TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES

CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

"PRODUCCION DE BIOETANOL POR FERMENTACION A PARTIR DE RESIDUOS ORGANICOS AGROINDUSTRIALES DE MANDARINA UTILIZANDO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y *ZYMOMONAS MOBILIS*"

Tesis para optar el título profesional de:

INGENIERA AMBIENTAL

Presentado por:

Nilda María Pérez Sandoval (0000-0002-3337-045X)

Asesor:

Luis Gomero Osorio (0000-0002-4739-2094)

Co-Asesor:

Oscar Reategui Arévalo (0000-0001-9773-2176)

Lima – Perú

2022

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 06 de enero del 2023.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Dr. Blgo. Miguel Fernández Sampedro
Miembro: Mg. Blga Wendy Elizabeth Pérez Porras
Miembro: Mg. Ing. Marisol Nuñez Martinez

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:

"PRODUCCION DE BIOETANOL POR FERMENTACION A PARTIR DE RESIDUOS ORGANICOS AGROINDUSTRIALES DE MANDARINA UTILIZANDO *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*"

Presentada por la/el estudiante/bachiller:

- **Nilda María Perez Sandoval**

Para optar el Título Profesional de Ingeniero Ambiental

Asesorado por: Ing. Luis Gomero Osorio y Co-asesorado por: Oscar Reategui Arévalo

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño del estudiante de la carrera de Ingeniería Ambiental en la sustentación, concluyen de manera unánime (x) por mayoría simple ( ) calificar a:

Tesista: Nilda María Perez Sandoval			Nota (en letras): (Catorce) 14
Aprobado (X)	Aprobado - Muy buena ( )	Aprobado - Sobresaliente ( )	Desaprobado ( )

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.

Dr. Blgo. Miguel Fernández Sampedro
Presidente

Mg. Blga Wendy Elizabeth Pérez Porras
Miembro 1

Mg. Ing. Marisol Nuñez Martinez
Miembro 2

Ing. Luis Gomero Osorio
Asesor

Mg. Ing. Oscar Reategui Arévalo
Co-asesor

T // (511) 610 6738
informes@cientifica.edu.pe
cientifica.edu.pe

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

ANEXO: FORMATO DE DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD DE CONTENIDO DE INFORME FINAL DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD DE CONTENIDO DE INFORME FINAL DE TESIS / TRABAJO DE INVESTIGACIÓN[1]

Lima, 11 de setiembre del 2023

Señor,
Carlos Zavalaga Reyes

Director General de Investigación, Desarrollo e Innovación
Universidad Científica del Sur
Presente. –

De nuestra consideración,

Yo: Nilda María Perez Sandoval, bachiller de la carrera de ingeniería ambiental de la Universidad Científica del Sur, en conjunto con el asesor de tesis Luis Gomero Osorio y co-asesor Oscar Reategui Arévalo, declaramos que este informe final de tesis titulado: "PRODUCCION DE BIOETANOL POR FERMENTACION A PARTIR DE RESIDUOS ORGANICOS AGROINDUSTRIALES DE MANDARINA UTILIZANDO Saccharomyces cerevisiae y Zymomonas mobilis"), sustentado para obtener el título/grado de ingeniero ambiental es original.

Es decir, no contiene plagio parcial ni total, cuando se utilizó información de fuentes externas se reconoció la autoría mediante la adecuada citación y los resultados obtenidos son producto entero de mi (nuestra) investigación y no han sido falseados ni fabricados. Todo esto en cumplimiento del Código de ética en la investigación, Reglamento del Comité de Integridad Científica, Reglamento de Propiedad Intelectual, Normas y procedimientos de los trabajos de investigación para la obtención de títulos profesionales y grados académicos [2], que afirmamos conocer en su totalidad.

Por ello, en caso de identificarse alguna situación de plagio, falsificación o fabricación de resultados, nos allanamos al proceso de investigación que establezca la Universidad y las posibles sanciones que pudieran surgir.

Firmamos en conformidad con lo declarado,



Firma tesista
DNI: 76922965



Firma del asesor de tesis
DNI:10681962



Firma del Co-asesor de tesis
DNI:17854305

[1] En conformidad con la Resolución del Consejo Directivo N° 084-2022-SUNEDU/CD
[2] Los documentos están en: https://investigacion.cientifica.edu.pe/reglamentos/

INFORME DE REVISIÓN DE ORIGINALIDAD

Título del documento evaluado. Producción de bioetanol por fermentación a partir de residuos orgánicos agroindustriales de mandarina utilizando Saccharomyces cerevisiae y Zymomonas mobilis

Autores. Nilda Maria Perez Sandoval.

Mecanismo de revisión de originalidad. Evaluación con Turnitin (ID 2264245373).

Resultado de la evaluación. 7%

Revisado por. Magaly Kelly Guerrero Huaracallo.

Comentarios sobre la revisión. Filtros usados: excluir fuentes de menos de 12 palabras.



Producción de bioetanol

INFORME DE ORIGINALIDAD

7%	6%	1%	0%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	scielo.conicyt.cl Fuente de Internet	3%
2	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	1%
3	es.scribd.com Fuente de Internet	1%
4	www.researchgate.net Fuente de Internet	1%
5	data.cdp.net Fuente de Internet	<1%
6	Ramirez Nino, Miguel Angel. "Caracterizacion de vinos de pina (variedada Espanola Roja) pasteurizados y sin pasteurizar elaborados con diferentes cepas de Saccharomyces cerevisiae", Proquest, 20111108 Publicación	<1%

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Resumen

Los biocombustibles son la alternativa mas rápida de implementación para reducir la alta dependencia de combustibles fósiles y la reducción de las emisión de gases de efecto invernadero que estos producen. El bioetanol a partir de la biomasa lignocelulósica podría ser un sustituto de la gasolina. Este estudio evaluó la eficiencia de *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* en la fermentación de los residuos de mandarina (*Citrus nobilis*). Se comparó la producción de bioetanol usando *S. cerevisiae, Z. mobilis y* la asociación de ambos. El cultivo se realizó por triplicado en un biorreactor casero. Los resultados mostraron el rendimiento óptimo de bioetanol después de 120 h de fermentación, obteniéndose 7,0 %v/v, 4,2 % v/v y 1,9 %v/v a partir de la asociación, *S. cerevisiae* y *Z. mobilis,* respectivamente. La asociación produjo los mayores rendimientos en la producción de bioetanol, (0,35 g-etanol/g-glucosa), mayor eficiencia de conversión de azúcares a bioetanol (67,68 %) y mayor productividad volumétrica (1,30 g/L/h). Los hallazgos de este estudio sugieren que los residuos de mandarina contienen azúcares fermentables favorables y representan una oportunidad para la producción de bioetanol.

Palabra Clave: Bioetanol; residuos de mandarina; biomasa lignocelulósica; *Saccharomyces cerevisiae; Zymomonas mobilis;* fermentación alcohólica.

Abstract

High dependence on fossil fuels and global warming caused by greenhouse gas emissions have prompted researchers to look for alternative fuels. Bioethanol from lignocellulosic biomass could be a substitute for gasoline. This study evaluated the efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* in the fermentation of tangerine waste (*Citrus nobilis*). Bioethanol production was compared using *S. cerevisiae, Z. mobilis, and* the association of both. The culture was carried out in triplicate in a homemade bioreactor. The results showed the optimal bioethanol yield after 120 h of fermentation, obtaining 7.0 %v/v, 4.2 % v/v, and 1.9 %v/v from the association, *S. cerevisiae,* and *Z. mobilis,* respectively. The association produced the highest yields in the production of bioethanol (0.35 g-ethanol/g-glucose), the highest conversion efficiency of sugars to bioethanol (67.68 %), and the highest volumetric productivity (1.30 g/L/h). The findings of this study suggest that mandarin residues contain favorable fermentable sugars and represent an opportunity for bioethanol production.

Keywords: Bioethanol; tangerine waste; lignocellulosic biomass; *Saccharomyces cerevisiae; Zymomonas mobilis;* fermentation.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

1. Introducción

Garantizar el acceso universal a la energía limpia, segura y asequible se ha convertido en uno de los mayores desafíos para los objetivos del desarrollo sostenible (ODS), ya que tiene una fuerte correlación con la calidad de vida de un individuo (Awogbemi et al., 2021). El crecimiento económico y demográfico han provocado un rápido aumento en la demanda energética conduciendo a un aumento en las emisiones de dióxido de carbono (CO2). Por su parte, Leis (2019) sostiene que la demanda de combustibles tradicionales podría alcanzar el cúspide en 2030. A fin de lograr la sostenibilidad, los gobiernos deben centrar esfuerzos hacia el objetivo a largo plazo coherentes con el Acuerdo de Paris para la transición a unas emisiones netas cero de CO_2 en 2050, eliminar gradualmente el financiamiento de los combustibles fósiles y fomentar la producción y consumo de energías limpias para satisfacer las necesidades energéticas de manera equitativa sin comprometer la sostenibilidad futura (PNUMA, 2021). Además, las respuestas frente a los impactos del cambio climático están relacionadas al desarrollo sostenible que garantiza el equilibrio entre el bienestar social, la prosperidad económica y la protección ambiental (IPCC, 2018).

Los biocombustibles se han ganado una popularidad sostenida como alternativa a los combustibles fósiles debido a su potencial para reducir las emisiones de CO2, además, se consideran neutros en carbono, en cuanto a las emisiones directas de CO_2 asociadas a su combustión (Sebos, 2022). Por estas razones el despliegue del bioetanol para el sector transporte ha seguido aumentando cada año. Según el IICA (2021) durante el periodo 2011- 2020, la producción mundial aumentó un 36%, siendo Estados Unidos

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

(41%) y Brasil (26%) los principales productores. A escala comercial, el bioetanol se puede encontrar en diferentes concentraciones dependiendo de las legislaciones de cada país, en Europa se permite la mezcla de E5 (5% bioetanol y 95% gasolina), en Estados Unidos, Brasil y Suecia el más implementado es E10 (90% gasolina y 10% bioetanol), como también las mezclas de E85 (85% bioetanol y 15% gasolina), E95 (95% bioetanol y 5 % gasolina) y E100 que son implementados en autos con motores especiales (Andrade et al., 2017). En el caso de Perú, la Ley de promoción del mercado de biocombustibles del 2007 (N°28054), establece 7,8 % de alcohol carburante (Etanol anhídrido) y 92,2 % de gasolina, denominado gasolina ecológica. Para utilizar en mezclas con gasolina procede a ser deshidratado para desplazar su punto azeotrópico (Alonso-Gómez & Bello-Perez, 2018).

La producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, conocida como bioetanol de segunda generación (2G) tiene múltiples impactos. Por un lado, contribuye a la reducción de gases de efecto invernadero (GEI), genera valor agregado, colabora con la sostenibilidad de los sistemas agroalimentarios (Duque et al., 2021). Aun así, lucha por ser competitivo en costo frente al etanol de maíz o caña de azúcar y la gasolina (Kremer et al., 2015). El proceso de conversión de la biomasa lignocelulósicas en azúcares simples es un procedimiento complicado debido a la existencia de polisacáridos de cadena larga. Por lo tanto, requiere de procesos de pretratamiento que producen cambios físicos y químicos en la biomasa con el propósito de remover la lignina, solubilizar la hemicelulosa y alterar la estructura cristalina de la celulosa (Muñoz,

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Pantoja & Cuatin, 2014). Las barreras que presenta la producción de bioetanol de 2G son costos elevados en la etapa de pretratamiento, el alto costo de las enzimas usadas para hidrolizar las biomasas lignocelulósicas y el obstaculo para realizar la conversión de azúcares de cinco carbonos a etanol (Alonso-Gómez & Bello-Pérez, 2018).

La fermentación es un proceso bioquímico utilizado para romper moléculas orgánicas más grandes en otras más simples (Awogbemi et al., 2021). Los microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) convierten los azúcares (glucosa, galactosa, y fructosa) en bioetanol, CO_2 y ATP (Adenosín trifosfato) que usan los microorganismos en su metabolismo celular en condiciones anaeróbicas (Tse, Wiens & Reaney, 2021). Entre los microorganismos más empleados para la producción de bioetanol, se encuentra la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que requiere el rango de pH óptimo entre 4 y 5, temperatura moderada (30°C) y poca tolerancia a altas concentraciones de bioetanol (Suárez-Machín et al., 2016). Por el contrario, *Zymomonas mobilis* es una bacteria anaerobia facultativa tolerante al oxígeno, presenta alta tolerancia a etanol y azúcares, y un amplio rango de pH de fermentación (Carreón- Rodríguez et al., 2019); además, utiliza la vía Entner- Doudoroff, que permite la fermentación con 50% menos de producción de ATP que la vía Embden-Meyerhof (Herrera et al., 2021). Así mismo, Busic et al. (2018) sostienen que *Z. mobilis* tiene una eficiencia para producir bioetanol hasta 97% del máximo teórico, mientras que *S. cerevisiae* presenta una eficiencia en torno al 90-93%. En ese sentido, uno de los criterios más importantes para la selección de las cepas microbianas es la capacidad de tolerar diversas condiciones como deficiencia de nutrientes, altas temperaturas, limitaciones de nitrógeno y tolerancia a altas concentraciones de etanol.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Por lo tanto, el objetivo de la investigacion fue evaluar la eficiencia de *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* para la fermentación de los residuos de mandarina. Los residuos de mandarina (*Citrus nobilis*) se utilizaron como sustrato rico en azúcares fermentables para la producción de bioetanol usando *S. cerevisiae* y *Z. mobilis.* Se evaluó el rendimiento en la producción de bioetanol, eficiencia de conversión de azúcares a bioetanol y productividad volumétrica tanto para la levadura como para la bacteria y la asociación de ambos (*S. cerevisiae* + *Z. mobilis*). Al usar residuos de mandarina de comercio local, este estudio también buscó ayudar en el uso sostenible de los residuos y diversificar los usos finales como complemento a las materias primas actuales para la producción de bioetanol en Perú.

2. Materiales y métodos

2.1 Sustrato

La biomasa utilizada fue residuos de mandarina (fruta malograda), recogidos del mercado Flores de Villa- San Juan de Miraflores. Una muestra de 15 kg fue lavada y reducida de tamaño en una licuadora hasta lograr pasar por una malla de 0,5 a 1 mm. Además, fue necesario realizar pretratamiento para hacer que el sustrato sea digerible para los microorganismos productores de celulasa, para liberar azúcares para la fermentación (Ghazanfar et al., 2022)

2.2 Microorganismos empleados

Se utilizó una cepa de la levadura *S. cerevisiae* y la bacteria *Z. mobilis,* las cuales fueron obtenidas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho. La levadura se sembró en placas con *Sabouraud Dextrose Agar*, mientras que la bacteria, con medio *Yeast Extract Peptone Glycerol* (Montañez et al., 2011).

2.3 Preparación de inóculo

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

El inóculo para la fermentación se preparó sembrando una colonia aislada de *S. cerevisiae* y otra de *Z. mobilis*, desde agar inclinado a placas de Petri estériles mediante el método de placa en estrías y se incubaron a 30°C por 48 h. Posteriormente, las colonias fueron sometidas a estudios morfológicos, realizándose tinción de Gram en el caso de bacterias.

En matraces Erlenmeyer, se agregaron 500 mL de jugo de residuos de mandarina con 15 g/ 100 mL de glucosa, 1,5 g de extracto de levadura, 1,5 g de extracto de malta y 2,5 g de peptona. El pH del medio fue ajustado a 4,5 con NaOH 5N. Posteriormente los medios de cultivos fueron esterilizados en una autoclave a 1 bar y 121°C durante 15 min. Luego, los matraces se inocularon con dos asadas de las cepas correspondientes y posteriormente fueron incubados a 30°C durante 48 h, y agitadas una vez al día. Luego, se analizo la concentración de microorganismos por el método de vaciado en palcas (2_X10^6 UFC/mL).

2.3. Fermentación

La fermentación se llevó a cabo junto con la hidrolisis tal como lo describe Ghazanfar et al. (2022). Doce matraces cónicos de 1 L de capacidad se clasificaron en cantidad de cuatro por grupo, conteniendo cada uno 800 mL de jugo de residuos de mandarina con 15 g/100 mL de glucosa, 1 g/L de sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$ como nutriente, el pH se ajustó a 4,5 con NaOH 5N. Posteriormente, los matraces se cubrieron con algodón, se envolvieron con papel aluminio y se esterilizaron en una autoclave a 1 bar y 121°C durante 15 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

En la Figura 1. se puede observar el esquema del proceso de fermentación alcohólica para los cuatro tratamientos.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

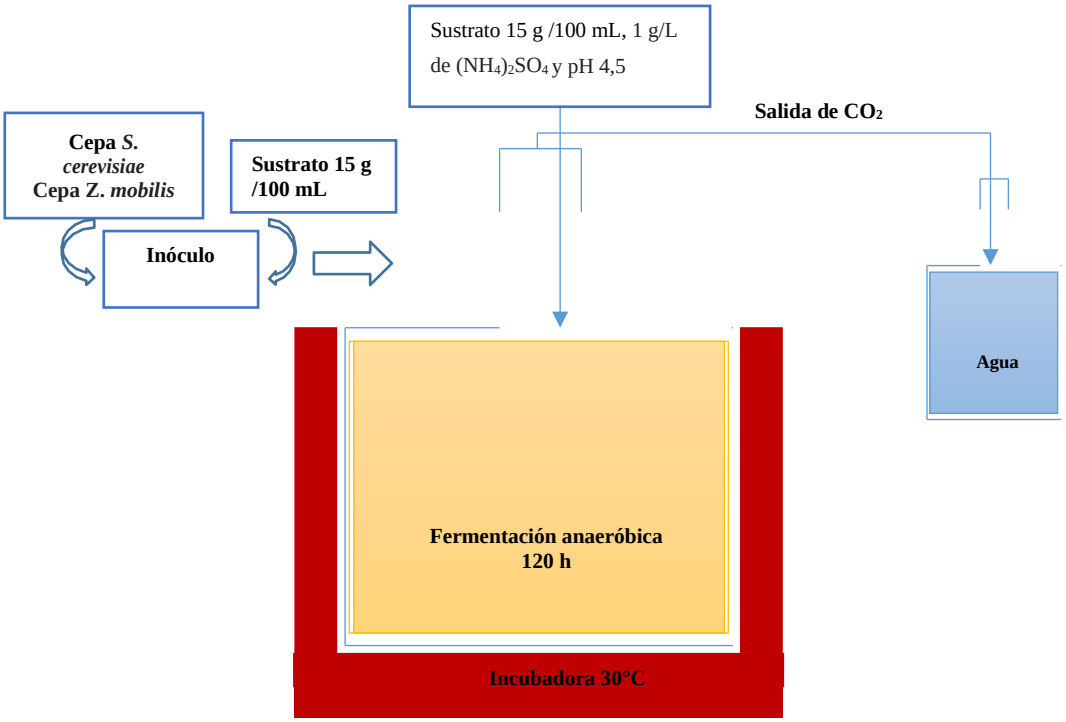


Figura 1. Esquema del proceso de fermentación alcohólica.

Los microorganismos se inocularon asépticamente en cada matraz e incubados a 30°C según cuatro tratamientos: Grupo control, 10% %v/v *S. cerevisiae*, 10% %v/v *Z. mobilis* y 5% *S. cerevisiae* + 5% *Z. mobilis.* La incubación inició cerrando herméticamente el matraz y conectando la manguera del matraz a otro contenedor que contenía agua a una temperatura de 30°C (Rijal, 2020). La fermentación se llevó a cabo durante 120 h y se agitó a mano una vez al día (Ruiz-Marín et al., 2016). Después de 120 h, el

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

caldo fermentado se filtró a través de una gasa de 0,45 µm de diámetro para ser usado en el proceso de destilación.

Durante el proceso de fermentación se tomaron muestras asépticamente, utilizando una jeringa estéril de 10 mL en intervalos de 24 h para determinar el contenido de azúcares g/ 100 mL, pH y temperatura (Braide et al., 2018). Para el cálculo de los parámetros cinéticos como rendimiento de bioetanol, eficiencia de conversión y producción volumétrica se utilizaron las siguientes ecuaciones según lo descrito por (Ma'As et al., 2020; Montañez et al., 2011).

$$\text{Rendimiento de bioetanol (g etanol/g glucosa)} = \frac{EEEEEEEEEEE\ pppEEpppppppppEE\ (gg/LL)}{CCEEEECCppCCEE\ ppdd\ EEaaúppEEppddCC\ ppddpppppppEEEEppddCC\ (gg/LL)} \quad (1)$$

$$\text{Eficiencia de conversión (\%)} = \frac{EEEEEEEEEEE\ pppEEpppppppppEE\ (gg/LL)}{0.511 * ppEEEECCppCCEE\ ppdd\ EEaaúppEEppddCC\ ppddpppppppEEEEppddCC\ (gg/LL)} \text{ x } 100 \quad (2)$$

$$\text{Productividad de bioetanol (g/L/h)} = \frac{MMEEMMppCCEE\ ppEEEEppddEEEEppEEpppóEE\ ppdd\ bbppEEddEEEEEEEEEE\ (gg/LL)}{TTppddCCppEE\ ppdd\ ffddppCCddEEEEEEpppóEE\ (h)} \quad (3)$$

2.3. Destilación

La destilación del fermentado se llevó a cabo en rotavapor (Selecta, modelo RS-3001V), a 40 °C y 0,10 mbar de presión reducida. Se agregaron 250 mL del medio fermentado al matraz, durante 2h.

2.4. Métodos analíticos

Los valores de concentración de azúcares reductores se analizaron de acuerdo con el método de Burgos (2020) mediante el ácido 3,5-dinitrosalicílico, cuya concentración se determinó por la absorbancia a 540 nm utilizando un espectrofotómetro.

El segundo método para medir la concentración de azúcares se realizó mediante el uso de refractómetro portátil (THE01501), cada 24 h tomando 1mL de muestra. Los

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

resultados se obtuvieron en g /100 mL (Khoja et al. 2018).

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

El grado alcohólico se determinó mediante el método del picnómetro, los resultados se obtuvieron en % v/v, y el pH del medio se determinó con un pH-metro portátil.

2.5. Análisis estadístico

El diseño experimental consistió en cultivos triplicados en biorreactores. Se usó STATISTICS 25 y Excel para el análisis estadístico, y se calculó el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar para cada grupo. Los resultados se probaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) p ≤0,01, pruebas de normalidad de Shapiro-Wilks; y la prueba Tukey (p ≤0,01) según lo descrito por Ruiz-Marín et al. (2016).

3. Resultados y discusión

3.1. Consumo de azúcares

La Figura 2 muestra el consumo de azúcares g/ 100 mL (°Brix) a lo largo del periodo de fermentación.

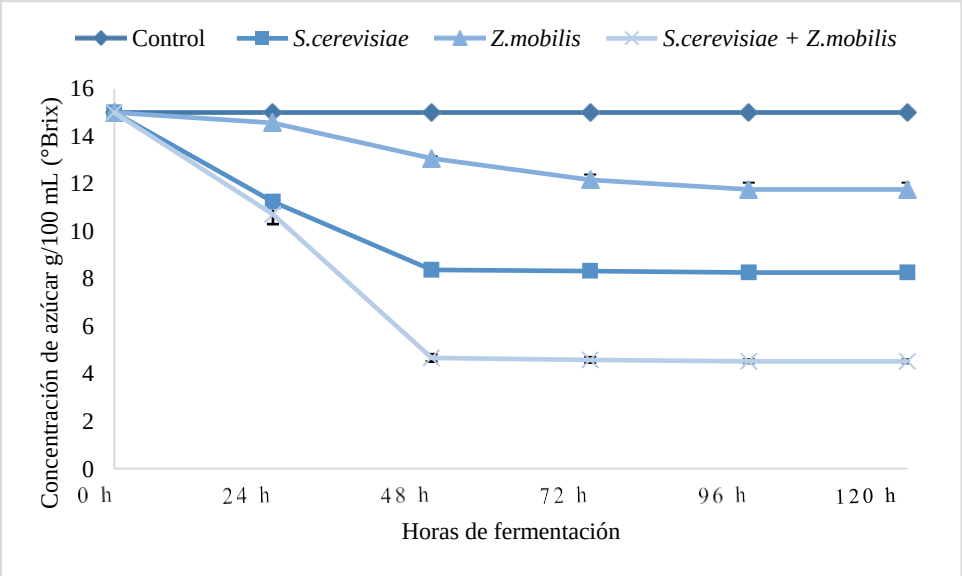


Figura 2. Consumo de azúcares por *S. cerevisiae, Z. mobilis* y *S. cerevisiae + Z. mobilis* en función del tiempo de fermentación, pH = 4,5 y T= 30°C.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Se observa que a 48 h después de iniciar la fermentación, *S. cerevisiae* consumió 6,6 g/ 100 mL de los azúcares y 10,3 g/100 mL, la asociación *S. cerevisiae + Z. mobilis.* Sin embargo, *Z. mobilis* tardo 96 h en consumir 3,2 g/100 mL. El pico de consumo de azúcares se alcanzó a las 48 h después de iniciar el proceso de fermentación para *S. cerevisiae* y la asociación *S. cerevisiae + Z. mobilis*, 96 h para *Z. mobilis* y luego declinó; posteriormente ya no hubo diferencias significativas (p > 0,01). Se observa que los azúcares en el medio disminuyen en medida que aumenta el tiempo de fermentación. Esto se debe a la utilización de los azúcares como fuente de carbono para el crecimiento, energía y actividades metabólicas, y a la posterior producción de bioetanol por los microorganismos.

La Figura 3, muestra las concentración inicial y final de azúcares reductores g/L fermentada por *S. cerevisiae, Z. mobilis* y la asociación *S. cerevisiae + Z. mobilis.* Las concentraciones de azúcares reductores iniciales de los tratamientos fluctuaron entre 185,20 g/L y 186,45 g/L; sin embargo, no se observó diferencias significativas (p> 0,01).

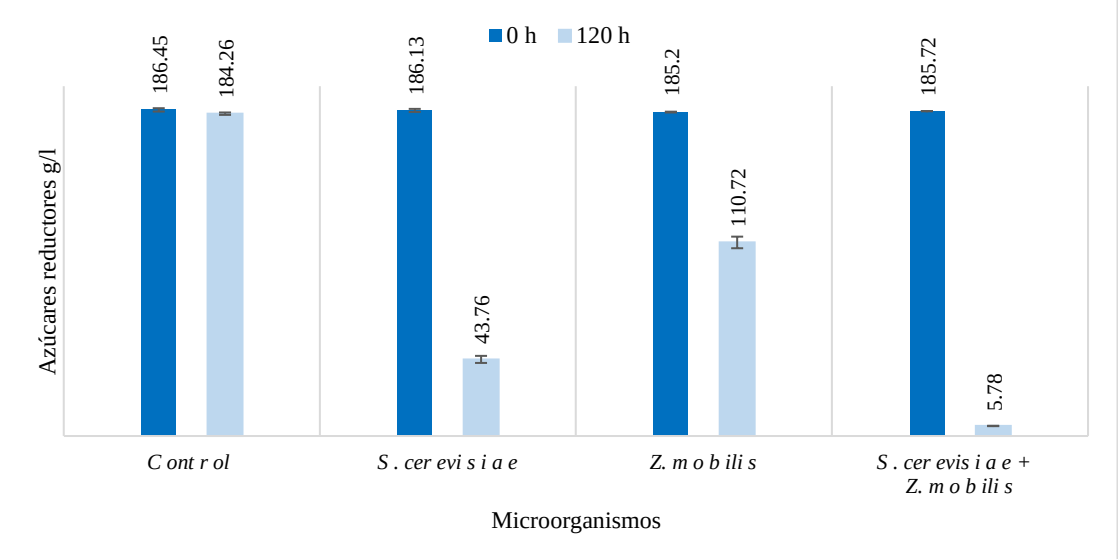


Figura 3. Concentración de Azúcares reductores antes (0 h) y después (120h) del proceso de fermentación por *S. cerevisiae, Z. mobilis* y *S. cerevisiae + Z. mobilis.*

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Un total de 179,94 ± 0,06 g/L de azúcares reductores fueron utilizados por la asociación de *S. cerevisiae + Z. mobilis* al final del periodo de fermentación de 120 h, mientras que *S. cerevisiae* utilizó 142,38 ± 1,25 g/L y Z. *mobilis*, 74,48 ±1,82 g/L. El consumo de sustrato presentó diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los microorganismos.

En las condiciones estudiadas, la asociación de S. *cerevisiae + Z. mobilis* para la producción de bioetanol ha demostrado ser una de las vías más eficientes para aumentar el rendimiento del producto, ya que ambas especies contribuyen en reducir la glucosa y aumentar la tasa de remoción del sustrato (Ruiz-Marín et al., 2016). Además, Tambuwal et al. (2018) sostienen que la asociación de levadura y bacteria experimentan vías Embden-Meyerhof-Parnas y Entner-Doudoroff, que convierten el azúcar en alcohol. Por su parte, Oliveira et al. (2021) mencionan que la levadura en ambientes ricos en nitrógeno ajusta su metabolismo mediante la secreción de aminoácidos, y por lo tanto permite la supervivencia de ciertas bacterias generando una interacción mutualista entre las dos especies.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que los cultivos de S. *cerevisiae* consumieron más glucosa que *Z. mobilis.* Si bien *Z. mobilis* muestra un potencial para la fermentación de etanol, también es muy sensible a los inhibidores que se encuentran en los medios de fermentación, como los ácidos acéticos derivados de la hemicelulosa. El porcentaje bajo de consumo de glucosa obtenido por *Z. mobilis* puede atribuirse a la inhibición del crecimiento celular por la presencia de los compuestos fenólicos de la lignina que se convierten en inhibidores de la fermentación (Alonso-Gómez & Bello-Perez, 2018). Así también, condiciones ambientales adversas causadas en el pretratamiento de la biomasa,

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

incluyendo estrés osmótico, iónico, oxidativo y tipo de sustrato como lo reportan Almeida & Franceschi (2016). Por su parte, Vriesekoop & Pamment (2021) sostienen que las condiciones de estrés iónico y osmótico inhiben el crecimiento de *Z. mobilis* causando la formación de filamentos.

Por lo tanto, para mejorar Los rendimientos de producción es esencial hidrolizar la lignina, la celulosa y pectinas para convertirlas en azúcares simples. Además, los efectos y las interacciones de los inhibidores durante el proceso de fermentación deben ser analizados a fondo. Por su parte, Busic et al. (2018) observaron la formación de levan, con sustrato a base de sacarosa durante la fermentación con *Z. mobilis,* aumentado la viscosidad del medio de fermentación y sorbitol a base de fructuosa.

3.2. Producción de bioetanol

En la producción de bioetanol la asociación S. *cerevisiae + Z. mobilis* tuvo mejor desempeño que los cultivos por separado, obteniendo la máxima producción de bioetanol 62,24 ± 0,27 g/L, mientras que cuando la fermentación fue llevada a cabo con S. *cerevisiae* y *Z. mobilis,* la máxima producción de bioetanol fue 37,52 ± 3,19 g/L y 16,97 ± 0,80 g/L, respectivamente. Los resultados revelan la concentración g/L de bioetanol en el orden asociación > *S. cerevisiae* > *Z. mobilis*, a 120 h iniciado el proceso de fermentación que está de acuerdo con los hallazgos de Tambuwal et al. (2018). Todos los tratamientos presentan diferencias significativas entre sí ($p < 0,01$).

La figura 4, muestra la concentración porcentual v/v de bioetanol producido por cultivos por separado *S. cerevisiae, Z. mobilis,* así como la asociación de *S. cerevisiae + Z. mobilis.*

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

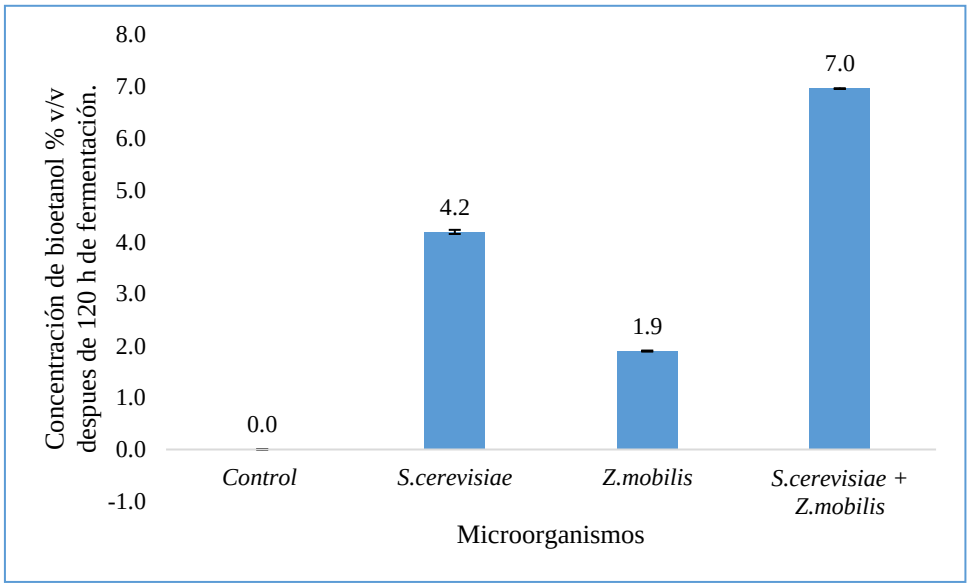


Figura 4. Porcentaje v/v de bioetanol producido por cultivos por separado *S. cerevisiae, Z. mobilis,* así como la asociación de *S. cerevisiae + Z. mobilis.*

En la investigación de Awasthi et al. (2018) y Tambuwal et al. (2018), el porcentaje de bioetanol obtenido mediante la fermentación del tallo de *Solanum lycopersicum* y mazorcas de maíz por la asociación de *S. cerevisiae + Z. mobilis* fue 11,46 % v/v y 10,97 % v/v, respectivamente, superiores a los resultados obtenidos en la presente investigación. Esto se le puede atribuir a que las vías de fermentación de *S. cerevisiae y Z. mobilis* están orientadas únicamente a glucosa, fructosa y sacarosa; sin embargo, son incapaces de consumir azúcares pentosas como arabinosa, xilosa o ácido galacturónico, tal como lo reporta Mahato et al. (2021).

Entre los microorganismos que fermentan naturalmente las pentosas se encuentra las levaduras *Candida shehatae, Pachysolen tannophilus y Scheffersomyces stipitis* (Broda, Yelle & Serwanska, 2022). Además, Busic et al. (2018) recomiendan investigar la tecnología de ADN recombinante y los microorganismos fermentadores de pentosas como es el caso de *Kluyveromyces marxianus* que puede fermentar hexosas y pentosas,

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

además tiene tolerancia al etanol (Kalnenieks, Pappas & Bettenbrock, 2020) o *E.coli* que fermenta el ácido galacturónico con un rendimiento de etanol en un 25 y 35% en comparación con la fermentación por *S. cerevisiae* (Mahato et al., 2021).

Al utilizar residuos de mandarina (cáscara y pulpa), se presentan los mismos retos que con otras biomasas lignocelulósicas. Por un lado, baja conversión de sustrato, debido a que, durante el proceso de hidrólisis, las principales azúcares lignocelulósicas consisten en D-glucosa y D-xilosa; la co-utilización de estos azúcares es un desafío como lo sostienen Kurgan et al. (2021) y Dhungana et al. (2022), debido a la represión de catabolitos de carbono, dando como resultado una utilización secuencial y subóptima de los azúcares secundarios como la xilosa y la arabinosa, lo que reduce las métricas de producción. Por otro lado, los complejos de la biomasa lignocelulosicas requieren un proceso de pretratamiento exigente para la remoción de la lignina presente, ya que esta constituye una barrera para que puedan ser aprovechados los polisacáridos de interés como celulosa y hemicelulosa (Tejeda, Marimon & Medina, 2014; Gómez et al., 2019).

Busic et al. (2018) sostienen que la elección del pretratamiento depende de la naturaleza de la materia prima y de la formación de subproductos. Por su parte, Broda, Yelle & Serwanska (2022) sostienen que el pretratamiento de extrusión genera una alteración física y química de la estructura compleja de la biomasa lignocelulósico, no produce furfural y hidroximetilfurfural (HMF) y puede llevarse a cabo de manera continua. sin embargo, debido a los altos requerimientos de energía, puede que no sea económicamente la mejor alternativa. Therasme et al. (2021) sostiene que la extracción de carbohidratos mediante agua caliente (HWE) es ideal para biomasa leñosa, da como

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

resultado la solubilización de hemicelulosa en su mayor parte en el agua y la escisión de grupos de acetato. Se realiza a temperatura elevada de 140 a 180° C por un periodo de 30 a 180 min sin el uso de productos químicos agresivos.

Rooni, Raud & kikas. (2017) sostienen que el pretratamiento por congelación a temperatura -18°C durante un cierto tiempo, es una técnica prometedora, demostró que aumenta significativamente la conversión enzimática de la paja de cebada, dando como resultado mayor producción de glucosa y bioetanol. Este método tiene bajo impacto ambiental y es relativamente rentable por el bajo consumo de energía y la falta de productos químicos tóxicos en el proceso. Así mismo, Nauman et al. (2019) sostienen que el pretratamiento de biomasa lignocelulósico con campo eléctrico pulsado (PEF) es un método novedoso, aumenta la porosidad y permeabilidad de la biomasa lignocelulósico al someter a series de pulsos de alta tensión (5 – 20 kV/cm) de corta duración (nano a milisegundos) mejora la hidrólisis de la celulosa dando como resultado su conversión eficiente a bioetanol. El método es rentable debido a los bajos requisitos de energía y puede ser fácilmente diseñado para las condiciones de biorrefinería.

3.3. Comparación de parámetros cinéticos

El resumen de los parámetros cinéticos como rendimiento de bioetanol, eficiencia de conversión de los azúcares y productividad de bioetanol para los tres grupos se muestra en la tabla 1.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Tabla 1

Parámetros cinéticos de la fermentación de los azúcares de mandarina por *S. cerevisiae, Z. mobilis* y la asociación de *S. cerevisiae + Z. mobilis* a pH 4,5 y T= 30°C.

Parámetro	*S. cerevisiae*	*Z. mobilis*	*S.cerevisiae + Z.mobilis*
Rendimiento de bioetanol (g-etanol/g-glucosa)	0,26 ± 0,0001 [b]	0,23 ±0,0003 [c]	0,35 ± 0,00001[a]
Eficiencia de conversión (%)	51,56 ±4,16 [b]	44,64 ± 9,93 [c]	67,68 ± 0,24[a]
Producción volumétrica (g/L/h)	0,78 ± 0,0014 [b]	0,35 ± 0,0003 [c]	1,30 ± 0,0001 [a]

+ ART = Azúcares reductores totales.

Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas (p<0.01).

En la tabla 2, se puede observar que la asociación *S. cerevisiae + Z. mobilis* tuvo mejor rendimiento en la producción de bioetanol, mejor eficiencia de la conversión de azúcar a bioetanol y una mayor productividad en comparación con las cepas por separado. Sin embargo, para lograr una producción de bioetanol a escala industrial, se requiere una eficiencia de >90% del máximo teórico, una concentración de bioetanol de > 40 g/L y una productividad de > 1 g/L/h (Ma'As., Hasanah., & Cheing, 2020; Ghazanfar et al., 2022).

Duque et al. (2021) sostienen que el rendimiento máximo de los procesos bioquímicos de producción de bioetanol es de 0,51 g de bioetanol/ g de monosacárido ya sea azúcares C5 o C6, pero la eficiencia de producción de bioetanol esta influenciada por diferentes factores. Gilna et al. (2017) sostienen que la resistencia de la pared celular afecta en gran medida la accesibilidad de los carbohidratos y, por lo tanto, impide la liberación de azúcares fermentables. Los sustratos primarios en la fermentación alcohólica esta limitada principalmente por la presencia de lignina. Por un lado, el polímero de lignina restringe el libre acceso de enzimas hidrolíticas a microfibrillas de

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

celulosa y cadenas de hemicelulosa. Por otro lado, la lignina actúa como adsorbente que se une a las moléculas de enzimas en su superficie provocando así su inactivación irreversible (Broda, Yelle & Serwanska., 2022).

Un estudio similar de Almeida & Franceschi (2016) quienes fermentaron cultivos por separado y cultivos mixtos (*S. cerevisiae + Z. mobilis*), fermentación por lote de cultivos mixtos inmovilizados con alginato de sodio y fermentación continua de cultivos mixtos inmovilizados, logrando un rendimiento teórico de 70,86%, 79,07% y 80,86% respectivamente. Estos hallazgos sugieren que los cultivos asociados e inmovilizados con alginato de sodio dan mejores rendimientos, tanto para proceso de fermentación por lote o continuos. Por lo tanto, la interacción sinérgica entre diferentes microorganismos provee herramientas para nuevas tecnologías de fermentación.

Por otro lado, se obtuvo una baja productividad con la fermentación de *Z. mobilis* con una eficiencia de conversión de 44,64% con respecto al etanol teórico, la cual es más baja en comparación por lo reportado por Khoja et al. (2018) para una biomasa como la melaza de azúcar, con una concentración de azúcar 16 g/100 mL, obteniendo una producción máxima de bioetanol de 9,3%v/v con una eficiencia de 92,5%. Esta diferencia probablemente podría verse afectada por la baja disponibilidad de azúcares fermentables en el medio 15 g/100 mL. Bajo esta premisa, el crecimiento de la bacteria sería más lento, reduciendo así el rendimiento en la producción de bioetanol.

Buscando mejorar las condiciones de fermentación para el proceso de producción de bioetanol en esta investigación, se podría adicionar acetaldehído como lo reporta Vriesekoop & Pamment (2021) quienes demostraron que la adición de este estimula el

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

crecimiento de *Z. mobilis* sometido a estrés ambiental ocasionado por el furfural, acetato y otras sustancias tóxicas que se encontraban en el hidrolizado. Los autores obtuvieron una tasa de utilización de azúcar de 25 g/L/h en cultivos no estresados, 13 g/L/h en cultivos estresados con etanol y 18 g/L/h en cultivos estresados adicionando acetaldehído.

4. Conclusiones

En este estudio, se observó una mayor producción de bioetanol para *S. cerevisiae + Z. mobilis* (7,0 %/% v/v), en comparación con los cultivos separados de *S. cerevisiae (4,2% v/v)* y *Z. mobilis* (1,9% v/v). Además, los resultados expresaron una eficiencia máxima del 67,68 % para *S. cerevisiae + Z. mobilis* en comparación con el 90 % del máximo teórico requerido para la producción a escala industrial. Estos hallazgos demostraron que los residuos de mandarina se pueden convertir en bioetanol. Es una alternativa viable y promueva la disminución del uso de otras materias primas que compiten por el uso de tierra con los cultivos alimentarios. Sin embargo, existe la necesidad de desarrollar un proceso de pretratamiento más eficiente y económico que permite la separación efectiva de complejos (celulosa, hemicelulosa y lignina) y de esta manera aumenta la accesibilidad de las enzimas a los azucares conduciendo a mejores rendimientos. Lamentablemente, no existe un pretratamiento universal para todos los tipos de biomasa y habitualmente se aplica una combinación de dos o más técnicas complementarias para obtener resultados mas satisfactorios. Además el desarrollo de mejores estrategias de pretratamiento para biomasa lignocelulósica sigue siendo un tema de extensa investigación.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

5. Referencias

Almeida, N. & Franceschi, D. (2016). Immobilization is an association of microorganisms to improve fermentation performance for ethanol production. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development*, 8(2), 7-15.

Alonso-Gomez, L. Bello-Perez, L. (2018). Materias primas usadas para la producción de etanol de cuatro generaciones: Retos y oportunidades. *Agrociencia*, 52, 976-990.

Andrade, C., Corredor, A., Buitrago, L y Lache, A. (2017). Procesos químicos utilizados para la producción de bioetanol, biodiesel y biogás y su estado en Colombia. *Fundación Universidad de América*, 3(1), 101-117.

Awasthi, R.; Shah, N & Bhandare, S. (2018). Optimization for production of bioethanol by *Zymomonas mobilis and Saccharomyces cerevisiae* using starch substrate from corn. *International Journal of Recent Trends in Science and Technology*, 30-34.

Awasthi, R.; Shah, N.; Kulkarni, M. & Bhandare, S. (2018). Corn cob fermentation to bioethanol by co-culture of *Saccharomyces cerevisiae and Zymomonas mobilis*. *International Journal of Pharmacy and Biological Science*, 8, 75-79.

Awogbemi, O.; Kallon, D.; Onuh, E.; Aigbodion, V. (2021). An Overview of the Classification, Production, and Utilization of Biofuels for Internal Combustion Engine Applications. *Energies*, 14, 5687.

Braide, W.; Oji, I.; Adeleye, S. & Korie, M. (2018). Comparative study of bioethanol production from agricultural waste by *Zymomonas mobilis and Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research, 6, 50-60.

Broda, M., Yelle, D. & Katarzyna, S. (2022). Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass: Challenges and Solutions. *Molecules*, 27, 8717.

Burgos, L. (2020). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3.5 dinitrosalicílico. *Fundación Universidad de América*, 13.

Busic, A., Mardetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivancic, M., Komes, D., Novak, S & Božidar Santek, B. (2018). Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food Technology & Biotechnology*, 56(3), 289-311.

Carreón- Rodríguez, O., Gutiérrez- Ríos, R., Acosta, J., Martínez, A & Ceballos, M. (2019). Phenotypic and genomic analysis of Zymomonas mobilis ZM4 mutants with enhanced ethanol tolerance. *Biotechnology Reports*, 23.

Dhungana, P., Prajapati, B., Maharjan., S & Joshi, J. (2022). Current Trends in

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Lignocellulosic Bioethanol Production. *Int. J. Appl. Sci. Biotechnol*, 10(1), 1-11.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Duque, A.; Álvarez, C.; Doménech, P.; Manzanares, P. & Moreno, A. (2021). Advanced Bioethanol Production: From Novel Raw Materials to Integrated Biorefineries. *Processes*, 9, 206. https:// doi.org/10.3390/pr9020206

Ghazanfar, M.; Irfan, M.; Nadeem, M.; Shakir, H.; Khan, M.; Ahmad, I.; Saeed, S.; & Chen, L. (2022). Bioethanol Production Optimization from KOH-Pretreated Bombax ceiba Using Saccharomyces cerevisiae through Response Surface Methodology. *Fermentation*, 8, 148.

Gilna, P., Lynd, L., Mohnen, D., Davis, M & Davison, B. (2017). Progress in understanding and overcoming biomass recalcitrance: a BioEnergy Science Center (BESC) perspective. *Biotechnol Biofuels,* 10, 285.

Gomez, J., Caste, G & Santiago, S. (2019). Proceso de producción de bioetanol de segunda generación (2G) en planta piloto, una oportunidad para mitigar la contaminación ambiental en México*. Revista Ingeniantes*, 2(3).

Gumienna, M.; Szambelan, K.; Jelen, H. & Czarnecki, Z. (2014). Evaluation of ethanol fermentation parameters for bioethanol production from sugar beet pulp and juice. *The Institute of Brewing & Distilling*, 120, 543-549.

Herrera, C.; Vieira, V.; Benoliel, T.; Carneiro, C.; De Marco, J.; de Moraes, L.; de Almeida, J. & Torres, F. (2021). Engineering Zymomonas mobilis to produce Xylonic Acid from Sugarcane Bagasse Hydrolysate*. Microorganisms*, 9, 1372.

IICA. (2021). Atlas de los biocombustibles líquidos 2020 – 2021. https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/18661/BVE21097939e.pdf?sequence=1&isAllowed=y

IPCC. (2018). *Calentamiento global de 1,5 °C*. https://www.ipcc.ch/sr15/

Kalnenieks, U.; Pappas, K.& Bettenbro, K. (2020). Zymomonas mobilis metabolism: Novel tools and targets for its rational engineering. *Advances in Microbial Physiology*, 77.

Khoja, A.; Yahya, S.; Nawar, A.; Ansari, A. & Qayyum, M. (2018). Fermentation of sugarcane molasses using Zymomonas mobilis for enhanced bioethanol production. *Journal of Advances Research in Applied Science and Engineering Technology,* 11, 31-38.

Kremer, T.; LaSarre, B.; Posto, A. & McKinlay, J. (2015). N_2 gas is an effective fertilizer for bioethanol production by Zymomonas mobilis. *PNAS,* 112(7), 2222-2226.

Kurgan et al, (2021). Directed evolution of Zymomonas mobilis sugar Facilitator Glf to overcome glucose inhibition. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*.

Leis, J. (12 de marzo de 2019). *Gestionando la transición energética: tres escenarios para*

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

la planificación. https://www.bain.com/insights/managing-the-energy-transition-three-scenarios-for-planning/

Ley N° 28054 de 2003. Ley de promoción del mercado de biocombustibles. 7 de agosto 2003.

Ma'As, M.; Hasanah, M. & Chieng, S. (2020): Bioethanol production from Brewer's rice by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*: evaluation of process kinetics and performance. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*,13.

Mahato, N.; Sharma, K.; Sinha, M.; Dhyani, A.; Pathak, B.; Jang, H.; Park, S.; Pashikanti, S. & Cho, S. (2021). Biotransformation of Citrus Waste: Production of Biofuel and Valuable Compounds by Fermentation. *Processes*, 9, 220.

Montañez, J., Victoria, J., Flores, R y Vivar, M. (2011). Fermentación del Agave tequilana Weber Azul por Zymomonas mobilis y Saccharomyces cerevisiae en la producción de bioetanol. *Información Tecnológica*, 22(6), 3-14

Muñoz, D., Pantoja, A & Cuatin, M. (2014). Aprovechamiento de residuos agroindustriales como biocombustibles y biorrefinería. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2(12), 10-19.

Oliveira, F.; Bajic, D.; Charles, J.; Sanchez, A. & Morten, A. (2021). Complex yeast-bacteria interactions affect the yield of industrial ethanol fermentation. *Nature communications*,12, 1498.

PNUMA. (18 febrero 2021). Hacer las paces con la naturaleza. https://www.unep.org/es/resources/making-peace-nature

Rijal, M. (2020). Bioethanol from sago waste fermented by bakers and tapai yeast as a renewable energy source. *bioRxiv*.

Rooni, V., Raud, M., & Timo Kikas, T. (2017). The freezing pre-treatment of lignocellulosic material: A cheap alternative for Nordic countries. *Energy*, 139, 1-7.

Ruiz-Marin, A.; Canedo-Lopez, Y.; Narvaez-Garcia, J. & Robles-Heredia, C. (2016). Producción de etanol por Saccharomyces cerevisiae y Zymomonas mobilis coinmovilizadas: Propuesta para el uso de desechos orgánicos. Agrociencia, 50, 551-563.

Sebos, I. (2022). Fossil fraction of CO2 emission of biofuels. *CARBON MANAGEMENT*, 13, 154- 163.

Suarez- Machín, C.; Garrido-Carralero, N. Guevara-Rodríguez, C. (2016). Levadura Saccharomyces cerevisiae y la producción de alcohol: revisión bibliográfica. *ICIDCA*, 50, 20-28.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Tambuwal, A.; Muhammad, I.; Alhaji, S.; Muhammad, S. & Ogbiko, C. (2018). Production and characterization of bioethanol from *Solanum Lycopersicum* stalk hydrolysates by the simultaneous saccharification and fermentation using *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 71–77.

Tejeda, L., Marimon, W. & Medina , M. (2014). Evaluacion del potencial de las casaras de frutas en la obencion de bioetanol. *Hechos Microbial*, 5, 4-9.

Therasme, O., Volk, T., Eisenbies, M., Amidon, T & Fortier, M. (2021). Life cycle greenhouse gas emissions of ethanol produced via fermentation of sugars derived from shrub willow (Salix ssp.) hot water extraction in the Northeast United States. *Biotechnol Biofuels*, 14-52.

Tse, T.; Wiens, D. & Reaney, M. (2021). Production of Bioethanol: A Review of Factors Affecting Ethanol Yield. *Fermentation*, 7, 268.

Vriesekoop, F. & Pamment, N. (2021). Acetaldehyde stimulation of the growth of Zymomonas mobilis subjected to ethanol and other environmental stresses: Effect of other metabolic electron acceptors and evidence for a mechanism. *Fermentation,* 7, 80.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

6. Anexos

Anexo 1. Anova y Tukey (0 h)

ANOVA: Single Factor

DESCRIPTION — Alpha 0.01

Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper
Control	3	559.34	186.45	0.95	1.89887	0.41343	185.059	187.834
S.cerevisi	3	558.4	186.13	0.87	1.74847	0.41343	184.746	187.521
Z.mobilis	3	555.6	185.20	0.22	0.4418	0.41343	183.813	186.587
S.cerevisi	3	557.15	185.72	0.01	0.01307	0.41343	184.329	187.104

ANOVA

Sources	SS	df	MS	F	P value	Eta-sq	RMSSE	Omega Sq
Between G	2.62269	3	0.87423	1.7049	0.24	0.39	0.75386	0.14982
Within Gr	4.1022	8	0.51278					
Total	6.72489	11	0.61135					

TUKEY HSD/KRAMER — alpha 0.01

group	mean	n	ss	df	q-crit
Control	186.447	3	1.89887		
S.cerevisi	186.133	3	1.74847		
Z.mobilis	185.2	3	0.4418		
S.cerevisi	185.717	3	0.01307		
		12	4.1022	8	6.204

Q TEST

group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
Control	S.cerevisi	0.31333	0.41343	0.75789	-2.2516	2.87826	0.95	2.56492	0.43757
Control	Z.mobilis	1.24667	0.41343	3.01542	-1.3183	3.81159	0.22	2.56492	1.74095
Control	S.cerevisi	0.73	0.41343	1.76571	-1.8349	3.29492	0.62	2.56492	1.01943
S.cerevisi	Z.mobilis	0.93333	0.41343	2.25753	-1.6316	3.49826	0.43	2.56492	1.30339
S.cerevisi	S.cerevisi	0.41667	0.41343	1.00783	-2.1483	2.98159	0.89	2.56492	0.58187
Z.mobilis	S.cerevisi	0.51667	0.41343	1.24971	-2.0483	3.08159	0.81	2.56492	0.72152

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Anexo 2. Anova y Tukey (120 h)

ANOVA: Single Factor

DESCRIPTION					Alpha	0.01		
Group	*Count*	*Sum*	*Mean*	*Variance*	*SS*	*Std Err*	*Lower*	*Upper*
Control	3	552.79	184.2633	0.713233	1.426467	0.717178	181.8569	186.6697
S.cerevisi	3	131.27	43.75667	2.045033	4.090067	0.717178	41.35026	46.16308
Z.mobilis	3	332.17	110.7233	3.304433	6.608867	0.717178	108.3169	113.1297
S.cerevisi	3	17.33	5.776667	0.109433	0.218867	0.717178	3.370256	8.183077

ANOVA								
Sources	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P value*	*Eta-sq*	*RMSSE*	*Omega Sq*
Between	55461.42	3	18487.14	11981.04	0.00	0.999777	63.19556	0.999666
Within Gr	12.34427	8	1.543033					
Total	55473.77	11	5043.07					

TUKEY HSD/KRAMER			alpha	0.01	
group	*mean*	*n*	*ss*	*df*	*q-crit*
Control	184.2633	3	1.426467		
S.cerevisi	43.75667	3	4.090067		
Z.mobilis	110.7233	3	6.608867		
S.cerevisi	5.776667	3	0.218867		
		12	12.34427	8	6.204

Q TEST

group 1	*group 2*	*mean*	*std err*	*q-stat*	*lower*	*upper*	*p-value*	*mean-crit*	*Cohen d*
Control	S.cerevisi	140.5067	0.717178	195.916	136.0573	144.956	0.00	4.449373	113.1122
Control	Z.mobilis	73.54	0.717178	102.5408	69.09063	77.98937	0.00	4.449373	59.20194
Control	S.cerevisi	178.4867	0.717178	248.8736	174.0373	182.936	0.00	4.449373	143.6872
S.cerevisi	Z.mobilis	66.96667	0.717178	93.37522	62.51729	71.41604	0.00	4.449373	53.91021
S.cerevisi	S.cerevisi	37.98	0.717178	52.95756	33.53063	42.42937	0.00	4.449373	30.57506
Z.mobilis	S.cerevisi	104.9467	0.717178	146.3328	100.4973	109.396	0.00	4.449373	84.48527

Anexo 3. Anova y Tukey consumo de azúcares reductores

ANOVA: Single Factor

DESCRIPTION					Alpha	0.01		
Group	*Count*	*Sum*	*Mean*	*Variance*	*SS*	*Std Err*	*Lower*	*Upper*
Control	3	6.55	2.18333	0.23463	0.46927	0.55055	0.33602	4.03065
S.cerevisi	3	427.12	142.373	1.54223	3.08447	0.55055	140.526	144.221
Z.mobilis	3	223.43	74.4767	1.81923	3.63847	0.55055	72.6293	76.324
S.cerevisi	3	539.91	179.97	0.0412	0.0824	0.55055	178.123	181.817

ANOVA								
Sources	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P value*	*Eta-sq*	*RMSSE*	*Omega Sq*
Between	55230	3	18410	20245.8	0.00	0.99987	82.1498	0.9998
Within G	7.2746	8	0.90932					
Total	55237.3	11	5021.57					

TUKEY HSD/KRAMER			alpha	0.01	
group	*mean*	*n*	*ss*	*df*	*q-crit*
Control	2.18333	3	0.46927		
S.cerevisi	142.373	3	3.08447		
Z.mobilis	74.4767	3	3.63847		
S.cerevisi	179.97	3	0.0824		
		12	7.2746	8	6.204

Q TEST

group 1	*group 2*	*mean*	*std err*	*q-stat*	*lower*	*upper*	*p-value*	*mean-crit*	*Cohen d*
Control	S.cerevisi	140.19	0.55055	254.635	136.774	143.606	0.00	3.41563	147.014
Control	Z.mobilis	72.2933	0.55055	131.31	68.8777	75.709	0.00	3.41563	75.8121
Control	S.cerevisi	177.787	0.55055	322.924	174.371	181.202	0.00	3.41563	186.44
S.cerevisi	Z.mobilis	67.8967	0.55055	123.325	64.481	71.3123	0.00	3.41563	71.2015
S.cerevisi	S.cerevisi	37.5967	0.55055	68.2889	34.181	41.0123	0.00	3.41563	39.4266
Z.mobilis	S.cerevisi	105.493	0.55055	191.613	102.078	108.909	0.00	3.41563	110.628

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Anexo 4. Anova y Tukey producción de bioetanol

ANOVA: Single Factor

DESCRIPTION — Alpha 0.01

Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper
Control	3	0	0	0	0	0.59938	-2.0111	2.01114
S.cerevisi	3	112.5	37.5	3.24	6.48	0.59938	35.4889	39.5111
Z.mobilis	3	50.92	16.9733	0.80103	1.60207	0.59938	14.9622	18.9845
S.cerevisi	3	186.6	62.2	0.27	0.54	0.59938	60.1889	64.2111

ANOVA

Sources	SS	df	MS	F	P value	Eta-sq	RMSSE	Omega Sq
Between	6480.05	3	2160.02	2004.18	0.00	0.99867	25.8468	0.99801
Within Gr	8.62207	8	1.07776					
Total	6488.67	11	589.879					

TUKEY HSD/KRAMER — alpha 0.01

group	mean	n	ss	df	q-crit
Control	0	3	0		
S.cerevisi	37.5	3	6.48		
Z.mobilis	16.9733	3	1.60207		
S.cerevisi	62.2	3	0.54		
		12	8.62207	8	6.204

Q TEST

group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
Control	S.cerevisi	37.5	0.59938	62.565	33.7815	41.2185	0.00	3.71853	36.1219
Control	Z.mobilis	16.9733	0.59938	28.3183	13.2548	20.6919	0.00	3.71853	16.3496
Control	S.cerevisi	62.2	0.59938	103.774	58.4815	65.9185	0.00	3.71853	59.9142
S.cerevisi	Z.mobilis	20.5267	0.59938	34.2467	16.8081	24.2452	0.00	3.71853	19.7723
S.cerevisi	S.cerevisi	24.7	0.59938	41.2095	20.9815	28.4185	0.00	3.71853	23.7923
Z.mobilis	S.cerevisi	45.2267	0.59938	75.4561	41.5081	48.9452	0.00	3.71853	43.5646

Anexo 5. Anova y Tukey rendimiento de bioetanol

ANOVA: Single Factor

DESCRIPTION — Alpha 0.01

Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper
Control	3	0	0	0	0	0.00553	-0.01855	0.01855
S.cerevisi	3	0.78	0.26	0.0001	0.0002	0.00553	0.24145	0.27855
Z.mobilis	3	0.68	0.22667	0.00023	0.00047	0.00553	0.20812	0.24521
S.cerevisi	3	1.04	0.34667	3.3E-05	6.7E-05	0.00553	0.32812	0.36521

ANOVA

Sources	SS	df	MS	F	P value	Eta-sq	RMSSE	Omega Sq
Between	0.19663	3	0.06554	715.03	0.00	0.99628	15.4384	0.99443
Within Gr	0.00073	8	9.2E-05					
Total	0.19737	11	0.01794					

TUKEY HSD/KRAMER — alpha 0.01

group	mean	n	ss	df	q-crit
Control	0	3	0		
S.cerevisi	0.26	3	0.0002		
Z.mobilis	0.22667	3	0.00047		
S.cerevisi	0.34667	3	6.7E-05		
		12	0.00073	8	6.204

Q TEST

group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
Control	S.cerevisi	0.26	0.00553	47.0358	0.22571	0.29429	0.00	0.03429	27.1561
Control	Z.mobilis	0.22667	0.00553	41.0055	0.19237	0.26096	0.00	0.03429	23.6746
Control	S.cerevisi	0.34667	0.00553	62.7144	0.31237	0.38096	0.00	0.03429	36.2082
S.cerevisi	Z.mobilis	0.03333	0.00553	6.03023	-0.00096	0.06763	0.01	0.03429	3.48155
S.cerevisi	S.cerevisi	0.08667	0.00553	15.6786	0.05237	0.12096	0.00	0.03429	9.05204
Z.mobilis	S.cerevisi	0.12	0.00553	21.7088	0.08571	0.15429	0.00	0.03429	12.5336

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Anexo 6. Anova y Tukey eficiencia de conversión

ANOVA: Single Factor

DESCRIPTION — Alpha 0.01

Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper
Control	3	0	0	0	0	1.09274	-3.6666	3.66655
S.cerevisi	3	154.69	51.5633	4.16123	8.32247	1.09274	47.8968	55.2299
Z.mobilis	3	133.91	44.6367	9.92333	19.8467	1.09274	40.9701	48.3032
S.cerevisi	3	203.04	67.68	0.2443	0.4886	1.09274	64.0134	71.3466

ANOVA

Sources	SS	df	MS	F	P value	Eta-sq	RMSSE	Omega Sq
Between	7552.88	3	2517.63	702.813	0.00	0.99622	15.3059	0.99433
Within Gr	28.6577	8	3.58222					
Total	7581.54	11	689.231					

TUKEY HSD/KRAMER — alpha 0.01

group	mean	n	ss	df	q-crit
Control	0	3	0		
S.cerevisi	51.5633	3	8.32247		
Z.mobilis	44.6367	3	19.8467		
S.cerevisi	67.68	3	0.4886		
		12	28.6577	8	6.204

Q TEST

group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
Control	S.cerevisi	51.5633	1.09274	47.1874	44.784	58.3427	0.00	6.77933	27.2436
Control	Z.mobilis	44.6367	1.09274	40.8485	37.8573	51.416	0.00	6.77933	23.5839
Control	S.cerevisi	67.68	1.09274	61.9363	60.9007	74.4593	0.00	6.77933	35.7589
S.cerevisi	Z.mobilis	6.92667	1.09274	6.33883	0.14733	13.706	0.01	6.77933	3.65972
S.cerevisi	S.cerevisi	16.1167	1.09274	14.7489	9.33733	22.896	0.00	6.77933	8.51529
Z.mobilis	S.cerevisi	23.0433	1.09274	21.0877	16.264	29.8227	0.00	6.77933	12.175

Anexo 7. Anova y Tukey producción volumétrica

ANOVA: Single Factor

DESCRIPTION — Alpha 0.01

Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper
Control	3	0.06	0.02	0.0004	0.0008	0.01404	-0.0271	0.06712
S.cerevisi	3	2.34	0.78	0.0016	0.0032	0.01404	0.73288	0.82712
Z.mobilis	3	1.06	0.35333	0.00023	0.00047	0.01404	0.30621	0.40045
S.cerevisi	3	3.88	1.29333	0.00013	0.00027	0.01404	1.24621	1.34045

ANOVA

Sources	SS	df	MS	F	P value	Eta-sq	RMSSE	Omega Sq
Between	2.72943	3	0.90981	1537.71	0.00	0.99827	22.64	0.9974
Within Gr	0.00473	8	0.00059					
Total	2.73417	11	0.24856					

TUKEY HSD/KRAMER — alpha 0.01

group	mean	n	ss	df	q-crit
Control	0.02	3	0.0008		
S.cerevisi	0.78	3	0.0032		
Z.mobilis	0.35333	3	0.00047		
S.cerevisi	1.29333	3	0.00027		
		12	0.00473	8	6.204

Q TEST

group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
Control	S.cerevisi	0.76	0.01404	54.1172	0.67287	0.84713	0.00	0.08713	31.2446
Control	Z.mobilis	0.33333	0.01404	23.7356	0.24621	0.42046	0.00	0.08713	13.7038
Control	S.cerevisi	1.27333	0.01404	90.6701	1.18621	1.36046	0.00	0.08713	52.3484
S.cerevisi	Z.mobilis	0.42667	0.01404	30.3816	0.33954	0.51379	0.00	0.08713	17.5408
S.cerevisi	S.cerevisi	0.51333	0.01404	36.5529	0.42621	0.60046	0.00	0.08713	21.1038
Z.mobilis	S.cerevisi	0.94	0.01404	66.9345	0.85287	1.02713	0.00	0.08713	38.6446

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Anexo 8. Anova y Tukey grado alcohólico

ANOVA: Single Factor

DESCRIPTION — Alpha 0.01

Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper
Control	3	0.1	0.0	0.00	0.00667	0.06872	-0.19724	0.26391
S.cerevis	3	12.6	4.2	0.04	0.08	0.06872	3.96942	4.43058
Z.mobilis	3	5.7	1.9	0.01	0.02	0.06872	1.66942	2.13058
S.cerevis	3	20.9	7.0	0.003	0.00667	0.06872	6.73609	7.19724

ANOVA

Sources	SS	df	MS	F	P value	Eta-sq	RMSSE	Omega Sq
Between	80.6492	3	26.8831	1897.63	0.00	0.9986	25.1504	0.9979
Within G	0.11333	8	0.01417					
Total	80.7625	11	7.34205					

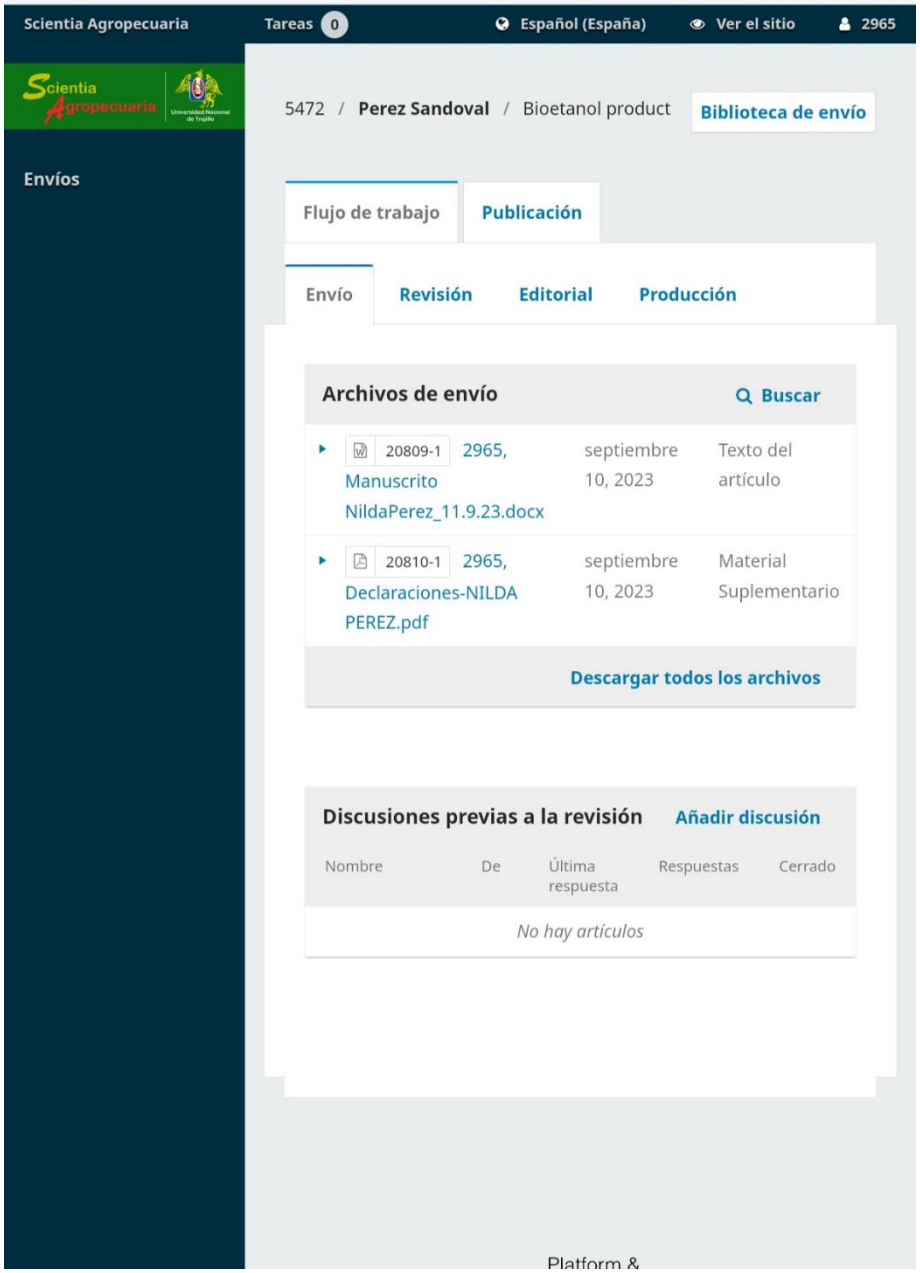
TUKEY HSD/KRAMER — alpha 0.01

group	mean	n	ss	df	q-crit
Control	0.0	3	0.00667		
S.cerevis	4.2	3	0.08		
Z.mobilis	1.9	3	0.02		
S.cerevis	7.0	3	0.00667		
		12	0.11333	8	6.204

Q TEST

group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
Control	S.cerevisiae	4.17	0.06872	60.6339	3.74034	4.593	0.00	0.42633	35.007
Control	Z.mobilis	1.87	0.06872	27.164	1.44034	2.293	0.00	0.42633	15.6831
Control	S.cerevisiae + Z.mobilis	6.93	0.06872	100.895	6.507	7.35966	0.00	0.42633	58.2517
S.cerevis	Z.mobilis	2.30	0.06872	33.4699	1.87367	2.72633	0.00	0.42633	19.3239
S.cerevis	S.cerevisiae + Z.mobilis	2.77	0.06872	40.2609	2.34034	3.193	0.00	0.42633	23.2446
Z.mobilis	S.cerevisiae + Z.mobilis	5.07	0.06872	73.7308	4.64034	5.493	0.00	0.42633	42.5685

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis



Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

RESOLUCIÓN DIRECTORAL ACADÉMICA DE CARRERA N°265-2020-DACIA-DAFCA-U. CIENTIFICA

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

Lima 26 de noviembre del 2020

VISTO:
El informe de revisión independiente académica y la aprobación de un Comité de Ética del proyecto de tesis titulado: **"PRODUCCIÓN DE BIOETANOL POR FERMENTACIÓN A PARTIR DE RESIDUOS ORGÁNICOS AGROINDUSTRIALES DE MANDARINA UTILIZANDO Saccharomyces cerevisiae y Zymomonas mobilis"**, presentado por:

- **Nilda María Perez Sandoval**

CONSIDERANDO:
Que, de acuerdo al Reglamento General de la Universidad Científica del Sur y los reglamentos de pregrado para obtener el título profesional de **Ingeniero(a) Ambiental** en la **Facultad de Ciencias Ambientales**, se debe desarrollar un trabajo de investigación.

Que, de acuerdo a la normativa vigente de la Universidad Científica del Sur, en uso de las atribuciones conferidas al Director Académico de Carrera.

SE RESUELVE:
Aprobar e inscribir el proyecto de tesis titulado: **"PRODUCCIÓN DE BIOETANOL POR FERMENTACIÓN A PARTIR DE RESIDUOS ORGÁNICOS AGROINDUSTRIALES DE MANDARINA UTILIZANDO Saccharomyces cerevisiae y Zymomonas mobilis"** con N° de registro: **N° 312-2020-PRE11**, y establecer el inicio del periodo de ejecución del mencionado proyecto.

Nombrar al docente/colaborador **Luis Abraham Gomero Osorio** como asesor(a) para el desarrollo de la tesis en cuestión.

Regístrese, comuníquese y archívese,

Mg. Gonzalo Francisco Flores Roca
Director Académico
Carrera de Ingeniería Ambiental