



BUSQUEDA DE NUEVOS SUSTRATOS DE LA INDUSTRIA AZUCARERA PARA FERMENTACION ALCOHOLICA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso 2012/13

Alumna: Víctor Calzada Sánchez

Tutor: Felicidad Ronda Balbás

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera
Universidad de Valladolid

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, a mi tutora Felicidad Ronda Balbás, el apoyo mostrado para poder realizar este trabajo fin de carrera y por sus mensajes de ánimo.

También quiero agradecer la información prestada y el trato recibido a mi tutora en la empresa Azucarera Iberia María José Tirado Milla y así como a todos los integrantes del Centro I+D+i de dicha empresa por su ayuda desinteresada.

Y por supuesto, agradecer también toda la ayuda, apoyo y animo que me han ofrecido mi familia y amigos que siempre están ahí cuando más los necesito.

Índice

| | |
|--|-----------|
| Resumen..... | 3 |
| 1. Introducción | 3 |
| 2. Objetivos | 8 |
| 3. Material y Métodos..... | 9 |
| 3.1. Materiales | 9 |
| 3.2. Métodos | 11 |
| 3.3.1. Proceso de fermentación..... | 11 |
| 3.3.2. Proceso de destilación | 14 |
| 3.3. Cálculos | 15 |
| 4. Resultados y Discusiones | 15 |
| 5. Conclusión | 29 |
| 6. Bibliografía | 30 |

Resumen

La necesidad de conseguir una utilización económicamente más rentable de diferentes subproductos del sector azucarero es lo que nos lleva a la realización de este estudio. En el presente estudio pretendemos evaluar la capacidad fermentativa de diferentes sustratos procedentes tanto de remolacha azucarera, como del refinado de azúcar crudo para la obtención de etanol, ya sea de manera independiente o mediante la combinación de diferentes sustratos. La levadura empleada en el proceso será *Saccharomices cerevisiae*. Los parámetros de estudio han sido aireación y adicción de nutrientes (extracto de levaduras). Uno de los aspectos destacables, han sido los buenos resultados obtenidos en la melaza procedente de la Refinería (azúcar crudo).

Abstract

The need to achieve a more economically profitable use of different sub-products of the sugar sector is what has brought us to carry out this study. Through the current study we are trying to evaluate the ability of different substrates coming from both the sugar beet and cane to obtain ethanol, either independently or using a combination of different substrates. The yeast used in the process will be *Saccharomices cerevisiae*. The studies parameters have been ventilation and addition of nutrients (extracted from the yeast). One of the aspects that stands out, have been the positive results obtained in the treacle coming from the cane.

1. Introducción

El etanol, se denomina comúnmente alcohol, su fórmula es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$. Se puede considerar que el alcohol se obtiene a partir de una materia prima, pudiéndose clasificar en función de su procedencia: alcohol de maíz, de melazas, vínico... Si bien es verdad el alcohol como tal producto químico, etanol, es independiente de su origen, estas denominaciones tienen razón de ser cuando el alcohol no está debidamente purificado y entonces se encuentran presentes ciertas impurezas características que identifican su procedencia.

Este se obtiene a partir de microorganismos, los cuales realizan la fermentación de azúcares que se encuentran en productos vegetales, que pueden provenir de subproductos de grandes procesos industriales, como es el proceso de la obtención del azúcar. En los últimos años la melaza, se ha convertido en un sustrato de alto interés para la obtención de alcohol por medio de vías fermentativas debido a su bajo precio en comparación con otros sustratos ya que es un subproducto de la fabricación

del azúcar blanco. La melaza está compuesta principalmente de diversos azúcares los cuales pueden ser fermentados por levaduras o bacterias, generando así un valor agregado para este subproducto (Palacio Llamas, 1956).

Nutricionalmente presenta un altísimo contenido en carbohidratos además de vitaminas del grupo B y abundantes minerales, entre los que destacan el hierro, cobre y magnesio. Su contenido de agua es bajo.

La norma ICONTEC 587 de 1994, define como miel fina o melaza (no cristalizable) al jarabe líquido denso o viscoso, separado de la misma masa cocida final y de la cual no es posible cristalizar más azúcar por métodos usuales (Fajardo, et al. 2007).

Su principal uso es como suplemento energético para la alimentación de ganado por su alto contenido de azúcares y su bajo costo en algunas regiones, aunque el precio de la melaza se ha incrementado en los últimos años, en más del 122% debido a su utilización como sustrato en la producción de etanol (Mancheno, 2004). No obstante, una pequeña porción de la producción se destina al consumo humano, empleándola como endulzante culinario, producción de bebidas como el ron, producción de ácido butírico y acetona y elaboración de levadura de melaza.

El alcohol formado por fermentación de diferentes sustratos habitualmente se separa mediante procesos de destilación donde se obtienen tres destilados y un residuo denominado vinaza. El primer destilado, o alcohol de cabeza, está compuesto por productos de punto de ebullición bajo, tales como aldehídos y éteres. El destilado de punto de ebullición más alto está constituido en su mayoría por alcoholes superiores o aceites de fusel. El destilado de punto intermedio de ebullición corresponde a los alcoholes de buen gusto que están constituidos principalmente por el alcohol etílico, también denominado alcohol neutro, para diferenciarlo de otras formas de presentación del alcohol etílico, como son el alcohol deshidratado o desnaturalizado.

El alcohol neutro en la actualidad tiene multitud de aplicaciones pero uno de los mayores consumos que se hace de este alcohol es el de preparación de licores, así como para el encabezado de los vinos de baja graduación. Igualmente se emplea en gran cantidad para fines científicos y sanitarios.

Actualmente los alcoholes de este grupo se encuentran gravados con grandes impuestos para evitar el consumo de bebidas alcohólicas.

Según la legislación en España se consideraran alcoholes para consumo humano los alcoholes neutros vínicos, además de los siguientes casos: alcoholes de orujo, residuos de vinificación, mieles y melazas de caña de azúcar y remolacha (cuya graduación no exceda de 0,75 centesimales) para la elaboración de aguardiente y ron, fermentados procedentes de la manzana para la elaboración de sidras.

En este último grupo se encuentran los sustratos empleados en este estudio.

El presente trabajo tiene como finalidad realizar un estudio comparativo de la producción de etanol por medio de la fermentación de los siguientes sustratos:

Jarabe salida evaporación: Se obtiene a partir de la remolacha azucarera, concentrando el jugo depurado hasta valores en torno al 70% de materias seca, mediante un proceso de evaporación para que de esta manera pueda ser cristalizado. Posee un elevado contenido en azúcar ya que nos encontramos en un paso previo a la cristalización (Gordo, 2003).

Licor C: Es la miel pobre que obtenemos después de la segunda cristalización, este licor todavía tiene azúcares cristalizables, que al turbinarse producirán azúcares amarillos, que una vez refundidos se volverían a mezclar con el jarabe para de esta manera continuar con el ciclo de fabricación (Figura 1).

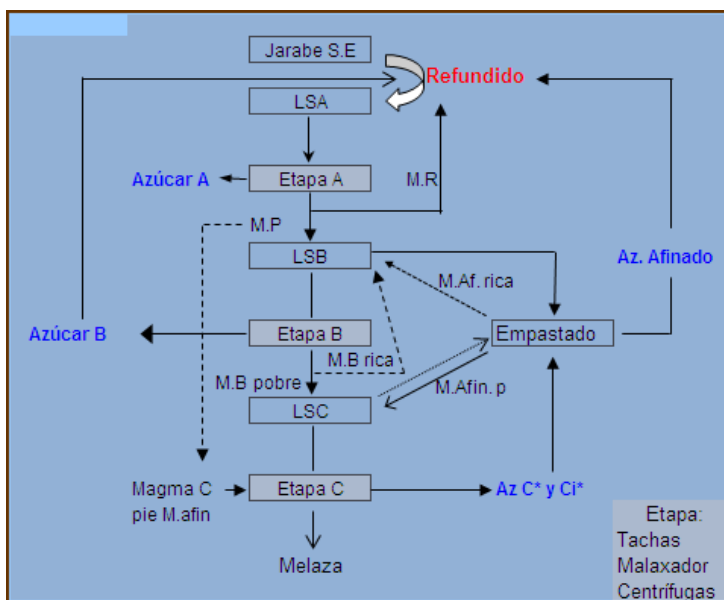


Figura 1: Diagrama proceso de Cristalización

Melazas: La melaza está formada por los no azúcares solubles y no eliminados durante el proceso y por la sacarosa difícilmente cristalizable causada por la presencia

de aquellos. Es un subproducto de las azucareras y forma parte de las materias primas para la elaboración de piensos animales y diferentes usos industriales (levaduras, alcohol, ácido cítrico, ácido glutámico).

La composición de la melaza es muy heterogénea y puede variar considerablemente dependiendo de la variedad de la remolacha, suelo, clima, periodo de cultivo, de la operación de la fábrica, sistema de ebullición del azúcar, tipo y capacidad de los evaporadores, entre otros. Pero las melazas se caracterizan por tener grados °Brix o sólidos disueltos entre 70 y 80 % un pH de 5.0 a 7,5.

-Sustratos procedentes de Desazucarado de melazas por cromatografía (MCD): Se ha utilizado la melaza empleada en este proceso (melaza de cromatografía), esta melaza la cual llamamos melaza de cromatografía, tiene un contenido más elevado de azúcares y muy bajo de acidez volátil, ya que solo se le ha sometido a dos procesos de cristalización. Mediante este proceso se consigue extraer hasta el 90 % del contenido de azúcar presente en dicha melaza, además se obtienen compuestos con un elevado valor como es la Betaina, sino no sería rentable este proceso.

La melaza una vez agotada, es decir, extraída la Betaina y el extracto azucarado pasa a denominarse rafinado (Figura 2), es un subproducto con un bajo contenido en azúcares fermentables, y una elevada acidez volátil, lo cual hace que este sustrato sea poco productivo en procesos de fermentación (Asadi, 2007).

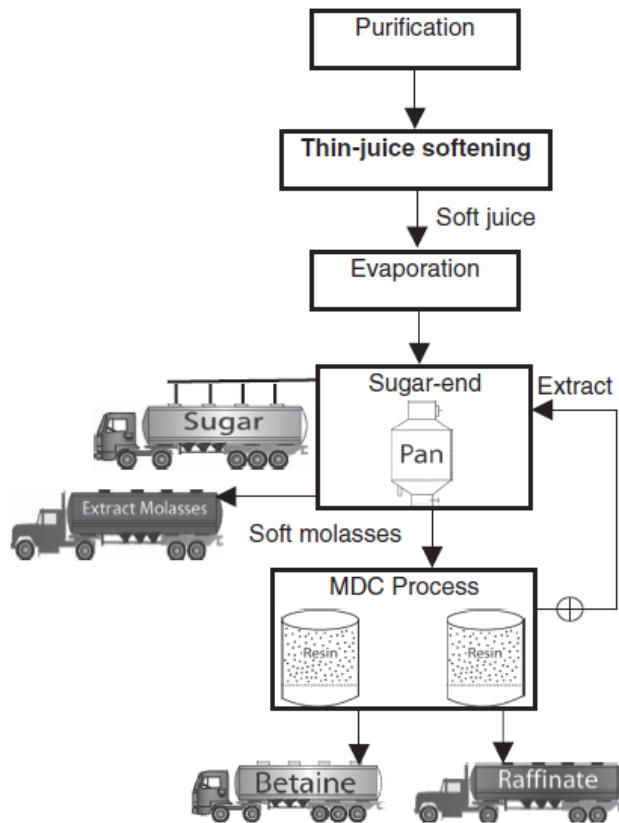


Figura 2: Diagrama Desazucarado de melazas por cromatografía (Asadi, 2007).

Levaduras

Las levaduras más utilizadas y estudiadas para la producción de alcohol, son *Saccharomyces cerevisiae* y *Cándida utilis* (Madigan, et al. 2003)

Las levaduras empleadas para llevar a cabo el proceso de fermentación alcohólica, requieren, que la glucosa sea catabolizada mediante la glucolisis o ruta de Embden-Meyerhof, para obtener el piruvato el cual posteriormente por la acción de enzimas específicas, se convierte anaeróticamente en etanol y dióxido de carbono. La glicolisis es una ruta catabólica en la cual la glucosa es convertida a dos moléculas de piruvato, las cuales dependiendo de las condiciones, pueden tomar rutas diferentes. Posteriormente el piruvato se descarboxila debido a la presencia de la enzima piruvato descarboxilasa que se encuentra en todos los organismos que metabolizan alcohol, para formar acetaldehído el cual se reduce a etanol por la presencia de NADH como agente reductor, a través de la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa, la cual está en todos los organismos capaces de dar lugar a la fermentación alcohólica. En las levaduras, la producción de etanol se realiza principalmente sobre sustratos sacarosados, jugos de remolacha, jarabe, aguas residuales o melaza de azúcar. Las

principales características que debe tener una cepa para la producción de alcohol industrial son:

- Capacidad de fermentar rápidamente el medio y producir etanol con un rendimiento próximo al rendimiento teórico.

- Pocos exigentes en factores de crecimiento, para evitar la adición de vitaminas a los medios industriales.

- Tener una buena tolerancia al etanol: Las levaduras deben presentar cierta resistencia a las concentraciones de alcohol que se producen durante la fermentación, debido a que el etanol, inhibe el transporte de D-xilosa, amonio, glicina y algunos aminoácidos, así como afecta la función y estabilidad de algunas enzimas citoplasmáticas como la hexoquinasa, debido a que a concentraciones críticas de etanol, se presenta la formación de un complejo hexoquinasa-etanol el cual puede detener la reacción glucosa a glucosa-6 fosfato. En conclusión la tolerancia al alcohol depende de la habilidad de la célula para exportar el etanol del interior al medio externo, un proceso que depende de la composición de la membrana y de la fluidez de la misma.

La célula modifica la composición en ácidos grasos de la membrana para minimizar los efectos de la fluidez que produce el etanol, de la misma manera la adaptación de las levaduras al etanol también obedece a una modificación de la composición lipídica de las membranas debido básicamente a un enriquecimiento de las mismas en esteroides y ácido grasos de cadena larga, de esta manera para las levaduras poder adaptarse a altas concentraciones de alcohol debe existir un aumento del contenido de ácidos grasos insaturados con respecto a los saturados y un aumento en la longitud de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos (Tomasso, 2004).

- Buena producción de ésteres y glicerol.

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es el estudio de diferentes sustratos de la industria azucarera, igualmente también se pretende evaluar el efecto de diferentes pre-tratamientos y condiciones de operación como son la esterilización previa de los sustratos junto a inyección de aire y suplementación con extracto de levadura estableciendo las condiciones de operación más adecuadas para la obtención de etanol.

3. Material y Métodos

3.1 Materiales

Sustratos empleados

En este ensayo se han utilizado diferentes sustratos en el proceso de fermentación para la obtención de alcohol así como sus mezclas: Jarabe Salida Evaporación procedente de la fábrica de Miranda, campaña 2013, Licor C procedente de la fábrica de Guadalete campaña 2013, Refinado campaña 2011, Melazas procedentes de: Toro campaña 2013, La Bañeza campaña 2013, Miranda campaña 2013, Cromatografía campaña 2013 y Refinería: Procedente de la fábrica de Guadalete (Mezcla hasta diciembre campaña 2012).

Levaduras

Las levaduras utilizadas son levaduras de panadería frescas y prensadas. La composición de la levadura nos la proporciona el fabricante LESAFFRE, la podemos apreciar en la tabla 1.

Tabla 1: Composición levadura

| Composición de la levadura fresca | |
|--|--------|
| Agua | 70,0% |
| Materias nitrogenadas | 13,5% |
| Materias celulósicas | 1,5% |
| Azúcar | 12,0% |
| Materias minerales | 2,0% |
| Vitaminas | B,PP,E |

Extracto de Levadura

Se utilizo un extracto de levadura de la casa Panreac, cuya composición se encuentra recogida en la Tabla 2, estos datos son proporcionados por el fabricante.

Tabla 2: Características extracto de levaduras

| | |
|--------------------------------|------|
| pH solución al 2% | 6-8 |
| Perdida por desecación a 105°C | 10% |
| Residuo de calcinación | 16% |
| Nitrógeno total | >10% |

Equipos

Los experimentos se realizaron en 4 reactores de vidrio de 1 litro de capacidad, todos ellos encamisados, arriba con tapa de esmerilado SCHOTT- DURAN y un orificio NS29 y tubo de cierre de fermentación NS29 (Figura 1).

Los reactores estuvieron conectados a un baño termostático con bomba de circulación LAUDA RE 112. Durante el proceso se mantuvo siempre una agitación mediante un agitador magnético VARIO MAG, MAXI HP7P. La toma de datos se llevo a cabo en balanzas SARTORIUS BP 6100, el programa de tratamiento de datos es Sarto Connect, se tomo un dato cada 15 minutos.

La destilación del alcohol se llevo a cabo en equipo de destilación, que posee un sistema de condensación conectado a un baño termostático LAUDA RE 106 que trabajo a una temperatura de 5°C, para conseguir una mejor recuperación de las sustancias más volátiles.

La medida del % de etanol producido se midió con un alcoholómetro cuyo rango fue del 0-10 en % volumen con una precisión del 0,1%, para medidas a 20°C. En lugar de medir a esa temperatura se midió la temperatura y se corrigió mediante el uso de unas tablas.

El Ph metro empleado es de la marca Crison el modelo Ph 25.

La balanza que se utilizo fue PC2200 de la marca Mettler Toledo.



Figura 1: Equipo de fermentación

Para medir el Brix hemos empleado un refractómetro RE 50 de la marca Mettles Toledo.

El equipo HPLC utilizado es Agilent 1100 series, trabajo en régimen isocrático, el volumen de inyección fue de 20 µl. Para ácidos utilizamos como eluyente ácido ortofosforico, el flujo fue de 1 ml/min y una columna KC-811, su tamaño es de 300x8mm, la temperatura de la columna fue de 40°C y con un tamaño de partícula de 6µm. Para azúcares la fase móvil que se utilizó es una disolución de agua con calcio titriplex, el flujo fue de 0,5 ml/min y la columna empleada fue SUGAR-PAC I, su tamaño es de 300x6,5 mm y la temperatura de trabajo de la columna fue de 90°C.

3.2 Métodos

3.2.1 Proceso de Fermentación

Tratamiento previo de la melaza antes de la fermentación: Antes de realizar el proceso de fermentación alcohólica, es necesario someter la melaza a tratamientos previos para acondicionarla. En todos los casos se partió de una cantidad de melaza inicial de 100g a excepción del Jarabe salida evaporación que fue de 75g.

-Dilución. La altísima concentración de azúcares y sales presentes en las melazas impiden que los microorganismos puedan fermentarlas, debido a la gran presión osmótica que generan sobre sus paredes celulares; asimismo, las melazas son altamente viscosas, y su manipulación es difícil en estas condiciones. Se agregó agua, hasta obtener diluciones de 25 °Brix o menores; a valores mayores se tiene el riesgo de inicios lentos de fermentación y contaminación bacteriana (Garzón, et al. 2009).

-Acidez del sustrato. El pH del medio fue ajustado a 4.5, de forma que se fijó en el centro del rango óptimo de operación de las levaduras, que está entre 3.5 y 5.5. En el proceso de fermentación, el pH tendió a disminuir debido a la producción de ácidos, formados al tomar los nitrógenos de los aminoácidos perdiendo su carácter anfótero. El pH fue ajustado con una dilución 1:3 de ácido nítrico concentrado en agua.

La acidificación restringe el tipo de microorganismos a habitar en el caldo de cultivo, haciendo este rango mínimo y mejorando así la productividad.

Variables de estudio consideradas en el proceso:

-Esterilización y Aireación: Las melazas pueden contener microorganismos que pueden ser nocivos para la fermentación. El más común es la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, la cual polimeriza las moléculas de sacarosa en dextranos no fermentables (Garzón, S.C., et al., 2009). Para evitar esto se elevó la temperatura de la melaza hasta el punto de ebullición. Una vez alcanzado el punto de ebullición se aplicó aire a la muestra mediante un sistema que inyecta aire comprimido, durante un tiempo de 7 minutos. La finalidad fue reducir la acidez volátil de las muestras, el efecto de dicha acidez es negativo en la mayoría de los casos, aunque según algunos estudios el efecto del ácido láctico puede tener un efecto positivo durante la etapa de fermentación alcohólica (Sanchez Collazo, et al., 1995).

-Adición de nutrientes: En ocasiones es necesario añadir algunos elementos adicionales, con el fin de complementar los nutrientes necesarios para los microorganismos que realizarán la fermentación. El nitrógeno puede ser un nutriente limitante, por lo que fue necesario añadir algo de nitrógeno. En nuestro caso hemos utilizado extracto de levaduras, el cual se obtiene a partir de células de levadura autolisiadas y con un alto contenido de vitaminas del grupo B. Utilizamos una cantidad de 2,5 g añadidos al inicio de la fermentación.

Una vez diluida la muestra, ajustado el pH y realizado el proceso de aireación, o no, según sea necesario, se encendió el baño termostático fijando la temperatura a 30°C. Se tararon las balanzas antes de verter las muestras en cada uno de los fermentadores, junto con los agitadores magnéticos. En este momento es cuando añadimos tanto la levadura, como los nutrientes. Mientras se homogeneiza la muestra con la levadura mantenemos una agitación intensa 350 rpm bajándola cuando se cerró la tapa de los fermentadores a 150 rpm. A partir de este momento es cuando se inició el programa que realiza la toma de pesos de forma automática cada 15 minutos.

La duración de la fermentación viene determinada por el consumo de los azúcares presentes en la melaza, cuando las lecturas se estabilizan al cabo de 20- 30 horas es cuando se dará por finalizada la fermentación, como máximo hemos esperado 72 horas para que se complete el proceso, ya que no sería rentable económicamente tiempos superiores a este valor.

Parámetros a controlar durante el proceso de fermentación

-Temperatura. Debido a que la fermentación es un proceso exotérmico, se debe mantener en el mismo un control de temperatura para mantener la temperatura en su valor óptimo que es de 30 °C, dado el carácter mesófilo de las levaduras utilizadas.

-Acidez volátil orgánica: La acidez volátil se refiere principalmente a la presencia de ácido acético, ácido propiónico, ácido valérico, ácido isovalérico, ácido isobutírico y ácido butírico. Los ácidos son tóxicos para la levadura, disminuyen su actividad y pueden causar su muerte. Un alto contenido de estos ácidos incrementa el tiempo de fermentación, y genera subproductos por las reacciones colaterales con el azúcar, disminuyendo la eficiencia de la fermentación. Adicionalmente, el incremento en acidez volátil es un indicador de la presencia de bacterias en la fermentación.

-Contenido de Caramelos: Los caramelos se forman por la exposición de los azúcares, durante un tiempo prolongado, a altas temperaturas. Los caramelos colorean las mieles generando un color café oscuro. Se ha observado que altos contenidos de caramelos en las mieles pueden retardar al doble de tiempo la fermentación (Acevedo, et al. 2005).

-Contenido de bacterias: El contenido de bacterias se define como el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL. Comúnmente se pueden encontrar valores entre 1×10^2 UFC – 1×10^3 UFC cuando se inicia la fermentación. Por ser de un tamaño menor que el de la levadura, deben observarse al microscopio con un lente de orden de 100x. Las bacterias se reproducen más rápidamente que la levadura y compiten por el azúcar, causando disminución en el rendimiento del alcohol y generando subproductos indeseados.

-Relación carbono/Nitrógeno: El contenido de nitrógeno, al igual que el contenido de la fuente de energía o carbono, son de mucha importancia en la fermentación. El nitrógeno es necesario para la generación de proteínas constituyentes de las células, es decir de la levadura. Este nitrógeno es adicionado al medio de cultivo como urea cuando el etanol que se va a producir no es de consumo humano; de lo contrario, se recomienda utilizar Difosfato de Amonio (DAP) como fuente de nitrógeno.

Contenido celular: Cuando el reactor tiene un alto contenido celular, la fermentación se torna más eficiente, pues son más células trabajando para producir etanol. El contenido de células en un sistema sin recirculación debe ser del orden de 80×10^6 cel/ml a 100×10^6 cel/ml (células por mililitro). En sistemas con recirculación debe ser

del orden de 350×10^6 cel/ml para incrementar la productividad de la fermentación, es decir, se disminuye el tiempo de fermentación.

-Agitación en el fermentador: Por medio de agitadores se mejora la transferencia de nutrientes entre el medio y la levadura homogenizando el medio en los fermentadores. El CO₂ que se genera en la fermentación también ayuda a la agitación de la mezcla y a mantener las partículas en suspensión (Acevedo, et al. 2005).

-Materias primas: El etanol puede obtenerse a partir de cualquier azúcar ó polisacáridos. Si utilizamos fuentes con alto contenido de azúcares. Como lo son azúcar de caña, remolacha, melazas y jugos de fruta. Son materias primas que poseen un alto contenido de azúcares simples y fermentables, como la glucosa, la fructosa, la galactosa y la sacarosa, entre otros. La ventaja de utilizar este tipo de fuentes consiste en que no es necesario realizar tratamientos previos para obtener los azúcares fermentables, puesto que estos ya se encuentran presentes.

3.2.2 Proceso de destilación

Cuando las lecturas se estabilizan transcurridas entre 20-40 horas, la fermentación se dará por finalizada.

Se apago el baño y se recogió la muestra en matraces de 500 ml. Para su destilación, se utilizaron matraces esféricos de 1 L, en los cuales se añadió la muestra, 300 ml de agua destilada y 2 ml NaOH al 30%.

Durante el proceso de destilación se mantuvo constante una temperatura de 5 °C.

Se recogen 400ml de destilado en un Erlenmeyer de 500 ml y enrasar con agua destilada. Se atempero a 20°C utilizando el baño termostático, antes de medir se homogeneizó bien la muestra y se midió el grado alcohólico con un alcoholómetro.

3.3 Cálculo de la capacidad fermentativa de los sustratos

Los valores que se emplean para comprobar la capacidad fermentativa de cada uno de los sustratos son los litros de etanol producidos por cada 100 Kg de jugo y el rendimiento en litros de etanol por cada Kg de sacarosa.

-Para calcular los litros de etanol en cada 100 Kg de jugo utilizamos la siguiente expresión:

$$L \text{ etanol}/100 \text{ Kg} = \text{°G alcohólico (\% vol)} * \text{---}$$

Donde V1 es el volumen final de la destilación (g) y V2 el volumen de melaza inicial (g).

-El rendimiento en litros de etanol por cada kg de sacarosa lo obtenemos mediante la siguiente expresión:

$$\text{Rendimiento V- etanol \% sacarosa} = \text{-----}$$

Donde V es el grado alcohólico del destilado a 20°C (%Vol) y % Az fermentables: expresados como sacarosa (%).

-El tiempo de fermentación

Consideramos el fin de fermentación cuando la variación de peso es inferior a 0,5 g en una hora.

4. Resultados y Discusión

Resultados de composición de los diferentes sustratos utilizados:

Tabla 3: Composición diferentes sustratos (HPLC)

| Muestra | °Brix | AZUCARES | | | | | | ACIDOS | | | | |
|------------------|-------|----------|----------|---------|----------|-----------|---------|-------------|-------------|-------------|----------------|--------------|
| | | Rafinosa | Sacarosa | Glucosa | Fructosa | Glutamina | Betaina | Ac. Láctico | Ac. Fórmico | Ac. Acético | Ac. Propionico | Ac. Butírico |
| | | % | | | | | | mg/kg | | | | |
| M. Toro | 77 | 2.16 | 42.07 | 0.454 | 0.892 | 0.005 | 5.74 | 25398 | 4450 | 6023 | 21168 | 641 |
| Licor C | 67 | 2.292 | 48.615 | 1.12 | 0.702 | - | - | 14616 | 5896 | 4980 | 364 | 325 |
| Rafinado | 67 | 4.256 | 11.4 | 0.023 | 0.008 | - | - | 56216 | 6938 | 23135 | 48758 | 2215 |
| M. Refinería | 73 | 3.599 | 39.613 | 0.397 | 0.218 | - | - | 31260 | 12040 | 7960 | 311 | 359 |
| M. Miranda | 72 | 1.659 | 42.145 | 0.076 | 0.179 | 0.057 | 5.888 | 25753 | 4614 | 6279 | 22555 | 510 |
| M. Cromatografía | 74 | 3.1 | 46.156 | 0.056 | - | 0.495 | 3.556 | 3738 | 1115 | 2498 | 4268 | 174 |
| JSE | 66 | 0.541 | 56.156 | 0.583 | 0.563 | - | - | 3281 | 500 | 1002 | 3228 | 1213 |
| M. Bañeza | 77 | 2.088 | 48.493 | 0.153 | 0.41 | 0.122 | 7.081 | 19909 | 3694 | 6410 | 39555 | 811 |

Los datos de la composición de cada uno de los sustratos los hemos obtenido mediante HPLC, se encuentran recogidos en la tabla 3 del presente estudio. Todos los sustratos tienen un contenido de azúcares fermentables bueno, destacando el Jarabe salida evaporación 56,1%, en contraposición nos encontramos el refinato que tiene un 11,4%.

Con respecto al contenido de ácidos de los sustratos los que tienen menor acidez (inhibición de la fermentación) son el Jarabe salida evaporación y la melaza cromatografía. El resto tienen unos valores muy similares a excepción del refinato que tiene una elevada acidez volátil, esto será un problema en el proceso de fermentación. Uno de los ácidos con una mayor influencia negativa en el proceso de fermentación es el ácido butírico, el mayor valor de este ácido nos lo encontramos en el Refinato.

4.1 Estudio de la capacidad fermentativa

En las siguientes Figuras (Figuras 4-11) se representa la pérdida de peso que se produce durante la fermentación al degradarse los azúcares y producirse etanol, con respecto al tiempo.

Las gráficas se han realizado mediante un programa automático que recoge los pesos de cada una de las balanzas cada 15 minutos.

Licor C

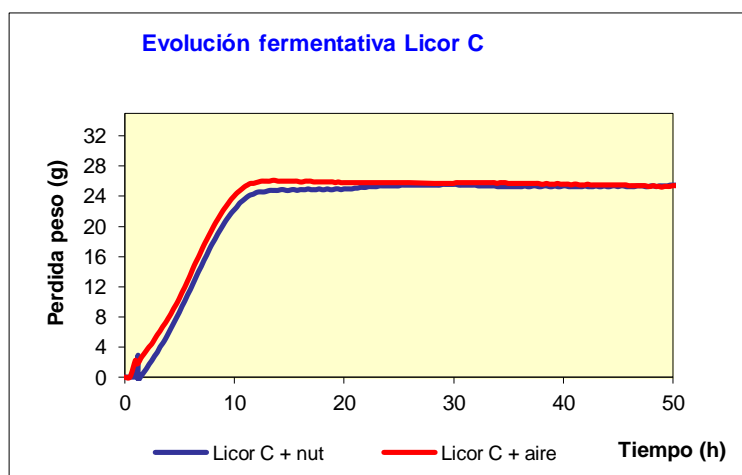


Figura 4: Fermentación Licor C

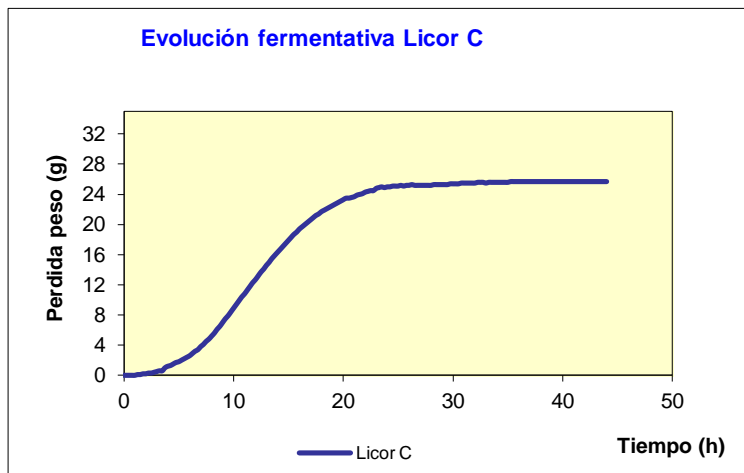


Figura 5: Fermentación Licor C

Tabla 4: Evolución fermentación Licor C.

| | Tiempo (h) | Peso máx. perdido | Grado obtenido (°GL) | L. etanol / 100 kg jugo | Rendimiento L Etanol/ Kg Sacarosa |
|----------------------|------------|-------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| Licor C | 20 | 26,1 | 6,00 | 30,00 | 0.62 |
| Licor C (nutrientes) | 12,50 | 25,7 | 6,50 | 32,50 | 0.67 |
| Licor C (aireación) | 12,50 | 26,3 | 6,80 | 34,00 | 0.69 |

Como se puede apreciar en las figuras 5 y 6 la fermentación ha sido muy rápida en todos los casos, siendo más eficiente cuando añadimos nutrientes o aireamos, en estos casos la fermentación comienza prácticamente desde el momento de la inoculación de las levaduras como se observa en la grafica se produce pérdida de peso desde prácticamente tiempo cero.

En la tabla 4 observamos que la producción de alcohol ha sido elevada obteniéndose rendimientos superiores a 0,6, cabe destacar la disminución de tiempo de fermentación de un 62% que se produce cuando añadimos nutrientes o aireamos

Jarabe salida evaporación

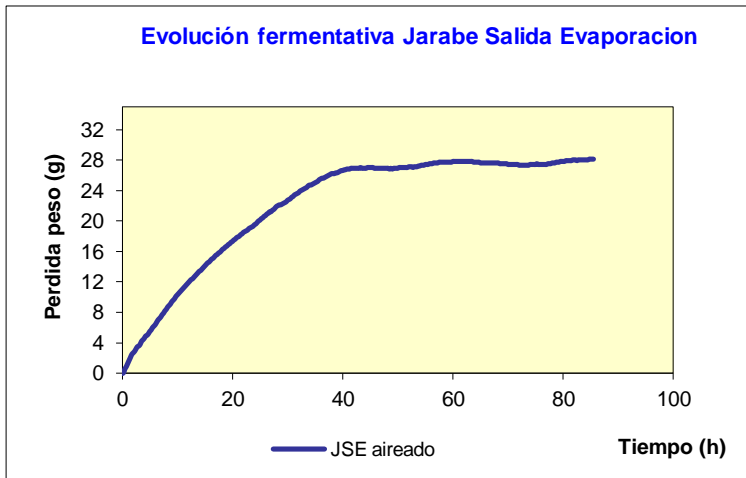


Figura 6: Fermentación Jarabe salida evaporación

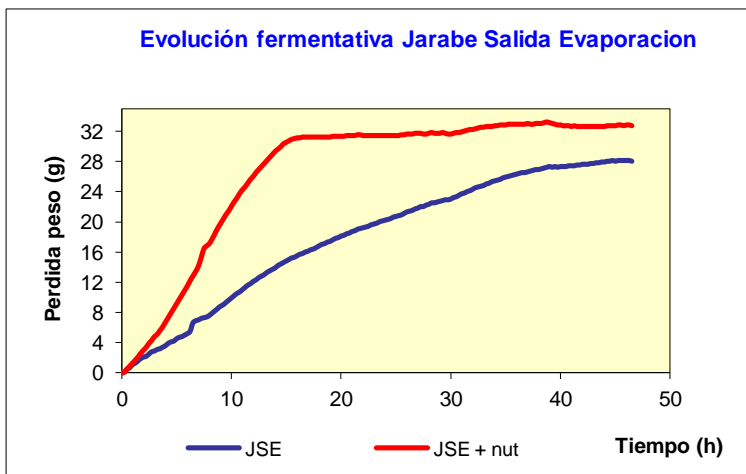


Figura 7: Fermentación Jarabe salida evaporación

Tabla5: Resultado fermentación Jarabe salida evaporación

| | Tiempo (h) | Peso máx. perdido | Grado obtenido (°GL) | L. etanol / 100 kg jugo | Rendimiento L Etanol/ Kg Sacarosa |
|------------------|------------|-------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| JSE | 45,00 | 28.1 | 6,50 | 43,20 | 0.64 |
| JSE (nutrientes) | 17,00 | 33.2 | 6,50 | 43,20 | 0.64 |
| JSE (aireación) | 38,00 | 29.2 | 6,50 | 43,20 | 0.64 |

El jarabe salida evaporación ha dado muy buenos resultados Figuras 6 y 7, es el único sustrato en el cual partimos de 75 g de producto inicial, no de 100g. Se obtienen fermentaciones rápidas, hay que destacar principalmente el caso en el que añadimos nutrientes.

Los rendimientos de fermentación obtenidos son superiores a 0,6 como se aprecia en la Tabla 5, solo se producen modificaciones en el tiempo de fermentación ya que el grado alcohólico obtenido se mantiene constante.

Melaza Miranda

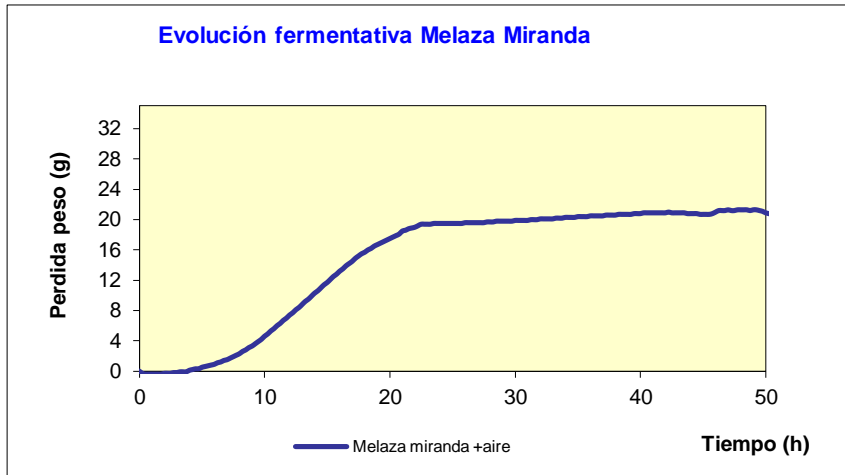


Figura 8: Fermentación melaza Miranda

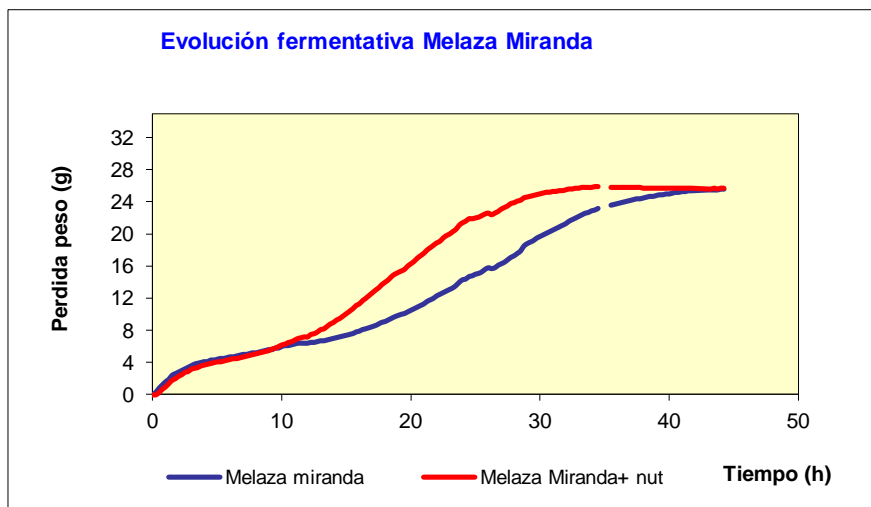


Figura 9: Fermentación melaza Miranda

Tabla 6: Resultado fermentación melaza Miranda

| | Tiempo (h) | Peso máx. perdido | Grado obtenido (°GL) | L. etanol / 100 kg jugo | Rendimiento L Etanol/ Kg Sacarosa |
|-------------------------|------------|-------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| M. Miranda | 35,00 | 25,6 | 4,30 | 21,50 | 0.51 |
| M. Miranda (nutrientes) | 25,00 | 25,9 | 4,90 | 24,50 | 0.58 |
| M. Miranda (aireación) | 20,00 | 25,9 | 4,80 | 24,00 | 0.57 |

Esta melaza ha sido una de las que mejores resultados hemos obtenido Figuras 8-9, con una buena producción de alcohol pero con unos tiempos de fermentación un poco largos en torno a las 20-30 horas, su rendimiento ligeramente inferior a 0.6 (Tabla 6)

Melaza de Refinería

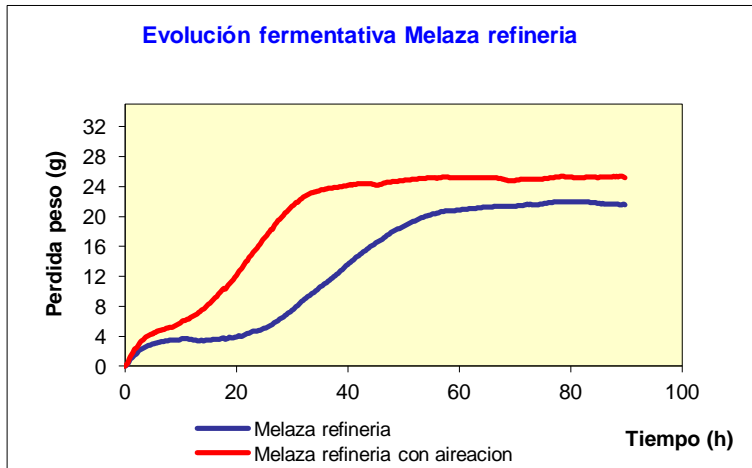


Figura 10: Fermentación melaza refinera

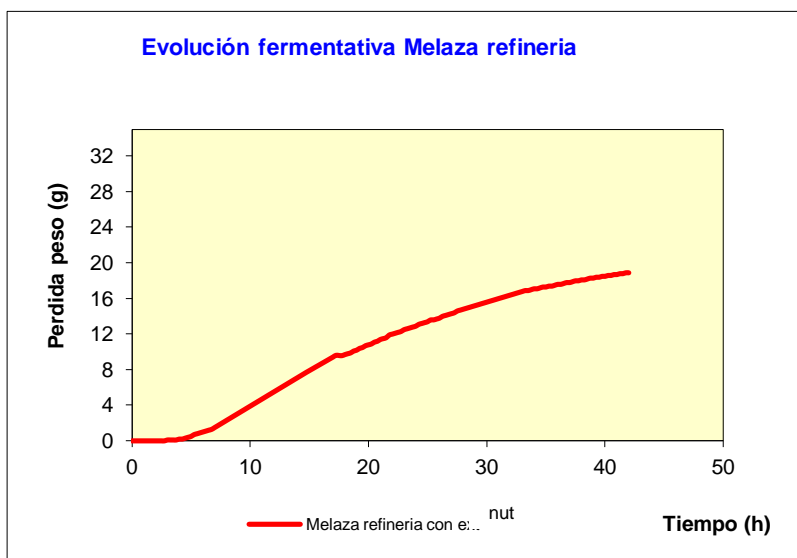


Figura 11: Fermentación melaza refinera

Tabla 7: Resultado fermentación melaza refinera

| | Tiempo (h) | Peso máx. perdido | Grado obtenido (°GL) | L. etanol / 100 kg jugo | Rendimiento L Etanol/ Kg Sacarosa |
|--------------------------|------------|-------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| M. refinera | 50,00 | 22,0 | 4,70 | 23,50 | 0,59 |
| M. refinera (nutrientes) | 40,00 | 25,4 | 4,35 | 21,75 | 0,55 |
| M. refinera (aireación) | 30,00 | 25,4 | 4,90 | 24,50 | 0,61 |

Los resultados obtenidos para esta melaza son muy positivos, es uno de los sustratos que más nos interesaba aprovechar. Los tiempos de fermentación no son exageradamente largos mejorando con la adición de nutrientes y levaduras (Figuras 10 y 11).

Los rendimientos de fermentación son muy buenos en torno a 0.6 Tabla 7.

Melaza de la Bañeza

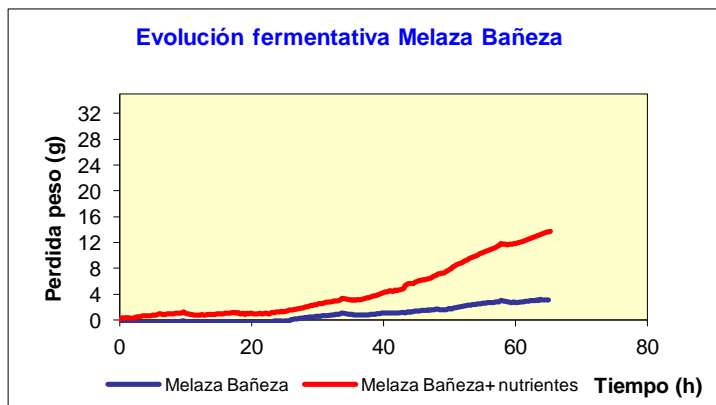


Figura 12: Fermentación melaza Bañeza

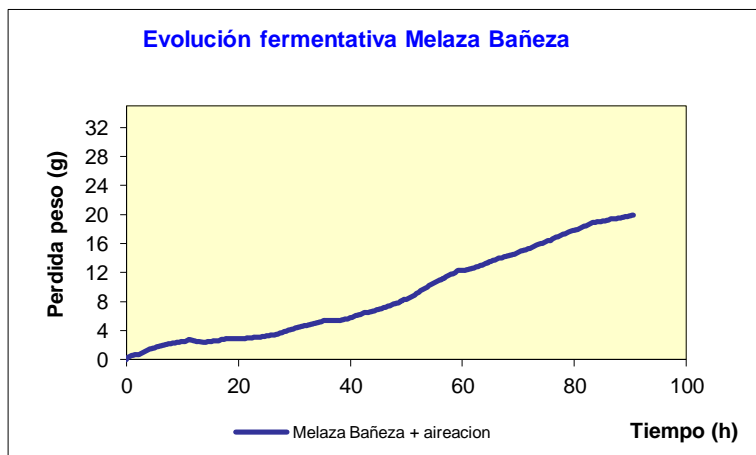


Figura 13: Fermentación melaza Bañeza

Tabla 8: Resultados fermentación melaza Bañeza

| | Tiempo (h) | Peso máx. perdido | Grado obtenido (°GL) | L. etanol / 100 kg jugo | Rendimiento L Etanol/ Kg Sacarosa |
|------------------------|------------|-------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| M. Bañeza | 60,00 | 3,2 | 1,00 | 5,00 | 0.10 |
| M. Bañeza (nutrientes) | 65,00 | 13,7 | 3,40 | 17,00 | 0.35 |
| M. Bañeza (aireación) | 80,00 | 13,7 | 4,10 | 20,50 | 0.43 |

Los resultados obtenidos de la melaza de la Bañeza han sido malos, es la peor de todas las melazas como se puede apreciar en las Figuras 12 y 13. Tiene unos rendimientos muy bajos (Tabla 8), era la melaza con mayor contenido de azúcares fermentables por lo que su bajo rendimiento puede ser debido a la presencia de inhibidores que no han sido analizados en este estudio

Melaza de Toro

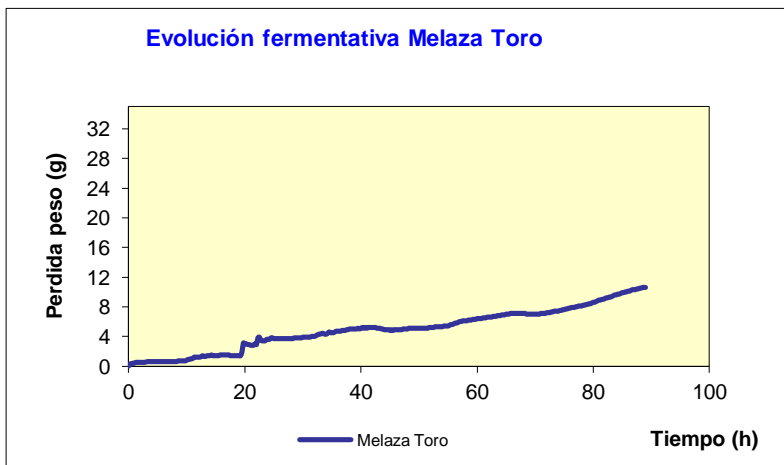


Figura 14: Fermentación melaza Toro

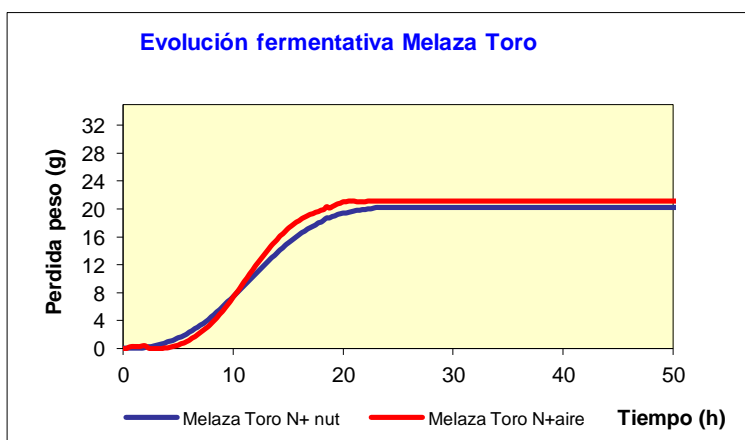


Figura 15: Fermentación melaza Toro

Tabla 9: Resultados fermentación melaza Toro

| | Tiempo (h) | Peso máx. perdido | Grado obtenido (°GL) | L. etanol / 100 kg jugo | Rendimiento L Etanol/ Kg Sacarosa |
|----------------------|------------|-------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| M. Toro | 60,00 | 10,6 | 2,00 | 10,00 | 0.24 |
| M. Toro (nutrientes) | 18,50 | 21,1 | 4,60 | 23,00 | 0.54 |
| M. Toro (aireación) | 17,50 | 21,4 | 4,90 | 24,50 | 0.58 |

Se han obtenido buenos resultados cuando añadimos nutrientes o aireamos Figura 15, la melaza sola tarda mucho en fermentar y lo hace con poca intensidad Figura 14. Esto puede ser debido a escasez de compuestos nitrogenados (solucionado por la adicción de extracto de levadura), o a una excesiva acidez volátil (solucionado por aireación).

Por ello los rendimientos son muy buenos con nutrientes y aireación en torno a 0.55 y malos cuando fermenta sola la melaza 0.24 (Tabla 9).

Rafinado

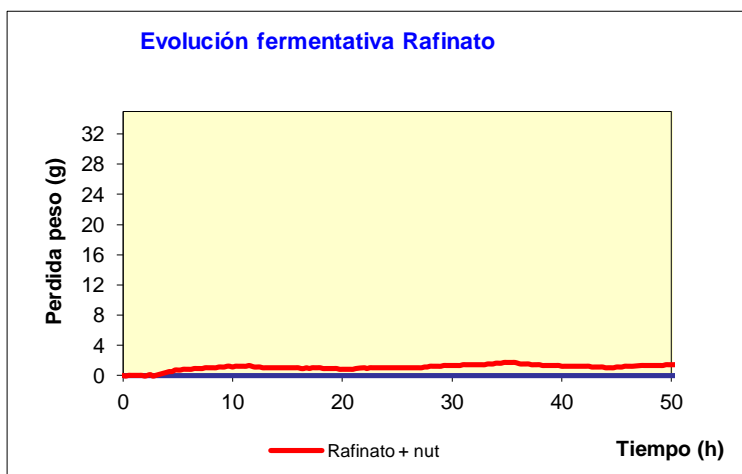


Figura 16: Fermentación Rafinado

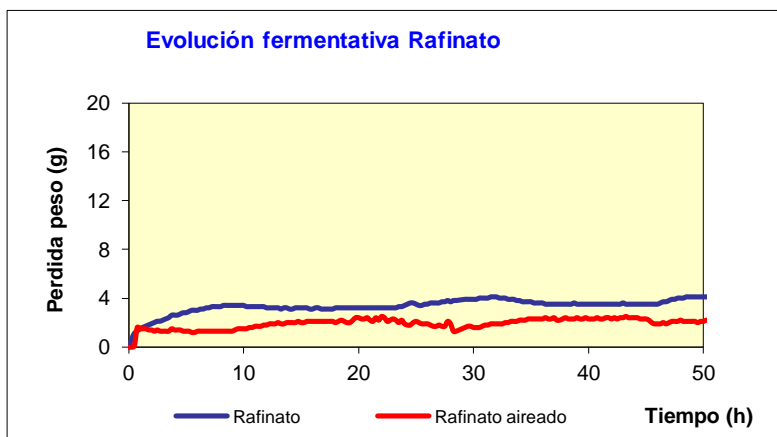


Figura 17: Fermentación Rafinado

Tabla 10: Resultados fermentación Rafinato

| | Tiempo (h) | Peso máx. perdido | Grado obtenido (°GL) | L. etanol / 100 kg jugo | Rendimiento L Etanol/ Kg Sacarosa |
|-----------------------|------------|-------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| Rafinato | 60,00 | 4,4 | 0,40 | 2,00 | 0.175 |
| Rafinato (nutrientes) | 60,00 | 2,1 | 0,60 | 3,00 | 0.26 |
| Rafinato (aireación) | 60,00 | 2,5 | 0,80 | 4,00 | 0.34 |

Los resultados son muy negativos, era de esperar ya que su contenido en azúcares fermentables es muy bajo y su acidez muy elevada. Era uno de los sustratos para los que se pretendía buscar un aprovechamiento. En las figuras 16 y 17 vemos que apenas se produce fermentación,

Su rendimiento se encuentra en torno a 0.2 y no se producen variaciones en el tiempo de fermentación.

Melaza de Cromatografía

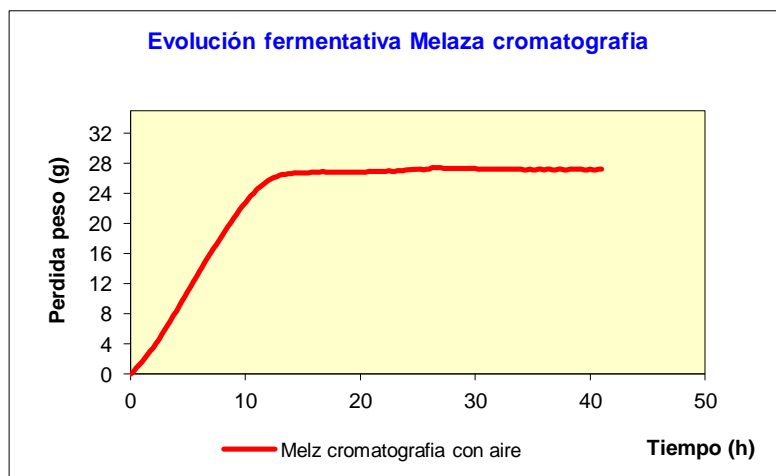


Figura 18: Fermentación melaza cromatografía

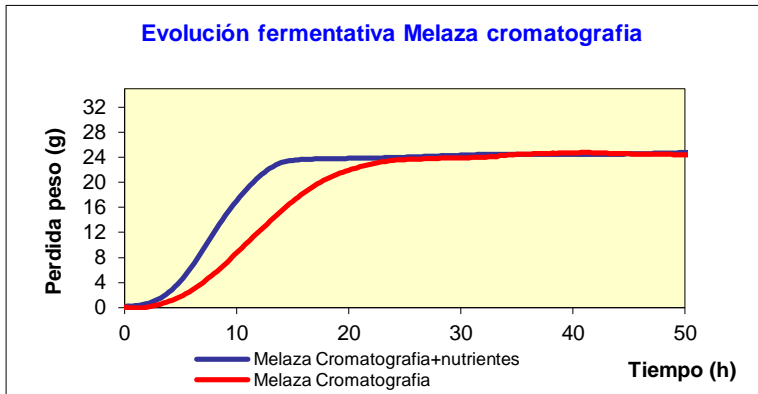


Figura 19: Fermentación melaza cromatografía

Tabla 11: Resultados fermentación melaza cromatografía

| | Tiempo (h) | Peso máx. perdido | Grado obtenido (°GL) | L. etanol / 100 kg jugo | Rendimiento L Etanol/ Kg Sacarosa |
|-------------------------------|------------|-------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| M. cromatografía | 20,00 | 25,2 | 5,10 | 25,50 | 0.55 |
| M. cromatografía (nutrientes) | 12,00 | 25,5 | 5,50 | 27,50 | 0.60 |
| M. cromatografía (aireación) | 12,00 | 25,5 | 5,75 | 28,75 | 0.62 |

Esta melaza es la que nos ha dado los mejores resultados como podemos apreciar en las graficas de las figuras 18 y 19. Los tiempos de fermentación son muy bajos obteniéndose muy buenos rendimientos de alcohol en torno a 0,6 (Tabla 11).

Discusión de los resultados

En la presente investigación buscamos el óptimo en la producción de etanol a partir de diferentes productos o subproductos de una azucarera.

Una vez concluidas todas las pruebas, apreciamos que los resultados obtenidos han sido muy positivos para el Licor C y el Jarabe Salida Evaporación en los cuales se ha obtenido un grado alcohólico en torno 5-6°, el tiempo de fermentación ha sido bajo y el rendimiento obtenido está por encima de los 40 Kg etanol cada 100 de jugo. Esto es debido a que contienen un alto contenido en azúcares y baja acidez, es lo normal ya que ambos son un producto intermedio en el proceso de obtención del azúcar (Tabla 3).

Como se puede apreciar en los resultados presentados anteriormente, la melaza con mejores resultados ha sido la Melaza de Cromatografía, mediante la cual obtenemos valores superiores al 5 % de etanol en cortos periodos de tiempo. Ello se debe a que es una melaza con alto contenido de azúcares fermentables y una baja acidez volátil,

como puede observarse en la tabla 4. Su rendimiento es de 27,5 kg de etanol por cada 100 kg de jugo.

Luego nos encontramos otro grupo de melazas con características similares en cuanto a polarización y acidez volátil (Melazas de Toro, Bañeza, Miranda y Refinería). A pesar de ello se han obtenido resultados significativamente mejores, de hasta un 4 % de alcohol, en las melazas procedentes de Miranda, y de la Refinería. Con los datos de los que disponemos, no podemos concluir cual es la causa de dicha diferencia, probablemente sea debido a la presencia de algún inhibidor que no hemos tenido en cuenta a la hora de la realización de los análisis.

Con el refinato los resultados obtenidos han sido muy desalentadores, teniendo en cuenta que era uno de los sustratos que más interés despertaba en el presente estudio. Apenas podemos considerar que se haya producido fermentación, se han conseguido valores inferiores a 0,5° de alcohol. El refinato es un subproducto de la desazucarización de melazas mediante cromatografía (MDM), por lo que es un sustrato con muy poco contenido en azúcares y gran cantidad de residuos que elevan su acidez excesivamente, intentaremos combinarlo con otros sustratos para mejorar sus rendimientos.

No se ha encontrado correlación entre el valor de ácido láctico presente en cada uno de los sustratos y su incidencia en la fermentación, según estudios (Sánchez Collazo, et al., 1995) la presencia de este ácido sería favorable.

La operación en discontinuo a escala laboratorio se utiliza para obtener los coeficientes estequiométricos y cinéticos, si la operación se realizase en continuo sería más eficiente ya que va llegando sustrato fresco con el caudal de entrada y se va retirando sustrato agotado.

Con respecto a las variables de estudio (aireación y adicción de nutrientes), hemos observado una clara mejora en ambos casos. En la mayoría de las ocasiones la mejora de los rendimientos ha sido más significativa cuando aplicábamos aireación, pero debido al coste elevado de este tratamiento, en la mezcla de sustratos hemos utilizado la adicción de nutrientes solamente.

Mezcla de sustratos

También se han realizado mezclas de diferentes melazas en el presente estudio, con las combinaciones que realizamos siempre intentamos mezclar un sustrato con el cual

se hayan obtenido buenos resultados con aquellos con los que los resultados han sido peores. Intentando conseguir mediante mezclas aumentar la producción de etanol y disminuir los tiempos de fermentación.

En los 3 casos de mezclas estudiadas, han sido, solas y con adicción de extracto de levaduras, ya que el empleo de aireación requiere un aporte energético elevado, disminuyendo su rentabilidad. (Tabla 12).

Tabla 12: Resultado mezcla de melazas

| Sustrato | Proporción (%) | Adicción de nutrientes | pH inicial | °GL | T (h) |
|--------------------------------|----------------|------------------------|------------|-------------|-------------|
| M. Cromatografía+ M. Refinería | 95-5 | 0 | 8,94 | 5,3 | 20 |
| | 95-5 | 1 | 8,88 | 5,7 | 12,5 |
| | 90-10 | 0 | 8,9 | 5,2 | 20 |
| | 90-10 | 1 | 8,87 | 5,6 | 12,5 |
| | 85-15 | 0 | 8,81 | 5,4 | 20 |
| | 85-15 | 1 | 8,87 | 5,85 | 11 |
| | 80-20 | 0 | 8,86 | 5,2 | 25 |
| | 80-20 | 1 | 8,88 | 5,4 | 15 |
| | 75-25 | 0 | 8,7 | 5,2 | 25 |
| | 75-25 | 1 | 8,75 | 5,4 | 15 |
| M. Cromatografía+ Rafinato | 95-5 | 0 | 9,01 | 5,4 | 20 |
| | 95-5 | 1 | 9 | 5,4 | 10 |
| | 90-10 | 0 | 8,99 | 4,6 | 20 |
| | 90-10 | 1 | 8,96 | 5 | 18 |
| | 85-15 | 0 | 8,95 | 4,75 | 30 |
| | 85-15 | 1 | 8,98 | 4,85 | 18 |
| | 80-20 | 0 | 8,9 | 4 | 35 |
| | 80-20 | 1 | 8,9 | 4,3 | 22 |
| | 75-25 | 0 | 8,86 | 3,9 | 35 |
| | 75-25 | 1 | 8,84 | 4,45 | 30 |
| M. Miranda+ M. Refinería | 95-5 | 0 | 7,25 | 5,1 | 22 |
| | 95-5 | 1 | 7,22 | 4,9 | 15 |
| | 90-10 | 0 | 7,28 | 5 | 30 |
| | 90-10 | 1 | 7,26 | 4,9 | 17 |
| | 85-15 | 0 | 7,32 | 4,9 | 22 |
| | 85-15 | 1 | 7,31 | 4,9 | 17 |
| | 80-20 | 0 | 7,37 | 4,8 | 25 |
| | 80-20 | 1 | 7,36 | 4,8 | 16 |
| | 75-25 | 0 | 7,49 | 4,9 | 30 |
| | 75-25 | 1 | 7,47 | 4,9 | 17 |

En función de los resultados anteriores y como se ha dicho anteriormente uno de los fines principales de este estudio es el aprovechamiento de la melaza de refinería y el refinato, por ello las mezclas elegidas han sido las siguientes:

-Melaza Cromatografía + Melaza de Refinería: En este caso el valor óptimo se ha alcanzado cuando mezclamos 85% de Melaza de cromatografía + 15% Melaza de Refinería, tanto el tiempo de fermentación como el etanol producido son muy interesantes (11 horas y 5,88° Etanol).

-Melaza Cromatografía + Rafinato: En este caso como era de esperar, el proceso sería menos eficiente cuando añadiésemos refinato debido a su bajo contenido en azúcares fermentables y su elevada acidez, por tanto consideramos el óptimo cuando solamente añadimos un 5% de refinato, ya que perjudica la fermentación en cuanto lo añadimos.

-Melaza Miranda + Melaza Refinería: Se han obtenido resultados muy positivos para esta mezcla, apenas han empeorado los resultados a medida que añadimos la melaza de la refinería, como nuestra intención es aprovechar al máximo esta melaza el óptimo sería en el que mayor contenido utilizamos el 25%.

5. Conclusiones

Como resultado de la realización de este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

Los valores obtenidos de producción de etanol son considerados aceptables para la mayoría de los sustratos, destacándose la mejora de los rendimientos tras la adición de nutrientes (aporte de Nitrógeno, que es un factor limitante) o aireación (disminución de la acidez volátil), consiguiéndose reducciones de hasta el 70% en el tiempo de fermentación con estos tratamientos.

Se ha establecido, por lo tanto, la conveniencia de la adición de nutrientes en el proceso fermentativo. La esterilización y aireación, a pesar de su demostrada efectividad, podría ser descartable por tener una dudosa viabilidad económica. Quedaría pendiente el cálculo de los costes asociados antes de su recomendación.

Los sustratos con mejores rendimientos han sido aquellos con un mayor contenido de azúcares fermentables, como son la melaza de cromatografía y el Jarabe salida evaporación.

Los resultados son muy positivos en el caso del aprovechamiento de la melaza de refinería, y negativos en el caso del refinato (esperable debido a sus características).

Las líneas de investigación a seguir podrían ir orientadas a disminuir la acidez, mediante técnicas cuyo coste sea menor que la aireación, para poder mejorar los rendimientos durante la fermentación, una posibilidad podría ser la aplicación de una corrección química, mediante el empleo de Carbonato Cálcico.

6. Bibliografía

- Acevedo, A., Llano, F., Ochoa, J.C., Parra, J.A., Caballero, M.R., Figueroa, M., Marriaga, N., Vallejo, R., Salazar, S., (2005) Producción de alcohol carburante: Informe Técnico.
- Acevedo, A., Godoy, R., Bolaños, G., (2003). Incremento de la producción de alcohol en fermentación de melazas mediante la utilización del complejo enzimático Rhyzozyme. Congreso Colombiano de Ingeniería Química.
- Asadi, M., (2007) Beet –Sugar Handbook. Ed. Jhon Wiley & sons, Inc. New Jersey
- Cachot, T., & Pons, M. (1991). Improvement of alcoholic fermentation on cane and beet molasses by supplementation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71(1), 24-27.
- El-Diwany, A. I., El-Abyad, M. S., El-Refai, A. H., Sallam, L. A., & Allam, R. F. (1992). Effect of some fermentation parameters on ethanol production from beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae* Y-7. *Bioresource technology*, 42(3), 191-195.
- Ergun, M., & Ferda Mutlu, S. (2000). Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource technology*, 73(3), 251-255.
- Fajardo, C., Erika, E., Sarmiento, F., Sandra, C. (2008). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. Facultad de ciencias Básicas. Microbiología Industrial. Bogotá.
- Garzón Castaño, S. C., Hernandez Lodoño, C., (2009). ESTUDIO COMPARATIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL ENTRE *Saccharomyces cerevisiae* silvestre,

Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 Y *Cándida utilis* ATCC 9950. Universidad Tecnológica de Pereira.

-Gordo Ingelmo, L.F. (2003). La Calidad Tecnológica de la Remolacha Azucarera. Valladolid: EDITO artes graficas.

- Jiménez, A. M., Borja, R., & Martín, A. (2003). Aerobic–anaerobic biodegradation of beet molasses alcoholic fermentation waste water. *Process Biochemistry*, 38(9), 1275-1284.

-Madigan T., Michael, Martinko M., Jhon, Parker, Jack. (2003) Brock Biología de los microorganismos. Pearson Prentice Hall. Décima edición. p: 957-985.

-Mancheno Gnecco, J. (2004). El precio de la melaza continua creciendo. Nota técnica Sucromiles S.A.

-Palacio Llames, H., (1956). Fabricación del alcohol. Salvat Editores, S.A. Madrid.

-Sanchez Collazo, O., Lara, A., Mejías, M., Martínez, J.L. (1995). Estudio de la influencia de ácidos orgánicos en la fermentación alcohólica. Facultad de Ingeniería Química ISPJAE.

-Tomasso, M., (2004). Tolerancia de las levaduras al etanol. Universidad de la República Uruguay. Facultad de Química.

-Van der Poel, P. W., Schiweck, H., Schwartz, T., (1998) Sugar Technology Beet and Cane Sugar Manufacture. Ed. Bartens, Verlag, Berlin.