

www.bdigital.ula.ve

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

www.bdigital.ula.ve
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE ARROZ DE SEGUNDA

MARTINEZ RIVAS ROSANA CRISTINA

MÉRIDA, OCTUBRE, 2009

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

www.bdigital.ula.ve
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE ARROZ DE SEGUNDA

Autor: Rosana Cristina Martínez Rivas

Tutor: Profesor. Hans Valenzuela

Co-tutor: Profesor. Balmore Guerrero

MÉRIDA, OCTUBRE, 2009

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

RESUMEN

La búsqueda de nuevos combustibles, de origen biológico y renovable, biodegradables, capaces de aumentar el rendimiento de los motores de automóviles, y la necesidad de disminuir la emanación de los gases invernadero han contribuido a usar al etanol como combustible o aditivo para gasolinas comerciales, a nivel mundial.

El presente trabajo trata de la utilización de arroz partido para producir glucosa a través de hidrólisis enzimática con amilasas, el hidrolizado producido es luego inoculado con levaduras comerciales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* para fermentarlo y finalmente recuperar el alcohol producido por medio de operaciones de destilación hasta conseguir etanol con una concentración lo más alta posible.

Se obtuvo que con las amilasas que se utilizaron se logró producir hidrolizados con dextrosa equivalente alta (95,72). La licuefacción se realizó a 95°C y pH 6 y la sacarificación a un pH de 4,5 y temperatura 55 °C.

La levadura *S. bayanus* consumió más glucosa y también tuvo la mayor producción de etanol, lo que implica que esta levadura dió mejores rendimientos en el proceso de fermentación.

Finalmente el etanol se recuperó mediante destilación simple hasta obtenerse un alcohol al 94,18 %.

AGRADECIMIENTOS

Dedico el presente trabajo a mi Padre, a mi Madre y a mis hermanos, por el inquebrantable apoyo, amor y consejos que siempre he recibido de ellos.

Agradecimientos:

A Dios por permitirme estar aquí.

A mi tutor, el profesor Hans Valenzuela por su persistente guía y paciencia.

A mi cotutor, el profesor Balmore Guerrero, por su constantes aportes en la finalización de este trabajo.

Al Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos (BIOMI) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes que tan amablemente me abrió las puertas a sus instalaciones para poder desarrollar y culminar mi proyecto.

A todo el personal, tanto profesores, como técnicos y estudiantes de postgrado que en el trabajan por toda la colaboración que me brindaron, especialmente al Sr. Jesús Pacheco.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	i
AGRADECIMIENTOS	ii
TABLA DE CONTENIDO	iii
INDICE DE TABLAS	iv
INDICE DE FIGURAS	v
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I. EL PROBLEMA	2
I.1.- Antecedente	2
I.2.- Planteamiento del problema	5
I.3.- Hipótesis	7
I.4.- Objetivos	7
I.5.- Alcances de la investigación	7
CAPITULO II. MARCO TEORICO	8
II.1.- Etanol	8
II.2.- Bioetanol	9
II.3.- Arroz	10
II.4.- Almidón	13
II.4.1.- Amilosa y amilopectina. Las fracciones del almidón	13
II.4.2- Pregelatinización	14

Continuación

TABLA DE CONTENIDO

II.5.- Enzimas	16
II.5.1.- Caracterización de las enzimas	17
II.5.2.- Nomenclatura de las enzimas	18
II.5.3.- Clasificación de las enzimas	19
II.5.4.- Actividad enzimática	20
II.6.- Amilasas	24
II.6.1.- α -amilasa	25
II.6.2.- Glucoamilasa o amiloglucosidasa	26
II.7.- Fermentación	26
II.7.1.- Fases de la fermentación	27
II.7.2.- Tipos de Fermentación	29
II.7.3.- Condiciones necesarias para la fermentación alcohólica	30
II.8.- Levaduras	32
II.8.1.- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
II.8.2.- <i>Saccharomyces bayanus</i>	34
II.9.- Métodos de recuperación del etanol	35
II.9.1.- Destilación	35
II.9.2.- Clasificación de la destilación	36
CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO	39

Continuación

TABLA DE CONTENIDO

III.1.- Fases de la investigación	39
III.2.- Diseño de investigación	40
III.3.- Materiales, equipos y reactivos	42
III.4.- Métodos	43
III.4.1.-Preparación del sustrato para la hidrólisis del almidón	43
III.4.2.-Hidrólisis del almidón	43
III.4.3.-Identificación de la presencia de almidón	44
III.4.4.-Determinación de dextrosa equivalente	45
III.4.5.-Determinación de glucosa	46
III.4.6.-Medio de cultivo para las levaduras	47
III.4.7.-Cultivo de las levaduras	48
III.4.8.-Crecimiento de las levaduras	49
III.4.9.-Fermentación	51
III.4.10.-Recuperación del alcohol producido	51
III.4.11.-Rendimiento de las fermentaciones	52
III.4.12.-Determinación de la concentración de alcohol mediante el método del picnómetro	53
III.4.13.-Determinación del punto de ebullición del alcohol producido mediante el método de Sibolowoff	55

Continuación

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
IV.1.- Pregelatinización	57
IV.2.- Hidrólisis	57
IV.2.1.- Licuefacción	58
IV.1.2.- Sacarificación	58
IV.3.- Curva de equilibrio de la Glucosa	60
IV.4.- Determinación de la concentración de glucosa en el hidrolizado	61
IV.5.- Fermentación	61
IV.5.1.-Determinación de la concentración de glucosa en las diferentes soluciones preparadas para la fermentación	61
IV.5.2.-Determinación de la concentración de glucosa en las soluciones después de la fermentación	62
IV.6.- Recuperación del etanol	63
IV.7.- Rendimiento de las fermentaciones	64
IV.9.- Concentración del alcohol por el método del picnómetro	65
IV.10.-Punto de ebullición del alcohol obtenido	65
CONCLUSIONES	67
RECOMENDACIONES	69

Continuación

TABLA DE CONTENIDO

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS	70
ANEXO A	76
ANEXO B	80

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunas Propiedades del Etanol	8
Tabla 2. Usos del grano de arroz	11
Tabla 3. Composición química del grano de arroz partido	12
Tabla 4. Composición química y valores energéticos del arroz	12
Tabla 5. Algunas propiedades del almidón de arroz	16
Tabla 6. Clasificación de las enzimas	19
Tabla 7. Componentes para la preparación del medio de cultivo para las levaduras	48
Tabla 8. Características de los equipos empleados en la destilación	52
Tabla 9. Rango de temperaturas de pregelatinización	57
Tabla 10. Propiedades determinadas al final de la licuefacción	58
Tabla 11. Propiedades determinadas en la sacarificación	59
Tabla 12. pH de las diferentes soluciones al final de la fermentación	63
Tabla 13. Peso específico y concentración de los alcoholes obtenidos	65
Tabla 14. Temperatura de ebullición del etanol producido	66

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sección vertical ampliada del grano de arroz	11
Figura 2. Estructura de la Amilosa	13
Figura 3. Estructura de la Amilopectina	14
Figura 4. Diferencia de requerimiento energético entre una reacción catalizada por enzimas y una no catalizada	16
Figura 5. Enzima, sustrato y formación de productos	18
Figura 6. Efecto del pH sobre la actividad de algunas enzimas	22
Figura 7. Efecto ejercido por el incremento en la temperatura en la velocidad de reacción de las enzimas	23
Figura 8. Efecto ejercido por el incremento en la temperatura en la actividad enzimática	23
Figura 9. Efecto de distintas concentraciones de sustrato sobre la actividad enzimática	24
Figura 10. Acción de las amilasas	25
Figura 11. Esquema de un fermentador ilustrando su construcción y los dispositivos para la aireación y procesos de control	27
Figura 12. Fases de la Fermentación	29
Figura 13. Cuñas con las levaduras en crecimiento	49
Figura 14. Levaduras en el cuarto de incubación	50
Figura 15. Levaduras listas para la fermentación	50
Figura 16. Picnómetro	53
Figura 17. Grado alcohólico para diferentes densidades	54
Figura 18. Resultado de la determinación cualitativa de la presencia de almidón en la licuefacción y la sacarificación	59
Figura 19. Dextrosa equivalente en función del tiempo para la lechada 4	60

Continuación

INDICE DE FIGURAS

Figura 20. Curva de calibración de la glucosa	60
Figura 21. Concentración inicial de glucosa en las soluciones para la fermentación	62
Figura 22. Concentración final de glucosa en los fermentos	62
Figura 23. Porcentaje de alcohol recuperado	63
Figura 24. Rendimiento de las fermentaciones	65

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCION

Debido al crecimiento en la demanda de combustibles, los altos precios del petróleo y la contaminación que generan las emisiones provenientes de la combustión de sus derivados, se ha generado la necesidad de buscar nuevas alternativas que originen soluciones a mediano y largo plazo en cuanto al consumo de combustibles fósiles, y esto se enfoca en la utilización de las energías renovables que pueden ser muy apropiadas para solucionar el problema planteado.

El combustible renovable más común actualmente es el etanol, derivado del maíz (almidones) y la caña de azúcar (sacarosa). Debido a su importancia en el ámbito alimenticio a nivel mundial y al alza en los precios de estos productos agrícolas que son consumidos en grandes cantidades, se están buscando nuevas fuentes de energía que no supongan un peligro para la seguridad alimentaria de la población a nivel mundial.

Así pues, los residuos agroindustriales son una buena opción para su uso como materia prima para la producción de bioetanol.

Este estudio plantea el uso de residuos amiláceos como el arroz partido o de segunda como materia prima para la producción de bioetanol sea para uso industrial o como combustible.

Se plantea hidrolizar y fermentar el arroz de segunda para finalmente someter el producto obtenido a operaciones de separación con el fin de obtener un etanol con alto grado de concentración.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

I.1.-Antecedentes:

La utilización de los biocombustibles líquidos es tan antigua como la de los mismos combustibles de origen fósil y los motores de combustión. Así, cuando hace más de 100 años Rudolf Diesel diseñó el prototipo del motor diesel ya estaba previsto que funcionara con aceites vegetales. De hecho, en las primeras pruebas, lo hizo funcionar con aceite de maní. Sin embargo, cuando el petróleo irrumpió en el mercado era barato, razonablemente eficiente y fácilmente disponible. Uno de sus derivados, el gasóleo, rápidamente se convirtió en el combustible más utilizado en el motor diesel.

También cuando Henry Ford hizo el primer diseño de su automóvil Modelo T en 1908, esperaba utilizar el etanol como combustible. De hecho, de 1920 a 1924, la Standard Oil Company comercializó un 25 % de etanol en la gasolina vendida en el área de Baltimore. Sin embargo, los elevados precios del maíz, junto con las dificultades de almacenamiento y transporte, hicieron abandonar el proyecto. A finales de la década de los veinte y durante la década de los treinta, se hicieron esfuerzos para recuperar sin éxito esta iniciativa. A raíz de esta caída en la utilización del etanol, Henry Ford y diversos expertos unieron fuerzas para promover su recuperación. Se construyó una planta de fermentación en Atchinson (Kansas) con un potencial para fabricar 38.000 litros diarios de etanol para automoción. Durante los años treinta, más de 2.000 estaciones de servicio en el Mediano Oeste vendieron este etanol hecho de maíz que denominó "gasohol". No obstante eso, la competencia de los bajos precios del petróleo obligó al cierre de la planta de producción de etanol a mediados de los años cuarenta. Como consecuencia, se acabó el negocio de los granjeros americanos y el gasohol fue sustituido definitivamente por el petróleo.

Durante el transcurso de la historia los biocarburantes siempre han tenido la crisis de los recursos petrolíferos como motor de desarrollo. El agotamiento de los recursos fósiles, el incremento de las emisiones de contaminantes (que se sitúan por encima de la capacidad de regeneración de los ecosistemas) y el hecho de que dos terceras partes de las reservas petrolíferas están en la inestable región del golfo Pérsico claman a gritos la necesidad de encontrar alternativas energéticas. Las crisis energéticas que sacudieron el siglo XX fueron el motor para incentivar la búsqueda de nuevas fuentes energéticas. Sin embargo, el actual modelo energético mayoritariamente basado en las energías fósiles y que engorda a la economía mundial está en crisis. Los denominados biocombustibles han entrado justo cuando se acercaba o se daba un período de crisis.

Octubre de 1973 pasó a la historia por la aparición de una fuerte crisis del petróleo asociada a la cuarta guerra árabe-israelí. Durante este mes, el precio de la gasolina, que se había mantenido prácticamente constante durante cinco años en los países industrializados, se dobló en cuestión de tres meses. El mundo desarrollado entero se resintió y los sectores más radicales comenzaron a defender el ataque militar en los países árabes para defender sus intereses. La escasez de este recurso no renovable hizo peligrar el suministro y este hecho comportó la búsqueda de combustibles alternativos a los derivados del petróleo.

A finales de 1979, a raíz de la preocupación que desencadenó la primera crisis del petróleo, se comercializó en EUA la mezcla de gasolina y etanol. Los combustibles alternativos se convirtieron en la solución al posible problema que representaba el agotamiento de los recursos no renovables. Así, la American Oil Company y otras empresas abanderadas en el sector comenzaron a comercializar la mezcla de etanol para diluir la gasolina y aumentar el octanaje. En Brasil, la crisis del petróleo también tuvo una fuerte repercusión. En este país, en el año 1975 se encauzó el proyecto Proalcohol, cuyo objetivo era la sustitución total de los combustibles de origen fósil. La alternativa propuesta era el bioetanol

proveniente de la melaza de la caña de azúcar. Esta nueva industria permitió la creación de casi un millón de lugares de trabajo, repartidos en más de 700 destilerías, en instalaciones complementarias, en redes de transporte y fabricación de motores específicos para estos combustibles, etc.

La aparición de una segunda crisis del petróleo relacionada con el principio de la guerra irano-iraquí a principios de la década de los ochenta provocó una nueva caída en el consumo de petróleo. La extracción de este combustible experimentó un importante descenso antes de recuperarse a finales de la década gracias al abaratamiento del precio del crudo. Esto comportó el abandono de las estrategias de cambio energético encauzadas hacía ya unos años. La década de los noventa comenzó con una nueva crisis, esta vez derivada de la invasión de Kuwait por Irak. Nuevamente, el precio del petróleo se volvió inestable y caro y los biocombustibles volvieron a la escena energética de la mayoría de los países.

Algunas de las medidas tomadas en su momento fueron por ejemplo las que en el año 1985 planteaban la introducción de los biocombustibles en Europa. El objetivo era sustituir el 25 % del combustible fósil por bioetanol. Su aplicación no se aprobó por cuestiones de rentabilidad y coste. Sin embargo, se dedicaron sustanciosos fondos para la investigación y desarrollo de estas tecnologías. Una interesante medida fue la propuesta a través de la directiva Scrivener, que consistía en la desgravación del bioetanol en valores cercanos a los que gravan los combustibles fósiles y así facilitar su competitividad. Esta medida ha tenido aplicaciones parciales especialmente en Italia, Francia, Alemania y Austria, donde se han desarrollado experiencias pioneras en el sector. Actualmente existen planes de fomento tanto para el biodiesel como para el bioetanol con el objetivo a nivel de Europa de que los biocombustibles lleguen a significar un 15% del consumo de combustible.

I.2.-Planteamiento del Problema:

La coyuntura del petróleo barato está llegando a su fin y el precio del barril podría volver rápidamente a US\$100 según dice la Agencia Internacional de Energía (IEA, por sus siglas en inglés). ^[1]

Casi cualquier país con suficiente terreno en su territorio puede producir etanol para su uso como combustible. A diferencia del petróleo, que debe ser extraído de unos yacimientos no existentes en todas las regiones.

Por esta razón, es necesaria la búsqueda de vías alternas de producción de combustibles debido al alto precio de los combustibles fósiles y a la gran cantidad de contaminantes que se generan a partir de ellos.

¿Por qué desarrollar el etanol y los biocombustibles?

- Energía: sustituir combustibles basados en petróleo para aumentar la seguridad energética, disminuir la dependencia frente a la volatilidad de los precios de petróleo, bajar los costos de combustibles o de las importaciones, disminuir la dependencia de países políticamente inestables.
- Medio Ambiente: disminuir daños ambientales relacionados con la cadena del petróleo, como por ejemplo los derrames de petróleo, además de reducir la contaminación. Según Otaviano Canuto ^[2], responsable de Brasil del Banco Mundial, el etanol contamina un 60% menos que la gasolina, una cifra que algunos expertos consideran que podría ser todavía mayor.
- Desarrollo Rural y Agrícola: apoyar a la agricultura nacional, mejorar la situación económica de las áreas rurales y de los ingresos de los agricultores.

Generalmente el bioetanol se produce principalmente a partir la caña de azúcar como es el caso de Brasil, y del maíz como ocurre en Estados Unidos, sin embargo existen muchos otros materiales que pueden utilizarse como materia prima para la producción de bioalcoholes como por ejemplo el arroz. Una gran cantidad de subproductos de la trilla de arroz tales como la cascarilla y el arroz

partido son subutilizados y desperdiciados, siendo estos materiales que pueden procesarse para producir biocombustibles.

Así pues, se plantea el uso del arroz de segunda como posible materia prima para la producción de etanol bien sea como producto de uso industrial o como combustible.

En Venezuela, se utiliza como aditivo para la gasolina sin plomo (aquella preparada sin la adición de Tetraetilo de Plomo, llamada comúnmente gasolina verde, actualmente el país importa el etanol de Brasil.

El estudio del etanol como combustible es un tema muy actual y en debate. Es muy posible que en plazos de tiempo no demasiado largos el uso de etanol se extienda creándose economías de escala que pueden no sólo abaratar costes sino también mejorar el balance energético mundial.

www.bdigital.ula.ve

I.3.- Hipótesis:

Mediante el tratamiento previo del arroz de segunda, se obtiene un hidrolizado con alto contenido de dextrosa que puede ser utilizado como medio de fermentación de levaduras comerciales como la *Saccharomyces cerevisiae* y la *Saccharomyces bayanus* para producir etanol de uso industrial y/o como combustibles.

I.4.- Objetivos de la Investigación:

❖ General:

- Obtener etanol de uso como combustible a partir de arroz de segunda.

❖ Específicos:

- Hidrolizar el material amiláceo (arroz de segunda).
- Preparar el medio de fermentación a partir del hidrolizado y algunos otros oligoelementos que pudiesen ser necesarios.
- Optimizar el proceso de fermentación.
- Recuperar y cuantificar el alcohol obtenido.
- Caracterizar el bioetanol.

I.5.- Alcances de la Investigación:

A corto plazo esta investigación servirá para futuros estudios en el campo de los biocombustibles a partir de residuos agroindustriales. A largo plazo se espera que esta investigación; en complemento con los numerosos estudios que ya se han desarrollado en este campo, sirva para generar fuentes de energía que no procedan de materia fósil y contribuir a la disminución de la contaminación y el calentamiento global.

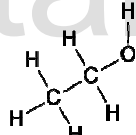
CAPITULO II

MARCO TEORICO

II.1.- Etanol:

El etanol, o alcohol etílico, cuya fórmula molecular es C_2H_5OH , es un alcohol que se presenta como un líquido incoloro e inflamable, con un punto de ebullición de $78,5\text{ }^\circ\text{C}$ y una densidad específica de $0,789$ a 20°C (68°F). Al mezclarse con agua en cualquier proporción, da una mezcla azeotrópica. En la tabla 1 se observan algunas propiedades del etanol: ^[3]

Tabla 1. Algunas Propiedades del Etanol ^[3]

Nombre (IUPAC) Sistemático	
Etanol	
General	
Fórmula semidesarrollada	CH_3CH_2OH
Fórmula estructural	
Fórmula molecular	C_2H_5OH
Identificadores	
Número CAS	64-17-5
Propiedades físicas	
Estado de Agregación	Líquido
Apariencia	Incoloro
Densidad	789 kg/m^3 ; $0,789\text{ g/cm}^3$
Masa	46,07
Punto de fusión	$158,9\text{ K}$ ($-114,3\text{ }^\circ\text{C}$)
Punto de ebullición	$351,6\text{ K}$ ($78,4\text{ }^\circ\text{C}$)
Temperatura crítica	514 K ($240\text{ }^\circ\text{C}$)

Propiedades químicas	
Acidez (pKa)	15,9
Solubilidad en agua	Miscible
Termoquímica	
$\Delta_f H^0_{\text{gas}}$	-235,3 kJ/mol
$\Delta_f H^0_{\text{líquido}}$	-277,6 kJ/mol
$S^0_{\text{líquido, 1 bar}}$	161,21 J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹

Fuente: wikipedia.org

El etanol tiene una amplia gama de usos como bebidas alcohólicas, como principio activo o excipiente de algunos medicamentos y cosméticos (es el caso del alcohol antiséptico 70º GL y en la elaboración de ambientadores y perfumes). Es un buen disolvente, y puede utilizarse como anticongelante y como combustible para automóviles sin mezclar o mezclado con gasolina en cantidades variables para reducir el consumo de derivados del petróleo [4].

II.2.- Bioetanol:

El bioetanol se puede producir a través de un proceso de hidrólisis y fermentación de la biomasa, y su posterior proceso de recuperación mediante destilación u otra operación de separación.

La biomasa puede ser sometida a hidrólisis ácida, alcalina o enzimática. En el caso de la hidrólisis enzimática se pueden utilizar enzimas como la α – amilasa y la glucoamilasa.

Es una alternativa atractiva como combustible debido a su fuente de carácter renovable y además por ser un compuesto oxigenado que posee 35% de oxígeno reduce las emisiones de partículas y compuestos NO_x de motores de combustión interna [5].

Tiene un número de octano alto (108), bajo número de cetano, límites de inflamabilidad amplios y calor de vaporización más alto que el de la gasolina, lo que permite mayores relaciones de compresión en los motores de combustión.

Es apropiado para mezclas combustibles con gasolina cuyo combustible resultante se conoce como gasohol (en algunos países, "alconafta"). Dos mezclas comunes son E10 y E85, que contienen el etanol al 10% y al 85%, respectivamente. El gasohol tiene mayor octanaje que la gasolina, se quema completamente de forma más lenta y fría ^[6].

Hoy en día se utilizan varios tipos de materias primas para la producción a gran escala de etanol de origen biológico (bioetanol):

- Sustancias con alto contenido de sacarosa (caña de azúcar, remolacha, melazas, sorgo dulce, otras)
- Sustancias con alto contenido de celulosa (madera, residuos agrícolas)
- Sustancias con alto contenido de almidón (maíz , patata , yuca , arroz) ^[7]

II.3.- Arroz:

El arroz es el alimento principal de dos terceras partes de la población del planeta. Es un cereal sano y nutritivo y tiene cualidades que lo vuelven ideal en cualquier tipo de dieta o requerimiento nutricional ^[8].

En la Tabla 2 se observa el uso que se le da al arroz a nivel mundial, de la producción mundial de arroz, alrededor del 88 % se utiliza en el consumo humano, cerca del 2,6 % se emplea en alimento para animales y 4,8 % de la producción global se pierde como desecho ^[9].

Tabla 2. Usos del grano de arroz.^[9]

	Consumo animal (%)	Semilla (%)	Desecho (%)	Manufactura de alimentos (%)	Consumo humano (%)	Otros usos (%)
África	1,41	2,32	7,17	0,48	86,67	1,94
Asia	2,71	3,05	4,55	0,68	88,85	0,16
Europa	6,53	2,36	0,82	0,34	87,40	2,55
Norteamérica	0,00	3,18	12,15	12,31	66,78	5,57
Centroamérica	0,73	1,23	4,11	3,89	89,66	0,38
Oceanía	0,05	2,31	2,06	1,73	92,71	1,14
Suramérica	2,05	2,75	8,35	3,00	83,18	0,66
Mundo	2,62	2,99	4,82	0,88	88,35	0,33

Fuente: Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. Biomass and Bioenergy 26 (2004)

La planta de arroz, científicamente denominada *Oryza sativa* y perteneciente a la familia de las gramíneas, está constituida por cuatro componentes principales: a) el germen, la parte más rica en nutrientes, ácidos grasos, aminoácidos y enzimas, y que se constituye en la parte germinal que da lugar al crecimiento del grano; b) el endospermo, que representa alrededor del 70% del volumen del grano y constituye al final del proceso el producto denominado arroz blanco; c) la cutícula o polvillo, el cual alcanza un 6,8% en volumen en el grano de arroz, utilizado como alimento para animales por su alto contenido de grasas y d) la cáscara o pajilla, que constituye aproximadamente 20% en peso del grano.^[10]

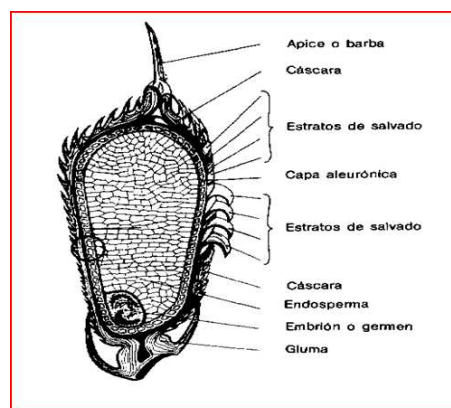


Figura 1. Sección vertical ampliada del grano de arroz.^[11]

En las Tablas 3 y 4, se especifica la composición química y los valores energéticos del arroz:

Tabla 3. Composición química del grano de arroz partido ^[12]

Componente	Composición en base seca (% Peso)	Composición en base húmeda (% Peso)
Almidón	90,20	80,6
Lípidos	0,54	0,40
Proteínas	8,00	6,70
Cenizas	0,48	0,30
Agua	-	12,0

Tabla 4. Composición química y valores energéticos del arroz. ^{a [13]}

Calorías	332
Agua (g)	12,00
Proteínas (g)	6,70
Lípidos (g)	0,40
Almidón (g)	72,90
Carbohidratos solubles (g)	0,20
Fibra (g)	1,00
Sodio (mg)	5,00
Potasio (mg)	92,00
Hierro (mg)	0,80
Calcio (mg)	24,00
Fósforo (mg)	94,00
Vitamina B1 (mg)	0,10
Vitamina B2 (mg)	0,03
Carbohidratos disponibles (g)	80,40

a. En base a 100g.

b. La información de esta tabla fue tomada de "Composition of foods". Agriculture Handbook N°8. Servicio de Investigación Agrícola de USA.; excepto para el tocoferol el cual fue tomado de "THE CHEMICAL COMPOSITION OF RICE" (USA - RICE COUNCIL)

II.4.- Almidón:

El almidón es un polisacárido natural, compuesto de unidades de glucopiranosas ligadas por enlaces α - glucosídicos, su fórmula aproximada puede representarse como $(C_6H_{10}O_5)_n$, donde n es probablemente mayor que un millar.

Se presenta en forma de gránulos blancos (que son relativamente densos, insolubles y se hidratan muy mal en agua fría), y está compuesto principalmente por un polímero lineal conocido como amilosa y un polímero ramificado llamado amilopectina, en la mayoría de los almidones, éstos se encuentran en proporciones de 20 a 25 % y 80 a 75 % respectivamente.^[14]

II.4.1.- Amilosa y amilopectina. Las fracciones del almidón: ^[15]

- **Amilosa**

La amilosa es un polímero lineal (sin ninguna o muy pocas ramificaciones) producto de la condensación de unidades D-glucopiranosas (véase Fig.2) por medio de enlaces glucosídicos α -(1,4), que establece largas cadenas lineales con 200-2500 unidades y pesos moleculares hasta de un millón; es decir, la amilosa es una α -D- (1,4)-glucana cuya unidad repetitiva es la α -maltosa. Tiene la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de hélice consta de seis moléculas de glucosa. El interior de la hélice contiene sólo átomos de hidrógeno, y es por tanto lipofílico.

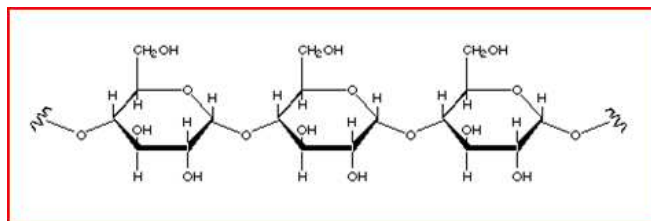


Figura 2. Estructura de la Amilosa

La naturaleza lineal de la amilosa le confiere ciertas propiedades únicas, por ejemplo, su habilidad para formar complejos con yodo (es responsable del color azul que presenta el almidón en presencia de este compuesto), se puede

precipitar de una solución de almidón mediante la adición de alcohol n-butílico que forma un complejo insoluble, así como asociarse con ella misma y precipitarse de la solución, donde tiende a cristalizarse o retrogradarse.

- **Amilopectina**

La amilopectina consiste de cadenas de D-glucosa unidas mediante enlaces α -(1,4), es altamente ramificada con cerca de 5 – 6 % de enlaces α -(1,6) [16]. Tiene un peso molecular alrededor de 10^8 , es una de las moléculas más grandes hallada en la naturaleza.

La amilopectina tiene poca tendencia a la retrogradación; sus soluciones calientes, al enfriarse, son viscosas, pero no gelifican, como consecuencia de su estructura ramificada, poco apta para la formación de redes moleculares.

Algunos almidones están constituidos exclusivamente por amilopectina y son conocidos como céreos.

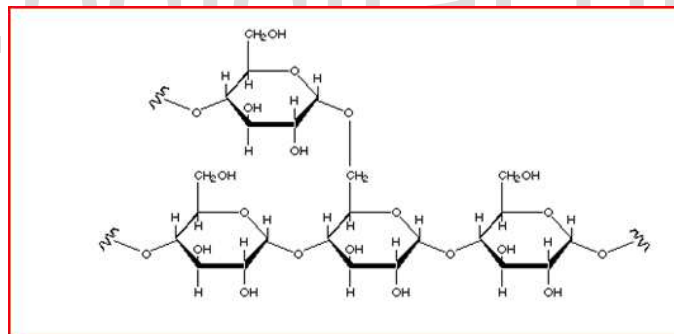


Figura 3. Estructura de la Amilopectina [16]

II.4.2- Pregelatinización: [17]

Los gránulos de almidón (en estado natural) son insolubles en agua fría, pero pueden absorber agua de manera reversible; es decir, pueden hincharse ligeramente con el agua y volver luego al tamaño original al secarse. Sin embargo cuando se calientan en agua, los gránulos de almidón sufren el proceso denominado gelatinización, que es la ruptura de la ordenación de las moléculas en los gránulos.

La temperatura crítica a la cual se produce esta ruptura se denomina temperatura de gelatinización y no es un valor único debido a que los gránulos del almidón generalmente no son de tamaño uniforme. La gelatinización total se produce normalmente dentro de un intervalo más o menos amplio de temperatura, siendo los gránulos más grandes los que primero gelatinizan.

Si se extiende el calentamiento por encima de la temperatura de gelatinización, se continúa rompiendo puentes de hidrógeno, aumentando la penetración de moléculas de agua en el gránulo, las cuales se asocian a grupos hidrófilos liberados durante el proceso. Ello origina un aumento progresivo del volumen, de la solubilidad del almidón y de la viscosidad y transparencia de la pasta.

El proceso continúa hasta que se alcanza la viscosidad máxima, hasta el momento en que se debilitan las fuerzas de cohesión que mantiene la estructura del gránulo y estos pierden su integridad, la viscosidad entonces comienza a descender debido a que se solubilizan gran número de las moléculas. Si en este punto, se deja enfriar la pasta, las moléculas de amilosa vuelven a asociarse lentamente formando un precipitado (cristalización) o un gel (formación de una red tridimensional). La temperatura de gelatinización es función de pH.

El almidón de arroz es el mayor constituyente del grano de arroz, está constituido por gránulos de forma poligonal y tamaño muy pequeño, en la Tabla 5 se detallan algunas propiedades del almidón de arroz, incluyendo la temperatura de gelatinización:

Tabla 5. Algunas propiedades del almidón de arroz.

Propiedad	Valor
Tamaño (μ) ^a	2 – 10
Forma	Poligonal
% Amilosa ^b	17 -33
Temperatura de gelatinización (°C) ^a	61 – 78
% solubilidad a 95 °C ^a	18

a. Según Barber S. ^[10]

b. Según Bates. F.L ^[18]

II.5.- Enzimas:

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas en los seres vivos, es decir, son sustancias que sin consumirse en una reacción, aumentan notablemente su velocidad. No hacen factibles las reacciones imposibles, sino que solamente aceleran las que espontáneamente podrían producirse. Ello hace posible que en condiciones fisiológicas tengan lugar reacciones que sin catalizador requerirían condiciones extremas de presión, temperatura o pH ^[19].

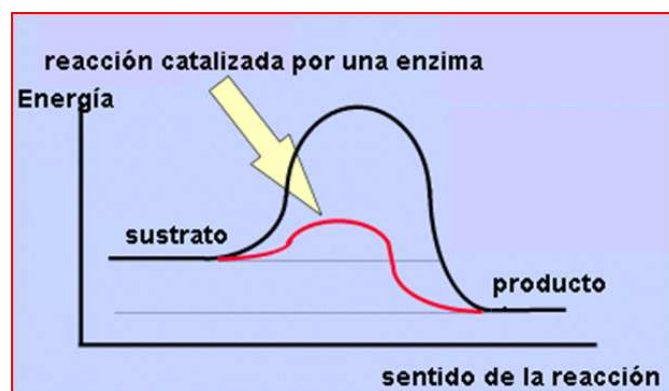


Figura 4. Diferencia de requerimiento energético entre una reacción catalizada por enzimas y una no catalizada. ^[20]

Cada célula y cada tejido tienen su actividad propia, lo que comporta continuos cambios en su estado bioquímico, en la base de la cual están las enzimas, que tienen el poder de facilitar y agilizar determinados procesos sintéticos y analíticos. Los propios genes son reguladores de la producción de las enzimas; por tanto, genes y enzimas pueden ser considerados como las unidades fundamentales de la vida.

Este concepto poco difundido casi hasta el siglo XX, se ha desarrollado y concretado cada vez más, y constituye un componente esencial de diversas disciplinas: la microbiología, la fisiología, la bioquímica, la inmunología y la taxonomía, formando además parte del campo aplicado, en gran variedad de industrias. El rasgo particular de las enzimas es que pueden catalizar procesos químicos a baja temperatura, compatible con la propia vida, sin el empleo de sustancias lesivas para los tejidos. La vida es, en síntesis, una cadena de procesos enzimáticos, desde aquellos que tienen por sustratos los materiales más simples, como el agua (H_2O) y el anhídrido carbónico (CO_2), presentes en los vegetales para la formación de hidratos de carbono, hasta los más complicados que utilizan sustratos muy complejos ^[21].

II.5.1.- Características de las enzimas:

Desde el punto de vista químico, las enzimas están formadas de carbono (C), Hidrógeno (H), oxígeno (O), Nitrógeno (Ni), y Azufre (S) combinados, pero siempre con pesos moleculares bastante elevados ^[19] que oscilan entre 12.000 y un millón.

Una enzima completa se denomina holoenzima, y está formada por una parte protéica (apoenzima) y un cofactor no protéico (coenzima) ^[12].

HOLOENZIMA = APOENZIMA + COENZIMA

En una reacción catalizada por un enzima:

- 1.- La sustancia sobre la que actúa el enzima se llama **sustrato**.

2.- El sustrato se une a una región concreta de la enzima, llamada **centro activo**. El centro activo comprende (1) un sitio de unión formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato y (2) un sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de la reacción.

Una vez formados los productos la enzima puede comenzar un nuevo ciclo de reacción ^[19]. Esto se ilustra en la Figura 5.

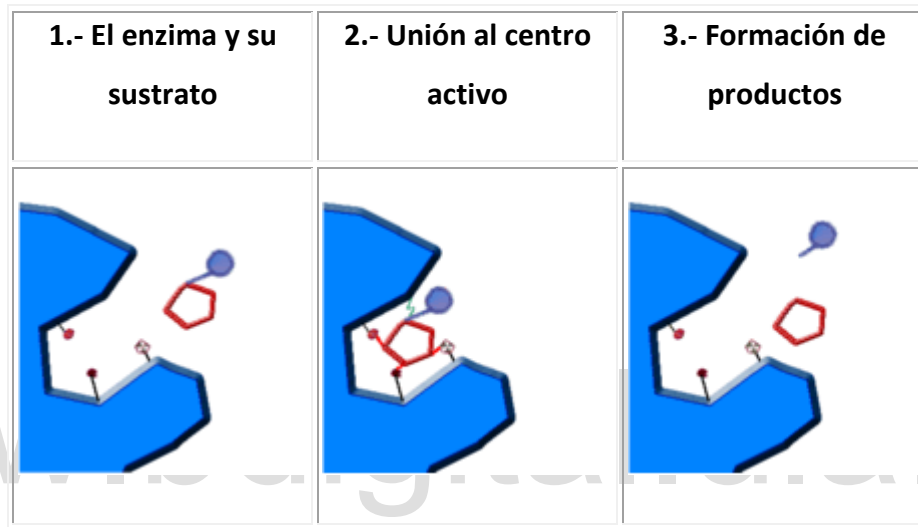


Figura 5. Enzima, sustrato y formación de productos. ^[22]

II.5.2.- Nomenclatura de las enzimas:

Antiguamente las enzimas fueron nombradas atendiendo al sustrato sobre el que actuaban, añadiéndole el sufijo **-asa** o haciendo referencia a la reacción catalizada. Así tenemos que la ureasa, cataliza la hidrólisis de la urea; la amilasa, la hidrólisis del almidón; la lipasa, la hidrólisis de lípidos; la ADNasa, la hidrólisis del ADN; la ATPasa, la hidrólisis del ATP, etc. ^[22].

En la actualidad el nombre de cada enzima puede ser identificado por un código numérico, encabezado por las letras EC (Enzyme Commission), seguidas de cuatro números separados por puntos. El primer número indica a cuál de las seis clases pertenece el enzima, el segundo se refiere a distintas subclases dentro

de cada grupo, el tercero y el cuarto se refieren a los grupos químicos específicos que intervienen en la reacción ^[22].

II.5.3.- Clasificación de la Enzimas:

Debido al gran número de enzimas conocidas en la actualidad, se ha adoptado una clasificación y nomenclatura más sistemática, en la que cada enzima tiene un número de clasificación que la identifica ^[19]. Dicha clasificación se muestra a continuación:

Tabla 6. Clasificación de las enzimas. ^[20]

Grupo	Acción	Ejemplos
1. Oxidoreductasas	<p>Catalizan reacciones de oxidorreducción, es decir, transferencia de hidrógeno (H) o electrones (e⁻) de un sustrato a otro, según la reacción general:</p> $AH_2 + B \Leftrightarrow A + BH_2$ $A_{red} + B_{ox} \Leftrightarrow A_{ox} + B_{red}$	<p>Dehidrogenasas</p> <p>Aminoxidasas</p> <p>Deaminasas</p> <p>Catalasas</p>
2. Transferasas	<p>Catalizan la transferencia de un grupo químico (distinto del hidrógeno) de un sustrato a otro, según la reacción:</p> $AB + C \Leftrightarrow A + CB$	<p>Transaldolasas</p> <p>Transcetolasas</p> <p>Transaminasas</p>

		Glucosidasas
		Lipasas
3. Hidrolasas	Verifican reacciones de hidrólisis con la consiguiente obtención de monómeros a partir de polímeros. Suele ser de tipo digestivo, por lo que normalmente actúan en primer lugar	Peptidasas Esterasas Fosfatasas
4. Isomerasas	Actúan sobre determinadas moléculas obteniendo de ellas sus isómeros de función o de posición. Suelen actuar en procesos de interconversión.	Isomerasas de azúcar Epimerasas Mutasas
5. Liasas	Realizan la degradación o síntesis (entonces se llaman sintetasas) de los enlaces denominados fuertes sin ir acoplados a sustancias de alto valor energético.	Aldolasas Decarboxilasas
6. Ligasas	Realizan la degradación o síntesis de los enlaces fuertes mediante el acoplamiento a sustancias ricas en energía como los nucleósidos del ATP	Carboxilasas Peptidosintetasas

II.5.4.- Actividad Enzimática:

La energía de activación es la cantidad de energía expresada en calorías, necesaria para que todas las moléculas de un mol, a una temperatura dada alcancen el estado reactivo ^[23]. Se define la unidad de actividad enzimática (U)

como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto.

La actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg prot) o por mililitro de disolución (U/ml). Recientemente, el Sistema Internacional de unidades (SI) ha definido la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que transforma 1 mol de sustrato por segundo. Esta unidad se llama katal (kat). Como 1 mol son 10^6 μmoles y 1 minuto son 60 segundos, resulta que 1 katal equivale a 60×10^6 U. Esta unidad es muy grande, de forma que se utilizan frecuentemente los submúltiplos como el microkatal (μkat , 10^{-6} kat) o el nanokatal (nkat, 10^{-9} kat) ^[196].

✓ Efecto del pH sobre la actividad enzimática :

Conociendo que las enzimas son proteínas, cualquier cambio brusco de pH puede alterar el carácter iónico de los grupos amino y carboxilo en la superficie proteica, afectando así las propiedades catalíticas de una enzima. A pH alto o bajo se puede producir la desnaturalización de la enzima y en consecuencia su inactivación.

Muchas enzimas tienen máxima actividad cerca de la neutralidad en un rango de pH de 6 a 8 ^[22]. La mayoría de los enzimas son muy sensibles a los cambios de pH. Desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente su actividad. Los seres vivos han desarrollado sistemas más o menos complejos para mantener estable el pH intracelular como los amortiguadores fisiológicos ^[19].

El efecto del pH sobre la actividad enzimática se observa en la figura mostrada a continuación para la pepsina, ureasa y arginasa.

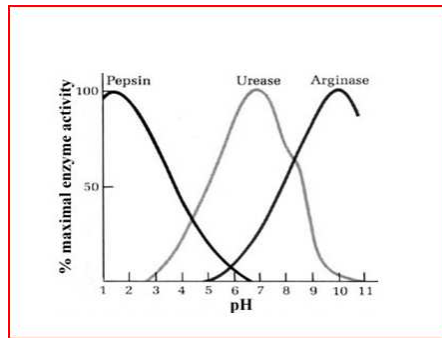


Figura 6. Efecto del pH sobre la actividad de algunas enzimas. [19]

✓ **Efecto de la Temperatura sobre la Actividad Enzimática:**

En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas: por cada 10°C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta regla general. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura, se empiezan a desnaturalizar por el calor. En las Figuras 7 y 8 se observa el efecto ejercido por el incremento de la temperatura en la actividad enzimática.

Generalmente la actividad enzimática va en ascenso en el rango de temperatura de 0 a 35 °C (véase Figura 8). La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se denomina temperatura óptima. Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse [18].

Sin embargo existen especies de bacterias y algas que habitan en fuentes de aguas termales y en el otro extremo ciertas bacterias árticas tienen temperaturas óptimas cercanas a 0° C. [22]

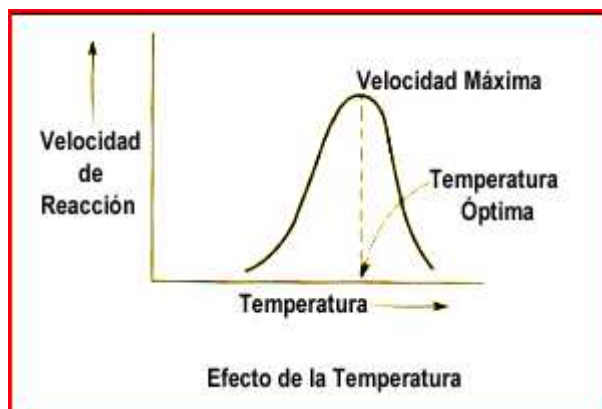


Figura 7. Efecto ejercido por el incremento en la temperatura en la velocidad de reacción de las enzimas. ^[19]

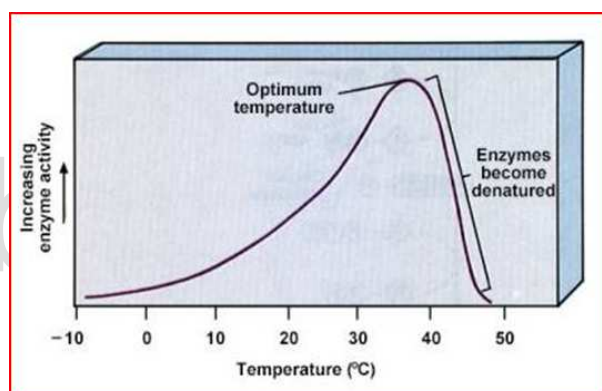


Figura 8. Efecto ejercido por el incremento en la temperatura en la actividad enzimática. ^[19]

✓ **Efecto de la Concentración sobre la Actividad Enzimática:**

La velocidad de una reacción enzimática depende de la concentración de sustrato. La Figura 9 muestra la velocidad de una reacción enzimática a 6 concentraciones distintas de sustrato.

Además, la presencia de los productos finales puede hacer que la reacción sea más lenta, o incluso invertir su sentido ^[24].

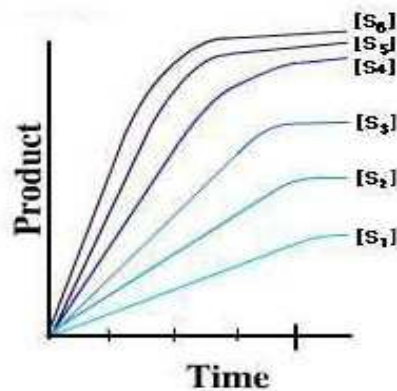


Figura 9. Efecto de distintas concentraciones de sustrato sobre la actividad enzimática. ^[19]

✓ **Efecto de los Inhibidores sobre la Actividad Enzimática:**

Los inhibidores enzimáticos son moléculas que se unen a las enzimas y disminuyen su actividad. La unión de un inhibidor puede impedir la entrada del sustrato al sitio activo de la enzima y/u obstaculizar que la enzima catalice su reacción correspondiente. La unión del inhibidor puede ser reversible o irreversible. Normalmente, los inhibidores irreversibles reaccionan con la enzima de forma covalente y modifican su estructura química a nivel de residuos esenciales de los aminoácidos necesarios para la actividad enzimática. En cambio, los inhibidores reversibles se unen a la enzima de forma no covalente, dando lugar a diferentes tipos de inhibiciones, dependiendo de si el inhibidor se une a la enzima, al complejo enzima-sustrato o a ambos. ^[22]

II.6.- Amilasas: ^[25]

Las amilasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del almidón. Están extensamente distribuidas en la naturaleza y son muy utilizadas en la industria, especialmente en la industria de los alimentos en la licuefacción de almidones y materias primas que los contienen.

La acción de las amilasas puede ser representada esquemáticamente como se muestra en la Figura 10:

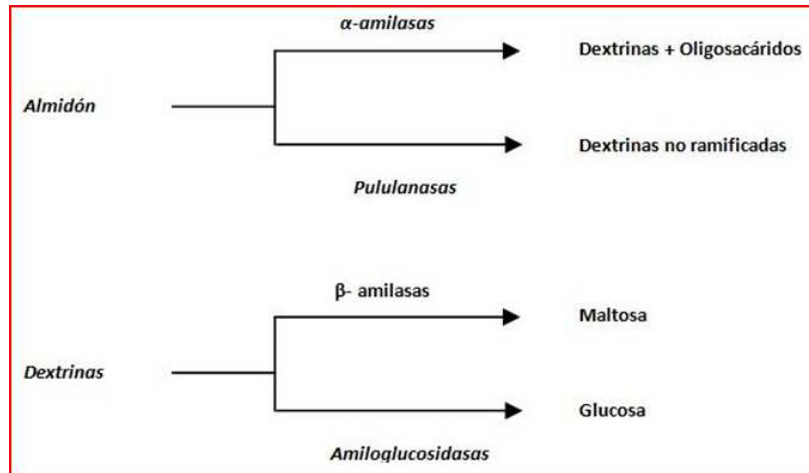


Figura 10. Acción de las amilasas

Las amilasas se clasifican en: ^[25]

Endoamilasas: Las α - Amilasa corresponden a este grupo, son conocidas como amilasas licuefactoras.

Exoamilasas: Son conocidas como amilasas sacarificantes, estas atacan el almidón gelatinizado y las dextrinas para producir maltosa. Las β -amilasas y glucoamilasas corresponden a este conjunto.

II.6.1.- α - amilasa:

Las α – amilasas se utilizan en el proceso de licuefacción del almidón. El uso de almidón pregelatinizado con una concentración de aproximadamente 30 % de sólido seco como sustrato acelera el efecto en la enzima. El progreso de la hidrólisis se puede observar debido al descenso de la viscosidad del sustrato y por la desaparición gradual del color al adicionar iodo. La reacción depende de la temperatura y el pH. Por ejemplo las α – amilasas de origen bacteriano como la proveniente del *Bacillus licheniformis* son microorganismos termoestables que pueden trabajar a temperaturas entre 90 y 105 °C y pH entre 5,8 y 6.

Durante la licuefacción con amilasas de origen bacteriano se ha alcanzado valores de dextrosa equivalente alrededor de 12. ^[26]

II.6.2.- Glucoamilasa o amiloglucosidasa:

Esta enzima ataca las cadenas de almidón, liberando glucosa de los extremos no reductores, los enlaces α -1-6 también son hidrolisados, pero de forma mucho más lenta. El pH y la temperatura óptima de las amiloglucosidasas dependen del tipo de microorganismo. Por ejemplo, las que provienen de *Aspergillus niger* tienen un rango de pH de 3 a 6 y una temperatura de 55 a 60 °C, mientras otras más resistentes pueden soportar 90 °C inclusive. La dextrosa equivalente que se obtiene en el proceso de sacarificación con amiloglucosidasa puede estar entre 92 y 95 %.^[26]

La finalidad de las glucoamilasas es sacarificar, es decir hidrolizar el almidón hasta obtener la mayor cantidad posible de glucosa.

II.7.- Fermentación:^[27]

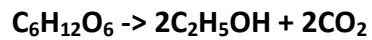
La fermentación es el proceso microbiano más estudiado y con mayor número de aplicaciones a nivel industrial no sólo de alimentos, también en la farmacéutica. La fermentación es un proceso generador de energía en el cual las moléculas orgánicas actúan como dadores y como aceptores de electrones.

La primera explicación bioquímica del proceso por el cual el azúcar en solución acuosa es descompuesto en alcohol y gas carbónico, en virtud de la acción de células vivas de levadura, la dio el químico francés Louis Pasteur, el cual vio que, mientras descomponen el azúcar en ausencia de aire, las células de levadura viven y se propagan en el líquido en fermentación y llamó al proceso de fermentación alcohólica "vida sin oxígeno".

Pasteur explicó que, por la descomposición de las células de levadura, de la misma manera que se produce energía en los tejidos de los animales y las plantas que respiran para satisfacer sus necesidades metabólicas cuando son oxidados en presencia de aire compuestos orgánicos.

Generalmente, la fermentación produce la descomposición de sustancias orgánicas complejas en otras simples, gracias a una acción catalizada.

Durante el proceso de fermentación, los azúcares se transforman en alcohol etílico y dióxido de carbono de acuerdo a la ecuación:



Ec. 1

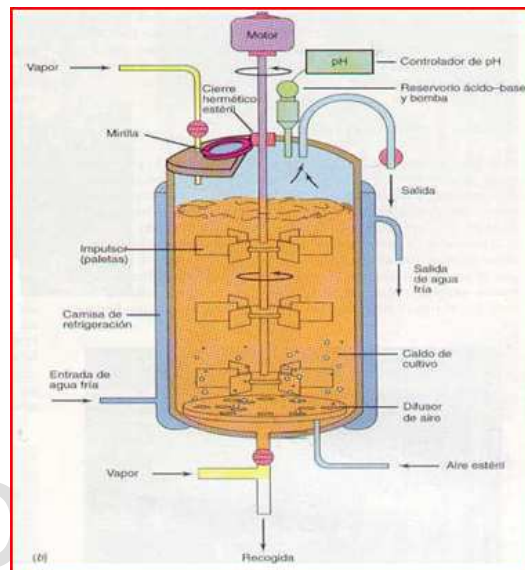


Figura 11. Esquema de un fermentador ilustrando su construcción y los dispositivos para la aireación y procesos de control [28]

II.7.1.- Fases de la fermentación: [29]

La Figura 12 describe el crecimiento microbiano en el tiempo, éste representa una típica curva de crecimiento que puede ser dividida en fases distinguibles, la fase de adaptación, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

- Fase de adaptación (Lag): Cuando una población microbiana es inoculada en medio fresco, el crecimiento generalmente no se inicia de inmediato sino después de un cierto tiempo, llamado fase lag que puede ser breve o largo, dependiendo de las condiciones. Si un cultivo que crece exponencialmente es inoculado al mismo medio bajo las mismas

condiciones de crecimiento no se observa la fase lag y el crecimiento exponencial continúa a la misma velocidad. Sin embargo, si el inoculo se toma de un cultivo viejo (fase estacionaria) y se inocula en el mismo medio, generalmente se presenta la fase lag, aún cuando las células del inoculo estén vivas.

- Fase exponencial: Es una consecuencia del hecho de que cada célula se divide para formar dos células, cada una de las cuales también se divide para formar dos células más y así sucesivamente. La mayor parte de los organismos unicelulares crecen exponencialmente. La velocidad de crecimiento exponencial varía mucho de un organismo a otro. Las condiciones ambientales, temperatura, composición del medio de cultivo, afectan a la velocidad de crecimiento exponencial así como las características del microorganismo.
- Fase estacionaria: El crecimiento exponencial se detiene, los nutrientes indispensables se agotan, no hay incremento o decremento en el número de células o masa, hay limitación de nutrientes y acumulación de sustancias tóxicas. Los microorganismos son fisiológicamente activos y viables. En un sistema cerrado no se puede llevar a cabo indefinidamente el crecimiento exponencial.
- Muerte celular: Si la incubación continúa después que una población alcanza la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero lo más probable es que mueran. Si esto último sucede, la población se encuentra en la fase de muerte. Durante esta fase, el conteo microscópico directo puede permanecer constante pero la viabilidad disminuye lentamente.

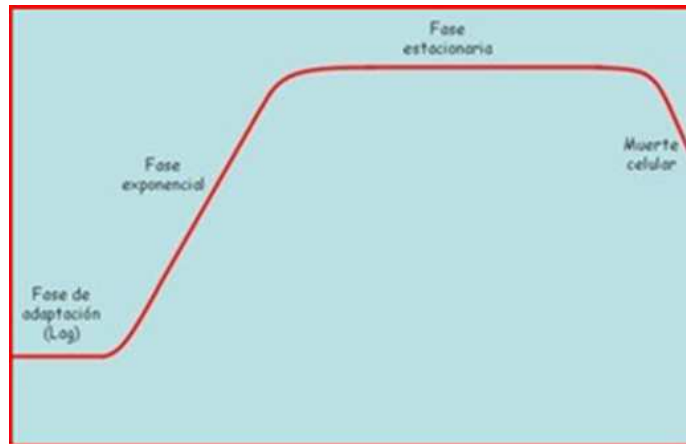


Figura 12. Fases de la Fermentación.

II.7.2.- Tipos de Fermentación: ^[30]

- **Fermentación láctica:** se llama al proceso celular donde se utiliza glucosa para obtener energía y donde el producto de desecho es el ácido láctico.
- **Fermentación acética:** es la fermentación bacteriana por Acetobacter, un género de bacterias aeróbicas, que transforma el alcohol etílico en ácido acético. La fermentación acética del vino proporciona el vinagre.
- **Fermentación pútrida:** es un tipo de fermentación que se lleva a cabo sin gasto de sustrato oxidante. Se basa en la degradación de sustratos de naturaleza proteica, para obtener productos malolientes como escatol, cadaverinas o indol. Algunas putrefacciones dan lugar a productos poco desagradables, que, por su fuerte aroma y sabor son utilizados en la fabricación de vinos y quesos, como la que lleva a cabo el penicillum rocheforti, que es la causa de las manchas verdosas del queso de roquefort.
- **Fermentación butírica:** se produce a partir de la lactosa o del ácido láctico con formación de ácido butírico y gas. Es característica de las bacterias del género Clostridium y se caracteriza por la aparición de olores pútridos y desagradables. La fermentación butírica es la conversión de los glúcidos en ácido

butírico por acción de bacterias de la especie *Clostridium butyricum* en ausencia de oxígeno.

- **Fermentación alcohólica:** es un proceso anaeróbico realizado por las levaduras, básicamente pero también lo pueden realizar algunas bacterias. De la fermentación alcohólica se obtienen muchos productos como: vino, cerveza, alcohol, cigarrillos, chocolate, pan, etc.

Las levaduras son microorganismos unicelulares, que consiguen su energía por medio de la fermentación alcohólica, en la que rompen las moléculas de glucosa para obtener la energía para sobrevivir y como producen el alcohol como consecuencia de la fermentación.

Cuando el medio es rico en azúcar, la transformación de la misma en alcohol hace que llegada una cierta concentración las levaduras no pueden sobrevivir en tal medio. Aunque hay distintos tipos de levaduras con diferentes tolerancias, el límite suele estar en torno a los 14 grados de alcohol para las levaduras del vino, por ejemplo.

II.7.3.-Condiciones necesarias para la fermentación alcohólica:

La determinación de los factores que limitan la glicólisis fermentativa del etanol son complejos debido a la interrelación existente y a la naturaleza de los parámetros intervinientes durante el proceso de fermentación.

Varios de ellos se deben tener en cuenta en la fermentación alcohólica industrial. En las restricciones que surgen durante el proceso se puede enumerar algunos de los más importantes, como por ejemplo:

- **Concentración de etanol resultante:** Una de las principales limitaciones de la fermentación, es la resistencia de las levaduras a las concentraciones de etanol (alcohol) que se llegan a producir durante el proceso, algunos

microorganismos como el *Saccharomyces cerevisiae* puede llegar a soportar hasta el 20% de concentración en volumen.^[31]

- Acidez del substrato: El pH es un factor taxativo en el proceso de la fermentación ya que las levaduras se encuentran afectadas claramente por el ambiente, bien sea alcalino o ácido. Por regla general el funcionamiento de las levaduras está en un rango que va aproximadamente desde pH 3,5 a 6.^[31] Los procesos industriales procuran mantener los niveles óptimos de acidez durante la fermentación usualmente mediante el empleo de disoluciones tampón. Los ácidos de algunas frutas (ácido tartárico, málico) coartan a veces este proceso.

- Concentración de azúcares: La concentración excesiva de hidratos de carbono en forma de monosacáridos y disacáridos puede frenar la actividad bacteriana. De la misma forma la baja concentración puede frenar el proceso. Las concentraciones límite dependen del tipo de azúcar así como de la levadura responsable de la fermentación. Las concentraciones de azúcares afectan a los procesos de ósmosis dentro de la membrana celular.

- Contacto con el aire: Una intervención de oxígeno (por mínima que sea) en el proceso lo detiene por completo (es el denominado Efecto Pasteur). Esta es la razón por la que los recipientes fermentadores se cierran herméticamente.

- La temperatura: El proceso de fermentación es exotérmico, y las levaduras tienen un régimen de funcionamiento en unos rangos de temperatura óptimos, se debe entender además que las levaduras son seres mesófilos. Si se expone cualquier levadura a una temperatura cercana o superior a 55 °C por un tiempo de 5 minutos se produce su muerte. La mayoría cumple su misión a temperaturas de 30°C.^[31]

- Ritmo de crecimiento de las cepas: Durante la fermentación las cepas crecen en número debido a las condiciones favorables que se presentan en el medio, esto hace que se incremente la concentración de levaduras.

- **Nutrientes y Activadores:** Las levaduras fermentativas necesitan los azúcares para su catabolismo, es decir para obtener la energía necesaria para sus procesos vitales, pero además necesitan otros substratos para su anabolismo como son nitrógeno, fósforo, carbono, azufre, potasio, magnesio, calcio y vitaminas, especialmente tiamina (vitamina B1). Por ello es de vital importancia que el medio disponga de una base nutricional adecuada para poder llevar a cabo la fermentación alcohólica.

El nitrógeno es de todos los nutrientes necesarios el más importante, siendo inevitable que el mosto contenga inicialmente nitrógeno amoniacal y en forma de aminoácidos por encima de 130-150 ppm. Una deficiencia de estos nutrientes hará que ataquen las proteínas presentes, liberándose H₂S.

- **Inhibidores:** Es importante evitar la presencia de inhibidores en el mosto como restos de productos fitosanitarios y ácidos grasos saturados de cadena corta.

Aguas abajo del proceso de fermentación, se tiene una solución acuosa con una concentración máxima 12 a 15 % en peso de etanol, la separación del etanol de esta solución requiere un extenso proceso. Es conocido el problema que se genera en la deshidratación del etanol, debido a que el etanol forma una mezcla azeotrópica o azeótropo a 95,6% en peso (97,2 % volumen) con el agua a una temperatura de 78,15 °C, lo que hace imposible separar el etanol del agua en una sola etapa de destilación ^[32].

II.8.- Levaduras:

Las levaduras son, por lo general, organismos unicelulares, y se presentan en formas muy variadas, desde las esféricas, ovoides y elipsoidales, a las cilíndricas, que pueden ser muy alargadas y aun filamentosas. Estas formas, aunque diversas según las especies, son lo bastante características para ser base de clasificación. Su estructura interna es compleja. Se reproducen

vegetativamente por gemación o por fisión, y sexualmente por producción de esporas. ^[33]

El hombre viene sirviéndose de las levaduras desde hace muchos siglos para fermentar zumos de frutas, para esponjar el pan y para hacer sabrosos y nutritivos ciertos productos alimenticios. Su importancia es aún mayor hoy que en tiempos pasados, porque se emplean procesos fermentativos más diversos, y además, para sintetizar ciertas vitaminas, grasas y proteínas partiendo de azúcares sencillos y de nitrógeno amoniacal. Se sabe, además, que algunas levaduras causan enfermedades en las plantas y en los animales y que otras alteran los alimentos y deterioran los productos textiles y otros materiales.

Las cepas puras de levaduras se cultivan en un medio con azúcares, compuestos nitrogenados, sales minerales y agua. El producto final puede aparecer en forma de células secas de levadura o prensado en pastillas con algún material excipiente.

Cuando se termina de utilizar un lote de levaduras destinadas a la fabricación del pan, a usos médicos, o para fabricación de alimentos, el medio de cultivo en el que han crecido se desecha. Sin embargo en la elaboración de vinos, cervezas, licores y alcoholes industriales, el medio de cultivo es el producto final, y en este caso son las propias levaduras las que se desechan, o bien se utilizan como pienso o alimento para animales.

Las distintas especies de levaduras pueden ser muy diferentes en cuanto a su fisiología, la mayoría necesitan más humedad para crecer y desarrollarse. El intervalo de temperatura de crecimiento de las levaduras es frecuentemente, parecido al de los hongos, con una temperatura óptima en torno a los 25 a 30°C y una temperatura máxima en torno a los 35 a 40°C.

Una reacción ácida del medio, próxima a un pH de 4 a 4,5 estimula el crecimiento de la mayoría de las levaduras, mientras que en medios básicos, no

crecen bien a no ser que se hayan adaptado a los mismos y aumenta la posibilidad de crecimiento bacteriano, crecen mejor en aerobiosis, aunque las especies de tipo fermentativo son capaces de crecer, aunque lentamente, en anaerobiosis.^[34]

En general, los azúcares son la fuente energética más apropiada para las levaduras, aunque en las oxidativas, por ejemplo, las formadoras de película oxidan los ácidos orgánicos y el alcohol, y también contribuyen en la producción de los sabores o “bouquet” de los vinos.

II.8.1.- Saccharomyces cerevisiae: ^[35]

El género **Saccharomyces** incluye muchos tipos diferentes de levaduras y forma parte del reino de los hongos. La incapacidad para utilizar nitratos y la capacidad de fermentar varios carbohidratos son las características típicas de los Saccharomyces. Sus colonias pueden crecer y madurar en 3 días y muestran un color amarillo oscuro. Muchos miembros de este género se consideran muy importantes en la producción de alimentos.

Un ejemplo es el Saccharomyces cerevisiae, que se usa en la producción de vino, pan y cerveza.

Las utilidades industriales más importantes de esta levadura son la producción de cerveza, pan y vino, gracias a su capacidad de generar dióxido de carbono y etanol durante el proceso de fermentación. Básicamente este proceso se lleva a cabo cuando esta levadura se encuentra en un medio muy rico en azúcares (como la D-glucosa). En condiciones de escasez de nutrientes, la levadura utiliza otras rutas metabólicas que le permiten obtener un mayor rendimiento energético, y por tanto no realiza la fermentación.

II.8.2.- Saccharomyces bayanus: ^[35]

Bayanus es una levadura del género Saccharomyces, y se utiliza en la vinificación y la fermentación de sidra. Está estrechamente relacionado con

Saccharomyces cerevisiae. Esta levadura tiene dos características esenciales, su habilidad para fermentar azúcares y su alto nivel de producción y tolerancia al alcohol en comparación a otras variedades de levaduras.

II.9.- Métodos de recuperación del etanol: ^[36]

El método más antiguo para separar el etanol del agua es la destilación simple, pero la pureza está limitada a un 95-96 % debido a la formación de un azeótropo de agua-etanol de bajo punto de ebullición. En el transcurso de la destilación hay que desechar la primera fracción que contiene principalmente metanol, formado en reacciones secundarias. Aún hoy, éste es el único método admitido para obtener etanol para el consumo humano. Para poder utilizar el etanol como combustible mezclándolo con gasolina, hay que eliminar el agua hasta alcanzar una pureza del 99,5 al 99,9%.

Para obtener etanol libre de agua pueden emplearse diferentes operaciones como la destilación azeotrópica o extractiva en una mezcla con benceno o ciclohexano, la destilación extractiva salina, entre otras. De estas mezclas se destila a temperaturas más bajas el azeótropo, formado por el disolvente auxiliar con el agua, mientras que el etanol se queda retenido. A escala de laboratorio se pueden utilizar desecantes como el magnesio, que reacciona con el agua formando hidrógeno y óxido de magnesio.

II.9.1.- Destilación:

La destilación es la operación de separar, mediante calor, los diferentes componentes líquidos de una mezcla. En la industria química se utiliza la destilación para la separación de mezclas simples o complejas. Una forma de clasificar la destilación puede ser la de que sea discontinua o continua.

El objetivo principal de la destilación es separar una mezcla de varios componentes aprovechando sus distintas volatilidades, o bien separar los materiales volátiles de los no volátiles.

Si la diferencia en volatilidad (y por tanto en punto de ebullición) entre los dos componentes es grande, puede realizarse fácilmente la separación completa en una destilación. Si los puntos de ebullición de los componentes de una mezcla sólo difieren ligeramente, no se puede conseguir la separación total en una destilación individual. Un ejemplo importante es la separación de agua, que hierve a 100 °C, y alcohol, que hierve a 78,5 °C. Si se hierve una mezcla de estos dos líquidos, el vapor que sale es más rico en alcohol y más pobre en agua que el líquido del que procede, pero no es alcohol puro. ^[37]

II.9.2.- Clasificación de la destilación:

Algunos de los tipos de destilación son:

- Destilación simple o sencilla.
- Destilación fraccionada.
- Destilación a presión reducida o al vacío.
- Destilación extractiva.
- Destilación por arrastre con vapor.
- **Destilación simple**

En una destilación simple, el líquido se destila desde el matraz de destilación, ocurriendo primeramente la vaporización, estableciéndose el equilibrio líquido vapor. Parte del vapor se condensa en las paredes del matraz, pero la gran parte pasa por la salida lateral condensándose debido a la circulación del agua fría por el tubo refrigerante, a este producto se le conoce como, “**destilado**”, y a la porción que queda en el balón de destilación el “**residuo**”, se debe mantener el ritmo de destilación, manteniendo continuamente una gota de condensado en el bulbo del termómetro. Para evitar el sobrecalentamiento de los líquidos es necesario introducir en el balón,

núcleos de ebullición y mantener constante el ritmo de destilación. La destilación simple es aplicable en los sistemas que contengan líquidos orgánicos de puntos de ebullición bastante diferenciados, ejemplo: Sistema butanos-etanol, agua-metanol.

- **Destilación fraccionada**^[38]

La destilación fraccionada no es nada más que una técnica para realizar una serie completa de pequeñas separaciones (destilación simple), en una operación sencilla y continua. Una columna de destilación fraccionada proporciona una gran superficie para el intercambio de calor, en las condiciones de equilibrio, que se establece entre el vapor que asciende y el líquido (condensado) que desciende. Esto tiene como consecuencia una serie completa de evaporaciones y condensaciones parciales en toda la longitud de la columna de fraccionamiento. Cuando el condensado en algún punto de la columna toma calor del vapor, parte se evapora de nuevo y el vapor formando el más rico en el componente más volátil (el de menor ebullición). Al mismo tiempo, cuando el vapor cede calor al condensado, parte del mismo se condensa, siendo este condensado más rico en el componente menos volátil (el de mayor punto de ebullición), bajo este panorama se puede decir que partiendo de la base de la columna, a medida que aumenta la altura aumenta el enriquecimiento del componente más volátil e inversamente con el componente menos volátil.

- **Destilación al vacío**^[39]

Muchas sustancias no pueden purificarse por destilación a la presión ordinaria, por que se descomponen a temperaturas cercanas a su punto de ebullición normal, en otros casos la destilación requiere de inmensas inversiones o utilización de energía en gran cantidad, o finalmente poseen problemas de equilibrio liquido-vapor, en consecuencia se emplea el método de destilación al vacío o a presión reducida. Se conoce que un líquido empieza a hervir cuando su presión de vapor iguala a la presión atmosférica o de operación, por lo tanto si

se reduce la presión de operación se tendrá la ebullición a temperaturas bajas, esta no incluye a la destilación fraccionada.

- **Destilación extractiva**^[39]

La destilación extractiva es una técnica utilizada para separar mezclas binarias azeotrópicas, en la que se adiciona un agente de separación o solvente, cuya característica principal es que no presenta la formación de azeótropos con ninguno de los componentes de la mezcla a separar.

El solvente altera de manera conveniente las volatilidades relativas de los componentes de la mezcla, por tal razón debe tener baja volatilidad para asegurar su permanencia en la fase líquida, además, para garantizar el contacto con la mezcla a lo largo de toda la columna debe tener un punto de ebullición superior al de los componentes a separar y se debe adicionar en una de las etapas cercanas al condensador, por encima de la etapa de mezcla azeotrópica.

- **Destilación por arrastre de vapor**

Es una técnica que sirve fundamentalmente para separar sustancias insolubles en agua y literalmente volátiles, de otros productos no volátiles mezclados con ellas. Este método es un buen sustituto de la destilación al vacío, y tiene algunas ventajas, ya que la destilación se realiza a temperaturas bajas. El comportamiento de la destilación de un sistema de dos fases inmiscibles, donde cada líquido ejerce su propia presión de vapor y la suma de ambas es de la presión de operación, y son independientes de las cantidades relativas de la mezcla. Estos hechos constituyen la base para la purificación de sustancias por el arrastre de una corriente de vapor. Existen varios compuestos orgánicos de punto de ebullición relativamente alto que con agua co-destilan en una cantidad en peso lo suficientemente grande para ser destilados con cierta rapidez por debajo del punto de ebullición del agua. Esto se debe a sus pesos moleculares relativamente elevados comparados con las del agua.

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

III.1.- Fases de la investigación:

El desarrollo del proceso de investigación se ha dividido en 5 etapas, las cuales comprenden:

Primera etapa

1. Revisión bibliográfica, que implica la búsqueda de información para obtener la mayor cantidad de datos posibles acerca del tema de la investigación.
2. Procesamiento de artículos y libros.
3. Desarrollo de una propuesta de investigación.

Segunda etapa

1. Preparación de la materia prima y los reactivos para la hidrólisis del material amiláceo.
2. Pregelatinización del almidón.
3. Hidrólisis del material amiláceo, comprende la licuefacción y la sacarificación.
4. Evaluación de las técnicas de medición de la dextrosa equivalente y la cantidad de glucosa en el hidrolizado.

Tercera etapa

1. Preparación del medio de cultivo para la fermentación.
2. Fermentación del hidrolizado.
3. Recuperación del producto obtenido de la fermentación mediante operaciones de destilación.
4. Cuantificación del etanol producido.

Cuarta etapa

1. Análisis de resultados.
2. Escritura, revisión y presentación del proyecto de grado.

III.2.- Diseño de investigación:

Las pautas a seguir para el estudio de la producción de bioetanol a partir de material amiláceo son:

- Molienda del arroz de segunda: Se realizará utilizando un molino Thomas Wiley Modelo ED-5 existente en el Laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ingeniería.
- Pregelatinización: El almidón pregelatinizado es el sustrato para la α -amilasa en la licuefacción. La pregelatinización se realizará calentando hasta llegar al rango de temperatura de gelatinización del almidón de arroz.
- Licuefacción: Es la primera parte de la hidrólisis enzimática del almidón, en la cual disminuye la viscosidad de la lechada de almidón debido a la ruptura de los enlaces alfa 1-4- glucosídicos. En esta etapa se utilizará la enzima RESIN ALPHA, una α -amilasa manufacturada por PROENZIMAS LTDA, para la industria de los alimentos. La ficha técnica facilitada por la compañía se encuentra en el ANEXO B.
- Sacarificación: Es la segunda etapa de la hidrólisis en la cual la amiloglicosidasa ataca las cadenas ramificadas del almidón liberando glucosa de los extremos no reductores. En la etapa de sacarificación se utilizará la enzima **Naturalzyme GA 300 L**, una glucoamilasa manufacturada por PROENZIMAS LTDA. La ficha técnica facilitada por la compañía se encuentra en el ANEXO B.

- Determinación de la dextrosa equivalente: Se realizará preparando las soluciones A y B de Fheling, solución de glucosa anhidra al 0,5 % y solución de azul de metileno al 1%, para luego titular las muestras y determinar la dextrosa equivalente (DE).
- Glucosa en el hidrolizado: Se determinará con un kit de glucosa oxidasa.
- Preparación del medio de cultivo para las levaduras que serán empleadas en la fermentación: El medio de cultivo se preparará empleando los componentes necesarios para el crecimiento de la levadura, tales como el nitrógeno y la glucosa.
- Inoculación de la levadura en el medio de cultivo para reproducir la levadura: Para esta etapa se emplearán cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* proporcionadas por el **Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos (BIOMI)** de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes.
- Fermentación del hidrolizado: Se utilizarán soluciones con diferentes concentraciones de glucosa provenientes del hidrolizado obtenido que serán inoculadas con las dos variedades de cepas disponibles.
- Recuperación del etanol: Para la recuperación del etanol primero se hará una destilación simple.
- Determinación del punto de ebullición y la concentración del producto obtenido: estas son dos de las propiedades del alcohol que serán determinadas, el punto de ebullición por el método de Sibolowoff y la concentración empleando el método del picnómetro.

III.3.- Materiales, equipos y reactivos:

Los implementos y materiales a utilizar para el desarrollo de la investigación se indican a continuación:

Arroz de segunda	Kit de determinación de glucosa
α - amilasa grado alimenticio	Cilindros graduados
Glucoamilasa grado alimenticio	Matraces de 250 y 500 ml
Saccharomyces cerevisiae	Balanza analítica
Saccharomyces bayanus	Estufa
Ácido clorhídrico 1 M	Desecador
Hidróxido de sodio 0,2 N	Tubo de Thiele
Glucosa anhidrida	Picnómetro
Reactivos de Fehling	Balanza analítica
Extracto de malta	Espectrofotómetro
Extracto de levadura	Medidor de grados Brix
Peptona	Mechero
Agar	Molino
Reactivo de Lugol	Tubos de ensayo
Equipo de destilación de vidrio	Autoclave
Plancha térmica	

III.4.- Métodos:

III.4.1.-Preparación del sustrato para la hidrólisis del almidón:

Para preparar el sustrato de las enzimas para la hidrólisis, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Se molió y tamizó aproximadamente 5 kg de arroz de segunda en un molino de laboratorio con tamices de 1 mm de diámetro de orificio.
2. Se preparó la lechada de almidón con 40 % base seca, mezclando 0,5 L de agua y 0,333 Kg de harina de arroz.
3. Luego se pregelatinizó mediante calentamiento con mechero, mezclando constantemente para lograr uniformidad durante aproximadamente 30 minutos. El proceso de gelatinización se detuvo al observar la formación de un gel.

Durante el proceso de gelatinización se utilizó la enzima RESIN ALPHA, una α – amilasa de grado alimenticio manufacturada por PROENZIMAS LTDA para disminuir la viscosidad de la lechada y facilitar el mezclado. Se agregó 0,12 ml de RESIN ALPHA, equivalente al 25 % de la dosis recomendada por el fabricante (Ver Anexo B).

La dosis de α - amilasa será de 0,5 a 0,2 % sobre base seca de almidón.

III.4.2.- Hidrólisis del almidón:

La hidrólisis del almidón contenido en el material amiláceo se realizó en dos etapas, una etapa de licuefacción la cual se llevó a cabo empleando α – amilasa y una etapa de sacarificación en la que se utilizó amiloglucosidasa.

Etapas de licuefacción:

1. Se midió el pH de la lechada, el cual debe estar en un rango de 5,5 a 7.
2. Al almidón pregelatinizado se agregó 0,36 ml de RESIN ALPHA, cantidad equivalente al 75% de la dosis recomendada por el fabricante.

3. Se calentó la lechada de forma constante hasta 95 °C, temperatura a la cual se realizó la licuefacción.
4. El proceso de licuefacción se llevó a cabo en aproximadamente 3 horas.
5. Una alícuota de la lechada se centrifugó para separar los sólidos, se le realizó la prueba de lugol para determinar la presencia de almidón y se determinó la dextrosa equivalente.

Etapa de sacarificación:

1. Se enfrió la lechada hasta 55-60 °C, rango de temperatura en el cual se realizó la sacarificación.
2. El pH durante el proceso de sacarificación debe estar entre 3 y 6, por lo que se realizó un ajuste del pH utilizando una solución de HCl 1M hasta pH 5,5 y hasta 4,5.
3. La dosis de glucoamilasa para la sacarificación será de 3 a 7,5 ml por cada 100 ml de medio (según datos del proveedor)
4. La lechada se mantuvo en estufa a 55 °C durante 90 horas.
5. La lechada hidrolizada se centrifugó para separar los residuos, debido a que se utilizó arroz en vez de almidón puro y por lo tanto habrá otras sustancias tales como proteínas y grasas.
6. Al sobrenadante de la etapa de centrifugación, se le realizó la prueba de lugol para determinar la presencia de almidón y se determinó la dextrosa equivalente.

III.4.3- Identificación de la presencia de almidón: ^[40]

El método se basa en la identificación de la presencia de almidón por la aparición de una coloración azul o marrón oscuro al combinarse la muestra con gotas de lugol cuando ésta contiene almidón.

1. El lugol se preparó disolviendo 1 gr de yodo y 2 gr de yoduro de potasio en agua, se afora a 200 cm³.
2. Se centrifugó la muestra y se tomó una alícuota del sobrenadante para realizar la determinación.
3. Se agregó unas gotas de Lugol a la muestra y se observó la coloración resultante.

III.4.4- Determinación de dextrosa equivalente: ^[41]

La dextrosa equivalente se determinó mediante el método de Lane y Eynon en donde la dextrosa, maltosa, y otros azúcares reductores contenidos en el hidrolizado, reducen el sulfato de cobre, que se encuentra en solución alcalina de tartrato. Para aplicar el método se prepararon:

- Solución de Fehling A. Se disolvieron 34,64 g de Sulfato de Cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en agua destilada hasta 500 ml.
- Solución de Fehling B. Se disolvieron 173 g de Tartrato de Sodio Potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y 50 g de Hidróxido de Sodio (NaOH) en agua destilada hasta 500 ml.
- Indicador azul de metileno ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), en solución acuosa al 1%.
- Solución de glucosa al 0,5%. Se preparó diluyendo 1,25 g de Glucosa Anhídrida en agua destilada hasta 250 ml.

Para la determinación de la dextrosa equivalente se procedió de la siguiente manera:

1. Se midió los grados Brix (°Bx) de la muestra a analizar para determinar la densidad de la solución.
2. Se calculó el peso aproximado de la muestra para luego diluir y realizar la titulación.

$$\text{Peso Aproximado de la muestra} = \frac{12500}{(DE_{\text{esperado}}) \cdot (^\circ Bx)} \quad \text{Ec. 2}$$

3. Se diluyó la muestra hasta 250 ml y se cargó una bureta de 25 ml.
4. En una fiola de 250 ml se añadió una mezcla de 25 ml de solución de Fehling, esto es 12,5 ml de Solución A y 12,5 ml de solución B.
5. Se agregó algunas perlas de ebullición y se procedió a calentar añadiendo lentamente la muestra.
6. Se dejó ebullicir por 2 minutos y se agregaron algunas gotas de azul de metileno, siempre agitando.
7. La titulación se detuvo cuando se observó la desaparición de la coloración azul y la formación de un precipitado pardo rojizo.
8. Se calculó la dextrosa equivalente mediante la siguiente ecuación:

$$DE = \frac{250 (a) (10)}{(b) (g) (d)} \quad \text{Ec.3}$$

Donde

a= Factor (La tabla con los factores se encuentra en el ANEXO B)

b= ml solución problema gastada en titulación

g= gr de muestra /250 ml

d= % solido seco en la muestra (°Bx)

III.4.5- Determinación de glucosa: ^[42]

Se empleó un kit de determinación de glucosa por oxidación de la glucosa enzimático manufacturado por QUALITEST.

La glucosa se oxida enzimáticamente por la glucosa oxidasa produciendo ácido glucónico y agua oxigenada. Esta última oxida al cromógeno en presencia de peroxidasa produciendo un compuesto de color rosado cuya intensidad es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra analizada. La metodología es la siguiente:

1. Se preparó 250 ml de reactivo reconstituido mezclando el contenido total de un vial de enzimas y un vial de sustrato en una de las botellas de solución tampón.

2. Se mezclaron 10 microlitros de muestra o patrón con 1 mililitro de reactivo reconstituido y se encubó por 10 minutos a 35 - 37 °C o 30 minutos a temperatura ambiente. Se observó la aparición de coloración rosada.

3. Se midió la absorbancia a 510 nm.

4. Según especificaciones del fabricante, el color es estable por una hora. La reacción colorimétrica es lineal hasta una concentración de 400 mg/dl de glucosa. La concentración de la glucosa se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$Glucosa (mg / dl) = \frac{Absorbancia\ de\ la\ muestra}{Absorbancia\ del\ patrón} \cdot Concentración\ del\ patrón \quad Ec.$$

4

5. Para comprobar la linealidad del método se construyó una curva de calibración preparando estándares de glucosa con concentraciones de 100 a 600 mg/dL. Las medidas se realizaron por triplicado.

III.4.6.- Medio de cultivo para las levaduras: ^[43]

El medio de cultivo se preparó según especificaciones proporcionadas por el profesor Balmore Guerrero del **Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos (BIOMI)**. Para preparar el medio de cultivo se empleó extracto de malta, extracto de levadura, peptona, glucosa y agar según la siguiente composición:

Tabla 7. Componentes para la preparación del medio de cultivo para las levaduras.

Componente	Concentración (g/L)
Extracto de malta	3
Extracto de levadura	3
Peptona	5
Glucosa	20
Agar	15

1. Se prepararon 500 ml de medio de cultivo con las cantidades correspondientes de cada componente.

2. Para ayudar a solubilizar los componentes se calentó la solución preparada.

3. Para preparar el sustrato para el crecimiento de las levaduras, se tomaron 50 ml de medio de cultivo en un matraz y se agregó 0,75 g de agar, con lo que la concentración de agar en la solución será 15 g/l.

4. El medio fue esterilizado en una autoclave por 20 min a una presión de 120 psi.

5. Se prepararon 6 cuñas de 5 ml de medio de cultivo con la solución que contenía agar y 2 matraces Erlenmeyer de 500 ml con 200 ml medio de cultivo cada uno, para reproducir las levaduras.

6. Una vez crecidas las levaduras, se procedió a centrifugar para separar las levaduras que quedan en el fondo.

III.4.7.- Cultivo de las levaduras:

1. Para cultivar las levaduras se prepararon 6 cuñas de 5 ml de medio de cultivo, en tubos de ensayo previamente esterilizados.

2. Tres cuñas se sembraron con *Saccharomyces cerevisiae* y las restantes con *Saccharomyces bayanus*.

3. Se dejaron crecer las levaduras en un cuarto oscuro a 30 °C durante 24 horas.

4. Se escogió la mejor cuña de cada cepa para inocular y reproducir las levaduras.



Figura 13. Cuñas con las levaduras en crecimiento.

III.4.8.- Crecimiento de las levaduras:

Para reproducir las levaduras se realizó el siguiente procedimiento:

1. Los matraces con medio de cultivo esterilizado fueron inoculadas con levaduras. Una para la *Saccharomyces cerevisiae* y la otra para la *Saccharomices bayanus*.

2. Se llevaron al cuarto de incubación a 30°C por dos días hasta que se observó turbidez en la muestra debido al crecimiento de las levaduras.



Figura 14. Levaduras en el cuarto de incubación.

3. Se centrifugó a 5000 rpm por 20 minutos para retirar el sobrenadante y utilizar las levaduras que precipitaron.
4. Estas levaduras se suspendieron nuevamente en 10 ml del sobrenadante que se había retirado. En la Figura 16 se observan las levaduras listas para la fermentación.
5. Se inoculan las diferentes soluciones de glucosa agregando 1 ml de levadura.

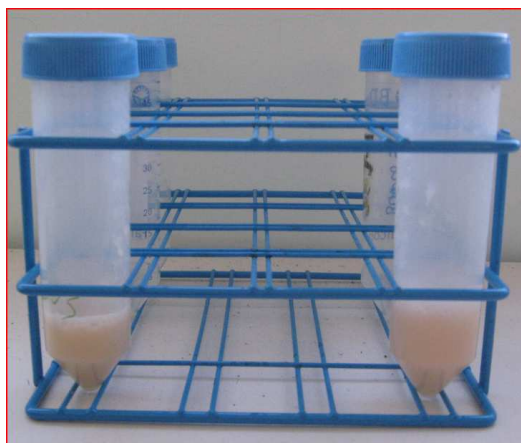


Figura 15. Levaduras listas para la fermentación.

III.4.9.- Fermentación:

Para la fermentación el protocolo de trabajo fue el siguiente:

1. Se esterilizaron 12 matraces Erlenmeyer de 250 ml para realizar las fermentaciones con las distintas levaduras.
2. Se midió el pH de las soluciones azucaradas para ajustar el pH a un valor dentro del rango óptimo. Como se mencionó anteriormente el rango óptimo de pH para este tipo de levadura está entre 3 y 6.
3. A cada matraz se añadió 200 ml de solución, cada una con diferentes concentraciones de glucosa. Esto se realizó por duplicado para cada cepa de levadura.
4. Se inocularon las soluciones con las levaduras y se taparon bien las matraces para evitar la entrada de aire y la contaminación.
5. Las fermentaciones se realizaron a temperatura ambiente.
6. Antes de pasar a la etapa de recuperación del alcohol se midió el pH de los fermentos.

III.4.10.- Recuperación del alcohol producido:

La recuperación del alcohol producido se realizó a través de una destilación simple para cada fermento. Se instaló un sistema de destilación en el laboratorio empleando una columna de vidrio, condensador, balones de vidrio, pinzas, soportes, cilindros graduados, mechero y un termómetro. En la Tabla 8 se especifican algunas de las características de los equipos utilizados.

Tabla 8. Características de los equipos empleados en la destilación.

Equipos	Material	Dimensiones	Observaciones
Columna de destilación	Vidrio	13 platos	Pyrex
Condensador	Vidrio		Tubo recto
Balón para el destilado	Vidrio	100 ml	Pyrex
Balón para el fondo	Vidrio	500 ml	Pyrex
Termómetro	Vidrio	-	Hasta 200 °C

Luego de la destilación se calcularon los porcentajes de recuperación de cada destilación de la siguiente forma:

$$\% \text{ recuperado} = \frac{V_{\text{destilado}}}{V_{\text{inicial fermento}}} \times 100 \quad \text{Ec. 5}$$

III.4.11.- Rendimiento de las fermentaciones:

Para calcular el rendimiento de las fermentaciones se realizaron los siguientes pasos:

1. Se calculó el peso de cada destilado obtenido asumiendo que la densidad de los destilados es 0,8193 g/ml en promedio. Este valor se obtuvo de la determinación del peso equivalente del alcohol destilado.
2. Se calculó la cantidad de glucosa consumida en cada fermentación.
3. Con la ecuación 6 se calculó el rendimiento de cada fermentación.

$$\text{Rendimiento} = \frac{g \text{ producto}}{g \text{ sustrato consumido}} \times 100 \quad \text{Ec. 6}$$

III.4.12.- Determinación de la concentración de alcohol mediante el método del picnómetro:^[44]

El picnómetro o botella de gravedad específica, es un frasco con un cierre sellado de vidrio el cual tiene un tapón con un finísimo capilar, de tal manera que un volumen puede obtenerse con gran precisión. Esto permite determinar la densidad de un fluido, en referencia a un fluido de densidad conocida como el agua o el mercurio, usando el principio de Arquímedes. Sirve para medir la densidad de líquidos no viscosos.



Figura 16. Picnómetro.^[45]

Para medir la gravedad específica de la muestra se utilizó un picnómetro de vidrio de 25 ml, estufa, desecador, pipetas de 25 ml y una balanza analítica con sensibilidad de hasta cuatro decimales. Se procedió de la siguiente manera:

1. Se lavó el picnómetro con agua destilada y se secó en la estufa.
2. Se introdujo en la campana y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente.
3. Se pesó el picnómetro vacío, (Pv).
4. Se llenó el picnómetro con agua destilada, se colocó la tapa y se observó la ausencia de burbujas dentro del mismo.

5. Se pesó en la balanza analítica, (Pa).
6. El picnómetro se vació y seco bien, para agregar la muestra.
7. Se llenó el picnómetro con la muestra, se secó bien y se pesó en la balanza, (Px).
8. Se limpió bien el picnómetro al finalizar las mediciones.
9. El peso específico (Pe) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Pe = \frac{Px - Pv}{Pa - Pv} \quad \text{Ec. 7}$$

Usando la Figura 18 por interpolación se calculó el grado alcohólico de la muestra.

Grado Alcohólico	Densidad	Grado Alcohólico	Densidad	Grado Alcohólico	Densidad	Grado Alcohólico	Densidad
1	0,998	26	0,970	51	0,932	76	0,875
2	0,997	27	0,969	52	0,930	77	0,872
3	0,996	28	0,968	53	0,928	78	0,870
4	0,994	29	0,967	54	0,926	79	0,867
5	0,993	30	0,965	55	0,924	80	0,864
6	0,991	31	0,964	56	0,922	81	0,861
7	0,990	32	0,963	57	0,920	82	0,859
8	0,989	33	0,963	58	0,910	83	0,858
9	0,988	34	0,961	59	0,916	84	0,854
10	0,987	35	0,959	60	0,914	85	0,850
11	0,985	36	0,958	61	0,911	86	0,847
12	0,984	37	0,956	62	0,909	87	0,844
13	0,983	38	0,955	63	0,907	88	0,842
14	0,982	39	0,953	64	0,905	89	0,837
15	0,981	40	0,952	65	0,902	90	0,834
16	0,980	41	0,950	66	0,900	91	0,831
17	0,979	42	0,949	67	0,898	92	0,827
18	0,978	43	0,947	68	0,895	93	0,824
19	0,977	44	0,945	69	0,893	94	0,820
20	0,976	45	0,944	70	0,890	95	0,816
21	0,975	46	0,942	71	0,888	96	0,812
22	0,974	47	0,940	72	0,885	97	0,808
23	0,973	48	0,938	73	0,883	98	0,804
24	0,972	49	0,936	74	0,880	99	0,799
25	0,971	50	0,934	75	0,878	100	0,794

Figura 17. Grado alcohólico para diferentes densidades. ^[46]

La ecuación que se utilizó para interpolar fue la siguiente:

$$Y = Y_1 + \frac{X - X_1}{X_2 - X_1} (Y_2 - Y_1) \quad \text{Ec. 8}$$

III.4.13.- Determinación del punto de ebullición del alcohol producido mediante el método de Sibolowoff: ^[47]

Si se calienta en un recipiente abierto un líquido, se observa que aumentará las moléculas que pasan del estado líquido al estado gaseoso al aumentar la temperatura. Es decir que con el aumento de la temperatura aumentara la presión de vapor. Al llegar a una determinada temperatura esta se mantendrá constante y el cambio de temperatura estado que se producía en la superficie, ahora se produce en toda la masa líquida. A esta temperatura la presión de de vapor es igual a la presión atmosférica, es decir que:

$$P_v = P_{atm} \quad \text{Ec. 9}$$

La temperatura a la cual se cumple la condición anterior se denomina Temperatura de Ebullición.

El punto de ebullición de los alcoholes obtenidos se determinó mediante el método de Sibolowoff. El procedimiento que se realizó para la determinación del punto de ebullición de la muestra fue:

1. Se instaló un Tubo de Thiele en una rejilla y se llenó con el fluido de calentamiento, en este caso se empleó aceite.
2. Se cerró el tubo capilar por un extremo y se comprobó que quedó bien cerrado.
3. En un tubo de ensayo pequeño se introdujo 5 ml de la muestra.

4. Se unió el tubo de ensayo y un termómetro con una liga y se introducen en el Tubo de Thiele.
5. Se introdujo el capilar dentro del tubo de ensayo con el extremo cerrado hacia arriba.
6. Con un mechero se calentó el cuello del Tubo de Thiele de manera uniforme.
7. Se observó la aparición de burbujas y se tomó nota del valor de la temperatura correspondiente a la temperatura de ebullición por calentamiento.
8. Se detuvo el calentamiento y se observó el desprendimiento de burbujas hasta que se detiene, en ese momento se tomó nota de la temperatura de ebullición por enfriamiento.
9. Se tomó nota de la presión atmosférica en el momento en que se realizó el experimento.
10. Con la ecuación de Antoine (Ec. 10) se calculó la temperatura de ebullición teórica la presión atmosférica. ^[49]

$$\log(p^*) = A - \frac{B}{C+T} \quad \text{Ec. 10}$$

Donde:

P*= presión de vapor, mmHg

T= Temperatura, °C

A=8,1122

B=1592,864

C=226,184

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1.- Pregelatinización:

Se llevó a cabo en aproximadamente 30 minutos para cada prueba realizada, se realizaron 6 pruebas en total. En la Tabla 9 se muestra las temperaturas promedios de operación durante el proceso de pregelatinización. La temperatura mínima se tomó cuando la lechada comenzó a espesar y la máxima cuando se observó la aparición de un gel transparente.

Tabla 9. Rango de temperaturas de operación durante la pregelatinización.

Temperatura Mínima (°C)	60
Temperatura Máxima (°C)	82

El rango de temperatura de pregelatinización para el almidón de arroz según la bibliografía consultada es 61 a 78 °C. Se observó que la temperatura máxima de operación durante el proceso de gelatinización (82 °C) estaba por encima del valor de referencia para la temperatura de pregelatinización. Esta diferencia pudo deberse a que la materia prima era arroz molido que contiene proteínas y grasas además de almidón.

IV.2.- Hidrólisis:

La hidrólisis se realizó en dos etapas, la licuefacción en la cual la α -amilasa disminuye la viscosidad del almidón pregelatinizado y una etapa de

sacarificación en la que la glucoamilasa ataca las cadenas de almidón, liberando glucosa de los extremos no reductores.

IV.2.1.- Licuefacción:

Se prepararon cuatro lechadas de almidón pregelatinizado. La temperatura de licuefacción promedio fue 95 °C a un pH más o menos constante e igual a 6. La Tabla 10 muestra los resultados de la determinación de la dextrosa equivalente (DE) y la presencia de almidón para cada lechada (Prueba del Lugol).

Tabla 10. Propiedades determinadas al final de la licuefacción.

Lechada	1	2	3	4
DE	11,51	11,26	10,9	11,91
Almidón	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

La dextrosa equivalente en la etapa de licuefacción fue de alrededor de 11,4 en promedio, lo que implica que los valores obtenidos en la determinación de la dextrosa equivalente en la etapa de licuefacción se acercan al valor sugerido por la bibliografía consultada (DE=12).

Adicionalmente, se comprobó que la enzima trabaja de manera óptima a un pH dentro del rango sugerido por el proveedor de la misma, ya que el pH óptimo sugerido por el proveedor PROENZIMAS LTDA para la enzima RESIN ALPHA esta entre 5,5 y 7.

IV.2.2.- Sacarificación:

La sacarificación se realizó con amiloglucosidasa a 55 °C durante 90 horas en promedio. En la Tabla 11 se exponen los resultados de la determinación de dextrosa equivalente (DE) así como el resultado de la prueba de la presencia de almidón en las lechadas.

De la misma manera, en la Tabla 11 se observa el valor de la dextrosa equivalente (DE) para la lechada 5, que es la unión de todos los hidrolizados.

Tabla 11. Propiedades determinadas en la sacarificación.

Lechada	1	2	3	4	5 *
pH	5,5	5,5	4,5	4,5	5,1
DE	86,55	87,24	93,25	95,72	95,3
Almidón	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

*La lechada 5 es la unión de todos los hidrolizados

Las lechadas con pH de 4,5 tienen valores de dextrosa equivalente más alto que los de pH 5,5. Este era el resultado esperado, ya que la enzima utilizada trabaja de forma óptima a un pH de 4,5.

La determinación de almidón mediante el uso de Lugol resultó negativa, lo que implica que prácticamente todo el almidón fue convertido a glucosa. En la Figura 18 se muestra la coloración resultante al realizar la prueba de Lugol para la licuefacción y para la sacarificación. El color marrón oscuro indica la presencia de almidón durante la etapa de licuefacción, en la etapa de sacarificación el color es amarillo, lo que implica que no hay almidón en la solución.

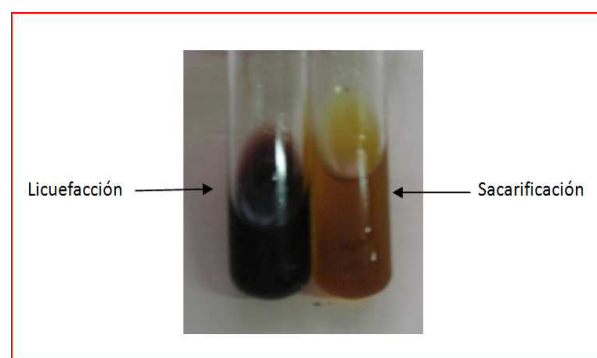


Figura 18. Resultado de la determinación cualitativa de la presencia de almidón en la licuefacción y la sacarificación.

En la Figura 19 se observa la curva de dextrosa equivalente en función del tiempo para la lechada 4. Como es de esperar, la dextrosa equivalente aumenta durante la hidrólisis a medida que transcurre el tiempo hasta llegar a un valor más o menos constante.

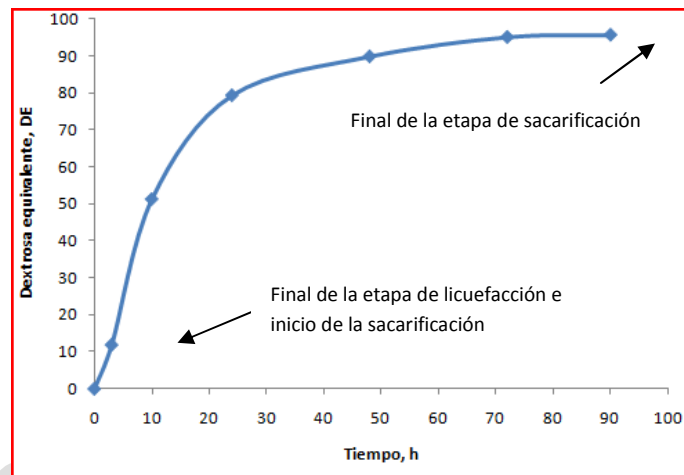


Figura 19. Dextrosa equivalente en función del tiempo para la lechada 4

IV.3.- Curva de equilibrio de la Glucosa:

La Figura 20 muestra la linealidad en el método de determinación de glucosa utilizado.

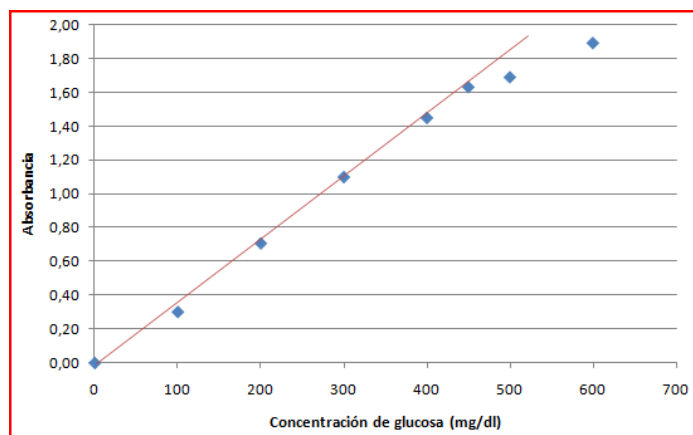


Figura 20. Curva de calibración de la glucosa.

El método fue lineal hasta 450 mg/dl, a concentraciones mayores mostró una desviación de su linealidad. Por lo tanto, las muestras de concentraciones mayores de 450 mg/dl se diluyeron con agua destilada y después de repetir la determinación, los resultados se multiplicaron por el factor de dilución correspondiente. Los datos de la curva de calibración se presentan en el Anexo A.

IV.4.- Determinación de la concentración de glucosa en el hidrolizado:

Para determinar la concentración del hidrolizado total, se diluyó en 1:100 la muestra para poder realizar la determinación de la glucosa. La concentración resultante de la muestra fue 164,83 g/l.

En el Anexo A se muestran los valores de absorbancia medidos para determinar la concentración de la glucosa en el hidrolizado.

IV.5.- Fermentación:

IV.5.1.- Determinación de la concentración de glucosa en las diferentes soluciones preparadas para la fermentación:

Se prepararon tres soluciones con concentraciones de glucosa 100, 120 y 150 g/l respectivamente con el fin de realizar las fermentaciones. Para ello se diluyó el hidrolizado de concentración 164,83 g/L. En La Figura 21 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de la concentración real de glucosa en las soluciones, los cuales no difieren mucho de los valores esperados. El pH de las soluciones fue de 5,6 en promedio.

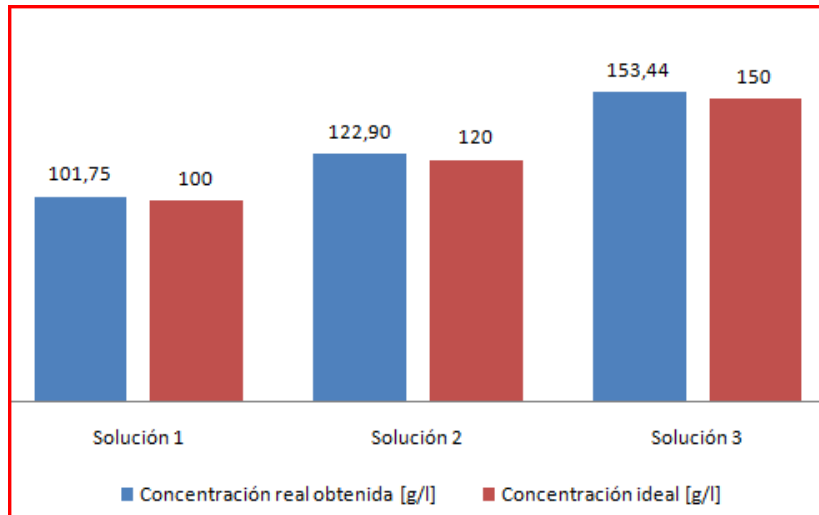


Figura 21. Concentración inicial de glucosa en las soluciones para la fermentación.

IV.5.2.- Determinación de la concentración de glucosa en las soluciones después de la fermentación.

Después de la fermentación se tomaron medidas de las concentraciones de glucosa en las soluciones para determinar el rendimiento de cada cepa de levadura. En la Figura 23 se observa la concentración de glucosa en las soluciones azucaradas que fueron fermentadas con *Saccharomyces cerevisiae* y las que utilizaron *Saccharomyces bayanus*.

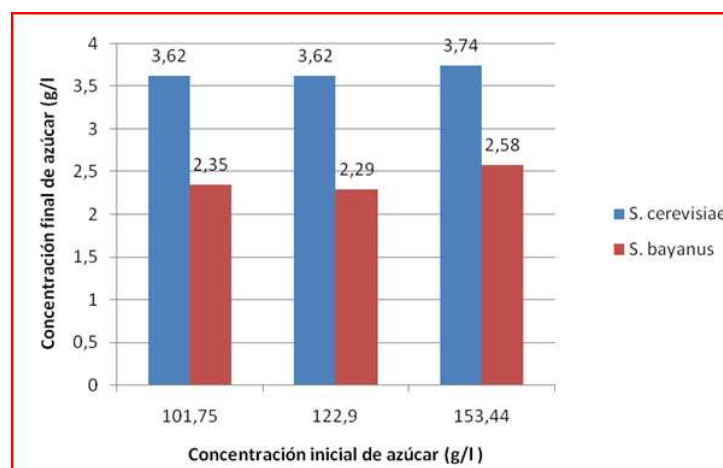


Figura 22. Concentración final de glucosa en los fermentos.

Las soluciones fermentadas con *S. bayanus* tuvieron la concentración de glucosa más baja al final del proceso, lo que implica un mayor consumo de glucosa durante el proceso de fermentación y por lo tanto mayor producción de alcohol. Al medir el pH de las soluciones se observa que al finalizar la etapa de fermentación el pH a disminuido. La tabla 12 muestra estos resultados.

Tabla 12. pH de las diferentes soluciones al final de la fermentación.

Glucosa inicial	g/l	Saccharomyces cerevisiae						Saccharomyces bayanus					
		100	120	150	100	120	150						
Muestra		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
pH		4,1	4,2	3,9	4,3	4,0	4,7	4,5	4,1	4,6	4,9	4,2	4,5

Este descenso del pH implica la disminución progresiva de la actividad de las levaduras.

IV.6.- Recuperación del etanol:

La recuperación del alcohol producido se realizó a través de una destilación simple en el laboratorio. La temperatura azeotrópica fue 74,8 °C. En la Figura 23 se muestra los diferentes porcentajes de alcohol recuperado para cada fermento, dependiendo de su concentración inicial de azúcar y la levadura que se empleó.

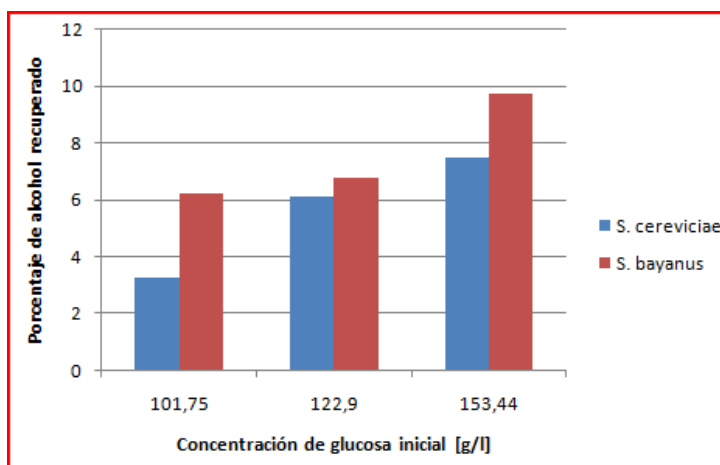


Figura 23. Porcentaje de alcohol recuperado.

Cuando existe mayor concentración de glucosa la producción de alcohol asciende, este comportamiento se refleja en los resultados obtenidos en las destilaciones realizadas con ambas levaduras.

Se observa que los mejores resultados se obtuvieron de la cepa *Saccharomyces bayanus* para cualquier concentración inicial de glucosa, por ejemplo para una concentración de 153,44 g/l de glucosa inicial el porcentaje de alcohol recuperado es 7,5 % para la *S. cerevisiae* mientras que para la *S. bayanus* es 9,75 %.

Según Huang et al., el porcentaje de alcohol en el fermento generalmente contiene de 5 a 12% en peso de etanol.

IV.7.- Rendimiento de las fermentaciones:

En la Figura 24 se muestra el rendimiento de las fermentaciones con los dos tipos de levaduras para las diferentes concentraciones iniciales de glucosa. Cuando la concentración inicial de glucosa es mayor, mejor será el rendimiento. Se obtuvo mejores rendimientos para la cepa *Saccharomyces bayanus* que para la *Saccharomyces cerevisiae*.

El rendimiento más bajo (27,13 %) se observó cuando se empleó *S. cerevisiae* para una concentración inicial baja de 101,75 g/l de glucosa mientras que para la *S. bayanus* el rendimiento fue mayor (41,90%) para la misma concentración inicial.

El mayor rendimiento (52,95 %) lo presentó la levadura *Saccharomyces bayanus* para una concentración inicial de 153,44 g/l, al contrario de la *S. cerevisiae* que solo tuvo 45,85 %.

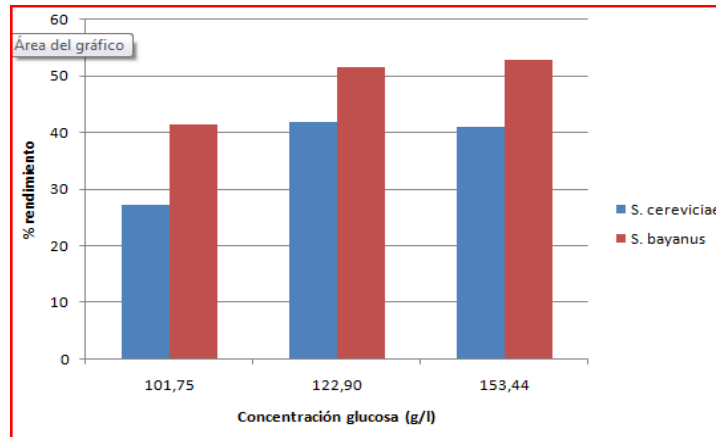


Figura 24. Rendimiento de las fermentaciones.

IV.8.- Concentración del alcohol por el método del picnómetro:

La Tabla 12 contiene los resultados de la determinación del peso específico para el alcohol destilado después de la fermentación y el alcohol deshidratado. Se calculó el grado alcohólico de las muestras mediante interpolación empleando la Figura 13.

Tabla 13. Peso específico y concentración de los alcoholes obtenidos.

Alcohol destilado	
Peso específico	0,8193
Grado Alcohólico	94,18

El alcohol destilado en la recuperación tiene una concentración de 94,18 % en peso, valor que no está muy lejos de la concentración esperada (la concentración de etanol máxima en el azeótropo está alrededor de 95 a 96 % a 1 atm de presión).

IV.9.- Punto de ebullición del alcohol obtenido:

La presión atmosférica al momento del experimento era 634 mmHg. Con este valor y aplicando la ecuación de Antoine se tiene que la temperatura de ebullición:

$$\log(634) = 8,1122 - \frac{1592,864}{226,184 + T}$$

Despejando se tiene que la temperatura de ebullición para el etanol a 634 mmHg es 73,78 °C.

Tabla 14. Temperatura de ebullición del etanol producido

	Experiencia 1	Experiencia 2	Promedio
T mínima °C	73	74	73,5
T máxima °C	74	75	74,5

La temperatura de ebullición determinada mediante el método de Sibolowoff ^[47] es cercana a la temperatura teórica correspondiente a la presión atmosférica en el momento de realizar la experiencia cuando el alcohol es puro.

CONCLUSIONES

Es importante tener el medio adecuado para la hidrólisis, ya que sin la pregelatinización del almidón, el proceso de hidrólisis no se lleva a cabo de forma adecuada, la licuefacción tarda más tiempo en llevarse a cabo.

Se demostró que la cantidad de dextrosa producida en la hidrólisis se ve influenciada por el pH al cual se encuentra el medio para las enzimas. El valor más alto de DE fue de 95,72 en una lechada con un pH de 4,5. Durante la hidrólisis del almidón, se deben tener las condiciones adecuadas de pH y temperatura para cada enzima.

La amiloglicosidasa en la etapa de sacarificación produce mejores resultados cuando trabaja en un sustrato ácido (pH= 4,5).

La fermentación es un proceso que utiliza microorganismos como las levaduras, que emplean azúcares fermentables como alimento y en el proceso producen alcoholes como etanol y otros subproductos.

La efectividad de las levaduras está directamente relacionada con las condiciones del medio de fermentación, esto se observó al comparar los resultados obtenidos con diferentes concentraciones iniciales de glucosa. Para una concentración inicial de 153,44 g/l de glucosa se obtuvo 9,75 % de etanol, mientras que en concentraciones más bajas como por ejemplo 100 g/l solo se pudo obtener 6,5 % de etanol como máximo.

La levadura *Saccharomyces bayanus* tiene mayores rendimientos en la producción de alcohol, debido a que consume más glucosa y produce más etanol que la *Saccharomyces cerevisiae*. El rendimiento más alto de esta levadura en el proceso de fermentación fue de 52,95 %

El consumo de energía en las operaciones de purificación del alcohol es alto, debido a que se necesitan varias destilaciones para lograr separar el agua del etanol, lo que implica altos costos de operación.

La deshidratación del etanol requiere procesos adicionales a la destilación simple, debido al azeótropo que se forma en el sistema etanol-agua.

www.bdigital.ula.ve

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda utilizar vapor para realizar la etapa de pregelatinización, ya que de esta forma el proceso es más rápido y fácil de manejar.
2. Es de vital importancia que las enzimas, las levaduras y los compuestos químicos utilizados se manipulen con guantes para evitar irritación en la piel.
3. En la etapa de licuefacción es importante realizar un calentamiento gradual, se debe controlar la temperatura desde 80°C aproximadamente (temperatura al final de la pregelatinización) hasta la temperatura de licuefacción (95 °C- 97°C) con el fin de lograr un calentamiento uniforme en toda la lechada.
4. Se debe tener mucho cuidado al manipular las cepas de levadura para que estas no se contaminen y el proceso de crecimiento sea más eficiente. También es importante que todo material que vaya a estar en contacto con las levaduras sea esterilizado.
5. Cuando se va a destilar es primordial tener un monitoreo constante de la temperatura, ya que a medida que la alimentación se despoja del alcohol la temperatura sube bruscamente y el destilado se contamina con agua.
6. Debe controlarse que exista la menor cantidad de fugas en el sistema de destilación.

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- [1] **BBC Mundo.** Redacción BBC Mundo. "Petróleo barato... Por ahora."

Artículo electrónico disponible en:

http://news.bbc.co.uk/hi/spanish/business/newsid_7723000/7723742.stm

Fecha de consulta: Diciembre 2008

- [2] **Infantes, Ana Isabel.** "El Etanol ¿una alternativa viable?"

Artículo electrónico disponible en:

<http://www.valoronet.net/article.php?sid=102>

Fecha de consulta: Diciembre 2008

- [3] **Wikipedia en español.** "Etanol."

Artículo electrónico disponible en:

http://es.wikipedia.org/wiki/Alcohol_et%C3%ADlico

Fecha de consulta: Diciembre 2008

- [4] **Msn Encarta.** Encyclopedia article. "Alcohol"

Artículo electrónico disponible en:

http://encarta.msn.com/encyclopedia_761565581/Alcohol.html#p4

Fecha de consulta: Diciembre 2008

- [5] **Hansen AC, Zhang Q, Lyne PWL.** "Ethanol–diesel fuel blends—a review." *Bioresource Technology* 2005; 96: 277–85
- [6] **Mustafa Balat, Havva Balat, Cahide Öz.** "Progress in bioethanol processing". *Revista Progress in Energy and Combustion Science* 34 (2008) 551–573
- [7] **Oscar J. Sánchez, Carlos A. Cardona.** "Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks." *Revista Bioresource Technology* N° 99 (2008) 5270–5295
- [8] **Depósitos de documentos de la FAO.** Prevención de pérdidas de alimentos poscosecha: manual de capacitación. "Elaboración del arroz en pequeña escala". Roma. (1985)
- [9] **Seungdo Kim, Bruce E. Dale.** "Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues." *Biomass and Bioenergy* 26 (2004) 361 – 375
- [10] **Barber, S.** "Rice starch and rice starch derivatives", American Association of Cereal Chemistry, (1971)
- [11] **Vandeputte, G.E., Derycke, V., Geeroms, J. and Delcour, J.A.,** "Rice starches. II. Structural aspects provide insight into swelling and pasting properties". *Journal of Cereal Science.* Volume 38, Pages 53–59. (2003)
- [12] **Yamamoto H., Makita E., Oki Y. and Otani M.** "Flow characteristics and gelatinization kinetics of rice starch under strong alkali conditions." *Food Hydrocolloids.* Volume 20, Issue 1 , Pages 9-20, January 2006.
- [13] **Composition of foods.** Agriculture Handbook N°8. Servicio de Investigación Agrícola de USA.
- [14] **Kerr R.W.** "Chemistry and Industry of Starch" Academic Press Inc. Second Edition. (1950).

- [15] **Wislyer R., Paschall E.** "Starch: Chemistry and technology." Academic Press Inc. Volume II. Chapter 3. 1967
- [16] **Vandeputte G. E. and Delcour J. A.** "From sucrose to starch granule to starch physical behavior: a focus on rice starch." Carbohydrate polymers. Volume 58, Issue 3 , 25 November 2004, Pages 245-266.
- [17] **Jaspreet Singh, Lovedeep Kaur and O.J. McCarthy.** "Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review." Food hydrocolloids
- [18] **Bates, F.L.** "Cereal Chemistry". 65, pp. 142 (1943)
- [19] **González, Juan Manuel.** "Curso de biomoléculas" Universidad del País Vasco.

Artículo electrónico disponible en:

<http://www.ehu.es/biomoleculas/enzimas/tema11.htm>.

Fecha de consulta: Marzo 2009

- [20] "Enzimas para todos"

Artículo electrónico disponible en:

<http://www.blogger.com/feeds/3323120524774307727/posts/default>

Fecha de consulta: Marzo 2009

- [21] **Libro Botánica on line.** Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Los Andes .Mérida. Venezuela.

Disponible en: Abril 2009

<http://www.forest.ula.ve/~rubenhg>

Fecha de consulta: Abril 2009

- [22] **González, Juan Manuel.** “Curso de biomoléculas” Universidad del País Vasco.

Artículo electrónico disponible en:

<http://www.ehu.es/biomoleculas/enzimas/enz3.htm#ae>

Fecha de consulta: Abril 2009

- [23] **Boyer, Rodney.** “Conceptos de Bioquímica.” Intenational Thomson Editores. Mexico. Año 2009

- [24] **Hernández, Rubén.** “Enzimas”. Libro Botánica on line

Artículo disponible en:

<http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/enzimas/index.html>

Fecha de consulta: Abril 2009

- [25] **Gerhartz, wolfgang.** “Enzymes in industry Production and applications.” VCH Publishers. Edition four.

- [26] **Uhlig, Helmet.** “Industrial enzymes and their applications.” Editorial John Wiley & Sons Inc. Páginas 271-278

- [27] **Präve, Paul.** “Fundamental of biotechnology”. VCH Publishers. Páginas 382-393. 1982.

- [28] “Fermentador”

Imagen disponible en:

<http://www.vi.cl/foro/lofiversion/index.php?t7774.html>

Fecha de consulta: Julio 2009

- [29] **Smith, John.** "Fermentación". Biotecnología. Editorial Acribia. Segunda Edición. Año 2006.
- [30] **Vogel, Henry.** "Fermentation and biochemical engineering handbook. Principles, process design, and equipment". Noyes Publication. Second Edition. 1997
- [31] **Collado, Quique.** "Levaduras y la fermentación alcohólica"

Artículo disponible en:

<http://www.verema.com/articulos/500449-levaduras-y-la-fermentacion-alcoholica-ii>

Fecha de consulta: Mayo 2009

- [32] **Hua-Jiang Huang, Shri Ramaswamy, U.W. Tschirner, B.V. Ramarao.** "A review of separation technologies in current and future biorefineries." Separation and Purification Technology 62 (2008) 1–21
- [33] **Michael F. Tuite.** "Saccharomyces". Biotechnology handbooks. Volume 4. Editorial Plenum Press.
- [34] **Atkinson Bernard.** Biochemical engineering and biotechnology handbook. Editorial Macmillan Publisher. 1983
- [35] **Matthews T.M, Webb C.** "Saccharomyces". Editorial Macmillan Publisher. Páginas 252-255.
- [36] **Kirk, Othmer.** Encyclopedia of chemical technology. Cuarta edición. Version digital.

- [37] **McCabe, Warren.** "Destilación." Operaciones unitarias en ingeniería Química. Cuarta edición. Editorial McGraw-HILL
- [38] **Manuel G. Cerpa.** "Producción del etanol anhidro como aditivo para la gasolina a partir de la caña de azúcar". Universidad de Valladolid, Facultad de Ciencias
- [39] **Perry's Chemical Engineers Handbook.** McGraw-Hill. USA. Section 13, Páginas 68-76
- [40] **AOAC.** "Methods of Analysis" Association of Official Analytical Chemist. Washington EUA. 1975
- [41] **Joslyn, M. A.** "Methods in Food Analysis". Academic Press Inc. 1970
- [42] **Loot, J.A.** "Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose" Clin Chem 1975; 21: Páginas 1764-1760
- [43] Fermentaciones. Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes.
- [44] **Boscán, Luis.** "Manual de prácticas de análisis de alimentos". Universidad del Zulia. 1972
- [46] Picnómetro.
- Artículo disponible en:
- <http://docencia.udea.edu.co/cen/tecnicaslabquimico/02practicas/practica03.htm>
- Fecha de consulta: Octubre 2009.
- [45] **Martínez, Jesús.** Destilería Campo Elías. Ejido. Estado Mérida. Venezuela.
- [46] **Galagovski, Lidia.** "Fundamentos teóricos prácticos del laboratorio" Editorial Eudeba. 1987

[47] **Himmelblau, David.** "Principios de Ingeniería Química". 6^{ta} Edición.
 Editorial Prentice Hall Hispanoamérica S.A

ANEXO A

Tabla A.1

	Patrón	Concentración de la solución de glucosa
	100 mg/dl	Dilución 1:100
Absorbancia	0,289	0,418
	0,295	0,402
	0,215	0,497
Absorbancia Promedio	0,266	0,439
Resultados	mg/dl	16483,1039
	g/l	164,831039

Tabla A.2 Datos del cálculo de la dextrosa equivalente

°Bx	Densidad g/ml	DE supuesto	Peso aproximado de la muestra	ml solución a diluir en 250 ml	Titulaciones (ml)				DE	pH	
					T1	T2	T3	Tprom			
L1	17,6	1,07238	20	35,5113	33,1145	40,2	40,5	40,4	40,5	11,91	6
L2	17,2	1,07063	20	36,3372	33,9400	44,8	44,3	44,1	44,2	10,90	
S1	22,0	1,09194	90	6,31313	5,78157	25,0	24,9	25,2	25,1	86,55	5,5
S2	22,6	1,09465	90	6,14553	5,61415	23,3	24,8	24,9	24,9	87,25	
S3	23,0	1,09647	90	6,03865	5,50735	23,5	23,2	23,3	23,35	93,25	4,5
S4	23,2	1,09738	90	5,98659	5,45535	19,8	22,8	22,5	22,7	95,72	

Tabla A.3 Datos de la dextrosa equivalente en función del tiempo para la lechada

4

Tiempo (horas)	DE
0	0
3	11,91
10	51,30

24	79,37
48	89,88
72	95,12
90	95,72

Tabla A.4 Datos de la curva de calibración de la glucosa

Concentración	Absorbancia
0	0,000
100	0,302
200	0,709
300	1,101
400	1,452
450	1,634
500	1,692
600	1,895

www.bdigital.ula.ve

Tabla A.5 Soluciones para la fermentación.

	Concentración Patrón	Concentración de glucosa ideal para las soluciones (g/l)		
	100	100	120	150
Absorbancia	0,279	0,273	0,307	0,415
	0,265	0,259	0,322	0,437
	0,255	0,281	0,353	0,374
Promedio	0,266	0,271	0,327	0,409
Resultados	mg/dl	10175,22	12290,36	15344,18
	g/l	101,75	122,90	153,44

Tabla A.6 Datos de la concentración final de glucosa

Glucosa inicial	g/l	Saccharomyces cerevisiae						Saccharomyces bayanus					
		100		120		150		100		120		150	
Muestra		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
pH		4,1	4,2	3,9	4,3	4,0	4,7	4,5	4,1	4,6	4,9	4,2	4,5
Absorbancia		0,955	0,970	0,985	0,985	0,995	1,005	0,630	0,688	0,572	0,604	0,690	0,686
		0,956	0,960	0,965	0,946	0,975	1,015	0,396	0,658	0,594	0,666	0,688	0,690
Absorbancia Promedio		0,970	0,970	0,955	0,945	0,965	1,023	0,694	0,692	0,601	0,630	0,682	0,690
		0,960	0,967	0,968	0,959	0,978	1,014	0,573	0,679	0,589	0,633	0,687	0,689
Glucosa final	mg/dl	360,58	362,95	363,5	359,9	367,3	380,8	215,2	255,0	221,1	237,8	257,8	258,5
	g/l	3,61	3,63	3,64	3,60	3,67	3,81	2,15	2,55	2,21	2,38	2,58	2,59
Glucosa final promedio	g/l	3,62		3,62		3,74		2,35		2,29		2,58	
Desviación estándar		0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,16	0,02	0,02	0,03	0,00	0,00
Media geométrica		0,96	0,97	0,97	0,96	0,98	1,01	0,56	0,68	0,59	0,63	0,69	0,69

Tabla A.7 Datos de la etapa de destilación.

Muestra	Saccharomyces cerevisiae						Saccharomyces bayanus					
	100		120		150		100		120		150	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Volumen inicial (ml)	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0
Volumen destilado (ml)	7,00	6,00	12,80	11,60	14,80	15,20	12,00	13,00	14,00	13,00	19,10	19,90
Volumen fondo (ml)	184,0	185,0	178,0	183,0	182,0	178,0	184,0	182,0	176,0	176,0	174,0	175,0
Volumen perdido (ml)	9,00	9,00	9,20	5,40	3,20	6,80	4,00	5,00	10,00	11,00	6,90	5,10
% volumen perdido	4,50	4,50	4,60	2,70	1,60	3,40	2,00	2,50	5,00	5,50	3,45	2,55
% recuperado	3,50	3,00	6,40	5,80	7,40	7,60	6,00	6,50	7,00	6,50	9,55	9,95
Promedio	3,25		6,10		7,50		6,25		6,75		9,75	

Tabla A.8 Datos de la determinación de la concentración de alcohol por el método del picnómetro.

Pesada	1	2	3	Promedio	Peso equivalente (Pe)
Pv (g)	14,26345	14,2642	14,2691	14,2656	-
Pa (g)	39,1904	39,1905	39,1901	39,1903	-
Px (g)	34,6907	34,6863	34,6786	34,6852	0,8193

Donde:

Pv= Peso del picnómetro vacío

Pa= Peso del picnómetro con agua

Px= Peso del picnómetro con alcohol destilado

Pe= Peso equivalente

Tabla A.9 Datos para el cálculo del rendimiento y resultados de rendimiento

	Saccharomyces cerevisiae						Saccharomyces bayanus					
	101,75	122,90	153,44	101,75	122,90	153,44						
g de alcohol destilado	5,74	4,92	10,49	9,50	12,13	12,45	9,83	10,65	11,47	10,65	15,65	16,30
g de glucosa consumida	19,63	19,62	23,85	23,86	29,95	29,93	19,92	19,84	24,14	24,10	30,17	30,17
% Rendimiento	29,22	25,05	43,97	39,83	40,48	41,61	49,36	53,68	47,52	44,19	51,86	54,04
% rendimiento Promedio	27,13		41,90		41,05		51,52		45,85		52,95	

ANEXO B

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Tabla B.1 Determinación de la dextrosa equivalente por el método de Lane y Eynon

ml de solución de azúcar requerido	Factor mg d dextrosa correspondiente a 25 ml de solución de Fehling	mg de dextrosa por 100 ml
15	120,2	801
16	120,2	751
17	120,2	707
18	120,2	668
19	120,3	633
20	120,3	601,5
21	120,3	572,9
22	120,4	547,3
23	120,4	523,6
24	120,5	501,9
25	120,5	482,0
26	120,6	463,7
27	120,6	446,8
28	120,7	431,1
29	120,7	416,4
30	120,8	402,7
31	120,8	389,7
32	120,8	377,6
33	120,9	366,3
34	120,9	355,6
35	121,0	345,6
36	121,0	336,3
37	121,1	327,4
38	121,2	318,8
39	121,2	310,7
40	121,2	303,1
41	121,3	295,9

42	121,4	289,0
43	121,4	282,4
44	121,5	276,1
45	121,5	270,1
46	121,6	264,3
47	121,6	258,8
48	121,7	253,5
49	121,7	248,4
50	121,8	243,6

Ficha técnica de Resin Alpha

RESIN ALPHA

ALFA - AMILASA PARA LICUEFACION DE ALMIDONES

PROENZIMAS
ENZIMAS PARA PROCESOS INDUSTRIALES

PROENZIMAS LTDA

Calle 56 No. 5N - 65

PBX: 447 6028

FAX: 446 6442

Cali - Colombia

e-mail: dirtecnica@proenzimasltda.com
www.proenzimas.com

Resin Alpha, es una alfa - amilasa grado alimenticio extraída del Bacillus licheniformes, capaz de hidrolizar los enlaces predominantes α -D 1,4 del almidón. Por esta razón, la viscosidad del almidón gelatinizado se reduce rápidamente. Resin Alpha convierte el almidón, la amilosa y la amilopectina en dextrinas solubles y pequeñas cantidades de glucosa y maltosa.

La enzima Resin Alpha tiene una excelente estabilidad y puede utilizarse en sistemas de licuefacción de almidones a temperaturas medias. Por tanto, pueden manejarse altos contenidos de sólidos con relativa facilidad y sin necesidad de adicionar calcio para estabilizar la enzima.

PROPIEDADES

Solubilidad	Completamente miscible con agua
SP. Gr	1,05 a 1,15 g / ml.
Actividad	340.000 MWU / g
Forma	Líquido no viscoso, estabilizado y estandarizado
Color	Canela.
Olor	Libre de olores ofensivos
Sabor	Libre de sabores ofensivos.

ACTIVADORES

No se requieren activadores para la completa actividad de la Resin Alpha.

COFACTORES

Todas las amilasas son metalo-proteínas de calcio. En presencia de suficientes iones calcio, las enzimas son bastante resistentes a la desnaturalización a valores extremos de pH o temperatura.

La máxima actividad a 70 °C se observa en soluciones con 5 a 10 ppm de calcio.

ACTIVIDAD

Una Unidad Modificada de Wohlgemuth (MWU), es la cantidad de enzima que dextriniza un miligramo de almidón soluble a una dextrina de tamaño definido en 30 minutos, bajo las condiciones del ensayo.

EFECTO DEL pH

Resin Alpha, tiene un rango óptimo de pH de 5 a 7, bajo las condiciones del ensayo espectrofotométrico de licuefacción por Alfa - Amilasas. En presencia de soluciones de almidón al 35 %, la enzima es más activa en el rango de pH 6,0 a 6,5 a 95 °C.

Resin Alpha puede hidrolizar efectivamente los almidones sobre el rango de pH de 5,0 a 8,0. La Resin Alpha es estable en solución a 25 °C sobre el rango de pH de 5,0 a 11,0.

Rango óptimo de pH : 5,5 a 7,0.

Rango efectivo de pH : 5,5 a 8,0.

Estabilidad al pH : 5,0 a 11,0.

EFECTO DE LA TEMPERATURA

Resin Alpha tiene una temperatura óptima de 90 °C a un pH de 6,0. En presencia de almidón al 10 - 50 % en base seca y suficiente ión calcio, la enzima hidrolizará efectivamente a temperaturas hasta de 90 °C. Con temperaturas por debajo de 95 °C se incrementa la estabilidad de la enzima. A 95 °C o más y con pH de 6,0 – 6,5, la velocidad de hidrólisis se incrementa, pero al mismo tiempo aumenta la velocidad de inactivación de la enzima.

Rango óptimo de temperatura : 80 a 95 °C

Temperatura óptima : 90 °C

INACTIVACION

La inactivación se puede lograr térmicamente elevando la temperatura a 90 - 100 °C, manteniéndola durante aproximadamente 10 a 20 minutos. Se observa, como resultado de la elevación de la temperatura, que la enzima demuestra una acción acelerada antes de lograr su inactivación. Cuando no se desea una

elevada temperatura para inactivar la enzima, se puede lograr disminuyendo el pH por debajo del rango efectivo, con ácido clorhídrico o sulfúrico a un pH de 5,0 y 90 °C en 15 minutos aproximadamente.

Es posible hacer una combinación de pH 3,5 a 4,0 y 80 a 85 °C durante 15 minutos. Después de la inactivación, la suspensión de almidón se puede neutralizar con carbonato de sodio o de calcio.

SUSTRATO

La Resin Alpha puede usarse para licuar almidón de maíz, papa, sorgo, trigo y otros tipos de almidones.

NIVEL DE USO

Los requerimientos de la enzima dependen generalmente de las condiciones del proceso. 0,05 % a 0,2 % de la Resin Alpha sobre base seca de almidón, licuefacionará en forma adecuada un 40 % de almidón (en base seca) en aproximadamente 15 a 30 minutos.

Ficha técnica de Naturalzyme GA 300 L[®]

NATURALZYME GA 300 L[®]

PROCESAMIENTO DE ALMIDONES Y FRUTAS

El almidón es un polímero de alto peso molecular con unidades de glucosa, unidas por enlaces glucosídicos, presente en cereales y frutas en forma natural.

Generalmente el almidón contiene un 15 a un 25 % de amilosa y entre un 75 a 85 % en amilopectina, constituyentes naturales de los almidones.

PROENZIMAS
ENZIMAS PARA PROCESOS INDUSTRIALES

PROENZIMAS LTDA

Calle 56 No. 5N - 65

PBX: 447 6028

FAX: 446 6442

Cali - Colombia

e-mail: dirtecnica@proenzimaslt.com

www.proenzimas.com

Bajo hidrólisis parcial, la molécula de almidón se rompe en un amplio espectro de oligosacáridos de bajo y alto peso molecular. La hidrólisis enzimática completa del almidón produce D – Glucosa con altos rendimientos.

La Naturalzyme GA 300 L, (amiloglucosidasa) tiene acción dextrinizante y sacarificante, haciendo posible hidrolizar almidón, amilosa, amilopectina y una gran variedad de oligosacáridos, obteniéndose rendimientos cuantitativos del 95 % al 97 %.

PROPIEDADES

Enzima	Glucoamilasa
Actividad	300 AGU / ml
Forma	Líquido
Olor	Libre de olores desagradables
Color	Ambar
Solubilidad	Completamente soluble en agua

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Naturalzyme GA-300L, tiene una actividad NLT 300 AGU / ml. Una unidad NG es la cantidad de enzima que liberará 1 gramo de dextrosa en una hora, bajo las condiciones del ensayo.

PROCESAMIENTO DE PULPAS DE FRUTAS

Además de la pectina, muchas frutas como el mango, al inicio de la cosecha, tienen una cantidad significativa de almidón insoluble, que en la fase de concentración de la pulpa a temperaturas superiores a 50 °C, se gelatinizará y causará problemas tanto en este proceso, como en la fase de filtración. Este

inconveniente puede solucionarse hidrolizando el almidón gelatinizado mediante la aplicación de Naturalzyme GA-300L, con acción dextrinizante y sacarificante, justo en los tanques donde se lleva a cabo el proceso de depectinización de la pulpa.

DOSIFICACIÓN

La cantidad de Naturalzyme GA-300L necesaria para dextrinizar y sacarificar el almidón, dependerá del contenido de almidón. En términos generales, adicionando 50 a 70 ml de Naturalzyme GA-300L por cada 1000 Kg de pulpa, se observará total ausencia de almidón en 60-90 minutos a una temperatura de proceso entre 25 y 45 °C. A menor temperatura de proceso se necesitará aumentar la cantidad de enzima. Mayor dosificación de enzima disminuirá el tiempo de proceso.

En clarificación de jugos finales, se presenta algún grado de turbidez, debido a presencia de sólidos insolubles provenientes de la despectinización y de un pequeño porcentaje de almidón, contenido en frutas que se recolectan aún inmaduras.

La dosificación es aproximadamente de 40 a 60 ml por cada 500 litros de jugo final. El tiempo de contacto de la enzima con el jugo, debe ser evaluado en forma práctica, dependiendo de la temperatura a la cual se efectúe el tratamiento.

USO EN PANIFICACIÓN

Cuando se desea mejorar el color de la corteza. La enzima GA 300L, se utiliza para aumentar la formación de glucosa en las masas, ya que la glucosa refuerza las reacciones melanoidinas, que producen el color dorado de la corteza durante el proceso de panificación.

Recomendamos añadir de 3 a 5 gramos de Naturalzyme GA 300L, por cada 100 kilos de harina. Además la adición de Naturalzyme GA-300L mejorará la consistencia y la vida comercial de los productos panificados.

MASAS REFRIGERADAS O CONGELADAS

Para las masas que se refrigeran durante la noche o bien se mantienen congeladas durante periodos prolongados, puede asegurarse la generación de los azúcares fermentables necesarios para la Segunda fermentación, añadiendo 3 a 5 gramos de GA 300L por cada 100 kilos de harina de trigo.

Naturalzyme GA 300 L, se caracteriza por tener cierta actividad de alfa-amilasa.

PRODUCCIÓN DE CERVEZA

La producción de alcohol disminuye en las últimas etapas de la fermentación a menos que sea continuamente alimentada con azúcares fermentables. Naturalzyme GA 300L convertirá las dextrinas no fermentables en azúcares fermentables, incrementando el rendimiento de alcohol y reduciendo la concentración de carbohidratos en la cerveza. Naturalzyme GA 300L puede ser utilizada para alcanzar un alto grado de atenuación en la producción de cerveza de bajo tenor de carbohidratos y calorías.

Para optimizar el uso, recomendamos ensayar en proceso distintos niveles de dosificación que permitan definir la dosis entre 3,0 y 7,5 ml de Naturalzyme GA 300L por cada 100 litros de medio de fermentador para producir cerveza de bajo nivel calórico.

PRESENTACIÓN

Se presentan en garrafas hasta por 20 kg neto.

Otras presentaciones están disponibles a solicitud de nuestros clientes.

ALMACENAMIENTO

En un sitio fresco y seco (25 °C), la pérdida de actividad es menor al 10% en 6 meses. Almacenamiento bajo refrigeración (5 °C), preserva la actividad.

www.bdigital.ula.ve