

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**UNIDAD REGIONAL NORTE**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
Y AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE TRES CEPAS DE LEVADURA EN LA  
PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE  
MELAZA DE CAÑA

Que para obtener el título de  
QUÍMICO BIÓLOGO  
Especialidad Análisis Clínicos

Presenta

Iván Edgardo De La Vara Morales

H. CABORCA SONORA

MAYO DE 2014

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos  
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de **Iván Edgardo De La Vara Morales**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de Químico Biólogo Clínico.

---

M.C. Ramón Efraín Lugo Sepúlveda  
Presidente

---

Dr. Jesús Ortega García  
Secretario

---

Q.B. Luis Arturo Ortega García  
Vocal

---

M.C. Eligio Espinoza Ojeda  
Asesor externo

## CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABLAS	2
ABREVIATURAS	3
OBJETIVOS	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
1. ANTECEDENTES	9
1.1. Producción de etanol en México	9
1.2. Fermentación alcohólica	10
1.3. Condiciones a medir y controlar en una fermentación alcohólica	14
1.4. Limitantes de la fermentación alcohólica	16
1.5. Microorganismos utilizados en la fermentación alcohólica	18
1.6. Producción de etanol a partir de melaza	19
1.7. Obtención de la melaza	19
1.8. Composición química de la melaza	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.1. Material biológico	24

2.2. Materia prima	25
2.3. Procedimiento de la fermentación alcohólica	26
2.4. Determinación de azúcares reductores	28
2.5. Determinación alcoholimétrica (grados Gay-Lussac)	30
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
3.1. Azúcares reductores totales (ART)	33
3.2. Temperatura y tiempo de fermentación	33
3.3. Sólidos residuales reductores (SR)	36
3.4. Grados Gay-Lussac (°GL)	38
4. CONCLUSIONES	40
5. BIBLIOGRAFÍA	41
6. ANEXO 1	44
6.1. Determinación de azúcares reductores directos y totales	44
7. ANEXO 2	53
7.2. Ficha técnica levadura Etanol red	53
7.3 Ficha técnica levadura Safdistil plus	54
7.4 Ficha técnica levadura Ft-858	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Proceso general de fermentación alcohólica con levaduras.	11
2.	Reacción de conversión del Piruvato en etanol y dióxido de Carbono.	13
3.	Proceso general de obtención de azúcar y melaza.	20
4	Control de la temperatura en las fermentaciones de melaza diluida a 25°B mediante baño maría eléctrico.	27
5	Cambio de coloración en la reacción redox llevada a cabo en la cuantificación de azúcares reductores (AR) y sólidos residuales reductores (SR).	29
6	Alcoholímetros certificados Dujardin-Salleron con rango de 0-20°GL y 90-100°GL.	31
7	Destilación de melaza fermentada y obtención del °GL mediante densitometría.	32
8.	Tiempo de fermentación y porcentaje de sólidos consumidos por hora, en las levaduras comparadas en la melaza adquirida el 2012.	34
9.	Tiempo de fermentación y porcentaje de sólidos consumidos por hora, en las levaduras comparadas en la melaza adquirida el 2013.	32
10.	Porcentaje de sólidos residuales reductores (SR) levaduras, en fermentaciones en la melaza adquirida el año 2012, diluidas a 25°Brix con 126 g/L de AR.	37
11.	Porcentaje de sólidos residuales reductores (SR) de las tres levaduras, en fermentaciones de la melaza adquirida el año 2013, diluidas a 25°Brix con 159 g/L de AR.	37
12.	Grados alcohólicos (Gay-Lussac °GL) obtenidos en las tres levaduras a comparar en una temperatura de 32°C.	39

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Composición química de la melaza.	21
2.	Concentración azúcares reductores para 10 mL de soluciones de Fehling (Método volumétrico de Lane-Eynon) ( $\text{mg}/_{100\text{mL}}$ ).	46
3.	Cantidades recomendadas para la preparación de muestras, en la determinación de azúcares reductores directos (ARD) y azúcares reductores totales (ART).	48

## ABREVIATURAS

AR	Azúcares Reductores
ATP	Adenosin trifosfato
BAA	Bacterias ácido acéticas
DAP	Difosfato de amonio
NADH	Nicotinamina adenina dinucleótido
pH	Potencial de hidrógeno
SR	Sólidos residuales reductores
°B	Grados Brix (porcentaje de sólidos disueltos)
°GL	Grados Gay-Lussac (grado alcohólico)



## **OBJETIVOS**

### **General**

Estudiar el comportamiento de 3 cepas de levaduras en la producción de etanol; Etanol red, Safdistil plus y Ft-858, definiendo parámetros (temperatura y tiempo), producción de alcohol y porcentajes de sólidos residuales reductores, para posteriormente aplicarlos a nivel industrial con el objetivo de tener un buen proceso fermentativo.

### **Particulares**

- 1) Obtención de grado alcohólico en cada una de las fermentaciones.
- 2) Determinación de azúcares reductores en cada una de las muestras; melaza pura, melaza diluida, melaza fermentada.
- 3) Comparar resultados obtenidos de las cepas a evaluar y determinar cuál es la mejor levadura a utilizar.

## RESUMEN

Las competencias del químico apuntan hacia la búsqueda de calidad y rendimiento de los productos, en este caso particular se refiere a la producción de alcohol a partir de melazas en el que inciden factores que afectan el rendimiento.

En el desierto de altar en Sonora, a partir del año 2012 se gestiona la creación de una planta productora de alcohol, esto con la finalidad de crear una derrama económica para la región y satisfacer la demanda. Tal planta se encuentra ubicada en el Km 16.5 del tramo carretero Caborca-Desemboque y cuenta con un equipo con capacidad de destilación de 50,000 litros de alcohol a 96°GL.

Dado que la planta industrial es una innovación para esta región, se hace necesario evaluar todos los factores que inciden en la producción del alcohol a partir de melazas en el nuevo contexto. Sin embargo por tratarse de procesos, el estudio se delimita al análisis a tres factores por considerarse los más urgentes: La levadura, el rendimiento en la producción de etanol y la temperatura de fermentación.

Esta investigación es relevante por la importancia de estandarizar los factores mencionados para asegurar un buen proceso industrial, mismo que se espera mejore el porcentaje de alcohol producido y los sólidos residuales reductores.

La trascendencia del proyecto es en hacer eficaz el proceso industrial en una consolidación de la planta para que sea redituable y permanezca, además de generar una derrama económica para la región.

En la búsqueda del mejor rendimiento en la producción de etanol, en el presente trabajo de investigación se compararon tres cepas de levadura de

diferentes casas comerciales; Etanol red (FERMENTIS), Safdistil plus (FERMENTIS) y FT-858 (LNF).

Se hicieron fermentaciones con dos tipos de melazas una adquirida el año 2012 y la segunda el año 2013. Se utilizaron las técnicas de densitometría en unidades Gay-Lussac para cuantificar el alcohol y la técnica de Lane-Eynon para la cuantificación de azúcares reductores en g/L.

Como resultado la levadura FT-858 (LNF) produjo 0.2°GL más que las otras dos a 32°C minimizando también los tiempos de fermentaciones y reduciendo los sólidos residuales reductores. Esto representa un incremento del rendimiento de 251 a 257 litros de alcohol a 96°GL por tonelada de melaza del año 2012 y en la del año 2013 un incremento de 309 a 315 litros de alcohol a 96°GL por tonelada de melaza.

## INTRODUCCIÓN

La fermentación es un término general, que indica la degradación aeróbica o anaeróbica de un substrato orgánico a diversos productos, por la acción de levaduras y algunas bacterias que producen enzimas para realizar esta función y obtener energía en forma de adenosin trifosfato (ATP).<sup>1</sup>

La degradación anaeróbica es quizá la más antigua, puesto que los microorganismos vivos aparecieron en una tierra primitiva, la cual carecía de oxígeno.<sup>1</sup>

Existen muchas clases de fermentaciones, dependiendo del tipo de organismo que la produce, del substrato o incluso de las condiciones impuestas, como lo son el pH o el oxígeno mismo.<sup>1</sup>

Los conocimientos sobre la fermentación fueron atesorados desde la antigüedad por importantes civilizaciones como la Egipcia y la Asiática quienes la emplearon para la producción de bebidas alcohólicas, igualmente como la Azteca y la China quienes la utilizaron para obtención de productos alimenticios tales como la salsas fermentadas. La técnica se modernizó a partir de la aparición de cultivos microbianos; Así, se industrializó la fermentación y dio origen a grandes industrias como la alimentaria donde se destacan la panificadora, la de bebidas alcohólicas, la industria farmacéutica en el campo de las vacunas y medicamentos, la industria química donde producen ácidos, aldehídos, etc.<sup>2</sup>

Una de las fermentaciones más importantes y mejor conocidas es la alcohólica, la cual es una biorreacción que permite degradar el azúcar en alcohol y anhídrido carbónico mediante la reacción química siguiente.



Las responsables de esta transformación son principalmente levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, la más utilizada en el mercado por su gran porcentaje de viabilidad al momento del desecado.<sup>3</sup>

Sin embargo, existen diversos estudios que comprueban una mayor o igual eficiencia en la producción de alcohol por otros tipos levaduras. También pueden utilizarse bacterias como *Zymomonas mobilis*, la cual su uso industrial es mínimo debido a su forma de trabajo, la mayoría de las bacterias no toleran un pH ácido por lo cual debe de trabajar a pH básico, condiciones óptimas para el desarrollo no solo de esta bacteria sino para cualquier otra, teniendo así un gran riesgo de contaminación en las fermentaciones.<sup>3</sup>

Aparentemente esta reacción es muy sencilla, pero la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos de dióxido de carbono es un proceso muy complejo, puesto que al mismo tiempo la levadura debe utilizar glucosa y otros nutrientes adicionales para poder reproducirse. El rendimiento teórico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511g de etanol y 0.489 g de anhídrido carbónico por gramo de glucosa.<sup>4</sup>

Llevando a la práctica este nivel estequiométrico es difícil obtener el rendimiento anteriormente mencionado por que la levadura utiliza la glucosa para producir otros metabolitos indispensables para su crecimiento y desarrollo. A nivel experimental varía entre 90 y 95% del teórico mientras que en la industria la variación es de 87 al 93%.<sup>5</sup>

## 1. ANTECEDENTES

El etanol o alcohol etílico es el producto orgánico sintético más usado en el mundo por el hombre, se presenta como un líquido incoloro e inflamable con un punto de ebullición de 78.3°C. Su fórmula química es  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ , siendo el componente esencial de toda bebida alcohólica, además de una de las materias primas importantes para la síntesis orgánica. Se puede obtener de dos procesos: la fermentación o la descomposición de los azúcares contenidos en distintas frutas y la destilación en la depuración de jugos fermentados.<sup>6</sup>

### 1.1. Producción de etanol en México

A pesar de que el etanol se ha utilizado mayoritariamente como base en la producción de bebidas alcohólicas, tales como cervezas, vinos, licores, etc. Tiene además una serie de aplicaciones en la industria química, farmacéutica y más recientemente como combustible para autos. El alcohol anhidro requiere tener por lo menos 99.5°GL, en los ingenios mexicanos se produce alcohol etílico, del tipo hidratado de 96°GL.<sup>7</sup>

En México, desde hace varios años, se produce etanol de caña de azúcar en los diferentes ingenios del país que cuentan con destilerías, solo que su uso es para bebidas embriagantes e industrias no para uso como combustible. A pesar de contar con capacidad instalada para producir mayor cantidad, los ingenios del país no la utilizan, dado que la demanda es limitada y que el insumo es cíclico.<sup>7</sup>

En promedio la capacidad utilizada es de 44% respecto a la capacidad instalada, además es relativamente fácil hacer adecuaciones para ampliar esa capacidad. Se estima que la capacidad instalada para etanol combustible en México sería de 33 millones de litros por año, producidos fundamentalmente en los ingenios La Gloria y San Nicolás ambos ubicados en Estado de Veracruz,

según los registros estadísticos, la producción de etanol ha venido disminuyendo en el país. En 1988 se llegó a producir 70 millones de litros y ya para el 2004 solo se producían 35 millones de litros aproximadamente.<sup>8</sup>

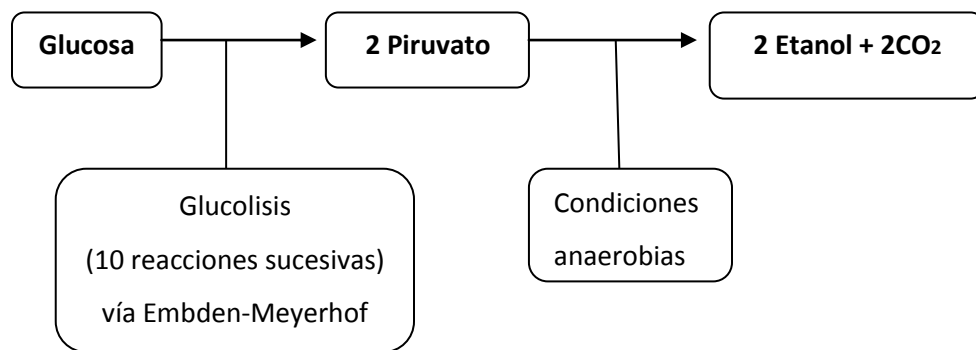
## **1.2. Fermentación alcohólica**

La fermentación a nivel industrial tiene como objetivo, aumentar la eficiencia con el fin de obtener mejores resultados en cuanto a productos, empleando un buen control y aplicación de las teorías, en ciertas variables que determinan la eficiencia del proceso como lo son: temperatura, pH, niveles de alcohol, concentraciones del sustrato y biomasa entre algunas otras no tan importantes.<sup>9</sup>

La fermentación alcohólica comprende toda una serie de reacciones bioquímicas a través de las cuales algunos microorganismos, por medio de un conjunto de enzimas producidas por ellos mismos o añadidas artificialmente, realizan una transformación de azúcares para convertirlos en etanol, dióxido de carbono y energía exotérmica la cual libera moléculas de Adenosin trifosfato (ATP), las cuales son necesarias para el funcionamiento metabólico de las levaduras.<sup>7</sup>

Debido a que el proceso es anaeróbico, la respiración celular de la cadena de ADP en ATP queda completamente bloqueada siendo la única fuente de energía para las levaduras la glicolisis, la cual produce moléculas de ATP mediante fosforilación a nivel sustrato. En balance total energético se generan dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa.<sup>1</sup>

Para llevar a cabo el proceso de fermentación alcohólica se requiere que la glucosa sea catabolizada mediante el rompimiento de la glucosa o la ruta Embden-Meyerhof, para obtener piruvato el cual posteriormente por acción de enzimas específicas, se convierte anaeróbicamente en etanol y anhídrido carbónico (Ver figura 1).



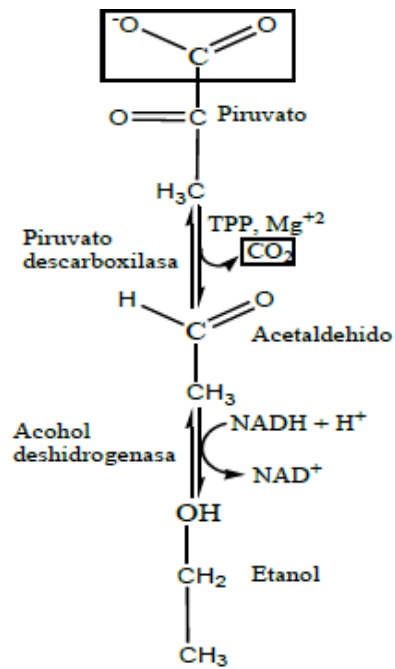
**Figura 1.** Proceso general de fermentación alcohólica con levaduras.

(Garzon C.S., Hernández L.C., 2009)



La glucólisis es una ruta catabólica en donde la glucosa es convertida a dos moléculas de piruvato, las que dependiendo de la ausencia o presencia de oxígeno pueden tomar rutas diferentes hablando de una fermentación por medio de levaduras.<sup>10</sup>

Posteriormente el piruvato se descarboxila debido a la presencia de la enzima piruvatodescarboxilasa que se encuentra en todos los organismos que metabolizan alcohol para formar acetaldehído, el cual se reduce a etanol por acción del Nicotinamina, Adenina, Dinucleótido (NADH) como un agente reductor, a través de la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (Ver figura 2), misma que está en todos los organismos capaces de dar lugar a una fermentación alcohólica.<sup>1</sup>



**Figura 2.** Reacción de conversión del piruvato en etanol y dióxido de carbono.

(Garzon C.S., Hernández L.C., 2009)

### **1.3. Condiciones a medir y controlar en una fermentación alcohólica**

Una fermentación puede llevarse a cabo en un rango de 25 a 35°C, la temperatura juega un papel notablemente en la reproducción de las levaduras y las bacterias, influye en la composición de los ácidos grasos de las membranas plasmáticas y en su proceso para degradar los azúcares en los microorganismos que se utilicen en las fermentaciones.<sup>16</sup>

#### **Temperatura**

Las levaduras son microorganismos mesófilos, por lo tanto su temperatura no puede sobrepasar los 50°C, puesto que esto produciría su muerte. Por lo tanto debido a que la fermentación es un proceso exotérmico, se debe mantener en el mismo control de temperatura para mantener así un valor óptimo que varía de 30-35°C.<sup>1</sup>

#### **pH**

El potencial de hidrógeno (pH) tiene una gran influencia en los productos finales del metabolismo anaerobio (producción de etanol) por lo tanto es importante tener un control sobre esta variable que por lo general se basa en un rango que va desde un pH ácido para algunos tipos de levaduras hasta un pH de 5 durante el desarrollo del proceso de fermentación, puesto que los microorganismos poseen rango óptimo en el cual tienen mayor velocidad de crecimiento y rendimiento, además este parámetro es necesario tenerlo en cuenta porque es una de nuestras asepsias naturales para controlar las contaminaciones en los mostos ya que la mayoría de las bacterias no toleran un pH ácido.<sup>1</sup>

## **Nutrientes**

Un jugo rico en azúcares que se pretende fermentar debe contar con todos los nutrientes requeridos por la levadura para su reproducción y para la transformación de los azúcares como son principalmente el carbono, nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio.<sup>16</sup>

**Carbono:** El carbono es el compuesto de la levadura, alrededor del 50% en peso seco. Los compuestos carbonados son utilizados por las levaduras a la vez como fuente de energía y como fuente de carbono. Entre las fuentes de carbono los glúcidos son los más frecuentemente utilizados como hexosas, disacáridos y trisacáridos.<sup>17</sup>

**Nitrógeno:** El nitrógeno es cuantitativamente el segundo constituyente aportado por el medio de cultivo. Es utilizado por las células en los aminoácidos, los nucleótidos y algunas vitaminas.

Todas las levaduras, asimilan el nitrógeno en forma de ion de amonio, nitrato de amonio, fosfato amónico y sobre todo el sulfato amónico, siendo éste el mejor por su mayor cantidad de partes por millón de nitrógeno que libera en el medio y al mismo tiempo aportando azufre necesario para la síntesis de ciertos aminoácidos.<sup>14</sup>

**Fósforo:** Contribuye a la incorporación de moléculas estructurales y como reserva de energía en forma de polifosfatos (ATP). Las fuentes en el medio de cultivo deben estar constituidas por el fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) o por el fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).<sup>1</sup>

**Potasio:** El potasio es el elemento mineral cuantitativamente más importante en las levaduras, ya que a pH ácido el potasio estimula la fermentación y la respiración además actúa como efector de numerosas

enzimas entre otros. Las fuentes de potasio en los medios de cultivo son cloruro potásico y los fosfatos mono y dipotásico.<sup>1</sup>

**Magnesio:** El magnesio es necesario para el buen funcionamiento de muchas enzimas del metabolismo, así mismo está implicado en las estructuras de los ribosomas, de las membranas nucleares y ácidos nucleicos. Una carencia de magnesio en la fermentación alcohólica conlleva a la producción de ácido acético.<sup>17</sup>

#### **1.4. Limitantes de la fermentación alcohólica**

##### **Concentración de alcohol**

Toda levadura presenta resistencia a concentraciones de alcohol que se produce durante la fermentación, debido a que este inhibe el transporte de la D-xilosa, amonio, glicina y algunos aminoácidos, afecta a la función de algunas enzimas citoplasmáticas como es la hexoquinasa por las grandes concentraciones de etanol, se presenta la formación de un complejo hexoquinasa-etanol por la cual puede detener la reacción glucosa a Glucosa-6-fosfato.<sup>11</sup>

La tolerancia al alcohol depende de la habilidad de la célula para exportar el etanol del interior al medio externo, este proceso depende de la composición de la membrana y la fluidez de la misma, el microorganismo modifica la composición de 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 de la membrana lipídica debido a un enriquecimiento de las mismas en esteroides y ácidos grasos de cadena larga de esta manera las levaduras pueden adaptarse en altas concentraciones de alcohol.<sup>11</sup>

La diferencia de tolerancia al etanol en cepas, ha sido asociada a niveles celulares de acetaldehído, aquellas cepas con menores niveles de acetaldehído citoplasmático serían las más tolerantes al etanol.<sup>11</sup>

### **Acidez del sustrato**

En el proceso de producción de etanol los puntos críticos de control microbiológicos se encuentran principalmente en la materia prima, en la etapa de propagación de levadura y en la fermentación, ya que en ellas puede ocurrir contaminación por bacterias ácido acéticas (BAA), microorganismos que se desarrollan en ambientes con grandes niveles de azúcar. Además que algunas de estas bacterias prefieren etanol como fuente de carbono generalmente predominan en las últimas etapas de las fermentaciones de vino, incluso en condiciones de baja tensión de oxígeno.<sup>12</sup>

Las BAA son bacilos gran negativos ampliamente conocidos por su habilidad para oxidar rápida e incompletamente sustratos de carbono, especialmente azúcares y alcoholes, por lo que se encuentran altamente adaptados en ambientes ricos en azúcar y etanol. La presencia de estas bacterias puede generar un aumento en la acidez volátil (ácido acético) en los mostos de fermentación, ya que inicialmente el alcohol se oxida por acción del alcohol deshidrogenasa a acetaldehído, producto intermedio que debido a la acción del aldehído deshidrogenasa se oxida a ácido acético.<sup>12</sup>

### **Concentración de azúcares**

Las concentraciones altas de azúcares afectan los procesos de ósmosis dentro de la membrana celular, el rango óptimo de concentración de azúcar es de 10-18% debido que a concentraciones de 22% las levaduras empiezan a tener problemas en su proceso de respiración celular, ocasionando una fermentación demasiado lenta que por lo regular no es completa dejando un porcentaje elevado de AR.<sup>1</sup>

## **1.5. Microorganismos utilizados en la fermentación alcohólica**

Otros tipos de microorganismos que se utilizan en estos procesos son las bacterias, con relación al empleo de cultivos mixtos en la fermentación alcohólica se reportan algunos trabajos con mezclas de levaduras, conformadas por dos levaduras: *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis* en proporciones de 4:1 en el orden mencionado, se favoreció el incremento en la producción de alcohol.<sup>13</sup>

Se plantea que hay una gran tendencia actualmente a utilizar bacterias; entre ellas se destaca *Zymomonas mobilis*. Se reportan productividades tres veces mayores para esta bacteria en comparación de *S. cerevisiae* usando concentraciones de glucosa de 150 g/L o más bajas. La viabilidad de *Z. mobilis* se mantiene durante la producción de etanol, se logran buenos rendimientos, así como el acortamiento del ciclo fermentativo respecto al que se obtiene con las levaduras.<sup>14</sup>

Se reportan estudios con cultivos mixtos o microorganismos trabajados genéticamente cuyo objetivo fundamental es lograr utilizar sustratos complejos para degradar, que incluso en algunos casos son residuos como las vinazas.<sup>14</sup>

Las bacterias *Escherichia coli* y *Zymomonas mobilis* y la levaduras *Saccharomysces cerevisiae* han sido objeto de estudios desde el punto de vista genético para ser utilizados en la sacarificación y fermentación de la celulosa.<sup>14</sup>

## **1.6. Producción de etanol a partir de melaza**

En la actualidad uno de los principales insumos para la producción de alcohol es la melaza, puesto que se produce en los ingenios azucareros como un resultado final de mieles incristalizables por los métodos conocidos, obteniendo una miel marrón con 85% de sólidos, de los cuales por lo regular solo el 44% son ART, este dato depende de la calidad del azúcar producida en los Ingenios azucareros.<sup>10</sup>

En una comparativa de países como Colombia y Brasil donde la producción de este producto es mucho mayor, debido a los climas y a su alta producción de alcohol a nivel mundial tiene normalizado el porcentaje de sólidos y de ART como también la calidad y el tipo de melaza, algo muy diferente sucede en México donde la melaza se utiliza frecuentemente como alimento para el ganado y en pocas fabricas para la producción de etanol.<sup>19</sup>

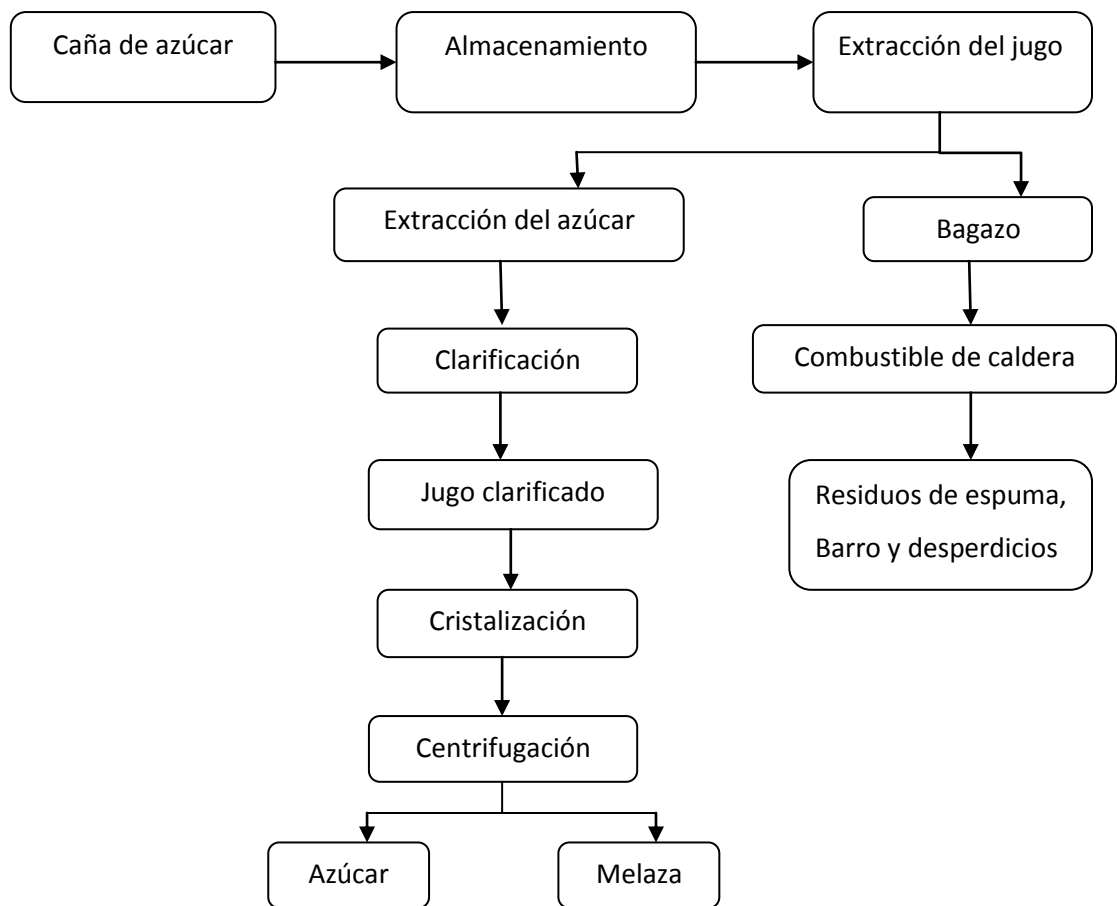
Existe una Norma Oficial Mexicana<sup>20</sup> que habla sobre la melaza de caña, acerca de sus especificaciones y su porcentaje de sólidos pero no el de ART, debido a esto, para la producción de etanol es necesario analizar frecuentemente las melazas con las cuales se trabajará y poder realizar diluciones debidamente.

## **1.7. Obtención de melaza**

La denominación melaza se aplica al efluente final obtenido en la preparación del azúcar mediante una cristalización repetida (Ver figura 3).

El proceso de evaporación y cristalización es usualmente repetido 3 veces hasta el punto en el cual el azúcar invertido y la alta viscosidad de las melazas ya no permitan una cristalización adicional de la sacarosa.<sup>16</sup>





**Figura 3.** Proceso general de obtención de azúcar y melaza.

(Fajardo C.E., Sarmiento F.S, 2007)

Es una mezcla compleja que contiene sacarosa, azúcar invertido (glucosa y fructosa) y otros compuestos solubles en álcali que normalmente están presentes en el jugo de caña, así como los formados durante el proceso de manufactura del azúcar, además de la sacarosa, glucosa, fructosa y rafinosa los cuales son fermentables.<sup>18</sup>

Las melazas también contienen sustancias reductoras fermentables y sustancias reductoras no fermentables, estos compuestos no fermentables reductores de sales de cobre, son principalmente caramelos libres de nitrógeno producidos por calentamiento requerido por el proceso como las melanoidinas que contienen nitrógeno derivadas a partir de productos de condensación de azúcar y amino compuestos.<sup>10</sup>

### **1.8. Composición química de la melaza**

La composición de las melazas es muy heterogénea y puede variar considerablemente dependiendo de la variedad de caña de azúcar, suelo, clima, periodo de cultivo, eficiencia de la operación de la fábrica, del sistema de ebullición del azúcar, tipo y capacidad de los evaporadores entre otros. Por otro lado, la melaza de caña se caracteriza por tener grados Brix (°B) alrededor de 85% (Ver tabla 1) y un pH de 5.0-6.1.<sup>18</sup>

**Azúcares:** Los principales azúcares en la melaza son la sacarosa (60-63% en peso) la glucosa o dextrosa (6-9% en peso), y la fructosa o levulosa (5-10% en peso) estas dos últimas forman la mayor parte de los azúcares reductores encontrados en el análisis puesto que con la sacarosa se descompone en glucosa y fructosa con una hidrólisis ácida y una combinación de temperatura a 65°C.<sup>16</sup>

**Tabla 1** Composición química de la melaza

Componentes	Constituyentes	Contenido (p/p)
Componentes mayores	Materia seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60-63%
	Azúcares reductores	3-5%
	Sustancias disueltas diferentes los azúcares	4-8%
	Agua	15%
	Cenizas	9%
	Calcio	0.74%
	Magnesio	0.35%
	Fósforo	0.08%
Contenido de minerales	Potasio	3.67%
	Glicina	0.10%
	Leucina	0.01%
	Treonina	0.06%
Contenido de aminoácidos	Colina	600 ppm
	Niacina (B3)	48,86 ppm
	Ácido pantoténico (B5)	42,90 ppm
Contenido de vitaminas	Piridoxina (B6)	44 ppm
	Riboflavina (B2)	4,40 ppm
	Tiamina (B1)	0,88 ppm

(Fajardo C.E., Sarmiento F.S, 2007)

**No azúcares:** Esta fracción está compuesta por un 33% de sustancias inorgánicas ( $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{As}^{+3}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^+$ ,  $\text{Pb}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_2$ ) el 42% corresponde a sustancias nitrogenadas (aminoácidos, péptidos, colorantes) y el 25% a sustancias orgánicas libres de nitrógeno (ácidos carboxílicos, alcoholes, fenoles, ésteres, vitaminas, gomas y dextrinas).<sup>16</sup>

**Vitaminas:** Aquellas vitaminas resistentes a la acción del calor y de los álcalis aparecen encontradas en las melazas. La niacina (B3), ácido pantoténico (B5) y riboflavina (B2), importantes para el crecimiento microbiano, pueden estar presentes en cantidades significativas y otras vitaminas lo están en cantidades muy pequeñas.<sup>18</sup>

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material biológico

Se evaluaron tres híbridos de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* en presentación deshidratada, fabricadas para su comercialización por diferentes casas comerciales.

- 1.- Etanol red (FERMENTIS MÉXICO)
- 2.- Safdistil plus (FERMENTIS FRANCIA)
- 3.- FT-858 (LNF BRASIL)

**Etanol Red;** Es una cepa especialmente seleccionada que se ha desarrollado para la industria del etanol, con una cepa de acción rápida y mantiene una viabilidad celular mayor, diseñada para la producción de alcohol a temperaturas elevadas, etanol red es capaz de maximizar los rendimientos de alcohol bajo una gama definida de temperaturas.

Menores costos de refrigeración, niveles más altos de etanol y el aumento de la productividad se puede esperar del uso Etanol red.

Esta levadura esta comercialmente disponible en México en presentaciones de 10kg deshidratada por lo cual no presenta ningún problema adquirirla.

**Safdistil plus;** Es una levadura híbrida seleccionada por Lesaffre Internacional de R&D por su cinética de fermentación superior, resistencia a la temperatura y tolerancia al alcohol, recomendada para fermentación tanto de azúcar, jugos espesos de varias composiciones y sustratos de grano.

Dicha levadura es diseñada y distribuida en Francia por lo cual presenta cierta dificultad la adquisición y la espera para la importación y el transporte. Se logró conseguir esta levadura en presentación deshidratada de 500g.

**FT-858;** Es una cepa aislada que se destaca especialmente en los trabajos con melazas y por algunas características que son esenciales para la fermentación como: fermentación de alto rendimiento, baja formación de espuma, altas tasas de multiplicación en el arranque, no floculante, alto grado de implantación y supervivencia y la tolerancia al estrés de la fermentación.

Esta levadura en particular es diseñada y distribuida únicamente desde Brasil, debido a los problemas de importación fue recibida por donación por una destilería ubicada en el municipio de Atoyac, Veracruz., la cual utiliza en sus fermentaciones.

## **2.2. Materia prima**

Las melazas con las cual se trabajó se recibieron de un ingenio ubicado en los Mochis, Sinaloa., “Compañía Azucarera de los Mochis S.A. de C.V.” Las melazas fueron compradas en el mes de Enero los años 2012 y 2013, fueron trasportadas camiones cisternas de 30 Toneladas para almacenarse en contenedores de acero inoxidable con capacidad de 700,000 litros, ambas melazas con diferente contenido de azúcares reductores (AR) pero igual porcentaje de sólidos 85°B.

### **2.3. Procedimiento de la fermentación alcohólica**

Las fermentaciones fueron llevadas a cabo realizando diluciones melaza-agua para poder llevarla de 85°B hasta 25°B, ésto fue realizado con los dos tipos de melazas con las que se trabajó, con ayuda de un refractómetro digital marca ATAGO modelo DBX-55A, pesándose 1.12 Kg de melaza adicionando 2.7 Kg de agua para poder obtener 3.48 L de melaza diluida a 25°B, de la cual se colocaron tres muestras de un litro de cada melaza, a fermentar con las tres levaduras.

La temperatura de fermentación fue controlada con un baño maría eléctrico con regulador de temperatura marca MAPSA modelo BMT-8, con ayuda de un termómetro marca BRANNAN de -20° a 110°C (Ver figura 4). Debido a que la fermentación es un proceso exotérmico, se debe mantener un control de la temperatura que varía de 30-35°C, realizando fermentaciones a 30, 31, 32, 33, 34 y 35°C.

El pH fue ajustado con ácido fosfórico al 85% para llevarlo a 4.5 con el fin de evitar alguna contaminación, utilizando un potenciómetro digital marca HANNA modelo HI 99161 y solo se utilizó difosfato de amonio (DAP) como nutriente único debido a la gran cantidad de nutrientes provistos por la melaza, se utilizaron 2 g/L para llevar el nitrógeno a 350 ppm en las fermentaciones.

#### **Inoculación con levaduras**

Se inocularon las diluciones en recipientes de plástico de dos litros utilizando 0.5g de levadura por cada inóculo. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL, Se hidrató cada muestra de levadura con 30 mL de agua a 30°C durante 10 minutos y se adicionaron a las diluciones de ambas melazas con un litro de muestra a fermentar para cada levadura, teniendo así seis fermentaciones de un litro.



**Figura 4.** Control de la temperatura en las fermentaciones de melaza diluida a 25°B mediante baño maría eléctrico.



## **2.4. Determinación de Azúcares reductores**

Los monosacáridos poseen un poder reductor, que lo deben al grupo carbonilo libre que tiene en su molécula. Este carácter reductor puede ponerse de manifiesto por medio de una reacción redox llevada a cabo entre una solución de sulfato de cobre (ion cúprico) y una solución amortiguadora de tartrato de sodio y potasio que son calentados en presencia de un monosacárido.

Las soluciones de esta sal tienen color azul, la reacción con el azúcar reductor forman óxido de cobre (ion cuproso) de color rojo; de este modo el cambio de color indica que se ha producido la reacción y que por lo tanto el azúcar presente es reductor (Ver figura 5).

Este es el fundamento del método de Lane-Eynon explicada en el anexo 1 y fue el método utilizado para la cuantificación de los AR tanto en melazas de 85°B como en las diluciones de 25°B y en las muestras ya fermentadas para determinar sólidos residuales reductores (SR).

Para ésto fue necesario realizar una clarificación de la muestra con carbón activado al momento del enfriamiento posterior a la inversión de los azúcares, y después centrifugar usando una centrifuga marca PREMIERE modelo XC-2000 a 2500 rpm durante un minuto para posteriormente titular con esta muestra la combinación de soluciones Fehling



**Figura 5** Cambio de coloración en la reacción redox llevada a cabo en la cuantificación de azúcares reductores y sólidos residuales reductores.

## **2.5. Determinación alcoholimétrica (grados Gay-Lussac)**

Los niveles de alcohol fueron determinados por densitometría con alcoholímetros Dujardin-Salleron certificados (Ver figura 6) con rango de 0-20°GL realizando una destilación previa en las fermentaciones terminadas como se indica a continuación.

Colocando 200 mL de la muestra más 200 mL de agua con una probeta con capacidad de 250 mL para evitar el secado de la muestra, en un matraz de bola fondo plano cuello largo de un litro adicionando perlas de vidrio y calentando hasta ebullición en una placa eléctrica marca CIMAREC modelo SP131325, conectado a un condensador en espiral de 30 cm con ayuda de un soporte universal y pinzas de tres dedos, recolectado en un matraz aforado de 200 mL del destilado para llevar a cabo la densitometría y determinar el °GL de cada una de las fermentaciones en una probeta de vidrio de 250 mL (Ver figura 7).

Debido a que los niveles de la densitometría son afectados por la temperatura fue necesario realizar un ajuste en el grado alcohólico en base a la temperatura y el grado de lectura, interpolándolos en una tabla de alcoholimetría o bien realizando una lectura a temperatura de 20°C en la cual no se manifiesta efecto alguno en la graduación.



**Figura 6.** Alcoholímetros certificados Dujardin-Salleron con rango de 0-20°GL y 90-100°GL.



**Figura 7.** Destilación de melaza fermentada y obtención del °GL mediante densitometría.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados son representativos de cinco experimentos independientes.

#### 3.1. Azúcares reductores totales (ART)

Se determinaron los ART en ambas melazas de 85°B con las que se trabajó, Obteniendo como resultado:

Melaza utilizada el 2012 a 85°B      390 g/Kg AR      (44%)

Melaza utilizada el 2013 a 85°B      497 g/Kg AR      (58%)

Posteriormente se realizaron diluciones agua-melaza para llevarlas de 85°B hasta 25°B obteniendo como resultado:

Melaza utilizada el 2012 a 25°B      126 g/L AR

Melaza utilizada el 2013 a 25°B      161 g/L AR

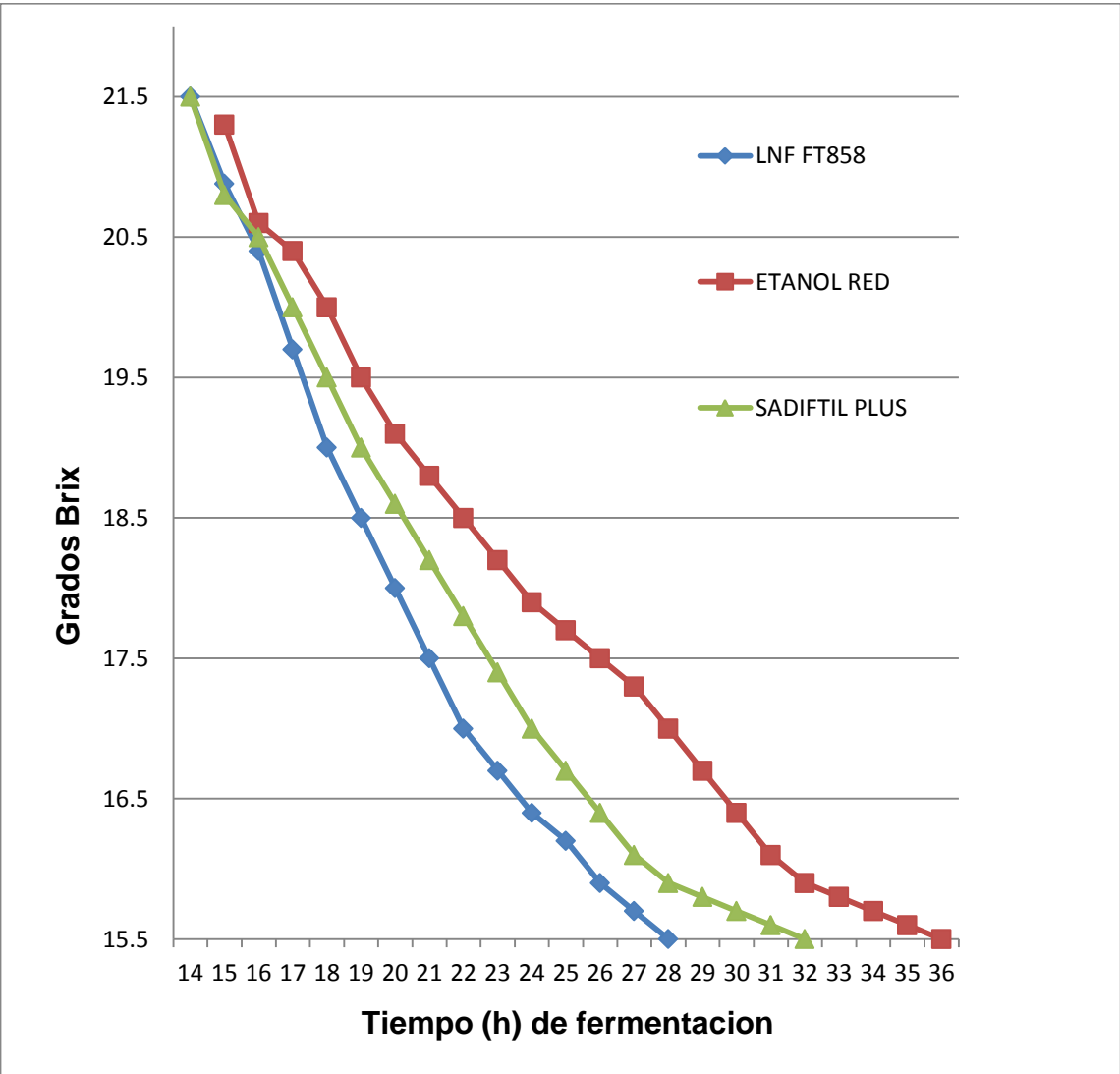
#### 3.2. Temperatura y tiempo de fermentación

Se fermentaron ambas muestras de melaza diluidas a 25°B definiendo como la temperatura optima 32°C, debido que en las temperaturas de 34 y 35°C se observó una disminución de 0.2°GL en todas las fermentaciones.

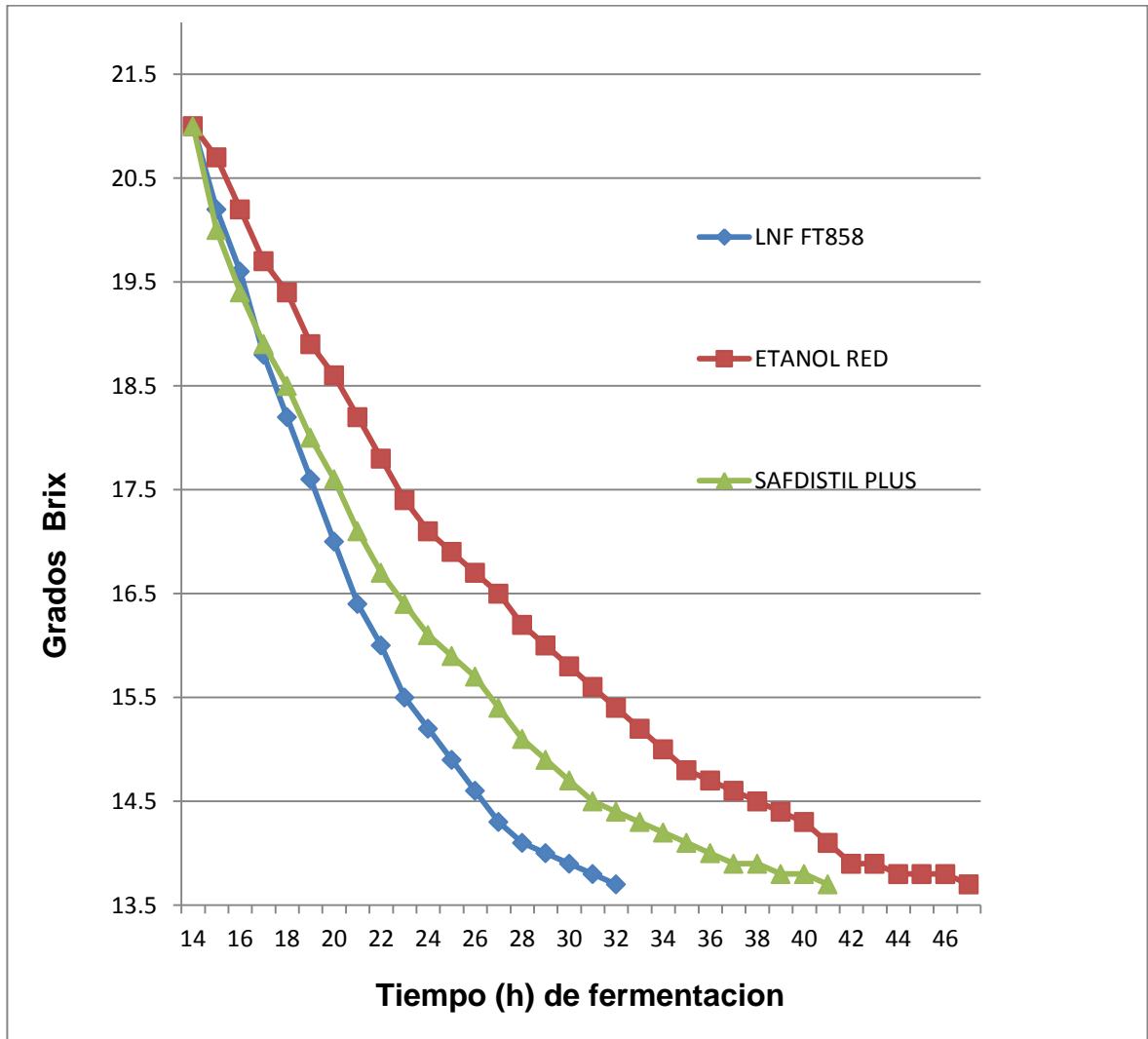
En las fermentaciones con las temperaturas de 30, 31, 32 y 33°C solo presentaron como inconveniente un alargamiento en los ciclos fermentativos conforme descendíamos la temperatura y no en los grados alcohólicos obtenidos de las tres levaduras.

Efectuando un análisis de sólidos contra tiempo con un refractómetro digital se logró observar el consumo de °B y los tiempos de fermentación en las tres levaduras para ambas melazas (Ver figura 8 y 9).

Teniendo como resultado en la dilución de la melaza adquirida en el 2012, una fermentación más rápida en la levadura FT-858, finalizando a las 28 horas, después Safdistil plus con 32 horas y al final Etanol Red, la cual fue la más tardada con 36 hrs de duración.



**Figura 8.** Tiempo de fermentación y porcentaje de sólidos consumidos por hora, en las levaduras comparadas en la melaza adquirida el 2012.



**Figura 9.** Tiempo de fermentación y porcentaje de sólidos consumidos por hora, en las levaduras comparadas en la melaza adquirida el 2013.



Debido a la mayor cantidad de azúcares reductores determinados en la melaza del año 2013, tardó más tiempo en finalizar las fermentaciones.

Primeramente la levadura FT-858, tardó un total de 32 horas de fermentación, después Safdistil Plus con un total de 41 horas y al final Etanol red con 47 horas.

### **3.3. Sólidos residuales reductores (SR)**

Una vez terminadas las fermentaciones se determinaron los sólidos residuales reductores para determinar la cantidad de azúcar que no fue consumido por las levaduras comparadas, obteniendo los resultados en las fermentaciones para la melaza del año 2012 de:

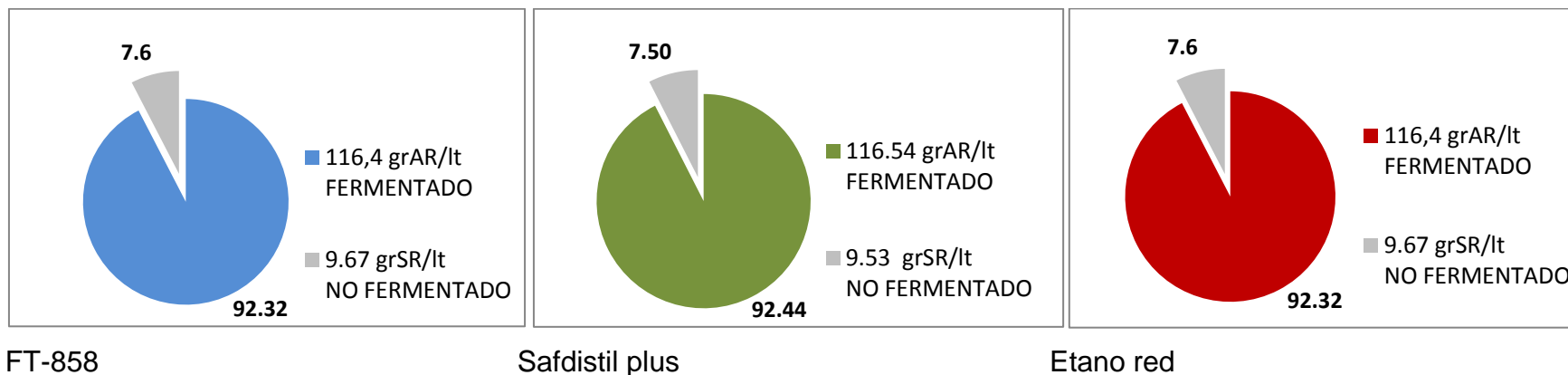
FT-858	8.75 g/L de SR
Safdistil plus	9.53 g/L de SR
Etanol red	9.67 g/L de SR

Disminuyendo en casi 1 g/L en la levadura FT-858 en comparación con las dos lavaduras anteriores (Ver figura 10).

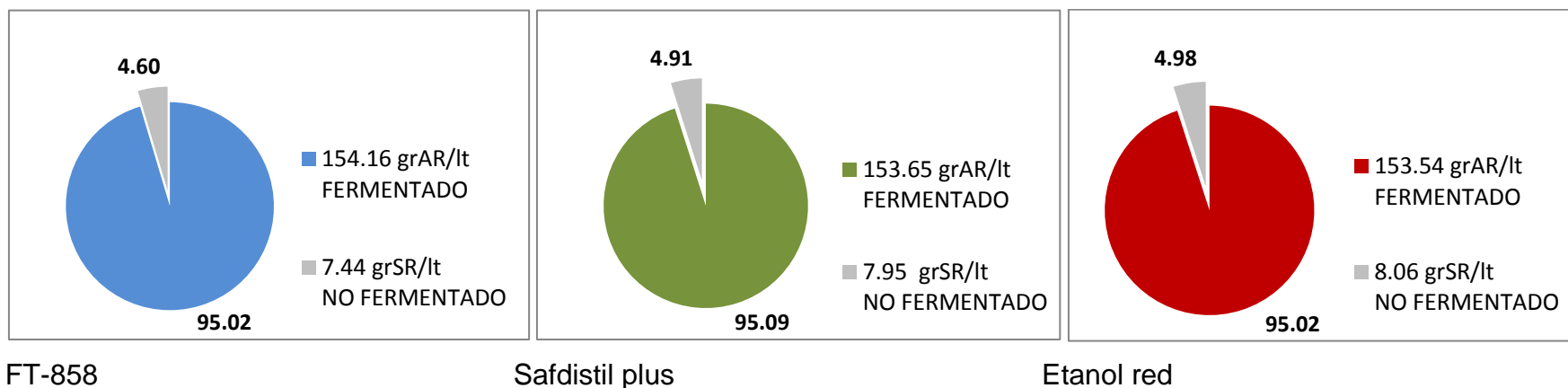
De igual manera se realizó el análisis de AR para las fermentaciones en la melaza del año 2013:

FT-858	7.44 g/L de SR
Safdistil plus	7.95 g/L de SR
Etanol red	8.06 g/L de SR

Observándose nuevamente en la levadura FT-858 una disminución de los sólidos residuales reductores, en casi 0.5 g/L en comparación con las levaduras Etanol red y Safdistil plus (Ver figura 11).



**Figura 10.** Porcentaje de sólidos residuales reductores de las tres levaduras, en fermentaciones en melaza adquirida el año 2012, diluidas a 25°Brix con 126 g/L de azúcares reductores.



**Figura 11.** Porcentaje de sólidos residuales reductores de las tres levaduras, en fermentaciones en melaza adquirida el año 2013, diluidas a 25°Brix con 159g/L de azúcares reductores.

La levadura FT-858 presentó un menor porcentaje de azúcar residual logrando consumir un mayor porcentaje de azúcares en las dos diferentes muestras de melazas.

### **3.4. Grados Gay-Lussac (°GL)**

Los niveles de alcohol resultantes, para las fermentaciones en la melaza del año 2012 con 44% de ART fueron:

FT-858	8°GL
Etanol red	7.8°GL
Safdistil plus	7.8°GL

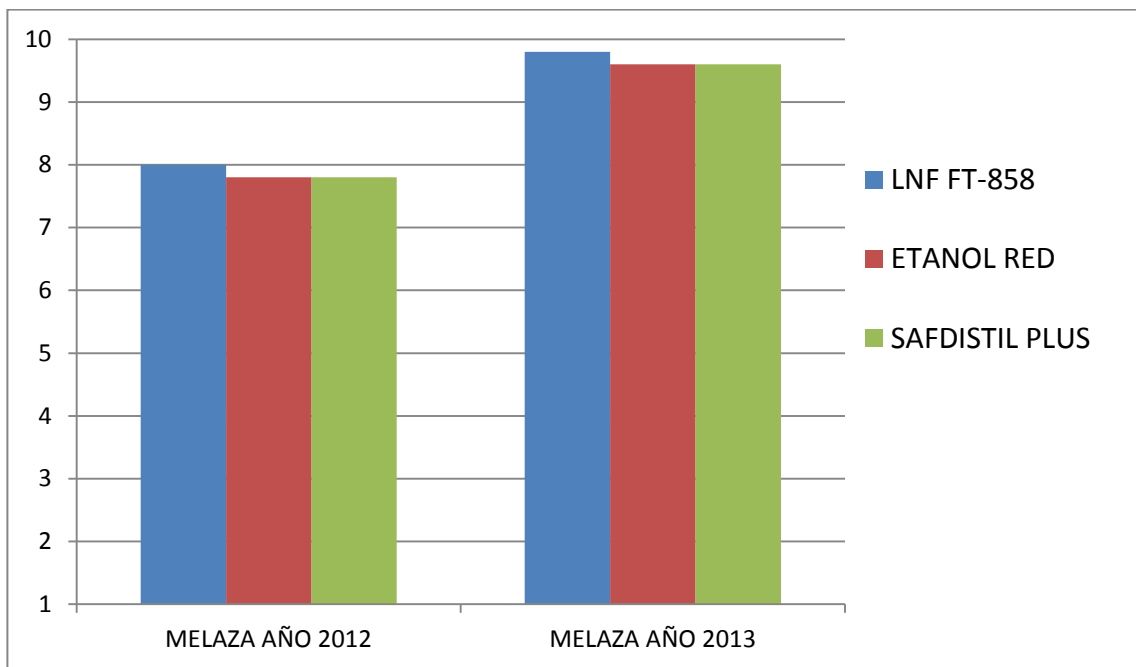
Se obtuvo un rendimiento para Etanol red y Safdistil plus de 251 L de etanol a 96°GL por tonelada de melaza y de 257 L para FT-858, iniciando las fermentaciones a 25°B deteniéndose a 15.5°B en las tres levaduras.

Los niveles de alcohol resultantes, para las fermentaciones en la melaza del año 2013 con 58% ART fueron:

FT-858	9.8°GL
Etanol red	9.6°GL
Safdistil plus	9.6°GL

Se obtuvo un rendimiento de 309 L de Etanol a 96°GL por tonelada de melaza para Etanol red y Safdistil plus y aumentó nuevamente para FT-858 a 315 L/Ton, iniciando las fermentaciones a 25°B y deteniéndose a 13.5°B en las 3 levaduras.

Los resultados favorecieron nuevamente a la levadura FT-858 la cual produjo 0.2 °GL más en las dos melazas utilizadas (Ver figura 12).



**Figura 12.** Grados alcohólicos (Gay Lussac °GL) obtenidos en las 3 levaduras a comparar en una temperatura de 32°C.

#### 4. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

- El tiempo de fermentación dependerá de la levadura a utilizar como también de la cantidad de ART presentes en las diluciones y como el del control de la temperatura en la fermentación.
- La temperatura óptima para obtener un mayor rendimiento en la producción de etanol para las tres levaduras es 32°C, debido a que presentaron una disminución del grado alcohólico de 0.2°GL para las dos muestras de melaza en las temperaturas de 34 y 35°C, observando un alargamiento en los ciclos fermentativos conforme se disminuye la temperatura.
- La levadura FT-858 diseñada en Brasil realizó una fermentación más rápida en las muestras de melaza a fermentar con 25°B, 126 g/L ART y 161 g/L ART.
- Se observó que la levadura FT-858 tuvo un mayor aprovechamiento en los sólidos residuales reductores (SR) con una diferencia en casi 1 g/L de SR en comparación con Safdistil plus y Etanol red en la melaza del 2012 y de 0.5 g/L de SR para la melaza del 2013.
- El mayor rendimiento en la producción de alcohol lo obtuvo FT-858 con un rendimiento de 157 L de alcohol a 96°GL por Tonelada de melaza adquirida el 2012 y disminuyendo en Safdistil plus y Etanol red en 151 L, incrementando también a 315 L/Ton en la melaza del 2013 disminuyendo en Safdistil plus y Etanol red con 309 L/Ton.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Garzon C.S., Hernández L.C.,UTP, A.C. *Tesis de Licenciatura Química industrial, ESTUDIO COMPARATIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL ENTRE Saccharomyces cerevisiae silvestre, Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 Y Candida utilis ATCC 9950.*, **2009**, Pág. 1-132.
2. Piergallini Ana Cecilia, UAI, *Facultad de Derecho y Ciencias Políticas*, **2008**, <http://imgbiblio.vaneduc.edu.ar/fulltext/files/TC081087.pdf>
3. Alarcón Elías Aurea Victoria, IPN, *Tesis de Maestría en Ciencias*, **2010**, Producción de Bioetanol con *Zimomonas mobilis*: Pág. 1-71.  
[http://www.biotechnologia.upibi.ipn.mx/recursos/posgrado/Tesis/mc\\_aalarcon.pdf](http://www.biotechnologia.upibi.ipn.mx/recursos/posgrado/Tesis/mc_aalarcon.pdf)
4. Cholata P.L., Mora R.L.,ESPOCH, *Tesis de Licenciatura Ingeniero Mecánico*, **2010**,Pág 1-117  
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/289/4/15T00430.pdf>
5. Dacosta O., Vázquez H.J., UNAM, **2007**, Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas, *Ingeniería Investigación y Tecnología*, VIII:  
<http://www.ejournal.unam.mx/ict/vol0804/ICT000800404.pdf>
6. Etanol, *Cadena Agroindustrial*, Nicaragua, **2004**:  
<http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A4648e/A4648e.pdf>
7. CONAE, **2008**, Vehículos con Etanol, *Ficha técnica*, Pág. 1-8  
<http://www.conae.gob.mx/work/sites/CONAE/resources/LocalContent/466/1/images/vehiculoetanol.pdf>

8. Becerra Pérez Luis Armando, **2006**, La industria del etanol en México, *Economía UNAM*, 6(16):  
<http://www.ejournal.unam.mx/ecu/ecunam16/ECU001600606.pdf>
9. Amador Villalpando Octavio A., **2007**, Biocombustibles, *Economía UNAM*, 311(27):  
<http://www.economia.unam.mx/publicaciones/econinforma/pdfs/350/09octavio.pdf>
10. Fajardo C.E., Sarmiento F.S., PUJ, A.C *Tesis de Licenciatura Microbiólogo Industrial*, **2007**, Pág. 1-120  
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis26.pdf>
11. Tomasso Mauricio, **2004**, Tolerancia de las Levaduras al Etanol, *UDELAR Facultad de Química*, Pág. 1-22  
<http://www.utu.edu.uy/Escuelas/departamentos/canelones/vitivinicultura/Bioquimica%20Enologica/Teoricos/Tolerancia%20etanol.PDF>
12. Mayra Alejandra Hurtado M., Ingrid Marcela Ramos P., Darly Silvana Parrado S., Héctor Egidio Guzmán A., **2011**, Aislamiento e Identificación de Bacterias Ácido Acéticas en Materia Prima y Tren de Fermentación en el Ingenio Providencia S.A., *Revista Técnicaña*, 4(27)  
[http://www.tecnicana.org/pdf/2011/tec\\_no27\\_2011\\_p6-12.pdf](http://www.tecnicana.org/pdf/2011/tec_no27_2011_p6-12.pdf)
13. Hernández Nodarse María Teresa, **2007**, Tendencias Actuales en la Producción de Bioetanol, *URL*, (8)17  
[http://www.tec.url.edu.gt/boletin/URL\\_08\\_ING01.pdf](http://www.tec.url.edu.gt/boletin/URL_08_ING01.pdf)
14. Leveau Y.J., Bouix M. **2000**. Microbiología Industrial, los microorganismos de interés industrial. Editorial ACRIBIA, S.A. p: 3-88, 529-559.

15. Madigan T., Michael, Martinko M., John, Parker, Jack. Brock Biología de los microorganismos. Pearson Prentice Hall. Décima edición. p: 957-985
16. Ríos del Risco, Carlos A., Fajardo, Mario, Pérez M., Juan Carlos. **2005**. Evaluación de una cepa de levadura para fermentar diferentes concentraciones de miel *Apis mellifera*. Estación experimental apícola Cuba.
17. Ospina, A. y Palacios, M. **1994**. Efectivo cultivo de levaduras sobre la carga orgánica de los efluentes de SUCROMILES S.A , *Tesis posgrado*. Facultad de Ingeniería , Universidad del Valle, Colombia 23-29p.
18. Swan, H y Karalazos, A. **1990**. Las melazas y sus derivados. *Revista Tecnología. Glepacea*. No. 19. España 78-82p.
19. NMX-F-277-1991
20. NMX-Y-327-1998-SCI
21. NMX-Y-327-1998-SCFI



## 6. ANEXO 1

### **6.1. Determinación de azúcares reductores directos y totales, método de Lane-Eynon**

El método volumétrico de Lane-Eynon que se basa en la determinación del volumen de una disolución de la muestra, que se requiere para reducir completamente un volumen conocido del reactivo alcalino de cobre. El punto final se determina por el uso de un indicador interno, azul de metileno, el cual es reducido a blanco de metileno por un exceso de azúcar reductor, este método es aplicable para los siguientes productos: leche evaporada y condensada, productos lácteos, néctares, jugos, mermeladas, cajetas, dulces, moles, jarabes y mieles.<sup>19</sup>

Establecer el procedimiento para la determinación de azúcares reductores directos (ARD) y azúcares reductores totales (ART) contenidos en las materias primas, en los materiales en proceso de producción, así como bebidas alcohólicas.

**Azúcares reductores:** monosacáridos que contiene en su molécula un grupo cetónico y un grupo aldehído, los cuales pueden ser detectados o estimado cuantitativamente por su oxidación con  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  o ferrocianuro, en un medio alcalino.

**Azúcares reductores directos:** son los azúcares reductores cuantificables directamente en la muestra.

**Azúcares reductores totales:** son monosacáridos que poseen grupos carbonilos libres, que se obtienen de la hidrólisis ácida y térmica de los polisacáridos.

**Factor de Fehling:** es la cantidad en gramos de azúcar invertida utilizada para reducir 10 mL de la mezcla de solución de Fehling.

**Solución de Fehling:** mezcla de partes iguales de la solución “A” (sulfato de cobre) y solución “B” (solución alcalina de tartrato) preparada en el momento de realizar la determinación.

### **Material del laboratorio**

- Bureta verificada o calibrada, preferentemente con punta lateral, de 50 mL con graduación de 0.1mL
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL
- Parrilla eléctrica Thermocientific
- Termómetro de -10 a 110°C
- Soporte universal con accesorios (pinzas)
- Balanza digital Scout Pro
- Cronómetro
- Goteros
- Probetas graduadas de 25, 250, 500 y 2000 mL
- Matraces volumétricos 50, 100, 200, 250 y 500 mL

### **Reactivos**

- Solución de cobre Fehling “A” grado reactivo marca Golden Bell
- Solución alcalina Fehling “B” grado reactivo marca Golden Bell
- Ácido clorhídrico 6.34 N grado reactivo marca Golden Bell
- Hidróxido de sodio 5.0 N
- Azul de metileno al 1.0% grado reactivo marca Golden Bell
- Fenolftaleína al 0.5% grado reactivo marca Golden Bell
- Agua destilada

### **Preparación de muestras**

En el caso de muestras sólidas solubles, pesar la cantidad de muestra (Tabla 3) y transferirlo a un matraz Erlenmeyer de 125 mL y disolverla en agua destilada.

En el caso de muestras líquidas, medir la cantidad de muestra recomendada en la Tabla 3 y transferir a un matraz volumétrico de la capacidad adecuada de acuerdo a la dilución que se quiera obtener.

### **Hidrólisis ácida**

Para la determinación de ART, adicionar 5 mL de ácido clorhídrico 6.34 N a la muestra ya preparada. Colocar en baño maría a temperatura controlada de 65 a 70°C; a partir de la cual se debe contabilizar el tiempo de hidrólisis, que va desde 5 min para muestras de agave a 15 min para muestras de otros azúcares. Al terminar la hidrólisis se debe enfriar la muestra y neutralizar el pH de nuestra solución y finalmente aforar con agua destilada.

### **Titulaciones volumétricas**

Está dividida en dos tipos de titulaciones; la primera es la titulación preliminar y la segunda es la titulación definitiva. La titulación preliminar es necesaria para comprobar que la dilución se preparó adecuadamente con la muestra problema, esto lleva a valores de volumen gastado que originan un cambio de color que, a su vez, demuestra que hubo reducción de todo el ion cúprico presente en la solución de Fehling, y que deben estar comprendido en un intervalo de 15 a 50 mL.

Si la dilución no logra el cambio de color dentro de este intervalo, será necesario preparar otra dilución de la muestra problema.

Además, esta titulación sirve para determinar el gasto volumétrico aproximado que se tendrá en cuenta en la titulación definitiva.

## **Titulación de la muestra**

Procedimiento a seguir:

1. Agregar 5 mL de la solución A, 5 mL de la solución B y de 20 a 50 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 250 mL
2. Colocar perlas de vidrio
3. Cargar la bureta con la solución problema hasta que la parte inferior del menisco coincida con la graduación cero de la misma
4. Colocar el matraz Erlenmeyer de 250 mL sobre la fuente de calentamiento y encender.
5. Calentar, hasta que inicie la ebullición.
6. Esperar alrededor de 2 min desde que inicia la ebullición.
7. Agregar 2 a 3 gotas de solución de azul de metileno al 1%.
8. Inmediatamente se agregar gota a gota la solución problema, hasta que desaparezca el color azul y se torne rojizo.
9. En este momento, se toma lectura del gasto volumétrico efectuado en el proceso de titulación y se registra.

## Cálculos

Con el gasto volumétrico obtenido de la titulación de la muestra problema, que está considerado en mL, interpolar en la tabla de gasto volumétrico vs concentración de azúcares en la Tabla 2 y hacer el cálculo correspondiente para obtener la cantidad real de mg de azúcar por cada 100 mL de solución que hay en la dilución de la muestra problema con la que se cargó la bureta.

Suponga que se obtiene un gasto volumétrico de 25.3 mL de solución de muestra problema, al interpolar en la Tabla 2 (mL de muestra vs mar/100 mL), se obtiene un valor de 208.88 mg de fructosa por cada 100mL de solución de muestra problema. Este valor se multiplica por un factor de dilución (FD), que se obtiene de acuerdo con la tabla de cantidades recomendadas para la preparación de muestras en la Tabla 3.

$$AR = \frac{mg\ AZ\ invertidos}{100\ mL} \times FD$$

donde:

$AR = \text{Azúcares reductores}$

$$\frac{mg\ AZ\ invertidos}{100\ mL} = GV\ interpolado$$

$$FD = \frac{volumen\ de\ la\ dilución}{volumen\ de\ muestra}$$

Posteriormente se reporta el resultado en % de azúcares reductores (AR) o en g de azúcares reductores por cada 1000 mL de solución ( $g^{AR}/L$ ).

**Tabla 2.** Concentración azúcares reductores para 10 mL de soluciones de Fehling (Método volumétrico de Lane-Eynon) ( $\text{mg}/_{100\text{mL}}$ ).

<i>mL</i> de solución de muestra problema	FRUCTOSA $\text{mg}/_{100\text{mL}}$	AZ. INV $\text{mg}/_{100\text{mL}}$	GLUCOSA $\text{mg}/_{100\text{mL}}$	<i>mL</i> de solución de muestra problema	FRUCTOSA $\text{mg}/_{100\text{mL}}$	AZ. INV $\text{mg}/_{100\text{mL}}$	GLUCOSA $\text{mg}/_{100\text{mL}}$	<i>mL</i> de solución de muestra problema	FRUCTOSA $\text{mg}/_{100\text{mL}}$	AZ. INV $\text{mg}/_{100\text{mL}}$	GLUCOSA $\text{mg}/_{100\text{mL}}$
15.0	348.00	336.66	227.33	21.0	250.48	242.86	235.71	27.0	195.92	190.37	184.81
15.1	345.89	334.62	325.35	21.1	249.39	241.76	243.68	27.1	195.26	189.69	184.19
15.2	343.78	332.58	323.36	21.2	248.29	240.65	233.66	27.2	194.59	189.01	183.56
15.3	341.66	330.54	321.38	21.3	247.20	239.55	232.63	27.3	193.93	188.33	182.94
15.4	339.55	328.50	319.40	21.4	246.10	238.44	231.61	27.4	193.26	187.65	182.31
15.5	337.44	326.46	317.42	21.5	245.01	237.34	230.58	27.5	192.60	186.97	181.69
15.6	335.33	324.41	315.43	21.6	243.92	236.24	229.55	27.6	191.94	186.29	181.07
15.7	333.22	322.37	313.45	21.7	242.82	235.13	228.53	27.7	191.27	185.61	180.44
15.8	331.10	320.33	311.47	21.8	241.73	234.03	227.50	27.8	190.61	184.93	179.82
15.9	328.99	318.29	309.48	21.9	240.63	232.92	226.48	27.9	189.94	184.25	179.19
16.0	326.88	316.25	307.50	22.0	239.54	231.82	225.45	28.0	189.28	183.57	178.57
16.1	324.96	314.45	305.81	22.1	238.50	230.86	224.51	28.1	188.66	182.97	177.95
16.2	323.03	312.65	304.12	22.2	237.46	229.89	223.58	28.2	188.04	182.37	177.34
16.3	321.11	310.84	302.43	22.3	236.42	228.93	222.64	28.3	187.43	181.78	176.72
16.4	319.19	309.04	300.74	22.4	235.38	227.96	221.71	28.4	186.81	181.18	176.11
16.5	317.27	307.24	299.05	22.5	234.34	227.00	220.77	28.5	186.19	180.58	175.49
16.6	315.34	305.44	297.35	22.6	233.29	226.03	219.83	28.6	185.57	179.98	174.87
16.7	313.42	303.64	295.66	22.7	232.25	225.07	218.90	28.7	184.95	179.38	174.26
16.8	311.50	301.83	293.97	22.8	231.21	224.10	217.96	28.8	184.34	178.79	173.64
16.9	309.57	300.03	292.28	22.9	230.17	223.14	217.0	28.9	183.72	178.19	173.03
17.0	307.65	298.23	290.59	23.0	229.13	222.17	216.09	29.0	183.10	177.59	172.41
17.1	306.00	296.63	288.92	23.1	228.22	221.29	215.23	29.1	182.52	177.00	171.87
17.2	304.34	295.03	287.25	23.2	227.30	220.40	214.37	29.2	181.95	176.41	171.33
17.3	302.69	293.43	285.58	23.3	226.39	219.52	213.51	29.3	181.37	175.81	170.79
17.4	301.03	291.83	283.91	23.4	225.48	218.63	212.65	29.4	180.79	175.22	170.25
17.5	299.38	290.23	282.24	23.5	224.57	217.75	211.80	29.5	180.22	174.63	169.71
17.6	297.73	288.62	280.57	23.6	223.65	216.87	210.94	29.6	179.64	174.04	169.16
17.7	296.07	287.02	278.90	23.7	222.74	215.98	210.08	29.7	179.06	173.45	168.62
17.8	294.42	285.42	277.23	23.8	221.83	215.10	209.22	29.8	178.48	172.85	168.08
17.9	292.76	283.82	275.56	23.9	220.91	214.21	208.36	29.9	177.91	172.26	167.54
18.0	291.11	282.22	273.89	24.0	220.00	213.33	207.50	30.0	177.33	171.67	167.00
18.1	289.63	280.74	272.50	24.1	219.12	212.48	206.67	30.1	176.76	171.15	166.49
18.2	288.15	279.25	271.11	24.2	218.64	211.62	205.84	30.2	176.19	170.63	165.99
18.3	286.67	277.77	269.72	24.3	217.36	210.67	205.01	30.3	175.61	170.10	165.48
18.4	285.19	276.28	268.33	24.4	216.48	209.42	204.18	30.4	175.04	169.58	164.98
18.5	283.72	274.80	266.95	24.5	215.60	209.07	203.35	30.5	174.47	169.06	164.47
18.6	282.24	273.31	265.56	24.6	214.62	208.21	202.52	30.6	173.90	168.54	163.96
18.7	280.76	271.83	264.17	24.7	213.84	207.36	201.69	30.7	173.33	168.02	163.46
18.8	279.28	270.34	262.78	24.8	212.96	206.51	200.86	30.8	172.75	167.49	162.95
18.9	277.80	268.86	261.39	24.9	212.08	205.65	200.03	30.9	172.18	166.97	162.45
19.0	276.32	267.37	260.00	25.0	211.20	204.80	199.20	31.0	171.61	166.45	161.94
19.1	274.94	266.08	258.75	25.1	210.43	204.05	198.47	31.1	171.11	165.93	161.43
19.2	273.56	264.80	257.50	25.2	209.65	203.30	197.64	31.2	170.60	165.41	160.93
19.3	272.17	263.51	256.23	25.3	208.88	202.55	197.02	31.3	170.10	164.89	160.42
19.4	270.79	262.22	255.00	25.4	208.10	201.80	196.99	31.4	169.59	164.37	159.92
19.5	269.41	260.94	253.75	25.5	207.33	201.06	195.96	31.5	169.09	163.85	159.41
19.6	268.03	259.55	252.50	25.6	206.56	200.31	194.83	31.6	168.58	163.33	158.90
19.7	266.65	258.36	251.25	25.7	205.78	199.96	194.10	31.7	168.08	162.81	158.40
19.8	265.26	257.07	250.00	25.8	205.01	198.81	193.88	31.8	167.57	162.29	157.89
19.9	263.82	255.79	248.75	25.9	204.23	198.06	192.65	31.9	167.07	161.77	157.39
20.0	262.50	254.50	247.50	26.0	203.46	197.31	191.92	32.0	166.56	161.25	156.88
20.1	261.30	253.34	246.32	26.1	202.71	196.62	191.21	32.1	166.06	160.79	156.43
20.2	260.10	252.17	245.14	26.2	201.95	195.92	190.50	32.2	165.55	160.33	155.99
20.3	258.89	251.01	243.96	26.3	201.20	195.23	189.79	32.3	165.05	159.88	155.54
20.4	257.69	249.84	242.78	26.4	200.44	194.93	189.08	32.4	164.54	159.42	155.10
20.5	256.49	248.68	241.61	26.5	199.69	193.84	188.37	32.5	164.04	158.96	154.65
20.6	255.29	247.52	240.43	26.6	198.43	193.15	187.65	32.6	163.54	158.50	154.20
20.7	254.09	246.35	239.25	26.7	198.18	192.45	186.94	32.7	163.03	158.04	153.76
20.8	252.88	245.18	238.07	26.8	197.43	191.76	186.23	32.8	162.53	157.59	153.31
20.9	251.68	244.02	236.89	26.9	196.67	191.03	185.52	32.9	162.02	157.13	152.87
33.0	161.52	156.67	152.42	39.0	137.43	133.33	129.74	45.0	119.78	116.22	113.11
33.1	161.07	156.21	151.97	39.1	137.09	133.00	129.42	45.1	119.52	115.97	112.85

33.2	160.63	155.75	151.52	39.2	136.74	132.66	129.09	45.2	119.26	115.72	112.62
33.3	160.18	155.29	151.08	39.3	136.40	132.33	128.77	45.3	119.00	115.46	112.37
33.4	159.74	154.83	150.63	39.4	136.06	132.00	128.44	45.4	118.74	115.21	112.13
33.5	159.29	154.37	150.18	39.5	135.72	131.67	128.12	45.5	118.48	114.96	111.88
33.6	158.84	153.90	149.73	39.6	135.37	131.33	127.80	45.6	118.21	114.71	111.63
33.7	158.40	153.44	149.28	39.7	135.03	131.00	127.47	45.7	117.95	114.46	111.39
33.8	157.95	152.98	148.84	39.8	134.69	130.67	127.15	45.8	117.69	114.20	111.01
33.9	157.51	152.52	148.39	39.9	134.34	130.33	126.82	45.9	117.43	113.95	110.90
34.0	157.06	152.06	147.94	40.0	134.00	130.00	126.50	46.0	117.17	113.70	110.65
34.1	156.61	151.65	147.55	40.1	133.70	129.71	126.22	46.1	116.92	113.48	110.44
34.2	156.16	151.25	147.15	40.2	133.40	129.41	125.93	46.2	116.67	113.26	110.22
34.3	155.71	150.84	146.76	40.3	133.09	129.12	125.65	46.3	116.42	113.04	110.01
34.4	155.26	150.44	146.36	40.4	132.79	128.83	125.36	46.4	116.17	112.82	109.79
34.5	154.82	150.03	145.97	40.5	132.49	128.54	125.08	46.5	115.93	112.60	109.58
34.6	154.37	149.62	145.58	40.6	132.19	128.24	124.80	46.6	115.65	112.37	109.37
34.7	153.92	149.22	145.18	40.7	131.89	127.95	124.51	46.7	115.43	112.15	109.15
34.8	153.47	148.81	144.76	40.8	131.58	127.66	124.23	46.8	115.18	111.93	108.94
34.9	153.02	148.41	144.39	40.9	131.28	127.36	123.94	46.9	114.93	111.71	108.72
35.0	152.57	148.00	144.00	41.0	130.98	127.07	123.66	47.0	114.68	111.49	108.51
35.1	152.12	147.59	143.60	41.1	130.67	126.77	123.37	47.1	114.44	111.26	108.28
35.2	151.78	147.18	143.20	41.2	130.36	126.46	123.07	47.2	114.24	111.03	108.06
35.3	151.38	146.77	142.80	41.3	130.04	126.16	122.78	47.3	114.03	110.79	107.83
35.4	150.99	146.36	142.40	41.4	129.73	125.86	122.48	47.4	113.81	110.56	107.61
35.5	150.59	145.95	142.00	41.5	129.42	125.56	122.19	47.5	113.59	110.33	107.38
35.6	150.19	145.53	141.60	41.5	129.11	125.25	121.89	47.6	113.37	110.10	107.15
35.7	149.80	145.12	141.20	41.7	128.80	124.95	121.60	47.7	113.15	109.87	106.93
35.8	149.40	144.71	140.80	41.8	128.48	124.65	121.30	47.8	112.94	109.63	106.70
35.9	149.01	144.30	140.40	41.9	128.17	124.34	121.01	47.9	112.72	109.40	106.48
36.0	148.61	143.89	140.00	42.0	127.86	124.04	120.71	48.0	112.50	109.17	106.25
36.1	148.21	143.53	139.65	42.1	127.59	123.78	120.45	48.1	112.27	108.97	106.03
36.2	147.81	143.17	139.30	42.2	127.31	123.51	120.20	48.2	112.04	108.76	105.82
36.3	147.40	142.80	138.95	42.3	127.04	123.25	119.94	48.3	111.81	108.56	105.60
36.4	147.00	142.44	138.60	42.4	126.76	122.98	119.68	48.4	111.58	108.36	105.38
36.5	146.60	142.08	138.25	42.5	126.49	122.72	119.43	48.5	111.35	108.16	105.17
36.6	146.20	141.72	137.89	42.6	126.22	122.46	119.17	48.6	111.12	107.95	104.95
36.7	145.80	141.36	137.54	42.7	125.94	122.19	118.91	48.7	110.89	107.75	104.73
36.8	145.39	140.99	137.19	42.8	125.67	121.93	118.65	48.8	110.66	107.55	104.51
36.9	144.99	140.63	136.84	42.9	125.39	121.66	118.40	48.9	110.43	107.34	104.30
37.0	144.59	140.27	136.49	43.0	125.12	121.40	118.14	49.0	110.20	107.14	104.08
37.1	144.24	139.90	136.13	43.1	124.84	121.12	117.87	49.1	109.98	106.93	103.89
37.2	143.88	139.53	135.77	43.2	124.55	120.85	117.60	49.2	109.76	106.71	103.70
37.3	143.53	139.16	135.41	43.3	124.27	120.57	117.33	49.3	109.54	106.50	103.52
37.4	143.17	138.79	135.05	43.4	123.98	120.30	117.06	49.4	109.32	106.28	103.33
37.5	142.82	138.43	134.69	43.5	123.70	120.02	116.80	49.5	109.10	106.07	103.14
37.6	142.47	138.06	134.33	43.6	123.41	119.74	116.53	49.6	108.88	105.86	102.95
37.7	142.11	137.69	133.97	43.7	123.13	119.47	116.26	49.7	108.66	105.64	102.76
37.8	141.76	137.32	133.61	43.8	122.84	119.19	115.99	49.8	108.44	105.43	102.58
37.9	141.40	136.95	133.25	43.9	122.56	118.92	115.72	49.9	108.22	105.21	102.39
38.0	141.05	136.58	132.89	44.0	122.27	118.64	115.45	50.0	108.00	105.00	102.20
38.1	140.69	136.26	132.58	44.1	122.02	118.40	115.22				
38.2	140.33	135.93	132.26	44.2	121.77	118.16	114.98				
38.3	139.96	135.61	131.95	44.3	121.52	117.91	114.75				
38.4	139.60	135.21	131.63	44.4	121.27	117.67	114.51				
38.5	139.24	134.96	131.32	44.5	121.03	117.43	114.28				
38.6	138.88	134.63	131.00	44.6	120.78	117.19	114.05				
38.7	138.52	134.31	130.69	44.7	120.53	116.95	113.81				
38.8	138.15	133.98	130.37	44.8	120.28	116.70	113.58				
38.9	137.79	133.66	130.06	44.9	120.05	116.46	113.34				

### Gasto volumétrico vs azúcares reductores

**Tabla 3.** Cantidades recomendadas para la preparación de muestras en la determinación de azúcares reductores directos (ARD) y azúcares reductores totales (ART).

MUESTRA	DILUCIÓN	TIEMPO DE HIDROLISIS	LECTURA DE COLUMNA DE TABLAS	EXPRESIÓN DE RESULTADOS
<b>Azúcar</b>	2g/1000mL	15 minutos	Azúcar Invertido	g/kg
<b>Piloncillo</b>	2,5g/1000mL	15 minutos	Azúcar Invertido	g/kg
<b>Meladura</b>	3,0 a 3,5g/1000mL	15 minutos	Azúcar Invertido	g/kg
<b>Melaza</b>	3,5 a 4,0g/1000mL	15 minutos	Azúcar Invertido	g/kg
<b>Jugos de Agave:</b>				
<b>Brix 0 a 1,2</b>	100mL/200mL	5 minutos	Fructosa	g/L
<b>Brix 1,2 a 1,9</b>	50mL/250mL	5 minutos	Fructosa	g/L
<b>Brix 1,9 a 3,9</b>	25mL/250mL	5 minutos	Fructosa	g/L
<b>Brix 3,9 a 8,0</b>	50mL/1000mL	5 minutos	Fructosa	g/L
<b>Brix 8,0 a 14,0</b>	25mL/1000mL	5 minutos	Fructosa	g/L
<b>Brix 14,0 a 18,0</b>	20mL/1000mL	5 minutos	Fructosa	g/L
<b>Brix 18,0 a 25,0</b>	10mL/1000mL	5 minutos	Fructosa	g/L
<b>Jugos Mixtos:</b>				
<b>Brix 0 a 1,2</b>	100mL/200mL	15 minutos	azúcar Invertido	g/L
<b>Brix 1,2 a 1,9</b>	50mL/250mL	15 minutos	azúcar Invertido	g/L
<b>Brix 1,9 a 3,9</b>	25mL/250mL	15 minutos	azúcar Invertido	g/L
<b>Brix 3,9 a 8,0</b>	50mL/1000mL	15 minutos	azúcar Invertido	g/L
<b>Brix 8,0 a 14,0</b>	25mL/1000mL	15 minutos	azúcar Invertido	g/L
<b>Brix 14,0 a 18,0</b>	20mL/1000mL	15 minutos	azúcar Invertido	g/L
<b>Brix 18,0 a 25,0</b>	10mL/1000mL	15 minutos	azúcar Invertido	g/L
<b>Agave Crudo</b>	100g/3000mL 50mL/200mL	5 minutos	Fructosa	g/kg
<b>Bagazo de Agave</b>	500g/4000mL 100mL/200mL	5 minutos	Fructosa	g/kg
<b>Fructosa pura</b>	3,0g/1000mL	5 minutos	Fructosa	g/kg



<b>Fructosa con mezcla de otros azúcares</b>	3,0g/1000mL	5 minutos	azúcar Invertido	g/kg
<b>Dextrosa</b>	3,0g/1000mL	5 minutos	Glucosa	g/kg
<b>Bebidas alcohólicas</b>	Dependiendo de la cantidad de extracto seco realizar la dilución: 100mL/200mL 25mL/500mL 25mL/1000mL	15 minutos	Azúcar Invertido	g/L

Diluciones recomendadas para la preparación de muestras