Optimization of molasses bioethanol using *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus MIT-L51 by Box-Behnken design

Helí Miranda-Chávez[1], Angélica Miranda-Jara[2], Pedro Arteaga-Llacza[2], Félix Carbajal-Gutiérrez[3], César Herbozo-y Romero[3], Alberto Palacios-Miñano[5], Henry Obregón-Tinoco[5]

[1]Universidad Nacional de Trujillo, hmirandch@gmail.com
[2] Universidad Nacional Federico Villarreal, amiranda@unfv.edu.pe, parteaga@unfv.edu.pe
[3] Universidad Nacional de Ingeniería, felix.carbajal.g@uni.edu.pe, cherbozo@uni.edu.pe
[4] Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, alberto.palacios@upc.pe
[5] Pontificia Universidad Católica del Perú, hobregon@pucp.edu.pe

***Abstract*– The objective was to optimize bioethanol production per-ton of sugarcane molasses by varying sugar concentrations, ammonium sulfate concentrations, and pH values, using Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus MIT-L51. The evaluated variables were evaluated at 15, 17, and 19% sugar concentrations, 400, 500, and 600 ppm ammonium sulfate concentrations, and pH values of 4.0, 4.5, and 5.0. Bioethanol production was carried out through 15 experimental trials using the Box-Behnken experimental design. The optimal conditions established for bioethanol production of 272.12 L per-ton of 50% standard molasses were 17% sugar concentration, 550 ppm ammonium sulfate concentration, and a pH value of 4.35. The aim has been to optimize the variables for subsequent experimental work until reaching industrial scale.**

***Keywords*-- V-ATPase, biorefinery, Box-Behnken, osmotic stress, ammonium sulfate.**

Optimización del bioetanol de melaza utilizando *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus MIT-L51 mediante el diseño Box-Behnken

Helí Miranda-Chávez[1], Angélica Miranda-Jara[2], Pedro Arteaga-Llacza[2], Félix Carbajal-Gutiérrez[3], César Herbozo-y Romero[3], Alberto Palacios-Miñano[5], Henry Obregón-Tinoco[5]

[1]Universidad Nacional de Trujillo, hmirandch@gmail.com
[2] Universidad Nacional Federico Villarreal, amiranda@unfv.edu.pe, parteaga@unfv.edu.pe
[3] Universidad Nacional de Ingeniería, felix.carbajal.g@uni.edu.pe, cherbozo@uni.edu.pe
[4] Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, alberto.palacios@upc.pe
[5] Pontificia Universidad Católica del Perú, hobregon@pucp.edu.pe

Resumen– El objetivo fue optimizar la producción de bioetanol por tonelada de melaza de caña de azúcar, variando las concentraciones de azúcar, concentraciones de sulfato de amonio y valores de pH, utilizando Saccharomyces cerevisiae var, ellipsoideus MIT-L51. Los niveles de las variables evaluadas fueron 15, 17 y 19% de concentración de azúcar, 400, 500 y 600 ppm de concentración de sulfato de amonio y 4.0, 4.5, y 5.0 de valores de pH. La producción de bioetanol se llevó a cabo por medio de 15 pruebas experimentales según el diseño experimental de Box-Behnken. Las condiciones óptimas establecidas, para una producción de etanol de 272.12 L de bioetanol por tonelada de melaza estándar al 50%, fueron 17% de concentración de azúcar, 550 ppm de concentración de sulfato de amonio y 4.35 de valor de pH. La finalidad ha sido optimizar las variables para un subsecuente trabajo experimental hasta llegar a la escala industrial.

Palabras clave— V-ATPasa, biorrefinería, Box-Benhken, estrés osmótico, sulfato de amonio.

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú, la principal materia prima utilizada como sustrato, para la producción industrial de bioetanol utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, es la melaza de caña de azúcar, que es un subproducto de la elaboración del azúcar de caña [1].

La melaza de caña contiene aproximadamente 50% de azúcares totales, de los cuales en promedio casi el 90% son azúcares fermentables y son los que tienen mayor importancia como sustratos, cuando se habla de producción de alcohol etílico. La fuente nitrogenada se encuentra entre 0.5 a 1.0% [2].

El azúcar fermentable que se encuentra en mayor concentración en la melaza es la sacarosa, que es la que va a sufrir un cambio bioquímico realizado por las levaduras; esto se lleva a cabo a través de las siguientes reacciones químicas: Primero, la sacarosa es hidrolizada en medio ácido desdoblándose en una molécula de glucosa y una molécula de fructosa. Segundo, cada una de estas moléculas a su vez, por la acción de las enzimas producidas por las levaduras, se desdoblan en dos moléculas de alcohol etílico y dos moléculas de anhidrido carbónico con desprendimiento de calor, siendo éstos los productos finales principales, de un proceso de fermentación alcohólica, bajo condiciones favorables [3].

Generalmente en la producción de etanol a nivel industrial, en donde el sustrato es la melaza de caña, la influencia del grado de concentración de azúcares se hace presente, indirectamente, en función del grado alcohólico obtenido de su transformación por las levaduras. Una alta concentración de azúcar permitirá obtener un alto grado alcohólico que sea compatible con aquellos que puedan ser tolerados por la levadura alcoholera, pues el alcohol producido, puede inhibir su acción y, en consecuencia, se prolongaría el tiempo de fermentación y podría no transformarse parte del azúcar. Por otra parte, el empleo de concentraciones demasiado bajas no resulta económico, ya que origina una pérdida de capacidad de fermentación y un aumento en los gastos de producción de alcohol [3,4].

A cerca de la fuente preferida de nitrógeno por las levaduras, se conoce que es la amoniacal, por sus beneficios sobre el rendimiento y sobre la velocidad de fermentación, pero ésta, en el caso de la melaza se encuentra en un bajo porcentaje con respecto a las necesidades nutritivas de las levaduras, por lo que se suele utilizar como suplemento el sulfato de amonio en los procesos fermentativos, en donde el sustrato empleado es la melaza (Kelsall, 1999, Ward, 1991).

Industrialmente en la producción de etanol, también suele usarse urea pomo fuente nitrogenada, pero recientemente su uso está siendo cuestionado por tener indicios de formar compuestos cancerígenos, debido a esto se está incrementando el uso de sulfato de amonio. El sulfato de amonio es la fuente de nitrógeno preferida para el desarrollo de la levadura, por su fácil asimilación y es la fuente nitrogenada que suele usarse en estudios de laboratorio. Sin embargo, esta fuente nitrogenada debe ser usada en una concentración que permita obtener un mejor rendimiento en el proceso fermentativo y al menor costo posible [5,6].

Con respecto a la concentración de hidrogeniones del medio que requiere la *Saccharomyces cerevisiae* en los procesos de fermentación alcohólica, es necesario que los valores de pH estén comprendidos entre 3 y 6 ya que en este rango son favorables al crecimiento y actividad fermentativa de la levadura [7,8].

A nivel industrial, la fermentación alcohólica se maneja satisfactoriamente cuando el pH del mosto ha sido ajustado entre 4.0 - 5.0. Este pH favorece el crecimiento y desarrollo de las levaduras, porque son microorganismos acidófilos y es lo suficientemente bajo para inhibir el desarrollo de muchos tipos de bacterias, las cuales crecen óptimamente a un pH de 6.8-8.2 [9].

El objetivo de la presente investigación fue optimizar la producción de alcohol etílico por tonelada de melaza de caña de azúcar, variando las concentraciones de azúcar, concentraciones de sulfato de amonio y valores de pH y utilizando como levadura alcoholera In cepa de *Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus* MIT-L51.

II. Materiales y métodos

A. Materiales de estudio

La melaza de caña de azúcar procedió de la Empresa Agroindustrial Tumán S.A. ubicada en el Departamento de Lambayeque. Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus MIT-L51 del Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Industrial del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo. Agar Sabouraud marca MERCK Q. P. Caldo mosto de melaza.

B. Control de los parámetros de estudio

1) Fase Pre-Fermentativa

Reactivación del cultivo

El cultivo de *S. cerevisiae var. ellipsoideus* MIT-L51 fue reactivado mediante subcultivos seriados en 2 placas Petri conteniendo agar Sabouraud e incubados a 30 °C por 48 horas.

Adaptación del cultivo

Reactivada la levadura se procedió a cosechar en cantidades adecuadas usando Solución Salina Fisiológica Estéril (SSFE). Se inocularon secuencialmente Erlenmeyer que contenían 100 mL de caldo mosto de melaza estéril a 6, 10 y 15 grados brix respectivamente y a un pH de 4.0 y se incubaron a 30°C por 12 horas en cada etapa, se logró en la última etapa un recuento de 10^8 células/mL. Los resultados promedios obtenidos se presentan en el Anexo 1 [10].

Mantenimiento y propagación de la levadura

El mantenimiento se hizo en caldo mosto de melaza a 15 grados brix a un pH de 4.0, al cual se inoculó 20 mL de suspensión homogénea de levadura del anterior caldo mosto de melaza a 15 grados brix, se incubó a 30°C por 12 horas, de manera que se pudo mantener el cultivo adaptado al medio diariamente. Los resultados promedios obtenidos se presentan en el Anexo 1.

Propagación de la levadura

Del Erlenmeyer a 15 grados brix que contenía el desarrollo de la levadura, se tomó un volumen de 50 mL y se transfirió a otro Erlenmeyer que contenía 250 mL de caldo mosto de melaza estéril a 18 grados brix y un pH de 4.0, el que se incubó a 30°C por 12 horas, en donde se obtuvo un número mayor de 1.5 x 10º células/mL, considerándose que la levadura estaba lista para su traspaso a la fase fermentativa [11].

2) Fase Fermentativa

La fase fermentativa se llevó a cabo por medio de pruebas experimentales y según el diseño Box-Behnken presentadas en la Tabla I. Para ello se prepararon un total de 15 balones fermentadores que contenían 1500 mL de solución de melaza sin esterilizar, a diferentes concentraciones de azúcar, sulfato de amonio y a diferentes valores de pH, de acuerdo con la prueba experimental correspondiente. Los balones fermentadores fueron inoculados con 300 mL de inóculo provenientes de la fase de propagación y se dejaron fermentar a temperatura ambiente durante 30 horas. Posteriormente se efectuaron los análisis respectivos a los mostos fermentados para su correspondiente evaluación [7].

3) Fase Post-Fermentativa

De cada uno de los balones fermentadores, terminado el tiempo de fermentación, se procedió a calcular la producción de litros de alcohol por tonelada de melaza y además se hicieron análisis de recuento celular, grado brix, valor de pH, azúcar total, porcentaje de alcohol y eficiencia de fermentación.

C. Determinación del bioetanol

El método utilizado fue el de picnometría, es decir se determinó la densidad relativa del destilado a 20°C y de acuerdo con las tablas de conversión se encontró los contenidos de alcohol de las muestras de mosto [12].

D. Determinación del pH

Se utilizó el método electrométrico, haciendo uso de un potenciómetro por medio del cual se determinaron los valores de pH y se estandarizó con una solución buffer [13].

TABLA I
DISEÑO EXPERIMENTAL BOX-BENHKEN

Variables	Símbolo	Niveles			Unidad
		Mínimo (-1)	Central (0)	Máximo (+1)	
Azúcar	A	15	17	19	% P/P
Sulfato de amonio	B	400	500	600	ppm
pH	C	4.0	4.5	5.0	

E. Determinación de la producción de bioetanol

La producción de bioetanol se calculó dividiendo el volumen de bioetanol obtenido en mL entre los g de melaza estándar al 50% utilizada, multiplicado por un factor de 10^3 para obtener $L.t^{-1}$. Se utilizó la siguiente ecuación:

$$Y_i\left({}^{L}/_{t}\right) = \frac{mL\ de\ bioetanol * 10^3}{g\ de\ melaza\ estándar\ al\ 50\%} \quad (1)$$

F. Diseño experimental

Para la optimización de la producción de etanol por tonelada de melaza fue necesario considerar 3 niveles de las 3 variables en estudio, cuyas cantidades se presentan en la Tabla I en un diseño Box – Behnken.

F. Análisis de datos

El nivel óptimo de cada variable independiente fue determinado usando las técnicas de optimización de respuesta superficial [14]. El análisis de respuesta superficial fue practicado para 3 variables independientes y sus relaciones se ajustaron al siguiente modelo polinomial cuadrático:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \ldots \quad (2)$$

Para la identificación de un valor óptimo fue necesario estimar la curvatura, para lo cual cada variable fue ensayada en 15 niveles mediante el diseño de Box-Behnken [15]. Los coeficientes del modelo polinomial fueron calculados usando las técnicas de regresión múltiple y luego fue determinada la ecuación XY Polinomial, la que fue usada para generar respuestas predictivas (superficie de respuestas y líneas de contorno) para las diferentes combinaciones de los niveles de las variables. Todos los cálculos y gráficos estadísticos fueron realizados con el software de prueba Minitab v.19.

II. Resultados

Rendimiento de bioetanol

TABLA II
PRODUCCIÓN DE ETANOL POR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* VAR. ELLIPSOIDEUS MIT-L51 VARIANDO LAS VARIABLES AZÚCAR, SULFATO DE AMONIO Y PH DE ACUERDO CON EL DISEÑO BOX-BEHNKEN

N°	Variables			Producción de etanol
	A	B	C	
	(%)	(ppm)		(L/t)
1	15	400	4.5	245.6
2	15	500	4	255.5
3	17	600	5	262
4	17	400	5	248.8
5	19	500	4	249.9
6	17	500	4.5	**269.6**
7	17	400	4	256.2
8	15	600	4.5	258.8
9	15	500	5	247.7
10	19	600	5	249.9
11	17	600	4	265.9
12	15	400	4	252.4
13	19	400	4.5	**239.6**
14	19	500	5	243
15	19	600	4.5	256.9

Los hallazgos derivados de las quince evaluaciones experimentales para la generación de etanol, expresados en litros de alcohol por tonelada de melaza estándar al 50%, conforme al diseño de respuesta superficial Box-Behnken, se exponen en la Tabla II. El valor mínimo fue de 239.6 L/t y el valor máximo fue de 269.6 L/t. En la práctica de la industria azucarera, 20° Brix en soluciones puras de sacarosa equivalen aproximadamente al 20% de azúcar. Raby et al. [16] utilizaron melaza de caña de azúcar como fuente de carbono para la producción de bioetanol a una dilución de 20° Brix, mientras que en el presente estudio se trabajó con una concentración de azúcar del 19% (19° Brix).

En la Tabla III, se observa el análisis de varianza para el modelo cuadrático evaluado con los datos de producción de etanol. La suma de cuadrados se clasifica en la categoría III - Parcial. El valor p del modelo de 0,0031 indica que es significativo. En el presente escenario, los términos A, B, C, A^2, B^2 y C^2 poseen relevancia significativa. Los valores que superan 0,1000 señalan que los términos del modelo carecen de relevancia. Si existen numerosos términos del modelo que carecen de relevancia (incluyendo aquellos necesarios para mantener la jerarquía), la disminución de este podría optimizarlo. En cuanto al ajuste y calidad del modelo el R^2 = 96.82, indica que el modelo lineal cuadrático logra explicar casi el 97% de la variabilidad observada en la producción de bioetanol. El R^2 Ajustado = 91.10%, al penalizar el modelo por el número de términos, sigue estando muy por encima del 80% recomendado en investigación biotecnológica. La significancia global (p = 0.0031), como es menor a 0.05, el modelo en su conjunto es altamente significativo para predecir la respuesta [15].

Se pueden observar que los efectos lineales son significativos ($p < 0.05$). La concentración de sulfato de amonio (B) (p = 0.0006), es el efecto lineal más crítico. El nitrógeno asimilable es vital para la síntesis de proteínas y la tolerancia al etanol de la levadura. Pequeños cambios aquí alteran drásticamente el rendimiento [17]. El pH (C) (p = 0.007) altera la carga de la membrana celular y la actividad de las enzimas clave en la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (glicólisis) [18]. Y la concentración de azúcar (A) (p = 0.0241) sorprendentemente, de forma puramente lineal, es el que menos ponderado de los tres, aunque sigue siendo significativa.

En cuanto a los términos cuadráticos es el hallazgo más interesante, todos los términos A^2, B^2 y C^2 son todos significativos, y el término A^2 tiene el valor F más alto de toda la tabla (F = 74.93, p = 0.0003). Esto significa biológicamente que la relación entre las variables y la producción de bioetanol es una curva (parábola con concavidad hacia abajo). En cuanto al azúcar (A^2), esto confirma la existencia de un óptimo real. Si hay demasiado el azúcar (hacia el 19%), el rendimiento cae debido al estrés osmótico y la inhibición por sustrato. Una concentración muy baja (15%), limita carbono. La cepa MIT-L51 encuentra su zona de confort en un punto intermedio. Lo mismo ocurre con el pH y el nitrógeno [19].

TABLA III
ANÁLISIS DE VARIANZA DEL MODELO CUADRÁTICO DEL DISEÑO BOX – BEHNKEN

Fuente de Variación	SC	GL	CM	F	p
Model	953.55	9	105.95	16.92	0.0031*
A	63.96	1	63.96	10.22	0.0241*
B	374.23	1	374.23	59.77	0.0006*
C	120.48	1	120.48	19.24	0.0071*
AB	14.86	1	14.86	2.37	0.1841
AC	4.50	1	4.50	0.7184	0.4354
BC	12.46	1	12.46	1.99	0.2175
A^2	469.14	1	469.14	74.93	0.0003*
B^2	45.27	1	45.27	7.23	0.0434*
C^2	75.27	1	75.27	12.02	0.0179*
Residual	31.31	5	6.26		
Cor Total	984.86	14			

GL: Grados de libertad, SC: Suma de cuadrados, CM: Cuadrados medios, F: valor F y P: valor p. R^2: 96.82%, R^2 ajustado: 91.10%; R^2 predicho: 67.25%; Precisión adecuada: 13.81.

Ninguna de las interacciones cruzadas es significativa ($p > 0.05$), significa que los factores actúan de manera independiente sobre la levadura. Por ejemplo, el efecto del pH en la producción de bioetanol es el mismo sin importar si tienes 400 ppm o 600 ppm de sulfato de amonio. En los gráficos de superficie de respuesta (3D), se notará que las proyecciones de las curvas en la base tienden a ser círculos o formas simétricas, no elipses ultra elongadas u oblicuas.

El modelo matemático postulado es adecuado y estadísticamente válido (Fig. 1), dado que los residuos satisfacen satisfactoriamente los tres supuestos fundamentales de la regresión y el análisis de varianza: normalidad, varianza constante e independencia [15].

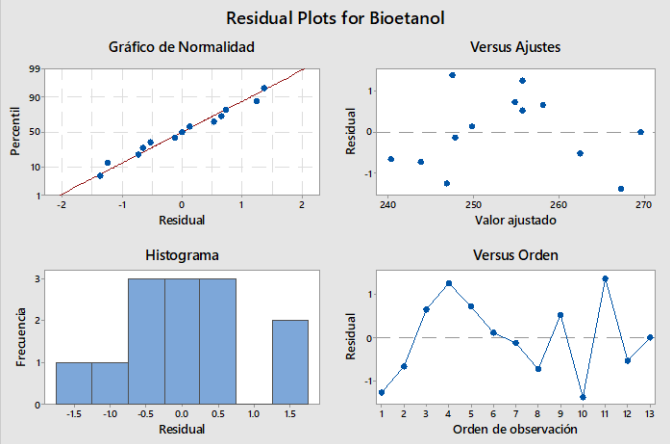


Fig. 1. Gráfica de residuos para producción de Bioetanol

En la Tabla IV, se observa que todos los coeficientes cuadráticos ($-13.35A^2$, $-4.15B^2$, $-5.35C^2$) son negativos. En el cálculo multivariable, esto es la prueba matemática inequívoca de que tus superficies de respuesta forman una parábola convexa (forma de domo o colina). Existe un punto máximo absoluto. El término del azúcar (A^2 = -13.35) es, por mucho, el más crítico. Moverse bruscamente lejos del centro (17%) hacia los extremos (15% o 19%) va a medrar drásticamente la producción debido al fuerte impacto del estrés osmótico celular [19]. Estudios recientes de optimización demuestran que manipular las proporciones de melaza (ej. 38.1% p/p) en co-sustratos lignocelulósicos busca precisamente maximizar la obtención de estos azúcares reductores para asegurar la viabilidad del proceso [20].

En cuanto a los términos lineales como el azúcar (A = -2.618) indica que el óptimo real de azúcar está ligeramente por debajo del nivel medio (17%). El sulfato de amonio (B = +6.332) es el coeficiente lineal más grande, esto significa que la cima de la producción se desplaza marcadamente hacia el nivel alto. La levadura tiene afinidad por el nitrógeno; el óptimo real va a estar por encima de los 500 ppm. Y el pH (C = -3.593) indica que el pH óptimo para la cepa MIT-L51 se inclina ligeramente hacia el lado más ácido (por debajo de 4.5, buscando el rango de 4.0 a 4.4). Esto es muy favorable industrialmente, ya que un pH más bajo ayuda a prevenir contaminaciones bacterianas en los fermentadores [21].

TABLA IV
COEFICIENTES PARA EL MODELO CUADRÁTICO

Términos	Efecto	Coeficiente	SE	T	P	FIV
Constant		268.09	2.31	116.08	0	
A	-5.236	-2.618	0.819	-3.2	0.024	1.07
B	12.664	6.332	0.819	7.73	0.001	1.07
C	-7.186	-3.593	0.819	-4.39	0.007	1.07
A^2	-26.69	-13.35	1.54	-8.66	0	1.27
B^2	-8.29	-4.15	1.54	-2.69	0.043	1.27
C^2	-10.69	-5.35	1.54	-3.47	0.018	1.27
A*B	3.56	1.78	1.15	1.54	0.184	1.22
A*C	1.96	0.98	1.15	0.85	0.435	1.22
B*C	3.26	1.63	1.15	1.41	0.217	1.22

SE: error estándar, T: valor t-student, p: valor p, A: azúcar, B: Sulfato, C: amonio, FIV: factor de inflación de la varianza.

Ecuación de regresión en unidades sin codificar:
Bioetanol = -986 + 103.3 A + 0.180 B + 152.3 C - 3.336 A*A - 0.000415 B*B - 21.38 C*C + 0.00889 A*B + 0.98 A*C + 0.0326 B*C

La gráfica de efectos principales (Fig. 2) muestra en la variable concentración de azúcar (A) que al incrementar el azúcar desde 15% hasta 16.8% la producción de bioetanol sube porque aumenta el sustrato disponible para la ruta fermentativa. Sin embargo, pasar del 17% hacia el 19% provoca una caída drástica llegando a su punto más bajo cerca de 253. Esto es el vivo reflejo del estrés osmótico. Las altas concentraciones de azúcar incrementan la presión osmótica extracelular, provocando la deshidratación parcial de la levadura, alterando su metabolismo y reduciendo severamente la eficiencia de la conversión a bioetanol [19]. Asimismo, la variable concentración de sulfato de amonio (B), relacionada a la fuente

de nitrógeno, indica que es crítica para la fermentación de melaza (que suele ser rica en carbono, pero deficiente en nitrógeno asimilable). Pasar de 400 a 500 ppm dispara la biomasa celular y estimula la síntesis de transportadores de glucosa y enzimas clave [21]. Lo interesante es que después de las 580 ppm la curva decae ligeramente. Esto demuestra un efecto de saturación nutricional, añadir más amonio ya no estimula la producción, e incluso concentraciones excesivas de sales de amonio pueden incrementar la salinidad del medio e inhibir sutilmente el crecimiento celular [17]. En cuanto a la variable pH (C) se nota un efecto en la cepa *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus MIT-L51 optimizando su gradiente de protones a través de la membrana plasmática en este rango de 4.3 – 4.4. Un pH óptimo ligeramente ácido optimiza el funcionamiento de la ATPasa de membrana, consumiendo menos energía celular en el transporte azúcares [22]. Si el pH sube a 5.0, el rendimiento disminuye (260 unidades menos) debido al gasto energético extra que requiere mantener la homeostasis interna y a posibles alteraciones en la carga superficial de la célula que afectan la absorción de nutrientes. Las bombas de protones tipo P, Pma1, y las V-ATPasas son los actores primordiales en el control del pH fúngico. Estas dos bombas de protones, con una regulación elevada, funcionan juntamente con una amplia variedad de otros transportadores. La coordinación de las acciones de V-ATPasa y Pma1 en determinadas circunstancias indica que el pH de los orgánulos y del citosol no se regula de manera autónoma [23].

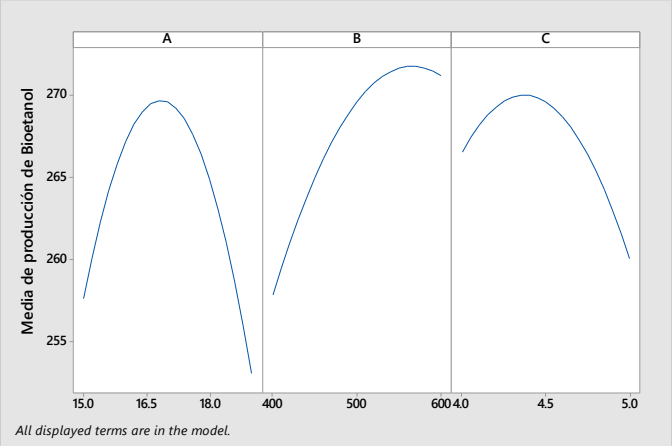


Fig. 2. Gráfica de efectos principales para producción de bioetanol

La Fig. 3 de interacciones de la producción de bioetanol muestra estadísticamente que cuando las líneas en un gráfico de interacción son paralelas o siguen exactamente la misma tendencia sin cruzarse, significa que los factores actúan de forma independiente [15]. Esto confirma lo hallado en el ANVA.

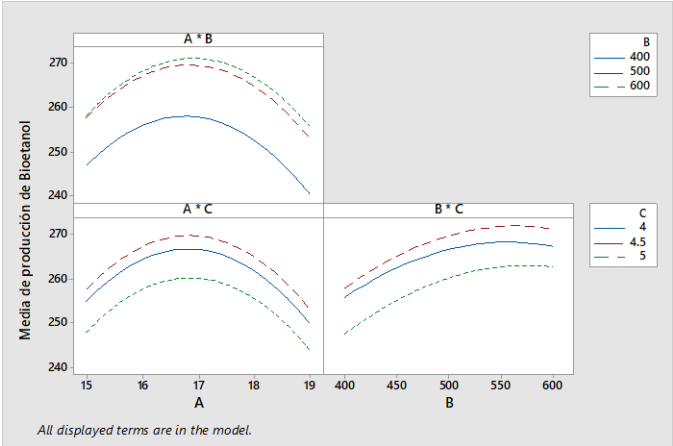


Fig. 3. Gráfica de interacciones de producción de bioetanol

La Fig. 4 en el panel B*A permite observar que la región de máxima producción (>270) tiene una forma elongada verticalmente. Se ubica de manera muy estricta en el eje horizontal entre 16.5% y 17.2% de azúcar (A), mientras que en el eje vertical (B) abarca un rango holgado desde aproximadamente 500 ppm hasta el límite superior de 600 ppm. Esto demuestra que el proceso es sumamente sensible al azúcar; si te sales de esa estrecha ventana central, la producción cae rápidamente a las zonas verde claro (260 – 265) o azul. En cambio, existe mayor flexibilidad operativa con el sulfato de amonio, siempre y cuando se mantengas en la mitad superior del diseño (>500 ppm). El panel C*A es el más restrictivo y el que mejor define el punto crítico. Muestra una "zona homeostasis" termodinámica y metabólica para la cepa MIT-L51. Fuera de este núcleo elíptico se castiga el rendimiento de bioetanol, confirmándose el peso que tienen los términos cuadráticos A^2 y C^2 en el modelo. Mientras que en el panel C*B, se observa que al dejar el azúcar constante en su nivel medio (17%), puede asegurar rendimientos máximos sin necesidad de manipular el pH, y la levadura metaboliza óptimamente el nitrógeno disponible en un ambiente moderadamente ácido (aproximadamente 4.3). Esto se traduce en una minimización significativa de los costos de control de pH a gran escala.

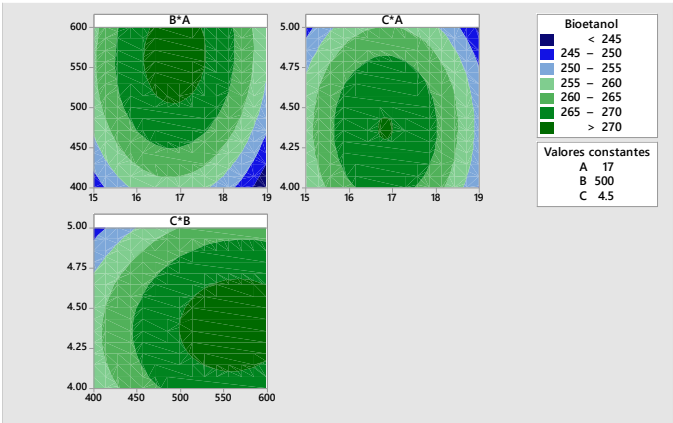


Fig. 4. Gráfica de contornos de producción de Bioetanol

Al igual que con los mapas de contorno, las proyecciones 3D de las superficies de respuesta (Fig. 5) visualmente, las tres superficies muestran una forma de domo o colina convexa, lo cual es la prueba definitiva en el espacio tridimensional de que los coeficientes cuadráticos negativos son dominantes y de que existe un punto de optimización máximo real y único dentro del diseño [15].

La Fig. 6 contiene el gráfico optimizador de respuesta, en este caso indica los valores de las variables de estudio que permiten maximizar la producción de bioetanol. El contenido óptimo de azúcar (A) se encuentra en la cúspide de la parábola. Esto demuestra que el valor de 16.9% evita con éxito el umbral de inhibición osmótica celular sin desaprovechar el potencial de carbono de la melaza. El óptimo de sulfato de amonio (B) se estabiliza 563.6 ppm, por debajo del límite superior evaluado (600 ppm). A escala industrial, esto representa la optimización del costo operativo. El pH óptimo de 4.4 ratifica que la cepa *MIT-L51* fermenta con máxima eficiencia en un entorno moderadamente ácido.

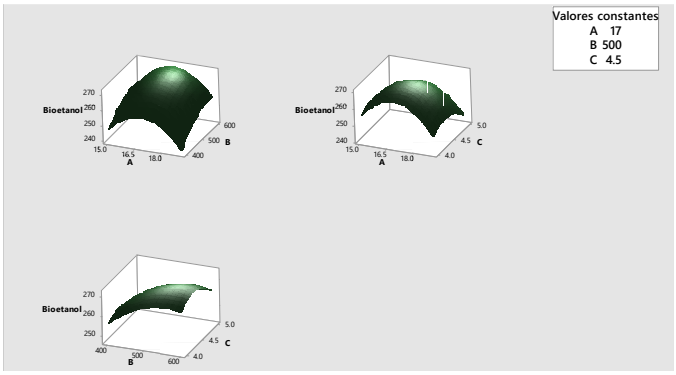


Fig. 5. Gráfica de superficies de producción de Bioetanol

Esto otorga una ventaja competitiva para el escalado del proceso, puesto que operar a este nivel de acidez limita el desarrollo de bacterias competidoras (como los géneros *Lactobacillus*) y reduce el costo de reducir el pH en fermentaciones industriales. Lo más destacable metodológicamente es el valor de Deseabilidad Compuesta (D = 1), esto significa el algoritmo matemático logró encontrar una combinación de variables que maximiza la producción de bioetanol a partir de melaza de caña azucarera.

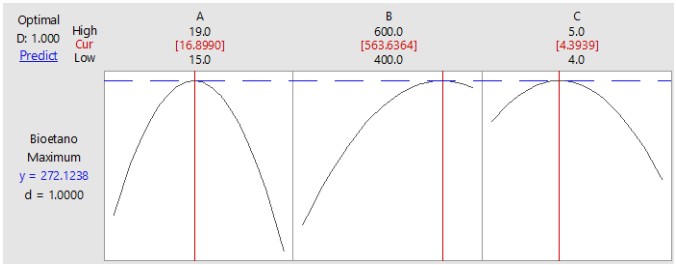


Fig. 6. Optimizador de producción de Bioetanol

Un estudio de Hawaz et al. [24] buscó optimizar la producción de bioetanol a partir de melaza de caña de azúcar utilizando un sistema de co-fermentación empleando dos levaduras: *S. cerevisiae* TA2 y *W. anomalus* HCJ2F-19; mediante la aplicación de metodología de superficie de respuesta (RSM) y un diseño compuesto central, se determinaron las condiciones operativas ideales de temperatura, pH y agitación. Los resultados finales destacaron que la interacción sinérgica entre ambas cepas no solo mejora la eficiencia metabólica, sino que también reduce el tiempo de incubación necesario.

El concepto moderno de biorrefinería integrada busca mitigar los impactos ambientales y maximizar la conversión de recursos mediante soluciones tecnológicas innovadoras en la destilación de alcohol [25]. Para que esta integración sea efectiva desde la primera generación, es crucial estandarizar el comportamiento cinético del sistema biológico.

IV. Conclusiones

Se optimizó con éxito el proceso de producción de bioetanol a partir de melaza de caña de azúcar utilizando la cepa *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus MIT-L51, mediante la aplicación de un diseño de superficie de respuesta Box-Behnken. El modelo matemático cuadrático desarrollado demostró una alta robustez y capacidad predictiva, respaldado por un coeficiente de determinación ajustado alto (R^2 = 91.10%) y una significancia global estadística elevada (p = 0.0031). Bajo estas especificaciones coordinadas y con una deseabilidad compuesta perfecta (D = 1), el modelo matemático predice un rendimiento máximo teórico de 272.12 L de bioetanol por tonelada de melaza. La ausencia de interacciones binarias significativas (p > 0.05) y la estabilidad del rendimiento en la zona óptima moderadamente ácida (pH 4.4) sugieren que la cepa MIT-L51 posee una notable robustez homeostática. Esto representa una ventaja técnica sustancial para el escalado industrial, ya que permite maximizar la productividad reduciendo la dependencia de cargas excesivas de nitrógeno y minimizando el riesgo de contaminación bacteriana en los biorreactores. Se recomienda evaluar el punto óptimo determinado en sistemas de biorreactores de columna o tanques agitados a escala piloto.

Referencias

[1] W.H. Liew, M.H. Hassim, D.K.S. Ng, Review of evolution, technology and sustainability assessments of biofuel production, J. Clean. Prod. 71 (2014) 11–29. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.01.006.

[2] Y. Cronjé, S. Farzad, M. Mandegari, J.F. Görgens, A critical review of multiple alternative pathways for the production of a high-value bioproduct from sugarcane mill byproducts: the case of adipic acid, Biofuel Research Journal 10 (2023) 1933–1947. https://doi.org/10.18331/BRJ2023.10.3.5.

[3] Y. Wu, J. Wen, K. Wang, C. Su, C. Chen, Z. Cui, D. Cai, S. Cheng, H. Cao, P. Qin, Understanding the Dynamics of the Saccharomyces cerevisiae and Scheffersomyces stipitis Abundance in Co-culturing Process for Bioethanol Production from Corn Stover, Waste Biomass Valorization 14 (2023) 43–55. https://doi.org/10.1007/s12649-022-01861-3.

[4] S.A. El-Mekkawi, S.M. Abdo, F.A. Samhan, G.H. Ali, Optimization of some fermentation conditions for bioethanol production from microalgae using response surface method, Bull. Natl. Res. Cent. 43 (2019) 164. https://doi.org/10.1186/s42269-019-0205-8.

[5] E. Hawaz, M. Tafesse, A. Tesfaye, D. Beyene, S. Kiros, G. Kebede, T. Boekhout, B. Theelen, M. Groenewald, A. Degefe, S. Degu, A. Admas, D. Muleta, Isolation and characterization of bioethanol producing wild yeasts from bio-wastes and co-products of sugar factories, Ann. Microbiol. 72 (2022) 39. https://doi.org/10.1186/s13213-022-01695-3.

[6] J.N. de Vasconcelos, C.E. Lopes, F.P. de França, Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane stalks, Brazilian Journal of Chemical Engineering 21 (2004) 357–365. https://doi.org/10.1590/S0104-66322004000300002.

[7] E. Hawaz, M. Tafesse, A. Tesfaye, S. Kiros, D. Beyene, G. Kebede, T. Boekhout, M. Groenwald, B. Theelen, A. Degefe, S. Degu, A. Admasu, B. Hunde, D. Muleta, Optimization of bioethanol production from sugarcane molasses by the response surface methodology using Meyerozyma caribbica isolate MJTm3, Ann. Microbiol. 73 (2023) 2. https://doi.org/10.1186/s13213-022-01706-3.

[8] M. Balat, Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review, Energy Convers. Manag. 52 (2011) 858–875. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013.

[9] T.A. Moonsamy, M. Mandegari, S. Farzad, Johann.F. Görgens, A new insight into integrated first and second-generation bioethanol production from sugarcane, Ind. Crops Prod. 188 (2022) 115675. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115675.

[10] N. Raina, P.S. Slathia, P. Sharma, Response surface methodology (RSM) for optimization of thermochemical pretreatment method and enzymatic hydrolysis of deodar sawdust (DS) for bioethanol production using separate hydrolysis and co-fermentation (SHCF), Biomass Convers. Biorefin. 12 (2022) 5175–5195. https://doi.org/10.1007/s13399-020-00970-0.

[11] Y. Naito, M. Okai, M. Ishida, M. Takashio, N. Urano, Bioethanol Production from Molasses by Yeasts with Stress-Tolerance Isolated from Aquatic Environments in Japan, Adv. Microbiol. 09 (2019) 1000–1011. https://doi.org/10.4236/aim.2019.912065.

[12] A.A. Salinas Sanchez, Estudio comparativo de la determinación de alcohol etílico en bebidas alcohólicas destiladas por los métodos oficiales y el método de espectroscopia en la región espectral del infrarrojo cercano, Tesis doctoral, Universidad Católica de Santa María, 2025.

[13] R. Ortiz Vásquez, S.V. Olivares Muñoz, Bebida alcohólica a partir de la fermentación de Rubus fruticosus con levadura y sacarosa, Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería 4 (2022) 50–56. https://doi.org/10.25127/ucni.v4i3.808.

[14] J. Antony, Design of experiments for engineers and scientists, Elsevier, 2023.

[15] R.H. Myers, D.C. Montgomery, C.M. Anderson-Cook, Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments, John Wiley & Sons, 2016.

[16] H.S. Raby, M.A. Saadat, A.N. Sakib, F. Moni Chowdhury, A. Yousuf, Bioethanol production from sugarcane molasses with supplemented nutrients by industrial yeast, Biofuels 15 (2024) 129–135. https://doi.org/10.1080/17597269.2023.2221880.

[17] C.S. Varize, A. Bücker, L.D. Lopes, R.M. Christofoleti-Furlan, M.S. Raposo, L.C. Basso, B.U. Stambuk, Increasing Ethanol Tolerance and Ethanol Production in an Industrial Fuel Ethanol Saccharomyces cerevisiae Strain, Fermentation 8 (2022) 470. https://doi.org/10.3390/fermentation8100470.

[18] N. Grüning, F. Agostini, C. Caldana, J. Hartl, M. Heinemann, M.A. Keller, J.L. Krüsemann, C. Lamperti, C.L. Linster, S.N. Lindner, J. Muenzner, J. Nielsen, Z. Nikoloski, B. Siebers, J.L. Snoep, H. Tenenboim, B. Teusink, S.J. Williams, M.M.C. Wamelink, M. Ralser, The return of metabolism: biochemistry and physiology of glycolysis, Biological Reviews 101 (2026) 751–803. https://doi.org/10.1111/brv.70104.

[19] R. Douradinho, P. Sica, F. Tonoli, E. Mattos, M. Oliveira, A. Pinto, L. Mota, T. Faria, V.F. Costa, G. Leite, V. Arthur, S. Coelho, A. Baptista, Osmotic Stress Alleviation in Saccharomyces cerevisiae for High Ethanol Fermentations with Different Wort Substrates, Stresses 3 (2023) 813–826. https://doi.org/10.3390/stresses3040055.

[20] H.M. Tadesse, T. Atnafu, E. Kassahun, I. Tessema, M. Abewaa, S. Tibebu, Optimization of bioethanol production from a brewers' spent grain and sugarcane molasses mixture utilizing Saccharomyces cerevisiae, Biomass Convers. Biorefin. 15 (2025) 20765–20788. https://doi.org/10.1007/s13399-025-06629-y.

[21] S.A. Siddiqui, Z. Erol, J. Rugji, F. Taşçı, H.A. Kahraman, V. Toppi, L. Musa, G. Di Giacinto, N.A. Bahmid, M. Mehdizadeh, R. Castro-Muñoz, An overview of fermentation in the food industry - looking back from a new perspective, Bioresour. Bioprocess. 10 (2023) 85. https://doi.org/10.1186/s40643-023-00702-y.

[22] C.D. Holyoak, M. Stratford, Z. McMullin, M.B. Cole, K. Crimmins, A.J. Brown, P.J. Coote, Activity of the plasma membrane H(+)-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of Saccharomyces cerevisiae in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid, Appl. Environ. Microbiol. 62 (1996) 3158–3164. https://doi.org/10.1128/aem.62.9.3158-3164.1996.

[23] P.M. Kane, Proton Transport and pH Control in Fungi, in: 2016: pp. 33–68. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6_3.

[24] E. Hawaz, M. Tafesse, A. Tesfaye, S. Kiros, D. Beyene, G. Kebede, T. Boekhout, M. Groenwald, B. Theelen, A. Degefe, S. Degu, A. Admasu, B. Hunde, D. Muleta, Bioethanol production from sugarcane molasses by co-fermentation of Saccharomyces cerevisiae isolate TA2 and Wickerhamomyces anomalus isolate HCJ2F-19, Ann. Microbiol. 74 (2024) 13. https://doi.org/10.1186/s13213-024-01757-8.

[25] P. Kaur, G. Kaur, M. Sethi, D. Singla, Sugarcane-Based Bioethanol Production for Sustainable Development, in: 2026: pp. 189–219. https://doi.org/10.1007/978-981-95-6766-9_6.