



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILIS TOGA. 1948

Facultad Química – Farmacia
Departamento de Licenciatura en Química

Trabajo de Diploma

*“Cultivo mixto en el desarrollo de la
fermentación para la producción
de alcohol orgánico”*

Autor: Reidy García Hernández

Tutores: M.Sc. Lic. Pedro J. Iturria Quintero

Ing. Nelsy Herrera Coello

Consultante: Dr. Ing. José A. Fabelo Falcón

“Año de la Revolución Energética en Cuba”

Santa Clara

2005 – 2006

El revolucionario verdadero está guiado por grandes sentimientos de amor.



RESUMEN

En este trabajo se realizó un estudio del proceso de obtención de alcohol orgánico, utilizando un cultivo mixto de bacterias lácticas y levaduras para el desarrollo de la fermentación. Se empleó la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y como sustratos la glucosa y la miel final obtenida en el proceso de fabricación de azúcar orgánico del Complejo Azucarero "Carlos Baliño".

Para cumplimentar este estudio se determinó la mejor concentración de inóculo de bacterias lácticas y de extracto de levadura, para lo cual se utilizó un diseño experimental tipo 2^2 , cuyos resultados fueron procesados a través del programa computacional Statgraphic Plus versión 4.1.

Se realizó una comparación de la propagación de las levaduras en monocultivo con la propagación de las levaduras en un medio acidificado con bacterias lácticas, utilizando glucosa como sustrato.

También se llevó a cabo una comparación entre el proceso de obtención de etanol utilizando bacterias lácticas como promotoras de la etapa fermentativa y extracto de levadura como nutriente, con los siguientes procesos:

- Obtención de etanol regulando pH con ácido sulfúrico y empleando sales de amonio.
- Obtención de etanol regulando pH con ácido láctico.

Se desarrolló un estudio del pH y la acidez total a diferentes concentraciones de sólidos solubles en el sustrato, así como una comparación del comportamiento de las bacterias lácticas en presencia de suero lácteo y extracto de levadura como fuentes de nitrógeno.

El estudio incluyó además un análisis de la fermentación alcohólica empleando un cultivo mixto de bacterias lácticas y levaduras.

Palabras claves: alcohol orgánico, bacterias lácticas, levaduras.

ABSTRACT

In this work was carried out a study of the process of obtaining of organic alcohol using a mixed cultivation of lactic bacteria and yeast for the development of fermentation. The yeast stump *Saccharomyces cerevisiae* was used and like substrates glucose and molasses obtained in the process of production of organic sugar of the Sugar Complex "Carlos Baliño."

To execute this study the best concentration it was determined of lactic bacteria and of yeast extract, for that which a design experimental type was used 2^2 whose results were processed through the program computational Statgraphic Plus version 4.1.

It was carried out a comparison of the yeast propagation using only one microorganism with the yeast propagation in a half acidified with lactic bacteria using glucose like substrate.

It was also carried out a comparison among the process of obtaining of ethanol where lactic bacteria are used as promoters of the stage fermentative and yeast extract like nutritious, with the following processes:

- Obtaining of ethanol regulating pH with sulfuric acid and using ammonium salts.
- Obtaining of ethanol regulating pH with lactic acid.

It was developed a study of the pH and the total acidity to different concentrations of soluble solids in the substrate and a comparison of the behavior of the lactic bacteria in presence of milky serum and yeast extract like nitrogen sources.

The study also included an analysis of the alcoholic fermentation using a mixed cultivation of lactic bacteria and yeasts.

Key words: organic alcohol, lactic bacteria, yeasts.

ÍNDICE

Contenido	Pág.
Introducción.....	15
Capítulo I: Revisión Bibliográfica.....	18
1.1. Productos orgánicos.....	18
1.1.1. Definición.....	18
1.1.2. Clasificación.....	18
1.1.3. Importancia.....	19
1.1.3.1. Importancia ecológica.....	19
1.1.3.2. Importancia social.....	19
1.1.3.3. Importancia económica.....	20
1.1.4. Productos orgánicos en Cuba.....	20
1.1.4.1. Agricultura orgánica.....	20
1.1.4.2. Azúcar orgánico.....	22
1.2. Sustratos utilizados en los procesos fermentativos de obtención de alcohol etílico.....	23
1.2.1. Miel final.....	24
1.3. Microorganismos utilizados en la producción de alcohol etílico.....	25
1.3.1. Factores que influyen en el crecimiento de las levaduras.....	26
1.4. Nutrientes utilizados en la producción de alcohol etílico.....	27
1.5. Obtención de alcohol etílico.....	28
1.5.1. Reseña histórica.....	28
1.5.2. Glucólisis.....	29
1.5.3. Vía fermentativa.....	34
1.5.3.1. Descripción de las etapas de obtención de alcohol etílico.....	34
1.5.3.2. Particularidades del proceso de obtención de alcohol orgánico.....	35
1.6. Microbiología de la leche.....	36

1.6.1. Tipos de microorganismos de la leche.....	36
1.6.2. Bacterias lácticas.....	37
1.6.2.1. Ácido láctico.....	37
Capítulo II: Materiales y Métodos.....	40
2.1. Descripción del sistema.....	40
2.2. Parte experimental.....	40
2.2.1. Descripción de las técnicas empleadas.....	46
Capítulo III: Análisis y discusión de los resultados.....	53
3.1. Determinación de la mejor concentración de inóculo de bacterias lácticas y extracto de levadura en glucosa.....	53
3.1.1. Análisis de las variables respuestas.....	54
3.2. Estudio sobre la propagación de la levadura.....	57
3.3. Caracterización de la miel final orgánica.....	60
3.4. Estudio de promotores de la fermentación alcohólica.....	61
3.5. Estudio del pH y la acidez total a diferentes concentraciones del sustrato.....	68
3.6. Estudio comparativo del comportamiento de las bacterias lácticas frente a dos fuentes de nitrógeno diferentes.....	70
3.7. Estudio del cultivo mixto.....	72
Conclusiones.....	77
Recomendaciones.....	79
Bibliografía.....	81
Anexos.....	89

INTRODUCCIÓN

(<http://www.ain.cubaweb.cu/2004/junio>.)

(<http://www.prensa.com/2002,4marzo>.)

(CETA. UCLV., 1997.)

Los productos orgánicos son de gran importancia ya que garantizan la alimentación sana de los seres humanos, frenan la degradación ambiental, contribuyen a la regeneración de las zonas contaminadas, eliminan los problemas causados por los pesticidas y herbicidas, generan empleos, alcanzan elevados precios en el mercado mundial entre otras.

En Cuba, los primeros pasos por desarrollar las producciones orgánicas se han dado en la industria azucarera, donde se han venido llevando a cabo experiencias en la producción de azúcar orgánico. La más avanzada de éstas, se realiza en el Complejo Azucarero Carlos Baliño de Villa Clara, aunque también se han procesado cosechas ecológicas en la Planta Piloto "José Martí" de la Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. De dicho proceso, se obtiene también miel orgánica, una excelente materia prima para la obtención de alcohol orgánico.

A nivel mundial la mayor parte del alcohol etílico que se produce es por vía fermentativa de fuentes azucaradas. En nuestro país se utiliza la miel final del proceso de obtención de azúcar, levadura como microorganismo productor de alcohol, sales de amonio como fuentes de nitrógeno y fósforo y ácido sulfúrico para ajustar pH; pero ¿cuál sería la combinación si en vez de querer producir un alcohol donde se adicionan productos químicos inorgánicos para su obtención, quisiéramos obtener un alcohol con características ecológicas?. Con este fin cambia el proceso, pues este exige la no utilización de productos químicos como las sales de amonio y el ácido sulfúrico antes mencionados. Habría que buscar entonces productos orgánicos que sean capaces de aportar las fuentes de nutrientes, así como regular el pH del medio, por lo que se plantea el siguiente problema científico e hipótesis:

- **Problema científico**

Existe la necesidad, en el proceso de obtención de alcohol orgánico, de encontrar productos no sintéticos, capaces de sustituir las funciones de regular el pH y aportar

los nutrientes necesarios al medio, que cumplen el ácido sulfúrico y las sales de amonio respectivamente, en la obtención del alcohol etílico.

- **Hipótesis de trabajo**

Es posible obtener resultados adecuados en el proceso de obtención de alcohol orgánico, empleando un cultivo mixto entre la especie de bacterias lácticas y la especie de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que aporte los nutrientes necesarios y permita la regulación el pH del medio.

- **Objetivo general**

Establecer criterios de carácter científico - técnico que contribuyan al estudio y desarrollo de la fermentación alcohólica en condiciones orgánicas.

- **Objetivos específicos**

1. Realizar una revisión bibliográfica de los aspectos abordados trabajo.
2. Estudiar el comportamiento del proceso de fermentación alcohólica usando la glucosa como sustrato en condiciones de monocultivo y en un medio acidificado a expensas de las bacterias lácticas.
3. Estudiar diferentes promotores de la fermentación alcohólica en miel final orgánica.
4. Evaluar el suero lácteo como fuente de nitrógeno en el proceso de fermentación alcohólica.
5. Estudiar la etapa de fermentación alcohólica, empleando como promotor de la misma un cultivo mixto de levaduras y bacterias lácticas en miel final orgánica.

- **Novedad científica del trabajo**

1. Crecimiento simultáneo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y las bacterias lácticas.
2. Se garantizan los requerimientos de pH en el medio sin necesidad de la adición de ácido sulfúrico.
3. El proceso se realiza sin la adición de nutrientes inorgánicos.
4. Se reduce el tiempo de fermentación en las diferentes etapas del proceso de obtención de alcohol orgánico.

CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. PRODUCTOS ORGÁNICOS

1.1.1. DEFINICIÓN

(<http://www.agendaorganica.cl>.)

(<http://www.fao.org>.)

(<http://www.alimentación-sana.com.ar>.)

(<http://www.medicinanaturista.com.ar>.)

Organic, en inglés o biologique, en francés, en español, se les denomina biológico, ecológico u orgánico y son sinónimos que se utilizan para designar los productos que cuidan tanto la salud de los consumidores como el equilibrio del medio ambiente en que se producen.

Se consideran orgánicos aquellos productos, donde en ninguna etapa de su producción intervienen fertilizantes, herbicidas, pesticidas químicos u otros compuestos químicos obtenidos por vía sintética así como tampoco en los suelos donde son cultivados.

Es muy difícil lograr producir alimentos que estén totalmente libres de pesticidas, debido a que en los suelos éstos permanecen largos períodos de tiempo en cantidades insignificantes o pueden contaminarse de suelos próximos a ellos. En pocos lugares del mundo se han determinado definiciones específicas para el uso del término orgánico así como tampoco el tiempo de espera que debe pasar desde la última aplicación de químicos en los suelos y el cultivo de un alimento sin ellos.

1.1.2. CLASIFICACIÓN

(<http://www.aedes.com.pe>.)

(<http://www.applusagroalimentario.com>.)

(<http://www.ing.unlp.edu.ar>.)

Los productos orgánicos pueden clasificarse dentro de cuatro categorías:

1. 100 % orgánicos: son aquellos productos sin ingredientes no orgánicos.
2. Orgánicos: para los productos con un 95 % de los ingredientes de tipo orgánico.
3. Hechos con productos orgánicos: para los productos realizados entre un 50 y 95 % con ingredientes orgánicos.

4. Productos con menos del 50 % de los ingredientes orgánicos: se deberá especificar cada ingrediente que sea orgánico.

1.1.3. IMPORTANCIA

1.1.3.1. Importancia ecológica

(<http://www.exporgánica.com.ar>.)

La importancia ecológica de las producciones orgánicas estriba en que evita la contaminación de la tierra, del agua y del aire; preserva y valoriza los recursos naturales como base de las explotaciones agrícolas; protege la fertilidad natural de los suelos a largo plazo; desarrolla métodos de producción respetuosos del ambiente; permite el aumento de la diversidad biológica tanto al nivel de flora como de fauna; mantiene un uso óptimo de los recursos naturales locales y de los recursos naturales renovables; evita la erosión hídrica y eólica, la salinidad y la degradación física y biológica de los suelos; conserva el agua; favorece los ciclos biológicos en el agrosistema y evita la erosión genética.

1.1.3.2. Importancia social

(<http://www.fao.org>.)

Los sistemas de producción orgánica en el mundo se fundamentan en el conocimiento profundo de los ciclos naturales y la biodiversidad de cada localidad por lo cual favorece a los habitantes nativos para su implementación y de esta manera los protege de incursiones transnacionales. Sumado a lo anterior, los sistemas orgánicos requieren de mucha mano de obra, tanto familiar como asalariada y considerando los precios recibidos actualmente por sus productos, esto ayuda a mejorar la calidad de vida en el campo y por lo tanto al arraigo de la población rural. Al reducirse la compra de insumos externos al sistema orgánico, se reduce la transferencia de recursos del campo y por tanto también mejoran los ingresos netos de los productores rurales. Además, con la eliminación de los insumos sintéticos tóxicos se ha reducido el número de accidentes mortales entre los productores y sus trabajadores agrícolas. Por esta misma razón los productores orgánicos disfrutan de un ambiente limpio y armónico donde transcurre su vida y la de sus familias.

1.1.3.3. Importancia económica

(<http://www.comercioactivo.org>.)

Los alimentos orgánicos alcanzan un costo más elevado en el mercado mundial que los alimentos convencionales, lo que está justificado por: la etiqueta de los productos orgánicos refleja de mejor manera el costo verdadero de cultivar los alimentos, sustituir la mano de obra y administración intensiva por químicos, la salud y los costos medioambientales que la sociedad genera. Estos costos incluyen la limpieza de aguas contaminadas y el saneamiento de la contaminación de los pesticidas. Los precios de los alimentos orgánicos incluyen el costo de su cultivo, cosecha, transporte y almacenaje. Cuando se trata de alimentos procesados, también se incluyen los costos de procesamiento y empaquetado. Los alimentos orgánicos deben cumplir normas que rigen todos estos pasos y que son más estrictas que las normas para los alimentos convencionales. La administración y el trabajo intensivos que se llevan a cabo en la producción frecuentemente son más costosos que los químicos usados constantemente en las granjas convencionales.

1.1.4. PRODUCTOS ORGÁNICOS EN CUBA

1.1.4.1. Agricultura orgánica

(<http://www.ain.cubaweb.cu/2004/junio>.)

(<http://www.vinculando.org>.)

(<http://www.ecoportal.net>.)

(<http://www.attra.ncat.org>.)

Al considerar las causas de la crisis de la agricultura industrial y sus efectos, resulta evidente la necesidad de un cambio. Esta necesidad da lugar al surgimiento y desarrollo de un paradigma alternativo que busca resolver los problemas de la producción agraria de una forma sostenible, de modo que se garantice el desarrollo presente y futuro. La agricultura orgánica puede ser una respuesta a esta necesidad.

La agricultura orgánica es un concepto diferente de la actual agricultura industrial. No es una nueva técnica agrícola ni es algo restrictivo o retrógrado, ni es una agricultura tradicional, poco productiva y agotadora de los suelos, por el contrario, es creativa, científica y avanzada y permite la solución de graves problemas ambientales,

sanitarios y sociales, producidos por el desequilibrio que supone la desaparición de la verdadera agricultura y los agricultores.

Cuba no está ajena a este proceso y desde el inicio de los años noventa se redujo la utilización de insumos químicos en grandes áreas, como consecuencia de la falta de recursos ocasionados por la contracción económica ocurrida en el país, al desaparecer los principales mercados. Esto propició la introducción de la agricultura orgánica en varios territorios del país. Otra causa importante para el surgimiento de estas técnicas en el país, fue la búsqueda de sistemas agroecológicos capaces de garantizar una mejor interacción entre el hombre y los recursos naturales ante los límites ambientales que presenta la agricultura convencional.

La agricultura orgánica ha sido desarrollada en Cuba tomando en cuenta los problemas y limitaciones que presenta la tecnología moderna de la agricultura convencional, basada en el monocultivo, el uso intensivo de maquinaria agrícola y el uso de productos químicos.

La agricultura cubana se encuentra en una etapa de sustitución de insumos de conversión horizontal (producción con menos insumos agroquímicos, técnicas para la recuperación de suelos y el manejo integrado de plagas basados en el control biológico, entre otros.), pues aún los resultados obtenidos de forma aislada, no se relacionan bajo una concepción agroecológica del desarrollo agrícola con el objetivo de aprovechar los mecanismos de sinergia.

En Cuba, como en ningún otro país, existen las condiciones sociales favorables para el establecimiento de sistemas de producción orgánica a escala nacional y lograr sistemas agrícolas sostenibles como son:

1. El papel del Estado en el desarrollo económico.
2. Demanda de productos de la agricultura por parte de la población.
3. Suficiente personal calificado y red de centros de investigación vinculada a la actividad agrícola.
4. Experiencia en el trabajo comunitario.
5. Estructuras administrativas y sociales que apoyan la autosuficiencia alimentaria.

-
6. Medios de difusión oficiales que propician campañas favorables en beneficio del pueblo.
 7. Resultados experimentales que se pueden adaptar al nuevo modelo.
 8. Retorno de muchas personas al campo en los últimos años.

Si bien existen condiciones para el fomento de la agricultura orgánica en Cuba, también existen factores generales que limitan su desarrollo, como son:

1. La conciencia del empleo de técnicas agroecológicas aún se apoyan en buena medida en el interés económico - productivista.
2. Los mecanismos de gestión y participación aún no se han desarrollado a fondo, por lo que el interés de producir y conservar el medio ambiente no se despliega como se requiere.
3. Se observa poca ayuda al funcionamiento del mercado actual para motivar demandas agroecológicas.
4. Existe una escasa institucionalización de las ideas y prácticas de la agricultura ecológica que se manifiesta en las comunidades rurales.
5. Indefinición del tiempo de tenencia de la tierra en usufructo gratuito.

Uno de los programas agrícolas cubanos que tiene como base la producción orgánica, es la producción de azúcar orgánico.

1.1.4.2. Azúcar orgánico

(<http://www.revistafuturos.info>.)

Es el azúcar obtenido a partir de caña orgánica, cultivada mediante prácticas de agricultura sostenible, que en su proceso fabril sólo utiliza productos naturales aceptados.

En Cuba se han venido desarrollando experiencias sobre la producción de azúcar orgánica. La más avanzada se realiza en el Complejo Azucarero Carlos Baliño de Villa Clara, además se han realizado cosechas ecológicas en la Planta Piloto José Martí de la Universidad Central de las Villas.

En estos sistemas productivos se utilizan prácticas orgánicas que incluyen el cultivo intercalado o en rotación de soya y otras leguminosas, control de plagas con medios biológicos, uso de biofertilizantes, compost, cachaza, abonos verdes y otras.

De este proceso de obtención de azúcar orgánico se obtiene también miel orgánica, la que puede utilizarse en el proceso de obtención de alcohol.

1.2. SUSTRATOS UTILIZADOS EN LOS PROCESOS FERMENTATIVOS DE OBTENCIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO

(Domínguez, V., 1998.)

(Palacio, H., Almazána y Horii, J. T., 1956.)

(Nikitin, G. A., 1981.)

(Blanco, C. G., 1978.)

(Iturria P. J., 2001.)

(Kretzchmarh, 1992.)

(Celson, A., 1990.)

(Conference on environment and development, 1992.)

Los sustratos son componentes del medio capaz de sustentar el crecimiento de microorganismos o la producción de metabolitos secundarios. La función del medio nutriente es proporcionar los componentes químicos necesarios y en las proporciones adecuadas para que la reacción ocurra, debe asegurar los componentes que garanticen el crecimiento de los microorganismos en todas sus facetas, en la forma más accesible, o sea, en medio líquido. Solo en casos especiales se usan medios con nutrientes sólidos o gaseosos. Además de los componentes esenciales, como fuente de carbono, de energía y nitrógeno, el medio debe contener otros muchos nutrientes que se requieren para la propagación de las células microbianas. El ajuste de la composición del medio y las propiedades físico - químicas ayudan en el mantenimiento de las tasas máximas de producción y la dirección adecuada de un cierto proceso.

Para la producción de alcohol las fuentes de carbono utilizadas como materia prima deben poder ser transformadas con facilidad en azúcar fermentable, almidón o celulosa. Su uso práctico estará determinado por el rendimiento en alcohol, por su costo y el tipo de microorganismo que se utilice.

La utilización de una u otra materia prima varía de un país a otro. Se pueden definir cuatro tipos de materias primas para la producción de etanol:

1. Materiales portadores de azúcares simples (tales como caña de azúcar, melazas, sorgo dulce, etc.) el cual contiene carbohidratos como fuentes de azúcares.
2. Almidones (tales como la yuca, maíz, papa, etc.) los cuales contienen carbohidratos en formas de almidón como fuente de azúcares.
3. Celulosas (tales como la madera, residuos agrícolas, etc.) cuyos carbohidratos se encuentran en formas más complejas.
4. Hidrocarburos gaseosos.

En particular son de interés las materias primas del primer grupo, las cuales son los más fácilmente fermentables y en general basta la acción enzimática asociada al microorganismo para metabolizar el sustrato sin necesidad de tratamientos previos para la degradación de carbohidratos.

La producción de etanol a partir de estos materiales generalmente incluyen tres etapas fundamentales, primero la conversión de carbohidratos en azúcares simples o asimilables por los microorganismos productores de alcohol, después la fermentación de estos azúcares a etanol y finalmente la separación del etanol y otros productos por destilación.

En Cuba se emplea la miel final de caña (miel C) como materia prima fundamental para la producción de alcohol etílico, aunque se han realizado varios estudios donde se utilizan las mieles de blanco directo, miel B, etc.

1.2.1. MIEL FINAL

(Fabelo, J. 1998.)

(Gómez, Y. 1999 – 2000.)

(Correa, Y. 1995.)

Las mieles finales del proceso de fabricación de azúcar son uno de los sustratos más utilizados en los bioprocesos y uno de los más estudiados, estas son siropes viscosos y oscuros. Los componentes principales de la miel son el agua, que se encuentra en su mayor parte como agua libre y otra parte retenida como agua de hidratación y los hidratos de carbono. El azúcar presente en la miel se encuentra fundamentalmente

como sacarosa, glucosa, fructuosa y pequeñas cantidades de manosa en mieles almacenadas. En su composición están presentes los no azúcares orgánicos e inorgánicos, entre los que se pueden citar los compuestos nitrogenados, ácidos, aminoácidos, albúminas, vitaminas, ceras, esteroides, lípidos, sales minerales o cenizas etc.

La miel está constituida también por una fracción de origen mineral de gran importancia en la que se encuentran más de 20 metales y no metales en distintas proporciones.

Las propiedades de las mieles fluctúan de acuerdo con la variedad de planta, la que a su vez cambia en función de la zona, época del año y de las condiciones climáticas. Otros factores que afectan la composición de las mieles están relacionados con el proceso fabril que es el único que puede ser modificado.

1.3. MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN LA PRODUCCION DE ALCOHOL ETÍLICO

(Palacio, H., Almazána y Horii J.T. 1956.)

(Verbina, N. M. 1988.)

(Panchal, C. 1984.)

(Kretzchmarh, 1980.)

(Chithra, N y Baradarajon, A., 1994.)

Uno de los problemas más críticos en la producción de alcohol a escala mundial lo constituye el control de la temperatura en el proceso de fermentación, una solución a esta problemática es la obtención de microorganismos termotolerantes los cuales mantengan sus propiedades fisiológicas a temperaturas considerables.

Las levaduras son los microorganismos más utilizados en la producción de etanol por la vía fermentativa, debido a que producen un mejor proceso de separación después de la fermentación, además producen un contenido de toxinas muy inferior a otros microorganismos. Ahora bien, el tipo de levadura a utilizar industrialmente debe reunir las siguientes condiciones:

1. Ser capaz de fermentar el mosto eficientemente.
2. Producir altas concentraciones de alcohol.

-
3. Tolerar altas concentraciones de alcohol.
 4. Poseer características estables y uniformes.
 5. Mantener su eficiencia a valores de pH alrededor de 4.
 6. Mantener su eficiencia a valores de temperatura alrededor de 35 °C.

Las levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae* son las más frecuentemente usadas, ya sea propagándolas en monocultivo o en combinación con otros microorganismos, es decir, en un cultivo mixto, ejemplo de esto lo constituye el empleo de levadura en conjunto con las bacterias lácticas.

1.3.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO DE LAS LEVADURAS

(<http://www.biologia.edu.ar>.)

- **Oxígeno**

Las levaduras son microorganismos anaerobios facultativos, aunque se ha probado que en escasa proporción son capaces de desarrollarse bajo condiciones anaerobias por completo. En presencia de oxígeno, el crecimiento de la levadura es mucho más vigoroso que en cultivos bajo condiciones en que no es posible el acceso de oxígeno.

- **Temperatura**

La temperatura óptima para la máxima producción de levadura se encuentra a 36 °C. El coeficiente crecimiento (r , gramos de levadura producidos por hora por gramo de levadura presente), a 20 °C es 0.149, a 30 °C será 0.311 y a 36 °C es 0.342, a temperaturas superiores se produce una disminución del factor.

La temperatura determina además la actividad de las distintas enzimas de la levadura, y también en este aspecto las diversas especies reaccionan de forma diferente.

- **Concentración de iones hidrógeno**

El crecimiento y la fermentación de la levadura dependen en alto grado de la reacción del medio nutritivo. El pH óptimo para el crecimiento de la *Saccharomyces cerevisiae* es entre 4,4 – 4,8. En las alcoholeras se trabaja a un pH alrededor de 4,2 para evitar contaminaciones en el medio de microorganismos indeseables.

- **Potencial óxido – reducción**

El rH es la fuerza reductora de hidrogeno gaseoso de una atmósfera de presión, que ha sido activada por un electrodo de platino. rH 42 representa el potencial de un electrodo rodeado por oxígeno puro de una atmósfera de presión. Los rH expresan, por tanto, la relación de hidrógeno y oxígeno de una solución. El punto neutro es 21, correspondiente a un pH igual 7. El margen vital de las levaduras se extiende por lo general desde rH 10 hasta rH 27.5. A ambos lados de esta cifra, el potencial de oxidación – reducción resulta tóxico. La mayoría de los *Saccharomyces cerevisiae* prefieren cifras rH alrededor de 20, sin embargo pueden acostumbrarse a vivir a un valor bajo de potencial oxidación – reducción.

1.4. NUTRIENTES UTILIZADOS EN LA PRODUCCION DE ALCOHOL ETÍLICO

(Iturria P. J., 2001.)

(Abreu, R., 2003 – 2004.)

Un aspecto importante a considerar en la obtención de alcohol para el crecimiento exitoso de la población celular son los nutrientes que se le añadan durante el proceso. En el proceso de producción de etanol por vía tradicional, los nutrientes más utilizados en Cuba son la urea y el sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y el fosfato de amonio como fuente de fósforo. Se prefiere la urea por su menor costo por unidad de nitrógeno.

Para producir alcohol orgánico, los nutrientes añadidos tradicionalmente deben ser sustituidos, con el objetivo de que el proceso cumpla con la condición de producto orgánico. Actualmente se encuentran en estudio los posibles sustitos del los nutrientes tradicionales. Se manejan las posibilidades de emplear extracto de levadura, suero de leche e incluso la acción de las propias bacterias lácticas.

1.5. OBTENCIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO

1.5.1. RESEÑA HISTÓRICA

(Kretzchmarh, 1980.)

(Olguín E. J., Téllez P. y otros, 1988.)

(González, R. A., 1995.)

(Blanco C. G., 1981.)

Las vías de producción de etanol han variado en diferentes épocas. Antes de la segunda guerra mundial se utilizaba la vía fermentativa, la que luego fue desplazada por la vía petroquímica, que consistía en la hidrogenación catalítica del etileno.

Después de la década de los años 70, la producción de etanol adquiere un nuevo giro debido al aumento de su demanda y el encarecimiento de los hidrocarburos, la vía fermentativa vuelve a planos primarios nuevamente.

Como consecuencia de la crisis internacional del petróleo, el etanol pasó a ser visto como un producto de mezcla, o aún como reemplazantes de gasolinas, esto determinó el establecimiento de numerosas plantas de producción de etanol por fermentación microbiológica.

A partir de entonces se inicia la investigación de nuevas fuentes de materias primas, así como la búsqueda de mejoras tecnológicas.

En los países productores de azúcar, los productos intermedios y subproductos del proceso de producción de azúcar resultaron ser las fuentes más promotoras de carbono para la obtención de etanol.

Los países no productores de azúcar, comenzaron a usar cereales como fuente de carbono, analizando conjuntamente varias alternativas, tales como la utilización de los residuos comunales de papel y cartón, previa separación mecánica del resto de los desechos para su hidrólisis enzimática y su posterior conversión a etanol.

1.5.2. GLUCÓLISIS

(Quintero R. R., 1981.)

(Strayer, L., 1982.)

(Lehninger, A., 1979.)

La glucólisis es el proceso de obtención de etanol en el organismo, es catalizada por la acción consecutiva de un grupo de once enzimas. Ocurre en el citoplasma de la célula. Todos los intermediarios de la glucólisis entre la glucosa y el piruvato son compuestos fosforilados, los que proveen cada intermediario de un grupo polar, cargado negativamente que le impide pasar a través de la membrana celular, actúan como grupos enlazantes o de reconocimiento en la formación de los complejos enzima - sustrato y conservan la energía transformándola en un grupo fosfato terminal del trifosfato de adenosina (ATP) en el transcurso de la glucólisis.

Durante la glucólisis ocurren tres tipos diferentes de transformaciones químicas cuyos caminos se hayan interconectados:

1. La secuencia de reacciones, mediante las cuales el esqueleto carbonado de la glucosa se degrada y forma lactato. (Ruta de los átomos de carbono).
2. La secuencia de reacciones mediante las que el fosfato inorgánico se transforma en el grupo fosfato terminal del ATP. (Ruta del fosfato).
3. La secuencia de las óxido - reducciones. (Ruta de los electrones).

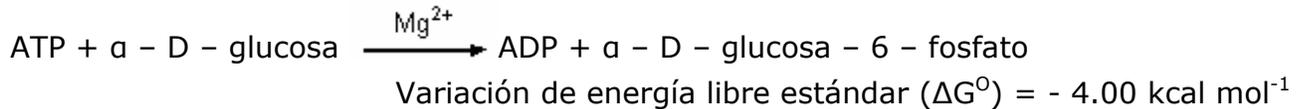
En la glucólisis anaeróbica se distinguen dos etapas fundamentales, las que se describen a continuación:

- **Primera etapa**

En la primera fase la glucosa se prepara para su catabolismo mediante su fosforilación escindiéndose después para formar el gliceraldehído - 3 - fosfato, azúcar de tres átomos de carbono. Esta fase de la glucólisis es la fase preparatoria, en ella se incorporan a la secuencia glucolítica cierto número de hexosas diferentes después de haber sido fosforiladas por el ATP y se convierten en un producto común, el gliceraldehído - 3 - fosfato. En esta fase se consumen dos moléculas de ATP para fosforilar las posiciones uno y seis de la hexosa.

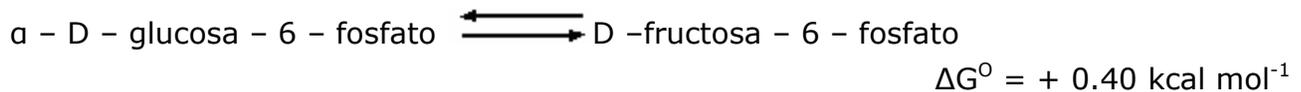
Fosforilación de la D – glucosa por el ATP

La fosforilación de la D – glucosa en la posición seis por el ATP para transformarse en D – glucosa – 6 – fosfato es catalizada por dos tipos de enzimas, la hexoquinasa y la glucoquinasa, que difieren en su especificidad para el azúcar y en su afinidad para la D – glucosa. La hexoquinasa es una enzima alostérica reguladora. La reacción es la siguiente:



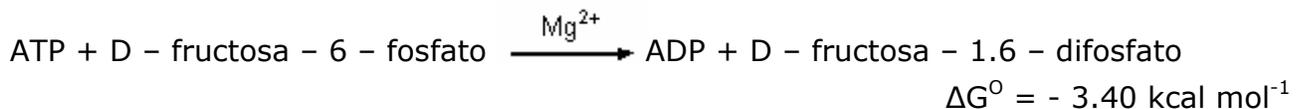
Conversión de la D –glucosa – 6 – fosfato en D –fructosa – 6 – fosfato

La enzima que cataliza la isomerización de la glucosa – 6 – fosfato a fructosa – 6 – fosfato es la glucosa – fosfato – isomerasa, la que es específica para la glucosa – 6 – fosfato y la fructosa – 6 – fosfato. La reacción es la siguiente:



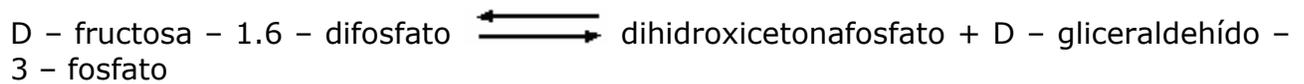
Fosforilación de la D – fructosa – 6 – fosfato a D –fructosa – 1.6 – difosfato

Se necesita el consumo de una segunda molécula de ATP para fosforilar la fructosa – 6 – fosfato en la posición uno, transformándola en fructosa – 1.6 – difosfato en reacción catalizada por la 6 – fosfofructo – quinasa, además es una enzima alostérica reguladora. La reacción es la siguiente:



Escisión de la D – fructosa – 1.6 – difosfato en dihidroxicetonafofosfato y D – gliceraldehído – 3 – fosfato

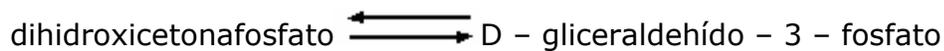
La reacción es catalizada por la enzima fructosa – difosfato – aldolasa. Esta reacción es una condensación aldólica reversible que produce dos fosfatos de triosa diferentes. Cave destacar que aunque la ΔG° es fuertemente positiva en condiciones intracelulares se desplaza fácilmente en el sentido directo. La reacción es la siguiente:



$$\Delta G^{\circ} = + 5.73 \text{ kcal mol}^{-1}$$

Interconversión de los fosfatos de triosa

Solo uno de los dos fosfatos de triosa, el gliceraldehído - 3 - fosfato, puede degradarse directamente en las reacciones de la glucólisis. Sin embargo, el otro, la dihidroxicetonafosfato, se convierte reversiblemente en gliceraldehído - 3 - fosfato por acción de la enzima triosa - fosfato - isomerasa. La reacción es la siguiente:



$$\Delta G^{\circ} = + 1.83 \text{ kcal mol}^{-1}$$

- **Segunda etapa**

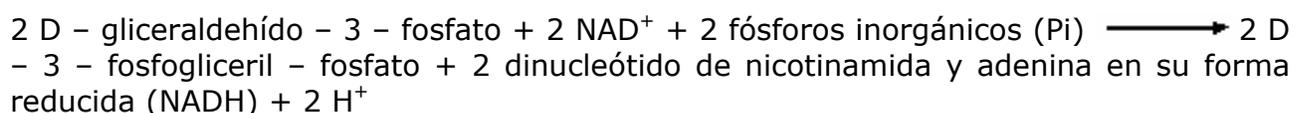
La segunda fase de la glucólisis es la ruta común para todos los azúcares; se producen en ella las etapas de la oxidación - reducción, actuando los mecanismos de conservación de la energía mediante los cuales el difosfato de adenosina (ADP) se fosforila a ATP. En la segunda fase se forman cuatro moléculas de ATP, de modo que el rendimiento neto es de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa degradada a lactato.

Oxidación del D -gliceraldehído - 3 - fosfato a D -3 - fosfogliceril - fosfato

Constituye ésta una de las etapas más importantes de la secuencia glucolítica ya que se conserva la energía de la oxidación del grupo aldehído del gliceraldehído - 3 - fosfato en el producto de su oxidación el 3 - fosfogliceril - fosfato.

El otro componente importante de esta reacción es el dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada (NAD⁺) ya que es el encargado de transportar los electrones desde el gliceraldehído - 3 - fosfato hasta el piruvato.

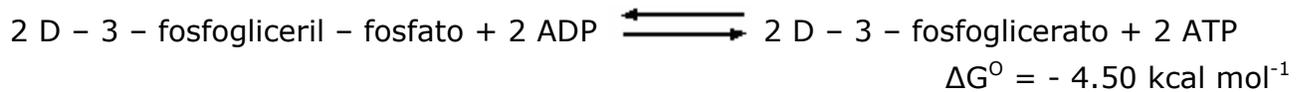
La enzima que cataliza la oxidación del gliceraldehído - 3 - fosfato es la gliceraldehído - fosfato - deshidrogenasa, que es una enzima alostérica reguladora. La reacción es la siguiente:



$$\Delta G^{\circ} = + 1.50 \text{ kcal mol}^{-1}$$

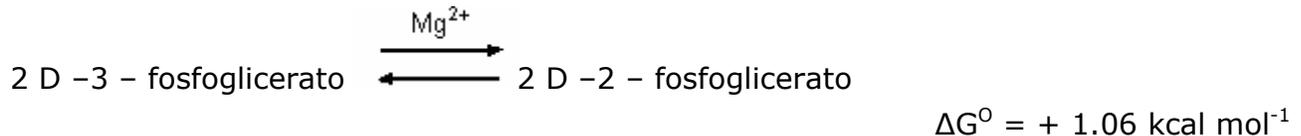
Transferencia de fosfato desde el D – 3 – fosfogliceril – fosfato al ADP

El D – 3 – fosfogliceril – fosfato reacciona enzimáticamente con el ADP con transferencia del grupo acil – fosfato al ADP y formación del D – 3 – fosfoglicerato en reacción catalizada por la enzima fosfoglicerato – quinasa. La reacción es la siguiente:



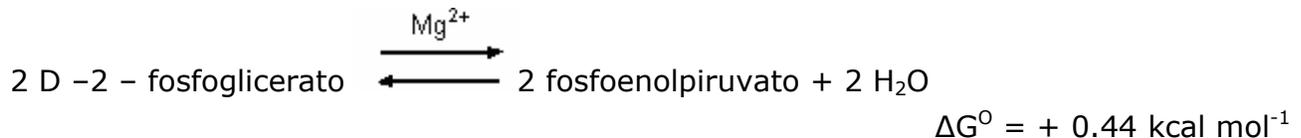
Conversión del D – 3 – fosfoglicerato en D – 2 – fosfoglicerato

Esta reacción comprende la transferencia del grupo fosfato desde la posición tres a la posición dos del ácido glicérico. El magnesio es esencial en esta reacción, la que posee solamente una pequeña ΔG° y es libremente reversible en la célula. La reacción es catalizada por la enzima fosfoglicero – mutasa. La reacción es la siguiente:



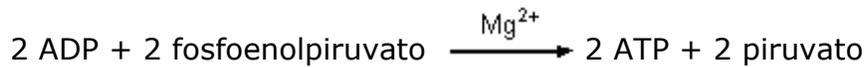
Deshidratación del D – 2 – fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato

La conversión del D – 2 – fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato es la segunda reacción de la secuencia glucolítica en la que se produce un fosfato de alto contenido energético. En la reacción hay eliminación de una molécula de agua de los átomos de carbono dos y tres del D – 2 – fosfoglicerato. A pesar de la relativamente pequeña ΔG° hay una gran variación de energía libre estándar de hidrólisis del grupo fosfato reaccionante y del producto. Este proceso es catalizado por la enzima enolasa. La reacción es la siguiente:



Transferencia de fosfato desde el fosfoenolpiruvato al ATP

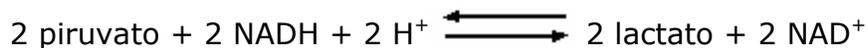
La transferencia del grupo fosfato desde el fosfoenolpiruvato al ATP produce piruvato libre. La reacción es catalizada por la piruvato – quinasa, enzima alostérica reguladora, que es inhibida por altas concentraciones de ATP y se activa en presencia de D – fructosa – 1.6 – difosfato. La reacción es la siguiente:



$$\Delta G^{\circ} = - 7.50 \text{ kcal mol}^{-1}$$

Reducción del piruvato a lactato

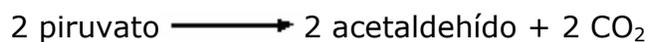
En la última etapa de la glucólisis el piruvato, en condiciones aneróbicas, se reduce a lactato a expensas de los electrones cedidos inicialmente por el 3 - fosfogliceraldehído. Dichos electrones son transferidos por el NADH. La reacción es catalizada por la lactato - deshidrogenasa. La reacción es la siguiente:



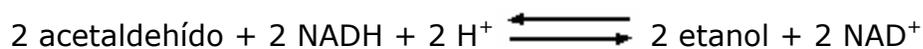
$$\Delta G^{\circ} = - 6.00 \text{ kcal mol}^{-1}$$

En organismos como la levadura de cerveza, que fermenta la glucosa a etanol y dióxido de carbono, en lugar de hacerlo a lactato, la ruta de fermentación es idéntica a la descrita para la glucólisis excepto en la etapa final, catalizada por la enzima lactato - deshidrogenasa, que es sustituida por dos etapas enzimáticas.

En la primera etapa, el piruvato se descarboxila a acetaldehído y dióxido de carbono por medio de la enzima piruvato - descarboxilasa. Esta reacción es irreversible. La reacción es la siguiente:



En la etapa final de la fermentación alcohólica, el acetaldehído se reduce a etanol, el NADH aporta el potencial de reducción y la reacción es catalizada por la enzima alcohol - deshidrogenasa. La reacción es la siguiente:



En las condiciones anaeróbicas, el aporte de energía a las células es muy pequeño comparado con el de la respiración y con las necesidades energéticas de la síntesis lo que implica que en estas condiciones no se produzca el crecimiento celular. La experiencia indica, no obstante, que aún en condiciones anaerobias existe una mínima reproducción celular a expensas y acorde con el pequeño aporte energético recibido por la célula. Este fenómeno es conocido como "Efecto Pasteur".

1.5.3. VÍA FERMENTATIVA

(Iturria P. J., 2001.)

En los países productores de azúcar, como es el caso de Cuba, los productos intermedios y subproductos del proceso de producción de azúcar son las fuentes promotoras de carbono para la obtención de etanol, mediante de la fermentación de las mismas.

1.5.3.1. Descripción de las etapas de obtención de alcohol etílico

(Hernández, T., 1986.)

(Abreu, R., 2003 – 2004.)

- **Preparación de las materias primas**

En esta sección se lleva a cabo la preparación de la materia prima para su uso en la fermentación. Deberá garantizar los tratamientos necesarios para:

1. Llevar los hidratos de carbono a formas fermentables directamente por el microorganismo.
2. Eliminar sustancias perjudiciales que afecten el proceso de fermentación.
3. Disminuir el contenido microbiano hasta el nivel que exige el proceso en uso.

- **Cultivo puro**

Se prepara en el laboratorio utilizando materias primas similares a las del proceso industrial en condiciones de absoluta esterilidad, a veces se evita airear a menos que se pueda garantizar esto estérilmente ya que es muy importante garantizar la pureza del cultivo.

- **Cultivador**

Se utiliza un medio de cultivo que contiene alrededor de 80 g/L del azúcar utilizado en el proceso, además, del resto de sales que complementan el medio para el adecuado crecimiento de la levadura. Aquí la formación de alcohol es escasa y el crecimiento en la práctica se conduce hasta cerca del final de la fase logarítmica, en que se cuenta una población microbiana abundante.

- **Prefermentador**

No se esteriliza el medio y la pureza del cultivo va lograse reduciendo el pH hasta valores de 4,2. En esta etapa la aeración es deficiente y se produce la propagación de la levadura y la formación de alcohol. El prefermentador nos garantiza un cultivo de aceptable pureza microbiológica y cierto grado de adaptación al medio alcohólico.

- **Fermentador**

El cultivo proveniente del prefermentador actuara sobre un medio de aproximadamente 120 g/L de azucares reductores totales (ART) en condiciones anaeróbicas para efectuar la transformación de ésta en alcohol con mínima reproducción celular.

- **Destilador**

Aquí se realiza la operación que tiene como objetivo recuperar el alcohol producido en la fermentación, teniendo en cuenta que estamos en presencia de una mezcla de multicomponentes donde predominan el alcohol etílico (p.e. 78.3 °C) y el agua (p.e. 100 °C).

1.5.3.2. Particularidades del proceso de obtención de alcohol orgánico

(Abreu, R., 2003 – 2004.)

Para la obtención del alcohol orgánico se sigue un procedimiento similar al expuesto anteriormente, con la diferencia de que en el cultivador no se adicionan las sales comúnmente empleadas como nutrientes y además es necesario desarrollar una etapa adicional, la inoculación, la que constituye la etapa inicial de este proceso y en la cual se prepara el cultivo mixto de bacterias lácticas y levadura.

Un medio adecuado para desarrollar las bacterias lácticas lo constituye la leche, de la cual se abordan algunos aspectos a continuación.

1.6. MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE

(Frazier W. C., 1966.)

(Pelczar, M. J. y Reid, R. D., 1966.)

(<http://www.mundohelado.com>.)

La leche es un excelente medio de cultivo para numerosos microorganismos por su elevado contenido en agua, su pH casi neutro y su riqueza en alimentos microbianos. Posee una gran cantidad de alimentos energéticos en forma de azúcares (lactosa), grasa y citrato, y compuestos nitrogenados. Los alimentos nitrogenados se hallan en numerosas formas: proteínas, aminoácidos, amoníaco, urea, etc. Por poseer azúcares fermentescibles, en condiciones ordinarias lo que más frecuentemente ocurre es una fermentación ácida a cargo de las bacterias; si no existen gérmenes formadores de ácido o si las condiciones son desfavorables para su actividad, pueden sufrir otros tipos de alteración.

1.6.1. TIPOS DE MICROORGANISMOS DE LA LECHE

(Frazier W. C., 1966.)

(Pelczar, M. J. y Reid, R. D., 1966.)

(Jorgensen – Hausen, 1979.)

Como consecuencia de los muchos focos de contaminación a que está sometida la leche, la magnitud y tipos de microorganismos que se encuentran en ella varían según la intensidad y naturaleza de dicha contaminación. Pueden encontrarse clases muy diferentes de organismos en relación con las circunstancias que intervienen en la obtención de cada leche en particular.

- **Tipos bioquímicos**

La leche contiene hidratos de carbono, proteínas y grasas, sustratos todos susceptibles de degradación por alguna especie de microorganismo.

Una de las transformaciones químicas que llevan a cabo los microorganismos de la leche, que se consideran como fermentaciones, es la producción de ácido.

Una de las vías de producción de ácido son los lactobacilos. Estos constituyen un grupo bacteriano de formas bacilares, por lo común largas y delgadas y algunas veces plomórficas, gram – positivas, no móviles y no esporuladas. Fermentan los hidratos de

carbono produciendo ácido láctico. Están muy difundidas en la naturaleza, encontrándose en los forrajes, ensilados, estiércol, leche y productos lácteos. Bioquímicamente pueden clasificarse en especies homo y heterofermentativa; el principal producto final de la degradación del hidrato de carbono por los tipos heterofermentativos es el ácido láctico en notables cantidades.

1.6.2. BACTERIAS LÁCTICAS

(Salminen, S. y Wright, A. V., 1993.)

Las bacterias lácticas transforman la lactosa de la leche en ácido láctico, el que modifica la estructura de las proteínas de la leche (cuajan). De esta manera se modifica la textura del producto, aunque existen otras variables, como la temperatura y la composición de la leche, que influyen en las cualidades de los distintos productos resultantes. El ácido láctico le confiere a la leche fermentada ese sabor ligeramente acidulado, y otros derivados de la fermentación producen a menudo otros sabores o aromas.

En la fabricación de alcohol se acidifica una pequeña cantidad de macerado a 50 °C hasta un 1% de ácido láctico, aproximadamente; entonces se esteriliza a 70 °C, se refrigera y se mezcla con levadura a 18 °C. Cuando fermenta este premacerado, se añade al macerado principal, que con ello se acidifica. En ocasiones se prescinde de la esterilización a 70 °C, con lo cual las bacterias vivas pasan al macerado principal.

Las lactobacterias transforman una parte de las proteínas en combinaciones nitrogenadas solubles, que la levadura puede asimilar con facilidad. Es natural que también aquí juegue un papel de desdoblamiento de la fitina. Esta función es tan valiosa que no se llega a tener en cuenta la esterilización del macerado.

1.6.2.1. Ácido láctico

(Química Analítica Aplicada, 1982.)

El ácido láctico es un compuesto de fórmula $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$. En su estado natural es una mezcla óptimamente inactiva compuesta por partes iguales de ambas formas D y L, conocida como mezcla racémica. El ácido láctico es un líquido viscoso y no volátil, inodoro, incoloro o ligeramente amarillento, soluble en todas porciones en el agua, éter, insoluble en benzol o cloroformo su masa molecular es de 90,08. El ácido puro contiene de ordinario de un 85 - 90% de ácido real siendo el resto de agua. Las

habituales impurezas del ácido láctico son ácidos, sales minerales, ácidos orgánicos (acético, butírico, tartárico, cítrico), azúcares, glicerina, etc.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA

El estudio realizado en este trabajo se efectuó a nivel de laboratorio, con una diferencia en relación con el proceso industrial, el hecho de que en una parte de los experimentos se utilizó glucosa, empleada como patrón, normalmente se utiliza la miel final orgánica, aunque esta también fue empleada.

A pesar de lo anteriormente planteado, el régimen operacional utilizado cumple con las condiciones industriales para un proceso orgánico.

Las demás condiciones fueron similares al proceso industrial orgánico.

2.2. PARTE EXPERIMENTAL

Durante el trabajo experimental se realizaron varios estudios, procediéndose en el siguiente orden:

1. Determinación de la mejor concentración de inóculo de bacterias lácticas y de extracto de levadura en glucosa.
2. Estudio de la propagación de las levaduras en un medio acidificado con bacterias lácticas, empleando extracto de levadura como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono.
3. Estudio de la propagación de las levaduras en monocultivo empleando extracto de levadura como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono.
4. Estudio de diferentes promotores de la fermentación alcohólica en miel final orgánica.
5. Estudio del pH y la acidez total a diferentes concentraciones de sólidos solubles en el sustrato.
6. Estudio comparativo del comportamiento de las bacterias lácticas frente a dos fuentes de nitrógeno diferentes.
7. Estudio de la fermentación alcohólica empleando un cultivo mixto de levaduras y bacterias lácticas en miel final orgánica.

A continuación se describe en detalles cada una de las fases anteriores:

1. Determinación de la mejor concentración de inóculo de bacterias lácticas y de extracto de levadura en glucosa

El inóculo de bacterias lácticas, el yogurt y el sustrato, la glucosa, fueron preparados previamente. Después al sustrato se le añadió extracto de levadura a razón de 1.0% o 0.5% según el experimento en estudio y fue sometido a un proceso de esterilización. Posteriormente se le añadió el inóculo a razón de 1.0% o 0.5% y se procedió con la medición de los parámetros: pH y acidez total. Se garantizaron las condiciones experimentales:

c (glucosa) \approx 30 g/L ART

Temperatura = 38 °C

Se le dio especial seguimiento al pH ya que se tomó como culminación del experimento la permanencia constante de este parámetro. En esta etapa se empleó un diseño experimental 2^2 , el cual se describe a continuación:

- **Diseño experimental (2^2)**

Tabla 1.1: Variables y niveles del diseño experimental.

Variables	Niveles
Inóculo (X_1)	0.5 – 1.0%
Extracto de levadura (X_2)	0.5 – 1.0%

Funciones respuesta

pH (Y_1)

Acidez total (Y_2)

Tabla 1.2: Matriz del diseño experimental.

Experimento	X_1	X_2
1	-	+
2	+	-
3	-	-
4	+	+

Procesamiento de la información

El diseño experimental empleado está representado por el polinomio:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

A través de dicho polinomio se puede obtener la superficie de respuesta de cada determinación en dependencia de la variación de la composición. Las determinaciones o respuestas que se estudiaron fueron: pH y acidez total. Para su procesamiento, se evaluó la disminución del pH y el incremento de la acidez total.

Todo este procedimiento fue llevado a cabo a través del programa computacional Statgraphic Plus versión 4.1.

2. Estudio de la propagación de las levaduras en un medio acidificado con bacterias lácticas, empleando extracto de levadura como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono

Después de que permaneciera constante el pH en la primera etapa, se procedió a inocular la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Este experimento se desarrolló en zaranda y se le controlaron los siguientes parámetros: pH, acidez total, ART, Brix, conteo celular de levaduras y biomasa. Se garantizaron las condiciones experimentales:

c (glucosa) \approx 30 g/L ART

c (levadura) = 5.0 g/L

Temperatura = 34 °C

Se tomó como conclusión de este estudio la permanencia constante del pH.

3. Estudio de la propagación de las levaduras en monocultivo, empleando extracto de levadura como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono

El sustrato, glucosa, fue preparado de forma previa, después se le añadió el extracto de levadura según correspondiera, concentración máxima (1.0%) o mínima (0.5%) según el experimento bajo estudio, se reguló el pH hasta 4.2 con ácido sulfúrico y se esterilizó esta solución. Posteriormente se le añadió la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Este experimento se desarrolló en zaranda y se le controlaron los siguientes parámetros: pH, acidez total, ART, Brix, conteo celular de levaduras y biomasa. Se garantizaron las condiciones experimentales:

c (glucosa) \approx 30 g/L de ART

c (levadura) = 5.0 g/L

Temperatura = 34 °C

Se le dio especial seguimiento al pH ya que se tomó como culminación de este estudio la permanencia constante de este parámetro.

4. Estudio de diferentes promotores de la fermentación alcohólica en miel final orgánica

Este estudio contiene una comparación de la fermentación utilizando ácido sulfúrico para regular pH y sales de amonio como nutrientes y la fermentación regulando pH con ácido láctico con la fermentación usando bacterias lácticas como promotoras de dicha etapa y extracto de levadura como nutriente. Se utilizó miel clarificada.

Fermentación utilizando ácido sulfúrico para regular pH y sales de amonio como nutrientes

El sustrato, miel final orgánica, empleado en cada una de las etapas: propagación, prefermentación y fermentación fue preparado de forma previa y esterilizado. Posteriormente al sustrato de la propagación se le reguló el pH con ácido sulfúrico y se le añadieron las sales de amonio y la levadura, dando así inicio a esta etapa. Después que el Brix inicial disminuyera hasta el 60%, con una relación de volumen 1/5, se añadió sulfato de amonio y comenzó la etapa de prefermentación, la que culminó con la misma condición de la etapa dando paso, con una relación de volumen 1/10 a la etapa de fermentación, la que concluyó cuando el Brix se mantuviera constante. Se garantizaron las condiciones experimentales:

c (miel final, propagación) \approx 30 g/L ART

c (miel final, prefermentación) \approx 60 g/L ART

c (miel final, fermentación) \approx 110 g/L ART

c [$\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, propagación] = 7.7 g/L

c [$\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, prefermentación] = 5.75 g/L

c [$\text{NH}_4(\text{PO}_4)_3$, prefermentación] = 1.5 g/L

c (levadura) = 5 g/L

Temperatura = 34 °C

En este experimento las concentraciones de sulfato de amonio $[\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2]$ empleadas son elevadas, lo que se explica por el hecho de que al no adicionar urea, se busca compensar así la concentración de nitrógeno que aporta la misma.

Fermentación regulando pH con ácido láctico

El sustrato, miel final orgánica, empleado en cada una de las etapas fue preparado de forma previa y esterilizado. Posteriormente al sustrato de la propagación se le reguló el pH con ácido láctico y se le añadió extracto de levadura a razón de 0.5% y levadura. Después de añadida la levadura se procedió de manera similar que en la fermentación por vía tradicional a excepción de que en la prefermentación no se añadió sulfato de amonio. Se garantizaron las condiciones experimentales:

c (miel final, propagación) \approx 30 g/L ART

c (miel final, prefermentación) \approx 60 g/L ART

c (miel final, fermentación) \approx 110 g/L ART

c (levadura) = 5 g/L

Temperatura = 34 °C

Fermentación empleando bacterias lácticas como promotoras de dicha etapa y extracto de levadura como nutriente

El sustrato, miel final orgánica acidificada, empleado en cada una de las etapas, así como el inóculo de bacterias lácticas, yogurt, fueron preparados de forma previa. Para preparar la miel ácida, se añadió extracto de levadura a razón de 0.5% y se esterilizó el medio, posteriormente se inoculó con bacterias lácticas a razón de 1.0%. Después se adicionó levadura dando así inicio a la propagación. Después de añadida la levadura se procedió de igual manera que en la fermentación donde se reguló pH con ácido láctico. Se garantizaron las condiciones experimentales:

c (miel final ácida, propagación) \approx 30 g/L ART

c (miel final ácida, prefermentación) \approx 60 g/L ART

c (miel final ácida, fermentación) \approx 110 g/L ART

c (levadura) = 5 g/L

Temperatura = 34 °C

5. Estudio del pH y la acidez total a diferentes concentraciones de sólidos solubles en el sustrato

La miel final orgánica, fue preparada de forma previa, según los diferentes Brix de trabajo seleccionados y se añadió extracto de levadura a razón de 0.5% y fue esterilizado. Después se inoculo con bacterias lácticas a razón de 1.0% y a partir de este instante se comenzó a medir el pH y la acidez total del medio. El estudio se realizó con miel clarificada.

6. Estudio comparativo del comportamiento de las bacterias lácticas frente a dos fuentes de nitrógeno diferentes

El inculo de bacterias lácticas y el sustrato, miel final orgánica, fueron preparados previamente, a este último se le añadió extracto de levadura a razón de 0.5% o suero lácteo a razón de 0.6%, según el experimento bajo estudio y fue sometido a esterilización. Después se inoculó cada variante con bacterias lácticas a razón de 1.0% y se procedió al control de los parámetros pH y acidez total del medio. El estudio se realizó con miel clarificada.

7. Estudio de la fermentación alcohólica empleando un cultivo mixto de levadura y bacterias lácticas en miel final orgánica

En este experimento se trabajó con miel clarificada. El inculo de bacterias lácticas y el sustrato empleado en cada una de las etapas, miel final orgánica, fueron preparados previamente y estos últimos esterilizados además. Posteriormente el sustrato fue inoculado con bacterias lácticas a razón de 1.0% y se adicionó levadura *Saccharomyces cerevisiae*, dando así inicio a la etapa de inculación. Después que el Brix inicial disminuyera hasta el 60%, con una relación de volumen 1/5, se adicionó nuevamente levadura iniciándose así la propagación, la que culminó igualmente con la disminución del Brix hasta el 60%. Con una relación de volumen 1/5, comenzó entonces la prefermentación, la que culminó con la misma condición que las etapas que la precedieron dando paso a la etapa fermentativa con una relación de volumen 1/10, esta culminó cuando el Brix se mantuviera constante. Se garantizaron las condiciones experimentales:

c (miel final, propagación) \approx 30 g/L ART

c (miel final, prefermentación) \approx 60 g/L ART

c (miel final, fermentación) \approx 110 g/L ART

c (levadura, inoculación) = 6.2 g/L

c (levadura, propagación) = 5 g/L

Temperatura = 34 °C

En este experimento la adición de levadura a razón de 6.2 g/L en la etapa de inoculación, se realiza para compensar el mismo contenido de nitrógeno que logra cuando se añade extracto de levadura.

2.2.1. DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS

- **Clarificación de la miel**

(Almazán, O., Klibansky, M. y Otero, M. A., 1982.)

Fundamento del método

La clarificación es una operación necesaria para librar a la miel de una serie de sustancias que, de lo contrario, se separarían durante la fermentación precipitándose sobre las células de la levadura, recubriendo su superficie y fomentando el peligro de infección. En el proceso de clarificación los precipitados que se forman eliminan al mismo tiempo las bacterias.

- **Determinación del pH**

(Manual Analítico para el Control Unificado, 1986.)

(Handbook de análisis de agua, 2002.)

Fundamento del método

La determinación de pH es una prueba empírica que permite medir la actividad de los iones hidrógeno (H^+) en una solución, y se define como $-\log [H^+]$

Expresión de los resultados

La lectura anotada es el valor del pH de la muestra.

- **Determinación del Brix**

(Manual Analítico para el Control Unificado, 1986.)

Fundamento del método

Al atravesar un rayo de luz dos medios diferentes, el primero experimenta una variación en su trayectoria en un cierto ángulo, llamándosele a esta desviación refracción.

El índice de refracción varía con la temperatura, con la longitud de onda y con la concentración de sólidos solubles presentes.

Expresión de los resultados

A la lectura anotada se le realiza la corrección de acuerdo con la temperatura de la muestra a través del auxilio de las tablas correspondientes.

Dicho valor corresponde al Brix de la muestra, expresado en grados.

Ver anexo No. 1

- **Determinación de la cantidad de células**

(Manual Analítico para el Control Unificado, 1986.)

Fundamento del método

Esta técnica se establece para la determinación cuantitativa de las células de la levadura presentes en el inóculo y en el cultivo en desarrollo.

Está basado en el conteo de la cantidad de células por unidad de volumen presentes en una muestra, previamente diluida, al observarla al microscopio.

Expresión de los resultados

$$Y = A * d * 5 * 10^4 \quad [\text{Células/mL}]$$

Donde:

Y número de células por unidad de volumen

A número total de células

d dilución

- **Determinación de los azúcares reductores totales (Método colorimétrico)**

(Herrera, A. y Quintana, M. 1989.)

Fundamento del método

Este se basa en la relación lineal que existe entre la absorbancia y la concentración según la ley de Lambert - Beer, siendo la absorbancia medida proporcional a la concentración de azúcares reductores presentes en la muestra. La lectura de la absorbancia se hizo en un espectrofotocolorímetro a 240 nm.

Expresión de los resultados

Previamente se construyó la curva de calibración de azúcares reductores, la cual se obtuvo como resultado de la preparación de disoluciones de glucosa y con sus correspondientes valores de absorbancia medidos. Utilizando el tabulador Excel se determinó la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación de la misma.

Ver anexo No. 2 y No.3

$$ART = A * d * \xi \quad [\text{g/L}]$$

Donde:

ART azúcares reductores totales

A absorbancia

d dilución

ξ pendiente de la recta de la curva de calibración

- **Determinación de los azúcares reductores totales (Modificación ICIDCA)**

(Manual Analítico para el Control Unificado, 1996.)

Fundamento del método

Está basado en la inversión de los azúcares presentes en la miel final y su posterior reacción con el Cu^{2+} en medio alcalino.

Expresión de los resultados

(Miel fermentada)

$$ART = (V_1 - V_2) * 0.002 * \frac{100}{a} * \frac{1000}{b} \quad [\text{g/L}]$$

Donde:

ART azúcares reductores totales

V_1 mL consumidos de la solución patrón de azúcar invertido en la valoración del blanco.

V_2 mL consumidos de la solución patrón de azúcar invertido en la valoración de la muestra problema.

a mL de muestra tomados para el análisis.

b mL de muestra invertidos.

(Miel final)

$$ART = (V_1 - V_2) * 0.006 * \frac{250}{a} * \frac{100}{b} \quad [\text{g/L}]$$

Donde:

V_1 , V_2 y b idénticos a las variables para miel fermentada.

a masa en gramos de la muestra.

- **Determinación de la biomasa**

(Herrera, A. y Quintana, M. 1989.)

Fundamento del método

Se basa en la determinación del peso seco de una alícuota del cultivo del fermento.

Expresión de los resultados

Se pesa en una balanza analítica, hasta la cuarta cifra decimal.

$$B = \frac{Ps/Pi * 1000}{m} \quad [\text{g}]$$

Donde:

B biomasa

Ps peso seco

Pi peso inicial

m masa real tomada para el análisis (en mL ya que la muestra es líquida)

1000 factor que nos permite referir "m" litros.

- **Determinación de la acidez total**

(Herrera, A. y Quintana, M. 1989.)

Fundamento del método

Se basa en la determinación de la cantidad de ácido total presente en la muestra y expresados como ácido acético (CH₃COOH) mediante valoración potenciométrica de neutralización.

Expresión de los resultados

$$AcidezTotal = \frac{Vg}{10mL}$$

Donde:

Vg Volumen gastado por la solución de hidróxido de sodio 0.1 N

- **Determinación del grado alcohólico (método picnométrico)**

(Garde, J. A., Mateo, F. J. y Baztán, U. 1997.)

Fundamento del método

La destilación es la operación que se realiza para separar una mezcla de dos líquidos miscibles, o una disolución de sólido en líquido. Consiste en el calentamiento a ebullición de la mezcla y la posterior condensación de los vapores formados. El líquido que se obtiene en la condensación será más rico en el componente más volátil que el líquido que permanece en el matraz.

Si destilamos una muestra de fermento se puede observar, como mínimo, la aparición de dos fracciones; alcohólica la primera, ya que el etanol tiene un punto de ebullición de 78 °C; acuosa la segunda, que permanece en el matraz. Esta separación no es nunca perfecta, y siempre se obtiene una mezcla de ambas. Se obtienen mejores resultados, realizando el fraccionamiento (separación de sustancias) con la destilación fraccionada o rectificación.

Expresión de los resultados

$$Pd = \frac{Pdp}{Pap}$$

Donde:

Pd peso del destilado

Pdp peso del destilado en el picnómetro

Pap peso del agua en el picnómetro

Leemos en la tabla el porcentaje en volumen de alcohol en el destilado correspondiente a su peso específico. Este es el grado de alcohol de la muestra.

Ver anexo No.4

CAPÍTULO III: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1. DETERMINACIÓN DE LA MEJOR CONCENTRACIÓN DE INOCULO DE BACTERIAS LÁCTICAS Y EXTRACTO DE LEVADURA EN GLUCOSA

Se realizó un diseño experimento con el objetivo de determinar la mejor concentración de inculo de bacterias lácticas y de extracto de levadura, para su posterior uso en la etapa de propagación del proceso de obtención de alcohol orgánico. Los resultados se muestran en la tabla 3.1.

Tabla 3.1: Datos del diseño de experimento.

Exp.		Variables		Variables respuesta			
				Original		Réplica	
		Inoculo [%]	Extracto de Levadura [%]	pH	Acidez Total	pH	Acidez Total
1	Inicio	0.5	1.0	5.28	0.05	5.26	0.05
	Final			4.09	0.16	4.04	0.16
	Δ			1.19	0.11	1.22	0.11
2	Inicio	1.0	0.5	4.78	0.1	4.74	0.09
	Final			3.85	0.18	3.76	0.19
	Δ			0.93	0.08	0.98	0.1
3	Inicio	0.5	0.5	4.83	0.07	4.82	0.07
	Final			3.91	0.12	3.95	0.11
	Δ			0.92	0.05	0.87	0.04
4	Inicio	1.0	1.0	5.2	0.06	5.08	0.07
	Final			3.78	0.28	3.68	0.29
	Δ			1.42	0.22	1.4	0.22

Los datos obtenidos durante el desarrollo de este estudio fueron procesados en el programa computacional Statgraphic Plus versión 4.1, analizándose los siguientes parámetros: disminución del pH e incremento de la acidez total, indicados como delta (Δ) y referidos en la tabla 3.1.

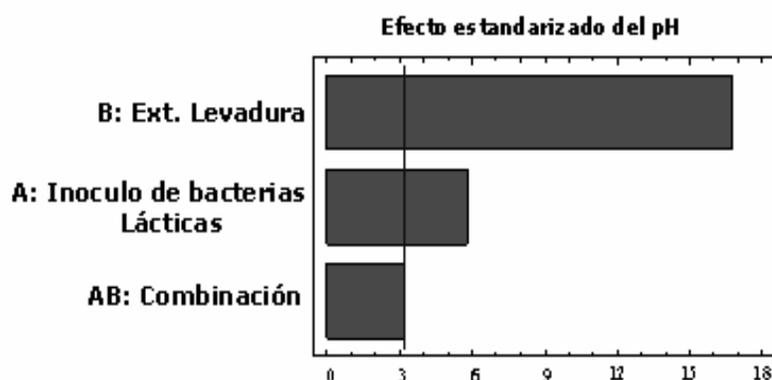
A través de este programa se obtuvieron además los modelos y gráficos correspondientes a cada variable, los cuales se muestran en los anexos.

3.1.1. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES RESPUESTAS

- **pH**

El comportamiento de esta variable se ilustra en la gráfica 3.1.

Gráfica 3.1



En la gráfica 3.1 la longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, que es el efecto estimado dividido por su error normal, lo que es equivalente a computar una t-estadística para cada efecto. La línea vertical se usa para juzgar qué efectos son estadísticamente significativos. En este caso, dos efectos son significativos, el extracto de levadura y el inoculo de bacterias lácticas.

Modelo obtenido

Regression coeffs. for pH

```
-----
constant      = 0.67
A:Inoculo     = -0.17
B:Ext. Levad. = 0.33
AB            = 0.58
-----
```

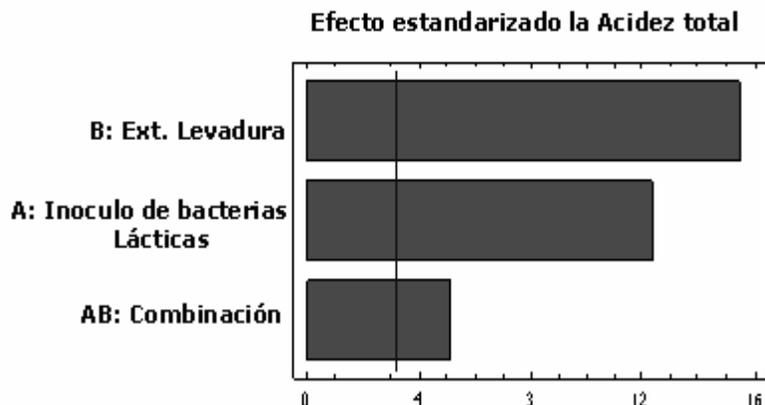
pH = 0.67 - 0.17*Inoculo + 0.33*Ext. Levad. + 0.58*Inoculo*Ext. Levad.

El resto de la información estadística se muestra en el anexo No.5.

- **Acidez total**

El comportamiento de esta variable se ilustra en la gráfica 3.2.

Gráfica 3.2



Para explicar la gráfica 3.2 nos podemos auxiliar en la gráfica 3.1, ya que en ambas se procede de igual manera para procesar los datos, solo que en la analizada la variable estudiada es la acidez total. En este caso, los tres efectos son significativos, el extracto de levadura y el inoculo de bacterias lácticas y la combinación de estos.

Modelo obtenido

```

Regression coeffs. for Ac. Tot.
-----
constant      = 0.0
A: Inoculo    = -0.04
B: Ext. Levad. = 0.0
AB            = 0.26
-----
Ac. Tot. = 0.0 - 0.04*Inoculo + 0.0*Ext. Levad. + 0.26*Inoculo*Ext.
Levad.
    
```

El resto de la información estadística se muestra en el anexo No.6.

Los resultados obtenidos anteriormente son de gran importancia ya que permiten establecer criterios acerca de las concentraciones más adecuadas de los parámetros inoculo de bacterias lácticas y extracto de levadura para su empleo en la etapa de propagación del proceso de obtención de alcohol, utilizando como sustrato la glucosa, en la cual no se encuentran presentes la mayor parte de las sustancias contenidas en la miel final, evitándose posibles interferencias de estas sobre los microorganismos presentes. Además se puede comprobar el desarrollo de las bacterias lácticas en ese medio y trasladar estos resultados a la miel final orgánica.

Destaca en este estudio la influencia determinante del extracto de levadura, la cual tiene mayor incidencia en cada una de las variables respuestas analizadas (pH y acidez total). Además se logran alcanzar los mejores resultados cuando se emplean las concentraciones máximas (1.0%) de inóculo de bacterias lácticas y extracto de levadura aunque las demás combinaciones no se deben descartar, pues en todas los niveles de acidez total del medio alcanzados fueron significativos y como consecuencia las disminuciones del pH fueron hasta valores inferiores a 4.09, muy adecuados para el desarrollo de los procesos fermentativos de producción de alcohol.

3.2. ESTUDIO DE LA PROPAGACIÓN DE LA LEVADURA

El estudio de la propagación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en monocultivo, así como en un medio acidificado con bacterias lácticas, empleando extracto de levadura como fuente de nitrógeno en ambos casos, se realiza con el objetivo de determinar la influencia de la miel acidificada con las bacterias lácticas en el desarrollo de las levaduras. Los resultados se muestran en las tablas 3.2 y 3.3.

Tabla 3.2: Datos experimentales de la propagación de levadura en un medio acidificado con bacterias lácticas empleando extracto de levadura como fuente de nitrógeno y como sustrato glucosa.

Exp.		Variables		Parámetros (valores medios)					
		Inoculo [%]	Extracto de Levadura [%]	pH	Acidez Total	ART [g/L]	Biomasa [g]	Brix [°]	Conteo celular [células/mL]
1	inicio	0.5	1.0	3.865	0.44	28.48	5.945	6.7	92*10 ⁶
	final			3.635	0.46	1.045	7.791	2.4	139*10 ⁶
2	inicio	1.0	0.5	3.59	0.27	30.64	5.495	5.4	5010 ⁶
	final			3.33	0.355	0.9	7.742	1.65	13510 ⁶
3	inicio	0.5	0.5	3.755	0.22	30.75	4.644	5.4	76*10 ⁶
	final			3.425	0.32	0.835	7.791	1.8	117*10 ⁶
4	inicio	1.0	1.0	3.585	0.46	30.57	6.894	6.5	78*10 ⁶
	final			3.41	0.495	1.375	8.494	2.2	180*10 ⁶

Tabla 3.3: Datos experimentales de la propagación de levadura empleando extracto de levadura como fuente de nitrógeno y como sustrato glucosa.

Exp.		Variable	Parámetros (valores medios)					
		Extracto de Levadura [%]	pH	Acidez Total	ART [g/L]	Biomasa [g]	Brix [°]	Conteo celular [células/mL]
1	inicio	0.5	3.815	0.21	29.87	5.782	5.15	$95 \cdot 10^6$
	final		3.26	0.29	0.375	8.265	1.5	$106 \cdot 10^6$
2	inicio	1.0	3.955	0.26	30.05	4.742	5.9	$91 \cdot 10^6$
	final		3.46	0.29	0.615	8.048	2.1	$127 \cdot 10^6$

Realizando un análisis comparativo entre la propagación de las levaduras en monocultivo y en un medio acidificado con bacterias lácticas, se puede afirmar que el parámetro ART, que constituye, junto con la producción de biomasa uno de los más importantes en el estudio de las levaduras, experimentó un mayor disminución en el monocultivo con 0.5% de extracto de levadura y en el medio acidificado con 0.5% de extracto de levadura y 0.5% de inóculo de bacterias lácticas.

Por su parte la biomasa experimentó sus mejores resultados en el monocultivo, con 1.0% de extracto de levadura y en el medio acidificado con 0.5% de extracto de levadura y 0.5% de inóculo de bacterias lácticas.

Por otra parte, para que se considere favorable el desempeño de un medio determinado, el Brix, debe disminuir hasta el 60% del valor inicial. En el caso del monocultivo se logró una mayor disminución del Brix con 1.0% de extracto de levadura y en el medio acidificado esta se logró con 1.0% de extracto de levadura y 1.0% de inóculo de bacterias lácticas.

La mayor cantidad de células de levaduras/mL en el monocultivo se logró con 1.0% de extracto de levadura y en el medio acidificado con 0.5% de extracto de levadura y 1.0% de inóculo de bacterias.

Tabla 3.4: Resumen de las tablas 3.2 y 3.3.

Efecto	Medio acidificado	Monocultivo
Consumo de los ART [%]	97.2	98.7
Disminución del Brix [%]	66.1	64.4
Incremento de la Biomasa [g]	3.147	3.324
Incremento de la cantidad de células de levaduras/mL [$\cdot 10^6$]	47	36

De forma general, los resultados obtenidos a través de las distintas variantes sometidas a análisis favorecen el proceso de propagación, pues las diferencias que existen entre ellos no son sensibles y además demuestran la factibilidad del uso de la miel acidificada con bacterias lácticas en el desarrollo de las levaduras, para su empleo en la etapa de propagación del proceso de obtención de alcohol orgánico.

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA MIEL FINAL ORGÁNICA

(Abreu, R., 2003 – 2004.)

Este estudio tiene como objetivo conocer la calidad de la miel orgánica que será empleada en los estudios siguientes, la cual procede del Complejo Azucarero “Carlos Baliño”. Los resultados se muestran en la tabla 3.5.

Tabla 3.5: Datos de la caracterización de la miel final orgánica.

Parámetros	Valores
pH	5.64
Brix [°]	85.22
Cenizas [%]	11.607
ART [g/L]	45.38
Azúcares Reductores fermentables (ARF) [g/L]	43.38
Azúcares Reductores infermentables (ARI) [g/L]	2.00
N ₂ (base húmeda) [%]	0.317
N ₂ (base seca) [%]	0.535
Mg ²⁺ [%]	0.438
Ca ²⁺ [%]	1.586

Los parámetros obtenidos están en correspondencia con los valores tradicionalmente reportados para el sustrato utilizado, la miel final orgánica, a diferencia del % de calcio, que es superior, lo que puede estar dado por los cambios introducidos en la tecnología de fabricación de azúcar orgánico, de donde se obtiene esta miel, no obstante la misma puede ser empleada sin dificultades en los experimentos que prosiguen.

3.4. ESTUDIO DE PROMOTORES DE LA FERMENTACION ALCOHÓLICA

Antes de proseguir con la descripción de este experimento, es importante señalar, que la concentración de extracto de levadura que se utiliza en el mismo, es de 0.5%, a pesar de obtenerse en experimentos anteriores que se logra un mejor desempeño con 1.0%. Esto se puede justificar producto de que las diferencias entre los resultados obtenidos empleando concentraciones altas y concentraciones bajas de extracto de levadura no son significativas, pero este producto resulta ser muy caro en el mercado internacional.

Este estudio contiene una comparación de la fermentación usando ácido sulfúrico y sales de amonio y la fermentación regulando pH con ácido láctico con la fermentación usando bacterias lácticas como promotoras de dicha etapa y extracto de levadura como nutriente y pretende determinar quién ejerce un efecto significativo sobre la fermentación, si las bacterias lácticas como organismo productor de ácido láctico o el propio ácido como reactivo y comparar el desarrollo de las bacterias lácticas como promotores de la fermentación con la fermentación usando ácido sulfúrico y sales de amonio.

A continuación se muestran en las tablas 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10 y 3.11 y la tabla resumen de estas, la 3.12 y en las gráficas 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 los resultados de este estudio y el análisis correspondiente al mismo.

- Fermentación utilizando ácido sulfúrico para regular pH y sales de amonio como nutrientes

Tabla 3.6: Resultados experimentales del comportamiento de las diferentes etapas de obtención de etanol.

Parámetros	Etapas					
	Propagación		Prefermentación		Fermentación	
	inicio	final	inicio	Final	inicio	Final
pH	4.27	2.91	4.25	3.26	4.39	4.09
Brix [°]	5	3.9	9.5	6.9	16	10.5
Acidez total	0.21	0.46	0.31	0.63	0.39	0.84
ART [g/L]	33.6	2.5	74	8.8	102	28.4
Biomasa [g]	5.097	8.12	2.708	7.98	3.89	4.58
Conteo celular [células/mL]	-	-	66×10^6	109×10^6	-	-
°Alcohólico [%]	-	-	-	3.13	0.46	4.14
Tiempo de duración [h]	5.75		7.5		24	
Eficiencia [%]	-		-		35.54	
Productividad [g/L*h]	-		-		1.354	

Tabla 3.7: Datos experimentales del estudio de la etapa fermentativa.

Hora	Parámetros			
	pH	Brix [°]	Acidez total	°Alcohólico [%]
0	4.39	16	0.39	0.46
16	4.12	13	0.66	2.38
20	4.10	12.2	0.84	3.33
24	4.09	10.5	0.84	4.14

• **Fermentación regulando pH con ácido láctico**

Tabla 3.8: Resultados experimentales del comportamiento de las diferentes etapas de obtención de etanol.

Parámetros	Etapas					
	Propagación		Prefermentación		Fermentación	
	inicio	final	inicio	Final	inicio	Final
pH	3.54	3.47	3.84	3.79	4.01	4.00
Brix [°]	5.6	2.7	10.3	7.5	16	12
Acidez total	0.54	0.63	0.65	0.64	0.7	1.24
ART [g/L]	29.6	2.4	60	14	110	34
Biomasa [g]	4.7	6.99	1.73	6.06	2.34	3.34
Conteo celular [células/mL]	-	-	43*10 ⁶	132*10 ⁶	-	-
°Alcohólico [%]	-	-	-	2.36	0.467	4
Tiempo de duración [h]	7		7.5		24	
Eficiencia [%]	-		-		31.86	
Productividad [g/L*h]	-		-		1.308	

Tabla 3.9: Datos experimentales del estudio de la etapa fermentativa.

Hora	Parámetros			
	pH	Brix [°]	Acidez total	°Alcohólico [%]
0	4.01	16	0.7	0.467
16	4	14	0.99	2
20	4.03	13	0.9	3.06
24	4	12	1.24	4

- **Fermentación empleando bacterias lácticas como promotoras de dicha etapa y extracto de levadura como nutriente**

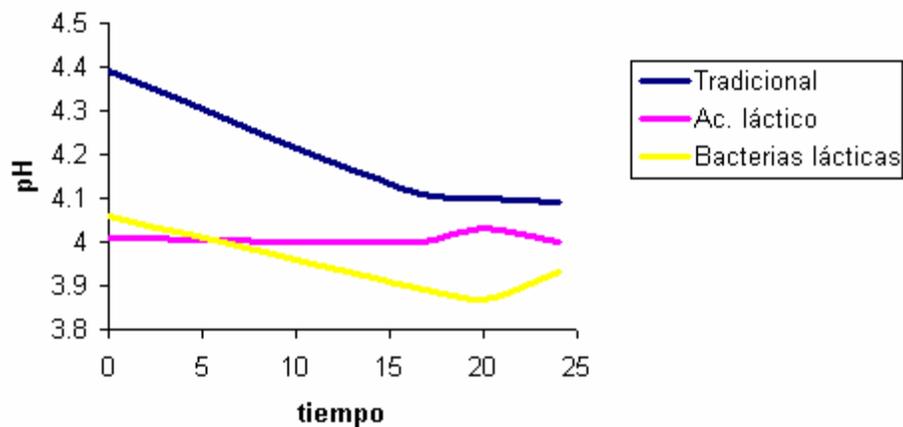
Tabla 3.10: Resultados experimentales del comportamiento de las diferentes etapas de obtención de etanol.

Parámetros	Etapas					
	Propagación		Prefermentación		Fermentación	
	inicio	final	inicio	Final	inicio	Final
pH	3.62	3.52	3.88	3.86	4.06	3.93
Brix [°]	5.4	3.1	12	9	15.9	10.7
Acidez total	0.5	0.55	0.72	0.86	0.72	1.07
ART [g/L]	31.06	2.2	78	29.6	112	20.28
Biomasa [g]	5.45	8.52	4.5	7.18	2.37	5.27
Conteo celular [células/mL]	-	-	57*10 ⁶	121*10 ⁶	-	-
°Alcohólico [%]	-	-	-	3	0.9665	7
Tiempo de duración [h]	4		7		24	
Eficiencia [%]	-		-		54.92	
Productividad [g/L*h]	-		-		2.28	

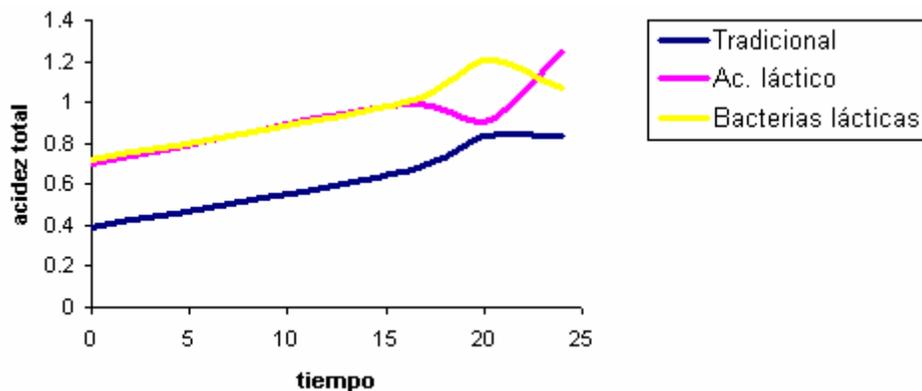
Tabla 3.11: Datos experimentales del estudio de la etapa fermentativa.

Hora	Parámetros			
	pH	Brix [°]	Acidez total	°Alcohólico [%]
0	4.06	15.9	0.72	0.9665
16	3.9	11.8	1	4.83
20	3.87	10.8	1.21	5.46
24	3.93	10.7	1.07	7

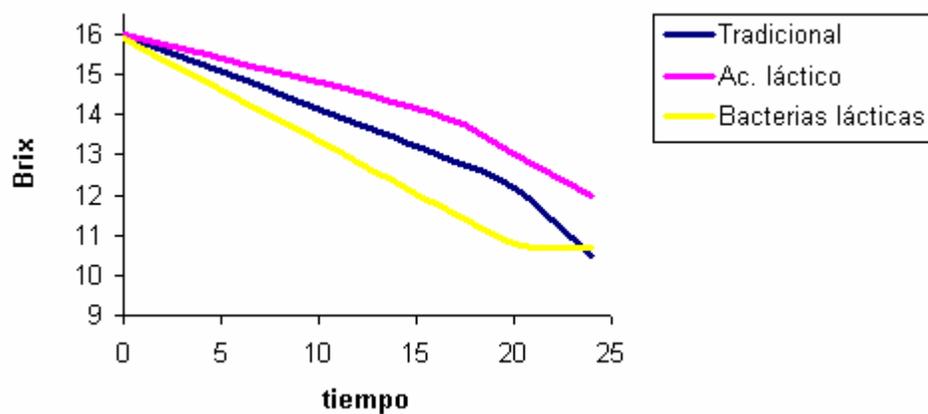
Gráfica 3.3: Comportamiento del pH en la etapa fermentativa.



Gráfica 3.4: Comportamiento de la acidez total en la etapa fermentativa.



Gráfica 3.5: Comportamiento del Brix en la etapa fermentativa.



Gráfica 3.6: Comportamiento del grado alcohólico en la etapa fermentativa.

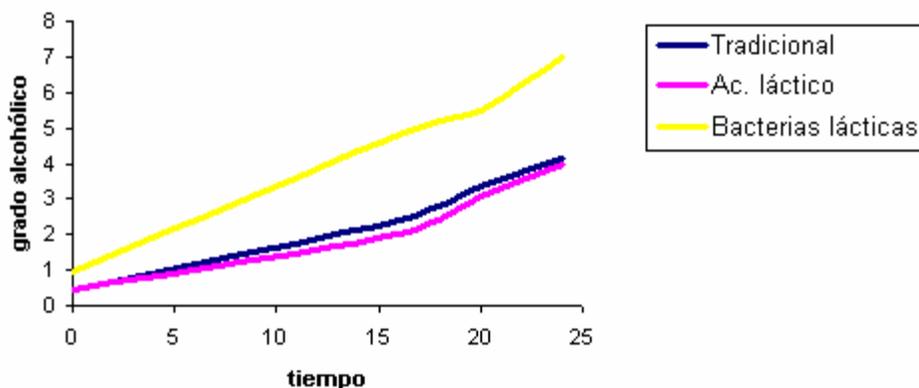


Tabla 3.12: Resumen de las tablas 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10 y 3.11.

Efecto	Mejor comportamiento por etapas		
	Propagación	Prefermentación	Fermentación
Disminución del pH	Ácido sulfúrico y nutrientes	Ácido sulfúrico y nutrientes	Ácido sulfúrico y nutrientes
Incremento de la acidez total	Ácido sulfúrico y nutrientes	Ácido sulfúrico y nutrientes	Ácido sulfúrico y nutrientes
Consumo de los ART	Cultivo mixto	Ácido sulfúrico y nutrientes	Cultivo mixto
Disminución del Brix	Ácido láctico para regular pH	Cultivo mixto	Ácido sulfúrico y nutrientes
Incremento de la Biomasa	Cultivo mixto	Ácido sulfúrico y nutrientes	Ácido sulfúrico y nutrientes
Incremento de la cantidad de células de levaduras/mL	-	Ácido láctico para regular pH	-
Incremento del grado alcohólico	-	-	Cultivo mixto
Menor tiempo de duración	Cultivo mixto	Cultivo mixto	Idéntico
Incremento de la eficiencia [%]	-	-	Cultivo mixto
Incremento de la productividad [g/L*h]	-	-	Cultivo mixto

Basándose en el análisis de las tablas 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11 y la tabla resumen de estas, la 3.12 y las gráficas 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6, se puede afirmar que la fermentación empleando bacterias lácticas como promotoras de dicha etapa, extracto de levadura como nutriente y miel ácida como sustrato, presentó un comportamiento favorable, ya que a pesar de que las variantes desarrolladas utilizando ácido sulfúrico y nutrientes y regulando pH con ácido láctico, evidenciaron resultados superiores en algunos parámetros de las diferentes etapas de obtención de alcohol, estos no son significativos en relación con los obtenidos por el cultivo mixto.

El índice de eficiencia se define como la relación entre la cantidad de alcohol producido por 100 Kg. de azúcares fermentables y la cantidad teórica de alcohol que debió obtenerse de igual peso de azúcares fermentables. Las destilerías cubanas tienen fijada una norma de eficiencia de 78%, es decir, que por cada 100 Kg. de azúcares alimentados al proceso se pierden alrededor de 22% motivado por diferentes causas. El mejor resultado obtenido de este parámetro es el de la variante donde se utilizan las bacterias lácticas y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, aunque no llega a la norma establecida, lo que puede estar motivado producto de que no se consumieron totalmente los azúcares, muy por encima este valor de los obtenidos en las demás variantes.

Los valores de productividad representan los g/L de batición producidos por horas de fermentación. Para la obtención de etanol a partir de melazas el rango de valores de este parámetro reportado es de 1.6 – 2.5. Se observa que excepto la variante del cultivo mixto con extracto de levadura como nutriente las demás se encuentran por debajo de este rango.

Con este experimento se logra demostrar que la utilización de las bacterias lácticas en el proceso de obtención de alcohol orgánico favorece el control del pH sin afectación de los parámetros fundamentales del mismo.

3.5. ESTUDIO DEL pH Y LA ACIDEZ TOTAL A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL SUSTRATO

Este experimento contiene un estudio del pH y la acidez total del medio, con el objetivo evaluar el comportamiento de las bacterias lácticas en miel final orgánica y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, a diferentes concentraciones de sólidos solubles del sustrato: 5, 10 y 15^oBrix, concentraciones estas utilizadas para el trabajo en la etapas de propagación, prefermentación y fermentación del proceso de obtención de etanol respectivamente.

A continuación se muestran en las tablas 3.13, 3.14 y 3.15 y las gráficas 3.7 y 3.8 los resultados de este estudio y el análisis correspondiente al mismo.

Tabla 3.13: Resultados experimentales del comportamiento del estudio a 5^o Brix.

Hora	Parámetros (valores medios)	
	pH	Acidez total
0	5.28	0.08
2	5.09	0.095
4	4.815	0.12
6	4.48	0.18
8	4.27	0.22
24	3.715	0.575

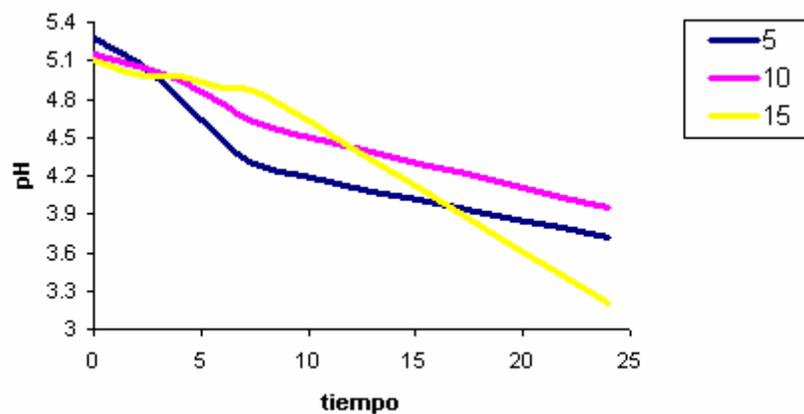
Tabla 3.14: Resultados experimentales del comportamiento del estudio a 10^o Brix.

Hora	Parámetros (valores medios)	
	pH	Acidez total
0	5.155	0.135
2	5.06	0.15
4	4.95	0.165
6	4.76	0.22
8	4.585	0.25
24	3.955	0.66

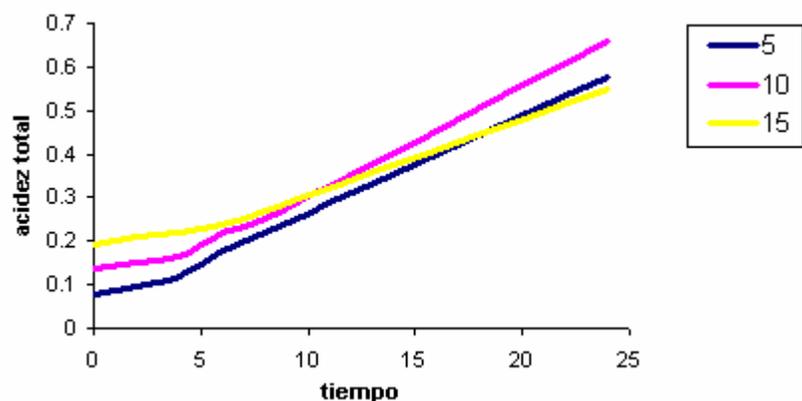
Tabla 3.15: Resultados experimentales del comportamiento del estudio a 15° Brix.

Hora	Parámetros (valores medios)	
	pH	Acidez total
0	5.11	0.19
2	5.00	0.21
4	4.98	0.22
6	4.88	0.24
8	4.83	0.27
24	3.205	0.55

Gráfica 3.7: Comportamiento del pH.



Gráfica 3.8: Comportamiento de la acidez total.



El análisis de las tablas 3.13, 3.14 y 3.15 y las gráficas 3.7 y 3.8 nos permite conocer que a las concentraciones de sólidos solubles sometidas a estudio 5, 10 y 15 °Brix en el sustrato, ocurre un descenso del pH y un incremento de la acidez total del medio en el tiempo.

El crecimiento y la fermentación de las levaduras dependen en alto grado de la reacción del medio nutritivo. El pH óptimo para el crecimiento de la *Saccharomyces cerevisiae* es entre 4,4 – 4,8. En las alcoholeras se trabaja a un pH alrededor de 4,2 para evitar contaminaciones en el medio de microorganismos indeseables.

A la concentración de 5 °Brix el valor de pH adecuado para un buen desarrollo de las levaduras en el medio, se alcanzó a las 8 horas, 4.27 específicamente y una acidez total de 0.22. A 10 °Brix, el valor requerido de concentración de iones hidrógeno para un medio óptimo para el trabajo, se alcanza entre las 8 y 24 horas, por lo que se requiere de un estudio en este período de tiempo para definir el tiempo real. No obstante a las 8 horas la acidez total era de 0.25 y el pH de 4.585, un valor que si bien dista en algunas unidades del óptimo, pudiera ser aprovechado para el desarrollo de las levaduras.

A 15 °Brix se observa que las 24 horas es cuando el pH muestra un valor adecuado, 4.205 y la acidez de 0.55, por lo que al incrementar la concentración de sólidos solubles en el sustrato, se requiere un tiempo mayor para alcanzar el pH adecuado para el desarrollo de las levaduras.

Estos resultados son favorables al desarrollo de una miel acidificada a expensas de las bacterias lácticas. Los mismos son de importancia práctica pues demuestra las posibilidades de obtener miel acidificada en un tiempo corto.

3.6. ESTUDIO COMPARATIVO DEL COMPORTAMIENTO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS FRENTE A DOS FUENTES DE NITRÓGENO DIFERENTES

Este experimento contiene una comparación del comportamiento de las bacterias lácticas frente a dos fuentes de nitrógeno: el suero lácteo y el extracto de levadura. El mismo se realizó con el propósito de analizar la posibilidad de sustituir este último, por los motivos anteriormente expuestos.

A continuación se muestran en las tablas 3.16 y 3.17 y en las gráficas 3.9 y 3.10 los resultados de este experimento, así como un análisis del mismo.

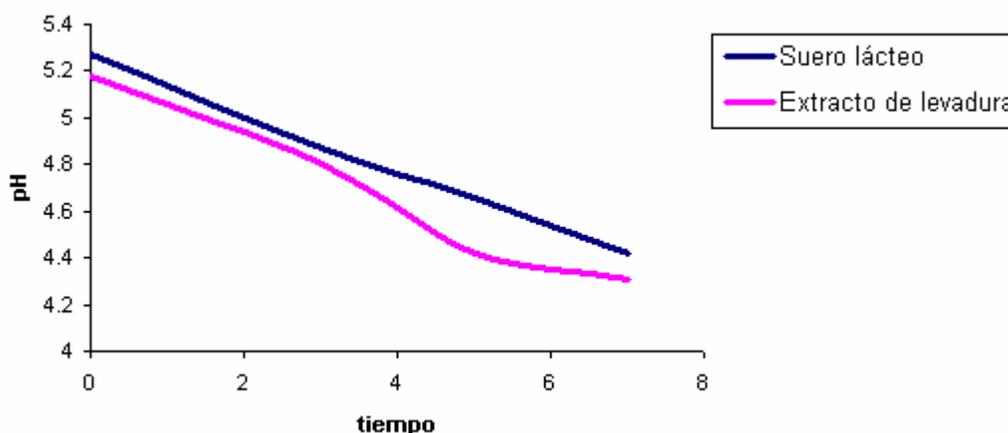
Tabla 3.16: Resultados experimentales del comportamiento de las bacterias lácticas en suero lácteo.

Hora	pH			Acidez total		
	Original	Réplica	Media	Original	Réplica	Media
0	5.27	5.27	5.27	0.07	0.07	0.07
3	4.88	4.86	4.87	0.11	0.11	0.11
5	4.67	4.65	4.66	0.13	0.13	0.13
7	4.42	4.42	4.42	0.17	0.17	0.17

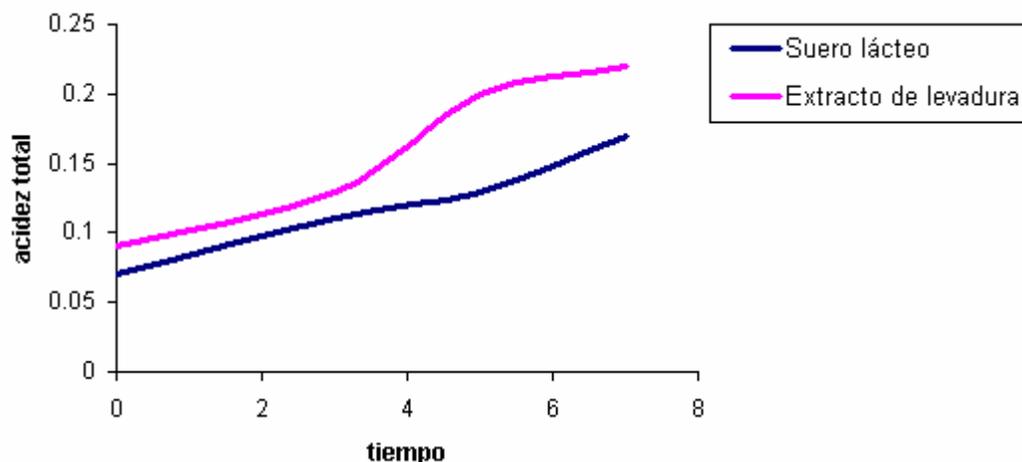
Tabla 3.17: Resultados experimentales del comportamiento de las bacterias lácticas en extracto de levadura.

Hora	Extracto de levadura					
	pH			Acidez total		
	Original	Réplica	Media	Original	Réplica	Media
0	5.18	5.18	5.18	0.09	0.09	0.09
3	4.81	4.79	4.8	0.13	0.13	0.13
5	4.4	4.44	4.42	0.2	0.2	0.2
7	4.32	4.3	4.31	0.22	0.22	0.22

Gráfica 3.9: Comportamiento del pH.



Gráfica 3.10: Comportamiento de la acidez total.



Teniendo en cuenta que el extracto de levadura resulta un producto costoso para su empleo en un proceso industrial, consideramos necesario el estudio de la utilización del suero de leche como fuente de aminoácidos y vitaminas para el crecimiento de las bacterias lácticas.

Se puede observar en las tablas 3.16 y 3.17 y las gráficas 3.9 y 3.10 que el comportamiento de las bacterias lácticas, en ambas fuente de nutrientes es adecuado. En extracto de levadura el pH del medio en 7 horas disminuyó 0.87 unidades respecto al inicial, desde 5.18 hasta 4.31, con una acidez del medio de 0.22, mientras que en suero lácteo descendió 0.85 unidades, desde 5.27 hasta 4.42, con una acidez total de 0.17. Tanto 4.31 como 4.42 son valores de pH adecuados para un desarrollo favorable de las levaduras. Este resultado es importante ya que se logra demostrar que el suero de leche, un producto más asequible y menos costos que el extracto de levadura, es capaz de sustituir al mismo como concepto de aporte de nitrógeno al sistema.

3.7. ESTUDIO DEL CULTIVO MIXTO

Este estudio contiene el análisis de la fermentación alcohólica empleando un cultivo mixto de bacterias lácticas y levaduras, el cual tiene como objetivo evaluar el comportamiento de dicho cultivo mixto en el desarrollo de la fermentación alcohólica, con el propósito de sustituir la adición de ácido sulfúrico y de las sales de amonio como concepto de ajuste del pH y aporte de fuentes de nitrógeno y fósforo en el sustrato fermentativo respectivamente.

A continuación se muestran en las tablas 3.18, 3.19, 3.20 y 3.21 los resultados de este experimento, así como un análisis del mismo.

Tabla 3.18: Resultados experimentales del comportamiento de la etapa de inoculación.

Hora	Parámetros			
	pH	Brix [°]	Acidez total	ART [g/L]
0	4.97	5.8	0.15	32
2	4.57	4.7	0.32	20.4
4	4.32	3.9	0.37	8.9
5	4.24	3.5	0.43	4.4

Tabla 3.19: Resultados experimentales del comportamiento de la etapa de propagación.

Hora	Parámetros					
	pH	Brix [°]	Acidez total	ART [g/L]	Biomasa [g]	Conteo celular [células/mL]
0	4.87	5.5	0.19	27.4	6	-
2	4.62	4.8	0.21	17.4	-	-
4	4.46	3.4	0.23	6.18	7.37	276*10 ⁶

Tabla 3.20: Resultados experimentales del comportamiento de la etapa prefermentativa.

Hora	Parámetros					
	pH	Brix [°]	Acidez total	ART [g/L]	Biomasa [g]	°Alcohólico [%]
0	5	10	0.18	54.5	2.51	-
5	4.87	8.7	0.19	46	-	-
9	4.75	7.1	0.27	28.4	3.4	1.466

Tabla 3.21: Resultados experimentales del comportamiento de la etapa fermentativa.

Hora	Parámetros							
	pH	Brix [°]	Acidez total	ART [g/L]	Biomasa [g]	°Alcohólico [%]	Eficiencia [%]	Productividad [g/L*h]
0	5.07	16.1	0.21	92.5	1.7	0.6	46.88	1.636
16	4.73	13.4	0.49	68	-	2.57		
18	4.72	12.5	0.55	53	-	4		
24	4.67	11.8	0.55	36.2	2.3	5		

Este experimento tiene la particularidad de realizarse sin la adición de ningún nutriente al medio.

Realizando un análisis por etapa, en la inoculación destaca la reducción del pH hasta 4.24, del Brix hasta el 60% requerido y un consumo de los reductores del 86% en un tiempo de 5 horas, mientras que en la propagación sobresale la reducción del Brix hasta valores cercanos al 60%, incrementos de biomasa de la levadura y un número de células/mL elevado, acorde a los parámetros reportados por la obtención de etanol empleando ácido sulfúrico para regular pH y sales de amonio como nutrientes. En la etapa prefermentativa no se lograron valores muy favorables en los diferentes parámetros controlados a excepción del grado alcohólico, donde 1.466%, para esta etapa, donde el desarrollo de las levaduras es de vital importancia y no la producción de etanol, es bueno. En la fermentación es bueno destacar que la etapa no excedió las 24 horas y se obtuvieron grados alcohólicos relevantes. No ocurrió así con los ART donde el consumo de los mismos fue pobre.

Como se observa, el valor de la eficiencia del proceso fermentativo es relativamente bajo en comparación con la norma establecida por las destilerías cubanas, lo cual puede estar dado por el consumo no total, por parte de los microorganismos presentes, de los azúcares, ya que este proceso se realiza sin la adición de ningún tipo de nutrientes, aunque se debe señalar que el valor de la productividad se encuentra dentro del rango reportado para este tipo de proceso.

De forma general, para suplir los problemas presentados por este experimento, sobre todo en la etapa prefermentativa se pudiera trabajar con miel acidificada previamente con bacterias lácticas.

Este estudio demuestra que es factible el proceso en cultivo mixto sin la adición de la fuente de nitrógeno en el sustrato y el control del pH con ácido sulfúrico y además que la alternativa de desarrollar las levaduras de fermentación en cultivo mixto con las bacterias lácticas, además de garantizar el control del pH en el medio, incrementa la productividad del proceso.

CONCLUSIONES

1. La mejor concentración de extracto de levadura y de inóculo de bacterias lácticas en glucosa resultó ser 1.0% en ambos casos.
2. La utilización de las bacterias lácticas en el proceso de obtención de alcohol orgánico favorece el control del pH sin afectación de los parámetros fundamentales del mismo.
3. La variante de la utilización del suero lácteo como fuente de nitrógeno en el sustrato para el crecimiento de las bacterias lácticas, resulta una alternativa de interés como vía de sustitución del extracto de levadura.
4. Los valores obtenidos de productividad empleando las bacterias lácticas en cultivo mixto se encuentran dentro del rango establecido para la producción de etanol a partir de las melazas, lo cual indica la factibilidad de desarrollar esta tecnología en la obtención de alcohol orgánico.
5. El cultivo mixto entre las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y las bacterias lácticas, logra eliminar el consumo de ácido sulfúrico por concepto de ajuste de pH y la adición de la fuente de nitrógeno en el sustrato fermentativo.

RECOMENDACIONES

1. Utilizar miel acidificada en el estudio "Fermentación alcohólica empleando un cultivo mixto de levaduras y bacterias lácticas en miel final orgánica".
2. Realizar la destilación de los fermentos obtenidos en los diferentes estudios y la posterior caracterización de los alcoholes y residuales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abate, C. "Ethanol production by a mixed culture of flocculent strains of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces* sp". 1996.
2. Abreu, R. Tesis de grado. "Contribución al estudio y al desarrollo de la fermentación para la obtención de alcohol orgánico". 2003 – 2004.
3. Albert, A. "Aplicaciones de la biotecnología en el mundo actual". 1999.
4. Almazán, O., Klibansky, M. y Otero, M. A. "Producción de proteína unicelular a partir de subproductos de la industria azucarera". 1982.
5. Alvarez, X. y colaboradores. "Estudio de mutantes respiratorios en la producción de alcohol". Revista ICIDCA, 1987.
6. Anónimo. "Subproductos de la caña". International Sugar Journal. Junio 1996.
7. Anónimo. "Subproductos de la caña". International Sugar Journal. Noviembre 1996.
8. Bepamp, Y. Tesis de grado. "Propuesta tecnológica para el tratamiento de las aguas residuales de la planta piloto José Martí". 1999
9. Blanco, C. G. "Diagnóstico de la industria para la producción de alcohol etílico". Revista ICIDCA, 1978.
10. Blanco, C. G. "La producción de alcohol a partir de la industria azucarera y sus posibilidades". 1981.
11. Celson, A. "Tecnología de la producción de alcohol por fermentación". 1990.
12. CETA. UCLV. "Producción de azúcar orgánica con fines científicos y comerciales". 1997.
13. Chará, J. D. y Suárez J. C. "Utilización de vinaza y jugo de caña como fuente energética en patos pekín alimentados con grano de soya y azolla como fuente proteica". 1993.
14. Chithra, N. y Baradarajon, A. "*Saccharomyces cerevisiae* Cells. Applied Biochemistry and Biotech". 1994.
15. Compagno, C. "Fermentation of whey and starch by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells". 1995.

Bibliografía

16. Correa, Y. "Estudio de la fermentación alcohólica con vinculación de otros sustratos. Evaluación del proceso". 1995
17. Correa, Y., Martínez, L. y Delgado, R. D. "Estudio de la miel B como fuente de carbohidratos para la fermentación alcohólica". 2002.
18. Dahiya, D.S., Koshy, M. y otros. "Spent Wash Recycling for molasses Fermentation". Int. Sugar Journal. 1982.
19. David, E. "Algunas consideraciones acerca de las mieles finales". Revista ATAC, 1978.
20. de la Cruz, R., González, E. y Abreu, A. "Alternativas de la combinación de sustratos para la fermentación alcohólica en la destilería anexa al Complejo Azucarero Melanio Hernández". 2000.
21. Díaz, R. "Tratamiento de aguas y aguas residuales". 1987.
22. Domínguez, V. E. "Influencia de la harina de maíz y el salvado de arroz en la formación de productos derivados en la fermentación alcohólica". Int. Sugar Journal, 1998.
23. Dunm's, A. "Production Read G. of fermentation alcohol as a fool source prescott. Industrial Microbiology". 4^{ta} edición, 1981.
24. Ethanol and methanol from cellulose biomass. "Fuels and electricity from renewable resources". Conference on environment and development. 1992.
25. Fabelo, J. A. "Determinación de los costos de producción de la etapa de fermentación alcohólica con la utilización de diferentes sustratos". 1998.
26. Fabelo, J. A., Correa, Y. y Martínez, L. "Estudio estadístico de la etapa de fermentación alcohólica para diferentes sistemas de sustratos". 1998.
27. Fabelo, J. A., Rodríguez, A. y Martínez, L. "Estudio del comportamiento de las mieles finales en la fermentación alcohólica". 1999.
28. Fernández, C. Tesis de grado. "Obtención de alcohol a partir de melazas orgánicas". 2001.
29. Fleet, H. G. "Wine microbiology and biotechnology". 1993.
30. Frazier, W. C. "Microbiología de los alimentos", 1966

Bibliografía

31. Fugelseng K, C. "Wine microbiology". 1996.
32. Galbe, M. y Zacchi, G. "Simulation of Ethanol Production Processes Based on Enzymatic Hydrolysis of woody Biomass". 1994.
33. García, R. y Valdés, I. "Pesquizaje de cepas termotolerantes en tres géneros de levaduras alcoholeras". Primer Taller Internacional de producción de alcoholes, febrero 1997.
34. Garde, J. A., Mateo, F. J. y Baztán, U. "Prácticas de Química para Educación Secundaria". 1997.
35. Gómez, Y. Tesis de grado. "Caracterización preliminar de las mieles de la planta piloto José Martí". 1999 – 2000.
36. González, R. A. "Potencial bioquímico del gas: nuevo método para el estudio de la digestión anaerobia a nivel de laboratorio". Memorias del 2^{do} Congreso AIDIS de Norteamérica y el Caribe y el IV Congreso de la Asociación Cubana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 1995.
37. Handbook de análisis de agua. 4^{ta} edición. 2002.
38. Hernández, H. y Kosikowski, F. V. "Elaboración de bebidas tipo CEFIR empleando mezclas de suero dulce desmineralizado y leche entera en polvo ". 1996.
39. Hernández, M. L. Tesis de grado. "Estudio del proceso de fermentación alcohólica con recirculación de vinazas". 1993.
40. Hernández, T. "Microbiología de la producción azucarera. Producciones microbianas derivadas". 1986.
41. Herrera, A. y Quintana, M. "Manual de prácticas de laboratorio de microbiología industrial". 1989.
42. <http://www.accessexcellence.org>.
43. <http://www.aedes.com.pe>.
44. <http://www.agendaorganica.cl>.
45. <http://www.agrobooks.com>.
46. <http://www.ain.cubaweb.cu/2004/junio>.
47. <http://www.alfinal.com>.

Bibliografía

48. <http://www.alimentación-sana.com.ar>.
49. <http://www.applusagroalimentario.com>.
50. <http://www.argenbio.org>.
51. <http://www.attra.ncat.org>.
52. <http://www.biologia.edu.ar>.
53. <http://www.comercioactivo.org>.
54. <http://www.ecoportal.net>.
55. <http://www.exporgánica.com.ar>
56. <http://www.fao.org>.
57. <http://www.infoagro.com>.
58. <http://www.ing.unlp.edu.ar>.
59. <http://www.medicinanaturista.com.ar>.
60. <http://www.monografias.com>.
61. <http://www.otisa.com.uy>.
62. <http://www.prensa.com/2002>, 4 marzo.
63. <http://www.revistafuturos.info>.
64. <http://www.sica.gov.agro.ec/2002> julio.
65. <http://www.sicoar.com.uy>.
66. <http://www.vinculando.org>.
67. <http://www.zonadiet.com>.
68. Iturria, P. J. Tesis de Maestría. "Estudio medioambiental de la etapa de fermentación alcohólica utilizando diferentes sustratos y sus combinaciones". 2001.
69. Jorgensen - Hausen. "Microbiología de las fermentaciones industriales." 7^{ma} edición, 1979.
70. Karsch, T., Ethal, V. y Esser, K.J. "Appl Microbiol Biotechnol". 1983.
71. Kretzschmarh. "Direct Conversion of Starch Hydrolyzate to Ethanol Using A. Immobilizate of Amyloglucosidae and Saccharomyces Cerevisae in Batch Stirred Tank Reactor. Bioprocesses engineering". 1992.

Bibliografía

72. Kretzschmarh. "Levaduras, alcohol y otros productos de la fermentación". 1980.
73. Kujol, P. "Ahorro de combustible en destilerías por el procesamiento eficiente de las melazas y utilización de las vinazas". Octubre, 1979.
74. La industria de los derivados de la caña de azúcar. Revista ICIDCA. 1992.
75. Laval, C. "Producción de etanol por proceso denominado: Biostil". Revista Brasil Azucarero. 1982.
76. Lehninger, A. "Bioquímica". 2^{da} Edición. 1979.
77. Lodos, J. y colaboradores. "Causas industriales de las altas purzas en mieles finales". 1998.
78. Mansur, M., Cuellar, A. y otros "Caracterización de jugo crudo y clarificado para la fermentación alcohólica" 2^{do} Seminario Internacional sobre azúcar y derivados de la caña. Tomo I. Diversificación. 1990.
79. Manual Analítico para el Control Unificado. "Producción de alcohol y levadura". 1986.
80. Manual Analítico para el Control Unificado. I.C.I.N.A.Z. Sala Nacional de Control y Análisis. Tomo I y II. 1996.
81. Manual de análisis de agua. 2^{da} edición. 2000.
82. Marcos, G. P. "Fermentación alcohólica con células inmovilizadas: experiencias en batch repetido". Septiembre, 1986.
83. Mariano. G. G., Rodolfo, Q. R. y López, A. "Biotecnología Alimentaria". 1999.
84. Montaña, M. "Análisis Microbiológico, composición y características de yogures comerciales y su repercusión". Congreso Panamericano de la leche. 1991.
85. Namer, I. "Evaluación económica preliminar del tema: Utilización de diferentes corrientes del central azucarero para la producción de alcohol". Septiembre 1986.
86. Nikitin, G. A. "Fundamentos Bioquímicos de las producciones Microbiológicas". 1981.
87. Norma internacional ISO 5815. "Calidad del agua. Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅). Método de dilución y siembra". 1989.

88. Olguín, E. J., Téllez, P. y otros. "Evaluación de alternativas biotecnológicas para la diversificación de la industria azucarera". 1988.
89. Palacio, H., Almazána y Horii, J.T. "Fabricación de alcohol". 1^{ra} edición, 1956.
90. Panchal, C. I. "Fermentation ethanol production. Application of the new genetics and ancient. Art energy tech. Apply and economical process. Aplica". 1984.
91. Pelczar, M. J. y Reid, R. D. "Microbiología". 1966
92. Prescott, S. C. "Microbiología industrial". 3^{ra} Edición, 1962.
93. Proyecto científico-productivo. "Producción de azúcar orgánica con fines comerciales y ecológicos, en la Planta Piloto del Centro de Estudio de Termoenergética Azucarera de la UCLV". 1999.
94. Química Analítica Aplicada. Tomo I. 3^{ra} edición, 1892.
95. Quintero, R. R. "Ingeniería Bioquímica". 1^{ra} edición, 1981.
96. Rodríguez, A. "Utilización del residual alcohólico como alimento animal". Revista ICIDCA. 1985.
97. Roger, P. "High productivity ethanol fermentation with *Zymomonas mobilis*". 1978.
98. Rosevear, J. y Chem, A. "Tech. Biotechnol 34B". 1984.
99. Salminen, S. y Wright A. V. "Lactic acid bacteria". 1993.
100. Sirigh, G. y colaboradores. "Productos alternativos de la caña de azúcar". Noviembre, 1996.
101. Smidrkarl, M. y Nejedly, A. "Fermentaciones continuas de alcohol". 1989.
102. Strayer, L. "Bioquímica". 2^{da} edición, 1982.
103. Suárez L. e Iñigo B. "Microbiología enológica". 1992.
104. Suárez, M. B. y Michelena, G. L. "Utilización y evaluación de la miel B. como fuente de carbohidratos para la producción de alcohol". 1999.
105. Triantatyllos, R. "Kinetics of ethanol Production from Carob Pods Extrad by immobilized". 1994.

Bibliografía

106. Valdés, I. y García, R. "Obtención de cepas resistentes a alcohol y termotolerantes por métodos de selección en cultivo continuo". 1^{er} Taller Internacional de Producción de alcoholes. Febrero 1997.
107. Verbina, N. M. "Microbiología de las producciones alimenticias". 1988.
108. Wiseman, A., Cheetham, S. J., Horwood, E. "Topics in Enzyme and Fermentación Biotechnology". 1979.
109. Yu-Chun-Yen. "Productos Biotecnológicos de la industria azucarera". 1986.
110. Yuji, T. y Noriaki, S. "Ethanol Fermentación of various Red Rices without Cooking"V. 1994.

ANEXOS

Anexo No. 1

Corrección de temperatura para refractómetros

T	°Brix													
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Réstele al %														
10	0.5	0.5	0.58	0.6	0.64	0.7	0.68	0.7	0.72	0.7	0.74	0.8	0.8	0.78
11	0.5	0.5	0.53	0.6	0.58	0.6	0.62	0.64	0.65	0.7	0.67	0.7	0.7	0.7
12	0.4	0.5	0.48	0.5	0.52	0.5	0.56	0.57	0.58	0.6	0.6	0.6	0.6	0.63
13	0.4	0.4	0.42	0.4	0.46	0.5	0.49	0.5	0.51	0.5	0.53	0.5	0.5	0.55
14	0.3	0.4	0.37	0.4	0.4	0.4	0.42	0.43	0.44	0.5	0.45	0.5	0.5	0.47
15	0.3	0.3	0.31	0.3	0.34	0.3	0.35	0.36	0.37	0.4	0.38	0.4	0.4	0.4
16	0.2	0.2	0.25	0.3	0.27	0.3	0.28	0.29	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.32
17	0.2	0.2	0.19	0.2	0.21	0.2	0.21	0.22	0.22	0.2	0.23	0.2	0.2	0.24
18	0.1	0.1	0.13	0.1	0.14	0.1	0.14	0.15	0.15	0.2	0.15	0.2	0.2	0.16
19	0.1	0.1	0.06	0.1	0.07	0.1	0.07	0.08	0.08	0.1	0.08	0.1	0.1	0.08
Súmele al %														
21	0.1	0.1	0.07	0.1	0.07	0.1	0.08	0.08	0.08	0.1	0.08	0.1	0.1	0.08
22	0.1	0.1	0.14	0.1	0.15	0.1	0.15	0.15	0.15	0.2	0.16	0.2	0.2	0.16
23	0.2	0.2	0.21	0.2	0.22	0.2	0.23	0.23	0.23	0.2	0.24	0.2	0.2	0.24
24	0.3	0.3	0.28	0.3	0.3	0.3	0.31	0.31	0.31	0.3	0.31	0.3	0.3	0.32
25	0.3	0.4	0.36	0.4	0.38	0.4	0.39	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
26	0.4	0.4	0.43	0.4	0.45	0.5	0.47	0.48	0.48	0.5	0.48	0.5	0.5	0.48
27	0.5	0.5	0.52	0.5	0.54	0.6	0.55	0.56	0.56	0.6	0.56	0.6	0.6	0.56
28	0.6	0.6	0.6	0.6	0.62	0.6	0.63	0.64	0.64	0.6	0.64	0.6	0.6	0.64
29	0.6	0.7	0.68	0.7	0.71	0.7	0.7	0.73	0.73	0.7	0.73	0.7	0.7	0.73
30	0.7	0.7	0.77	0.8	0.79	0.8	0.8	0.81	0.81	0.8	0.81	0.8	0.8	0.81

Anexos

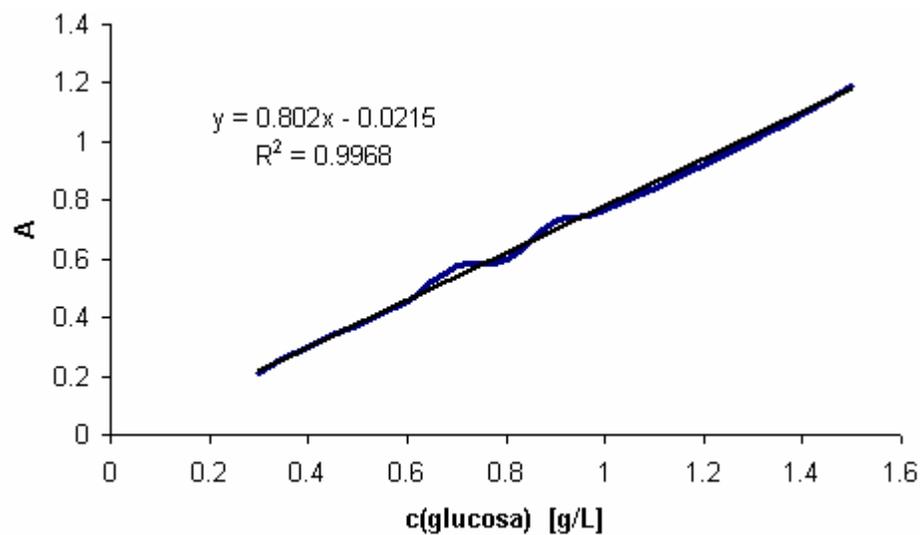
Anexo No.2

Datos para confeccionar la curva de calibración

c(glucosa) [g/L]	A
0.3	0.211
0.4	0.298
0.5	0.377
0.6	0.453
0.7	0.575
0.8	0.598
0.9	0.725
1.0	0.771
1.3	1.006
1.5	1.187

Anexo No.3

Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores totales



Anexos

Anexo No. 4

Tabla Alcoholimétrica

% C₂H₅OH en volumen	Peso específico	% C₂H₅OH en volumen	Peso específico
0	1.0000	13	0.9826
1	0.9985	14	0.9814
2	0.9970	15	0.9802
3	0.9956	16	0.9790
4	0.9941	17	0.9778
5	0.9927	18	0.9767
6	0.9914	19	0.9756
7	0.9901	20	0.9744
8	0.9888	21	0.9733
9	0.9875	22	0.9721
10	0.9862	23	0.9710
11	0.9850	24	0.9698
12	0.9838	25	0.9686

Anexo No.5

Análisis estadístico de la influencia de las concentraciones de inóculo de bacterias lácticas y extracto de levadura, empleando como sustrato la glucosa, sobre el pH.

Analysis Summary

Estimated effects for pH

A:Inoculo = 0.1325 +/- 0.0228674
B:Ext. Levad. = 0.3825 +/- 0.0228674
AB = 0.0725 +/- 0.0228674

Analysis of Variance for pH

Source Sum of Squares Df Mean Square F-Ratio P-Value

A:Inoculo 0.0351125 1 0.0351125 33.57 0.0102
B:Ext. Levad. 0.292612 1 0.292612 279.79 0.0005
AB 0.0105125 1 0.0105125 10.05 0.0505

R-squared = 99.081 percent
R-squared (adjusted for d.f.) = 98.3917 percent
Standard Error of Est. = 0.0323393
Mean absolute error = 0.01875
Durbin-Watson statistic = 1.80279

Anexos

Anexo No.6

Análisis estadístico de la influencia de las concentraciones de inoculo de bacterias lácticas y extracto de levadura, empleando como sustrato la glucosa, sobre la acidez total.

Analysis Summary

Estimated effects for Ac. Tot.

A:Inoculo = 0.0775 +/- 0.00629153
B:Ext. Levad. = 0.0975 +/- 0.00629153
AB = 0.0325 +/- 0.00629153

Analysis of Variance for Ac. Tot.

Source Sum of Squares Df Mean Square F-Ratio P-Value

A:Inoculo 0.0120125 1 0.0120125 151.74 0.0012
B:Ext. Levad. 0.0190125 1 0.0190125 240.16 0.0006
AB 0.0021125 1 0.0021125 26.68 0.0141

R-squared = 99.2887 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 98.7551 percent

Standard Error of Est. = 0.00889757

Mean absolute error = 0.004375

Durbin-Watson statistic = 2.97368