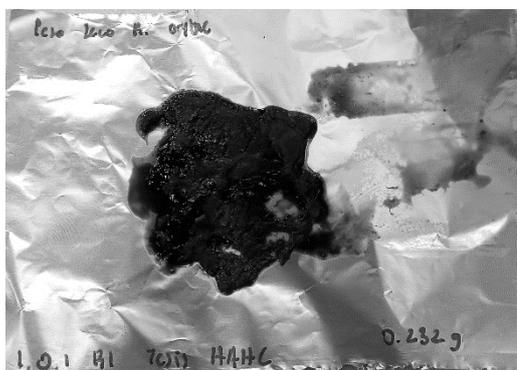


Figura 185. Biomasa en peso seco de la fermentación 1,0,1 (réplica 2).



Figura 186. Biomasa en peso seco de la fermentación 1,1,0 (réplica 1).



Figura 187. Biomasa en peso seco de la fermentación 1,1,0 (réplica 2).



Figura 188. Biomasa en peso seco de la fermentación AcLacMax (réplica 1).



Figura 189. Biomasa en peso seco de la fermentación AcLacMax (réplica 2).



Figura 190. Biomasa en peso seco de la fermentación AcLacMax (réplica 3).



Figura 191. Biomasa en peso seco de la fermentación AcLacMax (réplica 4).



Figura 192. Biomasa en peso seco de la fermentación AcLacMax (réplica 5).



Figura 193. Biomasa en peso seco de la fermentación AcLacMax (réplica 6).



Figura 194. Biomasa en peso seco de la fermentación AcLacMax (réplica 7).

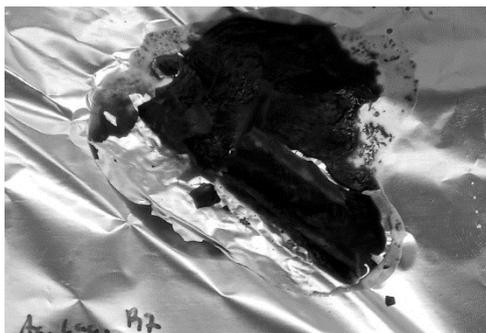


Figura 195. Biomasa en peso seco de la fermentación AcLacMax (réplica 8).



Figura 196. Biomasa en peso seco de la fermentación EtMax (réplica 1).

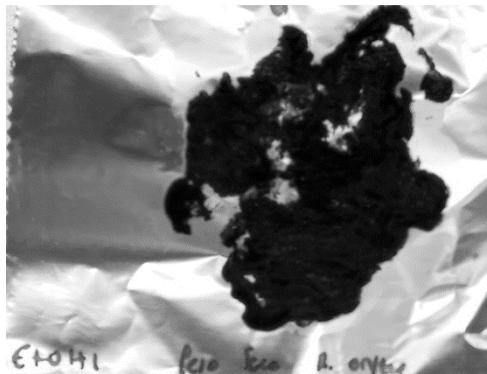


Figura 197. Biomasa en peso seco de la fermentación EtMax (réplica 2).



Figura 198. Biomasa en peso seco de la fermentación EtMax (réplica 3).



Figura 199. Biomasa en peso seco de la fermentación EtMax (réplica 4).

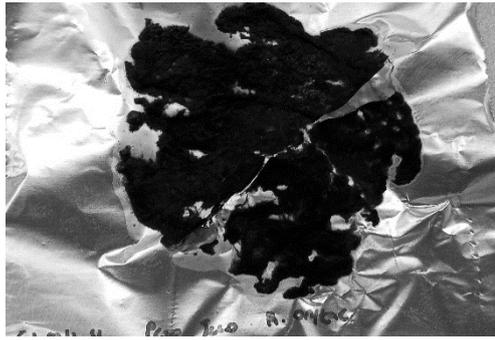


Figura 200. Biomasa en peso seco de la fermentación EtMax (réplica 5).



Figura 201. Biomasa en peso seco de la fermentación EtMax (réplica 6).

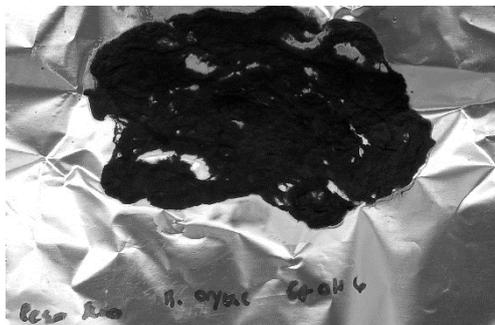


Figura 202. Biomasa en peso seco de la fermentación EtMax (réplica 7).



Figura 203. Biomasa en peso seco de la fermentación EtMax (réplica 8).

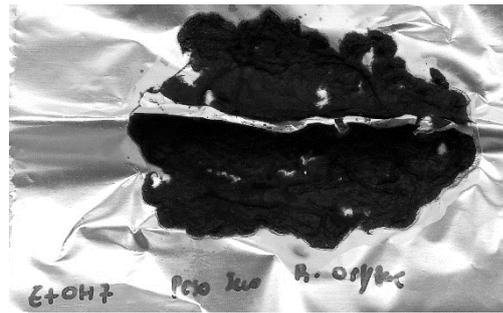


Figura 204. Biomasa en peso seco de la fermentación AcAcMax (réplica 1).



Figura 205. Biomasa en peso seco de la fermentación AcAcMax (réplica 2).



Figura 206. Biomasa en peso seco de la fermentación AcAcMax (réplica 3).



Figura 207. Biomasa en peso seco de la fermentación AcAcMax (réplica 4).

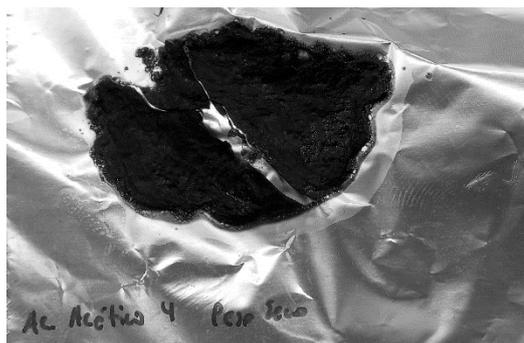


Figura 208. Biomasa en peso seco de la fermentación AcAcMax (réplica 5).



Figura 209. Biomasa en peso seco de la fermentación AcAcMax (réplica 6).

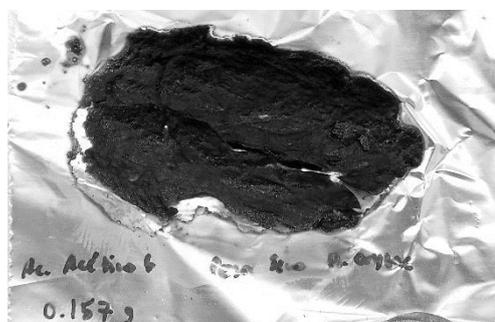
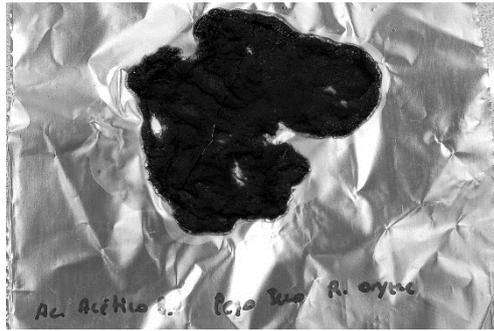


Figura 210. Biomasa en peso seco de la fermentación AcAcMax (réplica 7).



Figura 211. Biomasa en peso seco de la fermentación AcAcMax (réplica 8).



XIII. GLOSARIO

HPLC: Técnica analítica usada para identificar y cuantificar compuestos basada en la cromatografía de columna en la cual la fase móvil es un líquido forzado a pasar a través de una fase estacionaria mediante presión.

Caldo Sabouraud: Medio líquido utilizado para el cultivo de levaduras, mohos y microorganismos acidúricos. La alta concentración de dextrosa y el pH ácido hacen que este medio sea selectivo para los hongos de muestras clínicas y otros materiales.

Agar PDA: Medio de cultivo microbiológico que se preparan a partir de infusión de patata y dextrosa, recomendado para cultivar levaduras y mohos.