

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRIGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



102

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**"INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AIREACIÓN,
CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES
Y SULFATO DE AMONIO SOBRE EL
RENDIMIENTO DE AGUARDIENTE DE
20° GAY LUSSAC"**

**TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**AUTORES:
Bach. TABACO TAFUR NOÉ
Bach. TEJADA CHUQUIPIONDO EDUARD QUINTINO**

**Asesor:
DR. BARRENA GURBILLÓN Miguel Ángel**

**Coasesor:
Ms.C GAMARRA TORRES Oscar Andrés**



**CHACHAPOYAS - PERU
2012**

3 0 ENE 2013

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AIREACIÓN, CONCENTRACIÓN DE
AZÚCARES REDUCTORES Y SULFATO DE AMONIO SOBRE EL
RENDIMIENTO DE AGUARDIENTE DE 20° GAY LUSSAC**

AUTORES:

Bach. TABACO TAFUR NOÉ

Bach. TEJADA CHUQUIPIONDO EDUARD QUINTINO

ASESOR: Dr. BARRENA GURBILLÓN Miguel Ángel

COASESOR: Ms.C GAMARRA TORRES Oscar Andrés

AMAZONAS – PERÚ

2012



30 ENE 2013

01 ed

DEDICATORIA

Con mucho amor para mis padres Eligio Tabaco y Carmen Tafur; a mis hermanos y demás personas que hicieron que se haga realidad este proyecto para cumplir mis metas trazadas.

A toda la comunidad universitaria y demás personas que fomentan la investigación, a todos los jóvenes que día a día buscan enriquecer sus conocimientos mediante la lectura y la investigación para lograr cumplir los ideales que se han trazado.

Noe Tabaco

DEDICATORIA

A mis padres Segundo Quintino Tejada
Quintana y Mercedes Chuquipiondo Huamán;
y a mis hermanos, quienes me apoyaron para
hacer realidad las metas que me he trazado.

A los profesores de la Universidad Nacional
Toribio Rodríguez de Mendoza de
Amazonas y a los técnicos de los
laboratorios, quienes forjan la investigación
para el desarrollo del país.

Eduard Tejada

AGRADECIMIENTO

A nuestros padres por habernos dado la oportunidad de seguir adelante con su apoyo incondicional, emocional y moral para que de este modo luchar por los objetivos que nos hemos trazado.

A nuestros hermanos por su apoyo y respaldo, sin lo cual no hubiésemos podido abrirnos paso para cumplir con nuestras metas y anhelos.

A los docentes, quienes día a día contribuyen al aprendizaje continuo, fomentando la investigación, compañerismo, práctica de valores y ética profesional.

A todo el personal técnico y administrativo de nuestra Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, por el apoyo brindado para desarrollar este trabajo de investigación.

Al Asesor del presente trabajo de investigación Dr. Miguel Ángel Barrena Gurbillón y Co-Asesor Ms.C. Oscar Andrés Gamarra Torres, por apoyarnos con sus conocimientos y orientaciones oportunas.

Noe Tabaco y Eduard Tejada

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS DE LA UNTRM-A

Ph.D.,Dr.Hab. VICENTE MARINO CASTAÑEDA CHÁVEZ

RECTOR

Dr. ROBERTO JOSÉ NERVI CHACÓN

VICERRECTOR ACADÉMICO (e)

Dr. EVER SALOMÉ LÁZARO BAZÁN

VICERRECTOR ADMINISTRATIVO (e)

Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN

DECANO DE LA FACULTAD

DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS

VISTO BUENO

El docente de la UNTRM-A que suscribe, ha asesorado la tesis titulada “**INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AIREACIÓN, CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES Y SULFATO DE AMONIO SOBRE EL RENDIMIENTO DE AGUARDIENTE DE 20° GAY LUSSAC.**” de los Bachilleres en Ingeniería Agroindustrial egresados de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la UNTRM-A:

- ✓ **Bach. NOE TABACO TAFUR**
- ✓ **Bach. EDUARD QUINTINO TEJADA CHUQUIPIONDO**

El docente de la UNTRM-A que suscribe da su Visto Bueno para que la Tesis mencionada sea presentada al Jurado Evaluador, manifestando su voluntad de apoyar a ambos tesisistas en el levantamiento de observaciones y en el Acto de Sustentación de Tesis.

Chachapoyas, 20 de noviembre de 2012.



Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN

Profesor Principal DE UNTRM-Amazonas

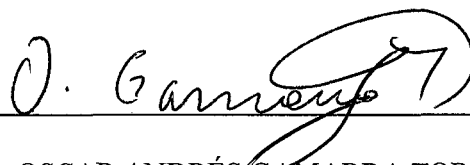
VISTO BUENO

El docente de la UNTRM-A que suscribe, ha co-asesorado la tesis titulada **“INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AIREACIÓN, CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES Y SULFATO DE AMONIO SOBRE EL RENDIMIENTO DE AGUARDIENTE DE 20° GAY LUSSAC.”** de los Bachilleres en Ingeniería Agroindustrial egresados de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la UNTRM-A:

- ✓ **Bach. NOE TABACO TAFUR**
- ✓ **Bach. EDUARD QUINTINO TEJADA CHUQUIPIONDO**

El docente de la UNTRM-A que suscribe da su Visto Bueno para que la Tesis mencionada sea presentada al Jurado Evaluador, manifestando su voluntad de apoyar a ambos tesisistas en el levantamiento de observaciones y en el Acto de Sustentación de Tesis.

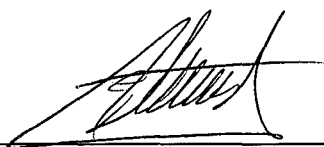
Chachapoyas, 20 de noviembre de 2012.



Ms.C. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES

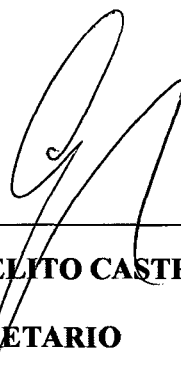
Profesor Principal TC UNTRM-Amazonas

JURADO DE TESIS



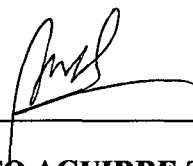
M.Sc. ELENA VICTORIA TORRES MAMANI

PRESIDENTA



Ing. EFRAÍN MANUELITO CASTRO ALAYO

SECRETARIO



Ing. HELÍ HUMBERTO AGUIRRE ZAQUINAULA

VOCAL

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido	Pg.
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MATERIAL Y METODOS.....	7
2.1. Material biológico.....	7
2.1.1. Aislamiento de levaduras.....	7
2.1.2. Preparación del inóculo.....	7
2.2. Seguimiento del proceso fermentativo.....	8
2.2.1. Inicio.....	8
2.2.2. Cada 24 horas.....	8
2.2.3. Al final de la fermentación (a las 72 horas).....	8
2.2.4. Destilación.....	8
2.2.5. Diseño estadístico de Box-Behnken.....	10
2.2.6. Variables independientes.....	10
2.2.7. Variable dependiente.....	10
III. RESULTADOS.....	12
3.1. Seguimiento de la fermentación.....	12
3.2. Destilación simple del jugo de caña fermentado.....	14
3.3. Rendimiento de aguardiente aplicando el diseño estadístico de Box-Behnken.....	15
VI. DISCUSIÓN.....	20
VII. CONCLUSIONES.....	23

VIII. RECOMENDACIONES.....	24
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	25
X. ANEXOS.....	26
ANEXO 1. Superficie de respuesta para rendimiento de aguardiente.....	27
ANEXO 2. Muestreo de guarapo y concho para aislar levaduras.....	31
ANEXO 3. Composición de los medios de cultivo.....	32
ANEXO 4. Preparación del Caldo Sabouraud y Agar Sabouraud.....	33
ANEXO 5. Conteo de levaduras en cámara de Neubauer.....	34
ANEXO 6. Ensamble de los biorreactores, regulación de bombas y fermentación del jugo de caña.....	36
ANEXO 7. Determinación de densidad, azúcares reductores y °Brix.....	37
ANEXO 8. Destilación simple, aguardiente de 20 °Gay Lussac.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Pg.
Tabla 1. Valor de las variables independientes a evaluar con el diseño estadístico de Box-Behnken.....	10
Tabla 2. Distribución de los valores de las variables independientes según el diseño estadístico de Box-Behnken.....	11
Tabla 3. Densidad, contenido de azúcares reductores y °Brix del jugo de caña de azúcar durante la fermentación alcohólica.....	12
Tabla 4. Rendimiento de aguardiente de 20° Gay Lussac, de cada una de las 15 corridas experimentales.....	14
Tabla 5. Resultados de cada una de las 15 corridas experimentales.....	15
Tabla 6. Análisis de varianza para rendimiento de aguardiente.....	16
Tabla 7. Coeficiente de regresión para rendimiento de aguardiente.....	16
Tabla 8. Camino de máximo descenso para rendimiento de aguardiente.....	17
Tabla 9. Parámetros óptimos para rendimiento de aguardiente.....	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Pg.
Figura 1. Diagrama de flujo para obtener aguardiente a 20° Gay Lussac.....	9
Figura 2. Diagrama de Pareto estandarizado para rendimiento de aguardiente.....	18
Figura 3. Representación gráfica para rendimiento de aguardiente optimizado bajo un modelo de superficie respuesta.	19
Figura 4. Representación gráfica para rendimiento de aguardiente bajo un modelo contorno superficie respuesta. Fuente: Elaboración propia.....	19
Figura 5. Superficie respuesta para rendimiento de aguardiente con aireación constante igual a 2 horas.	27
Figura 6. Superficie respuesta para rendimiento de aguardiente con aireación constante igual a 3 horas.	27
Figura 7. Superficie respuesta para rendimiento de aguardiente con sulfato de amonio constante (0,5 g/L de jugo de caña).....	28
Figura 8. Superficie respuesta para rendimiento de aguardiente con sulfato de amonio constante (1.0 g/L de jugo de caña)..	28
Figura 9. Superficie respuesta para rendimiento de aguardiente con sulfato de amonio constante (1,5 g/L de jugo de caña).	29

Figura 10. Superficie respuesta para rendimiento de aguardiente con AR (azucares reductores) constante 5 g/L de jugo de caña.....	29
Figura 11. Superficie respuesta para rendimiento de aguardiente con AR (azucares reductores) constante 7 g/L de jugo de caña.....	30
Figura 12. Superficie respuesta para rendimiento de aguardiente con AR (azucares reductores) constante 9 g/L de jugo de caña.....	30

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se determinó la influencia del tiempo de aireación, concentración de azúcares reductores y sulfato de amonio sobre el rendimiento de aguardiente de 20° Gay Lussac. Para ello se aisló y purificó en Caldo y Agar Sabouraud, *Saccharomyces cerevisiae* a partir de jugo de caña de azúcar fermentado (guarapo) de la biomasa sedimentada. Se activó el cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en caldo Sabouraud, durante 48 horas a 28°C, enseguida se sembró en Agar Sabouraud y se incubó por 48 horas a 28°C. El conteo de células de levadura en el inóculo se hizo con la cámara de Neubauer y microscopio. El pH del jugo se ajustó a 4,5 con HCl concentrado. Se empleó el diseño estadístico de Box-Behnken para tres variables independientes: azúcares reductores (5, 7 y 9 g/L), aireación desde el inicio de la fermentación con 0,45 vvm durante 1, 2 y 3 h, y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5, 1,0 y 1,5 g/L jugo de caña. La variable respuesta fue el rendimiento expresado como mL de aguardiente de 20° GL/mL de guarapo. Cada biorreactor se cargó con 3 L de jugo de caña de azúcar y se le adicionó 15 mL de inóculo con 10^6 células de levadura/mL. Para el seguimiento del proceso fermentativo se determinó al inicio, 24 h, 48 h y 72 h: densidad, °Brix y azúcares reductores según el método de Lane y Eynon. Se realizó una destilación simple hasta que el contenido alcohólico del destilado fue de 20° GL. El máximo rendimiento fue de 0,367 mL aguardiente/mL guarapo, obtenido con los valores de las variables: 1 hora de aireación, 1,0 gramos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por litro de jugo y 9,0 gramos de azúcares reductores por litro de jugo (contenido promedio del jugo de caña de azúcar recién extraído).

Palabras claves: Azúcares reductores, aireación, sulfato de amonio, densidad, °Brix, rendimiento de aguardiente.

ABSTRACT

The following work project aimed to determine the influence of air time, reducer sugars concentration and ammonium sulfate over the output of hard liquor of 20° Gay Lussac. To this, we separate and purify in Sabouraud Caldo and Agar, *Saccharomyces cerevisiae* from fermented sugar cane juice (guarapo) and the biomass of yeast's from the bottom of the container. Then, the *Saccharomyces cerevisiae* growing was activated in Sabouraud caldo, during 48 hours to 28°C; after that, we sowed in agar sabouraud and incubated in it for 48 hours to 28°C. The counting of Yeast cells in inoculate were made with the Neubauer camera and a microscope. The pH juice was fit to 4, 5 with HCl concentrated. We use the statistic design of Box-Behnken to three independent variables: reducer sugars (5, 7 and 9 g/L), air time since the beginning of fermentation with 0,45 vvm during 1,2 and 3 h, and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5; 1.0 and 1,5 g/L sugar cane juice. The answer of the variable was the output expressed as hard liquor mL of 20° GL/mL of sugar cane juice. Each bioreactor charged with 3L of sugar cane juice and then we added 15 mL of inoculate with 10^6 cells of yeast /mL. To the fermentative pursuit process, we determined the beginning, 24h, 48h, and 72h; density, °Brix and reducer sugars according to the method of Lane and Eynon. At the same time, we realized a simple distillation until the alcoholic content of distilled was 20° GL. Finally, the maximum performance was 0,367 mL hard liquor/ mL sugar cane juice, obtained with the value of the variables: 1 hour of air, 1, 0 gram of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ per litter of juice and 9, 0 grams of reducer sugars per litter of juice (the average content of sugar cane juice recently extract)

Key words: reducer sugars, air, ammonium sulfate, density, °Brix, hard liquor efficiency.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de aguardiente como aditivo para bebidas alcohólicas es parte importante de la agroindustria rural en la región, en ese sentido los pobladores generan ingresos económicos por dedicarse a la destilación del jugo de caña fermentado, que es comercializado en el mercado local.

Los pobladores locales no tienen establecido las variables influyentes en sus procesos de producción de aguardiente y sólo se limitan a producirlo de manera artesanal. Es necesario determinar el valor de las variables para maximizar la producción de aguardiente, con lo que se aprovechará mejor la materia prima y se incrementarán los ingresos económicos por esta actividad.

Según Barrena *et al.* (2010), en los trapiches y destilerías rurales en la Región Amazonas existe heterogeneidad en el proceso de producción de aguardiente, que conlleva a variación en el rendimiento y calidad del aguardiente o cañazo producido como aditivo para bebidas alcohólicas, lo cual es parte importante de la industria rural en la región.

En localidades conocidas de la Región Amazonas como el anexo San Isidro de la provincia de Chachapoyas y en la provincia de Rodríguez de Mendoza, los productores no conocen las variables influyentes en el proceso de producción de aguardiente y lo producen artesanalmente. Actualmente en el Perú no existen estudios referidos a lograr el incremento de la producción de aguardiente, en base a las variables influyentes en la fermentación.

La producción de alcohol a partir de sustratos azucarados o amiláceos se conoce desde tiempos inmemoriales, principalmente en lo que respecta a la obtención de bebidas, pero el

conocimiento del por qué ocurre es más reciente. En la fabricación de aguardiente obtenido de la fermentación del jugo de caña de azúcar, debe tenerse en cuenta la relación entre azúcar y acidez, ya que mientras más cerca sea ésta se considera que tendrá una mayor cantidad de azúcares fermentables, favoreciendo el proceso de elaboración de vinos y licores (Corrales, 1993).

Los sustratos más comúnmente usados para la fermentación son los azúcares, en especial la D-glucosa para fermentación alcohólica. Para muchas levaduras en un medio adecuado, en ausencia de aire, la fermentación significa la conversión de hexosas, principalmente glucosa, fructosa, manosa y galactosa, en etanol y dióxido de carbono (Hernández, 2007 y Madigan *et al*, 1999).

Para la producción de etanol han sido utilizadas diferentes fuentes de carbono como materia prima; estas deben ser transformadas con facilidad en azúcar fermentable. Su uso práctico estará determinado por el rendimiento en etanol, por su costo y el tipo de microorganismo que se utilice (Hernández, 2007).

Se definen tres tipos de materias primas para la producción de etanol: a) materiales portadores de azúcares simples que contienen carbohidratos (tales como jugo de caña de azúcar, melazas, sorgo dulce, etc.); b) materiales amiláceos los cuales contienen almidón como fuente de azúcares (tales como la yuca, maíz, papa, etc.) y c) materiales celulósicos, que contienen celulosa, hemicelulosa, tales como el bagazo de la caña de azúcar, la madera, residuos agrícolas, etc. (Hernández, 2007).

El etanol se produce por fermentación de estas materias primas con levaduras u otros microorganismos. Las materias primas del primer tipo fermentan directamente. El segundo

tipo de materias primas consta de carbohidratos complejos, como el almidón, que primero se deben convertir en azúcares fermentables mediante la acción de enzimas. Las sustancias celulósicas del tercer tipo de materias primas se convierten en azúcares fermentables por hidrólisis con ácidos inorgánicos, principalmente (Hernández, 2007).

Las levaduras que participan en la fermentación del vino son de dos tipos: las llamadas levaduras salvajes que se encuentran en las uvas cosechadas y que se transfieren al jugo; y la levadura de vino cultivada *Saccharomyces ellipsoideus*, las cuales se adicionan a jugo para iniciar la fermentación. La diferencia fundamental entre ellas es su tolerancia al alcohol. La mayor parte de las levaduras silvestres pueden tolerar solamente alrededor de un 4% de alcohol; cuando la concentración de alcohol llega a este punto, la fermentación se detiene. La levadura del vino puede tolerar hasta un 12 a 14% de alcohol antes de detener su desarrollo (Brock y Madigan, 1993).

La selección de levaduras nativas requiere del aislamiento e identificación de las levaduras asociadas a procesos fermentativos espontáneos como etapas previas al proceso de selección sustentado en la evaluación de ciertas propiedades tecnológicas indicativas de su potencial capacidad para uso fermentativo.

La fermentación es llevada a cabo por las levaduras en soluciones de 10 a 20% p/p de azúcar con pH entre 4 y 5, y a una temperatura entre 20 a 38°C durante 2 a 3 días para producir etanol en una concentración entre 8 y 10%. El filtrado del cultivo es destilado recogiendo una solución con 50 a 60% de alcohol y redestilado para obtener el azeótropo con 95% (95,5°Gay Lussac). La masa de levaduras se puede recuperar para forraje.

Como las materias primas constituyen hasta el 70% del costo final del etanol, se trata de obtener un alto rendimiento transformando la casi totalidad de los azúcares en alcohol a partir de materiales de bajo costo. El costo de los fermentadores representan la mayor fracción de los costos de capital y la productividad está limitada por la inhibición debida al producto y la dificultad de retener altas concentraciones de microorganismos.

Fernández *et al.* (2008), encontraron que en fermentaciones realizadas con una cepa termotolerante, la concentración final de etanol fue 5,9 % (v/v) a 35 °C y 6,2 % a 40 °C, lo que equivale a rendimientos de 0,39 y 0,41 g de etanol por g de azúcares totales.

Barrena *et.al.* (2010), obtuvieron un máximo rendimiento de aguardiente de 0,350 mL aguardiente/mL guarapo con los siguientes valores de las variables: 2 horas de aireación a 0,333 vvm, 0,5 gramos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por litro de jugo de caña de azúcar y 3,0 gramos de azúcares reductores por litro de jugo de caña de azúcar (contenido promedio del jugo de caña de azúcar recién extraído).

La ruta enzimática de la glucólisis (degradación de glucosa por vía aerobia) y de la fermentación alcohólica fue aclarada en el transcurso de muchos años de investigación a finales del siglo XIX y en la primera mitad del XX (Hernández, 2007).

La glicólisis es el conjunto de reacciones que permiten pasar de la glucosa a piruvato con la formación de 2 ATP y 2 NADH. En anaerobiosis el piruvato es descarboxilado hasta acetaldehído y luego reducido a etanol con gasto del NADH generado en la primera etapa. En algunas levaduras simultáneamente hay una pequeña producción de ácido acético, como en el caso de *Brettanomyces* y *Zygosaccharomyces bailii*, y en otras de glicerol, por ejemplo en especies de *Saccharomyces*. Pocas levaduras fermentan xilosa produciendo

etanol, como *Pachysolen tannophilus*, *Pichis stipitis* y *Candida shehatae* (Brock y Madigan, 1993).

La producción de células de levadura y la producción de alcohol por levaduras son dos procesos industriales muy diferentes: en el primer proceso se requiere oxígeno para la máxima producción de material celular y por consiguiente es un proceso aeróbico, en tanto que el proceso de fermentación alcohólica es anaeróbico y sólo se efectúa en ausencia de oxígeno (Brock y Madigan, 1993).

Las levaduras son hongos unicelulares que tienen forma esférica, ovoide, elipsoide o cilíndrica. Se multiplican por brotación y al separarse cada brote queda una escara en la pared de la célula madre. También suelen presentar una reproducción sexuada donde dos células haploides se conjugan formando un cigoto que de inmediato en algunas especies, o mucho tiempo después y sólo en condiciones especiales en otras, sufre una meiosis generando las ascosporas haploides (Brock y Madigan, 1993).

Las levaduras pueden oxidar en aerobiosis los monosacáridos, como la glucosa y la fructosa, hasta dióxido de carbono y agua formando ATP, NADH y radicales carbonados intermedios en la biosíntesis celular. Algunas son aerobias estrictas pero otras en condiciones de anaerobiosis pueden fermentar los azúcares produciendo etanol, aunque esta vía metabólica produce mucho menos ATP. Las levaduras usadas industrialmente consumen como máximo un 10% de sustrato por vía oxidativa, pues prefieren la fermentación. Entre ellas se encuentran especies de *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Brettanomyces* y *Candida*, las que consumen rápidamente la glucosa. Pero otras utilizan lentamente el 70% del azúcar en aerobiosis, como las especies de *Candida*, *Hansenula*,

Kluyveromyces y la mayor parte de *Pichia*. Para que los azúcares penetren en la células es necesario un transportador en la membrana citoplasmática. Los disacáridos, como la sacarosa son hidrolizados en el exterior de la membrana (Brock y Madigan, 1993).

En el presente trabajo de investigación, el jugo de caña de azúcar (sustrato) fue inoculado con *Saccharomyces cerevisiae*, y se le inyectó aire al inicio de la fermentación por un tiempo diferente en cada corrida experimental, lo que permitió determinar su influencia para producir más biomasa de la levadura inoculada, con lo que se propició que el sustrato sea colonizado más rápido, de manera que al quedar luego en anaerobiosis, las levaduras conviertan un mayor porcentaje de azúcares reductores en etanol y CO₂. Los azúcares reductores son la fuente de carbono y el sulfato de amonio la fuente de nitrógeno para que las levaduras se reproduzcan; asimismo, los azúcares reductores servirán como alimento de las levaduras, en anaerobiosis, y producto de su metabolismo excretarán etanol y CO₂.

Objetivo general

- ✓ Determinar la influencia del tiempo de aireación, concentración de azúcares reductores y sulfato de amonio sobre el rendimiento de aguardiente de 20 °Gay Lussac.

Objetivos específicos

- ✓ Determinar los valores óptimos de las variables influyentes en la producción de aguardiente.
- ✓ Evaluar el rendimiento de aguardiente.
- ✓ Proponer una secuencia de trabajo para incrementar la producción de aguardiente.

II. MATERIAL Y METODOS

2.1. Material biológico

Se empleó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para fermentar el jugo de caña de azúcar y producir etanol, las cuales se aislaron y purificaron como se indica en la siguiente sección.

2.1.1. Aislamiento de levaduras

En caldo Sabouraud se aisló y purificó las levaduras a partir del jugo de caña de azúcar fermentado (guarapo) y de la biomasa de levadura (fermento) que se encuentra en el fondo de los recipientes donde se fermenta el jugo de caña de azúcar, se incubó por 48 horas a 28°C. Las muestras se tomaron de un productor de guarapo del molino.

2.1.2. Preparación del inóculo

Para preparar el inóculo se sembró por extensión *Saccharomyces cerevisiae*, obtenidas como se indicó en la sección anterior, en placas con Agar Sabouraud, se incubó 48 horas a 28°C. A tres placas donde se desarrolló *S.cerevisiae* se le adicionó 10 mL de agua destilada estéril para retirar por lavado las levaduras, se depositaron en un matraz Erlenmeyer estéril de 250 mL, luego se le adicionó 50 mL de agua destilada estéril. Con cámara de Neubauer y microscopio de determinó la concentración del inóculo. Para cada sistema a ensayar se empleó 15 mL de inóculo con 10^6 células de levadura/mL (equivalente a 0,5% (v/v) con respecto al volumen de sustrato).

2.2. Seguimiento del proceso fermentativo

2.2.1. Inicio

En el jugo de caña se determinó: densidad y °Brix, su pH se ajustó a 4,5 con HCl concentrado y se determinó su contenido de azúcares reductores (AR) para hacer las diluciones y llevar el jugo a un contenido de AR según el diseño estadístico. También se inoculó 10^6 células de levaduras/ mL de jugo de caña de azúcar.

2.2.2. Cada 24 horas

En una muestra del jugo que se está fermentando se midió: densidad, contenido de azúcares reductores (AR) y °Brix.

2.2.3. Al final de la fermentación (a las 72 horas)

Se realizó una destilación simple hasta que el contenido alcohólico del destilado fue de 20° GL.

2.2.4. Destilación

Se ensambló el equipo para destilación simple, empleando un balón de 1000 mL, y un tubo refrigerante. El condensado se recibió en un matraz de 500 mL.

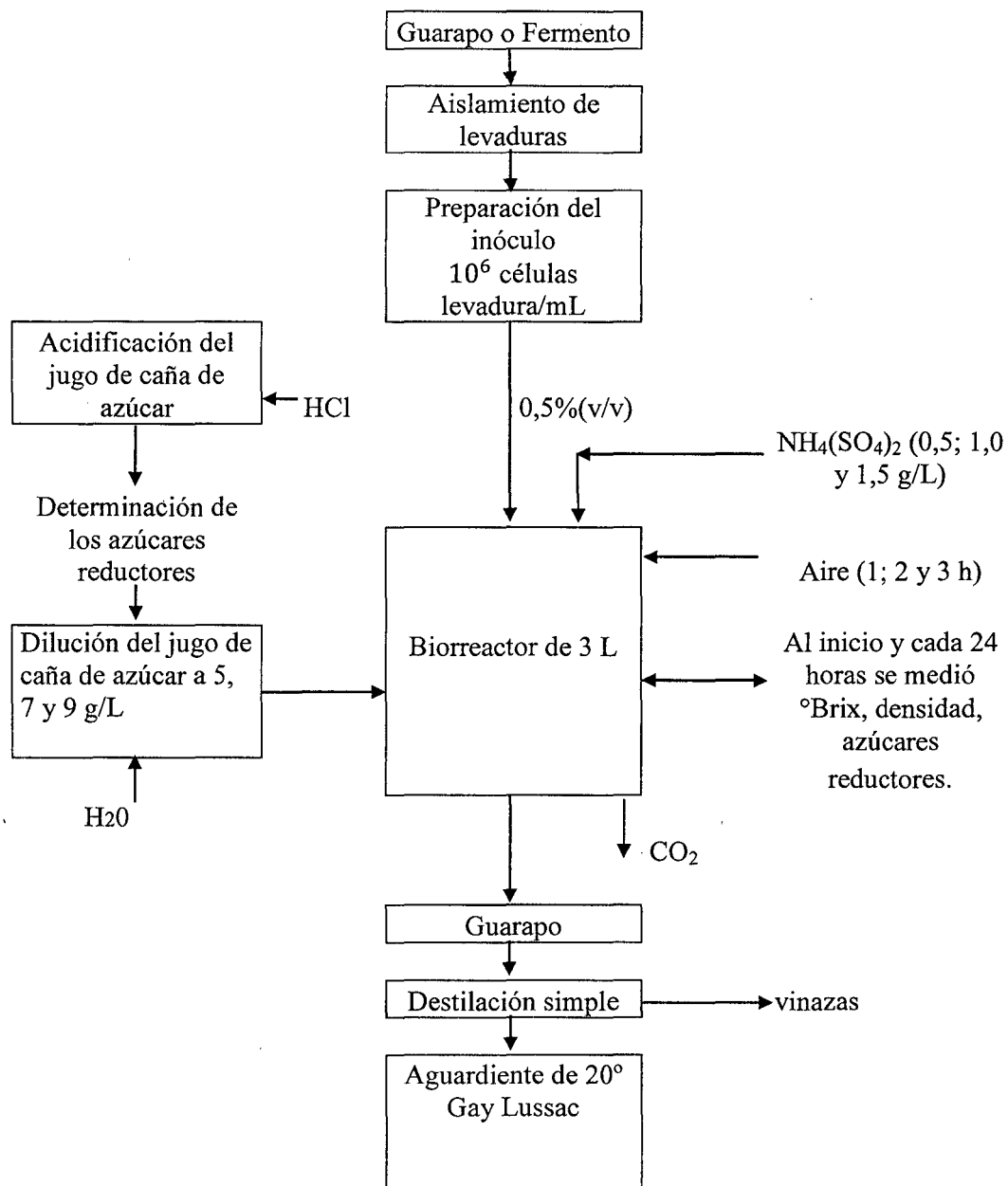


Figura 1. Diagrama de flujo para obtener aguardiente a 20° Gay Lussac.

Fuente: Elaboración propia

2.2.5. Diseño estadístico de Box-Behnken

Se utilizó el diseño estadístico de Box-Behnken (Montgomery, 2003) para tres variables independientes, para obtener el mejor valor de cada una de las variables influyentes en la producción de aguardiente en la Región Amazonas. En la Tabla 1 se muestra cada variable independiente con sus valores alto (+), medio (0) y bajo (-) a ser evaluados.

2.2.6. Variables independientes

- **Aireación:** desde el inicio de la fermentación a 0,45 vvm (0,45 mL de aire/mL de sustrato): 1 h, 2 h y 3 h.
- **(NH₄)₂SO₄** (en g/L jugo de caña): 0,5; 1,0 y 1,5.
- **Azúcares reductores** (en g/L jugo de caña): 5, 7 y 9.

2.2.7. Variable dependiente

En cada corrida experimental: Rendimiento = mL de aguardiente de 20° Gay Lussac/mL de guarapo,

Tabla 1. Valor de las variables independientes a evaluar con el diseño estadístico de Box-Behnken.

Valor	Aireación (horas)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L jugo de caña)	Azúcares reductores (g/L jugo de caña)
Alto (+)	03	1,5	9,0
Medio (0)	02	1,0	7,0
Bajo (-)	01	0,5	5,0

La distribución de los valores de las tres variables independientes de acuerdo al diseño estadístico de Box-Behnken para tres variables independientes, se realizó de acuerdo a la Tabla 2, donde cada columna representa una variable y cada fila un experimento.

Tabla 2. Distribución de los valores de las variables independientes según el diseño estadístico de Box-Behnken.

Número de experimento	Variables		
	A	B	C
1	-	-	0
2	-	+	0
3	+	-	0
4	+	+	0
5	-	+	-
6	-	0	+
7	+	0	-
8	+	0	+
9	0	-	-
10	0	-	+
11	0	+	-
12	0	+	+
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Fuente: Montgomery, 2003.

Los resultados experimentales se procesaron con el software estadístico Statgraphics para generar gráficas de respuestas en superficie.

III. RESULTADOS

3.1. Seguimiento de la fermentación

Tabla 3. Densidad, contenido de azúcares reductores y °Brix del jugo de caña de azúcar durante la fermentación alcohólica.

Número de Experimento	Densidad (g/mL)					Azúcares reductores(g/L)				°Brix			
	Inicio	24 h	48 h	72 h		Inicio	24 h	48 h	72 h	Inicio	24 h	48 h	72 h
1	1,072	1,049	1,030	1,010	7	13,2	17,9	83.0		17,2	16,9	15,5	13,2
2	1,074	1,060	1,013	1,010	7	16,7	33,3	125		17,5	16,9	16,2	13,7
3	1,074	1,049	1,049	1,020	7	16,1	38,5	83.4		17,6	16,9	14,3	13,4
4	1,072	1,049	1,035	1,030	7	17,8	38.5	100		16,4	16,6	15,0	13,6
5	1,068	1,040	1,025	1,020	5	16,7	33.3	100		10,7	10,7	9,60	8,10
6	1,075	1,059	1,036	1,022	9	12,5	20,8	83,3		18,5	17,9	15,4	13,8
7	1,071	1,045	1,032	1,015	5	20,8	35,7	125		11,5	10,8	9,8	9,40
8	1,074	1,049	1,049	1,020	9	16,1	38,5	83.4		18,3	17,6	16,9	14,3
9	1,070	1,050	1,025	1,015	5	14,3	19.2	125		10,5	10,0	9,5	9,0
10	1,075	1,045	1,020	1,008	9	12,5	15,6	100,0		18,3	17,6	14,6	13,8
11	1,071	1,052	1,018	1,010	5	14,3	20,8	125,0		10,6	10,2	9,7	9.2
12	1,074	1,041	1,025	1,020	9	16,7	45,5	125		18,3	17,8	17,1	14,9
13	1,074	1,050	1,036	1,018	7	19,2	33,3	125		17,5	16,5	13,5	11,5
14	1,075	1,045	1,020	1,008	7	12,5	15,6	100,0		17,6	14,6	13,8	11,6
15	1,071	1,052	1,018	1,010	7	14,3	20,8	125,0		17,0	16,4	13,9	12,0

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 3 se aprecia que la densidad del jugo de caña de azúcar en fermentación va disminuyendo conforme avanza la fermentación, debido a la producción de CO_2 , que se disipa al medio ambiente. Los azúcares reductores van incrementándose debido a que continúa la hidrólisis de la sacarosa presente en el jugo de caña de azúcar, por estar en medio ácido (pH 4,5). Los °Brix del jugo fermentado disminuyen, lo cual también se debe a la producción y disipación de CO_2 , lo que disminuye el contenido de sólidos disueltos en el medio, incidiendo directamente sobre el valor de los °Brix.

3.2. Destilación simple del jugo de caña fermentado

Tabla 4. Rendimiento de aguardiente de 20° Gay Lussac, de cada una de las 15 corridas experimentales.

Número de experimento	Guarapo (mL)	Aguardiente de 20° GL (mL)	Rendimiento (<u>mL de aguardiente</u>) mL guarapo
1	3000	660	0.220
2	3000	750	0.250
3	3000	696	0,232
4	3000	696	0,232
5	3000	588	0,196
6	3000	1101	0,367
7	3000	570	0,190
8	3000	1035	0,345
9	3000	726	0,242
10	3000	930	0,310
11	3000	825	0,275
12	3000	1056	0,352
13	3000	474	0,158
14	3000	480	0,160
15	3000	495	0,165

Fuente: Elaboración propia

3.3. Rendimiento de aguardiente aplicando el diseño estadístico de Box-Behnken

Tabla 5. Resultados de cada una de las 15 corridas experimentales.

Número de experimento	Variables			Rendimiento de aguardiente (mL aguardiente) mL guarapo	Orden de Producción
	A Aireación (h)	B $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L jugo caña)	C Azúcares reductores (g/L jugo caña)		
1	1	0,5	7,0	0,220	10
2	1	1,5	7,0	0,250	6
3	3	0,5	7,0	0,232	8
4	3	1,5	7,0	0,232	9
5	1	1,0	5,0	0,196	11
6	1	1,0	9,0	0,367	1
7	3	1,0	5,0	0,190	12
8	3	1,0	9,0	0,345	3
9	2	0,5	5,0	0,242	7
10	2	0,5	9,0	0,310	4
11	2	1,5	5,0	0,275	5
12	2	1,5	9,0	0,352	2
13	2	1,0	7,0	0,158	15
14	2	1,0	7,0	0,160	14
15	2	1,0	7,0	0,165	13

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 5 se aprecia que con los valores de las variables del experimento 6 se ha obtenido el mayor rendimiento de aguardiente.

Tabla 6. Análisis de varianza para rendimiento de aguardiente.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Aireación	0,0001445	1	0,0001445	0,18	0,6821
B: Sulfato Amonio	0,00137813	1	0,00137813	1,71	0,2237
C: AR	0,0277301	1	0,0277301	34,36	0,0002
BB	0,00731078	1	0,00731078	9,06	0,0147
CC	0,0270669	1	0,0270669	33,54	0,0003
Error total	0,00726406	9	0,000807118		
Total (corr.)	0,0690509	14			

Fuente: Elaboración propia.

El valor-P menor de 0,05 (95% de confianza) indica que son variables influyentes en el rendimiento de aguardiente.

Tabla 7. Coeficiente de regresión para rendimiento de aguardiente.

Coefficiente	Estimado
Constante	1,17645
A: Aireación	-0,00425
B: Sulfato de Amonio	-0,328673
C: AR	-0,269341
BB	0,177462
CC	0,0213413

Fuente: Elaboración propia

Con los valores experimentales obtenidos al ejecutar la matriz del diseño estadístico de Box-Behnken para la optimización de la producción de etanol a partir del jugo de caña, se realizó un análisis de regresión y se obtuvo la ecuación del modelo que mejor se ajusta a estos resultados, la cual viene dada por:

$$\text{Rendimiento Aguardiente} = 1.17645 - 0.00425 * \text{Aireación} - 0.328673 * \text{Sulfato Amonio} - 0.269341 * \text{AR} + 0.177462 * \text{Sulfato Amonio}^2 + 0.0213413 * \text{AR}^2.$$

Tabla 8. Camino de máximo descenso para rendimiento de aguardiente.

Aireación (h)	Sulfato Amonio (g/L sustrato)	Azúcares reductores (g/L sustrato)	Rendimiento aguardiente (mL aguardiente/mL guarapo)
2,0	1,0	7,0	0,177077
3,0	0,923565	6,30042	0,161708
4,0	0,923565	6,30042	0,157458
5,0	0,923565	6,30042	0,153208
6,0	0,923565	6,30042	0,148958
7,0	0,923565	6,30042	0,144708

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 8 se despliega el trayecto de máximo descenso, este es el trayecto desde el centro de la región experimental, a través del cual la respuesta estimada cambia más rápidamente con un cambio menor en los factores experimentales. Indica buenas locaciones para correr experimentos adicionales si el objetivo es incrementar o decrementar el rendimiento de aguardiente. Actualmente, 6 puntos se han generado cambiando aireación en incrementos de 1,0.

Tabla 9. Parámetros óptimos para rendimiento de aguardiente.

Valor óptimo = 0.383042

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Aireación	1,0	3,0	1,0
Sulfato amonio	0,5	1,5	1,5
AR	5,0	9,0	8,99986

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 2 se muestra la influencia de las tres variables independientes, siendo la más influyente la concentración de azúcares reductores y la menos influyente el tiempo de aireación.

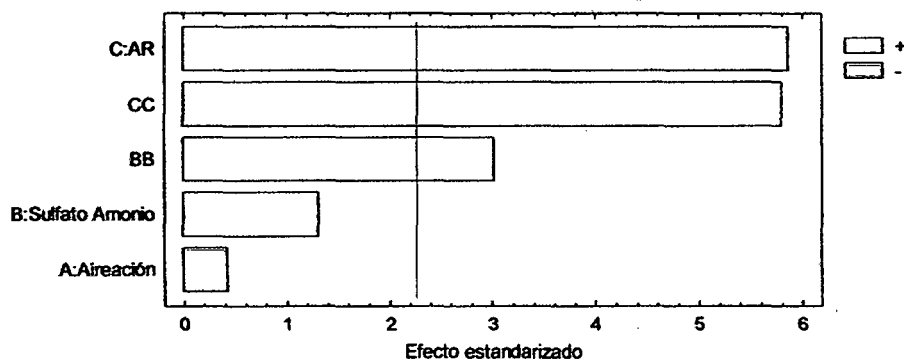


Figura 2. Diagrama de Pareto estandarizado para rendimiento de aguardiente. Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 3 se muestra la concentración de azúcares reductores versus el sulfato de amonio a una aireación constante de 1 hora se obtiene el máximo rendimiento de aguardiente.

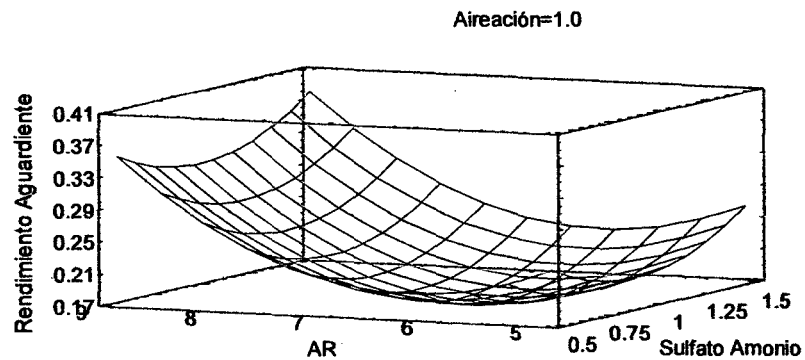


Figura 3. Representación gráfica para rendimiento de aguardiente optimizado bajo un modelo de superficie respuesta. Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 4 se muestra el punto de máximo rendimiento de aguardiente lo cual se obtiene con los valores altos en concentraciones de azúcares reductores y sulfato de amonio con una aireación constante de 1 hora.

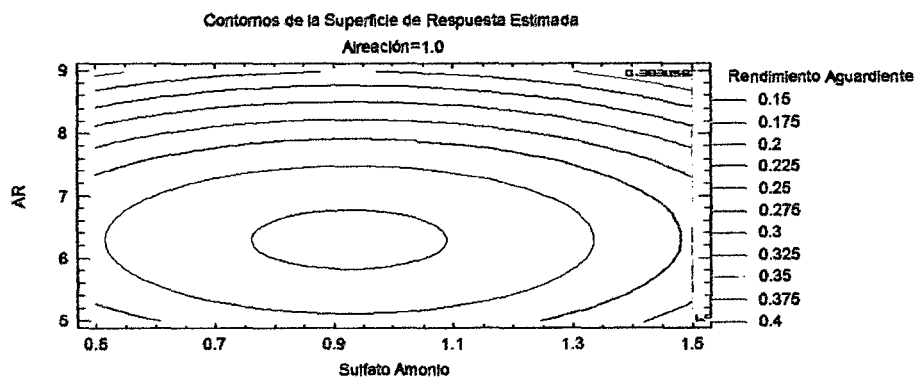


Figura 4. Representación gráfica para rendimiento de aguardiente bajo un modelo contorno superficie respuesta. Fuente: Elaboración propia.

IV. DISCUSIÓN

Con 1 hora de aireación a 0,45 vvm se han obtenido los mayores rendimientos de aguardiente que con 3 horas o con 2 horas de aireación también a 0,45 vvm. La aireación en un sustrato que contiene azúcares reductores permite que la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* inoculada se incremente, la cual colonizará rápidamente el sustrato. En anaerobiosis, la *S. cerevisiae* convierte los azúcares reductores en etanol y CO₂. En el presente trabajo de investigación se ha determinado que el menor tiempo de aireación favorece el mayor rendimiento de aguardiente.

En la presente investigación, el máximo rendimiento de aguardiente obtenido fue de 0,367 mL aguardiente de 20 °GL/mL guarapo y se ha obtenido con los valores de las variables del experimento número 6: 1 horas de aireación a 0,45 vvm (volumen de aire empleado es 0,45 del volumen de sustrato en el biorreactor), 1,0 gramos de (NH₄)₂SO₄ por litro de jugo de caña de azúcar y 9,0 gramos de azúcares reductores por litro de jugo de caña de azúcar (contenido promedio del jugo de caña de azúcar recién extraído). Barrena *et.al.* (2010), obtuvieron un máximo rendimiento de aguardiente de 0,350 mL aguardiente de 20 °GL/mL guarapo con los siguientes valores de las variables: 2 horas de aireación a 0,333 vvm, 0,5 gramos de (NH₄)₂SO₄ por litro de jugo de caña de azúcar y 3,0 gramos de azúcares reductores por litro de jugo de caña de azúcar. El rendimiento obtenido en la presente investigación es mayor debido a que la *S. cerevisiae* ha estado mayor tiempo en anaerobiosis, condición en la que esta levadura produce etanol y no biomasa.

El procesamiento de los resultados experimentales con el software Statgraphics permite predecir que se puede obtener 0,383 mL aguardiente de 20 °GL/mL guarapo con los

siguientes valores de las variables: 1 hora de aireación a 0,45 vvm, 1,5 gramos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por litro de jugo de caña de azúcar y 8,99 gramos de azúcares reductores por litro de jugo de caña de azúcar. El rendimiento predicho es ligeramente mayor al obtenido con el experimento 6 en la presente investigación, con la diferencia que el resultado del software indica que se debe emplear más $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para incrementar en rendimiento de aguardiente en solo 1,6%.

Según los parámetros óptimos para rendimiento de aguardiente (Tabla 9), se deduce de manera general que la mayor concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es la que permite mayor rendimiento de aguardiente. Mientras que el tiempo de aireación ($p>0,05$) es menos influyente para el rendimiento de aguardiente tal como se muestra en la Tabla 6 de análisis de varianza y en la Figura 2 del diagrama de Pareto estandarizado.

El mayor contenido de azúcares reductores (9 g/L), si se asocia a la mayor concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ empleada en el presente trabajo de investigación (1,5 g/L), permite obtener los mayores rendimientos de aguardiente, resultado que se favorece más si se emplea el valor bajo de aireación (1 hora), tal como se aprecia en la Figura 3 de superficie de respuesta obtenida con el software Statgraphics.

Conforme avanza la fermentación, se aprecia en la Tabla 3, que la densidad del jugo de caña de azúcar fermentado disminuye, el contenido de azúcares reductores aumenta porque se está hidrolizando la sacarosa presente en el jugo; los °Brix disminuye porque durante la bioconversión de sacarosa en etanol realizado por la *S. cerevisiae* también se produce CO_2 gaseoso que sale del sustrato en fermentación, perdiéndose masa.

La Tabla 6 del análisis de varianza, particiona la variabilidad de rendimiento aguardiente en piezas separadas para cada uno de los efectos, entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental en este caso, 3 efectos tienen un p-valor menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

Según Rodríguez *et al.* (2011), la variable más influyente para obtener mayores rendimientos de aguardiente es la concentración de azúcares reductores, lo cual coincide con los resultados del presente trabajo de investigación, demostrado en la Figura 2 del diagrama de Pareto.

Según Rodríguez *et al.* (2011), el pH óptimo para producir etanol es de 4,55 siendo similar al empleado en la presente investigación, el cual se ajustó a 4,5 adicionando HCl concentrado al jugo de caña de azúcar.

V. CONCLUSIONES

- 1- El máximo rendimiento fue de 0,367 mL aguardiente de 20 °GL/mL guarapo con los siguientes valores de las variables: 1 hora de aireación a 0,45 vvm, 1,0 gramos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por litro de jugo de caña de azúcar y 9,0 gramos de azúcares reductores por litro de jugo de caña de azúcar.
- 2- La concentración de 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{L}$ de jugo de caña de azúcar, es la que ha permitido mayores rendimientos de aguardiente.
- 3- La variable más influyente para el rendimiento de aguardiente fue la concentración de azúcares reductores en el jugo de caña de azúcar.
- 4- El menor tiempo de aireación (1 hora a 0,45 vvm) favorece el mayor rendimiento de aguardiente.

VI. RECOMENDACIONES

Los productores de aguardiente de la Región Amazonas deben seguir la siguiente secuencia de trabajo para obtener el máximo rendimiento de aguardiente de 0,367 mL aguardiente/mL guarapo:

- Bajar el pH del jugo de caña de azúcar a 4,5 con HCl concentrado. Este jugo debe contener en promedio 9,0 gramos de azúcares reductores/litro.
- Suplementar el jugo con 1,0 gramos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por litro de jugo de caña.
- Inocular el jugo acidificado con 0,5 %(v/v) de inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* que contiene 10^6 células/mL.
- Airear el jugo inoculado durante 1 hora a 0,45 vvm.
- Fermentar durante un tiempo de 72 a 96 horas.
- Deben contar con un alcoholímetro para determinar exactamente el momento en el cual deben detener la destilación, de esta manera se estará obteniendo un producto estándar con respecto al contenido de grado alcohólico de 20 °Gay Lussac.
- En futuras investigaciones, determinar el flujo de calor que se disipa en cada biorreactor para determinar la necesidad de refrigerante.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Barrena Gurbillón, M.A., O.A. Gamarra T. y J.L. Maicelo Q. Estandarización de la producción de aguardiente en la Región Amazonas, Perú – 2010. Trabajo de Investigación UNTRM-A.
- Brock, T. D. & M. T. Madigan. 1993. Microbiología. 6ta. Edic. Edit. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. México.
- Corrales, M. 1993. Alimentos, bebidas alcohólicas y condimentos. México.
- Fernández, T.; M., Marcet; W., Olivera & C., Martín. 2008. Aislamiento y evaluación de cepas termotolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de aguardientes y rones. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 6(1): 64-70.
- Hernández, M.T. 2007. Tendencias actuales en la producción de bioetanol. Boletín Electrónico No. 08. Facultad de Ingeniería - Universidad Rafael Landívar – Cuba.
- Madigan, M.T.; J.M., Martinko & J., Parker. 1999. Biología de los Microorganismos. 8^{va}. Edic. Edit. Prentice Hall, Inc. Madrid – España.
- Montgomery (2003). Diseño y análisis de experimentos. .2da. Edic. New York: Chichester: p.459-471.
- Rodriguez Gámez, O, M. J Serrat T, M. Camacho P. y J. E. Marin M. Optimización de las condiciones de fermentación para la producción de etanol de melaza de caña por *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 Cuba-2011.

ANEXOS

ANEXO 1

Superficie de respuesta para rendimiento de aguardiente

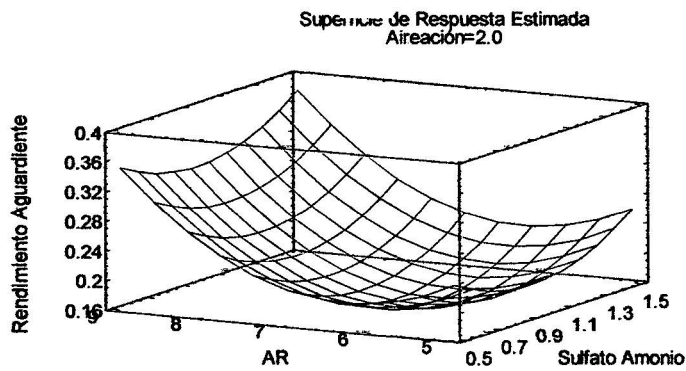


Figura 5. Superficie respuesta para rendimiento de aguardiente con aireación constante igual a 2 horas. Fuente: Elaboración propia.

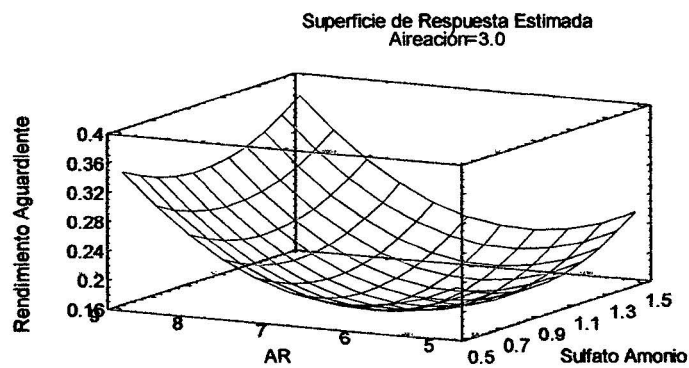


Figura 6. Superficie respuesta para rendimiento de aguardiente con aireación constante igual a 3 horas. Fuente: Elaboración propia.

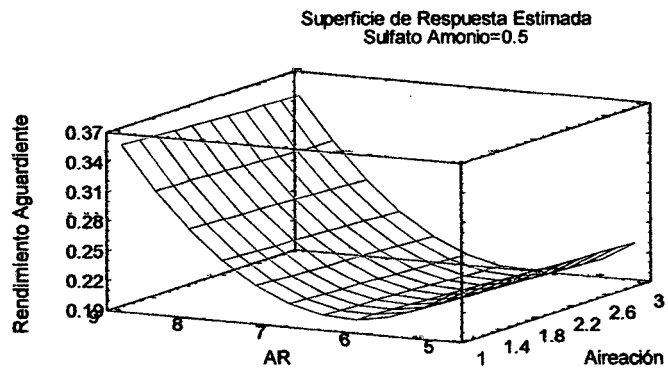


Figura 7. Superficie respuesta para rendimiento de aguardiente con sulfato de amonio constante (0,5 g/L de jugo de caña). Fuente: Elaboración propia.

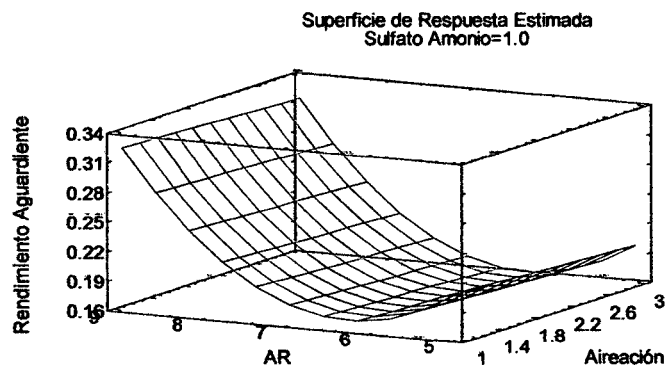


Figura 8. Superficie respuesta para rendimiento de aguardiente con sulfato de amonio constante (1.0 g/L de jugo de caña). Fuente: Elaboración propia.

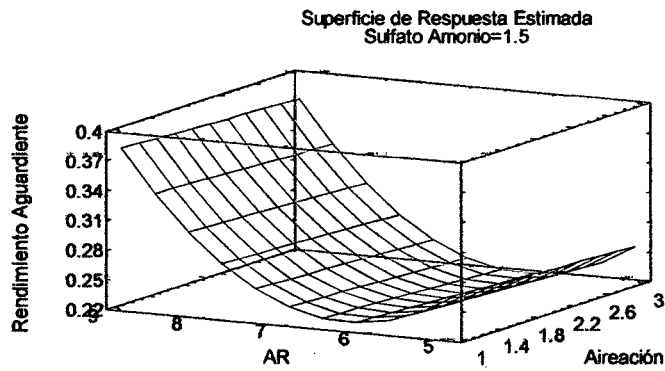


Figura 9. Superficie respuesta para rendimiento de aguardiente con sulfato de amonio constante (1,5 g/L de jugo de caña). Fuente: Elaboración propia.

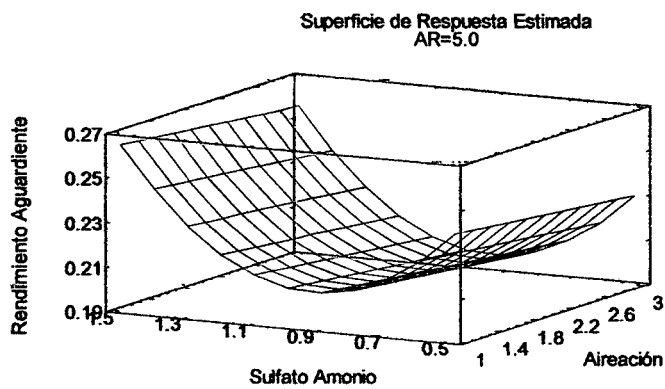


Figura 10. Superficie respuesta para rendimiento de aguardiente con AR (azucares reductores) constante 5 g/L de jugo de caña. Fuente: Elaboración propia.

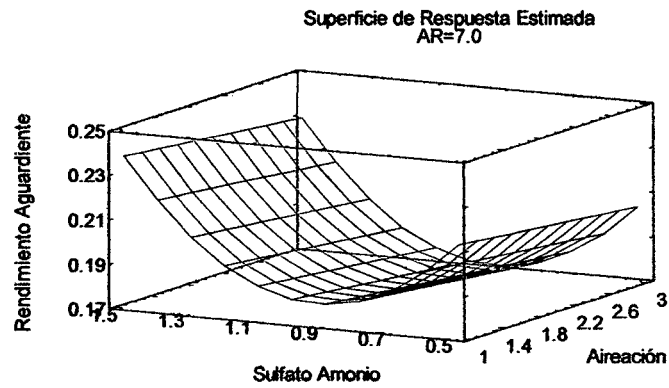


Figura 11. Superficie respuesta para rendimiento de aguardiente con AR (azúcares reductores) constante 7 g/L de jugo de caña. Fuente: Elaboración propia.

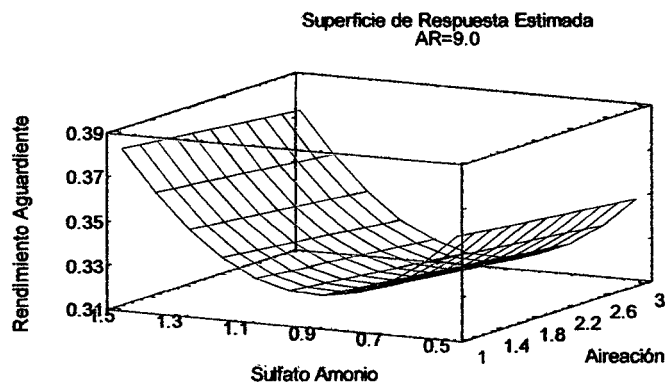
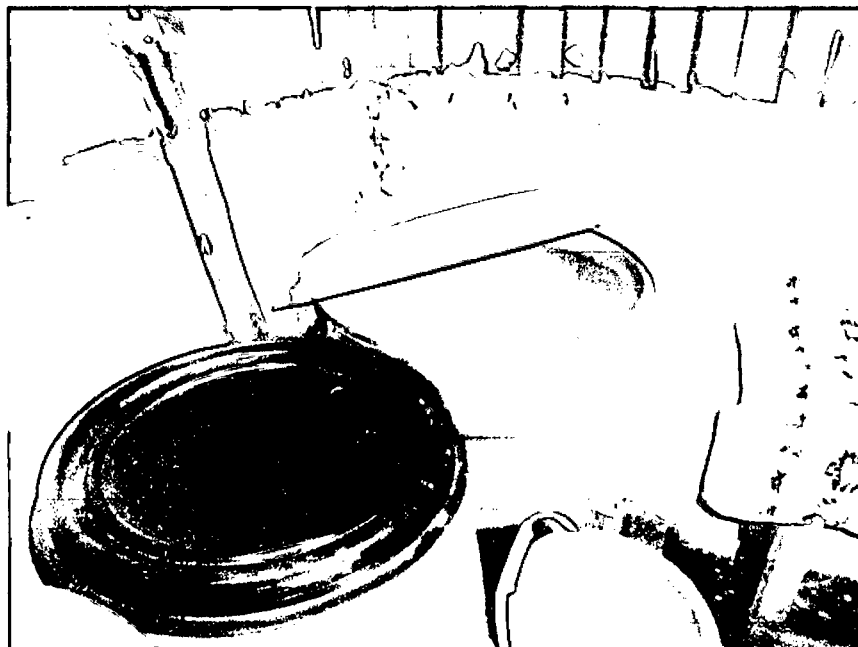


Figura 12. Superficie respuesta para rendimiento de aguardiente con AR (azúcares reductores) constante 9 g/L de jugo de caña. Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 2

Muestreo de guarapo y concho para aislar levaduras



Fotografía 1. Fermento utilizado como inóculo para el aislamiento de levaduras.



Fotografía 2. Muestras obtenidas de levaduras del Anexo El Molino, Chachapoyas, Amazonas.

ANEXO 3

Composición de los medios de cultivo

Caldo Sabouraud

Peptona	10 g
Glucosa	40 g
Agua destilada	1000 mL

Agar Sabouraud

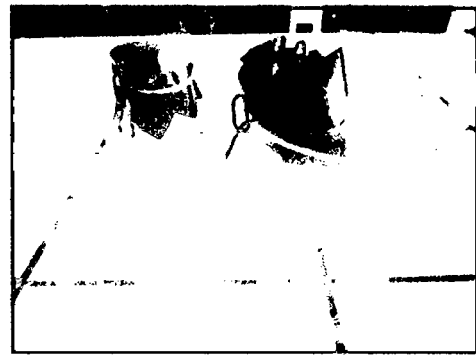
Peptona	10 g
Glucosa	40 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

ANEXO 4

Preparación del Caldo Sabouraud y Agar Sabouraud



Fotografía 3. Preparación del Caldo Sabouraud. Fotografía 4. Tubos con Caldo Sabouraud.



Fotografía 5. Esterilización de los medios de cultivo Fotografía 6. Medio de cultivo esterilizado (Caldo Sabouraud).

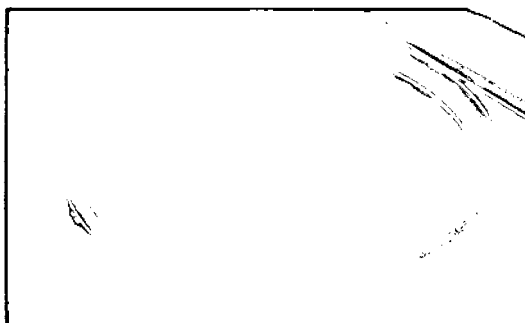


Fotografía 7. Observación al microscopio presencia de levaduras

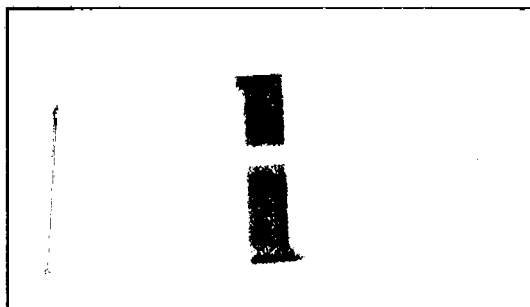
Fotografía 8. Placas con Agar Sabouraud, inoculación de levaduras.

ANEXO 5

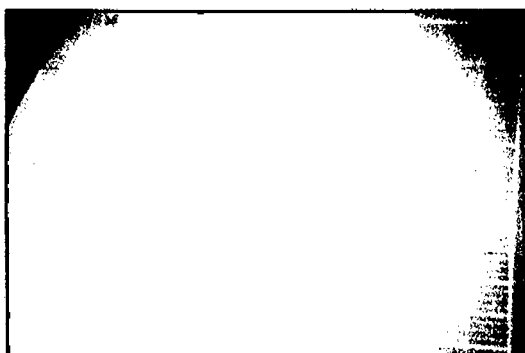
Conteo de levaduras en cámara de Neubauer



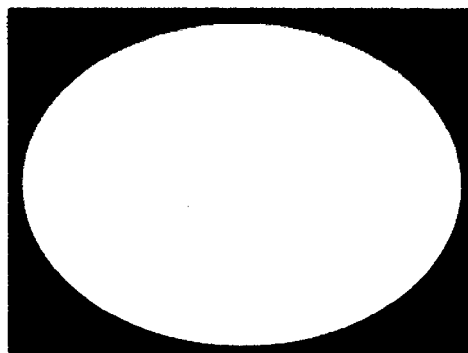
Fotografía 9. Placas incubadas por 48 horas



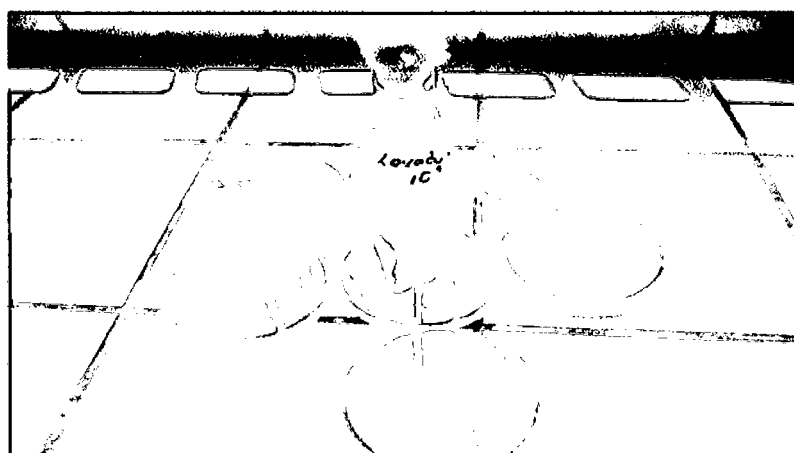
Fotografía 10. Cámara de Neubauer



Fotografía 11. Cámara de Neubauer vista al microscopio



Fotografía 12. Levaduras en la Cámara de Neubauer vista al microscopio.



Fotografía 13. Levaduras para ser utilizadas en los biorreactores.

Conteo de células de levaduras.

$$\frac{\text{Número de células de levaduras}}{\text{mL}} = \frac{\sum(A1+A3+C1+C3+B2)/5}{\text{Factor de dilución } \times 10^{-4} \text{ mL}}$$

Donde A1, A3, C1, C3 y B2 son los cuadros de la cámara de Neubauer

$$(A1+A3+C1+C3+B2)/5 = 96 \text{ contados a una dilución del inóculo de } 10^{-1}$$

$$\frac{\text{Número de células de levaduras}}{\text{mL}} = \frac{96}{10^{-1} \times 10^{-4} \text{ mL}}$$

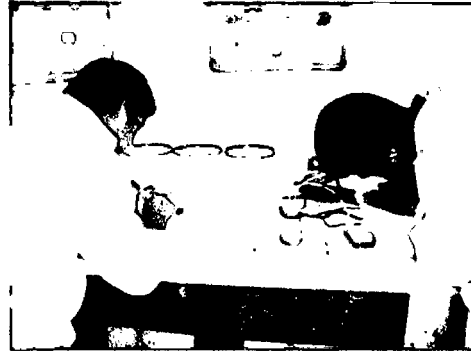
$$\frac{\text{Número de células de levaduras}}{\text{mL}} = 9,6 \times 10^6 \text{ células de levadura en el inóculo.}$$

ANEXO 6

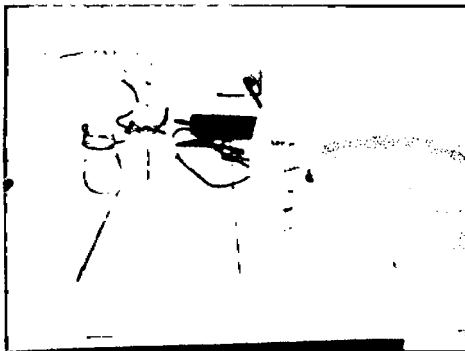
Ensamble de los biorreactores, regulación de bombas y fermentación del jugo de caña.



Fotografía 14. Ensamble de los biorreactores.



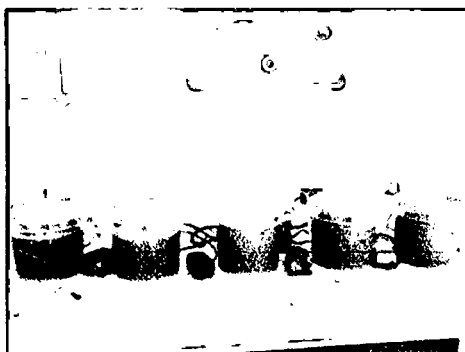
Fotografía 15. Regulación de bombas.



Fotografía 16. Regulación del volumen de aire inyectado



Fotografía 17. Estandarización del sustrato: inoculación de levaduras, sulfato de amonio pH y azúcares reductores.



Fotografía 18. Control del tiempo de aireación 1,2 y 3 horas.



Fotografía 19. Fermentación alcohólica

ANEXO 7

Determinación de densidad, azúcares reductores y °Brix



Fotografía 20. Determinación de densidad.



Fotografía 21. Determinación de azúcares reductores.

Contenido de azúcares reductores

Los carbohidratos cuyas moléculas contienen un grupo carbonilo libre, se denominan reductores. Se utilizó la metodología de Lane y Eynon (Amaga y Altamirano, 1999) para determinar la cantidad de azúcares reductores. El método se basa en que los azúcares que tienen carácter reductor, reducen las sales de cobre a óxido cuproso (Cu_2O) en solución alcalina.



Valoración del reactivo de Fehling

Se llenó la bureta de 50 mL con una solución de glucosa al 0,5%(p/v), después se depositó en un matraz Erlenmeyer 5 mL de Fehling A ($\text{CuSO}_4 = 34,65$ g para 1 L) y 5 mL de Fehling B (tartarato de sodio y potasio = 34,65 g y hidróxido de sodio = 50,00 g; para 1 L), luego se agregó a este matraz 4 gotas de azul de metileno al 1%(p/v) (indicador) y se calentó con un mechero de alcohol hasta ebullición. Enseguida se valoró el reactivo de Fehling, manteniendo la ebullición, con la solución de glucosa al 0,5%. Se finalizó la valoración cuando el sulfato cúprico se redujo totalmente, lo cual se comprobó por el cambio de color azul a un precipitado rojo ladrillo, anotándose el volumen de gasto (C mL) de la solución de glucosa al 0,5%.

Equivalencia en glucosa del reactivo de Fehling

Se determinó la equivalencia del reactivo de Fehling con el consumo de solución de glucosa (C mL) en la valoración:

Solución de glucosa al 0,5% equivale a decir 0,5 g de glucosa contenidos en 100 mL de esta solución.

$$C \text{ mL de solución de glucosa consumidos} = D \text{ g de glucosa}$$

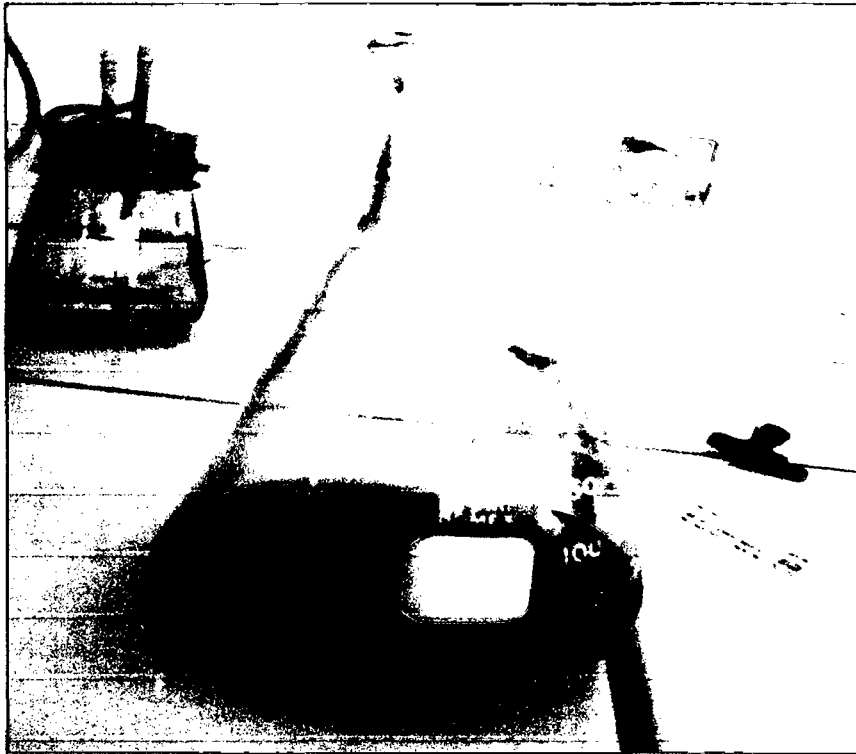
Entonces: 10 mL de Fehling A y B = D g de glucosa.

Determinación de azúcares reductores

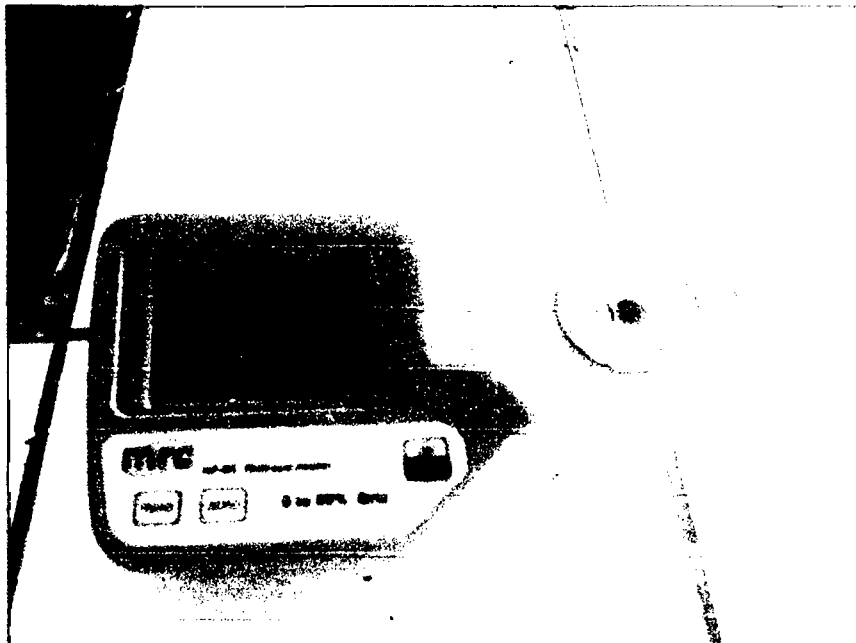
Se llenó la bureta de 50 mL con el jugo de caña de azúcar filtrado. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se depositó 5 mL de Fehling A y 5 mL de Fehling B, enseguida se agitó para homogenizar la mezcla, luego se agregó a este matraz 4 gotas de azul de metileno al 1%(p/v) (indicador) el cual dio un color azul intenso. Se calentó el matraz con un mechero de alcohol hasta ebullición. A continuación, se dejó caer de la bureta el jugo filtrado en goteo rápido manteniendo la ebullición. Se finalizó la titulación cuando el reactivo de Fehling cambió de color azul a un precipitado rojo ladrillo, anotándose el volumen de jugo de caña filtrado gastado (Y mL) en la titulación.

Determinación de g glucosa/L de jugo de caña de azúcar:

$$\begin{array}{r}
 D \text{ g glucosa} \qquad 10 \text{ mL Fehling} \qquad 1000 \text{ mL} \\
 \hline
 \qquad \qquad \qquad \times \qquad \qquad \qquad \times \qquad \qquad \qquad = E \text{ g glucosa/L jugo caña de azúcar} \\
 \hline
 10 \text{ mL Fehling} \qquad Y \text{ mL jugo consumido} \qquad 1L
 \end{array}$$



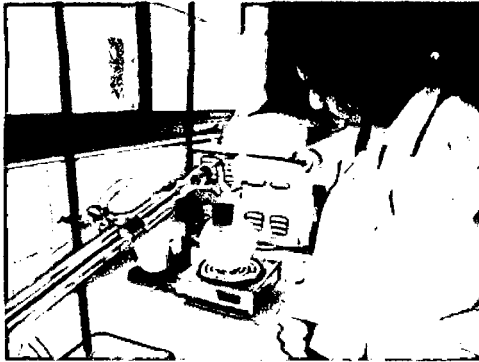
Fotografía 22. Punto final (rojo ladrillo) de la titulación de azúcares reductores.



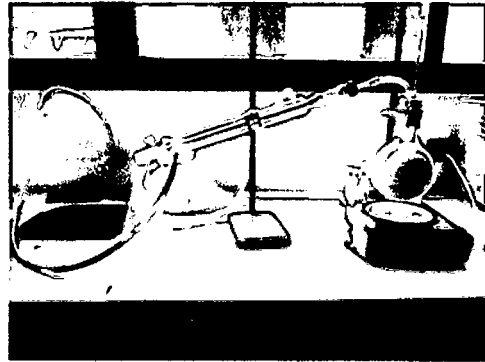
Fotografía 23. Medición de °Brix.

ANEXO 8

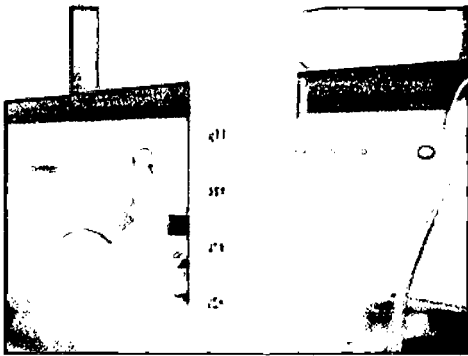
Destilación simple, aguardiente de 20 ° Gay Lussac.



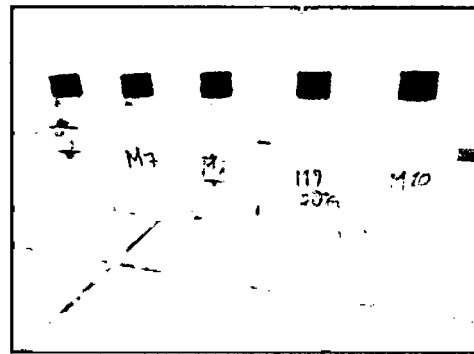
Fotografía 24. 1 Litro de jugo fermentado



**Fotografía 25. Destilación simple del
guarapo**



**Fotografía 26. Medición de los grados
alcohólicos**



**Fotografía 27. Muestras aguardiente de 20
°Gay Lussac.**