

UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS

FACULTAD DE QUIMICA-FARMACIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA



Trabajo de Diploma

"Estudio de la obtención de alcohol etílico a partir de sorgo"

Autor: Leyanis Rodríguez Rodríguez

Tutor: Dra. Irenia Gallardo Aguilar

2004-2005

"Año de la Alternativa Bolivariana para las Américas"

Resumen

En el presente trabajo se realizó una investigación preliminar para la obtención de alcohol a partir de sorgo. Para ello primeramente se llevó a cabo una revisión bibliográfica sobre el proceso de obtención de alcohol por fermentación y las materias primas utilizadas, prestando particular atención a los cereales y a los métodos de sacarificación de los mismos. En la realización de los experimentos se utilizaron dos variedades de sorgo: UDG-110 y CIAP-74V-04; el primero fue malteado para usarse en las muestras donde se combinaban la sacarificación ácida y enzimática, con presión; mientras que el CIAP-74V-04 se utilizó en los experimentos con sacarificación ácida donde se tuvieron en cuenta diferentes variables como son: relación sólido / líquido, concentración del ácido y tiempo de cocción. Los experimentos con sacarificación ácida reportaron resultados menores a los sacarificados con la combinación de ácido y malta tratados a presión.

Abstract

This present work was carried out as a preliminary investigation for the obtaining of alcohol starting from sorghum. For it firstly was carried out a bibliographical revision on the process of obtaining of alcohol for fermentation and the materials used for this operation, paying particular attention to the cereals and the methods of saccharification of the same ones. In the realization of the experiments two sorghum varieties were used: UDG-110 AND CIAP-74V-04; the first one was malted to be used in the samples where they combined the sour and enzymatic saccharification with pressure; while the CIAP-74V-04 was used in the experiments with sour saccharification where they were kept in mind different variables as they are: relationship solid / liquid, concentration of the acid and time of cooking. The experiments with acid saccharification reported smaller results to the saccharification with the acid combination and malt treatments with pressure.

Índice

	Pág
Introducción_____.	1
Capítulo I: Revisión bibliográfica	
1.1. Procesos de fabricación de alcohol etílico_____.	4
1.2. Producción industrial de alcohol por fermentación. Su importancia actual_____.	4
1.2.1. Materias primas utilizadas en la producción de alcohol etílico__.	6
1.3. Preparación y sacarificación de las masas_____.	7
1.4. Sacarificación ácida y enzimática de los cereales y otros materiales amiláceos_____.	10
1.4.1. Preparación de la malta_____.	12
1.5. Fermentación_____.	18
1.5.1. Mecanismo de conversión en la fermentación_____.	20
1.5.2. Procesos de fermentación_____.	22
1.5.3. Fermentación de Cereales_____.	24
1.6. Sorgo_____.	28
1.6.1. Origen del sorgo_____.	28

1.6.2. Uso y propiedades del sorgo_____.	29
Capítulo II: Desarrollo experimental para la obtención de alcohol a partir de sorgo	
2.1. Influencia de diferentes variables en la obtención de alcohol de sorgo mediante el método de hidrólisis ácida_____.	32
2.1.1. Técnica general seguida para el desarrollo de los experimentos.	34
2.2. Estudio de la obtención de alcohol de sorgo mediante el método combinado de hidrólisis ácida con malta_____.	44
2.2.1. Malteado del sorgo_____.	44
2.2.2. Experimentos realizados a presión con una combinación de sacarificación ácida y enzimática_____.	46
2.3. Obtención de alcohol a partir del jugo de la caña de sorgo dulce__.	51
2.3.1. Obtención del jugo y su preparación_____.	51
2.3.2. Preparación del prefermento_____.	52
2.3.3. Preparación del fermento_____.	52
2.3.4. Obtención del alcohol_____.	53
2.4. Esquema para las etapas de malteado y obtención de alcohol a partir de sorgo_____.	54
2.4.1 Esquema resumen de las etapas para una planta de producción de malta_____.	54
2.4.2. Esquema resumen de las etapas, para una planta de producción de alcohol_____.	55
2.5. Análisis de los resultados.	56

Conclusiones_____.	59
Recomendaciones_____.	60
Bibliografía_____.	61
Anexos	

Introducción

El inminente peligro de enfrentar una crisis energética desencadenada a partir del incremento brusco en los precios internacionales del petróleo, como la ocurrida en la década de los años 70, reviste en la actualidad una gran preocupación e incertidumbre por las consecuencias desastrosas que generaría para muchos países subdesarrollados, que no disponen de reservas naturales propias de combustibles fósiles.

No resulta nada difícil predecir que el petróleo siendo un combustible fósil de amplio uso y por tanto, potencialmente agotable, podría disminuir significativamente en el mediano o largo plazo sus reservas naturales, debido al notable y significativo incremento del consumo mundial, elevando con ello sus precios a niveles imprevisibles como viene aconteciendo en los actuales momentos.

Es por otra parte de todos conocido, el efectivo instrumento de dominio y manipulación política que significa el petróleo para las naciones que lo poseen, lo cual representa un peligro real y permanente de crisis que no debe obviarse y mucho menos descuidarse o desatenderse.

Esta situación debe, por su importancia, trascendencia y actualidad, despertar el interés y la atención de los países potencialmente afectados, entre ellos los que no disponen de este recurso natural, sometiendo a revisión y estudio los

recursos disponibles y sus necesidades energéticas, procurando diagnosticar y principalmente evaluar la viabilidad real de aprovechamiento de las Fuentes Alternativas de Energía Renovables en el plano nacional.

Mundialmente en las últimas décadas, el alcohol (etanol) ha alcanzado notable desarrollo como fuente alternativa de energía, teniendo un cambio sensible a partir de 1973 debido a:

- Aumento súbito de los precios del petróleo, debido a la crisis energética
- Los métodos atractivos de fermentación para su obtención
- Nuevas materias primas estudiadas para su producción con carácter renovable, donde continúa siendo la más atractiva la caña de azúcar.

Actualmente la demanda de alcohol es superior a las posibilidades de suministro y la materia prima tradicionalmente empleada, la miel final de caña cada día es más cotizada debido al incremento de las producciones biotecnológicas. Resultado de vital importancia es incrementar los niveles de producción a fin de satisfacer dicha demanda. Un aumento de la eficiencia global de producción de etanol tanto técnica como económica solo puede lograrse a través de las producciones integradas de azúcar-etanol o mediante la búsqueda de otras materias primas para su producción como biomásas celulósicas tales como plantas herbáceas y leñosas, residuos agrícolas y forestales, otros como el sorgo, papa, trigo, frutas, desechos vegetales y una gran parte de los residuos municipales e industriales.

Problema científico:

El sorgo es una materia prima amilácea, la cual ha sido empleada como forraje y en países africanos es muy utilizado para la producción de cervezas. En la UCLV hace varios años se desarrollan investigaciones para el desarrollo de su cultivo y se han realizado experiencias para emplearlo como extensores en varios productos alimentarios como: embutidos, café, etc y en la producción de cerveza como adjunto cervecero sustituyendo a la cebada, sin embargo no ha

sido explotado en toda su dimensión como por ejemplo en la producción de alcohol.

De acuerdo a esta problemática se plantea la siguiente

Hipótesis:

Es posible hidrolizar los almidones contenidos en el sorgo y convertirlos en azúcares fermentescibles por tratamiento ácido a altas temperaturas para la producción de etanol o por vía enzimática.

Para la solución a la hipótesis planteada se propusieron los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Estudiar a escala de laboratorio la obtención de alcohol etílico utilizando la sacarificación de diferentes tipos de sorgo, por vía ácida y mediante sacarificación enzimática con sorgo malteado.

Objetivos específicos:

1. Continuar estudio bibliográfico sobre la temática de investigación.
2. Estudiar el malteado del sorgo a escala de laboratorio con el objetivo de usarlo como agente enzimático en la obtención de alcohol.
3. Desarrollar los experimentos a escala de laboratorio para la obtención del alcohol a partir de diferentes tipos de sorgo por vía ácida y por vía enzimática, teniendo en cuenta diferentes variables.
4. Proponer sobre la base de los mejores resultados de laboratorio un esquema para la obtención de alcohol a partir de sorgo.

Capítulo I: Revisión bibliográfica

1.1. Procesos de fabricación de alcohol etílico.

El etanol es un líquido incoloro, volátil, con un olor característico y sabor picante. También se conoce como alcohol etílico. Sus vapores son más pesados que el aire.

Puede obtenerse, principalmente, al tratar etileno con ácido sulfúrico concentrado y posterior hidrólisis. Algunas alternativas de síntesis son: hidratación directa de etileno en presencia de ácido fosfórico a temperaturas y presiones altas y por el método Fischer-Tropsch, el cual consiste en la hidrogenación catalítica de monóxido de carbono, también a temperaturas y presiones altas.

De manera natural, se obtiene a través de los procesos de fermentación que dependen de la naturaleza de la materia prima. **(Etanol <http://www.sedespa.gob.mx>)**

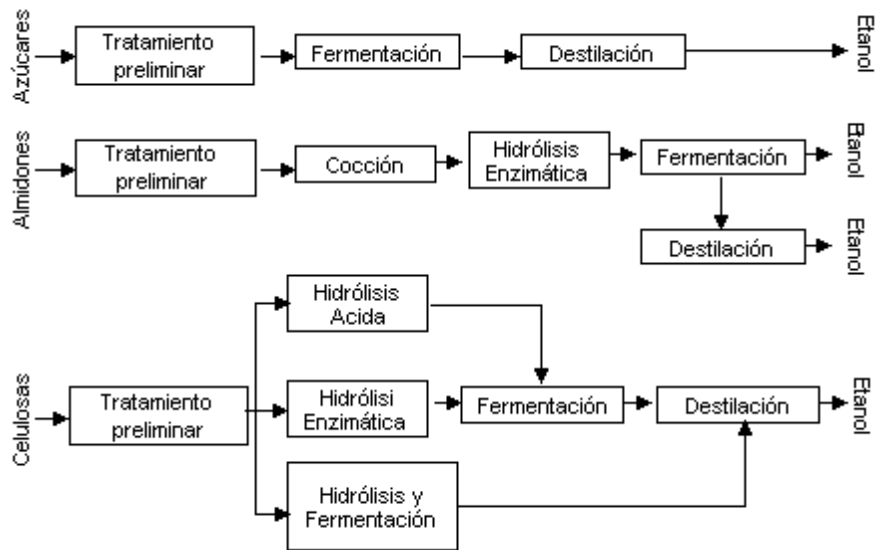
1.2. Producción industrial de alcohol por fermentación. Su importancia actual.

Una de las fermentaciones industriales mas importantes y mejor conocidas es la que da lugar al alcohol etílico al actuar las levaduras sobre los azúcares. El fabricante químico, el cervecero, el destilador, el panadero, el fabricante de vinagre, el científico y aún el ama de casa, aprovechan en mayor o menor grado la cualidad que tiene la levadura de transformar los azúcares en alcohol, CO₂ y otros productos finales. Puesto que gran cantidad de residuos que contienen hidratos de carbono, de precio muy reducido, pueden aprovecharse en la fabricación de alcohol etílico, el valor actual de los procesos de fermentación tiende a crecer en el futuro. Ha adquirido gran importancia la producción de alcohol etílico por fermentación a causa de los intentos para hallar sustitutivos de la gasolina; en especial la que contiene un 10% de alcohol etílico, puede emplearse satisfactoriamente en el tipo actual de motor de combustión interna.

La demanda de combustibles para motores es hoy día enorme, mientras que las fuentes de petróleo son limitadas.

Es una novedad el empleo del etanol como materia prima en la producción de pilas combustibles de hidrógeno.

Las materias sacaroideas requieren por lo general, poco o ningún tratamiento preliminar aparte de la dilución; pero las materias amiláceas y celulósicas deben ser hidrolizadas a azúcares fermentescibles antes que actúen sobre ellas la levadura. Después de la fermentación puede llevarse a cabo una destilación para obtener un producto con una mayor cantidad de alcohol, como se muestra en el siguiente esquema:



(<http://66.102.7.104>)

En todos los procesos la eficacia depende del tratamiento preliminar, en caso de haberlo; del empleo de una concentración óptima de azúcar, de un pH y temperatura óptimos; de la adición de sustancias nutritivas al mosto si este estuviera falto de algún constituyente esencial; de la inhibición del crecimiento bacteriano; el empleo de una variedad fuerte de levadura con alta tolerancia alcohólica y capaz, por tanto, de producir grandes cantidades de alcohol; del mantenimiento de las condiciones anaerobias adecuadas durante la fermentación, y de la inmediata destilación del mosto fermentado. **(Fabelo J.A. 1999).**

1.2.1. Materias primas utilizadas en la producción de alcohol etílico.

Las materias primas vegetales que pueden potencialmente emplearse para producir alcohol son muy diversas, aunque genéricamente se incluyen preferencialmente aquellas ricas en hidratos de carbono, las cuales pueden agruparse en dos categorías desde el punto de vista de la fermentación:

a) Directamente Fermentables

b) Indirectamente Fermentables

De acuerdo con esas categorías, las primeras (directamente fermentables) no requieren de transformación previa en hidratos de carbono, como sucede con la Sacarosa, la Glucosa y la Fructuosa. En el caso de las fuentes indirectamente fermentables sí es necesario realizar la conversión previa en carbohidratos, para someterlas luego a fermentación con el objeto de que puedan ser asimiladas por la Levadura Alcohólica, tal es el caso de los almidones y la celulosa.

Las principales fuentes de carbohidratos de acuerdo con esos criterios son:

Directamente Fermentables

Glucosa: Pulpa de Frutas

Fructuosa: Pulpa de Frutas

Sacarosa: Caña de Azúcar, Remolacha Azucarera, Sorgo Sacarino (tallos)

Indirectamente Fermentables

Almidón: Yuca, Maíz, Camote, Papa, Granos de Cereales, Tubérculos, Bananos

Celulosa: Madera, Bagazo y Paja de Caña, Cáscaras de Maní, Tusa de Maíz, Paja de Arroz, Palma.

Aunque todas esas fuentes de Carbohidratos puedan ser fermentadas, deben considerarse inicialmente aquellas que presentan alta concentración de ese componente en la materia prima, para lo cual debe a su vez presentar alta productividad agrícola (t/ha), rendimientos de Alcohol y rentabilidad (¢/litro).

Tanto el almidón como la celulosa deben en primera instancia ser convertidos (Desdoblados) en azúcares fermentables, antes de ser sometidos a la fermentación alcohólica; la transformación de la celulosa es en este caso un proceso químico mucho más difícil.

La conversión de las sustancias amiláceas se conoce como sacarificación, la cual se puede realizar por medio de procesos ácidos (Sulfúrico y Clorhídrico) o preferentemente biológicos (Enzimas Amilolíticas). El proceso de

desdoblamiento del almidón envuelve la hidrólisis de los puntos de unión (enlaces) de las moléculas de glucosa.

En las destilerías el proceso de sacarificación es desarrollado en el sacarificador, que es un tanque dotado de dispositivos que favorecen el calentamiento, enfriamiento y agitación de la materia prima tratada.

1.3. Preparación y sacarificación de las masas.

Las masas se pueden preparar usando o no ácidos, enzimas y vapor a presión. A continuación se describen algunos de los métodos empleados en la actualidad en escala de laboratorio o comercial.

1. Método de Hao, Fulmer y Hundercofler – Se colocan en un erlenmeyer de 500ml 60g de harina de maíz y 300ml de HCl 0.04N, y se mezclan cuidadosamente. El almidón del maíz se gelatiniza calentando la mezcla (agitando de vez en cuando) con una llama pequeña o una plancha caliente.

La masa se coloca entonces en una autoclave y se trata con vapor a una presión de 1.4 atm durante 30 min. El pH de la masa cocida y esterilizada se ajusta a 4.5-5.0 con NaOH, CaCO₃ o Na₂CO₃. La masa, a una temperatura de 30° C se coloca en un mezclador y se añade salvado enmohecido en suspensión en agua. Tras agitar durante un minuto la mezcla se devuelve al erlenmeyer de 500ml y se inocula 1hr a 30° C para sacarificar los almidones solubles. En algunas experiencias de conversión se empleo también una temperatura mayor (55° C) y tiempos distintos: 1 a 3hr. Hao y sus colaboradores inoculan una masa como la indicada con 20ml de un cultivo de 24hr de una raza especial de *S. cerevisiae* desarrollada en caldo-extracto de malta al 10 %.

2. Método de Roberts, Laufer, Stewart y Saletan- Roberts y colaboradores han empleado 2 tipos diferentes de masa. Se describen a continuación con las denominaciones de tratamiento de sobre presión y tratamiento a la presión atmosférica.

Tratamiento con sobre presión.- A 400ml de agua, que se ha calentado previamente a 50° C durante 15 min., y luego se sube la temperatura en 15

min. hasta 66° C., a cuya temperatura se mantiene durante 30 min. De nuevo se asciende la temperatura en 15 min. hasta 93° C, y se mantiene durante otra media hora. Finalmente se calienta la masa con vapor durante 1h a la presión de 1.4 atm y se enfría después hasta la temperatura de conversión.

Tratamiento a la presión atmosférica.- Este procedimiento es idéntico al anterior hasta el momento en que la temperatura se asciende a 66° C. La masa se mantiene a esta temperatura durante 55 min. y se enfría después rápidamente hasta la temperatura de sacarificación (en 5 min.). **(S.C. Prescott,1952)**

La sacarificación se efectúa bien a 30 o' a 52.5° C. Se prepara una suspensión de salvado enmohecido (Polidasa-C) a una concentración de 2.5 a 4%, siendo el peso total del grano y del agente sacarificante en todo caso de 100g y manteniendo la masa a la temperatura de sacarificación durante 15 min. Se añade entonces la suspensión sacarificante a la masa y se mantiene durante 30 min a la temperatura de sacarificación especificada.

Normalmente el maíz es el principal cereal que se utiliza en la producción de alcohol etílico en Estados Unidos.

Tratamiento preliminar. El maíz con o sin los gérmenes se muele, se mezcla con agua y se cuece con vapor a presión para gelatinizar el almidón. Se conduce la masa a una cuba convertidora, donde se le adiciona agua. Después de reducir la temperatura de la masa hasta unos 60° C, se le añade malta de cebada. Las enzimas que contiene la malta convierten gran parte del almidón del maíz en un azúcar fermentable (maltosa) y desdoblán también parte de las proteínas. El maíz se puede sacarificar empleando salvado enmohecido, ácido u otro procedimiento adecuado. La masa que contiene el almidón sacarificado se lleva a un fermentador, se diluye con agua hasta la concentración adecuada de azúcar, se enfría hasta una temperatura de 20 a 30° C y se inocula con levadura.

Algunos empleos especiales. El etanol fabricado de maíz se considera especialmente indicado para ciertos usos por estar libre de olores extraños.

Pueden emplearse, por ejemplo, para la fabricación de perfumes, extractos aromáticos y productos medicinales puros.

También se obtiene a partir de **trigo**.

Casi 28 millones de HI. de alcohol se produjeron en EE.UU. a partir de trigo y sus productos, desde fines de 1942 hasta julio de 1945, según Boruff y Van Lamén. El trigo se empleó como materia prima hidrocarbonada a causa de la gran demanda de alcohol, la falta de melazas y la superabundancia de trigo durante los primeros años de la segunda guerra mundial. Sin embargo, los destiladores carecían de experiencia en el empleo de trigo, y con frecuencia no poseían las mejores condiciones para su tratamiento y para la recuperación de los subproductos. Por otra parte, se formaba considerable cantidad de espuma cuando la concentración de trigo era grande.

Starch, Kolachov y Willkie comunican sus conclusiones en relación con el uso del trigo en la producción de alcohol. Encuentran que los tipos blancos y blandos de trigo *Red Winter* son los más adecuados para la producción de alcohol; que los trigos *Durum* y *Red Spring* duro, no suelen ser adecuados a causa de su bajo contenido de almidón; y que el trigo *Red Winter* duro es un intermedio entre estos dos grupos. Observan que la cocción a presión por los métodos continuo o discontinuo, o a la presión atmosférica a 68° C resulta plenamente satisfactoria.

La cocción del trigo a presión en proceso continuo se efectúa de la forma siguiente: El trigo blando *Red Winter* (tipo 1) molido de forma que el 55% permanezca en el tamiz de 20 mallas, se mezcla con agua y la precocción se efectúa a 63° C con adición de la cantidad de malta necesaria, y durante 10 min; se pasa a continuación por un calentador de chorro a 178° C en el que se mantiene durante 1 min enfriando después a 66.7° C en operación continúa. En el proceso de tratamiento a la presión atmosférica a 68.3° C se calienta agua (260 l por HI) a 43.5° C y se le añade el trigo molido según se le indicó anteriormente. La mezcla se calienta a 68.3° C en 45 min. y se mantiene a esta temperatura durante 1 hr. Luego se enfría la masa a la temperatura de

conversión (63-64.5° C) y se añaden los agentes de conversión. Se efectúa la conversión en 30 min. **(S.C. Prescott,1952)**

1.4. Sacarificación ácida y enzimática de los cereales y otros materiales amiláceos.

Los cereales, hortalizas y otros materiales amiláceos se pueden sacarificar empleando ácidos como el HCl o el H₂SO₄. En general, los productos a convertir se maceran o muelen, se mezclan con una cantidad determinada de agua acidulada y se tratan con vapor a presión.

Tras la sacarificación los mostos se ajustan al pH conveniente para la fermentación, con NH₄OH, NaOH, Na₂CO₃ o CaCO₃. El uso del NH₄OH es particularmente conveniente, puesto que el amoníaco puede actuar como fuente de nitrógeno para las levaduras. Si se emplea H₂SO₄ para la conversión del almidón y se neutraliza subsiguientemente con CaCO₃, el CaSO₄ precipitado se puede separar del mosto por sedimentación y filtración o por simple filtración.

Se ha investigado la sacarificación de diversas masas de cereales con HCl. Los rendimientos máximos de etanol de los cereales sacarificados con ácidos, son, en promedio, algo menores que los que se obtienen en la sacarificación con malta. Los rendimientos más altos de etanol a partir de maíz, se obtuvieron cuando la masa se calentó durante 2-3 hr a una presión de vapor de 1.7 atm en presencia de HCl 0.1N.

Otros investigadores han demostrado que se pueden obtener rendimientos normales de etanol por adición de salvado enmohecido a las masas sacarificadas por los ácidos. Su procedimiento para la preparación de masas sacarificadas ácidamente, basado en las condiciones óptimas encontradas por Severson, es el siguiente: - en una serie de matraces erlenmeyer de un litro se coloca en cada uno 100g de harina de maíz y 500ml de HCl 0.1N, y la mezcla se cuece durante 2.5hr a una presión de vapor de 1.7atm. El pH de las masas cocidas se ajusta a 5.0 con NH₄OH concentrado. A las masas sacarificadas por el ácido se añaden por presiones pesadas de los materiales aminolíticos

(enzimáticos) y la sacarificación final se efectúa a 55° C en 60min. Un examen realizado indica que los mejores resultados se consiguen con salvado enmohecido. Schoene y sus colaboradores sugieren que los rendimientos aumentados que resultan del uso del salvado enmohecido se deben a la gran variedad de enzimas que contiene. Por ejemplo, el salvado enmohecido contiene emulsina, una enzima capaz de hidrolizar a la gencibiosa (disacárido que se puede formar durante la sacarificación ácida) a glucosa.

Mezclas de salvado enmohecido y harina de soja también producen incremento en los rendimientos de etanol a partir de masas de maíz sacarificadas con ácidos.

Según Hayek y Shriner, las masas amiláceas se pueden hidrolizar satisfactoriamente, empleando ácido sulfuroso. Demuestran que el almidón puro se convierte completamente en glucosa en 15min, a 165° C, en presencia de 0.2 a 0.4 % de SO₂; que las masas de maíz se hidrolizan a 160° C en 15min, con 2% de SO₂; y que las masas de trigo se hidrolizan en 10 min. a 165-170° C, con 2% de SO₂. El SO₂ se puede eliminar con facilidad de las masas sacarificadas, e iniciar, la fermentación. Los rendimientos de etanol obtenidos a partir de masas hidrolizadas con SO₂ se pueden comparar favorablemente con los conseguidos usando masas convertidas con malta **(S.C. Prescott,1952)**

El pH de las masas sacarificadas con ácidos se debe ajustar antes de la inoculación con levadura u otro agente de fermentación.

En los estudios de obtención de alcohol usando productos enzimáticos se menciona la malta de la cual se hace referencia a continuación.

1.4.1. Preparación de la malta:

La malta es un producto enzimático que se prepara por lo general de cebada seleccionada, aunque pueden emplearse en su lugar otros cereales. La fabricación de la malta, generalmente llevada a cabo en las malterías, consiste en remojar la cebada seleccionada y cribada, dejándola germinar y secándola en condiciones cuidadosamente reguladas.

Selección de la cebada:

La cebada debe ser de una buena variedad, con preferencia de granos grandes, de tamaño bastante uniforme y de un color amarillo claro cuando está madura. Debe tener gran poder germinativo, contener poca cantidad de sustancias amargas y agrias en la cáscara y, además, tener la propiedad de producir enzimas apropiadas en calidad y cantidad durante la germinación. En los Estados Unidos la malta se prepara principalmente de cebada de seis filas de granos, aunque en California se emplea también la de dos filas, que en Europa utilizan en grandes cantidades

Composición de la cebada:

La cebada contiene las cuatro proteínas vegetales: gluteína, hordeína, leucosina y edestina, la gluceína y la hordeína se encuentran principalmente en la cáscara y en la capa de aleurona; la leucosina y la endestina en el endospermo, entre los granos de almidón

El almidón se encuentra en el endospermo y es uno de los constituyentes más importantes. Se encuentra grasa, rica en lecitina, en el embrión y en las capas de aleurona. Los taninos y las resinas amargas están situados principalmente en la cáscara y junto con las proteínas se denominan colectivamente ácido testínico.

Almacenamiento, lavado y graduado:

Tras la recepción en la planta de malteado, el cereal se pesa, almacena, lava y gradúa. Debe almacenarse en cubas separando las diversas variedades. De las cubas se transporta a los lavadores, que pueden ser de diversos tipos y construcciones, pero que emplean generalmente espiradores para separar por venteo los materiales ligeros, como el polvo, y tamices para la separación de piedras, cebada partida y otros materiales extraños. La cebada se gradúa después por tamaños, y se lleva cada graduación diferente a un tanque de depósito diferente, para ser tratada por separado.

Remojo:

Este es el proceso por el que se empapa el grano con el fin de que tome humedad suficiente para excitar las células vivientes del embrión y dar comienzo

a los procesos de producción de enzimas y germinación, que preceden a la rotura de las paredes de las células y a la hidrólisis de los alimentos en ellas almacenados.

Antes de mojar la cebada debe pasarse por un cedazo para que todos los granos tengan un tamaño uniforme. Así puede controlarse mejor el contenido de humedad durante el remojo.

Cada grano ha de adquirir un grado de humedad de 45 a 47 %; esta concentración de agua favorece la germinación normal.

El agua empleada debe tener una composición química conocida y un pH definido, puesto que la composición del agua tiene importancia para quitar adecuadamente los taninos, resinas amargas y ciertas proteínas que no son de desear en las cervezas; un pH elevado disuelve mejor estas sustancias. Por esta última razón a veces se alcaliniza con cal el agua de remojo, aunque parece ser que el agua alcalina no resulta ventajosa cuando la malta, y por tanto la cerveza, se ha hecho de cebadas de piel fina, siéndolo, en cambio, para las más ordinarias.

A veces se han empleado para el agua de remojo hipocloritos y permanganatos, pretendiendo que pueden estimular la germinación y destruir los microorganismos perjudiciales del agua; pero no se ha establecido con firmeza su utilidad.

La velocidad con que los granos absorben el agua depende principalmente de la variedad de cebada, del tamaño del grano y de la temperatura del agua.

Es satisfactoria para los tanques de remojo una temperatura de 10 a 15° C, que ha de controlarse adecuadamente.

El maltaje es un proceso vital que afecta el desarrollo y la respiración. La velocidad de respiración aumenta con la temperatura y el contenido de agua; naturalmente es necesaria la presencia de oxígeno, por lo que ha de airearse el agua de remojo. Con este aireamiento se hacen subir a la superficie del depósito, de donde pueden separarse fácilmente, las materias extrañas y granos de cebada defectuosos o huecos.

Uno de los métodos de aireamiento consiste en sacar el agua y llenar de nuevo el depósito.

El remojo deficiente da lugar a una reducción de la velocidad de respiración, un crecimiento anormal de las raicillas y un desdoblamiento incompleto de las proteínas. El producto final dará menos extracto.

El remojo excesivo conduce a la producción de mayor porcentaje de granos no germinados a causa de la escasez de oxígeno disponible durante el remojo, por el aumento de la velocidad de respiración. Si el agua se airea debidamente, los granos germinarían; pero es probable que el desarrollo sea anormal. De ahí que un remojo excesivo pueda conducir a producciones bajas de malta.

Germinación:

Durante la germinación tienen lugar varios cambios complejos. Los cambios morfológicos visibles son la formación de la plúmula y las raicillas. Un examen histológico nos mostraría que han desaparecido las paredes de las células del endospermo, mientras que un análisis bioquímico indicaría ciertos cambios en el metabolismo. La germinación es la escisión de las proteínas, almidones y otros constituyentes complejos, por influencia de las enzimas. Las enzimas se desarrollan o activan cuando la temperatura, humedad y las condiciones de aireación son satisfactorias para la germinación de la semilla.

Durante la germinación son muy importantes la temperatura, el contenido de humedad de los granos y el abastecimiento de oxígeno. Se controlan cuidadosamente estos factores en compartimientos o en tambores rotatorios. Los compartimientos son generalmente largos y estrechos. Van previstos de fondo de metal perforado, que permite el paso de aire de temperatura regulada y debidamente humidificado, y el drenaje hacia fuera del agua. Transportadores o canalones distribuyen la cebada empapada sobre el suelo del compartimiento. Durante el proceso de germinación la cebada se airea con aire humedecido y se revuelve con impulsores especiales de tornillos que se mueven constantemente adelante y atrás, de un extremo a otro del compartimiento; el conjunto puede ser

también irrigado desde la parte superior. La temperatura del grano se mantiene entre 15 y 21° C, regulando la temperatura con el aire que entra. En los tambores rotatorios, el aire humedecido y de temperatura regulada entra en cada tambor a través de una serie de tubos localizados cerca de la periferia, mientras que el tubo de salida se halla cerca del centro. Los tambores giran lentamente, en general a 1 ó 2 rpm durante el proceso de germinación. La germinación suele requerir de 5 a 7 días. El proceso ha terminado cuando la acrospora ha crecido una longitud igual a las tres cuartas partes de la longitud del grano.

Durante la germinación es especialmente importante el abastecimiento de oxígeno para aumentar la velocidad de respiración del grano. Como resultado de la respiración se desprende energía térmica, y se producen como productos residuales dióxido de carbono y agua. La acumulación de CO₂ inhibe la respiración normal y su concentración o una deficiencia de oxígeno, o ambas cosas a la vez, conducen a una respiración anormal en la que pueden funcionar en vez del oxígeno otros aceptores de hidrógeno. Entre los productos formados durante la respiración anormal puede haber ácidos, alcoholes y aldehídos, los cuales ejercen un efecto tóxico sobre el grano que germina o sobre la planta joven. La cebada en germinación suele tener un coeficiente respiratorio aproximado de 1.

$$\text{Coeficiente respiratorio} = \frac{\text{volumen de CO}_2 \text{ desprendido}}{\text{Volumen de O}_2 \text{ absorbido}}$$

En caso de respiración anormal aumenta el coeficiente respiratorio, pues aumenta el CO₂ desprendido o disminuye el oxígeno absorbido, o tienen lugar ambas cosas a la vez.

Por estos motivos es muy importante asegurar la separación completa de CO₂ y remover y airear debidamente la cebada que germina.

Desecación de la cebada germinada:

Cuando el grano ha adquirido el crecimiento deseado, la desecación pone fin a los procesos de germinación; con la aplicación del calor se desarrollan color, sabor y aroma y se reduce el contenido de humedad de la malta. Es conveniente

una humedad del 5 %, que permite almacenar la malta sin peligro de ser descompuesta por los microorganismos.

La desecación se lleva a cabo en cilindros giratorios controlados termostáticamente a temperaturas cuidadosamente reguladas, teniendo estas grandes influencias sobre el contenido de enzimas de la malta y el sabor de las cervezas hechas con ella. Al principio deben emplearse temperaturas bajas, porque pueden ser muy perjudiciales las excesivamente altas cuando el grano germinado está húmedo. Se eleva la temperatura gradualmente o por pequeños incrementos hasta llegar al final a unos 75-100° C.

Este valor varía con la clase de malta que se emplee: las maltas claras requieren temperaturas más bajas que las oscuras.

Durante los últimos años se ha intentado la desecación en estufas de vacío. Las maltas resultantes poseen una elevada concentración de enzimas; pero aunque son buenas para emplear en destilerías, no son adecuadas para la fabricación de cervezas, puesto que en ellas son diferentes las reacciones normales de proteínas.

Como tratamiento final se separan las radículas de los granos, generalmente por fricción.

Conversión rápida de las masas:

Gallagher y sus colaboradores han descrito un método rápido para la conversión del grano en mosto, sobre la base de los siguientes datos experimentales obtenidos en el laboratorio. Los caldos de maíz (masa, se preparan en las mismas condiciones que los de cebada y se enfrían a 62.8° C, la temperatura de conversión. A cada caldo se añade una cantidad igual de malta de cebada (10%) en forma de pasta. La mezcla de malta y maíz se agita mecánicamente y la conversión se lleva a cabo en el tiempo especificado. Las mezclas individuales se enfrían rápidamente (en 7 a 10 min.) a 22.2° C y se llevan a una concentración de 475 l de masa por Hl de grano. El pH se ajusta a 4.8-5.0. cada

masa se divide en 4 porciones, 3 de las cuales se inoculan en *S cerevisiae* (raza Segram, No. 1) y la restante se reserva como patrón. Se deja fermentar durante 68-72 h, y después se analiza el azúcar residual y el azúcar de los mostos.

Datos adicionales obtenidos por Gallagher y colaboradores demuestran que en un periodo de conversión de 1 min. es igual o mejor que un periodo de 60 min. a pH 4.5 ó 5.9, los límites inferior y superior respectivamente de los niveles óptimos generalmente empleados. Más del 70 % del almidón del grano cocido se convierte en maltosa por la malta de cebada, en 1 min. a 62.8° C.

El método rápido para la conversión de las masas es como sigue:

Una bomba de reparto inyecta continuamente una suspensión de malta, en una corriente de masa cocida que es impulsada por otra bomba. Los productos fluyen a través de un tubo de 31 m de largo y 10 cm. de diámetro, a una temperatura de 62.8° C. la malta actúa sobre el grano durante un periodo de 40 segundos. La mezcla se enfría después un periodo de 1.5 min. hasta 21.1-23.9°C. Esta unidad particular tiene una capacidad para convertir 1800 HI de grano por día.

Como se aprecia en la bibliografía consultada se reportan diferentes métodos tanto para la sacarificación con tratamiento ácido como por tratamiento enzimático, o combinadas, que son las más efectivas parece indicar, en dependencia del cereal que se utilice, como materia prima, por tanto para el estudio de una materia prima nueva, poco reportada como el sorgo, hay que ir adaptando los métodos reportados a las condiciones de esta materia prima, por lo que se impone una caracterización de la misma. **(S.C. Prescott, 1952)**

1.5. Fermentación

De todas las posibles fuentes indicadas anteriormente, para la obtención de etanol, los problemas de su disponibilidad real, la estructura de precios y el desarrollo tecnológico del procesamiento reducen la selección en términos de viabilidad económica a un número muy pequeño.

Dentro de una economía de mercado libre los sustratos pueden ser reducidos a tres materiales básicos: melazas azucaradas, maíz y tubérculos

En condiciones especiales pueden resultar inmediatamente viables otras materias primas y cuando el valor de la unidad de energía aumenta más de prisa que la mayor parte de los demás productos, pueden resultar posibilidades atractivas otras cosechas para energía. La naturaleza de las materias primas particulares utilizadas en fermentación tiene un peso considerable sobre los métodos de procesamiento empleados. Todos los constituyentes del producto agrícola son importantes, y existe una amplia disparidad entre los sustratos industriales y los utilizados con fines de investigación.

El sustrato ideal, un azúcar monosacárido, como la glucosa, a la concentración correcta, en solución acuosa estéril que contenga las proporciones adecuadas de nutrientes, no existe en la naturaleza. Además, la influencia del comercio de alcohol para consumo ha impuesto su tradición sobre la manufactura del alcohol industrial incluso aunque las características de sabor del destilado no estén ya sometidas a consideración. Demasiado frecuentemente, proyectos de alcohol industrial basados en melazas o en maíz parecen ser simples extensiones de la fabricación del ron o del whisky.

Esto es comprensible ya que la industria para consumo ha desarrollado su tecnología durante un gran número de años hasta conseguir sistemas prácticos, provechosos y seguros. Sin embargo, sirven a un mercado de lujo, de alto precio y operan a una escala menor de producción que la esperada para los proyectos del futuro orientados a la obtención de energía a partir del alcohol. La mayor parte de sus técnicas estaban establecidas cuando los costos de energía y de la materia prima eran bajos y cuando disminuir los residuos contaminantes no era considerado una necesidad social.

Todas las materias primas prácticas, requieren un pretratamiento para hacerlas adecuadas para la fermentación y en el pasado se prestó una insuficiente atención a producir un sustrato tan ideal como fuera posible dentro de las limitaciones físicas de su composición original. Para sacar ventaja de las técnicas de fermentación que ofrecen una conversión eficiente con recuperación de productos de baja energía y en las que puede ser empleado un sistema eficiente en el tratamiento de los efluentes de destilerías, el sustrato líquido debería poseer las siguientes condiciones:

- (1) La concentración de azúcares fermentables debe estar correctamente ajustada para ser adecuada a un método particular de fermentación y para asegurar que los azúcares residuales después de la fermentación sean mantenidos a un nivel mínimo.

- (2) El sustrato debería clarificarse a un pH y a una temperatura, óptimos, y debería contener los nutrientes adecuados para la levadura.
- (3) Los microorganismos de los del inóculo principal deberían ser eliminados por pasteurización, tratamientos con antibióticos o antisépticos, o esterilización, el grado y el método de eliminación dependería del sistema de fermentación empleado.
- (4) Las sustancias tóxicas para las levaduras deberían eliminarse o ser reducidas hasta un nivel aceptable.
- (5) Los efectos adversos de la presión osmótica deberían mantenerse dentro de los límites aceptables. **(Fermentación .pdf.)**

1.5.1. Mecanismo de conversión en la fermentación

El mecanismo de la fermentación fue cuantificado por primera vez por Gay Lussac, basándose en la estequiometría de la conversión de una hexosa en etanol y anhídrido carbónico:

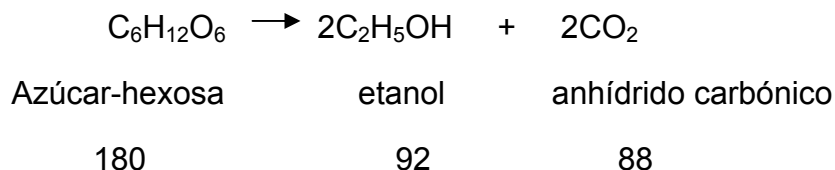


Tabla 1.1. -Rendimiento en la fermentación alcohólica.

Componentes	Peso %
Etanol	48.4
Anhídrido carbónico	46.6
Glicerol	3.3
Ácido succínico	0.6
Materia celular	1.2
Total	100.1

Por consiguiente, 100 kg de azúcar-hexosa = 51.1 kilos de etanol + 48.9 kg de anhídrido carbónico.

El rendimiento teórico de 51.1% por peso se denomina coeficiente de Gay Lussac y representa el dato básico en eficiencia de conversión.

La etapa siguiente en el entendimiento del mecanismo fue hecha por Luís Pasteur y su experimentación de hace cerca de un siglo representa un análisis decisivo en la ciencia microbiológica. Los rendimientos obtenidos de sus fermentaciones ideales de la glucosa se dan en la tabla 1.1.

Una apariencia más grande de productos comparada con el azúcar original se debe al oxígeno (del aire) y a los nutrientes procedentes de una fuente externa que es necesaria para el crecimiento celular. Por tanto, el coeficiente de Pasteur de aproximadamente 94.7% del rendimiento teórico GL (de Gay Lussac) se considera la máxima posible producción de etanol que puede ser alcanzada por fermentación.

Sin embargo, el coeficiente de Pasteur puede ser sobrepasado por la reutilización de las levaduras, o cuando el crecimiento pueda ser llevado a cabo a partir de carbohidratos no naturalmente fermentables hasta etanol. En la práctica comercial, en la que no se utiliza un sustrato ideal, las eficiencias de conversión mantenidas durante un período razonable de tiempo se encuentran normalmente en la región del 90% GL. La concentración típica de productos por 100 g de glucosa fermentada a etanol mediante levaduras se presenta en la tabla 1.2..

Las propiedades específicas de las levaduras, como la tolerancia a altas concentraciones de alcohol y CO₂, el crecimiento rápido y la capacidad de fermentación reducen el número de microorganismos adecuados viables para la operación a escala industrial a un número pequeño, de los cuales hasta el momento los más importantes son cepas selectas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces carlsbergensis*.

Tabla 1.2 Concentraciones medias de producto por 100g de glucosa fermentada en un proceso de producción de etanol que utiliza levaduras.

Producto	Variación en la concentración (g por 100g de glucosa fermentada)
Etanol	45-49
Anhídrido carbónico	43-47
Glicerol	2-5
Succinato	0.5-1.5
Alcoholes superiores	0.2-0.6
Butilenglicol	0-1.4
Materia celular	0.7-1.7

1.5.2. Procesos de fermentación

Se emplean tanto procesos continuos como discontinuos y muchos de estos incorporan alguna forma de reciclaje. Además de reducir el tiempo de fermentación, el ciclo de reciclaje reduce la cantidad de sustrato que se convierte en materia celular. En los procesos discontinuos de Melle-Boinot que han encontrado amplia aplicación, las células recuperadas después de la fermentación son recicladas al fermentador en el que se ha añadido sustrato fresco. Operaciones con niveles de levadura por encima de 15 kg de materia prima seca por m³ son comunes, con tiempos de fermentación típicamente de entre 8 y 18 h, dependiendo de la cepa de levadura, la naturaleza del sustrato y la temperatura de operación.

La mayor parte de las técnicas de fermentación rápida continua que existen actualmente como unidades comerciales, comprenden de 3 a 5 vasijas cerradas, organizadas en cascada. Cada vasija tendrá su propio sistema de refrigeración y la concentración de etanol que se acumula en cada etapa, comienza generalmente por 4% v/v en la primera vasija y alcanza el 10% v/v en la salida final. Son normales productividades del orden de 10-20 kg de etanol m⁻³h⁻¹

(basado en un volumen operativo efectivo); frecuentemente se han descrito productividades mucho más altas en sistemas de laboratorio pero estas siempre están relacionadas con sustratos ideales y dejan de considerar muchos factores esenciales como la eficiente conversión del azúcar y la instalación barata y de confianza. En comparación, los métodos discontinuos convencionales alcanzan normalmente productividades de solamente 1.5-3 kg de etanol $\text{m}^{-3}\text{h}^{-1}$. Sin embargo, una alta productividad sin relación con la eficiencia de rendimiento expresada como coeficiente de Gay Lussac carece de significado. En términos económicos, una reducción en los residuos puede ser bastante más beneficiosa que un aumento en rapidez.

Para la producción de etanol a gran escala y cuando las características del sabor no son un criterio en el método de fermentación, generalmente se acepta que una destilería debería ser totalmente continúa en todas sus unidades de operación lo cual independientemente de la fermentación, puede ser conseguido fácilmente.

Las ventajas de la fermentación continúa son:

- (1) Los fermentadores son de tamaño (o en número) reducido no siendo requeridos los de capacidades intermedias.
- (2) La destilería debe ser operada en condiciones de equilibrio y controlada dentro de los límites más finos en puntos establecidos, con mayor facilidad de operación.
- (3) Sin fluctuaciones durante las operaciones, los requerimientos de servicios son constantes, dando una mayor economía de utilización. Sin saltos de demanda, los costes del equipo relacionado puede reducirse.
- (4) Alta productividad ($\text{kg de etanol m}^3\text{h}^{-1}$) comparada con la de la fermentación discontinua.
- (5) Reducción en mano de obra.

Contra esto, las operaciones discontinuas tienen las siguientes ventajas:

- (1) Concentración más alta de producto final.
- (2) En muchos países, las condiciones intensivas de mano de obra pueden ser de la mayor importancia.
- (3) Menos dependencia del control automático y menos demanda de competencia técnica.
- (4) Abaratamiento del conjunto y sencillez en la construcción y en el mantenimiento de la planta.

La fermentación continua requiere un alto grado de asepsia para impedir la entrada y el desarrollo de contaminantes. Los sistemas discontinuos tienen flexibilidad para la limpieza rigurosa durante la vuelta completa del ciclo.

Debe siempre tenerse en cuenta que el elemento más costoso, con mucho, en la producción de alcohol es el coste de la materia prima, unos 2/3 a 3/4 del total. Incluso dentro del resto del coste, los costes de instalación y de operación en la etapa de fermentación son elementos relativamente menores. En consecuencia cualquier efecto que mejore la eficiencia de la producción de la fermentación puede fácilmente ser compensado por un aumento en el coste del capital e incluso más fácilmente anulado si la eficiencia de la conversión de la materia prima es perfectamente mantenida. Esta es la razón principal por la que los procesos de fermentación continua no han sido introducidos con la rapidez que sus inventores hubieran deseado.

1.5.3. Fermentación de Cereales

En base a peso seco el maíz, el trigo, el sorgo y otros granos contienen alrededor de 60-75% w/w de almidón hidrolizable a hexosas con un significativo aumento de peso (estequiometricamente la relación de almidón a hexosa es de 9:10) y constituyen una fuente de alto rendimiento de etanol.

La mayor parte de almidones de cereales contienen una mezcla de α -amilosa (20-30%) y amilopeptina (70-80%). La primera es un polímero lineal soluble en agua, mientras que la segunda es un polímero ramificado insoluble en agua. La

sacarificación de la amilasa es mucho más rápida que la de la amilopeptina, pero puesto que la amilopeptina predomina, la conversión global a azúcares fermentables esta gobernada por su degradación.

Originalmente los cereales fueron hidrolizados por catálisis ácida. Las conversiones eran incompletas y el requerimiento de altas temperaturas durante un extenso período de tiempo conducía a la formación de productos laterales indeseados. Los problemas de viscosidad entorpecían el proceso; frecuentemente la pasta calentada contenía también « dextrinas límite », que requieren un tiempo largo de fermentación para su catabolismo por las levaduras. Los almidones gelatinizados eran propensos a « retrogradación » al enfriarse, cuando las moléculas de almidón se reagregaban formando pequeños cristales insolubles, acompañado de aumento en la viscosidad de la papilla.

Hoy, la mayor parte de los procesos de conversión utilizan una fase de calentamiento, ayudada por la adición de enzimas para la conversión completa. A veces se practica la hidrólisis ácida seguida por la conversión enzimática pero la tendencia presente es apoyarse directamente en la hidrólisis enzimática que se lleva a cabo en dos etapas.

En la primera de licuefacción, la α -amilasa se utiliza para la dextrinización del almidón, que ocurre durante un período de tiempo relativamente corto a alta temperatura.

Los granos secos son molidos hasta un polvo fino y mezclados con agua templada. La lechada, normalmente de aproximadamente 2.5 a 3.0 kg de agua por kg de malta molida se ajusta a pH 6.0-6.5, se dosifica con una porción de enzima, se calienta por inyección con vapor hasta aproximadamente 110°C y se mantiene durante aproximadamente 20 min a presión, normalmente en tubos de mantenimiento continuo a velocidades determinadas de flujo para asegurar que sean mantenidos los factores críticos de tiempo y temperatura.

En esta etapa las uniones α -1.4 de las moléculas de almidón se rompen al azar; se forman cadenas más cortas de unidades de glucosa (dextrina), lo que resulta en una rápida reducción de la viscosidad del almidón gelatinizado. La conversión

es relativamente baja, y normalmente resulta en la formación de un equivalente de dextrosa (DE) por cada 10-15. (Esta medida de conversión se define como el porcentaje en peso de azúcares reductores calculado como dextrosa en relación al almidón seco disponible).

La pasta se enfría luego hasta aproximadamente 85-90°C. Se añade más amilasa y se mantiene la papilla en vasijas agitadas durante al menos 90 min hasta pos-licuefacción completa. La dosis relativa de enzima se establece normalmente en aproximadamente 1.5 kg de α -amilosa por toneladas de almidón. La dosis relativa varía entre destilerías, pero la economía gobierna las cantidades que se utilizan; es extremadamente difícil exceder de 20 DE.

La sacarificación a término utilizando glucoamilasa se lleva a cabo a temperatura más baja, normalmente en la región de 55-60°C, con tiempos más largos de residencia para minimizar la conversión. Tanto las uniones α -1.4 de los extremos no reductores de las moléculas, como las uniones α -1.6, se hidrolizan pasando a través de las etapas de dextrinas, maltosa y glucosa. Pueden alcanzarse niveles de 99 DE, que es normalmente 10-15% más alto que por hidrólisis ácida.

La pasta acidificada por debajo de pH 5 y el grado de dosificación con glucoamilasa depende de la temperatura, del tiempo de residencia en los fermentadores, del nivel DE después de la licuefacción y de la duración de la fermentación. Durante un tiempo de residencia de dos días a 55-60°C es típica una relación de 1.5 kg de glucosamilasa por tonelada de almidón original. De nuevo la economía del coste de la enzima dicta el uso óptimo. Después de esta etapa se lleva a cabo la dilución hasta una concentración apropiada para la fermentación. Sin embargo, la extensión a la que se complete la sacarificación antes de la fermentación es un asunto de opinión.

Los cambios en la temperatura influyen en la velocidad de la reacción enzimática de acuerdo con la ecuación de Arrhenius; de modo empírico la actividad enzimática disminuirá a la mitad por cada diez grados Celsius de reducción de temperatura. Esto significa que la actividad continua sacarificante de la

glucoamilasa durante la etapa de fermentación a aproximadamente 30-35°C, disminuye considerablemente. Sin embargo, durante las etapas iniciales de fermentación existe también una rápida eliminación de los azúcares existentes. Esto favorece la acción de la glucoamilasa y tiende a equilibrar el retraso debido a la reducción en temperatura. A medida que la fermentación avanza, cuando la concentración de etanol aumenta, la reacción de la glucoamilasa puede hacerse limitante del conjunto.

Cuando la sacarificación no es completa antes de la fermentación, el tiempo de residencia durante la fermentación se extenderá hasta alcanzar concentraciones finales razonables de etanol; las fermentaciones en las que están presentes las « dextrinas límite », requerirán varios días hasta estar completas. En condiciones diluidas para adaptarse a los niveles de fermentación, el volumen de las vasijas se convierte en un factor importante de los costos.

En este respecto, algunas de las nuevas técnicas de fermentación muestran posibilidades interesantes. Cuando el etanol se puede separar a medida que se forma, la rápida velocidad de fermentación puede ser mantenida continuamente, con una mejora correspondiente en la cinética de la sacarificación enzimática. Cuando se elimina el etanol y el reciclaje del sustrato consumido puede ser llevado a cabo sin destrucción térmica de la glucoamilasa, puede llegar a producirse una alta concentración de enzima para la misma dosis total enzimática.

Retención de la pasta

En el procesamiento convencional de los cereales, los granos triturados fermentados se mantienen en suspensión y se bombean directamente a la columna primaria de destilación en la que, en la sección de aligeramiento, se lavan efectivamente los sólidos suspendidos y se eliminan las trazas finales de etanol. El grano molido utilizado se recupera como alimento para animales mediante cribado y separación por decantación. El sistema es sencillo y barato y es el método tradicional; sin embargo la retención de la papilla tiene desventajas:

- La presencia de fibras y otros sólidos suspendidos entorpece la fermentación.
- Los métodos de fermentación quedan restringidos a operaciones tradicionales discontinuas en las que se necesita inoculación única de levaduras.

En comparación con las condiciones de fermentación de sustratos clarificados, en los que es posible recuperar y reciclar la levadura, las fermentaciones de papillas de cereales son menos eficientes en la producción de etanol y requieren tiempos más largos de residencia en vasijas de mayor tamaño.

En la actualidad, los procesos más utilizados, aunque no tan rentables para la obtención de etanol a partir de almidón, son los que realizan una hidrólisis previa para transformar este último a glucosa y, posteriormente, fermentar ésta a etanol mediante levaduras. Se ha intentado, con resultados prometedores eliminar el paso de sacarificación y licuefacción enzimática mediante el empleo de un cocultivo simbiótico de organismos amilolíticos y fermentadores de azúcares, disminuyendo así, los tiempos de producción. **(León Téllez 1997)**

1.6. Sorgo

Planta anual, originaria de la India, de la familia de las gramíneas, con cañas de dos a tres metros de altura, llenas de un tejido blanco y algo dulce y vellosas en los nudos; hojas lampiñas, ásperas en los bordes; flores en panoja floja, grande y derecha, o espesa, arracimada y colgante, y granos mayores que los cañamones, algo rojizos, blanquecinos o amarillos. Sirven estos para hacer pan y de alimento a las aves y toda la planta de pasto a las vacas y otros animales. **([www_Delariva_com](http://www.Delariva_com) -.htm)**

1.6.1. Origen del sorgo

De la familia de las Gramíneas, el género Sorghum, pertenece a la tribu de las andropogóneas. Comprende especies anuales y especies vivaces rizomoides.

Alcanza gran longitud (de 1 a 4 m.), llevando varios tallos por pie (fenómeno de ahijamiento), cada uno de los cuales lleva una inflorescencia en panícula, compacta en las especies cultivadas. Una espiga sésil, fértil, acompañada por dos espiguillas estériles pedunculadas caracteriza el género. El sorgo de grano era conocido en la **India** desde la más lejana antigüedad, pero en todo el mundo se encuentran especies silvestres más o menos adaptadas. Probablemente desde la India fue introducido a Asia anterior. Al principio de la Era Cristiana, el sorgo era conocido en la cuenca mediterránea y en África Tropical.

Desde África pasó a América con la trata de esclavos. Sólo a partir de 1876 empezó en EEUU un cultivo comercializado del Sorgo, con introducción de nuevas variedades. Gracias al progreso realizado en este país, vuelve a tomar un creciente interés en el mundo. ([14coll_es.htm](#))

1.6.2. Uso y propiedades del sorgo

El sorgo forma parte de la dieta básica de millones de personas en China, la India y África; en los países industrializados se cultiva sobre todo como planta forrajera.

El sorgo de grano del que se cultivan numerosas variedades, como milo, kafir, durra, feterita y kaoliang, es uno de los cereales más resistentes a la sequía; en condiciones de sequedad y calor extremas, la planta entra en una fase de descanso y cuando la situación mejora recupera la actividad. El sorgo puede obtener el mismo rendimiento que otros cultivos, pero empleando menor cantidad de agua. El gran número de raíces fibrosas, hace que la planta absorba eficazmente el agua. El sorgo azucarado se ha denominado "el camello de los cultivos", por su gran capacidad de adaptación, su gran resistencia a la sequía y a los suelos salino-alcalinos, y su tolerancia a las inundaciones.

Requiere un tercio del agua que consume la caña de azúcar, y su periodo de crecimiento es lo suficientemente corto para permitir cosecharlo dos veces al año. La caña de azúcar se propaga a partir de estaquillas del tallo, del sorgo se siembran las semillas y basta con 4.5 kilogramos por hectárea, en comparación con las 4 500 a 6 000 estaquillas de caña de azúcar.

El sorgo azucarado contiene en el tallo un jugo dulce, y se cultiva para obtener jarabes y como planta forrajera. Los llamados sorgos de hierba, como el sorgo sudanés y los híbridos de éste con el sorgo azucarado y con el de grano, se cultivan como plantas de forraje y pasto. El potencial del sorgo azucarado como cultivo para obtener energía -produce hasta 7 000 litros de alcohol etílico por hectárea **(Tecni-Fenalce 2001)**

A. A. Rodríguez y col. evaluaron el efecto de la adición de preparaciones enzimáticas comerciales sobre las características fermentativas de sorgo forrajero. El forraje fue cosechado a 90 días de crecimiento (20.04 % MS) y fue picado en pedazos de 2.5 cm. en la Finca Experimental Agrícola localizada en Michigan State University en East Lansing. Antes de su ensilado, el forraje picado se trató con preparaciones de enzimas que se aplicaron a razón de 1 ó 2 veces la dosis recomendada por el distribuidor. Los tratamientos experimentales incluyeron: sin aditivo (testigo), Viscozyme (0.1 % de forraje fresco), Ecogram (0.08 y 0.16 mL/kg de forraje fresco) y Celulosa G (0.25 y 0.50mL/kg de forraje fresco). Se abrieron tres silos por tratamiento después de tres períodos de fermentación (0, 40 y 100 días) y el ensilaje resultante fue analizado para determinar pH, productos de fermentación y contenido de carbohidratos solubles y estructurales. El pH del ensilado de sorgo forrajero fue similar en todos los tratamientos evaluados. El contenido de ácido acético y etanol difirió entre las preparaciones enzimáticas evaluadas y entredías de fermentación. Sin embargo, no se observaron cambios consistentes debido a ningún tratamiento. El contenido de glucosa fue mayor en sorgo ensilado con 1 ó 2 veces la dosis recomendada de Cellulase G al compararse con ensilajes sin aditivo, pero el contenido de xilosa fue menor. Ningún tratamiento experimental afectó el contenido de carbohidratos estructurales. En resumen, la adición de

preparaciones enzimáticas comerciales no tuvo un efecto consistente sobre las características fermentativas de sorgo forrajero. (ALPA 2005-90. pdf)

A continuación se muestra una tabla donde se puede comparar la composición del sorgo con otros cereales empleados en la producción de alcohol, donde el contenido de almidón y la proteína tiene valores superiores al del maíz que es uno de los cereales más empleados en la producción de alcohol. (Fermentación pdf.)

Tabla 1.3 Composición de diferentes cereales

Contenidos	Trigo	Maíz	Cebada	Avena	Sorgo
Humedad %	10,0	15,0	10,6	9,8	10,6
Almidón %	68,6	67,0	66,0	57,1	69,3
Proteína %	14,3	10,2	13,0	12,0	12,5
Grasa %	1,9	4,3	2,1	5,1	3,4
Fibra %	3,4	2,3	5,6	12,4	2,2
Cenizas %	1,8	1,2	2,7	3,6	2,0

Capítulo II: Desarrollo experimental para la obtención de alcohol a partir de sorgo

2.1. Influencia de diferentes variables en la obtención de alcohol de sorgo mediante el método de hidrólisis ácida.

Para comenzar la investigación se parte de un estudio preliminar realizado con hidrólisis ácida a dos tipos de sorgo de doble propósito (granífero-forrajero): CIAP 6G-95 y UDG-110, que reportaron resultados alentadores en cuanto a grado alcohólico y rendimiento alcohólico, para iguales condiciones de trabajo que fueron concentración de ácido clorhídrico 0,1N y tiempo de cocción 180 minutos, excepto en la muestra III en que el tiempo de hidrólisis fue menor y se enfrió bruscamente. **(Rodríguez L. & Palacios Y. 2004)**

Tabla 2.1. Valores del rendimiento alcohólico para los experimentos por vía ácida

Muestra	Tipo de sorgo	°Brix Final	°Brix inicial	Tiempo de	°Brix Final	°GL del Fermen	Rend Alcoh
---------	---------------	-------------	---------------	-----------	-------------	----------------	------------

		Hidrol	Ferment	Ferment		t	L a.a / kg.sorgo
I	CIAP 6G-95	26	19	3 días y 2 h	12.5	4.4	0,1580
II	UDG- 110	23.7	19	3 días y 6 h	12	3.6	0,1363
III	UDG- 110	22.2	16	1 día y 12 h	10	3.1	0,1135

Para sorgo con tratamiento enzimático, se reporta como promedio de 0,24-0,35 L a.a / Kg. (**Mathewson, S.W. htlm.**)

Por tanto puede afirmarse que los rendimientos son aceptables tratándose de un estudio preliminar y sin tratamiento enzimático.

Para el desarrollo del trabajo se hizo un diseño experimental fraccionado del tipo 2^{k-1} donde k sería el número de variables, en este caso 3 y para dos niveles de cada variable:

Variables	Niveles
Relación sólido / líquido (X_1)	100 – 200 g/l
Concentración del ácido (X_2)	0.05 – 0.1 N
Tiempo de cocción (X_3)	90 – 180 min.

Los niveles fueron seleccionados sobre la base de los mejores resultados obtenidos en 9 experimentos realizados con uno de los tipos de sorgo del estudio preliminar (UDG-110) utilizando concentraciones de ácido de 0.05N, 0.1N y 0.2N, relaciones sólido / líquido de 100 y 200 g/l, teniendo en cuenta experimentos reportados en la literatura para otros cereales y considerando la etapa de prefermentación en algunos casos.

Los experimentos programados, así como los niveles de trabajo aparecen reflejados en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Programación del diseño de experimento

Experimento	X₁	X₂	X₃
1	200 g/l	0.05 N	90 min.
2	100 g/l	0.05 N	180 min.
3	150 g/l	0.075 N	135 min.
4	200 g/l	0.1 N	180 min.
5	100 g/l	0.1 N	90 min.

2.1.1. Técnica general seguida para el desarrollo de los experimentos.

La metodología seguida para el desarrollo de los experimentos consta de las siguientes etapas:

Tratamiento preliminar: En esta etapa el sorgo es secado previamente para facilitar la trituración que se realiza por medio de un molino casero con el fin de reducir la granulometría y de esta forma facilitar su acondicionamiento. El cereal molido es tamizado en una malla 9 y separadas sus fracciones. Esto se hace con el fin de romper la cáscara del sorgo que es muy dura, ya que para otros cereales se reporta que el tamaño del grano no tiene influencia en la obtención de alcohol.

Hidrólisis ácida de los almidones: Se pone a calentar el ácido clorhídrico hasta una temperatura aproximadamente de 50°C y luego se le agrega el sorgo, esta mezcla se cuece durante un tiempo determinado con el objetivo de solubilizar e hidrolizar parcialmente los almidones.

Antes de pasar a la fermentación el producto obtenido de la hidrólisis ácida es filtrado a vacío y separado el jugo claro del residuo sólido para evitar así que pueda entorpecer la siguiente etapa, a este jugo se le ajusta el pH a un valor comprendido entre 4.5-5 que es el rango donde se desarrollan las levaduras. El residuo sólido puede ser utilizado como alimento animal o como abono. Debido a su pH ácido puede ser tratado químicamente con hidróxido de calcio para neutralizarlo y así no constituir una carga ambiental.

Fermentación: En esta etapa, por la acción de las levaduras, los azúcares fermentecibles son transformados en alcohol etílico y dióxido de carbono, además de otros productos en menor proporción. Aquí se incorporan los nutrientes y oxígeno inicialmente, para un mejor crecimiento y desarrollo de las levaduras, ya que se obvia la etapa de prefermentación.

Al jugo fermentado se le determina el grado alcohólico por picnometría o mediante un alcoholómetro Gay Lussac y de ser necesario se pasa a la próxima etapa.

Destilación: El alcohol producido en la fermentación es separado del mosto por destilación fraccionada en una columna de cristal de 14 platos con cazoletas de burbujeo. Se obtiene el destilado, al cual se le mide el grado alcohólico por picnometría o alcoholómetro, y por cromatografía se determina la calidad del alcohol obtenido en una primera y única destilación.

El sorgo empleado para estos experimentos es un sorgo de doble propósito el CIAP-74V-04 con un año de almacenamiento en la Estación Experimental de la UCLV. El volumen de mezcla a procesar fue de dos litros variando la cantidad de sorgo a añadir de acuerdo al diseño experimental.

La mezcla después de cocida se enfría rápidamente hasta la temperatura de sacarificación (50°C), a la cual se mantiene durante 30 min, se filtra a vacío para eliminar los sólidos, se ajusta el pH y luego se procede a la etapa de fermentación.

Las mediciones realizadas a las muestras fueron:

Determinación de los Azúcares Reductores.

Los Azúcares Reductores fueron determinados en muestras duplicadas de filtrados con el Método de Bernfeld, utilizando el Ácido 3,5-dinitro salicílico. Ver Anexo 4

Determinación de Carbohidratos Solubles Totales.

Los Carbohidratos Solubles Totales fueron determinados en muestras duplicadas de filtrados con el Método de Fenol - Acido Sulfúrico. Ver Anexo 5

Determinación de la concentración de Etanol.

La concentración del etanol fue determinada mediante el método de gravedad específica por picnómetro o por alcoholómetro. Ver Anexo 6

Experimento 1

Se mezclan 400g de sorgo con 2 litros ácido clorhídrico a 0.05N y se cuece durante 90 min.

Tiempo de cocción	Temperatura	°Brix alcanzado
20	50	1
40	56	1.3
60	62	2.2
80	70	4.5
90	84	5.9

En este experimento además de reportar un valor de brix muy bajo el licor se gelatinizó y fue imposible seguir la guía trazada por lo que se dio por concluido el experimento.

Experimento 2

Se mezclan 200g de sorgo con 2 litros de ácido clorhídrico a 0.05N y se cuece durante 180 min.

Tiempo de cocción	Temperatura	°Brix alcanzado
20	50	1
40	56	1.3
60	62	2.2
80	70	4.5
100	84	5.9
120	96	6.9
140	96	7.4
160	96	8.1
180	96	8.3

En este experimento al igual que en el primero fue imposible seguir la guía trazada debido a la gelatinización del licor, por lo que se dio por concluido el experimento.

Experimento 3

Se mezclan 150g de sorgo con 2 litros ácido clorhídrico a 0.075N y se cuece durante 135 min.

Tiempo de cocción	Temperatura	°Brix alcanzado
--------------------------	--------------------	------------------------

20	65	1
40	76	3.3
60	82	5
80	86	6.7
100	91	7.9
120	92	9.2
135	92	10

pH_{inicial} = 1.63

pH_{final} = 4.85

Los valores de carbohidratos y azúcares reductores totales antes y después de la fermentación dieron como resultado:

CST_{iniciales} = 29.064 g/l

ART_{iniciales} = 3.7401 g/l

CST _{finales} = 23.856 g/l

ART _{finales} = 1.247g/l

La fermentación duró 5 días y no se reportó grado alcohólico ninguno por lo que no fue necesario pasar a la etapa de destilación.

Experimento 4

Se mezclan 400g de sorgo con 2 litros ácido clorhídrico a 0.1N y se cuece durante 180 min.

Tiempo de cocción	Temperatura	°Brix alcanzado
20	65	1
40	73	3.3
60	81	6.1
80	88	8

100	96	10
120	96	12
140	96	12.6
160	96	12.6
180	96	13.2

pH_{inicial} = 1.44

pH_{final} = 4.77

Los valores de carbohidratos y azúcares reductores totales antes y después de la fermentación fueron:

CST_{iniciales} = 44.436 g/l

ART_{iniciales} = 26.1807g/l

CST _{finales} = 36.624 g/l

ART _{finales} = 7.482 g/l

La fermentación duró 6 días y se midió el grado alcohólico por alcoholímetro lo que reportó un grado alcohólico de 1.5 °GL por lo que no se consideró necesario pasar a la etapa de destilación.

Experimento 5

Se mezclan 200g de sorgo con 2 litros ácido clorhídrico a 0.1N y se cuece durante 90 min.

Tiempo de cocción	Temperatura	°Brix alcanzado
20	76	1
40	92	4.5
60	95	6
80	97	7.5
90	97	7.9

pH_{inicial} = 1.60

pH_{final} = 4.92 ajustado

Exp.	Relación	Conc	Tiempo	°Brix _F	CST _I	ART _I	pH _F
I	200	0.05	90	5.9	-	-	1.35
II	100	0.05	180	8.3	-	-	1.28
III	150	0.075	135	10	29.064	3,7401	1.63
IV	200	0.1	180	13.2	44.436	26,1807	1.44
V	100	0.1	90	7.9	22.848	3,24142	1.60

Los valores de carbohidratos y azúcares reductores totales antes y después de la fermentación fueron:

CST_{iniciales} = 22.848 g/l

ART_{iniciales} = 3.2414 g/l

CST _{finales} = 10.332 g/l

ART _{finales} = 1.4964g/l

La fermentación duró 6 días y se midió el grado alcohólico por alcoholímetro lo que reportó un grado alcohólico de 0.5 °GL por lo que no se consideró necesario pasar a la etapa de destilación.

Un resumen de los resultados de ambas etapas del proceso aparece reportado en las tablas 2.3.

Tabla 2. 3. Resultados de la hidrólisis ácida de los almidones.

Con los resultados obtenidos en la tabla 2.3 se procede a su procesamiento mediante Software Statgraphics donde se ve la influencia de las diferentes variables solamente sobre el Brix, ya que en los dos primeros experimentos no fue factible medir los carbohidratos y reductores por la gelatinización de las masas.

Modelo obtenido del análisis de regresión:

$$°\text{Brix} = -4.065 + 69.0 * C + 0.0145 * R + 0.0427778 * t$$

Con un R² = 96.31 %

Donde:

C: concentración del ácido

R: Relación sólido / líquido

T: Tiempo de cocción

Del análisis estadístico realizado podemos concluir que, al ser los valores de P menores que 0.05 los coeficientes asociados son estadísticamente significativos con un nivel de confianza (α) del 95%, por tanto el modelo lineal obtenido a partir del diseño factorial fraccionado 2^{3-1} describe satisfactoriamente la dependencia del °Brix con las variables estudiadas. Ver Anexo 7

En los ART todo parece indicar por los resultados que la variable que mayor influencia tiene es el tiempo de cocción.

Un resumen de la etapa de fermentación aparece reportado en la tabla 2.4.

Tabla 2.4. Resultados de la etapa de fermentación

Exp	Relación Sol/líqu	Conc de ácido	Tiempo de coccion.	°Brix	Tiempo Ferm (h)	°GL
I	200	0.05	90	5.9	-	-
II	100	0.05	180	8.3	-	-
III	150	0.075	135	10	120	0
IV	200	0.1	180	13.2	69	1.5
V	100	0.1	90	7.9	48	0.5

Continuación de la tabla 2.4

Exp	CST _I (g/l)	CST _F (g/l)	ART _I (g/l)	ART _F (g/l)	% ART consumido	ART/CST _(inicial es)
I	-	-	-	-	-	-
II	-	-	-	-	-	-

III	29.064	23.856	3.7401	1.247	66,6586	12,8685
IV	44.436	36.624	26.1807	7.482	71,4216	58,9177
V	22.848	10.332	32.9128	15.213	53,8350	14,1868

Para la concentración más baja de ácido 0.005N, (experimentos I y II) independientemente del tiempo de cocción y de la relación sólido / líquido las muestras se gelatinizaron siendo imposible su fermentación sin un tratamiento adicional.

Al aumentar la concentración del ácido (experimento III) al valor medio, hay una variación de los azúcares reductores totales en una proporción 66.65% pero no se produce alcohol, lo cual parece indicar que ocurre la reacción inversa de la hidrólisis al no tener las condiciones adecuadas para esta etapa.

Experimento con propagación

Este experimento se realizó al analizar los bajos resultados obtenidos en los tres primeros experimentos del diseño, por lo que se trata de ver si la levadura se desarrolla en ese medio tomándose para ello la combinación de variables que mejores resultados reportaron hasta ese momento.

Se mezclan 200 g de sorgo con 2 litros de ácido clorhídrico a 0.1N y se cuecen durante 180 min.

Tiempo de cocción	Temperatura	°Brix alcanzado
20	59	1.4

40	71	3
60	77	4.6
80	86	5.9
100	94	7
120	96	8
140	96	8.5
160	96	8.7
180	96	8.7

Después de cocida la mezcla, se enfría rápidamente hasta la temperatura de 50°C a la cual se mantiene durante 30 min, luego se filtra a vacío para eliminar los sólidos que puedan entorpecer la fermentación y además se ajusta el pH.

pH_{inicial} = 1.26

pH_{final} = 4.65

Se preparan 400 ml de licor para hacer una propagación de la levadura y así ver como es su comportamiento en este medio. Las proporciones de sustrato y levadura a agregar fueron:

- 1.5 g/l de fosfato de amonio
- 7.7 g/l de sulfato de amonio
- 1 g/l de levadura

Después de agregar la levadura y los nutrientes se hace un conteo celular inicial el cual se repite cada 2 h, luego el licor se separa en 2 elenmeyer con 200 ml cada uno y se ponen en la zaranda, aquí la levadura debe alcanzar alrededor de $150 \cdot 10^6$ células.

$Y_1 = a \cdot 1/d \cdot 25 \cdot 10^4$	$Y_2 = a \cdot 1/d \cdot 25 \cdot 10^4$
$10 \cdot 10^6$	$10 \cdot 10^6$
$23 \cdot 10^6$	$29 \cdot 10^6$
$38 \cdot 10^6$	$40 \cdot 10^6$
$72 \cdot 10^6$	$76 \cdot 10^6$
$101 \cdot 10^6$	$102 \cdot 10^6$
$115 \cdot 10^6$	$102.5 \cdot 10^6$
$132 \cdot 10^6$	$102.5 \cdot 10^6$

Se tomaron 100 ml de la propagación (muestra I) con 6.4 °Brix y se mezclaron con 1000 ml de licor inicial con 8.3 °Brix dando como resultado una mezcla de 9 °Brix.

Se prefermentó la muestra, aireando inicialmente y se puso a fermentar después de agregarle 1.5 g/l d levadura, 1.5 g/l de fosfato y 7.7 g/l de sulfato de amonio.

La fermentación duró aproximadamente 43 h, tras las cuales se filtró el fermento para separarle la levadura y se le midió el grado alcohólico del fermento por picnometría dando como resultado 2.02 °GL.

Se determinaron también carbohidratos solubles totales por el método del fenol-sulfúrico, según la técnica de Dubois, en cada una de las etapas del desarrollo, los que reportaron los siguientes valores.

Muestra inicial	CTS = 34.02 g/l
Final de la propagación	CTS = 14.616 g/l
Fermento inicial	CTS = 25.284 g/l
Fermento final	CTS = 11.34 g/l

Este experimento si bien arrojó un grado alcohólico algo superior al de la muestra realizada en estas mismas condiciones pero sin propagar, consume un tiempo de propagación de la levadura de aproximadamente 12h que unido al tiempo de

fermentación, que aunque menor, alarga y complica el proceso. Además en muchos de los experimentos reportados en la literatura para la obtención de alcohol a partir de granos se obvia esta etapa, fundamentalmente la de prefermentación.

2.2. Estudio de la obtención de alcohol de sorgo mediante el método combinado de hidrólisis ácida con malta

Malta es el resultado de la germinación y secado, durante tiempos y temperaturas determinadas, de las semillas de los cereales. El motivo de germinar y secar las semillas es para que se formen, durante este proceso, las enzimas necesarias y se realicen los cambios requeridos en la estructura molecular de los diferentes componentes de la semilla para obtener de ella la mayor cantidad de moléculas de azúcares fermentables y nutrientes básicos para la levadura. **(De Mesones Boris.htm.)**

2.2.1. Malteado del sorgo.

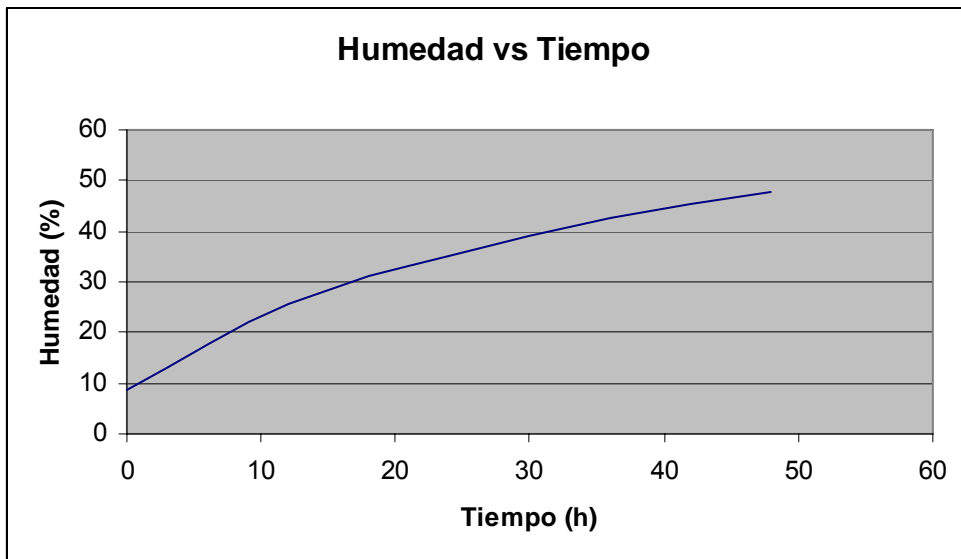
El sorgo empleado para el malteado fue el sorgo UDG-110 el cual presenta las siguientes características: humedad de 8.78 %, 9.38 % de proteínas y 69.22% de extracto, además presenta olor y sabor característico propio de su variedad.

Para el proceso de malteado del sorgo se requieren varias etapas:

Remojo: En esta etapa se ponen 2 kg de sorgo en un recipiente adecuado y se añade agua hasta que todos los granos estén tapados por ésta. Se efectúa el remojo durante 48 h, cambiando el agua y aireando cada 6 h, evitando así que éste adquiera olor desagradable debido a la actividad de las bacterias presentes en el grano, además se logra que se disuelvan en el agua sustancias que contiene el mismo y que pueden ser eliminadas durante el cambio de agua, porque de lo contrario estas sustancias pueden dificultar o retardar la germinación.

Durante el remojo se determinó humedad cada 12 h, mediante desecación en una estufa a 100 ° C, cuyos resultados se muestran a continuación:

Tiempo (h)	Humedad (%)
0	8.87
12	25.6
24	35.26
36	42.62
48	47.8



En esta etapa se pudo observar que a medida que transcurría el tiempo el grano iba creciendo, alcanzando crecimientos a las 24 h y a las 48 h de 0,37 mm y 0,40 mm respectivamente.

Germinación: Al pasar a la germinación, los granos se colocan en una bandeja sobre un paño húmedo y cubiertos con un papel humedecido. Esta etapa dura aproximadamente 4 días hasta que las raicillas alcancen las $\frac{3}{4}$ partes del tamaño del grano.

En el proceso de germinación, el grano produce alfa-amilasa, enzima que transforma el almidón insoluble en azúcares solubles. Lo cual tiene el efecto de aclarar la pasta hecha, calentando una mezcla de almidón en agua. A su vez, esto permite una mayor densidad calorífica en una pasta de una determinada viscosidad: puede utilizarse hasta el triple de harina germinada como si fuera grano sin germinar.

Secado: Concluida la germinación los granos germinados se colocan en una estufa de tiro de aire inducido a una temperatura de 60°C ya que con esta temperatura se garantiza que no se destruyan las enzimas. El proceso concluye cuando el grano ha alcanzado una humedad inferior al 5%. En esta etapa la malta adquirió un olor característico, parecido al de la malta de cebada empleada en las cervecerías. No fue factible determinar las propiedades a esta malta por no contar con los reactivos, pero en trabajos anteriores realizados en la facultad sobre malteado de sorgo se le determinó a la malta el contenido de proteínas, el poder diastásico y el contenido de N_2 α - amino. **(Pargas Morales M. 1994)**

Luego se pulverizó para ser utilizada en los experimentos con sacarificación enzimática.

2.2.2. Experimentos realizados a presión con una combinación de sacarificación ácida y enzimática.

Se mezclan cuidadosamente 400 g de sorgo con 2 litros de ácido clorhídrico a una concentración de 0.04N y se coloca sobre una placa caliente para lograr la gelatinización de los almidones, siguiendo el método de Hao, Fulmer y Hundercofler, pero empleando el sorgo como cereal y la malta de sorgo en lugar de salvado enmohecido como medio enzimático.

La masa cocida es colocada en una autoclave a una presión de aproximadamente 1.4 atm durante 30 min. Luego el pH de la masa cocida y esterilizada se ajusta a 4.5 - 5 con NaOH.

La masa, a una temperatura de 30°C se coloca en un mezclador y se añade malta. Tras agitar durante 1 min la mezcla se incubó 1 h a 30°C para sacarificar los almidones solubles.

Posteriormente se procede al proceso de fermentación como en el resto de los experimentos.

Resultados del experimento 1

Brix_{inicial} = 11.5 °

pH_{inicial} = 2.59

CST_{iniciales} = 83.916 g/l

CST _{finales} = 29.148 g/l

pH_{final} = 4.75

ART _{iniciales} = 29.9208 g/l

ART _{finales} = 1.247 g/l

La fermentación duró aproximadamente 21 h y 25 min, tras las cuales se filtró el fermento para separarle la levadura y se le midió el grado alcohólico por picnometría dando como resultado 4.8 °GL por lo que se decidió pasar a la etapa de destilación.

La destilación se llevó a cabo en una columna de cristal de 14 platos con cazoletas de burbujeo para su concentración. Concluida la destilación el volumen del destilado fue de 50 ml, al cual se le midió el grado alcohólico por picnometría dando como resultado 39.40 °GL y a esta muestra se le realizó la cromatografía.

Muestra	Acetaldehído mg/100 ml aa	Acet. Etilo mg/100 ml aa	Metanol mg/100 ml aa	Propanol mg/100 ml aa	Isoamílico mg/100 ml aa
Destilado M1	80,39	5,35	4,078	93,16	403,12

En los análisis cromatográficos realizados al destilado centro de la muestra M 1 se observa que los componentes encontrados coinciden con los que acompañan al etanol obtenido a partir de malzas es decir acetaldehídos, acetato de etilo, propanol, isoamílico y metanol en menor cuantía, siendo alto el contenido de aldehídos, al igual que los alcoholes superiores, lo que indica que la muestra no estaba lo suficientemente concentrada.

Resultados del experimento 2

En este experimento se siguieron los mismos pasos que en el anterior pero no se agregó malta para comprobar la eficacia de la misma y no el uso de la presión en la hidrólisis, que fue introducida como una condición en estos experimentos a diferencia de la hidrólisis ácida.

$$\text{Brix}_{\text{inicial}} = 13.3^{\circ}$$

$$\text{pH}_{\text{inicial}} = 2.5$$

$$\text{CST}_{\text{iniciales}} = 68.712 \text{ g/l}$$

$$\text{CST}_{\text{finales}} = 64.344 \text{ g/l}$$

$$\text{pH}_{\text{final}} = 4.72$$

$$\text{ART}_{\text{iniciales}} = 6.2335 \text{ g/l}$$

$$\text{ART}_{\text{finales}} = 1.8705 \text{ g/l}$$

La fermentación duró aproximadamente 31 h y 35 min, tras las cuales se filtró el fermento para separarle la levadura y se le midió el grado alcohólico del fermento por picnometría dando como resultado 0.9 °GL por lo que se decidió no pasar a la etapa de destilación.

Resultados del experimento 3

$$\text{Brix}_{\text{inicial}} = 14^{\circ}$$

$$\text{pH}_{\text{inicial}} = 2.55$$

$$\text{CST}_{\text{iniciales}} = 83.664 \text{ g/l}$$

$$\text{CST}_{\text{finales}} = 31.5 \text{ g/l}$$

$$\text{pH}_{\text{final}} = 4.68$$

$$\text{ART}_{\text{iniciales}} = 28.6741 \text{ g/l}$$

$$\text{ART}_{\text{finales}} = 1.8705 \text{ g/l}$$

La fermentación duró aproximadamente 42h, tras las cuales se filtró el fermento para separarle la levadura y se le midió el grado alcohólico mediante picnometría y alcoholímetro dando como resultado 3.3 °GL por lo que se decidió pasar a la etapa de destilación.

La destilación se llevó a cabo en una columna de cristal para su concentración.

Concluida la destilación el volumen del destilado fue de 50 ml, al cual se le midió el grado alcohólico por picnometría 34.47° GL.

Tabla 2. 5. Resultados de la etapa de sacarificación.

Exp.	Relación Sol/líqu	Conc de ácido	Tiempo Cocción.	°Brix final	CST _I (g/l)	ART _I (g/l)	°GL
M 1	200	0.04	180	11.5	83.916	29.9208	4.8
M 2	200	0.04	180	13.3	68.712	6.2335	0.9
M 3	200	0.04	180	14	83.664	28.6741	3.3

Tabla 2. 6. Resultados de la etapa de fermentación.

Exp.	°GL	Tiempo Ferm (h)	CST _F (g/l)	%CST consumido	ART _F (g/l)	%ART consumido
M 1	4.8	21.41	29.148	65,2652	1.247	95,8323
M 2	0.9	31.58	64.344	6,3569	1.8705	69,9927
M 3	3.3	42	31.5	62,3493	1.8705	93,4766

Podemos concluir que al ser iguales las condiciones de cocción en que se realizaron los experimentos, la mayor influencia, sobre la diferencia de carbohidratos y reductores entre las muestras M1 y M3 con respecto a M2, la ejerce la adición de malta, lo que facilita la licuefacción y el desdoblamiento de la sacarosa.

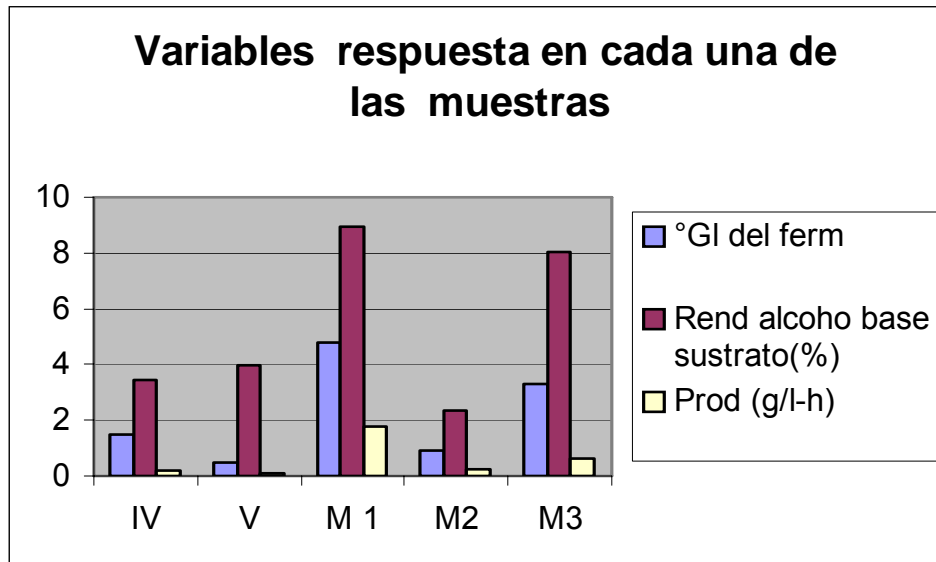
Tabla 2.7. Resumen de los experimentos realizados con ambos tratamientos en la

etapa de fermentación.

Exp.	% CST _(cons)	% ART _(cons)	Relación ART/CST _(I)	Relación ART/CST _(F)	°GL	Rend Alcohólico	Productividad
I	-	-	-	-	-	-	-
II	-	-	-	-	-	-	-
III	17,9190	66,6586	12,8685	5,2271	0	-	-
IV	17,5803	71,4216	58,9177	20,4292	1.5	0,0431	0,1726
V	54,7794	53,8350	14,18689	14,4831	0.5	0,05	0,0827
M1	65,2652	95,8323	35,65566	4,2781	4.8	0,1128	1,7798
M2	6,3569	69,9927	9,0719	2,9070	0.9	0,0292	0,2263
M3	62,3493	93,4766	34,2729	5,9380	3.3	0,1159	0,6240

La relación entre los parámetros de calidad del proceso para los distintos tratamientos, con ácido y ácido-malta aparecen relacionados en la figura 2.1

Figura 2.1. Relación entre los parámetros de calidad del proceso para los distintos tratamientos



En la figura se aprecia como para los experimentos tratados con ácido solamente (muestras IV, V y M2) tanto el grado alcohólico como el rendimiento y la productividad, dan valores muy bajos con respecto a los tratados con presión y malta (muestras M1 y M3).

Sin embargo se aprecia que en la muestra M2 que se trató a presión pero con una concentración de ácido menor que las muestras IV y V el valor del rendimiento alcohólico es inferior lo que indica que la concentración de ácido influye sobre esta variable.

2.3. Obtención de alcohol a partir del jugo de la caña de sorgo dulce.

2.3.1. Obtención del jugo y su preparación.

El trabajo experimental se le realizó a la variedad de sorgo dulce **CIAP-SD-51-02-02-04**, de color rojo, el cual se pesó obteniéndose un peso neto de cañas limpias de 17.08 Kg. Esta masa de caña fue triturada en un molino anexo a la planta piloto José Martí y fue recogido un volumen de jugo, igual a 4 L. Para un índice de extracción de $4/17=0.23$ L/kg de caña.

Con el jugo recolectado se procedió a calcular su densidad, para lo cual el jugo previamente filtrado se pesó y se midió su volumen, arrojando los siguientes resultados:

Peso = 3872 g

Volumen = 3800 ml

Para una densidad de 1.018 g/ml ó 1018 Kg/m³

Al jugo también se le realizaron otras mediciones:

pH = 5.24 °Brix del Jugo = 8 °Bx

2.3.2. Preparación del prefermento.

Se preparó un prefermento del jugo tomándose para ello un volumen de jugo de 1/10 del volumen del fermentador, se le añadió levadura seca a razón de 1 g/L de jugo y también se adicionaron los nutrientes necesarios para un adecuado desarrollo de las mismas.

.Además se ajustó el pH hasta un valor de 3.9 para favorecer este proceso.

Se tomaron 380 ml de jugo y se airearon midiendo el °Brix y el pH. Comprobando que al cabo de 3 h el °Brix era 9.

2.3.3. Preparación del fermento.

Para la preparación del fermento, se ajustó el pH del jugo a 4.2 y se añadió levadura seca a razón de 1.5 g/L de jugo y también se adicionaron los nutrientes necesarios para un adecuado desarrollo de las mismas. A este fermento se le fue midiendo sistemáticamente el °Brix y se detuvo la fermentación cuando el fermento tuvo los grados °Brix estabilizados en dos mediciones sucesivas, aproximadamente la mitad. Este proceso demoró 19 h

°Brix final = 4.5 °Bx pH = 4.12

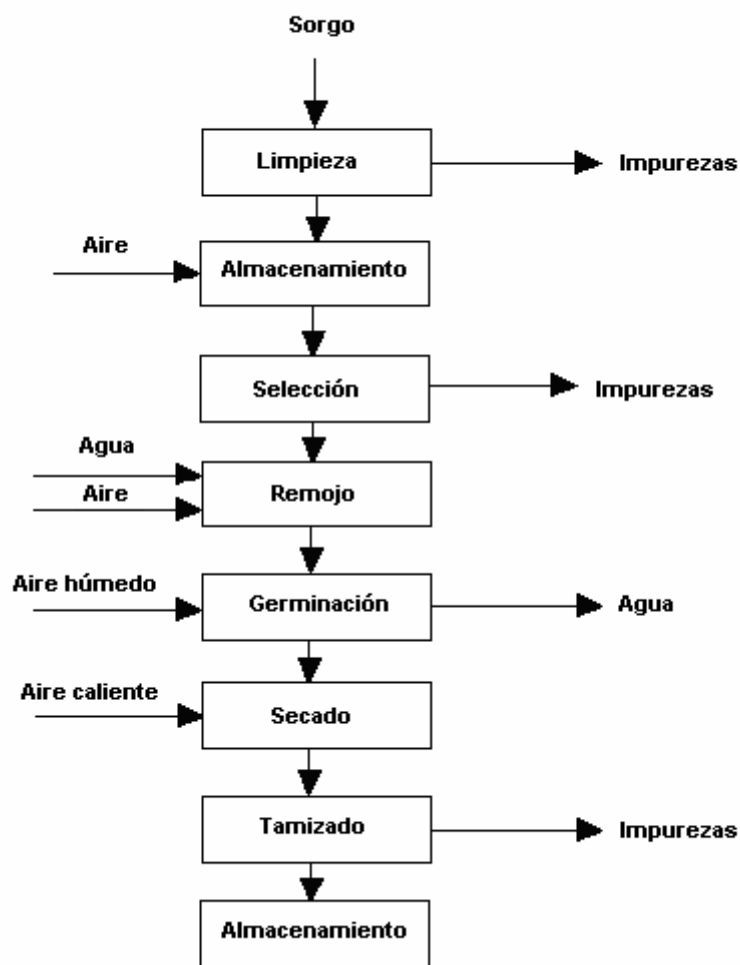
2.3.4. Obtención del alcohol.

Para obtener el grado alcohólico del fermento, por dos vías diferentes, el picnométrico y el alcoholímetro, se toman 100 ml de fermento, más 50 ml de agua destilada y ambos son adicionados a un balón, se calienta y se hace que la mezcla ebulle, a través de un condensador se recoge un volumen de 50 ml de destilado en un matraz de 100 ml y se enrasa con agua destilada. Ver Anexo 6

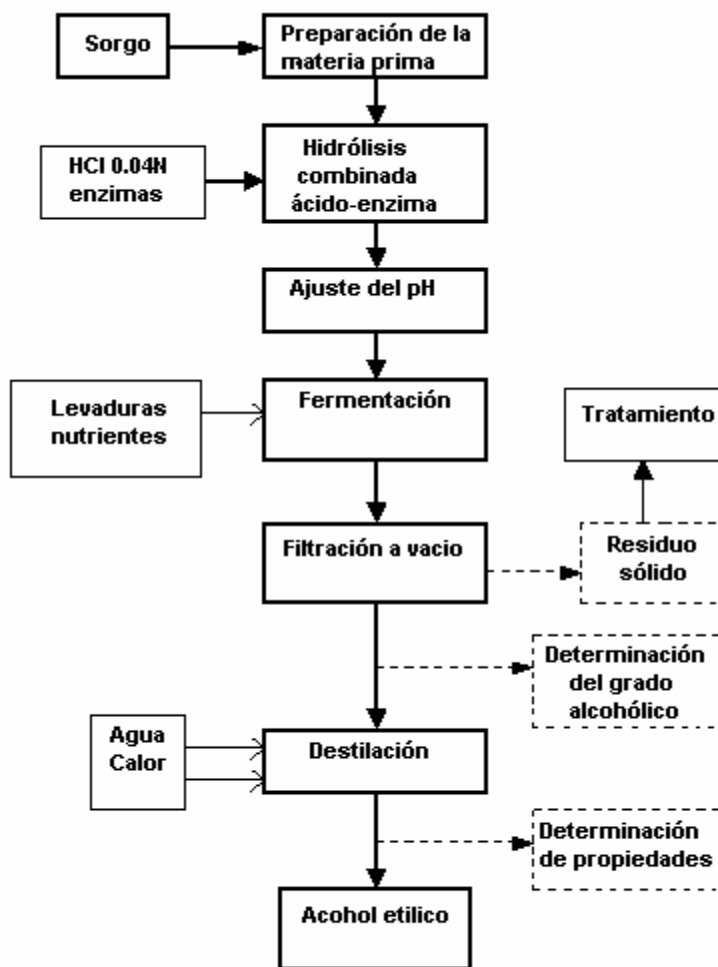
2.4. Esquema para las etapas de malteado y obtención de alcohol a partir de sorgo.

Sobre la base de los resultados obtenidos en el trabajo se proponen a continuación los esquemas para las etapas de una posible tecnología de obtención de malta y alcohol.

2.4.1 Esquema resumen de las etapas para una planta de producción de malta



2.4.2. Esquema resumen de las etapas, para una planta de producción de alcohol.



2.5. Análisis de los resultados.

Podemos decir que la conversión de carbohidratos a azúcares reductores totales se comporta de igual forma en las tres muestras tratadas solamente con ácido y en las muestras tratadas con ácido y a presión, mientras que en las muestras a las que se le añade la malta es mayor, aunque se aprecia que el contenido de carbohidratos sin convertir a azúcares reductores totales todavía es alto, lo cual pudiera ser mejorado con una mayor adición de malta.

En el por ciento de carbohidratos que son factibles de aprovechar por la levadura, dado por la relación de $(ART/CST)_{iniciales}$, tiene una marcada influencia la concentración del ácido, ya que para las muestras con iguales relaciones sólido / líquido y tiempo de cocción (IV, M1, M2 y M3), la de mayor concentración de ácido es la de mayor relación, visto también en las tres muestras con tratamiento ácido solamente. Además en esta relación, la malta también ejerce influencia, ya que para muestras con iguales condiciones de cocción tuvo mejores resultados según lo reflejan las muestras M1 y M3 malteadas contra M2 sin maltear.

Las masas sacarificadas con ácido y malta son las que mejores resultados dieron tanto desde el punto de vista de la etapa de sacarificación como del aprovechamiento de los azúcares reductores totales por parte de la levadura, al dar los mayores por cientos de alcohol en batición y de rendimiento del sustrato.

El tratamiento a presión ayuda a la licuación de la gelatina formada en la cocción con el ácido a bajas concentraciones.

Al parecer el tiempo de almacenamiento del sorgo influye en los resultados de la obtención de alcohol a partir de él, ya que en el estudio preliminar realizado (tabla 2.1) se obtuvieron mejores resultados con el tratamiento ácido para el UDG-110 recién cosechado, que para el mismo tipo de sorgo con más de 1 año de almacenamiento, tratado con malta y cocido a presión (muestra M3).

Como fue expresado anteriormente, las muestras cuando son tratadas a concentraciones de ácido clorhídrico por debajo de 0.1N gelatinizan, siendo más difícil la etapa de

fermentación, cambiando esta situación cuando es añadida la malta, cuyas enzimas ayudan a la licuación de la gelatina formada, mejorando el aprovechamiento del sustrato por la levadura, acortando los tiempos de fermentación y favoreciendo la filtrabilidad de las masas tratadas por esta vía.

Analizando los resultados de los estudios previos a este trabajo (tabla 2.1), donde se utilizaron otros tipos de sorgo, pero con iguales condiciones a la muestra IV, es decir: relación sólido / líquido 200 g/l, concentración del ácido 0.1N y tiempos de cocción de 180 min se obtuvieron resultados muy similares y son los más satisfactorios obtenidos en la investigación. De los tres sorgos estudiados de forma preliminar para la producción de alcohol UDG-110, CIAP-6G-95 y CIAP-74V-04, el CIAP-6G-95 fue el que mejores resultados reportó al ser tratado solamente con ácido, es decir sin presión y sin malta, aunque hay que resaltar que este sorgo estaba recién cosechado.

De los ensayos realizados puede decirse que en el grado alcohólico y en el rendimiento del sustrato la mayor influencia la tiene el malteado, muestras M1 y M3, ya que son las de mayores grados alcohólicos alcanzados (4.8 y 3.3) al igual que el rendimiento sustrato (0.1128 y 0.1159), en esto influye lo expresado anteriormente sobre el efecto de las enzimas en la etapa fermentativa.

El rendimiento alcohólico con malta debió dar resultados más elevados pero en estas muestras aunque no fue medido se apreció un crecimiento de la biomasa, lo cual disminuye el volumen de fermento y puede haber inhibido en parte el rendimiento alcohólico, también pudo haber influenciado en este resultado como se señaló anteriormente el tiempo y condiciones de almacenamiento del sorgo.

Los valores de productividad representan los gramos por litro de batición, por horas fermentadas. En nuestros experimentos los mejores resultados para esta variable se presentan también en las muestras con tratamiento enzimático, cuyos valores fueron 1.77 para M1 estando en el rango de 1.6 - 2.5 reportados para la obtención de alcohol a partir de malzas y de 0.7278 para M3.

Si bien se ha señalado que el aumento de la concentración del ácido favorece la etapa de sacarificación y a su vez la formación de alcohol, ésta tiene un valor límite ya que en las corridas realizadas para acortar los valores máximos y mínimos de las variables a tomar en el diseño de experimento, cuando la concentración de ácido era 0.2N se hacía muy difícil el ajuste del pH en el rango de valores que requiere la levadura para la producción de alcohol en la etapa fermentativa.

Se hizo un estudio muy preliminar de la obtención de alcohol a partir del jugo de la caña de sorgo, este proceso, que muy similar al de la caña de azúcar, alcanza valores de ° Brix muy bajos, por lo que los rendimientos fueron también bajos, los cuales pudieran incrementarse mediante un sustrato que combine el jugo de la caña con el licor obtenido de los granos con tratamiento enzimático, similar al estudio realizado por Fabelo J.A en su trabajo de doctorado.

La malta obtenida de forma experimental en este trabajo, si bien no pudo ser caracterizada nos dio resultados satisfactorios al ser utilizada combinada con el tratamiento ácido, además de que presenta olor y sabor muy parecido al de la malta de cebada empleada en las destilerías.

Conclusiones

1. De las tres variables estudiadas para la obtención de alcohol a partir de sorgo empleando el tratamiento ácido como vía de sacarificación, la concentración de ácido resulta ser la variable de mayor influencia, seguida por el tiempo de cocción.
2. De acuerdo a los resultados obtenidos las mejores condiciones para la obtención de alcohol a partir de sorgo mediante tratamiento ácido son: concentraciones de ácido de 0.1N, relación sólido / líquido de 200 g/l y tiempo de cocción 180 min.
3. De acuerdo a los resultados obtenidos las etapas de sacarificación y fermentación, las masas sacarificadas con ácido y malta fueron las que mejores resultados arrojaron.
4. El tiempo y condiciones de almacenamiento del sorgo tienen influencia en la obtención de alcohol a partir de este cereal, ya que en los estudios previos a este trabajo con el sorgo recién cosechado, se obtuvieron mejores rendimientos que en los realizados actualmente para las mismas condiciones de trabajo e incluyendo los tratamientos con malta.
5. De los tres tipos de sorgo de doble propósito estudiados hasta el momento el CIAP-6G-95 parece ser el mejor, al obtenerse mejores rendimientos alcohólicos solamente con el tratamiento ácido, seguido por el UDG-110.
6. Es posible el malteado del sorgo empleando técnicas similares a las de la cebada y ser utilizada esta malta como vía enzimática en los procesos de obtención de alcohol por vías no convencionales.
7. La obtención de alcohol a partir de sorgo de doble propósito ya sea a partir del jugo de su caña como de los granos Puede constituir una fuente de sustrato no convencional para diversificar la industria alcoholera cubana tanto por los resultados que este ofrece en cuanto a la calidad del producto como por la resistencia de su cultivo.

Recomendaciones

- Continuar el estudio de la obtención de alcohol a partir de sorgo utilizando la hidrólisis enzimática comparándola con los resultados obtenidos en este trabajo.
- En el estudio de la etapa de fermentación cuantificar el crecimiento de biomasa para tener un criterio sobre la influencia que esta pueda tener en el rendimiento alcohólico.
- Continuar el trabajo de obtención de alcohol a partir del jugo de la caña de sorgo y de ser necesario combinarlo con el licor obtenido de los granos con tratamiento enzimático, para lograr un mayor rendimiento alcohólico.
- Continuar el estudio del malteado del sorgo con vista a su empleo también en la fabricación de cerveza ya que esto es de gran interés en el territorio.
- Hacer una evaluación económica del proceso cuando se hayan estudiado con profundidad todas las variables que puedan afectarlo.

Bibliografía

1. ALPA 2005-90. pdf*
2. Destilación de alcohol a partir de cereales (maíz y sorgo granífero). Alcohol 2. sorgo . doc. Material en Soporte Electrónico Recopilado por el CIAP de la UCLV.
3. E:\Investigacion\Reseña histórica del uso de alcohol como combustible en Argentina.htm
4. E.A. Jackman. Alcohol Industrial. Biotecnología Básica. Parte II.pdf. Sitio: <ftp://172.20.9.24>
5. El sorgo y el mijo en la nutrición humana - Composición química y valor nutritivo.html. Material en Soporte Electrónico Recopilado por el CIAP de la UCLV.
6. Empresa León Jiménez . Revista El Leoncito.. pdf. htm. Edición Octubre/2003
7. Fabelo J.A 1999 " Estudio de la etapa de fermentación Alcohólica utilizando diferentes sustratos " Tesis en opción al Grado de Dr. En Ciencias Técnicas. 1999
8. . Fermentación pdf.
9. G. A. Deluga, Renewable Hydrogen from Ethanol by Autothermal Reforming. February 2004 VOL 303 SCIENCE www.sciencemag.org
10. Gallardo A. I. Curso Facultativo de Destilación de Alcohol. QF-mx. Documentación Red facultad de Química y Farmacia 2004.
11. Gilliland y Robinson. Elements of Fractional Distillation. Mc Graw –Hill. 1950.
12. Herrera A. "Manual de prácticas de laboratorio de microbiología industrial".
13. Hübner Peter Reforming of Ethanol, LAMNET-Workshop, Brasilia Dec. 3 - 5, 2002

14. http://www.sedespa.gob.mx/transicion/impacto_ambiental/inform_quimica/etanol
15. <http://66.102.7.104/search?q=cache:EfaCNfQOx00J:www.terra.es/personal5/turriano/biomlink.htm+alcohol+de+sorgo&hl=es>
16. Las cervezas africanas o la tradición del mijo. "La Cerveza", N° 1, Marzo de 1998, Edit. Edimpres, Cervecería Andina, Ecuador, pp.7.
17. León Téllez 1997*
18. Llorca Marquez M. "Modelización de la operación de secado de malta por aire caliente en lecho fijo y en capa profunda"
19. Manual Analítico para el Control Unificado (MACU). "Producción de alcohol y levadura" 1986.
20. Mesones De Boris. Noticias e informaciones sobre micro cervecerías y fábricas de cerveza, malteado y maltas. htm.
21. O'Brien Dennis J. "Continuous Fermentation With Pervaporation Membranes". United States Department of Agriculture Eastern Regional Research Center. 2001 htm
22. Pargas Morales M. 1994
23. Rodríguez L. & Palacios Y. 2004
24. Samuel Cate Prescott, Sc. D. Microbiología Industrial
25. Sorgo Dulce en China. Alcohol 1. sorgo. doc. Material en Departamento de Agricultura de la FAO. Material en Soporte Electrónico Recopilado por el CIAP de la UCLV.
26. S. Appa Rao*, M.H. Mengesha, V. Gopal Reddy y K.E. Prasada Rao. "Recolección y evaluación de germoplasma del sorgo en Rwanda". Genetic Resources Division, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Patancheru, Andhra Pradesh, 502 324, India. htm. July 07, 2000.
27. Samuel Cate Prescott, Sc. D. Microbiología Industrial. Aguilar, S.A. de Ediciones-Madrid. 1952.

28. TECNI-FENALCE- Boletín Informativo N° 10 Año3 Agosto 2001.
Publicado por la FAO 2002
29. Treybal Robert. Operaciones con Transferencia de Masa. T-1. Cap 9.
ENPES. MES
30. Usos del Sorgo en Argentina. Campaña agrícola 1996/1997 Alcohol 3.
sorgo. doc. Material en Departamento de Agricultura de la FAO. Material
en Soporte Electrónico Recopilado por el CIAP de la UCLV.
31. Xandri Tagüeña José Maria. Elaboración de aguardientes simples,
compuestos y licores. Salvat Editores, S.A. 1958.
32. Mathewson, S.W. The Manual for the Home and Farm Production of
Alcohol Fuel. htm 1980
33. www_Delariva_com -.htm *
34. 14coll_es.htm

Anexo 1: Determinación del pH

Fundamento del método

El término pH es la forma de expresar la mayor o menor acidez de una solución en función de la actividad de los iones hidrógeno. La determinación se basa en medir el cambio en la concentración hidrogeniónica mediante una variación en el voltaje detectado por los electrodos del equipo. **(MACU, 1986)**.

Expresión de resultados

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

Anexo 2: Determinación del Brix

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. **(MACU, 1986)**.

Expresión de resultados

La lectura anotada es el valor que corresponde al °Bx de la muestra, expresado en %.

Anexo 3: Determinación de la cantidad de células (conteo celular)

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.

Procedimiento

1. Se toma la muestra y se diluye con solución de ácido sulfúrico (si es necesario) para garantizar que en cada cuadrado de la cámara no haya más de 60 células ni menos de 20.
2. Se toma la muestra con una pipeta volumétrica, soplando y absorbiendo hasta su homogeneidad.
3. Se coloca el cubre objeto sobre el área cuadrículada de la cámara Neubauer y se presiona suavemente con la yema de los dedos.
4. Con una pipeta Pasteur se toma una pequeña gota de la dilución y se desliza por el borde del cubre objeto, manteniendo la misma 1 min. en reposo. Se observa al microscopio y se realiza el conteo, teniendo en cuenta que:
 - a) el conteo se efectuará sobre los cuadrados extremos y sobre el cuadrado central.
 - b) si la yema tiene un tamaño mayor que la mitad de la célula madre, se considerará como una célula de levadura, no como una célula gemante
 - c) la célula se contará cuando posea el 50 % o más de su tamaño dentro del área del cuadrado. **(MACU, 1986).**

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

Anexo 4: Determinación de los azúcares reductores totales

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.

Procedimiento

1. Se añade a un tubo de ensayo 1 mL del sobrenadante centrifugado y se añaden 2 mL de la solución de reactivo 3,5 – Dinitrosalicílico mezclando bien.
2. Se colocan los tubos de ensayo en baño de agua hirviendo durante 5 minutos, extrayéndose posteriormente y dejándose enfriar hasta temperatura ambiente.
3. Se enrasan todos los tubos de ensayo hasta 10 mL con agua destilada y se lee en el espectrofotocolorímetro a 240 nm contra un blanco preparado con 1 mL de agua destilada el cual debe sufrir la misma técnica operatoria. **(Herrera A. 1989).**

Para la confección de la curva de calibración se prepararon 10 soluciones a diferentes concentraciones de glucosa, midiéndose la absorbancia de las mismas, obteniéndose el siguiente resultado:

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

Expresión de los resultados

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

Donde:

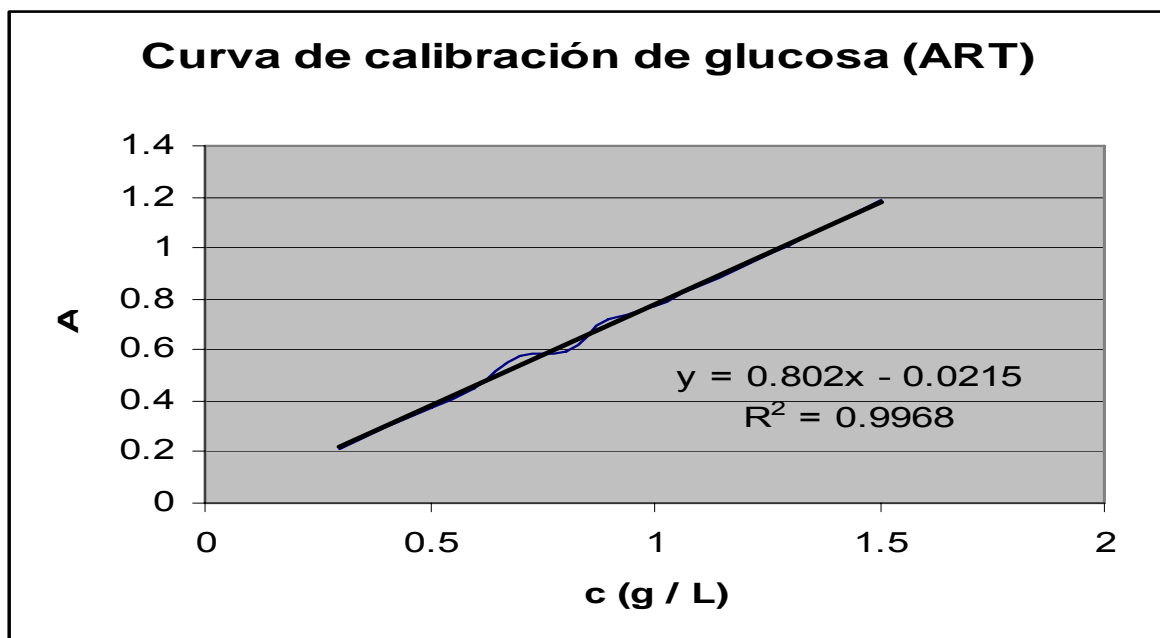
ART azúcares reductores totales

A absorbancia

d dilución

ξ pendiente de la recta de la curva de calibración

Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores totales



Anexo 5: Determinación de carbohidratos solubles totales por el método del fenol-sulfúrico, según la técnica de Dubois et al., (1951).

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 carbohidratos solubles totales presentes en la muestra.

Procedimiento

1. Se toman 10 ml del cultivo y se centrifugan a 5000 rpm durante 15 minutos tomando 5 ml del sobrenadante, al cual se le añaden 5 ml de una solución de ATC al 10%, esperando 10 minutos.
2. Se filtra por papel, o se centrifuga a 5000 rpm durante 15 minutos. Del filtrado, o centrifugado, se realizan diluciones desde 1/10 hasta 1/10000, para determinar el rango de trabajo con las muestras.
3. De cada una de estas diluciones se toma 1 ml y se añade 1 ml de la solución fenólica al 5%.
4. Se añade con cuidado, por las paredes del tubo, 5 ml de la solución reactiva de ácido sulfúrico al 95%, agitando con cuidado y dejando enfriar hasta temperatura ambiente, durante unos 20 minutos.
5. La mezcla reactiva así obtenida se lee a 490 nm en espectro colorímetro, dentro de las primeras 3 horas de efectuada la reacción.
6. Se prepara un blanco empleando 1 ml de agua destilada, el cual debe sufrir el mismo tratamiento que las muestras.
7. Los resultados en densidades ópticas, se transforman a sus respectivos valores de concentración en carbohidratos solubles totales, mediante su multiplicación por el factor de la curva patrón previamente confeccionada.

8. Debe tenerse especial cuidado en considerar las diversas diluciones que ha sufrido la muestra, durante las operaciones efectuadas. (**Herrera A. 1989**).

Para la confección de la curva de calibración se prepararon 10 soluciones a diferentes concentraciones de glucosa, midiéndose la absorbancia de las mismas, obteniéndose el siguiente resultado:

c (g/L)	0.009	0.018	0.027	0.036	0.045	0.054	0.063	0.072
A	0.107	0.198	0.295	0.412	0.505	0.627	0.721	0.859

Se tomaron solamente el resultado de 8 muestras debido a que las demás reportaban resultados fuera del rango de trabajo.

Expresión de los resultados

$$CST = A * d * \xi \quad [g / L]$$

Donde:

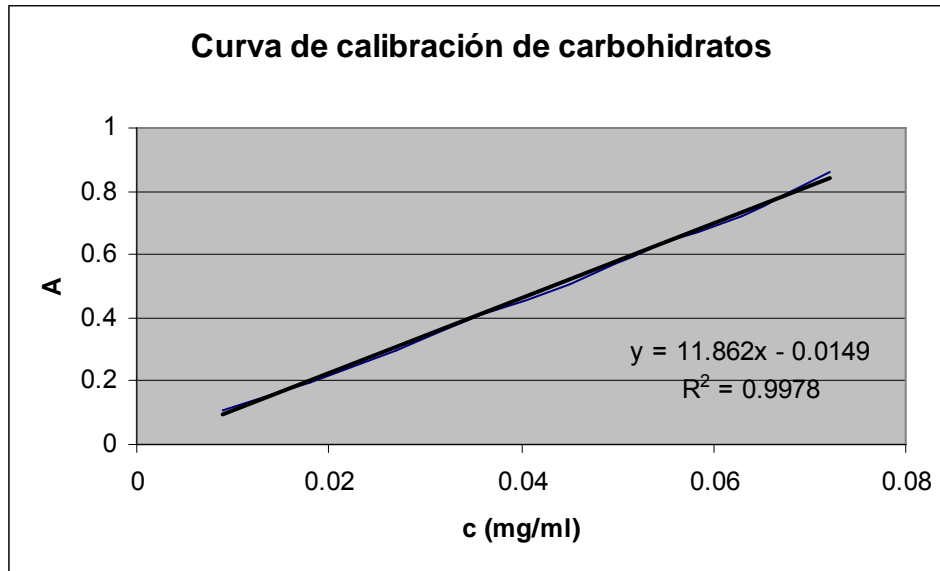
CST carbohidratos solubles totales

A absorbancia

d dilución

ξ pendiente de la recta de la curva de calibración

Curva de calibración para la determinación de carbohidratos solubles totales.



Anexo 6: Determinación del grado alcohólico en fermento.

Método Picnométrico

Se toman 100 ml de fermento, más 50 ml de agua destilada y ambos son adicionados a un balón, se calienta y se hace que la mezcla ebulle, a través de un condensador, se recoge un volumen de 50 ml de destilado en un matraz de 100 ml y se enrasa con agua destilada.

Con este producto se procede a realizar los análisis de medición del grado alcohólico que consiste en realizar un conjunto de pesadas al picnómetro, vacío, con agua destilada y hervida, y con el destilado. Entonces a través de la fórmula se obtiene la gravedad específica y con ese valor se va a la tabla "Determinación del alcohol en volumen y en peso por ciento según K. Windish, a 15 °C " Donde se obtiene el valor del grado °GL

Todo el procedimiento se realizó a 15 °C pues a esa temperatura es a la que viene referido el valor del grado alcohólico.

$$S = 0.99913(C - A)/(B - A)$$

S - gravedad relativa

A - peso del picnómetro vacío

B - peso del picnómetro con el agua destilada y hervida

C - peso del picnómetro con el destilado

Anexo 7: Análisis estadístico del diseño experimental.

Analysis of Variance for Brix

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A: C	23.805	1	23.805	64.66	0.0002
B: R	4.205	1	4.205	11.42	0.0149
C: t	29.645	1	29.645	80.52	0.0001
Total error	2.209	6	0.368167		
Total (corr.)	59.864	9			

R-squared = 96.31 percent

R-squared (adjusted for d. f.) = 94.465 percent

Standard Error of Est. = 0.606767

Mean absolute error = 0.376

Durbin-Watson statistic = 1.875

The StatAdvisor

The ANOVA table partitions the variability in Brix into separate pieces for each of the effects. It then tests the statistical significance of each effect by comparing the mean square against an estimate of the experimental error. In this case, 3 effects have P-values less than 0.05, indicating that they are significantly

different from zero at the 95.0% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 96.31% of the variability in Brix. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 94.465%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0.606767. The mean absolute error (MAE) of 0.376 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the DW value is greater than 1.4, there is probably not any serious autocorrelation in the residuals.

Regression coeffs. for Brix

constant = -4.065
A: C = 69.0
B: R = 0.0145
C: t = 0.0427778

The StatAdvisor

This pane displays the regression equation which has been fitted to the data. The equation of the fitted model is

$$\text{Brix} = -4.065 + 69.0 * C + 0.0145 * R + 0.0427778 * t$$

where the values of the variables are specified in their original units. To have STATGRAPHICS evaluate this function, select Predictions from the list of Tabular Options. To plot the function, select Response Plots from the list of Graphical Options.