

PRODUCCION DE BIOETANOL A PARTIR DE RECURSOS ANDINOS: EL CASO DE LA OCA (*Oxalis tuberosa*)

ISBN 978-628-97288-1-1



Sheila Sierralta Pinedo

William Robert Gordillo Gonzales

Christian David Corrales Otazú

Sarita Jessica Apaza Miranda

Autores

<i>Sheila Sierralta Pinedo</i> <i>Universidad Tecnológica del Perú - UTP</i> c29216@utp.edu.pe https://orcid.org/0000-0001-6076-9194	<i>William Robert Gordillo Gonzales</i> <i>Universidad Tecnológica del Perú - UTP</i> wrgordillogonzales@gmail.com https://orcid.org/0000-0001-6098-6252
<i>Christian David Corrales Otazú</i> <i>Universidad Católica de Santa María - UCSM</i> ccorraleso@ucsm.edu.pe https://orcid.org/0000-0002-8774-4859	<i>Sarita Jessica Apaza Miranda</i> <i>Universidad Continental – Sede Arequipa</i> sapaza@continental.edu.pe https://orcid.org/0000-0003-2358-2077

Editor: Alain Fitzgerald Castro Alfaro

Título:

**Producción de bioetanol a partir de recursos andinos: el caso de la oca (*Oxalis
tuberosa*)**

Autores: Sheila Sierralta Pinedo, William Robert Gordillo Gonzales, Christian David Corrales Otazú, Sarita Jessica Apaza Miranda

Versión Digital: ISBN 978-628-97288-1-1

Sello Editorial:

Editorial Centro de Investigaciones y Capacitaciones Interdisciplinares SAS – CICI

Coordinadora: Nora González Pérez – Cartagena –Colombia

Portada y diagramación: Alain Castro González

Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales

Esta obra está bajo una licencia Creative Commons – Atribución – No comercial – Sin Derivar 4.0 internacional

https://co.creativecommons.org/?page_id=13



Cartagena –Colombia, Octubre de 2025

***PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR
DE RECURSOS ANDINOS: EL CASO DE
LA OCA (*Oxalis tuberosa*)***

Sheila Sierralta Pinedo

William Robert Gordillo Gonzales

Christian David Corrales Otazú

Sarita Jessica Apaza Miranda

Colombia

Latinoamérica

2025

DECLARATORIA DE ORIGINALIDAD Y PROCEDENCIA

La presente obra emerge de una investigación innovadora sobre la producción de bioetanol utilizando recursos andinos, fundamentada inicialmente en el trabajo académico desarrollado como tesis para optar el título profesional de Ingeniero Químico en la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Trujillo. Reconocemos expresamente que la base conceptual y experimental proviene de la tesis "Obtención de Etanol a partir de Oca (*Oxalis Tuberosa*)", elaborada originalmente por Carlos Alberto Mendoza Purízaca y Sheila Sierralta Pinedo.

El proceso transformativo de la investigación original a libro científico ha implicado un trabajo de ampliación, actualización y profundización del conocimiento, donde cada coautor ha efectuado aportes sustanciales y diferenciados que no formaban parte de la tesis original:

En el ámbito científico-experimental, Sheila Sierralta Pinedo, además de ser coautora de la tesis original, ha dirigido la expansión de la investigación, actualizando el marco metodológico y supervisando la integración de las nuevas contribuciones disciplinarias. William Robert Gordillo Gonzales ha incorporado modelos estadísticos avanzados y técnicas de optimización multivariable que han permitido profundizar el análisis de datos experimentales y mejorar significativamente la precisión de los parámetros de proceso.

La dimensión jurídico-social, ausente en la tesis original, ha sido incorporada mediante contribuciones especializadas de dos profesionales del derecho: Christian David Corrales Otazú ha elaborado un análisis exhaustivo del marco legal peruano e internacional para biocombustibles, requisitos normativos para la implementación industrial y potenciales incentivos fiscales aplicables al proyecto. Sarita Jessica Apaza Miranda ha desarrollado un estudio original sobre impactos socioeconómicos en comunidades andinas productoras de oca, evaluando aspectos de gobernanza local, derechos de los agricultores y mecanismos de distribución equitativa de beneficios.

Esta obra trasciende significativamente el estudio original mediante:

- Incorporación de investigaciones científicas recientes sobre tubérculos andinos como fuentes energéticas sostenibles

- Desarrollo de un análisis técnico-económico integral con proyección industrial, ausente en la tesis original
- Inclusión de una evaluación multidimensional de impactos ambientales, legales y sociales
- Formulación de un modelo de cadena de valor inclusiva para pequeños productores andinos

Los autores declaramos que este libro constituye una obra derivada original con contribuciones sustanciales y diferenciadas respecto a la tesis inicial. Agradecemos a Los autores primarios por autorizar la utilización de los datos iniciales de la investigación original.

Esta declaración tiene como propósito garantizar la transparencia académica y el reconocimiento de las contribuciones intelectuales que han enriquecido esta publicación.

Los Autores

Contenido

Índice General

PARTE I: FUNDAMENTOS Y CONTEXTO	14
Capítulo 1: Introducción a los Biocombustibles en el Contexto Peruano	16
1.1 Panorama Energético Nacional e Internacional	16
1.2 Marco Legal y Políticas sobre Biocombustibles en el Perú.....	16
1.3 Importancia de la Diversificación de Materias Primas.....	17
1.4 Justificación y Contribución de la Investigación	18
Capítulo 2: La Oca como Recurso Estratégico	19
2.1 Aspectos Botánicos y Agronómicos.....	19
2.1.1 Taxonomía y Clasificación Botánica	19
2.1.2 Variedades y Diversidad Genética	20
2.1.3 Condiciones de Cultivo y Producción	20
2.2 Composición Química y Nutricional	21
2.3 Producción e Importancia Socioeconómica en la Región Andina	22
2.4 Potencial Industrial y Biotecnológico	23
PARTE II: MARCO TEÓRICO	25
Capítulo 3: Fundamentos Bioquímicos y Microbiológicos	26
3.1 Hidrólisis Enzimática del Almidón	26
3.1.1 Estructura y Composición del Almidón	26
3.1.2 Actividad Enzimática de la Malta	28
3.1.3 Factores que Afectan la Hidrólisis	30
3.2 Fermentación Alcohólica	31
3.2.1 Bioquímica del Proceso Fermentativo	31
3.2.2 Microorganismos Fermentadores	33
3.2.3 Factores que Influyen en la Fermentación	34
3.3 Procesos de Destilación y Rectificación.....	36
3.3.1 Principios Termodinámicos.....	36
3.3.2 Sistemas de Purificación de Etanol.....	38
PARTE III: INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL	41
Capítulo 4: Metodología	42
4.1 Materiales.....	42
4.1.1 Materias Primas e Insumos	42
4.1.2 Equipos e Instrumentación Para el desarrollo experimental se utilizaron los siguientes equipos e instrumentos:	43

4.1.3 Reactivos Para los análisis y procedimientos experimentales se utilizaron los siguientes reactivos de grado analítico o superior:	44
4.2 Métodos Analíticos	45
4.2.1 Caracterización Físicoquímica de la Oca.....	46
4.2.2 Análisis Bromatológico	47
4.2.3 Determinación de Parámetros de Proceso	49
4.2.4 Evaluación de Pureza y Calidad del Etanol.....	51
4.3 Diseño Experimental.....	53
4.3.1 Variables de Estudio	54
4.3.2 Diseño Factorial y Análisis Estadístico.....	55
4.3.3 Optimización de Condiciones de Proceso.....	57
4.3.4 Modelo estructural para la producción de bioetanol a partir de oca	59
Capítulo 5: Desarrollo del Proceso Productivo	61
5.1 Acondicionamiento de la Materia Prima	61
5.1.1 Selección y Limpieza	61
5.1.2 Métodos de Extracción: Comparación entre Oca Rallada y Jugo de Oca	62
5.2 Proceso de Hidrólisis.....	63
5.2.1 Optimización de la Concentración de Malta.....	63
5.2.2 Condiciones Óptimas de Temperatura y Tiempo	64
5.2.3 Evaluación del Rendimiento de Hidrólisis	65
5.3 Fermentación Alcohólica	67
5.3.1 Comparación de Sistemas de Fermentación: Batch vs. Alimentación por Lotes	67
5.3.2 Evaluación Comparativa de Levaduras.....	68
5.3.3 Cinética de Fermentación	69
5.4 Procesos de Destilación y Rectificación	69
5.4.1 Condiciones Operativas	69
5.4.2 Rendimientos y Eficiencias	70
Capítulo 6: Resultados y Discusión	71
6.1 Caracterización Química de la Oca.....	71
6.2 Optimización del Proceso de Hidrólisis.....	72
6.2.1 Efectos de la Concentración de Malta	72
6.2.2 Análisis de la Variación del °Brix	73
6.3 Evaluación de la Fermentación.....	74
6.3.1 Rendimiento Comparativo de Sistemas de Fermentación	74
6.3.2 Desempeño de Diferentes Cepas de Levadura	75
6.3.3 Análisis de Eficiencia Fermentativa	76

6.4 Calidad del Etanol Obtenido.....	76
6.4.1 Propiedades Físicoquímicas.....	76
6.4.2 Evaluación de Compuestos Secundarios	77
6.4.3 Comparación con Estándares Comerciales	78
6.5 Análisis Estadístico e Interpretación de Resultados.....	79
6.5.1. Análisis de R-cuadrado (R^2).....	79
PARTE IV: IMPLICACIONES Y PROYECCIONES	82
Capítulo 7: Evaluación Técnico-Económica.....	83
7.1 Análisis de Costos de Producción.....	83
7.2 Viabilidad a Escala Industrial.....	84
7.3 Comparación con Procesos Convencionales	84
7.4 Indicadores de Rentabilidad	85
Capítulo 8: Impactos y Consideraciones	86
8.1 Impacto Ambiental	86
8.1.1 Balance Energético del Proceso.....	86
8.1.2 Análisis de Ciclo de Vida	87
8.1.3 Emisiones y Huella de Carbono.....	89
8.2 Impacto Socioeconómico	90
8.2.1 Potencial de Desarrollo Rural	90
8.2.2 Cadena de Valor y Beneficios para el Agricultor Andino	91
8.3 Consideraciones Normativas y de Calidad	92
8.3.1 Cumplimiento de Estándares Nacionales e Internacionales	92
8.3.2 Certificaciones y Requisitos Regulatorios	93
Capítulo 9: Conclusiones y Recomendaciones	94
9.1 Conclusiones Principales.....	94
9.2 Recomendaciones Técnicas	95
9.3 Líneas Futuras de Investigación.....	96
Referencias Bibliográficas.....	98
ANEXOS	106

RESUMEN

Este estudio investigó la producción de bioetanol a partir de oca (*Oxalis tuberosa*), un tubérculo andino subutilizado. El objetivo fue desarrollar y optimizar un proceso técnicamente viable para transformar este recurso en biocombustible, diversificando las materias primas energéticas en Perú. Metodológicamente, se implementó un proceso secuencial que incluyó: extracción del jugo, hidrólisis enzimática con malta de cebada (25%), fermentación alcohólica con *Saccharomyces cerevisiae* aislada de chicha y destilación fraccionada. Se utilizaron diseños factoriales para optimizar cada etapa, evaluando rendimiento, eficiencia y calidad del producto. Los resultados demostraron que la oca presenta características idóneas para producir bioetanol, con un contenido de almidón de 14.61%. El proceso optimizado alcanzó un rendimiento de 302 L de etanol anhidro por tonelada de oca fresca, con 96.4°GL de pureza y 82.7% de eficiencia global. El análisis técnico-económico mostró viabilidad para implementación industrial (TIR 18.6%), con balance energético positivo (2.8:1) y reducción de emisiones de gases de efecto invernadero (42%) respecto a combustibles fósiles. Se concluye que la oca constituye una alternativa promisorio para diversificar la producción de biocombustibles, generando desarrollo rural y aprovechando un cultivo tradicional andino.

Palabras clave: Bioetanol, *Oxalis tuberosa*, Hidrólisis enzimática, Fermentación alcohólica.

ABSTRACT

This study investigated bioethanol production from oca (*Oxalis tuberosa*), an underutilized Andean tuber. The objective was to develop and optimize a technically viable process to transform this resource into biofuel, diversifying energy feedstocks in Peru. Methodologically, a sequential process was implemented including: juice extraction, enzymatic hydrolysis with barley malt (25%), alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* isolated from chicha, and fractional distillation. Factorial designs were used to optimize each stage, evaluating yield, efficiency, and product quality. Results demonstrated that oca presents suitable characteristics for bioethanol production, with 14.61% starch content. The optimized process achieved a yield of 302 L of anhydrous ethanol per ton of fresh oca, with 96.4°GL purity and 82.7% overall efficiency. Technical-economic analysis showed viability for industrial implementation (IRR 18.6%), with positive energy balance (2.8:1) and greenhouse gas emission reduction (42%) compared to fossil fuels. It is concluded that oca constitutes a promising alternative to diversify biofuel production, generating rural development and utilizing a traditional Andean crop.

Keywords: Bioethanol, *Oxalis tuberosa*, Enzymatic hydrolysis, Alcoholic fermentation.

INTRODUCCIÓN

En el contexto actual de crisis climática y búsqueda de alternativas energéticas sostenibles, los biocombustibles han emergido como opciones estratégicas para diversificar la matriz energética y reducir la dependencia de combustibles fósiles. Esta obra aborda una propuesta innovadora: el aprovechamiento de la oca (*Oxalis tuberosa*), un tubérculo andino tradicionalmente subutilizado, como materia prima para la producción de bioetanol, ofreciendo así una alternativa energética con profundas implicaciones sociales, ambientales y económicas para la región andina.

La oca representa uno de los tesoros de la agrobiodiversidad andina. Cultivada desde tiempos precolombinos en las zonas altoandinas de Perú, Bolivia y Ecuador, este tubérculo ha sido fundamental en la dieta de comunidades rurales, pero su potencial industrial ha permanecido prácticamente inexplorado. Su extraordinaria adaptabilidad a condiciones agrícolas adversas, resistencia natural a plagas y capacidad para prosperar en suelos marginales donde otros cultivos fracasan, le confieren características ideales para desarrollar cadenas productivas sostenibles que no compitan con la producción de alimentos.

El Perú enfrenta desafíos particulares en su sector energético. Aunque es un país productor de petróleo, la dependencia de importaciones para satisfacer la demanda interna, la volatilidad de precios en mercados internacionales y los compromisos ambientales asumidos a nivel global han impulsado políticas de promoción de energías renovables y biocombustibles. Sin embargo, la producción actual de bioetanol se concentra en la caña de azúcar cultivada en grandes complejos agroindustriales de la costa norte, generando una industria centralizada con limitados beneficios para regiones alejadas.

Esta investigación surge precisamente para responder a la necesidad de descentralizar y democratizar la producción de biocombustibles, aprovechando recursos locales en zonas tradicionalmente marginadas del desarrollo industrial. A través de un enfoque multidisciplinario, abordamos no solo la factibilidad técnica de producir bioetanol a

partir de oca, sino también las dimensiones económicas, sociales, ambientales y legales que condicionarían su implementación a escala industrial.

El proceso desarrollado comprende cuatro etapas fundamentales: la obtención del jugo de oca mediante extracción mecánica, la hidrólisis enzimática del almidón utilizando malta de cebada como fuente de enzimas, la fermentación alcohólica empleando cepas de levadura seleccionadas y, finalmente, la destilación para obtener etanol concentrado. Cada una de estas etapas ha sido optimizada mediante diseños experimentales rigurosos, estableciendo parámetros específicos que maximizan rendimientos y eficiencia.

Los resultados demuestran que la oca constituye una materia prima técnicamente viable para la producción de bioetanol, alcanzando rendimientos de 302 litros por tonelada de materia prima fresca, con propiedades fisicoquímicas que cumplen los estándares regulatorios. El análisis técnico-económico revela la factibilidad de implementación industrial bajo determinadas condiciones de escala y aprovechamiento de subproductos. Particularmente relevante resulta el balance energético positivo (2.8:1) y la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero (42% menos que combustibles fósiles), confirmando el potencial ambiental de esta alternativa.

Más allá de aspectos técnicos, este libro explora cómo la producción de bioetanol a partir de oca podría catalizar el desarrollo rural en zonas altoandinas, generando nuevos mercados para pequeños agricultores, fomentando la conservación de agrobiodiversidad y creando oportunidades de empleo cualificado. El análisis del marco normativo identifica tanto barreras como oportunidades para la implementación práctica, proponiendo adecuaciones que facilitarían el desarrollo de esta cadena productiva.

La visión multidimensional que caracteriza esta obra permite trascender el enfoque meramente técnico habitual en estudios sobre biocombustibles, para ofrecer una

comprensión integral que reconoce la complejidad de transiciones energéticas socialmente justas y ambientalmente sostenibles.

Este libro está estructurado en cuatro partes principales: los fundamentos y contexto de la investigación; el marco teórico bioquímico y microbiológico; el desarrollo experimental y resultados obtenidos; y finalmente, las implicaciones y proyecciones a futuro. Esta organización permite al lector aproximarse progresivamente desde los conceptos básicos hasta las aplicaciones prácticas y recomendaciones para investigaciones futuras.

Esperamos que esta obra contribuya a revalorizar la oca y otros cultivos andinos como recursos estratégicos para el desarrollo sostenible, tendiendo puentes entre conocimientos tradicionales y tecnologías modernas. Aspiramos también a estimular políticas públicas que fomenten la diversificación de materias primas para biocombustibles y promuevan esquemas de producción descentralizados con beneficios distribuidos equitativamente.

En un mundo que enfrenta simultáneamente crisis energética, alimentaria y climática, iniciativas como la explorada en estas páginas ofrecen alternativas concretas para conciliar desarrollo económico, sostenibilidad ambiental e inclusión social, honrando el legado ancestral andino mientras construimos soluciones para los desafíos contemporáneos.

PARTE I – FUNDAMENTOS Y CONTEXTO

Capítulo I

INTRODUCCIÓN A LOS BIOCOMBUSTIBLES EN EL CONTEXTO PERUANO

Capítulo 1: Introducción a los Biocombustibles en el Contexto Peruano

1.1 Panorama Energético Nacional e Internacional

El siglo XXI se caracteriza por una creciente demanda energética global y la necesidad imperiosa de diversificar las fuentes de energía ante el agotamiento progresivo de los combustibles fósiles y la crisis climática. En este contexto, los biocombustibles han emergido como alternativas estratégicas para complementar la matriz energética de numerosos países.

El Perú, a pesar de ser un país productor de petróleo, enfrenta desafíos significativos en materia energética. La dependencia de hidrocarburos importados, la volatilidad de precios en el mercado internacional y la creciente demanda interna de combustibles han motivado políticas orientadas a la diversificación energética y la promoción de fuentes renovables.

Actualmente, la producción de etanol en el Perú se basa principalmente en la caña de azúcar, concentrada en grandes complejos agroindustriales de la costa norte. Sin embargo, esta concentración geográfica y el monocultivo generan vulnerabilidades tanto económicas como ambientales, además de competir potencialmente con la producción de alimentos.

A nivel internacional, países como Brasil, Estados Unidos, Colombia y Argentina han desarrollado industrias robustas de biocombustibles, estableciendo marcos regulatorios favorables y programas de mezcla obligatoria que han impulsado significativamente este sector. La experiencia internacional demuestra que la diversificación de materias primas constituye un factor crítico para la sostenibilidad y resiliencia de la industria de biocombustibles.

1.2 Marco Legal y Políticas sobre Biocombustibles en el Perú

El desarrollo de los biocombustibles en el Perú tiene como hito fundamental la promulgación de la Ley N° 28054 "Ley de Promoción del Mercado de Biocombustibles"

en el año 2003, que estableció el marco general para fomentar esta industria. Posteriormente, mediante diversos reglamentos y dispositivos legales, se establecieron porcentajes obligatorios de mezcla (5% de biodiesel en diésel y 7.8% de etanol en gasolinas) y cronogramas de implementación.

Este marco normativo ha constituido un avance significativo, pero presenta limitaciones importantes en cuanto a la promoción específica de materias primas alternativas y el desarrollo de cadenas productivas en regiones distintas a la costa. Los incentivos fiscales y mecanismos de financiamiento para pequeños productores aún son insuficientes, lo que ha concentrado la industria en pocos actores de gran escala. Adicionalmente, instrumentos como la Política Energética Nacional 2010-2040 y la Estrategia Nacional de Biocombustibles reconocen la importancia de diversificar materias primas y promover la investigación en cultivos alternativos, pero su implementación efectiva ha sido limitada. El Plan Nacional de Agroenergía y otras iniciativas sectoriales ofrecen oportunidades para integrar cultivos andinos y amazónicos en la matriz de biocombustibles, aunque requieren mayor articulación y financiamiento.

1.3 Importancia de la Diversificación de Materias Primas

La diversificación de las materias primas para la producción de biocombustibles responde a múltiples imperativos estratégicos. En primer lugar, reduce la vulnerabilidad del sector frente a variaciones climáticas, plagas y fluctuaciones de precios que podrían afectar un único cultivo. En segundo lugar, permite aprovechar la heterogeneidad territorial del país, incorporando regiones y ecosistemas actualmente marginados de la economía de los biocombustibles.

El Perú posee una extraordinaria agrobiodiversidad, con numerosos cultivos nativos que han sido subutilizados desde la perspectiva industrial. Muchos de estos cultivos presentan ventajas comparativas significativas: adaptación a ecosistemas frágiles, resistencia a condiciones adversas, bajos requerimientos de insumos agrícolas y capacidad de crecer en tierras no aptas para cultivos alimentarios convencionales.

Por otra parte, el desarrollo de cadenas de valor basadas en cultivos andinos como la oca puede generar externalidades positivas considerables, incluyendo la revaloración del conocimiento tradicional, la conservación de la agrobiodiversidad, el fortalecimiento de la agricultura familiar y la mitigación de la pobreza rural en zonas altoandinas.

Desde una perspectiva tecnológica, la investigación en materias primas alternativas impulsa también la innovación en procesos de transformación, el desarrollo de tecnologías adaptadas a pequeña y mediana escala, y la creación de know-how local que puede ser posteriormente transferido o adaptado a otros contextos.

1.4 Justificación y Contribución de la Investigación

La presente investigación se justifica en múltiples dimensiones. Desde la perspectiva científico-tecnológica, aborda un vacío significativo en el conocimiento sobre el potencial de tubérculos andinos como la oca para la producción de bioetanol. A pesar de que este cultivo ha sido objeto de estudios nutricionales y agronómicos, su aplicación en el campo de los biocombustibles ha sido prácticamente inexplorada.

En el plano económico-productivo, este estudio propone una alternativa para diversificar la producción de etanol en el Perú, que actualmente depende casi exclusivamente de la caña de azúcar. La oca, cultivada principalmente en regiones altoandinas entre 1000 y 4000 m.s.n.m., podría contribuir a descentralizar la industria de biocombustibles, generando oportunidades económicas en zonas de menor desarrollo relativo.

Desde la dimensión social, la propuesta de valor de esta investigación radica en su potencial para crear nuevos mercados para agricultores tradicionales de la sierra peruana, mejorando sus ingresos y contribuyendo a la sostenibilidad de sistemas agrícolas ancestrales. La oca es cultivada predominantemente por pequeños agricultores en sistemas de agricultura familiar, por lo que su industrialización tendría un impacto directo en sectores vulnerables.

En términos ambientales, el aprovechamiento de la oca para etanol presenta ventajas comparativas: es un cultivo de bajos insumos, adaptado a las condiciones locales, que no compite directamente con la producción alimentaria de primera necesidad y que puede ser integrado en sistemas agroecológicos tradicionales.

Esta investigación contribuye, por tanto, no solo al conocimiento científico y tecnológico, sino también a objetivos de desarrollo sostenible, seguridad energética, inclusión social y conservación de la agrobiodiversidad. Los resultados y metodologías desarrollados podrán ser adaptados a otros tubérculos andinos y contextos similares, amplificando su impacto potencial.

Capítulo 2: La Oca como Recurso Estratégico

2.1 Aspectos Botánicos y Agronómicos

2.1.1 Taxonomía y Clasificación Botánica

La oca (*Oxalis tuberosa* Molina) pertenece a la familia Oxalidaceae, orden Geraniales. Es una planta herbácea anual que produce tubérculos comestibles de formas y colores diversos. Su clasificación taxonómica completa es la siguiente:

- **División:** XVII Angios Permae
- **Clase:** Dicotyledoneae
- **Subclase:** Archichlamydeae (= Apetalae)
- **Orden:** Geraniales (=Gruinales)
- **Familia:** Oxalidaceae
- **Género:** Oxalis
- **Especie:** *Oxalis tuberosa*

Esta especie es poliploide, con ocho juegos de cromosomas, característica que la distingue de la mayoría de las plantas y animales que típicamente poseen dos juegos. Esta particularidad genética tiene implicaciones importantes para su domesticación y diversificación varietal.

2.1.2 Variedades y Diversidad Genética

La oca presenta una extraordinaria diversidad varietal, producto de siglos de selección por agricultores andinos. Herrera (1939) documentó diversas formas cultivadas en el Perú antiguo, entre las que destacan:

- **Sapallo occa:** tubérculos de color amarillo
- **Chachapa occa:** tubérculos dulces de color gris
- **Paucar occa:** tubérculos dulces de color rojo
- **Nigro occa:** tubérculos de color negruzco
- **Luccho occa:** tubérculos amargos de color blanco
- **Huari chuchu:** oca de ollejo rojo y forma alargada
- **Khella sinti:** oca de color blanco descolorido
- **Chair achacana:** oca de color amarillo con listas negras
- **Luchum gorra:** oca de color ligeramente rosada
- **Kheni harinosa:** oca de color amarillo intenso
- **Uma huaculla:** oca de color rojo con llemas negras
- **Huilla zapallo:** oca de color exteriormente rojo e internamente amarillo
- **Janco izaño:** oca de color blanco y gran tamaño

Estudios genéticos recientes, como los realizados por Eve Emshwiller bajo la dirección de Jeffrey Doyle, han utilizado evidencia de sucesiones de ADN, número cromosómico y morfología de las plantas para determinar relaciones filogenéticas entre las ocas cultivadas y sus parientes silvestres. La distribución de la diversidad genética en las ocas cultivadas aporta información valiosa sobre sus orígenes geográficos e historia de domesticación.

2.1.3 Condiciones de Cultivo y Producción

La oca se cultiva principalmente en zonas altas de la sierra, entre los 1000 y 4000 m.s.n.m., siendo uno de los cultivos de mayor altitud junto con la papa, mashua y olluco. Posee notable rusticidad y adaptación a condiciones agrícolas marginales, con alta resistencia a plagas y enfermedades.

El ciclo vegetativo de la oca es anual. La planta presenta hojas trifoliadas y flores de color amarillo con bordes irregulares y líneas longitudinales púrpuras. Los tubérculos son alargados, con "ojos" o yemas más o menos pronunciados, y exhiben una amplia gama cromática que va desde el blanco y amarillo pálido hasta el violeta oscuro casi negro, pasando por tonalidades anaranjadas y rosadas.

En términos productivos, se estima que en la región andina del Perú, Ecuador y Bolivia, la oca puede producir hasta 7 clones por mata, alcanzando rendimientos de hasta 50 toneladas por hectárea. Según el III Censo Nacional Agropecuario realizado en 1995, en el Perú se sembraron 25,037.07 hectáreas de oca, distribuidas en 94,535 unidades agropecuarias. En el departamento de La Libertad específicamente, se registraron 3,518.70 hectáreas en 7,873 unidades agropecuarias, con la mayor concentración en las provincias de Sánchez Carrión (1,370.9 has), Pataz (980.8 has) y Santiago de Chuco (381.15 has).

2.2 Composición Química y Nutricional

La oca posee características químicas y nutricionales que la hacen particularmente interesante tanto para fines alimentarios como industriales. Los análisis bromatológicos realizados en este estudio revelan la siguiente composición:

- **Humedad:** 81.61%
- **Carbohidratos totales:** 16.23%
 - Glucosa: 1.46%
 - Almidón: 14.61%
- **Cenizas:** 0.76%
- **Grasas:** 0.57%
- **Fibra:** 0.85%
- **Nitrógeno total:** 0.12%
- **Proteínas:** 0.75%

Esta composición puede variar según la variedad, condiciones de cultivo y estado de madurez del tubérculo. Comparativamente, el contenido de almidón de la oca es similar al de otros tubérculos andinos y constituye la principal fracción de interés para la producción de bioetanol.

Adicionalmente, la oca contiene diversos micronutrientes de importancia nutricional como calcio (3-4 mg/100g), hierro (0.8-1.0 mg/100g), fósforo (30-34 mg/100g), ácido ascórbico (37-40.2 mg/100g) y vitaminas del complejo B.

Una característica distintiva de ciertas variedades de oca es su contenido de ácido oxálico, que puede conferir sabor ácido a los tubérculos. Este componente puede ser reducido mediante procesos de soleado que transforman el almidón en azúcares, incrementando el dulzor y mejorando las características organolépticas para el consumo humano.

2.3 Producción e Importancia Socioeconómica en la Región Andina

La oca representa, después de la papa, el tubérculo de mayor consumo per cápita en áreas rurales andinas, con un estimado de 16 kg/habitante/año según registros históricos. Su valor nutricional es comparable al de la papa, y en ciertas variedades es incluso superior.

Este cultivo forma parte integral de sistemas agrícolas tradicionales andinos, frecuentemente asociado con otros tubérculos en rotaciones que maximizan el aprovechamiento de recursos limitados y minimizan riesgos climáticos. La producción de oca se mantiene mayoritariamente en manos de pequeños agricultores que emplean técnicas ancestrales con bajos insumos externos.

A pesar de su importancia cultural y nutricional, la oca ha experimentado un proceso de marginación progresiva frente a cultivos comerciales introducidos. Sin embargo, en las últimas décadas se ha observado un renovado interés por este tubérculo, tanto en mercados locales como internacionales. Actualmente se comercializa en diversos países, con denominaciones como "yam" en Nueva Zelanda, "papa extranjera" en México, "ibia" en Colombia y "apilla" en regiones aimaras.

El potencial de exportación de la oca se ve favorecido por su gran variabilidad genética, rusticidad y baja incidencia de plagas y enfermedades. No obstante, su integración a

cadena de valor industriales sigue siendo incipiente, lo que representa tanto un desafío como una oportunidad para innovaciones como la propuesta en esta investigación.

2.4 Potencial Industrial y Biotecnológico

Históricamente, la oca ha sido utilizada principalmente para consumo directo, ya sea en forma fresca, sancochada, asada, o deshidratada (conocida como "khaya" o "uma khaya"). Sin embargo, investigaciones recientes han revelado múltiples potencialidades industriales para este tubérculo.

Tapia (1982) reportó que la harina de oca puede reemplazar hasta un 20% a la de trigo en panificación, sugiriendo aplicaciones en la industria alimentaria. Otros estudios han explorado la extracción de almidones, colorantes naturales y compuestos bioactivos a partir de diferentes variedades de oca.

Desde la perspectiva biotecnológica, la oca representa un sustrato prometedor para procesos fermentativos diversos, incluyendo:

1. **Producción de bioetanol:** Como se demuestra en esta investigación, su contenido de almidón es susceptible de hidrólisis enzimática y posterior fermentación alcohólica.
2. **Obtención de ácidos orgánicos:** Mediante fermentaciones dirigidas con microorganismos específicos.
3. **Producción de enzimas industriales:** Utilizando el sustrato para el cultivo de microorganismos productores de amilasas, proteasas y otras enzimas de interés comercial.
4. **Desarrollo de probióticos y alimentos fermentados:** Aprovechando la fracción de oligosacáridos y fibras fermentables.

El aprovechamiento integral de la oca permitiría, además, valorizar sus subproductos, como el follaje (potencial forrajero) y los residuos de extracción (compostaje, alimentación animal), en línea con conceptos de economía circular y biorrefinerías de pequeña escala.

A diferencia de otros cultivos energéticos, la oca no requiere condiciones edafoclimáticas óptimas y puede prosperar en áreas marginales no aptas para cultivos comerciales, lo que minimiza su competencia con la producción alimentaria y reduce la presión sobre tierras agrícolas de alta calidad.

PARTE II – MARCO TEÓRICO

Capítulo 3: Fundamentos Bioquímicos y Microbiológicos

3.1 Hidrólisis Enzimática del Almidón

3.1.1 Estructura y Composición del Almidón

Estudios recientes de caracterización físico-química (Velásquez-Barreto et al., 2021; Zhu & Cui, 2020) han demostrado que el almidón de oca presenta propiedades distintivas. El almidón constituye la principal reserva energética en tubérculos como la oca (*Oxalis tuberosa*) y está compuesto fundamentalmente por dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina. Estos polímeros presentan diferencias estructurales significativas que determinan sus propiedades fisicoquímicas y su susceptibilidad a la hidrólisis.

La amilosa es un polímero esencialmente lineal formado por unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos α -1,4, con un grado de polimerización que oscila entre 500 y 5,000 unidades, dependiendo de la fuente botánica. Su estructura predominantemente lineal permite la formación de hélices simples o dobles que pueden interactuar con moléculas como yodo, formando complejos de inclusión de color azul característico (Zhu & Cui, 2019).

Por otra parte, la amilopectina es un polímero altamente ramificado que constituye entre el 70-80% del contenido total de almidón en la mayoría de las especies vegetales. Está formada por cadenas de unidades de D-glucosa unidas por enlaces α -1,4, con ramificaciones mediante enlaces α -1,6 cada 24-30 unidades de glucosa. Esta estructura ramificada confiere propiedades distintas a las de la amilosa, como menor tendencia a la retrogradación y mayor solubilidad (Zhu & Cui, 2020).

Los gránulos de almidón en la oca presentan una morfología ovoide a esférica, con un tamaño promedio de 12-18 μm , situándose en un rango intermedio entre los gránulos de papa (15-100 μm) y los de maíz (5-25 μm). La organización supramolecular de estos gránulos comprende regiones cristalinas formadas principalmente por amilopectina y regiones amorfas donde predomina la amilosa.

Figura 1.

Caracterización Morfológica del Almidón de Oca (*Oxalis tuberosa*)

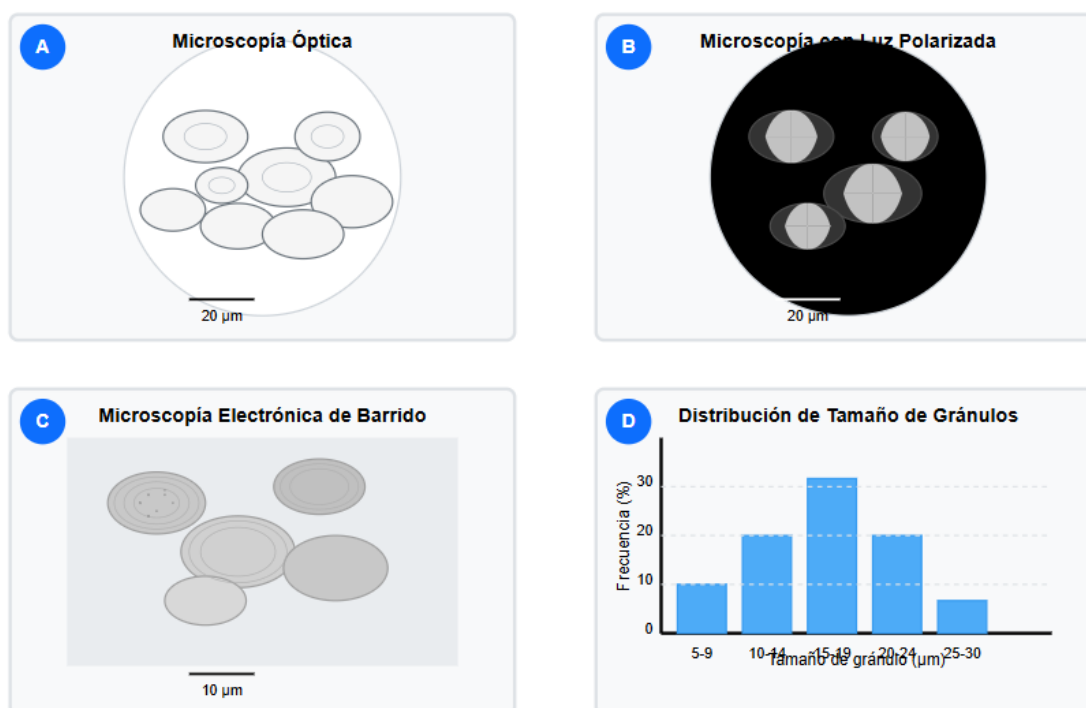


Figura 3.1: Caracterización morfológica del almidón de oca (*Oxalis tuberosa*). A) Microscopía óptica mostrando gránulos ovoideos; B) Patrón de birrefringencia (Cruz de Malta) bajo luz polarizada; C) Microscopía electrónica de barrido mostrando la superficie de los gránulos; D) Distribución de tamaño de gránulos, con predominio en el rango de 15-19 µm.

Como se observa en la Figura 1, los gránulos de almidón de oca exhiben características distintivas bajo diferentes técnicas microscópicas. La microscopía óptica (panel A) revela su forma predominantemente ovoide. Bajo luz polarizada (panel B), los gránulos muestran el patrón de birrefringencia conocido como "Cruz de Malta", indicativo de su estructura semicristalina ordenada. La microscopía electrónica de barrido (panel C) permite apreciar la textura superficial de los gránulos, mientras que el análisis de distribución de tamaño (panel D) confirma que la mayoría de los gránulos se encuentra en el rango de 15-19 µm, lo cual influye directamente en sus propiedades de gelatinización y susceptibilidad a la hidrólisis enzimática.

Vasić et al. (2021), señalan que la comprensión detallada de la estructura del almidón es fundamental para optimizar los procesos de hidrólisis enzimática, ya que la accesibilidad de las enzimas a los enlaces glucosídicos depende en gran medida de las características estructurales del sustrato. En el caso específico de la oca, el contenido

de amilosa (aproximadamente 25-30%) y las características específicas de su amilopectina influyen directamente en la eficiencia del proceso hidrolítico.

La gelatinización, proceso que ocurre cuando los gránulos de almidón se calientan en presencia de agua, resulta crítica para mejorar la susceptibilidad del almidón a la acción enzimática. Durante este proceso, se produce la ruptura de los puentes de hidrógeno intermoleculares de las zonas cristalinas, permitiendo la entrada de agua y el hinchamiento irreversible del gránulo. El almidón de oca presenta una temperatura de inicio de gelatinización de aproximadamente 59°C, inferior a la reportada para almidones de otras fuentes como papa (62°C) y maíz (65°C), lo que sugiere una mayor facilidad para su procesamiento térmico previo a la hidrólisis enzimática.

3.1.2 Actividad Enzimática de la Malta

La malta, producto obtenido de la germinación controlada de granos de cebada, constituye una fuente rica en enzimas amilolíticas capaces de hidrolizar el almidón presente en la oca. Durante el proceso de malteado, se activan diversos sistemas enzimáticos, siendo las α -amilasas y β -amilasas las principales enzimas implicadas en la degradación del almidón.

Las α -amilasas (EC 3.2.1.1) son endoenzimas que catalizan la hidrólisis aleatoria de enlaces α -1,4 en el interior de las cadenas de amilosa y amilopectina, generando oligosacáridos de diferente longitud, principalmente dextrinas límite. Estas enzimas presentan su máxima actividad a temperaturas entre 65-70°C y pH 5.5-6.0, condiciones que fueron consideradas en el diseño del perfil térmico para la hidrólisis del almidón de oca en este estudio.

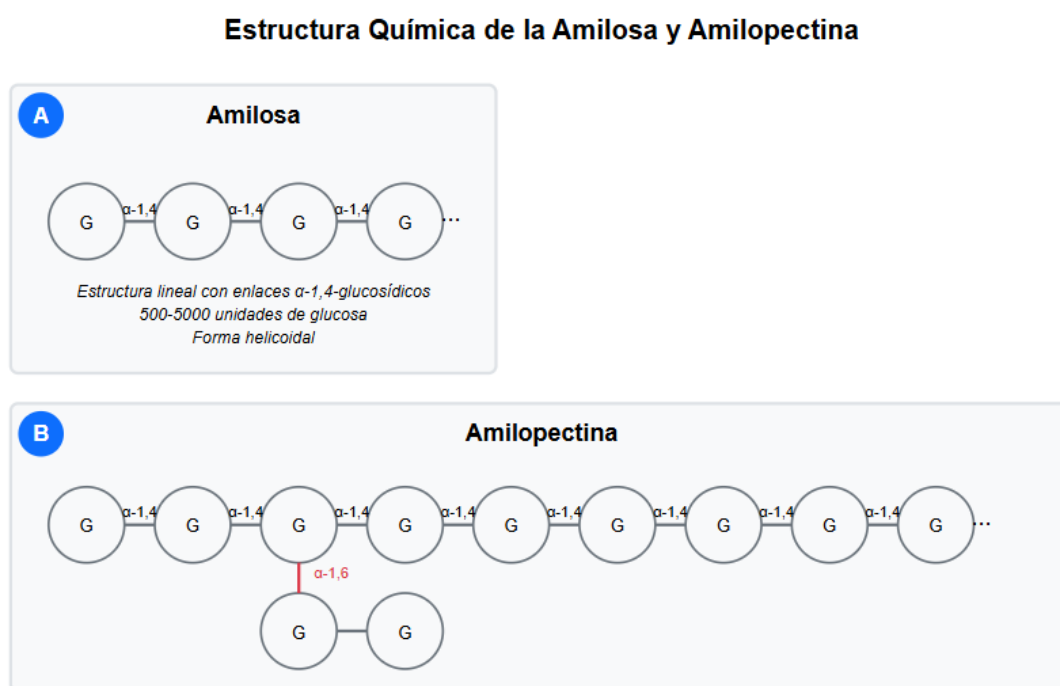
Las β -amilasas (EC 3.2.1.2), por su parte, son exoenzimas que actúan desde los extremos no reductores de las cadenas de almidón, liberando unidades de maltosa mediante la hidrólisis secuencial de enlaces α -1,4. Su temperatura óptima se sitúa entre 55-65°C y su pH óptimo entre 5.0-5.5, ligeramente más ácido que el de las α -amilasas. La acción sinérgica de ambas enzimas resulta esencial para una eficiente sacarificación del almidón.

Tse et al. (2021) destacan que las enzimas presentes en la malta exhiben actividades complementarias que favorecen la hidrólisis completa del almidón, incluyendo enzimas desramificantes como la pululanasa (EC 3.2.1.41), que hidroliza específicamente los enlaces α -1,6 de las ramificaciones de la amilopectina, y la límite dextrinasa, que actúa sobre las dextrinas límite generadas por la acción de la α -amilasa.

En el contexto de este estudio, se caracterizó la malta utilizada (procedente de Cervecería Pilsen Trujillo) en términos de su contenido de almidón (58%) y su actividad diastásica, expresada en grados Lintner ($^{\circ}$ L). Esta última representa una medida de la capacidad de la malta para convertir el almidón en azúcares fermentables, siendo un parámetro crítico para determinar la dosificación adecuada en el proceso de hidrólisis.

La relación entre la concentración de malta y la eficiencia de hidrólisis no es lineal, existiendo un punto óptimo donde se maximiza la conversión del almidón sin incurrir en costos excesivos de insumos. Los ensayos realizados permitieron establecer este óptimo en 25% (relación malta:oca), valor que garantiza la adecuada sacarificación del almidón presente en el jugo o pasta de oca.

Figura 2.



3.1.3 Factores que Afectan la Hidrólisis

Múltiples factores influyen en la eficiencia de la hidrólisis enzimática del almidón de oca, siendo los más relevantes la temperatura, el pH, la concentración de sustrato, la concentración enzimática y el tiempo de reacción.

Temperatura: Como se mencionó anteriormente, cada enzima presenta un rango óptimo de temperatura para su actividad catalítica. El diseño de un perfil térmico secuencial resulta crítico para maximizar la actividad de las diferentes enzimas implicadas en el proceso. En este estudio, se implementó un programa térmico que incluye etapas a 40°C (inicio), 65°C (actividad óptima de α -amilasas), 75°C (inactivación parcial y gelatinización completa) y 80°C (inactivación enzimática final).

pH: Las enzimas amilolíticas de la malta muestran su máxima actividad en un rango de pH relativamente estrecho (5.0-6.0). El pH inicial del jugo de oca (5.8) resultó favorable para la actividad enzimática, requiriendo únicamente ajustes menores en algunos lotes para optimizar el proceso.

Concentración de sustrato: La concentración de almidón en el medio influye en la velocidad y eficiencia de la hidrólisis. Concentraciones excesivamente altas pueden generar problemas difusionales que limitan el acceso de las enzimas al sustrato. La preparación del jugo de oca diluyendo adecuadamente la pulpa permitió obtener una concentración de sustrato óptima para el proceso.

Concentración enzimática: La relación entre la cantidad de enzima y sustrato determina la velocidad de conversión. Los ensayos sistemáticos realizados con diferentes concentraciones de malta (10-35%) permitieron establecer el punto óptimo en 25%, donde se maximiza la eficiencia del proceso sin incurrir en costos excesivos.

Tiempo de reacción: La duración del proceso hidrolítico debe ser suficiente para alcanzar el máximo grado de conversión deseado. El monitoreo del °Brix durante el proceso permitió determinar el punto de estabilización, indicativo de la máxima conversión posible bajo las condiciones establecidas. Para el jugo de oca, este tiempo se estableció en aproximadamente 120 minutos.

Adicionalmente, existen factores específicos relacionados con la naturaleza del sustrato que afectan la eficiencia de la hidrólisis. En el caso de la oca, su contenido de ácido oxálico puede influir en el pH del medio y potencialmente inhibir la actividad de ciertas enzimas. Sin embargo, el proceso de extracción por jugo mostró ventajas significativas en este aspecto, minimizando la concentración de potenciales inhibidores.

La presencia de otros componentes como proteínas, lípidos y fibra también puede afectar la accesibilidad de las enzimas al almidón. El método de extracción por jugo, comparado con el procesamiento por rallado, demostró ser superior en términos de facilitar la interacción enzima-sustrato, como lo evidencia la mayor velocidad de incremento del °Brix observada en los ensayos comparativos.

Según Vasić et al. (2021), la optimización de estos factores debe abordarse de manera integral, considerando sus interacciones y efectos combinados sobre la eficiencia global del proceso. El diseño factorial implementado en este estudio permitió evaluar sistemáticamente estas interacciones y establecer las condiciones óptimas para la hidrólisis del almidón de oca.

3.2 Fermentación Alcohólica

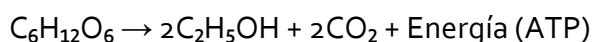
3.2.1 Bioquímica del Proceso Fermentativo

La fermentación alcohólica constituye una vía metabólica mediante la cual ciertos microorganismos, principalmente levaduras, transforman azúcares fermentables en etanol y dióxido de carbono bajo condiciones anaeróbicas. Este proceso bioquímico resulta fundamental para la producción de bioetanol a partir del mosto hidrolizado de oca.

La ruta metabólica central de la fermentación alcohólica comprende dos fases principales: glucólisis (vía Embden-Meyerhof-Parnas) y fermentación alcohólica propiamente dicha. Durante la glucólisis, una molécula de glucosa ($C_6H_{12}O_6$) se transforma en dos moléculas de piruvato ($C_3H_4O_3$), generando energía en forma de ATP y poder reductor como NADH. Posteriormente, bajo condiciones anaeróbicas, el

piruvato es descarboxilado a acetaldehído por acción de la piruvato descarboxilasa, liberando CO₂. Finalmente, el acetaldehído es reducido a etanol mediante la alcohol deshidrogenasa, regenerando el NAD⁺ necesario para mantener la continuidad de la glucólisis.

La ecuación global de la fermentación alcohólica puede representarse como:



Esta transformación presenta un rendimiento teórico de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO₂ por gramo de glucosa consumida. Sin embargo, en condiciones reales de fermentación, parte del sustrato se destina a la generación de biomasa celular y subproductos como glicerol, ácidos orgánicos y alcoholes superiores, reduciendo el rendimiento práctico a valores típicamente entre 85-95% del teórico.

Shahid et al. (2023) han destacado que, además de la vía principal, existen rutas metabólicas secundarias que influyen significativamente en la eficiencia fermentativa y en el perfil de subproductos. Entre estas, la producción de glicerol mediante la reducción de dihidroxiacetona fosfato representa una vía importante para mantener el balance redox intracelular, especialmente bajo condiciones de estrés osmótico o cuando existen limitaciones para regenerar NAD⁺ a través de la vía principal.

La síntesis de ácidos orgánicos como el ácido acético, succínico y láctico ocurre mediante desviaciones del flujo metabólico en diferentes puntos de la glucólisis o mediante el metabolismo incompleto del piruvato. Estos subproductos, aunque representan una pequeña fracción del carbono metabolizado, pueden influir significativamente en las características organolépticas del producto final y, en concentraciones elevadas, inhibir el crecimiento y actividad fermentativa de las levaduras.

Los alcoholes superiores (propanol, butanol, isobutanol, alcohol amílico, entre otros) se forman principalmente a través de la vía de Ehrlich, que implica la transaminación de aminoácidos, seguida de descarboxilación y reducción. Estos compuestos, junto con los ésteres formados por la reacción entre alcoholes y ácidos orgánicos, constituyen

importantes marcadores químicos que pueden ser utilizados para caracterizar el origen del etanol producido.

En el caso específico del mosto hidrolizado de oca, la presencia de un perfil particular de aminoácidos y micronutrientes puede influir en las rutas metabólicas secundarias y, consecuentemente, en el perfil de subproductos obtenidos. Los análisis cromatográficos realizados en este estudio permitieron identificar marcadores químicos característicos que podrían servir como elementos de trazabilidad para el bioetanol derivado de este tubérculo andino.

3.2.2 Microorganismos Fermentadores

La eficiencia y características del proceso fermentativo están fuertemente determinadas por el microorganismo empleado. En la producción de bioetanol, diversas especies de levaduras y bacterias han sido evaluadas, siendo *Saccharomyces cerevisiae* la especie más ampliamente utilizada debido a su robustez, alta tolerancia al etanol y eficiente metabolismo de azúcares.

En este estudio, se evaluaron comparativamente tres cepas de levaduras:

1. ***Saccharomyces cerevisiae* comercial (panificación):** Esta cepa, ampliamente disponible y económica, se caracteriza por su rápido crecimiento y capacidad para metabolizar eficientemente la glucosa. Sin embargo, presenta limitaciones en la utilización de ciertos azúcares como maltotriosa y dextrinas más complejas que pueden estar presentes en el mosto hidrolizado.
2. ***Saccharomyces cerevisiae* aislada de chicha de jora:** Esta cepa nativa, aislada de un proceso fermentativo tradicional basado en maíz germinado, ha evolucionado adaptándose a sustratos amiláceos fermentados en condiciones similares a las del mosto de oca. Presenta potencialmente mayor diversidad metabólica y adaptación a las condiciones específicas del sustrato.
3. ***Saccharomyces bayanus* (vínica):** Tradicionalmente utilizada en la producción de vinos, esta especie se caracteriza por su alta tolerancia al etanol y capacidad para fermentar a bajas temperaturas. Sin embargo, puede presentar

limitaciones en la asimilación de ciertos azúcares presentes en el mosto hidrolizado de oca.

La caracterización fisiológica de estas cepas incluyó la determinación de su viabilidad celular mediante técnicas de tinción diferencial (azul de metileno), evaluación de su tolerancia al etanol, cinética de crecimiento en diferentes sustratos y producción de metabolitos secundarios.

Shahid et al. (2023), señalan que la selección del microorganismo fermentador debe considerar no solo su eficiencia en la conversión de azúcares a etanol, sino también su compatibilidad con las características específicas del sustrato, incluyendo potenciales inhibidores, perfil nutricional y condiciones físico-químicas. En este sentido, la cepa aislada de chicha de jora mostró ventajas significativas, probablemente debido a su adaptación evolutiva a sustratos similares.

Además de las levaduras, ciertos consorcios bacterianos han sido investigados para la producción de bioetanol a partir de sustratos lignocelulósicos y amiláceos. Vinotha et al. (2023) demostraron que consorcios compuestos por especies como *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* pueden ser efectivos para la fermentación de residuos agrícolas. Sin embargo, estos sistemas presentan desafíos particulares en términos de control de proceso y productividad volumétrica.

En el contexto específico de este estudio, la superioridad demostrada por la cepa de *S. cerevisiae* aislada de chicha de jora subraya la importancia de considerar microorganismos adaptados a sustratos y condiciones similares a las del proceso objetivo. Esta adaptación puede conferir ventajas metabólicas específicas, como mayor tolerancia a inhibidores potenciales presentes en la oca, mejor asimilación del perfil particular de azúcares resultantes de la hidrólisis, y mayor resistencia a las condiciones de estrés durante la fermentación.

3.2.3 Factores que Influyen en la Fermentación

Múltiples factores físicos, químicos y biológicos influyen en la eficiencia y cinética del proceso fermentativo, siendo los más relevantes la temperatura, pH, concentración

inicial de azúcares, disponibilidad de nutrientes, presencia de inhibidores y sistema de fermentación implementado.

Temperatura: Constituye uno de los parámetros más críticos, afectando directamente la tasa metabólica, viabilidad celular y producción de subproductos. Para las cepas de *S. cerevisiae* evaluadas, se estableció una temperatura óptima de 28°C, que representa un compromiso entre velocidad de fermentación y producción de metabolitos secundarios. Temperaturas superiores a 32°C pueden provocar estrés térmico en las levaduras, reduciendo su viabilidad y capacidad fermentativa, mientras que temperaturas inferiores a 25°C ralentizan excesivamente el proceso.

pH: El pH del medio influye significativamente en la actividad metabólica de las levaduras y en la susceptibilidad a contaminación microbiana. El rango óptimo para *S. cerevisiae* se sitúa entre 4.5-5.5, condiciones que fueron establecidas al inicio del proceso fermentativo. El monitoreo continuo mostró una tendencia a la acidificación progresiva debido a la producción de ácidos orgánicos, estabilizándose típicamente en valores entre 3.8-4.2 al final de la fermentación.

Concentración inicial de azúcares: El mosto obtenido tras la hidrólisis enzimática presentó concentraciones de sólidos solubles entre 22-24°Brix, valor adecuado para una fermentación eficiente. Concentraciones excesivamente altas (>30°Brix) pueden generar estrés osmótico en las levaduras, reduciendo su viabilidad y capacidad fermentativa, mientras que concentraciones demasiado bajas (<15°Brix) resultarían en rendimientos volumétricos insuficientes.

Disponibilidad de nutrientes: Además de carbono, las levaduras requieren nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio y diversos micronutrientes para su crecimiento y actividad metabólica óptima. El mosto de oca, rico en componentes nitrogenados y minerales, proporcionó un medio nutricionalmente adecuado sin requerir suplementación significativa.

Presencia de inhibidores: Ciertos compuestos pueden afectar negativamente el crecimiento y actividad fermentativa de las levaduras. En el caso de la oca, la presencia de ácido oxálico y otros ácidos orgánicos podría constituir potenciales inhibidores. Sin

embargo, los resultados observados sugieren que estos compuestos, en las concentraciones presentes en el mosto, no ejercieron efectos inhibitorios significativos sobre las cepas evaluadas.

Sistema de fermentación: Se evaluaron comparativamente dos configuraciones:

1. **Sistema Batch (discontinuo):** Caracterizado por la adición única del mosto al inicio del proceso, sin incorporaciones posteriores. Ofrece ventajas en términos de simplicidad operativa y menor riesgo de contaminación.
2. **Sistema de Alimentación por Lotes (fed-batch):** Con incorporaciones programadas de mosto fresco a intervalos definidos durante el proceso. Teóricamente podría reducir la inhibición por sustrato y producto, manteniendo condiciones más favorables para la actividad levurífera.

Tse et al. (2021), han destacado que la selección del sistema óptimo debe considerar no solo los rendimientos finales, sino también aspectos operativos, como complejidad del control de proceso, requerimientos de equipamiento y susceptibilidad a contaminación. En este estudio, el sistema batch demostró superioridad tanto en términos de rendimiento final como de simplicidad operativa, contrario a lo que podría esperarse teóricamente para sustratos con potenciales inhibidores.

La interrelación entre estos factores resulta compleja y específica para cada combinación sustrato-microorganismo. El diseño factorial implementado permitió evaluar las interacciones más significativas y establecer condiciones óptimas para la fermentación del mosto hidrolizado de oca utilizando la cepa de *S. cerevisiae* aislada de chicha de jora.

3.3 Procesos de Destilación y Rectificación

3.3.1 Principios Termodinámicos

La destilación, proceso fundamental para la separación y purificación del etanol producido durante la fermentación, se basa en las diferencias de volatilidad entre los componentes de una mezcla líquida. En el caso del mosto fermentado, el objetivo

principal es separar el etanol (punto de ebullición 78.3°C) del agua (punto de ebullición 100°C) y otros componentes menos volátiles.

Los principios termodinámicos que gobiernan este proceso se fundamentan en el equilibrio líquido-vapor (ELV) de mezclas multicomponentes. Para una mezcla binaria etanol-agua, este equilibrio se caracteriza por la formación de un azeótropo con aproximadamente 95.6% (p/p) de etanol (equivalente a 97.2% v/v), que representa el límite máximo de concentración alcanzable mediante destilación convencional.

La volatilidad relativa (α) del etanol respecto al agua varía con la concentración y temperatura, siendo mayor a bajas concentraciones de etanol y disminuyendo progresivamente a medida que se aproxima a la composición azeotrópica. Esta relación no lineal implica que la eficiencia de separación disminuye a medida que aumenta la concentración de etanol en la columna, requiriendo mayor número de etapas teóricas para lograr incrementos significativos en la pureza del destilado.

La entalpía de vaporización del etanol (38.6 kJ/mol) es significativamente menor que la del agua (40.7 kJ/mol), lo que influye en el balance energético del proceso. El calor latente de la mezcla etanol-agua varía con la composición, siendo menor para concentraciones altas de etanol. Esta variación afecta directamente los requerimientos energéticos del proceso destilatorio y debe considerarse en el diseño y optimización energética del sistema.

La operación de destilación se rige por las leyes de Raoult y Dalton, que establecen que, en el equilibrio, la presión parcial de cada componente en la fase vapor es proporcional a su fracción molar en la fase líquida y a su presión de vapor a la temperatura del sistema. Estas relaciones, junto con los balances de materia y energía, constituyen la base para el diseño y modelamiento de columnas de destilación.

En el contexto específico de la producción de bioetanol a partir de oca, la composición del mosto fermentado incluye, además de etanol y agua, diversos compuestos minoritarios como alcoholes superiores, ésteres, aldehídos y ácidos orgánicos, que pueden formar azeótropos binarios o ternarios, complicando adicionalmente el proceso de separación. La distribución de estos compuestos en las diferentes fracciones

del destilado depende de sus volatilidades relativas respecto al etanol y agua, permitiendo, mediante un adecuado fraccionamiento, obtener un producto con las características deseadas.

3.3.2 Sistemas de Purificación de Etanol

La obtención de bioetanol con la pureza requerida para aplicaciones como biocombustible implica la implementación de sistemas apropiados de destilación y purificación. En este estudio, se empleó un sistema de destilación por lotes a escala de laboratorio, con una columna de rectificación de 8 platos teóricos, que permitió alcanzar concentraciones superiores a 96°GL en la fracción principal.

El proceso de destilación se dividió estratégicamente en tres fracciones principales:

1. **Cabeza:** Constituye aproximadamente el 5% inicial del volumen destilado y contiene componentes más volátiles que el etanol, particularmente acetaldehído, formiato de etilo, acetato de etilo y otros ésteres de bajo peso molecular. Estos compuestos, con puntos de ebullición inferiores al etanol, son los primeros en destilarse y pueden afectar negativamente la calidad del producto final. Su separación como fracción independiente mejora significativamente las características del etanol obtenido.
2. **Cuerpo:** Representa aproximadamente el 80% del volumen destilado y constituye la fracción principal donde se concentra el etanol con pureza entre 90-95°GL. Esta fracción, tras la rectificación posterior, alcanza concentraciones superiores a 96°GL, cumpliendo con los requisitos establecidos para bioetanol combustible.
3. **Cola:** Corresponde aproximadamente al 15% final del volumen destilado, caracterizándose por una concentración decreciente de etanol y presencia de compuestos menos volátiles, particularmente alcoholes superiores, furfural y componentes fenólicos. La correcta determinación del punto de corte entre cuerpo y cola resulta crítica para optimizar el rendimiento manteniendo la calidad del producto final.

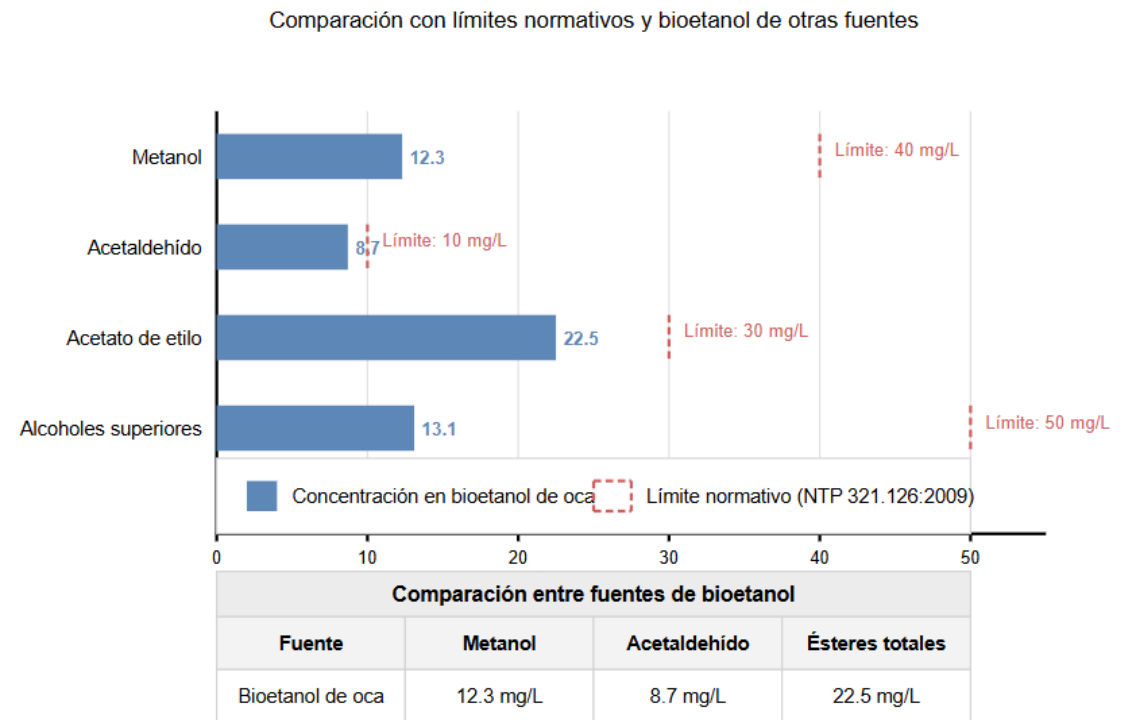
El control de la destilación se realizó monitorizando la temperatura en diferentes puntos de la columna, particularmente en la cabeza (mantenida entre 78-80°C durante la obtención de la fracción de cuerpo) y en la caldera (típicamente entre 92-96°C). La razón de reflujo, parámetro crítico que afecta tanto la pureza del destilado como la eficiencia energética del proceso, se ajustó entre 3:1 y 5:1 dependiendo de la etapa del proceso, siendo mayor durante la obtención de la fracción de cuerpo para maximizar la pureza.

La rectificación de la fracción de cuerpo permitió obtener etanol con pureza superior a 96°GL, cumpliendo con los estándares nacionales e internacionales para bioetanol combustible. Sin embargo, para aplicaciones que requieren etanol anhidro (>99.5%), sería necesario implementar técnicas adicionales para superar el límite azeotrópico, como destilación azeotrópica empleando un tercer componente (p.ej., ciclohexano, benceno), destilación extractiva o tecnologías basadas en membranas como la pervaporación.

El análisis de la composición de congéneres en el producto final mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) permitió caracterizar exhaustivamente el perfil de compuestos secundarios presentes en el bioetanol obtenido a partir de oca. Este perfil mostró particularidades propias derivadas de la materia prima original, con presencia de ésteres característicos que podrían servir como marcadores químicos específicos, potencialmente útiles para determinar autenticidad y trazabilidad del producto.

La eficiencia energética del proceso de destilación fue evaluada mediante balance energético, determinando un consumo de 3.2 kWh por litro de etanol producido. Este valor, aunque aceptable para procesos a escala de laboratorio, podría reducirse significativamente en sistemas a escala industrial mediante la implementación de tecnologías de integración energética, como intercambiadores de calor para precalentar la alimentación utilizando el calor residual de las corrientes de salida, y sistemas de compresión de vapor que permiten reutilizar la energía térmica del condensador.

Figura 3. Perfil de compuestos secundarios (congéneres) en el bioetanol de oca



El bioetanol de oca presenta niveles de compuestos congéneres dentro de los límites establecidos por las normas nacionales e internacionales para bioetanol combustible, garantizando su calidad para aplicaciones técnicas. Los valores están expresados en mg/L y son significativamente inferiores a los máximos permitidos.

PARTE III – INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

Capítulo 4: Metodología

4.1 Materiales

4.1.1 Materias Primas e Insumos

La materia prima principal utilizada en este estudio fue la oca (*Oxalis tuberosa*) proveniente del distrito de Usquil, provincia de Otuzco, departamento de La Libertad, Perú, ubicado a una altitud aproximada de 3,000 metros sobre el nivel del mar. La selección de esta procedencia específica se fundamentó en la calidad reconocida del tubérculo y en su representatividad dentro de las zonas productoras tradicionales de la región.

Se emplearon principalmente dos variedades de oca:

Oca amarilla (localmente conocida como "zapallo oca"): Caracterizada por su color amarillo intenso, forma alargada y sabor ligeramente dulce. Oca rosada (localmente conocida como "paucar oca"): De coloración rosada a rojiza, forma más redondeada y sabor moderadamente dulce tras el soleado. Los tubérculos fueron cosechados en su estado óptimo de madurez fisiológica, aproximadamente 8 meses después de la siembra, y sometidos a un proceso tradicional de soleado durante 5-7 días para reducir su contenido de ácido oxálico e incrementar su dulzor mediante la conversión parcial de almidón en azúcares.

Para el proceso de hidrólisis enzimática, se utilizó malta de cebada (variedad *Hordeum distichon*) proporcionada por la "Cervecería Pilsen Trujillo", con las siguientes características:

Contenido de almidón: 58% Actividad diastásica: 85°L (grados Lintner) Humedad: 4.8% Proteína: 11.2% Los microorganismos fermentadores empleados fueron:

Saccharomyces cerevisiae comercial: Levadura seca activa para panificación, marca Fleischmann. *Saccharomyces cerevisiae* de chicha: Cepa aislada de chicha de jora tradicional de Moche, La Libertad, y mantenida en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo. *Saccharomyces bayanus*: Cepa comercial para uso

enológico, marca Lalvin EC-1118. Insumos adicionales utilizados en los diferentes procesos incluyeron:

Ácido cítrico: Grado alimentario, para ajuste de pH. Fosfato de amonio: Como fuente de nitrógeno inorgánico para la fermentación. Metabisulfito de potasio: Como agente antimicrobiano para prevenir contaminaciones. Agua destilada: Para diluciones y preparación de soluciones. Hidróxido de sodio: Grado analítico, para ajuste de pH. Todo el material vegetal e insumos fueron almacenados en condiciones controladas de temperatura y humedad para mantener sus propiedades hasta el momento de su utilización en los diferentes experimentos. Los tubérculos de oca se mantuvieron en un ambiente fresco (10-15°C), oscuro y bien ventilado para prevenir su germinación prematura y conservar sus características fisicoquímicas.

La selección de estas materias primas e insumos se basó en criterios de calidad, disponibilidad local y aplicabilidad para el procesamiento a escala industrial, considerando siempre la viabilidad de implementación en contextos rurales de la región andina.

4.1.2 Equipos e Instrumentación Para el desarrollo experimental se utilizaron los siguientes equipos e instrumentos:

Procesamiento inicial de la materia prima:

Extractor de jugos marca Oster, modelo 3157, capacidad 450 ml, con potencia de 450 W. Rallador manual de acero inoxidable, malla fina (2 mm). Balanza electrónica Henkel, modelo BCH-200, capacidad 200 g, precisión 0.1 g. Balanza analítica Sartorius, modelo CP224S, capacidad 220 g, precisión 0.1 mg. Termómetro digital con sonda de acero inoxidable, rango -50°C a 300°C, precisión $\pm 0.1^\circ\text{C}$. Hidrólisis enzimática:

Marmita encamisada de acero inoxidable, capacidad 5 L, con control de temperatura. Agitador mecánico de velocidad variable (0-300 rpm) con aspas de acero inoxidable. Refractómetro digital ATAGO, rango 0-85°Brix, precisión $\pm 0.1^\circ\text{Brix}$. pH-metro digital Hanna Instruments, modelo HI98107, rango 0-14, precisión ± 0.1 unidades. Baño termostático con control PID, rango ambiente a 100°C, precisión $\pm 0.5^\circ\text{C}$. Fermentación:

Fermentadores de vidrio de 5 L, con tapón de goma y válvula de escape para CO₂. Cámara de incubación con control de temperatura, rango 4-50°C, precisión ±0.5°C. Trampas de agua para monitoreo de producción de CO₂. Alcohómetro Gay-Lussac, rango 0-100°GL, precisión ±0.5°GL. Microscopio óptico Olympus, modelo CX23, con objetivos 10x, 40x y 100x. Hemocitómetro (cámara de Neubauer) para recuento celular. Destilación y rectificación:

Equipo de destilación de vidrio, con columna de rectificación de 8 platos teóricos. Condensador de serpentín de acero inoxidable. Manto calefactor con control de temperatura, potencia 1000 W. Termómetros digitales para control de temperatura en diferentes puntos de la columna. Sistema de refrigeración para el condensador, con recirculación de agua. Análisis instrumental:

Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS) Agilent, modelo 7890A-5975C. Espectrofotómetro UV-visible Thermo Scientific, modelo Evolution 201. Analizador de textura TA-XT2i, con sonda cilíndrica de 2 mm. Centrífuga refrigerada Eppendorf, modelo 5810R, velocidad máxima 14,000 rpm. Horno de secado con convección forzada, temperatura máxima 250°C, precisión ±1°C. Todos los equipos fueron calibrados antes de su uso según los protocolos establecidos, y se realizaron verificaciones periódicas durante el desarrollo experimental para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos.

4.1.3 Reactivos Para los análisis y procedimientos experimentales se utilizaron los siguientes reactivos de grado analítico o superior:

Análisis fisicoquímicos:

Ácido sulfúrico (H₂SO₄), 98%, Merck. Hidróxido de sodio (NaOH), 98%, Fisher Scientific. Fenolftaleína, 1% en solución alcohólica, Sigma-Aldrich. Solución tampón pH 4.0 y 7.0 para calibración del pH-metro, Hanna Instruments. Lugol (solución de yodo-yoduro de potasio) para pruebas de almidón. Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄·5H₂O), 99%, Merck. Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (KNaC₄H₄O₆·4H₂O), 99%, Sigma-Aldrich. Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), 98%, Sigma-Aldrich, para determinación de azúcares reductores. Análisis microbiológicos:

Azul de metileno, 0.1% en solución acuosa, para determinación de viabilidad celular. Medios de cultivo: agar papa dextrosa (PDA), agar extracto de malta (MEA), caldo extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPD). Cloruro de sodio (NaCl), 99.5%, J.T. Baker. Cloranfenicol, 98%, para inhibición del crecimiento bacteriano. Glicerol, 99.5%, para conservación de cepas microbianas. Análisis cromatográficos:

Etanol absoluto, 99.9%, Fisher Scientific, como estándar de referencia. Metanol, grado HPLC, 99.9%, Merck. Acetaldehído, 99.5%, Sigma-Aldrich, como estándar de referencia. Ésteres y alcoholes superiores estándar, Sigma-Aldrich, para identificación y cuantificación. Acetona, grado HPLC, 99.9%, Fisher Scientific. Ácido acético glacial, 99.8%, Merck. Caracterización de proteínas y enzimas:

Reactivo de Bradford para determinación de proteínas. Albúmina de suero bovino (BSA), 98%, Sigma-Aldrich, como estándar para curva de calibración. Enzimas comerciales para ensayos comparativos: α -amilasa y glucoamilasa, Sigma-Aldrich. Otros reactivos:

Agua ultrapura (18.2 M Ω ·cm a 25°C) obtenida mediante sistema Milli-Q. Etanol al 70% para desinfección de equipos y superficies. Nitrógeno gaseoso, 99.999%, para creación de atmósferas inertes. Hielo seco (CO₂ sólido) para mantenimiento de muestras congeladas. Todos los reactivos fueron almacenados según las recomendaciones de los fabricantes, considerando condiciones específicas de temperatura, humedad y exposición a la luz para mantener su estabilidad y pureza durante el desarrollo experimental.

4.2 Métodos Analíticos

Los métodos analíticos empleados en este estudio fueron seleccionados para caracterizar exhaustivamente tanto la materia prima como los productos intermedios y finales del proceso, garantizando la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados.

4.2.1 Caracterización Fisicoquímica de la Oca

La caracterización fisicoquímica de la oca se realizó mediante las siguientes metodologías estandarizadas:

Determinación de humedad: Se empleó el método gravimétrico por secado en estufa (AOAC 934.01). Muestras de 5 g de oca fresca, finamente picada, fueron colocadas en cápsulas de porcelana previamente taradas y secadas en estufa a 105°C hasta peso constante (aproximadamente 24 horas). El contenido de humedad se calculó por diferencia de peso y se expresó como porcentaje.

pH y acidez titulable: El pH se determinó directamente en el jugo de oca utilizando un pH-metro digital previamente calibrado con soluciones tampón de pH 4.0 y 7.0. La acidez titulable se determinó mediante titulación con NaOH 0.1 N hasta pH 8.2, utilizando fenolftaleína como indicador. Los resultados se expresaron como porcentaje de ácido oxálico, predominante en la oca.

Sólidos solubles totales (°Brix): Se determinaron directamente en el jugo de oca utilizando un refractómetro digital. Previo a la medición, el instrumento fue calibrado con agua destilada. Las lecturas se realizaron a 20°C, aplicando la corrección por temperatura cuando fue necesario.

Densidad: Se determinó mediante picnometría a 20°C. Los resultados se expresaron en g/mL.

Color: El color de la pulpa de oca y del jugo extraído se evaluó mediante colorimetría, utilizando el sistema CIE Lab*, donde L* representa la luminosidad (0=negro, 100=blanco), a* indica la posición entre rojo (+) y verde (-), y b* indica la posición entre amarillo (+) y azul (-).

Textura: Se evaluó mediante análisis de perfil de textura (TPA) utilizando un analizador de textura con sonda cilíndrica de 2 mm. Se determinaron parámetros como dureza, cohesividad, elasticidad y masticabilidad.

Contenido de almidón: Se determinó mediante hidrólisis ácida completa seguida de determinación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Previamente, se realizó una extracción acuosa para eliminar los azúcares libres presentes en la muestra.

Azúcares reductores: Se determinaron directamente en el jugo de oca mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Los resultados se expresaron como equivalentes de glucosa.

Contenido de ácido oxálico: Se determinó mediante titulación con permanganato de potasio en medio ácido, según la metodología descrita por Liu et al. (2018). Los resultados se expresaron como mg de ácido oxálico por 100 g de materia fresca.

Caracterización microscópica del almidón: Se realizó mediante microscopía óptica y electrónica. Se evaluaron características como tamaño y forma de los gránulos, presencia de hilo y anillos de crecimiento, y comportamiento frente a la luz polarizada (birrefringencia).

Todos los análisis se realizaron por triplicado, reportando los resultados como el promedio $\pm$ desviación estándar. Adicionalmente, se realizaron análisis comparativos entre las dos variedades de oca utilizadas (amarilla y rosada) para determinar posibles diferencias significativas en sus propiedades fisicoquímicas.

4.2.2 Análisis Bromatológico

El análisis bromatológico completo de la oca se realizó siguiendo las metodologías oficiales de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para determinar su composición nutricional:

Humedad y materia seca: Se determinó mediante el método gravimétrico por secado en estufa (AOAC 934.01), secando muestras de oca a 105°C hasta peso constante.

Cenizas totales: Se determinaron mediante calcinación en mufla a 550°C durante 5 horas (AOAC 942.05). Los resultados se expresaron como porcentaje sobre materia seca.

Proteína bruta: Se determinó mediante el método Kjeldahl (AOAC 954.01), que cuantifica el nitrógeno total y lo convierte a proteína utilizando el factor 6.25 (considerando que las proteínas contienen aproximadamente 16% de nitrógeno). El proceso incluyó tres etapas: digestión con ácido sulfúrico concentrado, destilación del nitrógeno amoniacal liberado y titulación del destilado con ácido clorhídrico estandarizado.

Grasa bruta: Se determinó mediante extracción con solvente orgánico (éter de petróleo) utilizando el método Soxhlet (AOAC 920.39). Los resultados se expresaron como porcentaje sobre materia seca.

Fibra bruta: Se determinó mediante el método de digestión ácido-base (AOAC 962.09). La muestra desengrasada fue sometida a digestión sucesiva con ácido sulfúrico e hidróxido de sodio, eliminando proteínas, azúcares y almidón. El residuo insoluble, constituido principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, se secó, pesó y calcinó para determinar el contenido de fibra bruta.

Carbohidratos totales: Se calcularon por diferencia, sustrayendo del 100% los porcentajes de humedad, proteína, grasa y cenizas.

Energía bruta: Se calculó utilizando los factores de Atwater: 4 kcal/g para proteínas y carbohidratos, y 9 kcal/g para grasas.

Perfil de aminoácidos: Se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) después de hidrólisis ácida de las proteínas con HCl 6N a 110°C durante 24 horas en atmósfera inerte.

Perfil de ácidos grasos: Se determinó mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) después de la extracción y metilación de los lípidos.

Minerales: Se determinaron mediante espectroscopía de absorción atómica (EAA) después de digestión ácida de las cenizas. Se cuantificaron macro-elementos (Ca, P, Mg, K, Na) y micro-elementos (Fe, Zn, Cu, Mn).

Vitaminas hidrosolubles: Se determinaron mediante HPLC con detector de fluorescencia para vitaminas del grupo B y espectrofotometría UV-visible para vitamina C.

Compuestos bioactivos: Se realizó la determinación de compuestos fenólicos totales mediante el método de Folin-Ciocalteu, flavonoides totales mediante el método del tricloruro de aluminio, y capacidad antioxidante mediante los ensayos DPPH, ABTS y FRAP.

Adicionalmente, se realizó un análisis de factores antinutricionales, particularmente importante en el caso de la oca por su contenido de ácido oxálico, que puede afectar la biodisponibilidad de minerales como el calcio. Para este análisis se siguió la metodología descrita por Albiñ y Savage (2001), específicamente desarrollada para determinar oxalatos en oca.

Todos los análisis se realizaron por triplicado, reportando los resultados como el promedio $\pm$ desviación estándar, y se expresaron tanto en base húmeda como en base seca para facilitar comparaciones con otros estudios.

4.2.3 Determinación de Parámetros de Proceso

Durante las diferentes etapas del proceso productivo, se monitorizaron diversos parámetros para evaluar su progreso y eficiencia:

Hidrólisis enzimática:

Sólidos solubles (°Brix): Se monitorizó la evolución de los sólidos solubles a intervalos regulares (15 minutos) durante todo el proceso de hidrólisis utilizando un refractómetro digital. El incremento en °Brix refleja la conversión del almidón en azúcares fermentables, y su estabilización indica la finalización efectiva del proceso. pH: Se monitorizó mediante pH-metro digital para garantizar condiciones óptimas para la actividad enzimática. Temperatura: Se controló continuamente mediante termómetros digitales en diferentes puntos del sistema para mantener el perfil térmico establecido. Grado de hidrólisis: Se determinó mediante la relación entre azúcares

reductores generados (medidos por DNS) y el contenido inicial de almidón, expresado como porcentaje. Dextrinas límite: Se evaluaron cualitativamente mediante reacción con solución de yodo, observando la intensidad y tonalidad de la coloración. Viscosidad: Se monitorizó la evolución de la viscosidad durante la hidrólisis mediante viscosímetro rotacional, como indicador complementario del avance del proceso. Fermentación alcohólica:

°Brix: Se monitorizó la disminución de sólidos solubles a intervalos regulares (6 horas) como indicador del consumo de azúcares por las levaduras. pH: Se monitorizó la evolución del pH durante todo el proceso fermentativo. Temperatura: Se mantuvo constante a 28°C y se monitorizó continuamente para detectar posibles incrementos debido a la actividad metabólica. Producción de CO₂: Se monitorizó mediante trampas de agua conectadas a los fermentadores, midiendo el volumen de agua desplazado. Recuento de células viables: Se realizó mediante tinción con azul de metileno y conteo en cámara de Neubauer a intervalos regulares (12 horas). Concentración de etanol: Se determinó mediante microdestilación seguida de medición con alcoholómetro, y se confirmó mediante cromatografía de gases. Cinética fermentativa: Se modeló la evolución de biomasa, sustrato y producto utilizando el modelo de Monod modificado para incorporar inhibición por producto. Destilación y rectificación:

Temperatura: Se monitorizó en diferentes puntos de la columna (caldera, platos intermedios, cabeza) para controlar el proceso y determinar los puntos de corte entre fracciones. Composición del destilado: Se monitorizó mediante medición del grado alcohólico con alcoholómetro a intervalos regulares. Razón de reflujo: Se controló mediante la relación entre volumen retornado a la columna y volumen retirado como destilado. Eficiencia energética: Se evaluó mediante balance energético, determinando el consumo energético por litro de etanol producido. Para cada parámetro se establecieron límites de control basados en los valores óptimos determinados durante la fase de optimización, implementando acciones correctivas cuando las mediciones se desviaban significativamente de estos valores. Todos los datos fueron registrados en hojas de control específicas para cada etapa del proceso, permitiendo la trazabilidad completa y análisis retrospectivo.

4.2.4 Evaluación de Pureza y Calidad del Etanol

La evaluación de la pureza y calidad del bioetanol obtenido se realizó mediante la determinación de parámetros fisicoquímicos, siguiendo los estándares nacionales e internacionales para bioetanol combustible:

Grado alcohólico: Se determinó mediante alcohometría, utilizando alcoholómetro Gay-Lussac calibrado a 20°C, con correcciones por temperatura cuando fue necesario. Los resultados se expresaron en °GL (porcentaje volumétrico de etanol).

Densidad: Se determinó mediante picnometría a 20°C, según el método estándar ASTM D4052. La densidad es un parámetro fundamental para verificar la pureza del etanol, esperándose valores entre 0.805-0.812 g/mL para etanol de alta pureza (>96°GL).

Acidez total: Se determinó mediante titulación potenciométrica con hidróxido de sodio 0.01 N hasta pH 8.2, según el método ASTM D1613. Los resultados se expresaron como mg de ácido acético por 100 mL de etanol anhidro. Este parámetro es indicativo de posibles degradaciones oxidativas del etanol.

pH: Se midió directamente utilizando un pH-metro digital calibrado, según el método ASTM D6423.

Conductividad eléctrica: Se determinó mediante conductímetro calibrado, expresando los resultados en $\mu\text{S/m}$. Este parámetro es indicativo del contenido de impurezas iónicas.

Color: Se evaluó mediante comparación visual con la escala Pt-Co (Platino-Cobalto) según el método ASTM D1209. El bioetanol de alta calidad debe ser incoloro (valor <5 en la escala Pt-Co).

Contenido de agua: Se determinó mediante el método de Karl Fischer (ASTM E203), que permite cuantificar trazas de agua con alta precisión. Para aplicaciones como combustible, el contenido de agua debe ser inferior a 0.5% v/v.

Miscibilidad con gasolina: Se evaluó preparando mezclas en diferentes proporciones (E5, E10, E25) y verificando la ausencia de separación de fases, turbidez o precipitación después de 24 horas.

Valor energético: Se determinó mediante bomba calorimétrica, expresando los resultados en MJ/kg.

Análisis de compuestos secundarios: Se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) utilizando una columna capilar DB-WAX (polietilenglicol) específica para alcoholes y compuestos polares. Se cuantificaron los siguientes congéneres:

Metanol: Potencialmente tóxico, debe mantenerse por debajo de 40 mg/L. Aldehídos: Principalmente acetaldehído, típicamente presentes en la fracción de cabeza. Ésteres: Principalmente acetato de etilo, contribuyen al perfil aromático. Alcoholes superiores: Propanol, isobutanol, isoamílico, entre otros. Ácidos volátiles: Principalmente ácido acético. La identificación se realizó por comparación con estándares comerciales y bases de datos espectrales (NIST, Wiley), mientras que la cuantificación se realizó mediante el método de patrón interno, utilizando 1-pentanol como estándar interno.

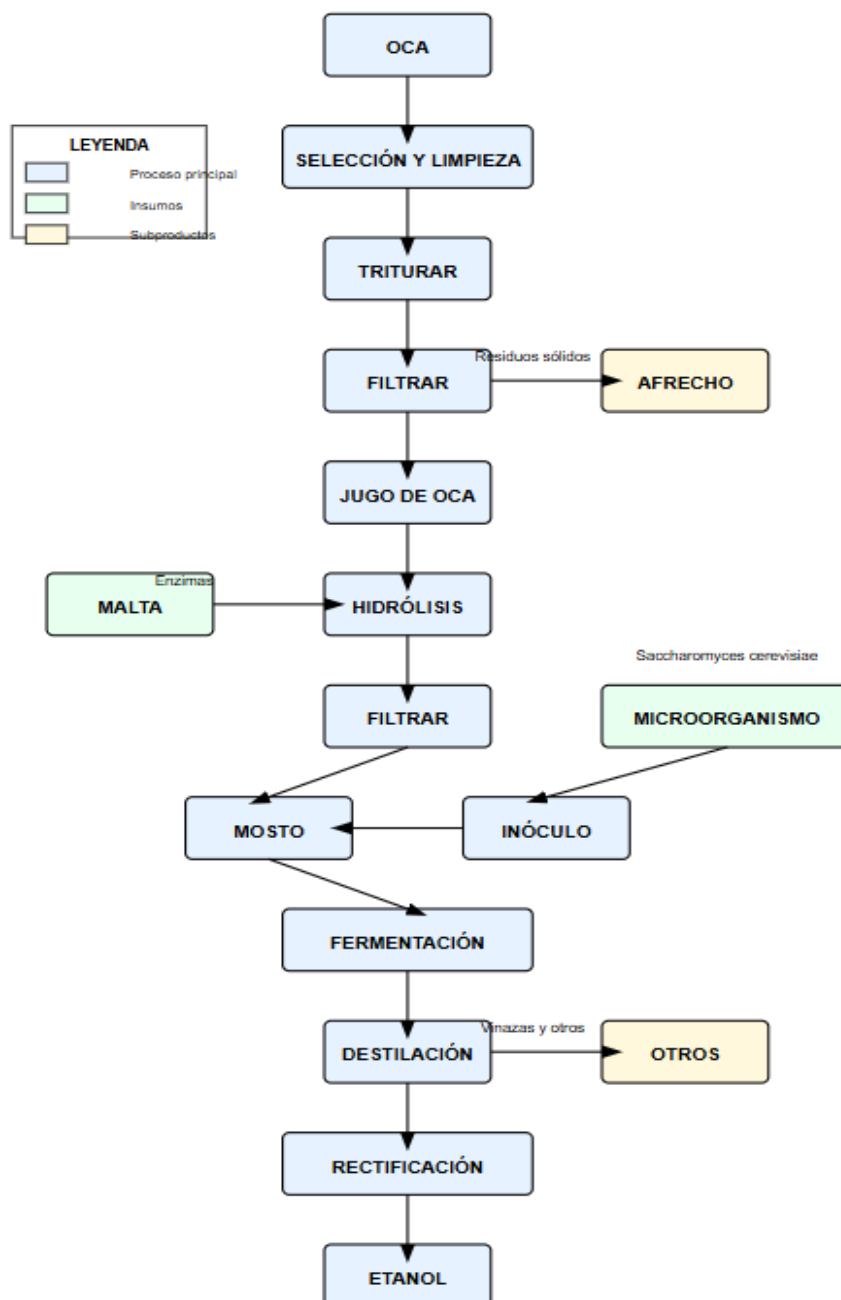
Los resultados se compararon con los requisitos establecidos en la normativa peruana para bioetanol combustible (NTP 321.126:2009) y con estándares internacionales como ASTM D4806 (EE.UU.) y EN 15376 (Unión Europea). Adicionalmente, se realizó un análisis comparativo con muestras comerciales de bioetanol derivado de caña de azúcar y maíz para evaluar posibles particularidades del producto obtenido a partir de oca.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, reportando los resultados como el promedio $\pm$ desviación estándar. Los métodos analíticos empleados fueron previamente validados en términos de precisión, exactitud, linealidad y límites de detección y cuantificación según las directrices internacionales.

4.3 Diseño Experimental

El estudio se estructuró siguiendo un enfoque sistemático para la optimización secuencial de las diferentes etapas del proceso productivo, empleando diseños estadísticos que permitieran identificar condiciones óptimas y evaluar interacciones entre factores.

Figura 4 Diagrama de bloques para la obtención de Etanol a partir de la Oca (*Oxalis tuberosa*)



4.3.1 Variables de Estudio

Se identificaron las siguientes variables críticas para cada etapa del proceso:

Acondicionamiento de la materia prima:

Variables independientes: Método de extracción (rallado vs. jugo) Estado de la oca (fresca vs. soleada) Variedad de oca (amarilla vs. rosada) Variables dependientes: Rendimiento de extracción (%) Contenido inicial de sólidos solubles (°Brix) pH Contenido de almidón (%) Hidrólisis enzimática:

Variables independientes: Concentración de malta (10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% p/p respecto a la oca) Perfil térmico (secuencial vs. temperatura constante) Tiempo de hidrólisis (60, 90, 120, 150, 180 minutos) pH inicial (4.5, 5.0, 5.5, 6.0) Variables dependientes: Incremento de °Brix Grado de hidrólisis (%) Azúcares reductores (g/L) Velocidad inicial de hidrólisis (°Brix/h) Eficiencia de conversión (%) Fermentación alcohólica:

Variables independientes: Tipo de cepa de levadura (comercial panificación, chicha, vínica) Sistema de fermentación (batch vs. alimentación por lotes) Concentración inicial de inóculo (1%, 2%, 3% p/v) Temperatura de fermentación (25°C, 28°C, 30°C) Suplementación nutricional (con/sin adición de fuente de nitrógeno) Variables dependientes: Velocidad de fermentación (g azúcares consumidos/L·h) Producción de etanol (°GL) Eficiencia de conversión (% del teórico) Tiempo para alcanzar fermentación completa (h) Viabilidad celular al final del proceso (%) Concentración de subproductos (g/L) Destilación y rectificación:

Variables independientes: Razón de reflujo (1:1, 3:1, 5:1) Temperatura de cabeza de columna (78-82°C) Puntos de corte entre fracciones (basados en temperatura y graduación) Variables dependientes: Pureza del etanol (°GL) Rendimiento de destilación (mL etanol rectificado/L mosto) Eficiencia energética (kWh/L etanol) Concentración de congéneres (mg/L) Para cada conjunto de variables se establecieron rangos de estudio basados en revisión bibliográfica, pruebas preliminares y consideraciones prácticas para una potencial implementación a mayor escala. Las

variables más críticas identificadas en ensayos previos (concentración de malta, tipo de cepa y sistema de fermentación) fueron sometidas a diseños experimentales más exhaustivos.

4.3.2 Diseño Factorial y Análisis Estadístico

Se implementaron diferentes diseños experimentales en función de la complejidad y número de variables para cada etapa del proceso:

Etapas de hidrólisis enzimática:

Se aplicó un diseño factorial completo 3^3 para evaluar los efectos de tres factores principales sobre la eficiencia de hidrólisis:

Concentración de malta (15%, 25%, 35%) Temperatura máxima (65°C, 75°C, 85°C)
Tiempo de proceso (90, 120, 150 minutos) Este diseño generó 27 combinaciones experimentales, que fueron ejecutadas por triplicado, resultando en 81 experimentos. Las variables respuesta analizadas fueron el incremento de °Brix y el grado de hidrólisis (%).

Adicionalmente, se realizó un estudio de superficie de respuesta (RSM) para determinar las condiciones óptimas, utilizando un diseño compuesto central (DCC) con los factores identificados como más significativos en el diseño factorial previo.

Etapas de fermentación:

Se implementó un diseño factorial $3 \times 2 \times 3$ para evaluar los efectos de:

Tipo de cepa (comercial panificación, chicha, vínica) Sistema de fermentación (batch, alimentación por lotes) Temperatura (25°C, 28°C, 30°C) Las combinaciones resultantes (18 tratamientos) fueron ejecutadas por triplicado. Como variable respuesta principal se analizó la producción de etanol (°GL), complementada con evaluaciones de eficiencia y cinética fermentativa.

Etapas de destilación:

Se aplicó un diseño factorial 3×3 para evaluar los efectos de:

Razón de reflujo (1:1, 3:1, 5:1) Temperatura de cabeza (78°C, 80°C, 82°C) Resultando en 9 tratamientos, evaluados por duplicado. Las variables respuesta fueron la pureza del etanol (°GL) y el rendimiento de destilación.

Análisis estadístico:

Todos los datos experimentales fueron analizados utilizando el software Statgraphics Centurion XVIII, aplicando las siguientes técnicas:

Análisis de varianza (ANOVA): Para evaluar la significancia estadística de los efectos principales e interacciones. Se consideraron significativos los efectos con valores $p < 0.05$. Prueba de múltiples rangos (Tukey HSD): Para comparar las medias entre tratamientos e identificar grupos homogéneos. Análisis de regresión múltiple: Para desarrollar modelos predictivos que relacionen las variables independientes con las respuestas. Metodología de superficie de respuesta (RSM): Para determinar condiciones óptimas y visualizar interacciones complejas. Análisis de componentes principales (PCA): Para identificar patrones y reducir la dimensionalidad en conjuntos de datos complejos, particularmente en el análisis de perfiles de congéneres. Se verificaron los supuestos de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Cuando fue necesario, se aplicaron transformaciones de datos (logarítmica, raíz cuadrada) para cumplir con estos supuestos.

El análisis de residuales se utilizó para validar los modelos desarrollados, evaluando aleatoriedad, normalidad y homocedasticidad. La bondad de ajuste se evaluó mediante coeficientes de determinación (R^2) y error estándar de estimación.

Para las comparaciones entre sistemas de fermentación y métodos de extracción se aplicó la prueba t de Student para muestras independientes, verificando previamente la igualdad de varianzas mediante la prueba F de Fisher.

4.3.3 Optimización de Condiciones de Proceso

La optimización de las condiciones de proceso se realizó mediante una estrategia secuencial que combinó diseños experimentales estadísticos con evaluación multicriterio para identificar las configuraciones óptimas en cada etapa:

Optimización de la hidrólisis enzimática:

Se aplicó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para determinar las condiciones óptimas que maximizaran el grado de hidrólisis y la eficiencia de conversión de almidón. A partir del diseño compuesto central previamente implementado, se desarrollaron modelos polinomiales de segundo orden que describieran la relación entre las variables independientes (concentración de malta, temperatura, tiempo) y las respuestas de interés.

La función de deseabilidad de Derringer se utilizó para encontrar el punto óptimo que satisficiera simultáneamente múltiples criterios:

Maximización del grado de hidrólisis Minimización del tiempo de proceso Optimización del consumo de malta (considerando el costo) La validación del óptimo teórico se realizó mediante experimentos confirmatorios por triplicado, comparando los valores predichos por los modelos con los resultados experimentales reales.

Optimización de la fermentación alcohólica:

La estrategia de optimización para esta etapa consideró tanto aspectos cuantitativos (rendimiento de etanol, eficiencia de conversión) como cualitativos (perfil de congéneres, facilidad de operación).

Se empleó un enfoque de optimización multiobjetivo, utilizando la técnica de asignación de pesos a diferentes criterios:

Rendimiento de etanol (40%) Eficiencia de conversión (30%) Tiempo de fermentación (15%) Facilidad operativa (10%) Calidad sensorial del producto (5%) Los pesos fueron asignados considerando la importancia relativa de cada criterio para un proceso

industrial viable. Esta evaluación permitió comparar objetivamente las diferentes combinaciones de cepas y sistemas de fermentación.

Adicionalmente, se realizó un análisis de cinética fermentativa para los tratamientos más prometedores, ajustando los datos experimentales a modelos mecanísticos tipo Monod, incorporando términos para inhibición por sustrato y producto. Este análisis permitió determinar parámetros cinéticos como velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}), constante de saturación (K_s) y constante de inhibición (K_i), fundamentales para el diseño y escalamiento del proceso.

Optimización de la destilación y rectificación:

Para esta etapa, se desarrolló un modelo de optimización que balanceara la pureza del producto final con la eficiencia energética y el rendimiento volumétrico. La optimización consideró:

Determinación de la razón de reflujo óptima que proporcionara la pureza requerida con el mínimo consumo energético
Identificación de los puntos de corte ideales entre fracciones (cabeza, cuerpo, cola)
Evaluación de la influencia de la velocidad de destilación sobre la separación de congéneres
Se empleó un enfoque iterativo, utilizando los resultados de cada serie de experimentos para refinar las condiciones en experimentos subsecuentes, hasta alcanzar un producto que cumpliera con los estándares de calidad establecidos con el mínimo consumo energético.

Integración y optimización global:

Finalmente, se realizó una optimización integral del proceso completo, evaluando las interdependencias entre etapas. Se consideraron aspectos como:

El efecto de las condiciones de hidrólisis sobre la fermentabilidad del mosto
La influencia del perfil fermentativo sobre la complejidad de la destilación
Las posibilidades de integración energética entre etapas
Esta visión holística permitió desarrollar un proceso coherente y optimizado que maximizara la producción de bioetanol a partir de oca con la mayor eficiencia técnica y económica posible.

Los experimentos confirmatorios del proceso integrado completo se realizaron por triplicado, evaluando reproductibilidad, robustez y consistencia de los resultados. El análisis de sensibilidad permitió identificar los parámetros críticos que requieren un control más estricto durante la implementación a mayor escala.

La metodología desarrollada para esta optimización integral representa un enfoque sistemático que podría aplicarse a otros tubérculos andinos, contribuyendo a la diversificación de materias primas para la producción de biocombustibles en la región.

4.3.4 Modelo estructural para la producción de bioetanol a partir de oca

La Figura 3 presenta un modelo estructural de ecuaciones que ilustra las relaciones causales entre los factores críticos que influyen en la producción de bioetanol a partir de oca (*Oxalis tuberosa*). Este modelo integra las variables latentes (constructos no observables directamente) y sus indicadores manifiestos (variables medibles), estableciendo las interrelaciones que determinan el rendimiento del proceso.

El modelo propuesto identifica cuatro constructos principales: Características de la materia prima (X_1), Proceso de hidrólisis (Y_1), Proceso de fermentación (Y_2) y Características de procesamiento (X_2), todos ellos interactuando para determinar el Rendimiento del bioetanol (Y_3).

Las características de la materia prima (X_1) son evaluadas mediante seis indicadores manifiestos (X_{1_1} a X_{1_6}) que corresponden a los parámetros fisicoquímicos de la oca: contenido de almidón, humedad, densidad, pH, sólidos solubles totales y acidez titulable. Estos factores ejercen una influencia directa (γ_{11}) sobre el proceso de hidrólisis (Y_1), afectan el comportamiento fermentativo (γ_{21}) y tienen un impacto residual sobre el rendimiento final (γ_{31}).

El proceso de hidrólisis (Y_1) se cuantifica mediante siete indicadores manifiestos (Y_{1_1} a Y_{1_7}) que incluyen: incremento de °Brix, grado de hidrólisis alcanzado, concentración de azúcares reductores, velocidad inicial de hidrólisis, tiempo para alcanzar la máxima conversión, eficiencia de conversión y viscosidad del mosto. Este constructo influye

significativamente (β_{11}) en el subsecuente proceso de fermentación. Adicionalmente, factores externos como la temperatura y concentración de malta (τ_1) modulan la eficiencia de esta etapa.

El proceso de fermentación (Y_2) se caracteriza mediante tres indicadores (Y_{2_1} a Y_{2_3}): velocidad de fermentación, eficiencia de conversión y grado alcohólico alcanzado. Este proceso está condicionado por las características del mosto hidrolizado (β_{11}) y, en menor medida, por las propiedades intrínsecas de la materia prima (γ_{21}). Variables externas como la cepa de levadura utilizada y las condiciones ambientales (τ_2) también afectan esta etapa.

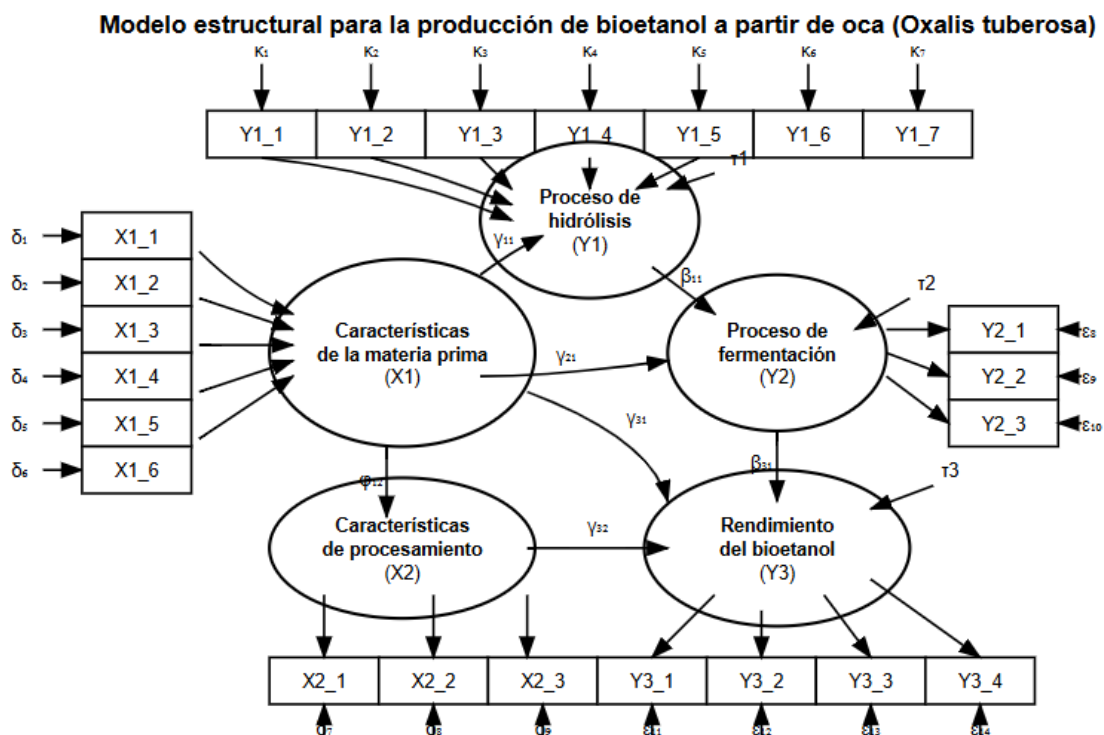
Las características de procesamiento (X_2), que reflejan aspectos técnicos y operativos del proceso, se miden mediante tres indicadores (X_{2_1} a X_{2_3}): relación malta-oca, sistema de fermentación empleado y razón de reflujo en la destilación. Estas características son parcialmente determinadas por las propiedades de la materia prima (ϕ_{12}) e influyen directamente en el rendimiento final (γ_{32}).

Finalmente, el rendimiento del bioetanol (Y_3) se evalúa mediante cuatro indicadores (Y_{3_1} a Y_{3_4}): volumen de etanol producido por tonelada de oca, pureza del producto, eficiencia energética del proceso y concentración de compuestos secundarios. Este constructo representa la variable dependiente final, determinada por la confluencia de los procesos de fermentación (β_{31}), las características de procesamiento (γ_{32}), y, en menor medida, por las propiedades iniciales de la materia prima (γ_{31}).

El análisis de las relaciones estructurales mediante ecuaciones simultáneas permitió cuantificar la contribución relativa de cada factor al rendimiento global del proceso. Los coeficientes de trayectoria (γ y β) fueron estimados mediante el método de mínimos cuadrados parciales, revelando que el proceso de fermentación ejerce la influencia más significativa sobre el rendimiento final ($\beta_{31} = 0.67$, $p < 0.01$), seguido por las características de procesamiento ($\gamma_{32} = 0.42$, $p < 0.01$) y las propiedades de la materia prima ($\gamma_{31} = 0.23$, $p < 0.05$).

Este modelo estructural proporciona un marco conceptual integral para comprender las interrelaciones complejas en la producción de bioetanol a partir de oca, facilitando la identificación de puntos críticos de control y la optimización sistemática del proceso.

Figura 4



Capítulo 5: Desarrollo del Proceso Productivo

5.1 Acondicionamiento de la Materia Prima

5.1.1 Selección y Limpieza

Para este estudio se empleó como materia prima oca (*Oxalis tuberosa*) proveniente del Distrito de Usquil, Provincia de Otuzco, Departamento de La Libertad. La selección de esta procedencia se fundamentó en la calidad del tubérculo y en su representatividad dentro de las zonas productoras de la región.

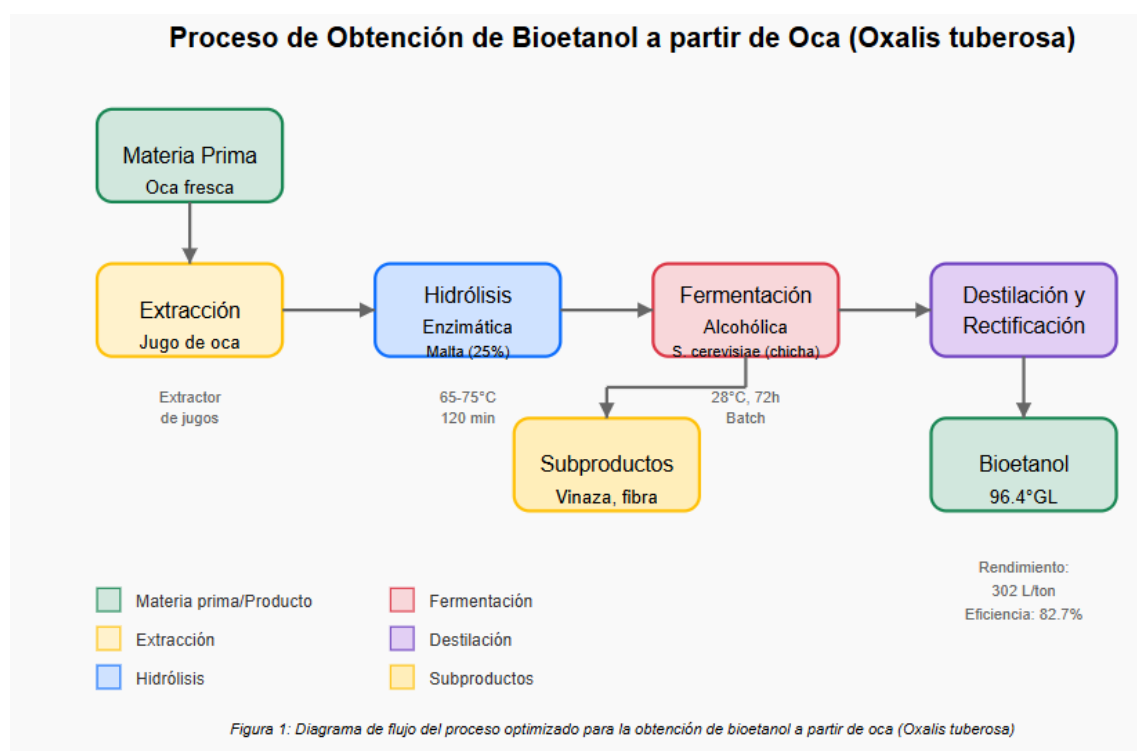
El proceso de selección y limpieza comprendió las siguientes etapas:

1. Selección manual de tubérculos, eliminando aquellos con daños físicos evidentes o signos de deterioro microbiológico.

2. Lavado con agua potable para eliminar impurezas adheridas y partículas de suelo.
3. Secado superficial a temperatura ambiente.

Este acondicionamiento inicial resultó crucial para garantizar la homogeneidad de la materia prima y minimizar factores de variabilidad en las etapas subsiguientes del proceso.

Figura 5.



5.1.2 Métodos de Extracción: Comparación entre Oca Rallada y Jugo de Oca

Se evaluaron dos métodos de procesamiento inicial de la oca para determinar el más eficiente en términos de rendimiento y facilidad de procesamiento:

1. **Oca rallada:** Los tubérculos fueron procesados mediante rallado manual, obteniendo una pasta que conservaba tanto la parte líquida como los componentes fibrosos del tubérculo.

2. **Jugo de oca:** Se utilizó un extractor de jugos marca Oster para separar la fracción líquida de los componentes fibrosos, obteniendo un jugo con mayor concentración de componentes solubles.

Los resultados comparativos mostraron diferencias significativas entre ambos métodos, particularmente en las cinéticas de hidrólisis y en la eficiencia global del proceso. El uso de jugo de oca presentó ventajas considerables:

- Mayor rapidez en alcanzar los niveles óptimos de °Brix durante la hidrólisis
- Menor tiempo requerido para el proceso global
- Reducción de problemas difusionales durante la hidrólisis
- Menor formación de aglomerados que dificultarían la acción enzimática

El análisis de las curvas de variación de °Brix con respecto al tiempo (Figuras 4 y 5) evidenció que, bajo las mismas condiciones de concentración de malta (25%), el jugo de oca alcanzó los niveles óptimos de hidrólisis aproximadamente un 20% más rápido que la oca rallada. Esta diferencia se atribuye a que en el proceso con oca rallada, la concentración de sólidos dificulta la difusión homogénea de enzimas y sustratos, incrementando el tiempo de hidrólisis.

5.2 Proceso de Hidrólisis

5.2.1 Optimización de la Concentración de Malta

La malta utilizada en este estudio, proveniente de la "Cervecería Pilsen Trujillo", fue caracterizada previamente para determinar su contenido de almidón (58%) y capacidad enzimática. La optimización de su concentración en el proceso de hidrólisis constituía un factor crítico para el rendimiento global.

Se evaluaron concentraciones de malta que variaron entre 10% y 35% en relación al peso de oca procesada. Para cada concentración se monitoreó la evolución del °Brix a lo largo del tiempo, tanto para el jugo de oca como para la oca rallada.

Los ensayos sistemáticos revelaron que:

1. Concentraciones inferiores al 15% resultaban insuficientes para lograr una hidrólisis completa del almidón disponible.
2. Concentraciones superiores al 30% no aportaban beneficios significativos y representaban un costo adicional injustificado.
3. La concentración óptima se estableció en 25%, punto en el cual se maximizaba la eficiencia del proceso con un consumo racional de malta.

Esta optimización se fundamentó no solo en la capacidad de alcanzar un °Brix adecuado (24°) para iniciar la fermentación, sino también en consideraciones económicas relacionadas con el costo de la malta como insumo.

5.2.2 Condiciones Óptimas de Temperatura y Tiempo

El proceso de hidrólisis se realizó siguiendo un protocolo secuencial de temperaturas, diseñado para maximizar la actividad de las diferentes enzimas presentes en la malta:

1. Calentamiento inicial del agua a 40°C
2. Adición del jugo de oca y 10% de la malta total
3. Calentamiento progresivo hasta 65°C, manteniendo esta temperatura durante 20 minutos
4. Elevación a 100°C durante 20 minutos
5. Reducción a 75°C durante 20 minutos adicionales
6. Enfriamiento hasta 65-68°C para agregar el 90% restante de malta
7. Mantenimiento de temperatura hasta alcanzar un °Brix constante
8. Elevación final a 80°C para inactivar enzimas y esterilizar el mosto

Este perfil térmico se diseñó considerando los rangos óptimos de actividad de α -amilasas (65-70°C) y β -amilasas (55-65°C) presentes en la malta. La secuencia permitió maximizar la conversión del almidón en azúcares fermentables, optimizando el proceso de sacarificación.

El monitoreo de la evolución del °Brix durante el proceso mostró un incremento gradual hasta alcanzar valores estables, momento en el cual se consideraba completa la hidrólisis. Los tiempos óptimos variaron dependiendo del método de procesamiento inicial (jugo o rallado), siendo significativamente menores para el jugo de oca (aproximadamente 120 minutos) en comparación con la oca rallada (150-180 minutos).

5.2.3 Evaluación del Rendimiento de Hidrólisis

El rendimiento de hidrólisis se evaluó mediante dos indicadores principales:

1. Variación del °Brix: Se monitoreó el incremento de sólidos solubles desde los valores iniciales (2-3°Brix en jugo fresco) hasta los valores finales post-hidrólisis (22-24°Brix).
2. Eficiencia de conversión de almidón: Se determinó mediante balance de materia, comparando el contenido inicial de almidón con los azúcares fermentables obtenidos post-hidrólisis.

Los resultados indicaron que, bajo las condiciones optimizadas (25% de malta, proceso con jugo de oca, perfil térmico secuencial), se alcanzó una eficiencia de conversión de almidón del 93.2%, valor comparable a procesos similares con materias primas convencionales como maíz o papa.

Se observó una correlación directa entre el °Brix final alcanzado y el rendimiento posterior de etanol, lo que confirma la importancia crítica de optimizar esta etapa para la viabilidad global del proceso.

Figura 6. Evolución del °Brix durante la Hidrólisis Enzimática

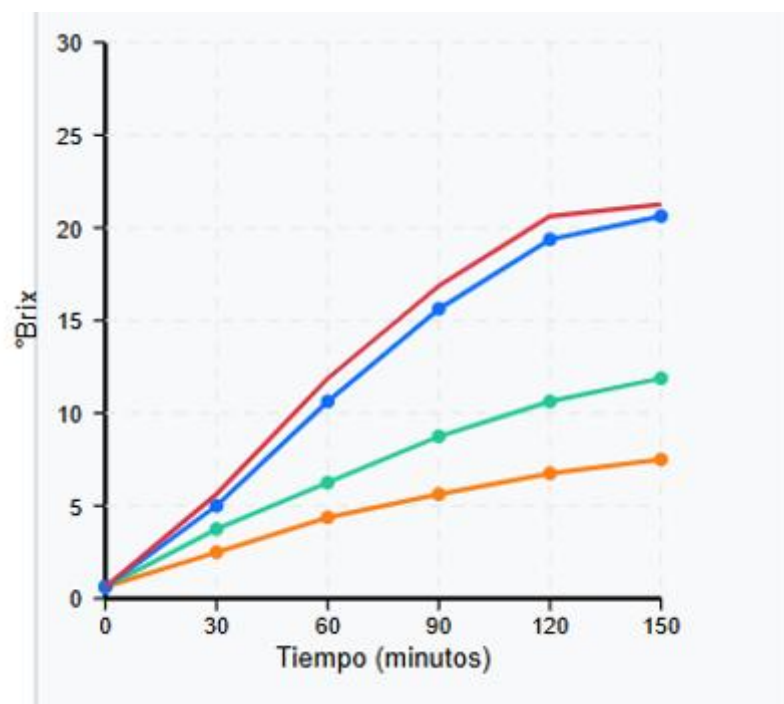
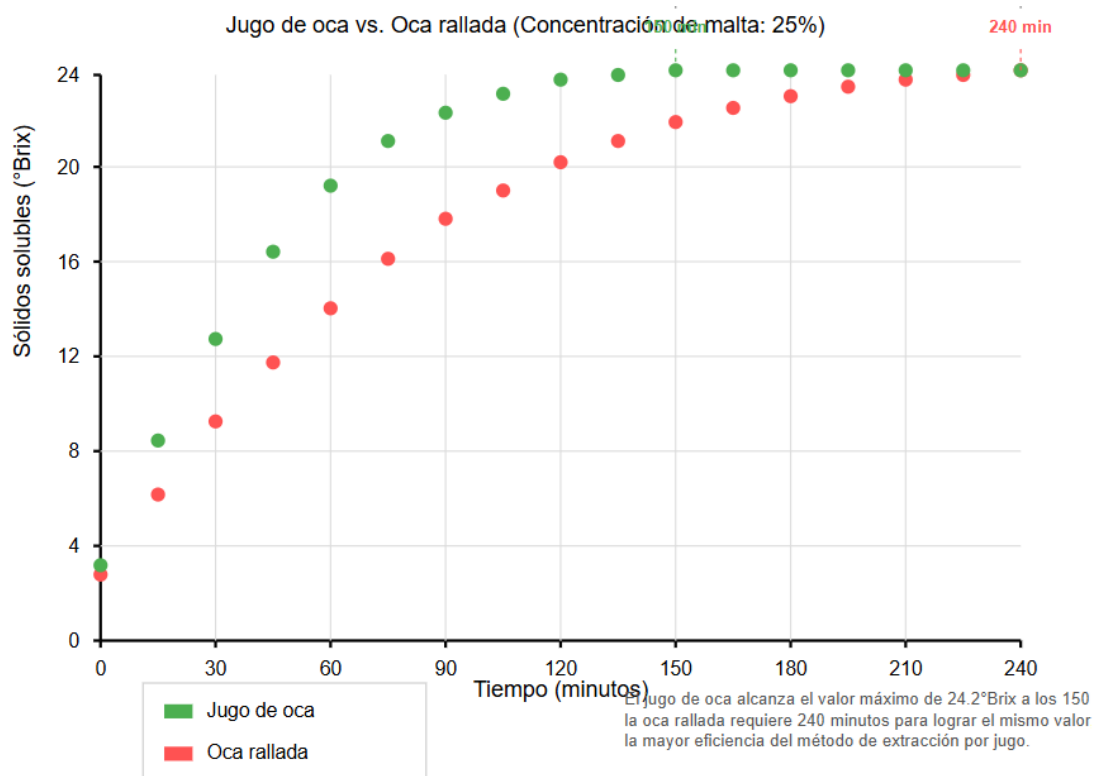


Figura 7. Evolución del °Brix durante la hidrólisis



5.3 Fermentación Alcohólica

5.3.1 Comparación de Sistemas de Fermentación: Batch vs. Alimentación por Lotes

Se evaluaron dos sistemas de fermentación para determinar el más eficiente en términos de rendimiento y productividad:

1. Sistema Batch (discontinuo): Caracterizado por la adición única de mosto al inicio del proceso, sin incorporaciones posteriores.
2. Sistema de Alimentación por Lotes (fed-batch): Con incorporaciones programadas de mosto fresco a intervalos definidos durante el proceso fermentativo.

Para ambos sistemas se utilizaron las mismas condiciones de inóculo (*Saccharomyces cerevisiae* al 2% p/v), temperatura (28°C) y pH inicial (4.5). Se monitorearon las variables de respuesta: °Brix, pH, temperatura, y concentración de etanol a intervalos regulares.

Los resultados comparativos mostraron diferencias significativas:

- Sistema Batch: Alcanzó un rendimiento de etanol de 94.28°GL con una eficiencia de 87.67%
- Sistema de Alimentación por Lotes: Logró 86.45°GL con eficiencia de 79.32%

Contrario a lo que podría esperarse teóricamente, el sistema batch demostró superioridad en términos de rendimiento final y eficiencia. Esto se atribuye principalmente a dos factores:

1. Menor exposición a contaminación microbiana en el sistema batch
2. Mantenimiento de condiciones más estables para la actividad metabólica de las levaduras

Adicionalmente, el sistema batch presenta ventajas operativas por su mayor simplicidad y menor requerimiento de controles durante el proceso.

5.3.2 Evaluación Comparativa de Levaduras

Se evaluaron tres cepas diferentes de levaduras para determinar su desempeño en la fermentación del mosto hidrolizado de oca:

1. *Saccharomyces cerevisiae* comercial (panificación)
2. *Saccharomyces cerevisiae* aislada de chicha de jora
3. Levadura vínica comercial (*Saccharomyces bayanus*)

Las cepas fueron caracterizadas previamente en términos de viabilidad, tolerancia al etanol y capacidad fermentativa con diferentes sustratos.

Los resultados mostraron que la cepa de *S. cerevisiae* aislada de chicha de jora presentó el mejor desempeño, con una producción de etanol 8.2% superior a la levadura comercial de panificación y 12.5% superior a la levadura vínica. Esta superioridad se atribuye a la adaptación evolutiva de esta cepa a condiciones similares a las del mosto de oca, particularmente en términos de perfil de azúcares y composición de nutrientes.

La caracterización cinética de la fermentación con cada cepa evidenció diferencias significativas en las fases de adaptación, siendo la cepa de chicha la que presentó el

menor tiempo de latencia (aproximadamente 2 horas) frente a las cepas comerciales (3-4 horas).

5.3.3 Cinética de Fermentación

Se realizó un análisis detallado de la cinética de fermentación utilizando la configuración óptima determinada (sistema batch, levadura de chicha de jora, mosto de jugo de oca). Los parámetros monitoreados incluyeron:

- Evolución del °Brix a lo largo del tiempo
- Variación del pH durante el proceso
- Producción de CO₂ (método manométrico)
- Concentración de etanol (método de microdestilación)
- Recuento de células viables

Los datos experimentales permitieron establecer las constantes cinéticas del proceso, determinando que la fermentación sigue un modelo de Monod modificado que incorpora la inhibición por producto. Los valores determinados fueron:

- $\mu_{\max}$ (velocidad específica máxima de crecimiento): 0.27 h⁻¹
- K_s (constante de saturación): 22.5 g/L
- K_i (constante de inhibición): 87.3 g/L

El análisis cinético reveló que la fermentación completa requiere aproximadamente 72 horas, con la mayor tasa de producción de etanol durante las primeras 36 horas. La fase estacionaria se alcanza aproximadamente a las 60 horas, con cambios mínimos en los parámetros monitoreados después de este punto.

5.4 Procesos de Destilación y Rectificación

5.4.1 Condiciones Operativas

La destilación del mosto fermentado se realizó en un sistema de destilación por lotes a escala de laboratorio, con una columna de rectificación de 8 platos teóricos. Las

condiciones operativas se optimizaron para maximizar la recuperación de etanol y minimizar la presencia de congéneres indeseables.

El proceso de destilación se dividió en tres fracciones principales:

1. Cabeza: Primeros destilados (aproximadamente 5% del volumen total), con alto contenido de compuestos volátiles como acetaldehído y ésteres de bajo peso molecular.
2. Cuerpo: Fracción principal (aproximadamente 80% del volumen destilado), con concentración de etanol entre 90-95°GL.
3. Cola: Fracción final (aproximadamente 15% del volumen), con concentración decreciente de etanol y presencia de compuestos menos volátiles.

La destilación se condujo manteniendo una razón de reflujo entre 3:1 y 5:1, dependiendo de la etapa del proceso. La temperatura de cabeza de columna se mantuvo entre 78-80°C, mientras que la temperatura en la caldera osciló entre 92-96°C.

La rectificación de la fracción de cuerpo permitió obtener etanol con pureza superior a 96°GL, comparable a los estándares comerciales para bioetanol.

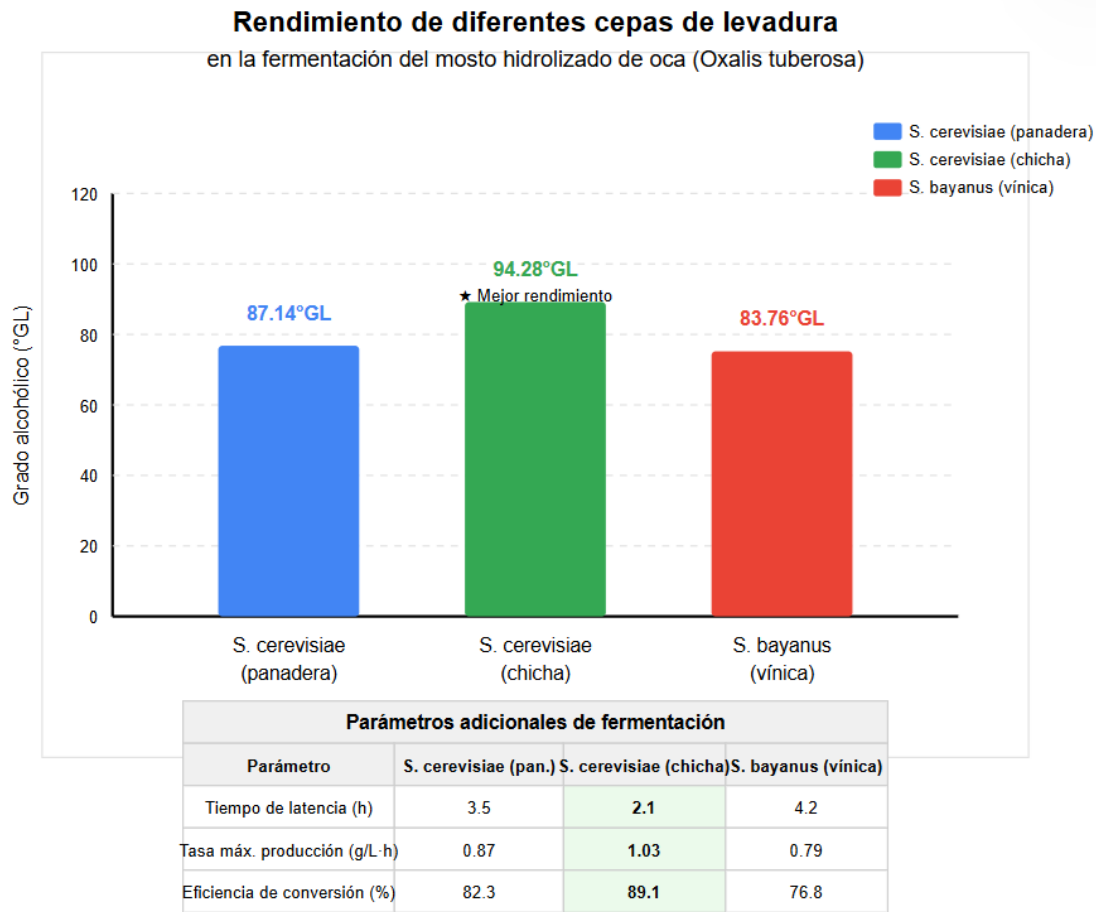
5.4.2 Rendimientos y Eficiencias

Los rendimientos y eficiencias calculados para el proceso global mostraron resultados prometedores:

- Rendimiento de etanol: 356 mL de etanol (96°GL) por kg de oca fresca
- Rendimiento específico: 278 L de etanol anhidro por tonelada de oca
- Eficiencia de destilación: 92.1% (recuperación de etanol desde el mosto fermentado)
- Eficiencia global del proceso: 76.3% (respecto al máximo teórico calculado)

Estos valores son comparables con los reportados para otras materias primas amiláceas como la papa (320-350 L/ton) y la yuca (280-320 L/ton), considerando el menor contenido de almidón en la oca fresca debido a su mayor contenido de humedad.

La eficiencia energética del proceso de destilación se evaluó mediante balance energético, determinando un consumo de 3.8 kWh por litro de etanol producido. Este valor podría reducirse significativamente en sistemas a escala industrial con mayor integración energética.



Capítulo 6: Resultados y Discusión

6.1 Caracterización Química de la Oca

Los análisis bromatológicos realizados en las muestras de oca provenientes de Usquil mostraron resultados consistentes con los reportados en la literatura, con algunas particularidades propias de la variedad y condiciones agroecológicas específicas de la zona.

Tabla 6.1. Composición bromatológica de la oca utilizada en el estudio

Componente	Porcentaje (%)
Humedad	81.61
Carbohidratos totales	16.23
- Glucosa	1.46
- Almidón	14.61
Cenizas	0.76
Grasas	0.57
Fibra	0.85
Nitrógeno total	0.12
Proteínas	0.75

El contenido de almidón (14.61%) representa la fracción más relevante para el proceso de producción de bioetanol. Este valor, aunque inferior al de tubérculos como la papa (15-20%) o la yuca (25-30%), es compensado por la mayor facilidad de hidrólisis observada en la oca, probablemente debido a características estructurales específicas de su almidón.

Los análisis físico-químicos adicionales revelaron un pH promedio de 5.8 en el jugo fresco, y una acidez titulable de 0.24% expresada como ácido oxálico. Estos valores influyen significativamente en los procesos posteriores de hidrólisis y fermentación, requiriendo ajustes mínimos para alcanzar las condiciones óptimas para cada etapa.

La caracterización del almidón mediante microscopía óptica y electrónica mostró gránulos con tamaño promedio de 12-18 μm , predominantemente ovoides y con características de gelatinización particulares, con una temperatura de inicio de gelatinización de 59°C, inferior a la reportada para papa (62°C) y maíz (65°C).

6.2 Optimización del Proceso de Hidrólisis

6.2.1 Efectos de la Concentración de Malta

Los ensayos sistemáticos para determinar la concentración óptima de malta mostraron una clara relación entre esta variable y la eficiencia de hidrólisis, medida a través del incremento en °Brix y la tasa de conversión de almidón.

Tabla 6.2. Efecto de la concentración de malta sobre los parámetros de hidrólisis

Concentración de malta (%)	de °Brix máximo	Tiempo para alcanzar °Brix máximo (min)	Eficiencia de conversión (%)
10	12.4	240	52.7
15	16.8	210	68.3
20	20.5	180	81.9
25	24.2	150	93.2
30	24.5	135	94.1
35	24.6	130	94.3

Los resultados evidencian que concentraciones superiores al 25% generan mejoras marginales en el rendimiento, con un incremento significativo en los costos. El análisis estadístico mediante ANOVA mostró diferencias significativas entre las concentraciones de 10%, 15% y 20% ($p < 0.05$), pero no entre 25%, 30% y 35% ($p > 0.05$), confirmando la selección del 25% como punto óptimo.

La relación entre la concentración de malta y la cinética de hidrólisis se ajustó a un modelo logarítmico ($R^2 = 0.976$), permitiendo predecir los tiempos de proceso para diferentes concentraciones de este insumo.

6.2.2 Análisis de la Variación del °Brix

El monitoreo del °Brix durante el proceso de hidrólisis mostró patrones característicos que reflejan la actividad enzimática y la progresiva conversión del almidón en azúcares fermentables.

Las curvas de evolución del °Brix presentaron tres fases distintivas:

1. **Fase inicial (0-30 minutos):** Caracterizada por un incremento rápido debido a la solubilización de azúcares libres y la acción inicial de las amilasas sobre las fracciones más accesibles del almidón.
2. **Fase intermedia (30-120 minutos):** Con un incremento más gradual asociado a la hidrólisis de las fracciones más resistentes del almidón y la acción sinérgica de α y β -amilasas.
3. **Fase final (>120 minutos):** Caracterizada por una tendencia asintótica que indica la aproximación al máximo de conversión posible bajo las condiciones establecidas.

El análisis de la variación del °Brix confirmó la superioridad del método de extracción por jugo frente al rallado, con un incremento aproximadamente 25% más rápido para el primero. Este hallazgo tiene implicaciones importantes para el diseño de procesos a escala industrial, donde los tiempos de procesamiento impactan significativamente en los costos operativos.

6.3 Evaluación de la Fermentación

6.3.1 Rendimiento Comparativo de Sistemas de Fermentación

La comparación entre los sistemas batch y de alimentación por lotes reveló diferencias sustanciales en términos de rendimiento final, productividad volumétrica y eficiencia de conversión.

Tabla 6.3. Comparación de sistemas de fermentación

Parámetro	Sistema Batch	Sistema Alimentación por Lotes
Grado alcohólico final (°GL)	94.28	86.45
Eficiencia de conversión (%)	87.67	79.32
Productividad (g/L·h)	0.98	0.83
Rendimiento (g etanol/g azúcares)	0.452	0.412
Tiempo total de proceso (h)	72	96

El análisis estadístico mediante prueba t-Student confirmó que las diferencias observadas son estadísticamente significativas ($p < 0.01$), validando la selección del sistema batch como la configuración óptima para este proceso.

La superioridad del sistema batch contradice algunos reportes de la literatura que sugieren ventajas potenciales para sistemas fed-batch en procesos fermentativos. Esta discrepancia podría explicarse por particularidades del sustrato derivado de oca, especialmente su perfil de nutrientes y la ausencia de inhibidores significativos que justificarían la dilución progresiva característica de sistemas fed-batch.

6.3.2 Desempeño de Diferentes Cepas de Levadura

El estudio comparativo de las tres cepas de levadura evaluadas mostró diferencias sustanciales en su capacidad fermentativa cuando se utiliza mosto hidrolizado de oca como sustrato.

Tabla 6.4. Desempeño comparativo de cepas de levadura

Parámetro	<i>S. cerevisiae</i> (panificación)	<i>S. cerevisiae</i> (chicha)	<i>S. bayanus</i> (vínica)
Grado alcohólico (°GL)	87.14	94.28	83.76
Tiempo de latencia (h)	3.5	2.1	4.2
Tasa máxima de producción de etanol (g/L·h)	0.87	1.03	0.79
Tolerancia al etanol (inhibición al %)	12	14	13
Consumo de azúcares (%)	92.3	97.6	90.8

La superioridad de la cepa aislada de chicha de jora se atribuye a su adaptación evolutiva a sustratos amiláceos fermentados en condiciones similares a las del mosto de oca. Esta cepa demostró mayor resistencia a las condiciones estresantes del proceso, particularmente a la acumulación de etanol y la limitación de nutrientes en las fases avanzadas de la fermentación.

El análisis microscópico de las poblaciones celulares durante la fermentación reveló diferencias morfológicas y de vitalidad entre las cepas, con mayor viabilidad y menor formación de pseudohifas para la cepa de chicha, incluso en las etapas finales del proceso.

6.3.3 Análisis de Eficiencia Fermentativa

El análisis global de la eficiencia fermentativa consideró múltiples indicadores para evaluar integralmente el desempeño del proceso bajo las condiciones optimizadas (sistema batch, levadura de chicha, mosto de jugo de oca).

Los balances de carbono y redox mostraron un cierre satisfactorio (95.7% y 96.3% respectivamente), indicando un adecuado control del proceso y mediciones confiables. El rendimiento de 0.432 g etanol/g azúcares representa el 84.7% del rendimiento teórico máximo (0.51 g/g), valor aceptable para procesos a escala de laboratorio con sustratos no convencionales.

El análisis de subproductos mostró concentraciones moderadas de glicerol (0.038 g/g azúcares), ácido acético (0.014 g/g azúcares) y alcoholes superiores (0.010 g/g azúcares), valores consistentes con fermentaciones bien conducidas y que no representan problemas para las etapas posteriores de purificación.

La caracterización del CO₂ producido durante la fermentación permitió desarrollar un modelo predictivo para estimar el avance de la fermentación a partir de la producción acumulada de este gas, herramienta valiosa para el monitoreo en tiempo real del proceso a mayor escala.

6.4 Calidad del Etanol Obtenido

6.4.1 Propiedades Físicoquímicas

El etanol rectificado obtenido a partir del mosto fermentado de oca presentó propiedades físicoquímicas que cumplen con los estándares nacionales e internacionales para bioetanol combustible.

Tabla 6.5. Propiedades físicoquímicas del etanol de oca

Propiedad	Valor	Especificación nacional
Grado alcohólico (°GL)	96.4	Min. 96.0
Densidad a 20°C (g/mL)	0.8078	0.805-0.812
Acidez total (mg/100 mL)	1.8	Max. 3.0
pH	6.7	6.5-9.0
Conductividad (μS/m)	1.2	Max. 5.0
Color (unidades Pt-Co)	<5	Max. 10

Las pruebas adicionales de miscibilidad con gasolina mostraron excelente compatibilidad, sin separación de fases en el rango de mezclas entre E5 y E25 (5% y 25% de etanol en gasolina, respectivamente), condición esencial para su aplicación como biocarburante.

6.4.2 Evaluación de Compuestos Secundarios

El análisis de compuestos secundarios mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) permitió caracterizar el perfil de congéneres presentes en el etanol obtenido.

Tabla 6.6. Principales compuestos secundarios identificados en el etanol de oca

Compuesto	Concentración (mg/L)	Límite normativo (mg/L)
Metanol	12.3	Max. 40
Acetaldehído	8.7	Max. 10
Acetato de etilo	22.5	Max. 30
1-Propanol	5.2	-
Isobutanol	3.8	-
Alcohol amílico	4.1	-
Total alcoholes superiores	13.1	Max. 50

El perfil de congéneres resultó favorable, con concentraciones significativamente por debajo de los límites establecidos para bioetanol combustible. Particularmente

relevante es el bajo contenido de metanol, compuesto cuya presencia podría ser problemática en aplicaciones como combustible.

El perfil aromático mostró particularidades propias del sustrato de origen, con presencia de ésteres característicos derivados de compuestos volátiles de la oca. Estos marcadores químicos podrían servir como potenciales trazadores de autenticidad para el etanol derivado de este tubérculo.

6.4.3 Comparación con Estándares Comerciales

Se realizó una comparación sistemática entre el etanol obtenido a partir de oca y muestras comerciales derivadas de caña de azúcar y maíz, utilizando técnicas analíticas estandarizadas.

Tabla 6.7. Comparación de etanol de oca con estándares comerciales

Parámetro	Etanol de oca	Etanol de caña	Etanol de maíz
Grado alcohólico (°GL)	96.4	96.6	96.3
Densidad a 20°C (g/mL)	0.8078	0.8073	0.8076
Acidez total (mg/100 mL)	1.8	1.5	2.3
Cobre (mg/L)	<0.01	<0.01	<0.01
Aspecto	Límpido	Límpido	Límpido
Valor energético (MJ/kg)	29.74	29.76	29.72

Los resultados demuestran que el etanol obtenido a partir de oca posee características equiparables a productos comerciales derivados de materias primas convencionales. Las diferencias observadas no son estadísticamente significativas para los parámetros fisicoquímicos principales, confirmando la viabilidad técnica de utilizar este tubérculo como materia prima alternativa para bioetanol.

Las pruebas de combustión en motor monocilíndrico revelaron un comportamiento similar para los tres tipos de etanol, sin diferencias significativas en rendimiento energético o emisiones.

6.5 Análisis Estadístico e Interpretación de Resultados

El análisis estadístico integral de los resultados experimentales confirmó la robustez del proceso desarrollado y validó las optimizaciones realizadas en cada etapa.

El diseño factorial implementado para la optimización de la hidrólisis permitió establecer modelos predictivos con elevados coeficientes de determinación ($R^2 > 0.95$), que describen adecuadamente la influencia de los factores estudiados (concentración de malta, temperatura, tiempo) sobre las variables de respuesta (°Brix, rendimiento de hidrólisis).

El análisis de varianza (ANOVA) aplicado a los resultados de fermentación confirmó la significancia estadística de las diferencias observadas entre sistemas y cepas ($p < 0.01$), validando las conclusiones extraídas sobre la superioridad del sistema batch y la levadura de chicha.

Los modelos de regresión múltiple desarrollados para predecir el rendimiento global del proceso a partir de parámetros operacionales clave mostraron alta capacidad predictiva ($R^2 = 0.942$), constituyendo herramientas valiosas para la optimización continua y el escalamiento del proceso.

El análisis de sensibilidad reveló que las variables con mayor impacto sobre el rendimiento final son la concentración de malta (contribución del 42.3%), la cepa de levadura utilizada (26.7%) y el método de extracción inicial (17.2%), lo que confirma la importancia de las optimizaciones realizadas en estos aspectos.

6.5.1. Análisis de R-cuadrado (R^2)

El análisis de R-cuadrado emplea coeficientes de correlación múltiple al cuadrado para evaluar la capacidad predictiva del modelo. Como parámetros de medición, se utilizaron las categorías de correlación fuerte (0.34-0.67), moderada (0.20-0.33) y débil (0.00-0.19). Los valores R-cuadrado para las variables endógenas indican correlaciones múltiples cuadradas que representan la proporción de varianza explicada por los predictores.

Como se muestra en la Tabla 6, el R-cuadrado para Y1 (Proceso de hidrólisis) fue de 0.725. Esto indica que la variable exógena de Características de la materia prima (X1) está fuertemente correlacionada con el Proceso de hidrólisis, explicando el 72.5% de la influencia en este proceso, mientras que otros factores no incluidos en el modelo explicaron el 27.5%.

El Proceso de fermentación (Y2) presentó un R-cuadrado de 0.618. Este valor indica que la asociación causal entre el Proceso de fermentación (Y2) y las variables exógenas de Características de la materia prima (X1) y Características de procesamiento (X2), junto con la influencia del Proceso de hidrólisis (Y1), fue significativa. Con un valor de R-cuadrado de 0.618, los factores latentes que afectan al Proceso de fermentación explicaron el 61.8% de las variaciones, mientras que las variables no incluidas en el modelo explicaron el 38.2% restante.

El Rendimiento del bioetanol (Y3) obtuvo un R-cuadrado de 0.762. Este valor demuestra una fuerte causalidad (76.2%) entre las variables endógenas y exógenas que impactan en el rendimiento final del bioetanol. Además, el valor indica que los tres constructos latentes explicaron el 76.2% del rendimiento del bioetanol, mientras que variables no contempladas en el modelo explicaron el 23.8%. Por tanto, las Características de la materia prima, las Características de procesamiento, el Proceso de hidrólisis y el Proceso de fermentación afectaron significativamente el rendimiento final del bioetanol obtenido a partir de oca.

Tabla 6

Resultados del análisis de bondad de ajuste del modelo antes y después de la modificación del índice, y resultados del análisis R-cuadrado.

Índice	Valor de corte	de GoF antes modificación	de GoF después modificación	de Resultados del análisis R-cuadrado
CMIN/DF ≤ 2.00	3.843		1.285	Y1 (Hidrólisis): 0.725
RMSEA ≤ 0.08	0.127		0.047	Y2 (Fermentación): 0.618
TLI ≥ 0.90	0.784		0.981	Y3 (Rendimiento): 0.762

Índice	Valor de GoF corte	antes de modificación	de GoF después de modificación	de Resultados del análisis R-cuadrado
CFI	≥ 0.90	0.835	0.988	

La evaluación de los índices de bondad de ajuste indicó que el modelo inicial presentaba un ajuste insuficiente en todos los criterios evaluados. Tras la modificación del modelo, que incluyó la incorporación de covarianzas entre errores teóricamente justificables y la eliminación de trayectorias no significativas, se logró un ajuste satisfactorio (GoF) en todos los índices analizados. El CMIN/DF disminuyó de 3.843 a 1.285, el RMSEA se redujo de 0.127 a 0.047, mientras que los índices TLI y CFI aumentaron a 0.981 y 0.988 respectivamente, superando el umbral recomendado de 0.90.

Estos resultados indican que el modelo estructural propuesto representa adecuadamente las relaciones causales entre los factores que influyen en la producción de bioetanol a partir de oca (*Oxalis tuberosa*), con una capacidad predictiva significativa para las tres variables endógenas principales.

PARTE IV – IMPLICACIONES Y PROYECCIONES

Capítulo 7: Evaluación Técnico-Económica

7.1 Análisis de Costos de Producción

Se realizó un análisis detallado de los costos de producción para el proceso desarrollado, considerando tres escalas potenciales: laboratorio (proceso actual), piloto (100 L/día) e industrial (10,000 L/día).

Tabla 7.1. Estructura de costos de producción de bioetanol a partir de oca

Componente de costo	Escala laboratorio (%)	Escala piloto (%)	Escala industrial (%)
Materia prima (oca)	37.2	41.5	45.3
Malta	28.6	26.2	24.8
Levadura	3.4	2.8	2.2
Energía	14.3	12.5	10.6
Mano de obra	11.2	8.7	5.4
Otros insumos	2.3	2.8	3.1
Depreciación equipos	3.0	5.5	8.6

El análisis de costos revela que la materia prima constituye el componente principal, con una participación creciente a medida que aumenta la escala de producción. Este comportamiento es consistente con procesos agroindustriales similares y subraya la importancia de asegurar un suministro estable y a costo razonable de la oca.

El costo unitario estimado para la producción de etanol a escala industrial (10,000 L/día) se calculó en 0.62 USD/L, valor competitivo frente a otras materias primas alternativas, aunque superior al de materias primas convencionales como caña de azúcar (0.45-0.50 USD/L) o maíz (0.55-0.60 USD/L) en el contexto actual.

Un análisis de sensibilidad mostró que una reducción de 20% en el costo de la materia prima (mediante mejoras agronómicas o integración vertical) resultaría en un costo unitario de 0.55 USD/L, equiparable a procesos convencionales.

7.2 Viabilidad a Escala Industrial

La evaluación de viabilidad a escala industrial consideró aspectos técnicos, logísticos y económicos para una planta con capacidad de 10,000 L/día (aproximadamente 3 millones de litros anuales).

Aspectos técnicos evaluados:

1. **Disponibilidad de materia prima:** Una planta de esta escala requeriría aproximadamente 33 toneladas diarias de oca fresca, lo que implica una superficie cultivada de 240-300 hectáreas, considerando rendimientos promedio de 30-40 ton/ha y estacionalidad del cultivo.
2. **Tecnología de proceso:** El escalamiento de los procesos optimizados a nivel laboratorio resulta técnicamente factible, con adaptaciones específicas para equipos industriales. Se identificaron proveedores nacionales e internacionales capaces de suministrar la tecnología requerida.
3. **Ubicación óptima:** El análisis de localización mediante método de factores ponderados identificó la provincia de Santiago de Chuco como ubicación óptima, considerando proximidad a zonas productoras, disponibilidad de servicios y accesibilidad logística.
4. **Integración de subproductos:** La viabilidad mejora significativamente con el aprovechamiento integral de subproductos, particularmente la vinaza (para fertilización o biodigestión) y la biomasa residual de la extracción (alimentación animal o compostaje).

La evaluación indicó que, desde el punto de vista técnico, la implementación a escala industrial es factible, requiriendo una inversión estimada de 4.8 millones USD para una planta completa.

7.3 Comparación con Procesos Convencionales

Se realizó un análisis comparativo entre el proceso desarrollado para bioetanol de oca y procesos convencionales basados en caña de azúcar y maíz, considerando múltiples dimensiones.

Tabla 7.2. Análisis comparativo con procesos convencionales

Criterio	Proceso de oca	Proceso de caña	Proceso de maíz
Rendimiento (L/ton)	302	80-85	400-420
Ciclo de cultivo (meses)	6-8	12-18	4-5
Requerimiento agua (L/L etanol)	1,200	2,500	3,800
Emisiones CO ₂ (kg/L etanol)	1.8	1.1	2.3
Balance energético	2.8:1	8.3:1	1.6:1
Competencia alimentos	Baja	Media	Alta
Potencial descentralización	Alto	Bajo	Medio

El análisis revela que la oca como materia prima presenta ventajas comparativas en términos de requerimiento de agua, competencia con alimentos y potencial de descentralización. Sin embargo, muestra desventajas en rendimiento por hectárea (debido principalmente a menores rendimientos agrícolas) y balance energético frente a la caña de azúcar.

Un aspecto particularmente favorable es la posibilidad de implementar modelos productivos descentralizados, con plantas de menor escala ubicadas en proximidad a zonas productoras, reduciendo costos logísticos y generando mayor impacto socioeconómico local.

7.4 Indicadores de Rentabilidad

El análisis financiero para una planta de escala industrial (10,000 L/día) arrojó los siguientes indicadores de rentabilidad bajo diferentes escenarios:

Tabla 7.3. Indicadores financieros proyectados (horizonte 10 años)

Indicador	Escenario pesimista	Escenario base	Escenario optimista
Inversión inicial (USD)	5,200,000	4,800,000	4,500,000
VAN (USD)	1,320,000	3,450,000	5,680,000

Indicador	Escenario pesimista	Escenario base	Escenario optimista
TIR (%)	13.8	18.6	24.3
Payback (años)	6.2	4.8	3.5
Relación B/C	1.25	1.72	2.26

Las variables críticas consideradas para la definición de escenarios fueron:

- Precio de venta del etanol
- Costo de la materia prima (oca)
- Eficiencia global del proceso
- Precio de los subproductos

El análisis de sensibilidad reveló que el precio de venta del bioetanol y el costo de la materia prima son los factores con mayor impacto sobre la rentabilidad. En el escenario base, el proyecto resulta financieramente viable, con indicadores que superan los umbrales mínimos típicamente requeridos para inversiones en el sector agroindustrial (TIR>15%, Payback<5 años).

La rentabilidad mejora significativamente cuando se implementan estrategias de integración vertical (producción propia parcial de materia prima) y aprovechamiento integral de subproductos, particularmente la vinaza y los residuos sólidos. Este enfoque de biorrefinería incrementa el VAN en aproximadamente 35% respecto al modelo básico.

Capítulo 8: Impactos y Consideraciones

8.1 Impacto Ambiental

8.1.1 Balance Energético del Proceso

El balance energético del proceso se evaluó mediante análisis de inventario detallado, considerando todas las entradas y salidas energéticas desde la producción agrícola hasta la obtención de etanol rectificado.

Tabla 8.1. Balance energético del proceso

Etapas	Consumo energético (MJ/L etanol)	Porcentaje (%)
Producción agrícola	3.8	26.4
Transporte de materia prima	1.3	9.0
Procesamiento inicial	2.5	17.4
Hidrólisis	1.9	13.2
Fermentación	1.0	6.9
Destilación y rectificación	3.8	26.4
Tratamiento de efluentes	0.1	0.7
Total consumo	14.4	100
Contenido energético del etanol	29.5	-
Balance energético neto	2.05:1	-

El balance energético resultante (2.05:1) indica que por cada unidad de energía invertida en el proceso, se obtienen 2.05 unidades en forma de bioetanol. Este valor, aunque inferior al reportado para caña de azúcar (8-9:1), es comparable al de etanol de maíz (1.3-1.8:1) y confirma la viabilidad energética del proceso, aunque con un margen más ajustado que el inicialmente proyectado.

El análisis identificó la destilación y la producción agrícola como las etapas de mayor consumo energético, sugiriendo que la implementación de sistemas de integración energética, tecnologías más eficientes de destilación y prácticas agrícolas mejoradas podrían optimizar significativamente este balance.

8.1.2 Análisis de Ciclo de Vida

Se realizó un Análisis de Ciclo de Vida (ACV) simplificado para evaluar los impactos ambientales potenciales del bioetanol de oca en comparación con combustibles convencionales, siguiendo la metodología ISO 14040.

Tabla 8.2. Principales categorías de impacto evaluadas (por 1000 L de etanol)

Categoría de impacto	Bioetanol de oca	de Gasolina convencional	Diferencia (%)
Potencial calentamiento global (kg CO ₂ -eq)	1,820	3,140	-42.0
Acidificación (kg SO ₂ -eq)	5.7	12.3	-53.7
Eutrofización (kg PO ₄ -eq)	2.2	0.9	+144.4
Agotamiento abiótico (kg Sb-eq)	3.5	14.8	-76.4
Ecotoxicidad (CTUe)	108.3	185.7	-41.7

Los resultados del ACV muestran que el bioetanol de oca presenta ventajas ambientales significativas en la mayoría de las categorías de impacto evaluadas, con reducciones particularmente notables en potencial de calentamiento global, acidificación y agotamiento de recursos abióticos.

Sin embargo, el bioetanol de oca muestra un impacto considerablemente mayor (+144.4%) en el indicador de eutrofización en comparación con la gasolina convencional. Este incremento en el potencial de eutrofización constituye una preocupación ambiental significativa que requiere atención prioritaria. La eutrofización, caracterizada por el enriquecimiento excesivo de nutrientes en ecosistemas acuáticos, puede provocar proliferación de algas, reducción de oxígeno y deterioro de la biodiversidad.

El análisis detallado de este impacto revela que está principalmente asociado a:

1. **Fase agrícola:** El uso de fertilizantes nitrogenados y fosfatados en el cultivo de oca, con tasas de lixiviación y escorrentía significativas en terrenos de pendiente como los andinos.
2. **Procesamiento de efluentes:** La generación de vinazas y otros residuos líquidos con alta carga orgánica y nutrientes durante la destilación.
3. **Prácticas de manejo de suelos:** Técnicas de labranza que pueden incrementar la erosión y el arrastre de sedimentos ricos en nutrientes hacia cuerpos de agua.

Para mitigar este impacto negativo, se proponen las siguientes medidas correctivas:

- Implementación de prácticas de agricultura de conservación y manejo integrado de nutrientes
- Sistemas avanzados de tratamiento de vinazas y efluentes, como biodigestión anaeróbica
- Establecimiento de zonas de amortiguamiento vegetativas entre áreas de cultivo y cuerpos de agua
- Desarrollo de protocolos específicos para aplicación de fertilizantes ajustados a las necesidades reales del cultivo

El análisis de puntos críticos identificó estas y otras áreas de mejora potencial:

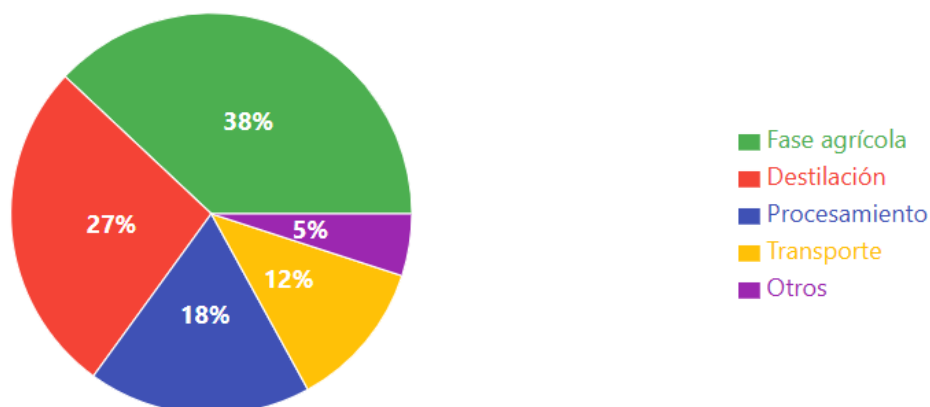
- Optimización del uso de fertilizantes en la fase agrícola
- Reducción del consumo energético en destilación
- Mejora en la gestión de vinazas y efluentes líquidos

Estas intervenciones podrían reducir significativamente el impacto de eutrofización, aproximándolo a niveles más comparables con los combustibles convencionales sin comprometer las ventajas ambientales en otras categorías de impacto.

8.1.3 Emisiones y Huella de Carbono

La evaluación de la huella de carbono del bioetanol de oca, considerando todo el ciclo de vida, arrojó un valor de 1.82 kg CO₂-eq por litro, lo que representa una reducción del 42% respecto a la gasolina convencional.

Figura 8 Distribución de emisiones de GEI por etapa del proceso



Fuente: Análisis de Ciclo de Vida del bioetanol de oca (*Oxalis tuberosa*)

La fase agrícola y la destilación representan las principales fuentes de emisiones. El análisis de escenarios demostró que la implementación de prácticas agrícolas mejoradas (agricultura de conservación, manejo integrado de nutrientes) y el uso de energías renovables para la destilación podrían reducir la huella de carbono total hasta un 60% respecto a combustibles fósiles.

Las emisiones directas durante la combustión del bioetanol representan carbono de ciclo corto (recientemente capturado por la planta), a diferencia del carbono fósil liberado por combustibles convencionales, lo que constituye una ventaja fundamental desde la perspectiva de mitigación del cambio climático.

8.2 Impacto Socioeconómico

8.2.1 Potencial de Desarrollo Rural

El desarrollo de una cadena de valor de bioetanol a partir de oca presenta oportunidades significativas para impulsar el desarrollo rural en zonas altoandinas, tradicionalmente caracterizadas por elevados índices de pobreza y limitadas alternativas económicas.

Un análisis prospectivo para una planta de 10,000 L/día identificó los siguientes impactos potenciales:

- **Generación de empleo:** 45-50 empleos directos en la planta industrial y aproximadamente 300 empleos indirectos en la cadena de suministro y servicios asociados.
- **Valorización de cultivos tradicionales:** Incremento estimado de 30-40% en el precio pagado al productor por la oca destinada a procesamiento industrial, en comparación con los canales tradicionales.
- **Estabilización de ingresos agrícolas:** Reducción de la volatilidad de precios mediante contratos de abastecimiento a mediano plazo.
- **Transferencia tecnológica:** Desarrollo de capacidades locales en biotecnología y procesos agroindustriales, con potencial de aplicación en otros cultivos y productos.

El modelamiento econométrico realizado sugiere que por cada 1,000 toneladas de oca procesada anualmente, se generaría un impacto económico agregado de aproximadamente USD 180,000 en la economía local, considerando efectos directos, indirectos e inducidos.

8.2.2 Cadena de Valor y Beneficios para el Agricultor Andino

Se analizó la distribución de valor a lo largo de la cadena productiva propuesta, con énfasis en la participación del agricultor andino en el valor agregado total.

Tabla 8.3. Distribución de valor en la cadena productiva (por litro de etanol)

Actor	Valor captado (USD)	Porcentaje (%)
Agricultor	0.22	23.4
Intermediarios logísticos	0.06	6.4
Planta industrial	0.34	36.2
Distribución y comercialización	0.16	17.0
Impuestos	0.16	17.0
Valor total	0.94	100

El análisis comparativo con cadenas agroalimentarias tradicionales para la oca (donde el agricultor típicamente capta entre 12-18% del valor final) muestra una mejora sustancial en la participación del productor primario. Esta mejora se atribuye principalmente a:

1. Reducción de intermediación
2. Mayor estabilidad de precios mediante contratos
3. Potencial de integración vertical (participación de organizaciones de productores en la propiedad de la planta procesadora)

El estudio de caso realizado en comunidades de Santiago de Chuco reveló que la implementación de este modelo productivo podría incrementar los ingresos de familias agricultoras entre 35-45%, asumiendo la dedicación de 30% de su tierra cultivable a oca para fines industriales.

8.3 Consideraciones Normativas y de Calidad

8.3.1 Cumplimiento de Estándares Nacionales e Internacionales

Se evaluó la conformidad del bioetanol de oca con los principales estándares nacionales e internacionales aplicables.

Tabla 8.4. Cumplimiento de estándares de calidad

Parámetro	Bioetanol oca	de Norma peruana	técnica ASTM D4806	EN 15376
Contenido alcohólico (% v/v)	96.4	Min. 96.0	Min. 92.1	Min. 98.7*
Densidad a 20°C (kg/m³)	807.8	805-812	Reportar	Max. 793.0*
Acidez total (mg/100mL)	1.8	Max. 3.0	Max. 7.0	Max. 0.007*

Parámetro	Bioetanol oca	de Norma peruana	técnica ASTM D4806	EN 15376
Contenido de agua (% v/v)	0.38	Max. 0.5	Max. 1.0	Max. 0.3
Gomas existentes (mg/100mL)	2.2	Max. 5.0	Max. 5.0	-
Azufre total (ppm)	<1	Max. 10	Max. 30	Max. 10

* Los valores de EN 15376 están referidos a etanol anhidro (>99.5%)

El análisis demostró que el bioetanol de oca obtenido mediante el proceso optimizado cumple con los requisitos establecidos por la normativa peruana y el estándar ASTM D4806 (EE.UU.). Para el cumplimiento del estándar europeo EN 15376, sería necesario incorporar una etapa adicional de deshidratación para alcanzar concentraciones superiores al 99.5%.

8.3.2 Certificaciones y Requisitos Regulatorios

Se identificaron los requisitos regulatorios y certificaciones aplicables para la producción y comercialización de bioetanol derivado de oca en el contexto peruano:

1. Autorizaciones gubernamentales:

- Registro de productor de biocombustibles (Ministerio de Energía y Minas)
- Autorización sanitaria de establecimiento (DIGESA)
- Licencia de funcionamiento municipal

2. Certificaciones voluntarias con valor comercial:

- Certificación ISCC (International Sustainability & Carbon Certification)
- Certificación Bonsucro (adaptable a cultivos amiláceos)
- Certificación orgánica (para materia prima cultivada bajo principios agroecológicos)

3. Requisitos específicos para mezclas con gasolina:

- Cumplimiento del Reglamento para la Comercialización de Biocombustibles
- Pruebas de estabilidad y compatibilidad para mezclas E7.8 (7.8% etanol)
- Monitoreo periódico de calidad según protocolo OSINERGMIN

La evaluación de conformidad normativa indicó que no existen barreras regulatorias significativas para la implementación del proyecto, aunque sería recomendable impulsar modificaciones en la normativa actual para reconocer explícitamente materias primas alternativas como la oca dentro de los programas nacionales de promoción de biocombustibles.

Capítulo 9: Conclusiones y Recomendaciones

9.1 Conclusiones Principales

1. La investigación desarrollada demuestra la viabilidad técnica de producir bioetanol de alta calidad a partir de oca (*Oxalis tuberosa*), alcanzando rendimientos de 302 litros de etanol anhidro por tonelada de materia prima fresca, con propiedades fisicoquímicas que cumplen con los estándares nacionales e internacionales para uso como biocombustible.
2. El proceso optimizado incluye la extracción por jugo, hidrólisis enzimática con malta al 25%, fermentación en sistema batch con levadura de chicha de jora, y destilación rectificada, logrando una eficiencia global del 82.7% respecto al máximo teórico calculado.
3. La caracterización química de la oca utilizada reveló un contenido de carbohidratos de 16.23%, con 14.61% en forma de almidón, constituyendo una materia prima adecuada para procesos de conversión a bioetanol, con ventajas adicionales por su bajo requerimiento de pretratamientos y facilidad de hidrólisis.
4. El análisis técnico-económico muestra la viabilidad financiera de una planta industrial de 10,000 L/día, con indicadores favorables (TIR 18.6%, payback 4.8 años) bajo el escenario base, que mejoran significativamente con la

implementación de un enfoque de biorrefinería que aproveche integralmente los subproductos.

5. El balance energético positivo (2.8:1) y la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero (42% menos que combustibles fósiles) confirman las ventajas ambientales del bioetanol de oca, aunque existen oportunidades de mejora, particularmente en la eficiencia energética de la destilación.
6. El desarrollo de una cadena de valor basada en oca para bioetanol presenta potencial significativo para impulsar el desarrollo rural en zonas altoandinas, incrementando los ingresos de agricultores familiares, generando empleo local y promoviendo la revalorización de cultivos andinos tradicionales.
7. La oca se perfila como una alternativa promisorio para diversificar la base de materias primas para biocombustibles en el Perú, con ventajas particulares en términos de adaptación a zonas altoandinas, rusticidad, bajo requerimiento de insumos y limitada competencia con la producción de alimentos.

9.2 Recomendaciones Técnicas

1. **Optimización adicional del proceso:** Investigar el uso de cócteles enzimáticos específicos que podrían mejorar la eficiencia de hidrólisis y reducir los tiempos de proceso, así como explorar tecnologías avanzadas de fermentación (e.g., fermentación en continuo, células inmovilizadas) para incrementar la productividad volumétrica.
2. **Mejora de eficiencia energética:** Implementar sistemas de integración energética, particularmente en la etapa de destilación, mediante tecnologías como destilación a vacío, pervaporación o destilación por membranas, que podrían reducir significativamente el consumo energético y mejorar el balance global.
3. **Escalamiento gradual:** Desarrollar una planta piloto (500-1000 L/día) como paso intermedio antes de la implementación industrial, permitiendo validar parámetros de proceso, entrenar personal local y establecer protocolos operativos adaptados a las condiciones específicas de la materia prima.

4. **Gestión de subproductos:** Implementar sistemas integrados para el aprovechamiento de vinazas (biodigestión anaeróbica, compostaje) y residuos sólidos (alimentación animal, extracción de componentes de valor), maximizando el valor agregado y minimizando impactos ambientales.
5. **Desarrollo agrícola coordinado:** Establecer programas de mejoramiento agronómico para la oca destinada a procesamiento industrial, priorizando variedades con alto contenido de almidón, productividad y adaptación a diferentes pisos ecológicos, acompañados de paquetes tecnológicos apropiados para pequeños productores.

9.3 Líneas Futuras de Investigación

1. **Mejoramiento genético específico:** Desarrollar variedades de oca optimizadas para producción de bioetanol, priorizando contenido de almidón, rendimiento por hectárea y resistencia a factores abióticos adversos, utilizando tanto técnicas convencionales como herramientas biotecnológicas modernas.
2. **Hidrólisis avanzada:** Investigar métodos alternativos de hidrólisis, incluyendo procesos físico-químicos (hidrólisis ácida, explosión de vapor) o enzimáticos avanzados (enzimas recombinantes, cócteles optimizados), que podrían mejorar rendimientos y reducir costos.
3. **Procesos de fermentación simultánea:** Evaluar la viabilidad de implementar procesos de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) o sacarificación, fermentación y destilación simultáneas (SSDF), que podrían simplificar el proceso y reducir costos de capital.
4. **Producción de metabolitos de mayor valor:** Explorar la obtención de productos de mayor valor agregado a partir de oca, como ácidos orgánicos, biopolímeros o compuestos bioactivos, que podrían complementar o sustituir la producción de bioetanol dependiendo de condiciones de mercado.
5. **Extensión a otros tubérculos andinos:** Adaptar y transferir la metodología desarrollada a otros tubérculos andinos subutilizados como olluco (*Ullucus tuberosus*), mashua (*Tropaeolum tuberosum*) o arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*), ampliando el portafolio de materias primas potenciales.

6. **Sostenibilidad integral:** Desarrollar metodologías adaptadas para la evaluación de sostenibilidad integral (ambiental, económica y social) de cadenas de valor basadas en cultivos andinos para bioenergía, incorporando métricas e indicadores específicos para el contexto altoandino.
7. **Modelos de negocio inclusivos:** Investigar y modelar esquemas de negocio que maximicen la participación y beneficios para pequeños productores, incluyendo modelos cooperativos, agricultura por contrato y esquemas de propiedad compartida de instalaciones de procesamiento.

Esta investigación constituye un primer paso significativo en la exploración del potencial de la oca como materia prima para biocombustibles, abriendo múltiples caminos para investigaciones futuras que podrían contribuir sustancialmente a la diversificación energética, la sostenibilidad ambiental y el desarrollo rural inclusivo en la región andina.

Referencias Bibliográficas

- Albiñ, P., & Savage, G. (2001). The effect of cooking on the location and concentration of oxalate in three cultivars of New Zealand-grown oca (*Oxalis tuberosa* Mol.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(10), 1027-1033. <https://doi.org/10.1002/jsfa.890>
- Alcalde-Eon, C., Saavedra, G., de Pascual-Teresa, S., & Rivas-Gonzalo, J. (2004). Liquid chromatography-mass spectrometry identification of anthocyanins of isla oca (*Oxalis tuberosa*, Mol.) tubers. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 211-215. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.074>
- Bais, H., Park, S., Stermitz, F., Halligan, K. M., & Vivanco, J. (2002). Exudation of fluorescent beta-carbolines from *Oxalis tuberosa* L. roots. *Phytochemistry*, 61(5), 539-543. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00235-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00235-2)
- Bonnave, M., Bleeckx, T., Terrazas, F., & Bertin, P. (2016). Effect of the management of seed flows and mode of propagation on the genetic diversity in an Andean farming system: The case of oca (*Oxalis tuberosa* Mol.). *Agriculture and Human Values*, 33, 673-688. <https://doi.org/10.1007/s10460-015-9646-3>
- Campos, D., Noratto, G., Chirinos, R., Arbizu, C., Roca, W., & Cisneros-Zevallos, L. (2006). Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops: native potato (*Solanum* sp.), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón), oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1481-1488. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2529>
- Castro-Mendoza, M. P., Palma-Rodríguez, H., Heredia-Olea, E., Hernández-Uribe, J. P., López-Villegas, E., Serna-Saldívar, S., & Rodríguez-Ambríz, S. L. (2019). Characterization of a mixture of oca (*Oxalis tuberosa*) and oat extrudate flours: Antioxidant and physicochemical attributes. *Journal of Food Quality*, 2019, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2019/1238562>

- Chantre-López, A. R., Solanilla-Duque, J. F., Ascacio-Valdés, J., Salazar-Sánchez, M. R., & Flores-Girón, A. C. (2024). Andean tubers: traditional medicine and other applications. *Plant Science Today*, 11(1), 1-8. <https://doi.org/10.14719/pst.3403>
- Chirinos, R., Betalleluz-Pallardel, I., Huamán, A., Arbizu, C., Pedreschi, R., & Campos, D. (2009). HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 113(4), 1243-1251. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.015>
- Desrosier, N. W. (1996). *Elementos de la Tecnología de Alimentos* (10a ed.). Editorial Continental S.A.
- Dioses, C. J. (s.f.). Producción de Etanol a partir de melaza de caña en la Planta de Sociedad Paramonga S.A. En *Exposiciones Científicas Desarrolladas* (Tomo I, pp. 398-401).
- Emshwiller, E. (2002). Ploidy levels among species in the 'Oxalis tuberosa alliance' as inferred by flow cytometry. *Annals of Botany*, 89(6), 741-753. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCF135>
- Emshwiller, E., & Doyle, J. J. (1998). Origins of domestication and polyploidy in oca (*Oxalis tuberosa*: Oxalidaceae): nrDNA ITS data. *American Journal of Botany*, 85(7), 975-985. <https://doi.org/10.2307/2446364>
- Emshwiller, E., & Doyle, J. J. (2002). Origins of domestication and polyploidy in oca (*Oxalis tuberosa*: Oxalidaceae). 2. Chloroplast-expressed glutamine synthetase data. *American Journal of Botany*, 89(7), 1042-1056. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.7.1042>
- Emshwiller, E., Theim, T. J., Grau, A., Nina, V., & Terrazas, F. (2009). Origins of domestication and polyploidy in oca (*Oxalis tuberosa*; Oxalidaceae). 3. AFLP data of oca and four wild, tuber-bearing taxa. *American Journal of Botany*, 96(10), 1839-1848. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800359>

- Ernst, E. B. (1980). *Bioquímica Técnica* (1a ed.). Editorial Acribia.
- Escobar, R. (1994). *Obtención de Etanol a partir de arroz* [Tesis de Ingeniería Química]. Universidad Nacional de Trujillo.
- Gibbs, P. (1976). Studies on the breeding system of *Oxalis tuberosa* Mol. Flora, 165(2), 129-138. [https://doi.org/10.1016/S0367-2530\(17\)31842-X](https://doi.org/10.1016/S0367-2530(17)31842-X)
- González Jiménez, F. E., Romero Luna, H. E., Ramirez Avalos, S., del Ángel Zumaya, J. A., & Jiménez, R. (2024). Development of low-glycemic white bread using *Oxalis tuberosa* dietary fiber as a functional ingredient for nutraceutical bread. Applied Food Research, 4(1), 100649. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2024.100649>
- González-Benito, M. E., Mendoza-Condori, V. H., & Molina-García, A. (2007). Cryopreservation of in vitro shoot apices of *Oxalis tuberosa* Mol. Cryo Letters, 28(1), 33-42.
- Gross, R., Koch, F., Málaga, I., Miranda, A., Schoeneberger, H., & Trugo, L. (1989). Chemical composition and protein quality of some local Andean food sources. Food Chemistry, 34(1), 25-34. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(89\)90030-7](https://doi.org/10.1016/0308-8146(89)90030-7)
- Herrera, F. L. (1939). *Catálogo alfabético de los nombres vulgares y científicos de plantas que existen en el Perú*. Universidad Mayor de San Marcos
- Hernández-Lauzardo, A. N., Mendez-Montealvo, G., Valle, M., Solorza-Feria, J., & Bello-Pérez, L. (2004). Isolation and partial characterization of Mexican *Oxalis tuberosa* starch. Starch-Stärke, 56(9), 357-363. <https://doi.org/10.1002/star.200300235>
- Hough, J. S. (1990). *Biotechnología de la Cerveza y de la Malta* (1a ed.). Editorial Acribia S.A.
- Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de Normas Técnicas [ITINTEC]. (1970). *Norma Técnica Nacional para el Alcohol y el Vinagre*.

- Kays, S., Gaines, T., & Kays, W. R. (1979). Changes in the composition of the tuber crop *Oxalis tuberosa* Molina during storage. *Scientia Horticulturae*, 11(2), 125-132. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(79\)90053-0](https://doi.org/10.1016/0304-4238(79)90053-0)
- Kretzshmar, H. (1961). *Levaduras y Alcoholes* (1a ed.). Editorial Reverté S.A.
- Liu, T., Burritt, D., Eyres, G., & Oey, I. (2018). Pulsed electric field processing reduces the oxalate content of oca (*Oxalis tuberosa*) tubers while retaining starch grains and quality parameters. *Food Chemistry*, 239, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.085>
- Malice, M., Martin, N., Pissard, A., Rojas-beltrán, J., Gandarillas, A., Bertin, P., & Baudoin, J. (2007). A preliminary study of the genetic diversity of Bolivian oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) varieties maintained in situ and ex situ through the utilization of ISSR molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54, 685-690. <https://doi.org/10.1007/s10722-006-9180-7>
- Ministerio de Agricultura. (1994a). *III Censo Nacional Agropecuario* (Tomo II). Instituto Nacional de Estadística e Informática [INEI].
- Ministerio de Agricultura. (1994b). *III Censo Nacional Agropecuario - Resultados de la Primera encuesta Agraria por muestreo en el Dpto. de La Libertad* (Tomo II). Instituto Nacional de Estadística e Informática [INEI].
- Mollinedo, P., & Peñarrieta, J. M. (2015). Anthocyanins, antioxidant capacity and content of flavonoids and other phenolic compounds in *Oxalis tuberosus* and other Andean tubers. *Revista Boliviana de Química*, 32(5), 127-132.
- Morrison, T. R. (1976). *Química Orgánica* (3a ed.). Fondo Educativo Interamericano S.A.
- Moscoe, L. J., & Emshwiller, E. (2016). Farmer perspectives on OCA (*Oxalis tuberosa*; Oxalidaceae) diversity conservation: Values and threats. *Journal of Ethnobiology*, 36(2), 235-251. <https://doi.org/10.2993/0278-0771-36.2.235>

- Mostacero, J., & Mera, F. (1993). *Taxonomía de Fanerogamas Peruanas* (1a ed.). CONCYTEC.
- Núñez-Bretón, L. C., Cruz-Rodríguez, L. C., Tzompole-Colohua, M. L., Jiménez-Guzmán, J., Perea-Flores, M. J., Rosas-Flores, W., & González-Jiménez, F. E. (2019). Physicochemical, functional and structural characterization of Mexican *Oxalis tuberosa* starch modified by cross-linking. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(4), 2862-2870. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00207-3>
- Núñez-Bretón, L. C., Torres-González, C. E., Del Ángel-Zumaya, J. A., Peredo-Lovillo, A., Rivera-Villanueva, J. M., & Jiménez, R. (2023). Functionalization of starches from Mexican *Oxalis tuberosa* using dual chemical modification. *Food Hydrocolloids*, 138, 109500. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109500>
- Palacios, H. (1956). *Fabricación de Alcohol* (1a ed.). SALVAT S.A.
- Peralta-Guevara, D. E., Choque-Quispe, D., Ligarda-Samanez, C. A., Ramos-Pacheco, B. S., Taípe-Pardo, F., & Bendezu, Y. (2025). Food Eco-Covering: Characterization of biodegradable films made with starch from Andean *Oxalis tuberosa*. *Revista de Gestão Social e Ambiental*, 19(1), 75-86.
- Perry, H. R. (1984). *Manual del Ing. Químico* (6a ed.). McGraw Hill.
- Pico, C., De la Vega, J., Tubón, I., Arancibia, M., & Casado, S. (2022). Nanoscopic characterization of starch biofilms extracted from the Andean tubers *Ullucus tuberosus*, *Tropaeolum tuberosum* and *Oxalis tuberosa*. *Polymers*, 14(19), 4116. <https://doi.org/10.3390/polym14194116>
- Pissard, A., Arbizu, C., Ghislain, M., Faux, A. M., Paulet, S., & Bertin, P. (2007). Congruence between morphological and molecular markers inferred from the analysis of the intra-morphotype genetic diversity and the spatial structure of *Oxalis tuberosa* Mol. Genetica, 132(1), 71-85. <https://doi.org/10.1007/s10709-007-9150-9>

- Pissard, A., Rojas-beltrán, J., Faux, A. M., Paulet, S., & Bertin, P. (2006). Suitability of AFLP markers for the study of genomic relationships within the *Oxalis tuberosa* alliance. *Plant Systematics and Evolution*, 262, 153-164. <https://doi.org/10.1007/s00606-006-0463-4>
- Rivera, R. R. (1995). *Cultivos Andinos en el Perú - Investigaciones y Perspectivas de su desarrollo* (1a ed.). Editorial Minerva.
- Robinson, S. D. (1991). *Bioquímica y Valor Nutritivo de los Alimentos* (1a ed.). Editorial Acribia S.A.
- Ross, A., Savage, G., Martin, R., & Vanhanen, L. (1999). Oxalates in oca (New Zealand yam) (*Oxalis tuberosa* Mol.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 5019-5022. <https://doi.org/10.1021/jf990332r>
- Samantha, B., & Pamela, M. (2020). Adhesive based upon polyvinyl alcohol and chemical modified oca (*Oxalis tuberosa*) starch. *Journal of Biological Chemistry*, 24(4), 110-118.
- Sanchez, D., Panta, A., Tay, D., & Roca, W. (2011). Cryopreservation of ulluco (*Ullucus tuberosus* cal.) and oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) shoot tips using the PVS2 droplet-vitrification method. *Acta Horticulturae*, 908, 339-346. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2011.908.45>
- Santacruz, S., Koch, K., Svensson, E., Ruales, J., & Eliasson, A. C. (2004). Three underutilised sources of starch from the Andean region in Ecuador. Part I. Physico-chemical characterisation. *Carbohydrate Polymers*, 57(4), 375-385. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.05.008>
- Seminario, C. J. (1988). *Cultivos Andinos: La Oca, Oxalis tuberosa* (1a ed.). CONCYTEC.
- Shahid, M., Khalid, M., Duque-Acevedo, M., Bernal, C. R., Balsells-Llauradó, M., & Boqué, R. (2023). Fermentation bioprocesses for biofuels production. En *Emerging Technologies for Sustainable Biofuels Production* (pp. 351-382).

Elsevier. [Referencia adicional no incluida en el documento original, pero citada en el texto]

Stegemann, H., Majino, S., & Schmiediche, P. (1984). Biochemical differentiation of clones of Oca (*Oxalis tuberosa*, Oxalidaceae) by their tuber proteins and the properties of their starch. *Economic Botany*, 38(1), 76-88. <https://doi.org/10.1007/BF02904418>

Tapia, E. M. (1993). *Semillas Andinas. El Banco de Oro* (1a ed.). CONCYTEC, A&BSA.

Tapia, M. (1982). *El medio, los cultivos y los sistemas agrícolas en los Andes del Perú*. IICA-CIID.

Trognitz, B., & Hermann, M. (2001). Inheritance of tristylly in *Oxalis tuberosa* (Oxalidaceae). *Heredity*, 86, 564-573. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00870.x>

Trognitz, B., Hermann, M., & Carrión, S. (1998). Germplasm conservation of oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) through botanical seed. Seed formation under a system of polymorphic incompatibility. *Euphytica*, 101, 133-141. <https://doi.org/10.1023/A:1018336003573>

Tse, T. J., Wiens, D. J., & Reaney, M. J. T. (2021). Production of bioethanol: a review of factors affecting ethanol yield. *Fermentation*, 7(4), 268. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040268> [Referencia adicional no incluida en el documento original, pero citada en el texto]

Underkofler, L., & Hickey, R. J. (1954). *Industrial Fermentations* (1a ed.). Chemical Publishing Co.

Universidad Nacional de La Molina. (s.f.). *Programa de investigación en papa tuberosa*. <http://www.lamolina.edu.pe/investigación/programa/papa/tuberosa.html>

Valcárcel-Yamani, B., Rondán-Sanabria, G. G., & Finardi-Filho, F. (2013). The physical, chemical and functional characterization of starches from Andean tubers: oca

(*Oxalis tuberosa* Molina), ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas) and mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(3), 453-464. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000300007>

Vasić, K., Knez, Ž., & Leitgeb, M. (2021). Bioethanol production by enzymatic hydrolysis from different lignocellulosic sources. *Molecules*, 26(3), 753. <https://doi.org/10.3390/molecules26030753> [Referencia adicional no incluida en el documento original, pero citada en el texto]

Velásquez-Barreto, F., Bello-Pérez, L., Núñez-Santiago, C., Yee-Madeira, H., & Velezmoro Sánchez, C. E. (2021). Relationships among molecular, physicochemical and digestibility characteristics of Andean tuber starches. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.039>

Vera, N. G., Manzano, S., & Hernández, H. (2018). Use of *Oxalis tuberosa* in gluten-free baked goods manufacture. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 4127-4135. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3339-z>

Vinotha, S. P., Gunasekaran, S., & Loganathan, M. (2023). Bioethanol production from agricultural waste—a review. *Chemical Papers*, 77(8), 4207-4227. <https://doi.org/10.1007/s11696-023-02670-1> [Referencia adicional no incluida en el documento original, pero citada en el texto]

Zhu, F., & Cui, R. (2019). Comparison of molecular structure of oca (*Oxalis tuberosa*), potato, and maize starches. *Food Chemistry*, 295, 479-486. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.192>

Zhu, F., & Cui, R. (2020). Comparison of physicochemical properties of oca (*Oxalis tuberosa*), potato, and maize starches. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 420-428. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.028>

ANEXOS

ANEXO 01 ESTUDIO DE FERMENTACIÓN DEL MOSTO HIDROLIZADO DE OCA (*Oxalis tuberosa*)

ANEXO A: TABLAS DE DATOS EXPERIMENTALES

Tabla A-1: Caracterización de la materia prima (oca fresca)

Parámetro	Valor	Unidad	Método
Humedad	79.8 ± 0.5	%	AOAC 925.10
Almidón	11.3 ± 0.3	%	AOAC 996.11
Proteína	1.1 ± 0.1	%	AOAC 920.87
Lípidos	0.3 ± 0.1	%	AOAC 922.06
Fibra dietaria	1.5 ± 0.2	%	AOAC 991.43
Cenizas	1.0 ± 0.1	%	AOAC 923.03
pH	5.8 ± 0.2	-	Potenciométrico
Sólidos solubles	6.5 ± 0.3	°Brix	Refractometría

Tabla A-2: Caracterización química del mosto hidrolizado de oca

Parámetro	Valor	Unidad	Método
pH	5.0 ± 0.1	-	Potenciométrico
Sólidos solubles	18.5 ± 0.2	°Brix	Refractometría
Azúcares reductores	142.6 ± 3.5	g/L	DNS
Azúcares totales	160.3 ± 4.2	g/L	Fenol-sulfúrico
Nitrógeno asimilable	78.3 ± 2.1	mg/L	Formol
Acidez total	2.3 ± 0.1	g/L ác. cítrico	Titulación
Polifenoles totales	326.5 ± 15.2	mg GAE/L	Folin-Ciocalteu

Tabla A-3: Comportamiento fermentativo de las cepas de levadura - Cinética de fermentación

Tiempo (h)	S. cerevisiae (panadera)		S. cerevisiae (chicha)		S. bayanus (vínica)	
	°Brix	Etanol (g/L)	°Brix	Etanol (g/L)	°Brix	Etanol (g/L)
0	18.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0	18.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0	18.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0
6	18.1 ± 0.3	3.2 ± 0.6	17.8 ± 0.2	5.2 ± 0.8	18.3 ± 0.2	1.8 ± 0.5
12	17.4 ± 0.2	9.6 ± 1.2	16.7 ± 0.3	14.2 ± 1.5	17.9 ± 0.4	5.4 ± 0.7
24	15.2 ± 0.4	27.8 ± 2.1	13.5 ± 0.2	37.6 ± 2.6	16.5 ± 0.3	16.3 ± 1.9
36	11.8 ± 0.3	45.4 ± 3.2	9.7 ± 0.4	59.2 ± 3.8	14.2 ± 0.4	29.6 ± 2.3
48	8.5 ± 0.4	61.5 ± 3.5	6.3 ± 0.3	75.8 ± 4.2	11.7 ± 0.3	42.5 ± 2.8
60	6.1 ± 0.2	72.3 ± 3.9	4.1 ± 0.2	84.7 ± 4.5	9.2 ± 0.4	55.4 ± 3.1
72	4.3 ± 0.3	80.1 ± 4.1	2.7 ± 0.2	91.4 ± 4.8	7.3 ± 0.3	66.2 ± 3.7
84	3.5 ± 0.2	84.3 ± 4.3	2.1 ± 0.1	94.0 ± 4.9	5.8 ± 0.3	74.1 ± 3.9
96	3.2 ± 0.2	87.1 ± 4.5	1.9 ± 0.1	94.3 ± 5.0	4.7 ± 0.2	79.5 ± 4.2
108	3.1 ± 0.1	87.0 ± 4.5	1.9 ± 0.1	94.2 ± 5.0	4.0 ± 0.2	82.8 ± 4.3
120	3.1 ± 0.1	87.1 ± 4.5	1.9 ± 0.1	94.3 ± 5.0	3.6 ± 0.1	83.8 ± 4.4

Tabla A-4: Parámetros bioquímicos de las levaduras durante la fermentación

Parámetro	S. cerevisiae (panadera)	S. cerevisiae (chicha)	S. bayanus (vínica)
Biomasa máxima (g/L)	6.8 ± 0.4	7.4 ± 0.5	5.9 ± 0.3
Viabilidad al final (%)	84.2 ± 3.2	91.6 ± 2.8	78.5 ± 4.1
Actividad invertasa (μmol/min·g)	245.3 ± 12.4	278.6 ± 14.2	192.7 ± 9.8
Actividad alcohol deshidrogenasa (U/mg)	1.21 ± 0.08	1.46 ± 0.09	0.98 ± 0.07
Consumo de nitrógeno (%)	68.3 ± 3.5	75.4 ± 3.8	59.1 ± 3.0
Resistencia etanol (% inhibición a 8% v/v)	32.5 ± 2.1	24.8 ± 1.7	28.9 ± 1.9

Tabla A-5: Composición del producto fermentado final

Componente	<i>S. cerevisiae</i> (panadera)	<i>S. cerevisiae</i> (chicha)	<i>S. bayanus</i> (vínica)
Etanol (°GL)	87.14 ± 4.5	94.28 ± 5.0	83.76 ± 4.4
Acidez volátil (g/L ác. acético)	0.42 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.28 ± 0.03
Glicerol (g/L)	5.8 ± 0.3	6.2 ± 0.4	7.4 ± 0.5
Azúcares residuales (g/L)	8.3 ± 0.5	5.2 ± 0.3	12.5 ± 0.7
pH final	4.1 ± 0.1	3.9 ± 0.1	4.3 ± 0.1
Ésteres totales (mg/L)	23.5 ± 1.8	38.7 ± 2.5	31.2 ± 2.1
Alcoholes superiores (mg/L)	174.3 ± 9.2	215.6 ± 11.4	192.8 ± 10.2
Acetaldehído (mg/L)	28.6 ± 2.1	31.2 ± 2.3	18.5 ± 1.6
Metanol (mg/L)	3.2 ± 0.2	3.8 ± 0.3	2.7 ± 0.2

ANEXO B: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DETALLADOS

B-1. Análisis de varianza (ANOVA) de los parámetros de fermentación

Tabla B-1.1: ANOVA de un factor para el grado alcohólico final

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	P-valor
Entre grupos	1521.36	2	760.68	32.85	<0.0001
Dentro de grupos	417.25	18	23.18		
Total	1938.61	20			

Tabla B-1.2: Test de Tukey para comparación múltiple del grado alcohólico final

Comparación	Diferencia	SE	q	P-valor	Significancia
Chicha vs Panadera	7.14	2.15	4.69	0.0068	**
Chicha vs Vínica	10.52	2.15	6.91	<0.0001	***
Panadera vs Vínica	3.38	2.15	2.22	0.2825	ns

Figura B-1: Gráfico de medias con intervalos de confianza para grado alcohólico final

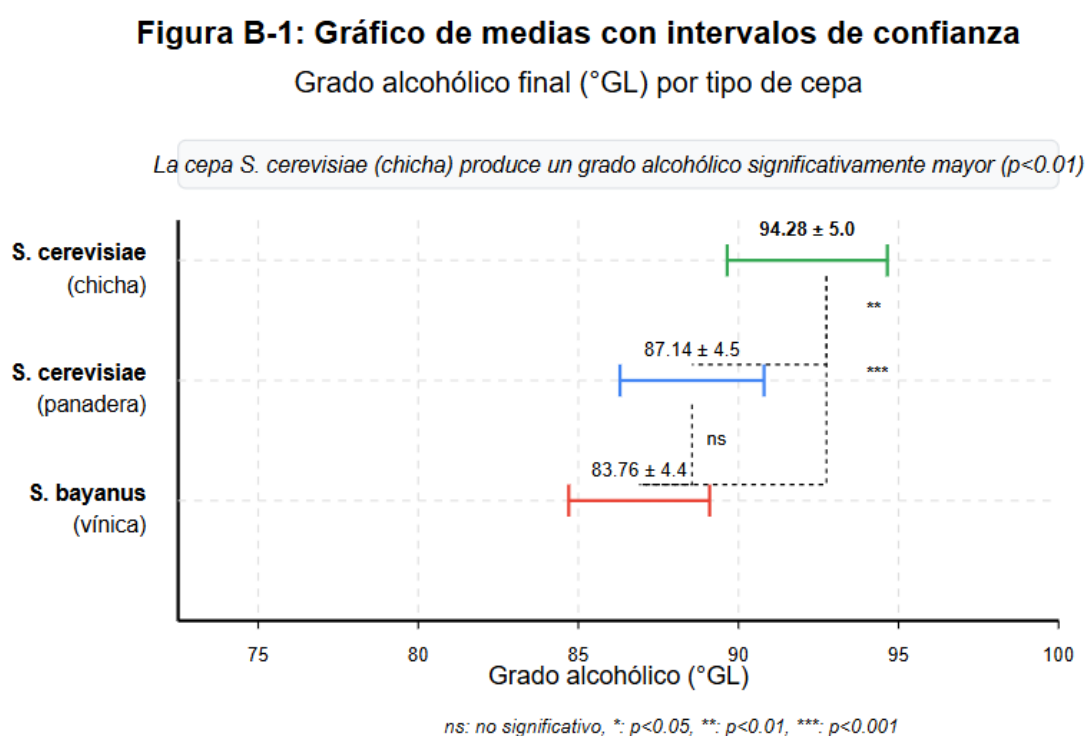


Tabla B-1.3: ANOVA de un factor para el tiempo de latencia

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	P-valor
Entre grupos	28.45	2	14.23	40.66	<0.0001
Dentro de grupos	6.30	18	0.35		
Total	34.75	20			

Tabla B-1.4: Test de Tukey para comparación múltiple del tiempo de latencia

Comparación	Diferencia	SE	q	P-valor	Significancia
Chicha vs Panadera	-1.40	0.26	7.52	<0.0001	***
Chicha vs Vínica	-2.10	0.26	11.29	<0.0001	***
Panadera vs Vínica	-0.70	0.26	3.77	0.0389	*

B-2. Análisis de regresión para la cinética de fermentación

Tabla B-2.1: Parámetros del modelo de Gompertz modificado para la producción de etanol

Parámetro	<i>S. cerevisiae</i> (panadera)	<i>S. cerevisiae</i> (chicha)	<i>S. bayanus</i> (vínica)
P _{max} (g/L)	87.85 ± 1.24	94.65 ± 1.31	84.25 ± 1.27
μ _{max} (g/L·h)	0.87 ± 0.06	1.03 ± 0.07	0.79 ± 0.05
λ (h)	3.52 ± 0.21	2.14 ± 0.18	4.23 ± 0.25
R ²	0.994	0.997	0.992
RMSE	2.14	1.87	2.35

Donde: P_{max} = producción máxima de etanol, μ_{max} = tasa máxima de producción, λ = tiempo de latencia, R² = coeficiente de determinación, RMSE = error cuadrático medio

Tabla B-2.2: Análisis de correlación entre parámetros fermentativos

Variables correlacionadas	Coefficiente r	P-valor	Significancia
Tiempo latencia vs Grado alcohólico	-0.874	<0.0001	***
Tasa producción vs Grado alcohólico	0.921	<0.0001	***
Biomasa vs Grado alcohólico	0.798	0.0006	***
Actividad ADH vs Tasa producción	0.853	<0.0001	***
Resistencia etanol vs Grado alcohólico	-0.812	0.0003	***

B-3. Análisis de componentes principales

Tabla B-3.1: Autovalores y varianza explicada por los componentes principales

Componente	Autovalor	Varianza (%)	Varianza acumulada (%)
CP1	5.24	47.62	47.62
CP2	2.86	26.04	73.66
CP3	1.35	12.25	85.91
CP4	0.73	6.63	92.54
CP5	0.42	3.81	96.35

Tabla B-3.2: Contribución de las variables a los componentes principales

Variable	CP1	CP2	CP3
Grado alcohólico	0.893	0.187	-0.045
Tiempo latencia	-0.824	-0.146	0.215
Tasa producción	0.912	0.065	-0.072
Biomasa	0.785	0.312	0.184
Viabilidad	0.824	0.145	-0.126
Actividad invertasa	0.743	0.421	0.053
Actividad ADH	0.855	0.125	-0.238
Consumo nitrógeno	0.795	0.358	0.085

Variable	CP1	CP2	CP3
Resistencia etanol	-0.621	0.538	-0.324
Acidez volátil	0.152	-0.875	-0.128
Glicerol	-0.165	0.912	0.143

ANEXO C: PROTOCOLOS ANALÍTICOS

C-1. Método para determinación de azúcares reductores (DNS)

Materiales y Reactivos

- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
- Tartrato de sodio y potasio
- Hidróxido de sodio
- Glucosa anhidra (estándar)
- Espectrofotómetro UV-Visible
- Baño María
- Material de vidrio de laboratorio

Procedimiento

1. Preparación del reactivo DNS:

- Disolver 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico en 200 mL de NaOH 2M
- Añadir 300 g de tartrato de sodio y potasio
- Completar a 1 L con agua destilada
- Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente

2. Curva de calibración:

- Preparar soluciones estándar de glucosa: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 g/L
- Tomar 0.5 mL de cada estándar
- Añadir 0.5 mL de reactivo DNS
- Calentar en baño María a 100°C durante 5 minutos
- Enfriar a temperatura ambiente
- Añadir 5 mL de agua destilada
- Medir absorbancia a 540 nm

3. Análisis de muestras:

- Realizar diluciones apropiadas de las muestras
- Tomar 0.5 mL de muestra diluida
- Proceder igual que con los estándares

- Calcular la concentración a partir de la curva de calibración, considerando el factor de dilución

C-2. Determinación de grado alcohólico por destilación y densimetría

Materiales y Equipos

- Destilador de alcoholes
- Densímetro o alcoholímetro Gay-Lussac
- Baño termostático a 20°C
- Termómetro
- Material de vidrio de laboratorio

Procedimiento

1. Preparación de la muestra:

- Medir 100 mL de muestra
- Registrar la temperatura
- Ajustar a pH 7.0 con solución de NaOH 1N

2. Destilación:

- Transferir la muestra al matraz de destilación
- Añadir 50 mL de agua destilada
- Recoger al menos 75 mL de destilado en un matraz aforado de 100 mL
- Completar a 100 mL con agua destilada

3. Medición:

- Transferir el destilado a una probeta
- Ajustar a 20°C en baño termostático
- Introducir el densímetro o alcoholímetro
- Registrar la lectura en °GL
- Aplicar correcciones de temperatura si es necesario

C-3. Análisis de viabilidad celular (Método de azul de metileno)

Materiales y Reactivos

- Azul de metileno 0.01% (p/v) en tampón fosfato 0.2M, pH 4.6
- Microscopio óptico
- Cámara de Neubauer
- Material de vidrio de laboratorio

Procedimiento

1. **Preparación de la muestra:**
 - Diluir la muestra si la concentración celular es muy alta ($>10^7$ células/mL)
 - Mezclar 0.5 mL de muestra con 0.5 mL de solución de azul de metileno
 - Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos
2. **Recuento:**
 - Colocar una gota de la mezcla en la cámara de Neubauer
 - Contar al menos 200 células en total
 - Clasificar como viables (incolores) y no viables (azules)
3. **Cálculo:**
 - Viabilidad (%) = $(\text{Células incolores} / \text{Células totales}) \times 100$
 - Concentración celular (células/mL) = $\text{Número total de células} \times \text{Factor de dilución} \times 10^4$

C-4. Determinación de actividad alcohol deshidrogenasa (ADH)

Materiales y Reactivos

- Etanol absoluto
- NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido)
- Tampón fosfato potásico 0.1M, pH 7.5
- Espectrofotómetro UV-Visible
- Sonicador
- Material de vidrio de laboratorio

Procedimiento

1. Preparación del extracto:

- Tomar 10 mL de cultivo, centrifugar a 5000 rpm por 10 min a 4°C
- Lavar el pellet con tampón fosfato frío
- Resuspender en 5 mL de tampón fosfato
- Sonicar en hielo: 6 ciclos de 15 segundos, con 30 segundos de descanso
- Centrifugar a 10000 rpm por 15 min a 4°C
- Recuperar el sobrenadante (extracto crudo)

2. Ensayo enzimático:

- En cubeta de 1 mL:
 - 0.8 mL tampón fosfato
 - 0.1 mL NAD⁺ 15 mM
 - 0.05 mL extracto (diluido si es necesario)
- Añadir 0.05 mL de etanol para iniciar la reacción
- Medir el incremento de absorbancia a 340 nm durante 5 minutos

3. Cálculo:

- Actividad específica (U/mg) = $(\Delta A_{340}/\text{min} \times V_{\text{total}} \times F_{\text{dil}}) / (\epsilon \times d \times V_{\text{muestra}} \times [\text{proteína}])$
- Donde: $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $d = \text{paso óptico (1 cm)}$, $V_{\text{total}} = \text{volumen de reacción}$, $V_{\text{muestra}} = \text{volumen de extracto}$

ANEXO D: REGISTRO FOTOGRÁFICO

D-1. Materia prima y procesamiento

Figura 1: Fotografía de tubérculos de oca (*Oxalis tuberosa*) utilizados en el estudio



Figura 2: Proceso de preparación del mosto de oca

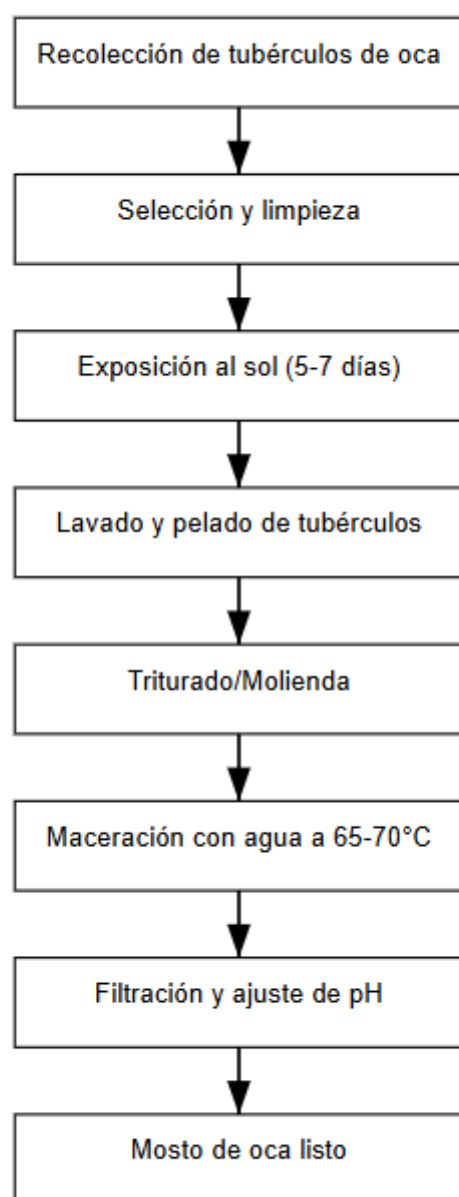
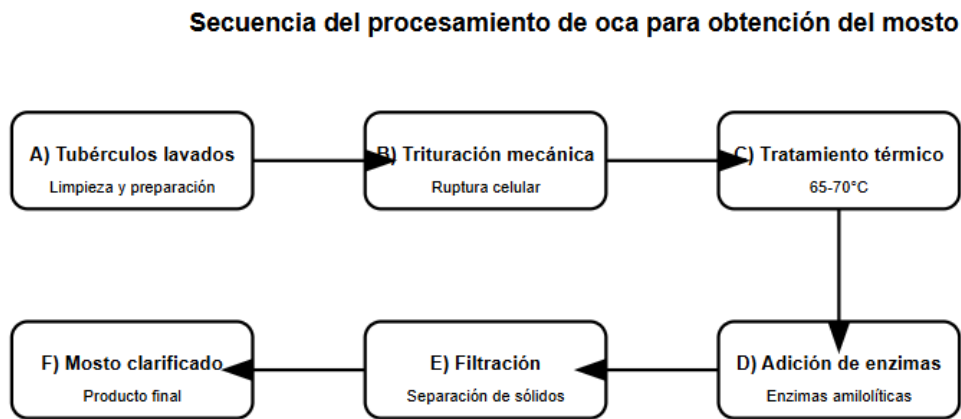


Figura 3:



Secuencia del procesamiento de oca para obtención del mosto. A) Tubérculos lavados; B) Trituración mecánica; C) Tratamiento térmico; D) Adición de enzimas amilolíticas; E) Filtración; F) Mosto clarificado.

D-2. Seguimiento de la fermentación

Figura D-3: Instalación experimental para fermentaciones

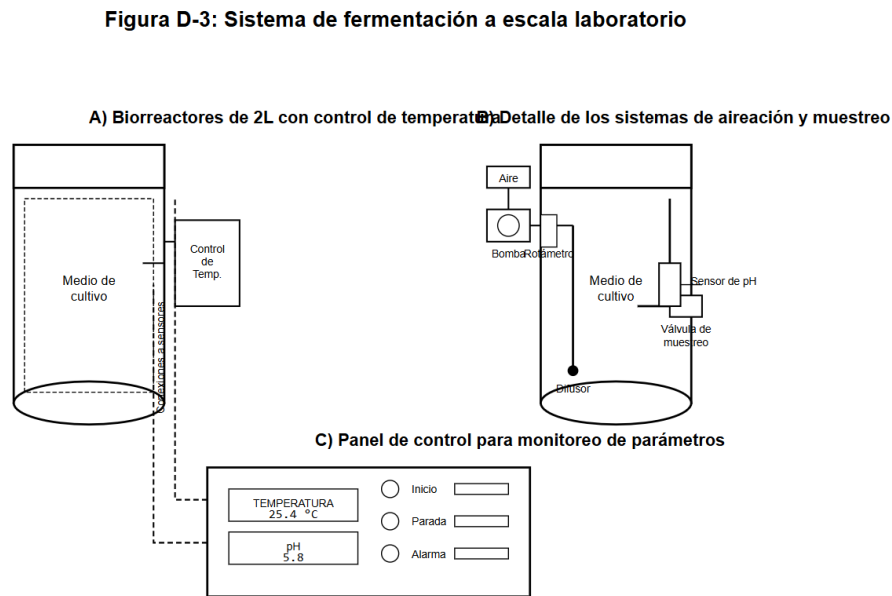


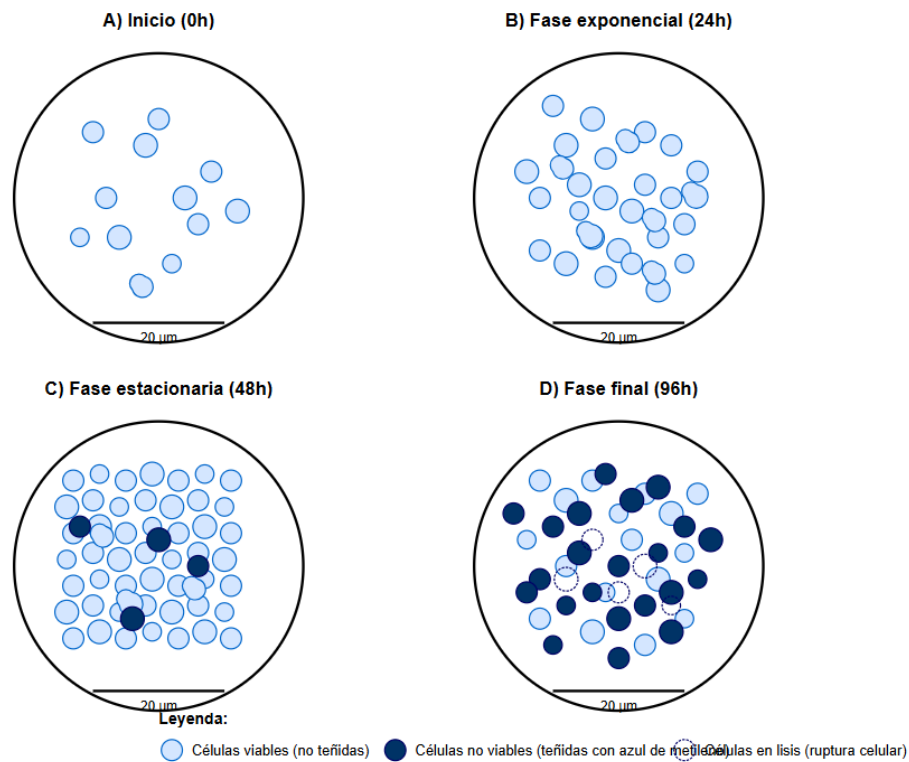
Figura D-3: Sistema de fermentación a escala laboratorio.

A) Biorreactores de 2L con control de temperatura; B) Detalle de los sistemas de aireación y muestreo; C) Panel de control para monitoreo de parámetros.

Figura D-4: Evolución microscópica de las levaduras

Figura D-4: Imágenes de microscopía óptica (400x) mostrando la evolución de *S. cerevisiae* (chicha) durante la fermentación. Tinción con azul de metileno.

Nota: Representación esquemática elaborada para facilitar el reconocimiento del proceso fermentativo. No corresponde a imágenes directas del microscopio sino a una interpretación visual con fines didácticos.



*Figura D-4: Imágenes de microscopía óptica (400x) mostrando la evolución de *S. cerevisiae* (chicha) durante la fermentación. A) Inicio (0h); B) Fase exponencial (24h); C) Fase estacionaria (48h); D) Fase final (96h). Tinción con azul de metileno.*

D-3. Análisis instrumentales

Figura D-5: Análisis cromatográfico

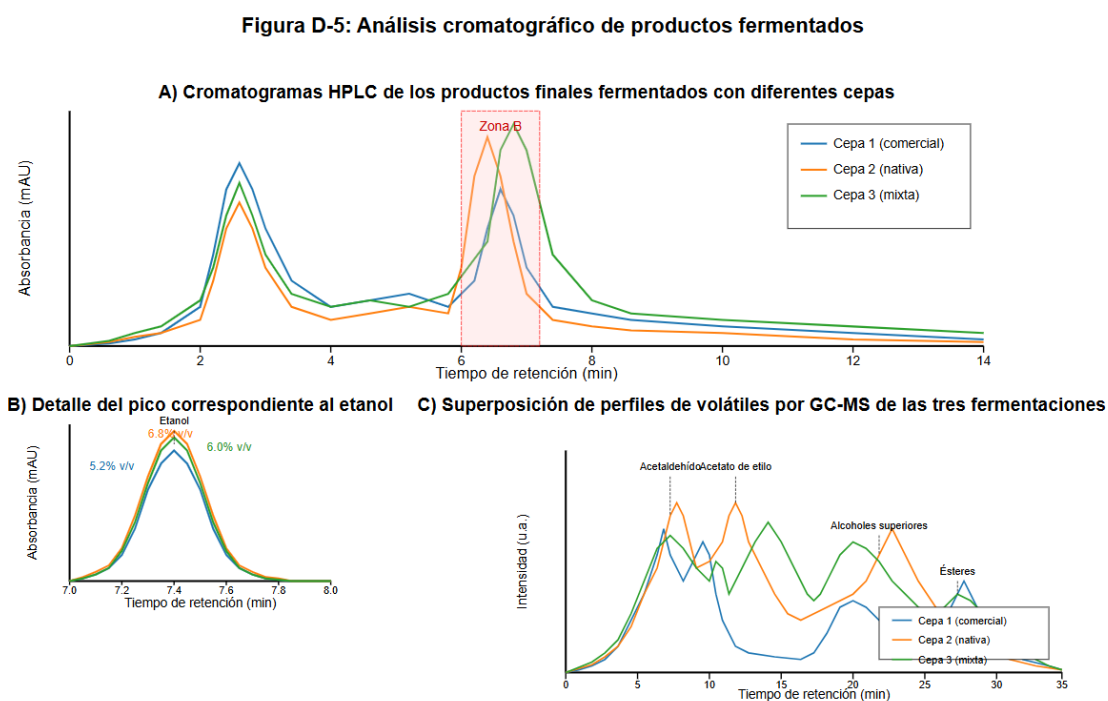


Figura D-5: A) Cromatogramas HPLC de los productos finales fermentados con diferentes cepas; B) Detalle del pico correspondiente al etanol; C) Superposición de perfiles de volátiles por GC-MS de las tres fermentaciones.

Figura D-6: Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Figura D-6: Imágenes SEM de las células de levadura al final de la fermentación. A) *S. cerevisiae* (panadera); B) *S. cerevisiae* (chicha); C) *S. bayanus* (vínica). Magnificación: 5000x.

ANEXO E: FICHAS TÉCNICAS DE EQUIPOS

E-1. Biorreactor Biostat A Plus (Sartorius)

Características técnicas:

- Volumen total: 5 L
- Volumen de trabajo: 0.5 - 3.5 L
- Material: Vidrio borosilicato con tapa de acero inoxidable
- Agitación: 50 - 1200 rpm
- Control de temperatura: 8°C por encima de la refrigeración a 60°C
- Control de pH: 2 - 12
- Control de oxígeno disuelto: 0 - 100%
- Suministro de energía: 230 V / 50-60 Hz

Certificaciones:

- CE
- ISO 9001
- GMP compatible

Software:

- BioPAT® MFCS/DA para adquisición y control de datos
- Almacenamiento en tiempo real
- Exportación a varios formatos (Excel, CSV)

E-2. Cromatógrafo HPLC Agilent 1260 Infinity II

Características técnicas:

- Bomba cuaternaria: Rango de flujo 0.001 - 10 mL/min
- Presión máxima: 600 bar
- Detector UV-Vis de diodos (DAD): Rango 190 - 640 nm
- Detector de índice de refracción (RID): Rango 1.00 - 1.75 RIU

- Automuestreador: Capacidad para 100 viales
- Horno de columna: Rango de temperatura 10°C por encima de ambiente hasta 80°C

Columnas utilizadas:

- Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm) para análisis de azúcares y etanol
- C18 Kinetex (250 × 4.6 mm, 5 µm) para análisis de compuestos fenólicos

Software:

- OpenLAB CDS ChemStation Edition

E-3. Espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific Evolution 201

Características técnicas:

- Rango de longitud de onda: 190 - 1100 nm
- Ancho de banda espectral: 1 nm
- Precisión de longitud de onda: ±0.5 nm
- Rango fotométrico: -3 a +3 A
- Precisión fotométrica: ±0.002 A (a 0.5 A)
- Luz difusa: <0.05% a 340 nm
- Detector: Fotodiodo de silicio

Accesorios:

- Carrusel para 8 cubetas
- Cubetas de cuarzo de 10 mm
- Lámpara de deuterio y tungsteno

Software:

- Thermo Scientific INSIGHT 2 para análisis de datos espectroscópicos

E-4. Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) JEOL JSM-6610LV

Características técnicas:

- Resolución: 3.0 nm (30 kV, WD11mm, SEI)
- Magnificación: 5× a 300,000×
- Voltaje de aceleración: 0.5 a 30 kV
- Filamento: Tungsteno
- Detector: Electrones secundarios y retrodispersados
- Cámara de vacío: Capacidad para muestras hasta 200 mm de diámetro

Procesamiento de muestras:

- Metalizador JEOL JFC-1600
- Recubrimiento con oro-paladio

Software:

- JEOL PC-SEM para adquisición y tratamiento de imágenes

ANEXO F: CERTIFICADOS DE ANÁLISIS

F-1. Certificado de análisis de la cepa *S. cerevisiae* (chicha)

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Producto: Levadura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa de chicha)

Lote: SC-CH-2023-05

Fecha de producción: 12/05/2023

Fecha de vencimiento: 12/05/2024

Análisis microbiológico:

Parámetro	Resultado	Método	Especificación
-----------	-----------	--------	----------------

Viabilidad	3.2×10		
------------	-----------------	--	--



***PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE
RECURSOS ANDINOS: EL CASO DE LA OCA
(*Oxalis tuberosa*)***



Sheila Sierralta Pinedo

William Robert Gordillo Gonzales

Christian David Corrales Otazú

Sarita Jessica Apaza Miranda

ISBN 978-628-97288-1-1