

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

CARRERA INTERDISCIPLINARIA EN TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Proyecto de graduación presentado a la Carrera
Interdisciplinaria en Tecnología de Alimentos
como requisito parcial para optar al grado
de Licenciado en Tecnología de Alimentos

OBTENCION DE ALCOHOL A PARTIR DE YUCA

MARIO PETERS REINFORD

Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio"

1982

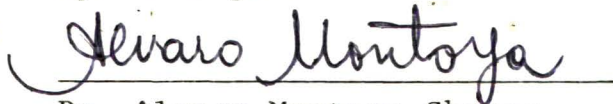
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
CARRERA INTERDISCIPLINARIA
EN TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Proyecto de graduación presentado para optar al
grado de Licenciado en Tecnología de Alimentos

OBTENCION DE ALCOHOL A PARTIR DE YUCA

MARIO PETERS REINFORD

Aprobado por:



Dr. Alvaro Montoya Chaves

Director del Proyecto



Dr. Luis Fernando Pacheco Bolaños

Profesor Asesor



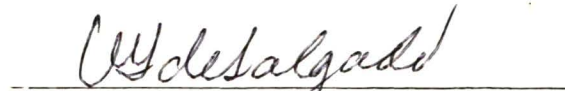
M.Sc. Manuel Koss Rubinstein

Profesor Asesor



M.Sc. Félix Del Barco Silva

Presidente del Tribunal



Dra. Vera García Cortés

Profesor Designado

1 9 8 2

DEDICATORIA

A mis padres: Myrtle y Rubén

A mi esposa : Claire Marie

A mi hijo : Mario Alberto

Y a mis hermanos

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a los señores: Dr. Alvaro Montoya Chaves, Dr. Luis Fernando Pacheco Bolaños y M.Sc. Manuel Koss Rubinstein, por su valiosa colaboración en la dirección y revisión de este trabajo.

También doy las gracias al Centro de Investigaciones en Tecnología de Alimentos, por el apoyo que me brindaron al permitirme utilizar el Laboratorio de Química y la Planta Piloto.

A la vez agradezco a todas aquellas personas e instituciones que en una u otra forma me prestaron su desinteresada ayuda, para llevar a feliz término este Proyecto de Graduación.

INDICE GENERAL

	<u>Página</u>
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
INDICE GENERAL	v
INDICE DE CUADROS	vi
INDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	2
III. REVISION BIBLIOGRAFICA	3
IV. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y EQUIPOS	31
V. RESULTADOS EXPERIMENTALES	43
VI. DISCUSION DE RESULTADOS	53
VII. CONCLUSIONES	58
VIII. RECOMENDACIONES	59
IX. BIBLIOGRAFIA	60

APENDICE

- A. RESULTADOS INTERMEDIOS
- B. MUESTRA DE CALCULO

INDICE DE CUADROS

<u>Cuadro N°</u>	<u>Descripción</u>	<u>Página</u>
1	Composición química promedio de yuca dulce y amarga	6
2	Composición química media de la raíz entera, de la corteza y del cilindro central de la yuca	7
3	Rendimiento de diferentes variedades de raíz de yuca cosechadas en la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit (Costa Rica)	8
4	Rendimiento de cosecha y cantidad de carbohidratos presentes en los tubérculos más cultivados en Costa Rica	9
5	Resultados obtenidos de porcentaje de almidón, porcentaje de azúcares reductores y de la eficiencia de la hidrólisis	47
6	Eficiencia de la fermentación de un hidrolizado de yuca a diferentes pH	48
7	Eficiencia de la fermentación de un hidrolizado de yuca a diferentes concentraciones de sulfato de magnesio y a pH 4.5. ...	49
8	Eficiencia de la fermentación de un hidrolizado de yuca a diferentes concentraciones de fosfato de amonio a pH 4.5.	50
9	Eficiencia de la fermentación de un hidrolizado de yuca con las variables en sus puntos óptimos	51
10	Eficiencia de la fermentación de un hidrolizado de yuca a diferentes concentraciones de vitaminas	52
11	Porcentaje de almidón presente en tres muestras de yuca	65
12	Prueba del pH en la fermentación de un hidrolizado de yuca a diferentes concentraciones	66

<u>Cuadro N°</u>	<u>Descripción</u>	<u>Página</u>
13	Prueba del sulfato de magnesio en la fermentación de un hidrolizado de yuca a diferentes concentraciones	67
14	Prueba del fosfato de amonio en la fermentación de un hidrolizado de yuca a diferentes concentraciones.	68
15	Principales variables en su punto óptimo de un hidrolizado de yuca..	69
16	Prueba de las vitaminas en la fermentación de un hidrolizado de yuca a diferentes concentraciones...	70
17	Costos en colones por litro de alcohol obtenido a partir de yuca ..	71

INDICE DE FIGURAS

<u>Figura N°</u>	<u>Descripción</u>	<u>Página</u>
1	Aspecto del clon de yuca a la edad de tres meses	10
2	Raíces de yuca cosechadas en su punto óptimo de crecimiento	11
3	Microfotografía de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> en gemación	20
4	La vía de fermentación de Embden-Meyerhof	27
5	Procedimiento experimental esquematizado	37
6	Marmita Groen utilizada en la hidrólisis de la yuca	39
7	Mini-fermentador mostrando sus partes	40
8	Destilador simple utilizado en la destilación	42
9	Eficiencia de la fermentación del hidrolizado de yuca a diferentes pH	43
10	Eficiencia de la fermentación del hidrolizado a diferentes concentraciones de sulfato de magnesio	44
11	Eficiencia de la fermentación del hidrolizado a diferentes concentraciones de fosfato de amonio	45
12	Eficiencia de la fermentación del hidrolizado a diferentes concentraciones de vitaminas	46

RESUMEN

Se procedió a la hidrólisis de los almidones de la yuca por vía enzimática y posteriormente se realizó una fermentación alcohólica por medio de levadura. Se utilizó en la licuefacción de los almidones una α amilasa (Termamyl 60 L.) y en la sacarificación una amiloglucosidasa (AMG. 150 L.) usando como substrato yuca (variedad valencia) molida con un 33% de sólidos totales. En la fermentación se utilizó una levadura de destilería con gran capacidad fermentativa. Este proceso se realizó variando el pH, las concentraciones de sulfato de magnesio, de fosfato de amonio y de un complejo vitamínico.

Al variar el pH dentro de un rango de 4 a 5 se encontró la máxima eficiencia fermentativa en 54.8% correspondiendo a un pH de 4.5. El sulfato de magnesio se trabajó a ese pH y a diferentes concentraciones siendo la más apropiada la de 1 g/L. Con este ingrediente hubo un aumento apreciable en la eficiencia fermentativa. Se probó luego el fosfato de amonio obteniéndose magníficos resultados. Se trabajó a diferentes concentraciones y la concentración de 2 g/L. llevó a una eficiencia fermentativa de 88.6%. La otra variable fué un complejo vitamínico compuesto por rivo flavina, niacina, tiamina que se utilizó a diferentes concentraciones dando resultados similares al ensayo donde no estuvo presente.

I INTRODUCCION

El alto costo actual del petróleo ha provocado en los países no productores una grave crisis de orden energético que los ha impulsado a la búsqueda y desarrollo de nuevas fuentes de energía.

Costa Rica por ser un país importador de petróleo no se escapa de esta problemática internacional. Una alternativa viable que ofrece nuestro territorio es la de aprovechar productos ricos en carbohidratos como materia prima para realizar fermentaciones y producir alcohol como un sustituto del petróleo.

Las diferentes materias primas que ofrecen posibilidad de proceso y producción de alcohol son: caña de azúcar, banano y tubérculos. Nuestro propósito fué trabajar con yuca.

La yuca o mandioca es una de las plantas fotosintetizadoras más eficientes que se conoce. Es ampliamente cultivada en nuestro país y resiste climas y suelos adversos siendo rica en carbohidratos ya que presentan en sus raíces de 20 a 45% de almidón y hasta 5% de azúcares reductores. Seca alcanza un 90% de almidón (Tobías y Lamo, 1976).

En la segunda guerra mundial muchos países se interesaron en la producción de alcohol a partir de yuca. Actualmente es importante promover de nuevo la utilización de alcohol como carburante.

II OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Hidrolizar los almidones presentes en la yuca utilizando enzimas y realizar una fermentación alcohólica por medio de levaduras.

1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1.2.1 Establecer un método eficiente y adaptado a nuestro medio para obtener alcohol a partir de yuca considerando las siguientes 4 variables: pH, concentración de sulfato de magnesio, concentración de fosfato de amonio y la concentración de un complejo vitamínico.

1.2.2 Determinar las condiciones óptimas de rendimiento en la fermentación alcohólica utilizando como sustrato el hidrolizado del almidón de la yuca.

III REVISION BIBLIOGRAFICA

1. GENERALIDADES DE LA YUCA

1.1. Taxonomía

La planta de la yuca es valiosa por las largas raíces tuberosas ricas en almidón. Abunda en regiones de climas tropicales y posee varios sinónimos tales como: yuca (Centro América), mandioca (Sur América) y cassava (Africa y sur-este de Asia). El nombre científico para la especie comercial es Manihot esculenta (Manihot utilisima se utiliza también en la literatura moderna), la cual pertenece a la familia de las Eufobiaceas y posee alrededor de 180 variedades. Es un arbusto que puede llegar a 4 ó 5 metros de altura pero entre los tipos cultivados no pasa de 2 a 3 metros (Montaldo, 1979).

1.2. Cultivo

Las raíces tuberosas se agrupan en un número variable y tienen por lo general una dirección de crecimiento oblicua. Estas raíces tienen de 20 a 40 centímetros de largo por 5 a 8 centímetros de diámetro; sin embargo pueden producirse raíces hasta de 2 metros de largo y de 20 a 30 cm. de diámetro.

El cultivo de la yuca resiste climas y suelos variados siendo la temperatura óptima de 20°C. Sin embargo puede crecer a temperaturas entre 10 y 30°C. Es una planta que crece

bien en condiciones de plena luz y sus rendimientos dependen principalmente de este factor que juega un papel esencial en la fotosíntesis. El viento es desfavorable cuando las plantas ya están desarrolladas y muchas veces suele causar la tentidura o tumbado de un cultivo.

Esta planta puede vegetar en toda clase de suelos a condición de que no estén expuestos a inundaciones y que sean suficientemente permeables para infiltrar el agua de las fuertes lluvias. Sin embargo los suelos permeables no son favorables cuando son húmedos ya que las raíces se pudren fácilmente. Los suelos profundos, ligeros, porosos y sueltos son los más convenientes.

Cuando se cultivan variedades mejoradas en los suelos fértiles, profundos, ricos en materia orgánica y en elementos minerales se obtienen rendimientos más elevados en raíces y almidón (Montaldo, 1979).

1.3. Composición

La raíz de yuca tuberosa se divide en tres partes:

- a- El periderma o película suberosa que se desprende fácilmente y que representa de 1 a 2% de la raíz total.
- b- La cáscara o corteza que forma de 12 al 20% de la raíz.
- c- El cilindro central o pulpa que forma del 78 al 85% de la raíz.

Está compuesto de liber (floema) y del tejido (xilema).
Este último tiene dos clases de elementos: los vasos leñosos y las células parenquimáticas llenas de almidón (Montaldo, 1979).

Cuadro N° 1

Composición química promedio de yuca dulce y amarga
(100 gr. base húmeda)

Composición	Raíz de yuca (dulce)	Raíz de yuca (amarga)
Humedad, %	65.2	60.6
Proteína, %	1.0	0.8
Grasa, %	0.4	0.3
Carbohidratos totales, %	32.8	37.4
Fibra, %	1.0	1.0
Cenizas, %	0.6	0.9
Calcio, mg.	40.0	36.0
Fósforo, mg.	34.0	48.0
Hierro, mg.	1.4	1.1
Vitamina A, mg.	trazas	5.0
Tiamina, mg.	0.05	0.06
Riboflavina, mg.	0.04	0.04
Niacina, mg.	0.60	0.70
Acido Ascórbico, mg.	19.0	40.0

Fuente: (Montaldo, 1979)

Cuadro N° 2

Composición química media de la raíz entera, de la corteza y del cilindro central de la yuca

Fracciones	Raíz entera		Corteza		Cilindro central	
	Húmeda	Seca	Húmeda	Seca	Húmeda	Seca
Humedad	61.0	-	72.0	-	59.0	-
Proteína	1.2	3.1	1.5	5.4	1.0	2.4
Grasa	0.4	1.1	0.6	2.1	0.4	1.0
Carbohidratos	34.9	89.4	21.7	77.5	37.5	91.0
Fibra	1.2	3.1	2.1	8.9	1.1	2.7
Cenizas	1.3	3.3	1.7	6.1	1.2	2.9

FUENTE: (Montaldo, 1979).

Cuadro N° 3

Rendimiento de diferentes variedades de raíz de yuca
cosechadas en la Estación Experimental Agrícola
Fabio Baudrit (Costa Rica)

Código	Variedad	Ton./Ha.	% de Almidón
Y-11	Blanca de Alajuela	35.00	32.25
Y-12	Pata de Paloma	32.12	31.37
Y- 5	Vagana	23.28	31.24
Y- 8	Valencia	22.40	32.42
Y- 4	Mangi	22.30	31.58
Y- 3	Brasil 31	22.16	26.25
Y- 2	Brasil 40	21.40	26.21
Y- 1	Brasil 36	21.02	25.71
Y-10	Amarilla de Guácimo	19.05	37.67
Y- 9	Movada de Esparta	17.19	30.67
Y- 6	Negrona	15.49	33.66
Y- 7	Agria	12.35	31.24

Fuente: (González, 1961)

Cuadro N° 4

Rendimiento de cosecha y cantidad de carbohidratos
presentes en los tubérculos más cultivados en Costa Rica

Tubérculo	Rendimiento (Ton./Ha.)	Carbohidratos (g / 100 g)
Yuca	22.40	32.42
Tiquisque	9.40	27.90
Camote	10.20	25.00
Ñames	10.80	24.30
Malanga	23.50	20.70
Patata	5.70	17.36

Fuente: (Montaldo, 1977)

Figura N° 1

Aspecto del clon de yuca a la edad de tres meses



Fuente: (Montaldo, 1977)

Figura N° 2

Raíces de yuca cosechadas en su punto óptimo de crecimiento



Fuente: (Montaldo, 1977)

2. CARACTERISTICAS DE LAS ENZIMAS

2.1. Introducción

Una de las características distintivas de la célula activa es su habilidad para desarrollar reacciones rápidamente y a la temperatura ambiente. Fuera de la célula estas reacciones se desarrollarían con demasiada lentitud. La compleja maquinaria metabólica fundamental para la célula no podría trabajar a velocidades tan bajas. Los principales agentes que participan en las notables transformaciones celulares pertenecen a un grupo de proteínas denominadas enzimas.

Las enzimas son catalizadores coloidales orgánicos generalmente solubles en agua, formados dentro de células vivas de vegetales o de animales pero capaces de actuar en el exterior de las células y sin conexión alguna con ellas. Como son proteínas, todos los agentes capaces de desnaturalizar a estos compuestos (como el calor, los ácidos y las bases fuertes, los solventes orgánicos y otros) hacen perder a las enzimas sus propiedades catalíticas.

La elevada especificidad de la función catalítica de las enzimas se debe a su naturaleza proteica. La compleja estructura de las proteínas les confiere la capacidad de establecer mecanismos específicos de reacción así como la capacidad para identificar solo a un limitado grupo de sustratos (Conn y Stumpf, 1977).

2.2. Efecto de la temperatura

La temperatura afecta a las reacciones químicas. Las reacciones enzimáticas no son excepción y por lo tanto son sensibles a los cambios de temperatura. Sin embargo el exceso de temperatura desnatura las enzimas por lo que disminuye su concentración efectiva y por lo tanto la velocidad de la reacción. Hasta determinada temperatura el efecto predominante corresponde a un incremento en la velocidad de la reacción. Sobre esa temperatura el proceso opuesto (desnaturalización térmica) adquiere cada vez más importancia hasta que este se acelera y destruye la función catalítica enzimática (Braverman, 1977).

2.3. Efecto del pH

Los cambios del pH afectan de manera notable el carácter iónico de los grupos amino y carboxílico de las enzimas, lo que a su vez modifica marcadamente el sitio catalítico y en general su conformación. Los valores bajos o altos de pH además de producir efectos puramente iónicos pueden determinar desnaturalización, consideración que también conduce a la inactivación enzimática.

En los estudios enzimáticos es muy importante establecer desde el principio de la investigación, el pH óptimo y los límites de actividad. Una vez establecido esto debe mantenerse

la reacción en un medio cuidadosamente controlado con soluciones amortiguadoras de adecuada capacidad estabilizadora (Wood et al., 1974).

2.4. Especificidad

La especificidad del sustrato es una característica importante de las enzimas. Estas pueden seleccionar para su ataque solo a un número limitado de compuestos. Ello se debe a la conformación de la molécula compleja de la proteína, a las características tan especiales del sitio activo y a la configuración estructural de la molécula del sustrato (Braverman, 1980).

2.5. Enzimas amilolíticas

La α amilasa proveniente del páncreas de diversos animales, de vegetales y microorganismos, actúa al azar sobre los enlaces α 1, 4 de la amilosa y de la amilopectina provocando un descenso rápido de la viscosidad de las soluciones y dando polisacáridos de menor tamaño.

La amiloglucosidasa ataca las dextrinas producidas por la acción de las enzimas precedentes, hidrolizando específicamente a glucosa, al romper los enlaces α 1, 4 así como los enlaces α 1,6.

La acción de las enzimas amilolíticas sobre los gránulos

de almidón depende en gran parte del grado de hidratación así como de la estructura de los gránulos ya que hay diferentes estructuras según el origen.

La amilasa denominada comercialmente Termamyl 160L es producida por el Bacillus licheniformis y posee una actividad de 60 unidades kilo novo/gramo (una unidad novo es la cantidad de enzima que hidroliza 5.26 mg de almidón/hora, bajo condiciones standard.

La amiloglucosidasa (AMG 150 L.) puede obtenerse del Aspergillus niger y posee una actividad de 150 unidades amiloglucosidasa/mililitro (una unidad de amiloglucosidasa es la cantidad de enzima que parte un micromol de maltosa por minuto a 25°C (Cheftel, 1980).

2.6. Cofactores

Un gran número de enzimas requieren un componente adicional para poder desempeñar sus funciones catalíticas. Estos componentes se definen con el término genérico de cofactor. Los cofactores pueden dividirse en tres grupos:

- A- Grupos prostéticos: cofactor unido firmemente a la proteína enzimática.
- B- Coenzima: molécula orgánica pequeña y estable al calor que fácilmente se disocia de la proteína enzimática.

C- Grupo metálico: está representado por los cationes mono y divalentes que pueden estar unidos débil o firmemente a la proteína enzimática (Conn y Stumpf, 1977).

3. LEVADURAS

3.1. Generalidades

Las diversas características de los hongos han creado ideas encontradas en cuanto a su posición taxonómica. Frecuentemente y por factores de conveniencia se incluyen dentro del reino vegetal en el grupo de las Thallophytas que se caracteriza por carecer de flores, raíces y tallo, estando constituidas por lo que se conoce simplemente como un " talo ". Son colocados así junto a las bacterias, algas y líquenes.

Observaciones más recientes parecen indicar que existen aspectos particulares de los mismos que permiten agruparlos dentro de un nuevo reino: el reino Fungi (Whittaker, 1969).

Las levaduras son hongos que se caracterizan por presentar un talo unicelular, el que se reproduce por un proceso de gemación que origina esporas asexuales conocidas como blastosporas. Pueden dividirse en dos clases, los que forman esporas sexuales o verdaderas levaduras representada por la familia Endomycetaceae y las que no forman esporas sexuales o pseudo-levaduras, que están representadas, por las familias Rhodotorulaceae, Torulopsidaceae y Nectaromycetaceae. Las verdaderas levaduras incluyen alrededor de 17 géneros y un gran número de especies, muchas de las cuales tienen a su vez gran cantidad de razas o tipos que se

diferencian entre sí ligeramente. El género Saccharomyces es de relevante interés por pertenecer a él la mayor parte de las levaduras que tienen aplicación técnica (Frazier, 1976).

Donde mejor se desarrollan las levaduras es en las soluciones que contienen azúcar y otros elementos necesarios. En el caldo nutritivo las células suelen estar separadas o en grupos de dos y tres y unidas unas a otras en pequeños apiñamientos que son en realidad grupos de células de generaciones distintas, dado el método característico de reproducción por gemación. Si agitamos el líquido, estos grupos se separan y gran parte de las células caen al fondo como células sedimentarias. Si el caldo de cultivo está en reposo pueden aparecer en su superficie islas de células o películas de mayor o menor complejidad. A veces estas células superficiales pueden aparecer como cadenas o filamentos de células como si fueran hifas y a menudo con cierto número de células más pequeñas o yemas. Si los medios sólidos son adecuados se producen colonias compactas que varían en tamaño y alineación superficial, según la naturaleza del substrato y la edad de la colonia (Frazier, 1976).

3.2. Morfología

Las células individuales de levadura suelen ser esféricas, ovoideas o elipsoideas. Algunas levaduras pueden presentar células muy ensanchadas o alargadas. Sin embargo, la

forma de la célula no es un indicio para la identificación de especies, ni la variedad de formas en un mismo cultivo es una prueba de contaminación del mismo. Las levaduras no poseen flagelos y en consecuencia las células son inmóviles (Figura N° 6), (Prescott, 1952).

3.2.1 Tamaño de las células

El tamaño de las células de levadura varía considerablemente, según la especie, nutrición, edad y otros factores. Pueden oscilar de 1 a 5u o más de anchura, y de 1 a 10u de longitud. Las células esféricas de levaduras industriales tienen un diámetro medio de 4 a 6u; pero puede haber grandes diferencias aún en un mismo cultivo. La mayoría de las levaduras de tamaño excesivamente pequeño no tienen importancia industrial, a no ser que estén presentes como contaminantes.

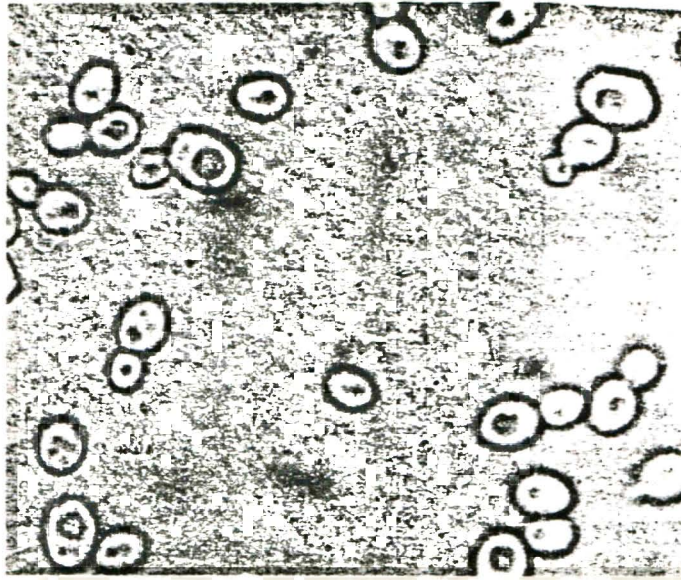
Las células de levadura son por lo general mucho más grandes que las células bacterianas y no pueden ser confundidas con ellas si se observan al microscopio (Prescott, 1952).

3.3. Composición química

Las levaduras contienen de 68 a 83% de humedad. El contenido de proteínas, carbohidratos, grasa y ceniza varía considerablemente según la clase de levadura y las condiciones en que se ha desarrollado (Prescott, 1952).

Figura N° 3

Microfotografía de Saccharomyces cerevisiae
en gemación



FUENTE: (Frazier, 1976).

3.4. Reproducción

Las verdaderas levaduras, Endomycetaceae, pueden reproducirse vegetativamente por gemación o por escisión y también por formación de esporas.

Durante la gemación se traslada materia citoplasmática y nuclear de la célula madre a una yema. La yema se estrecha por su base, se forma una pared que cierra el estrechamiento y la célula puede separarse, o bien seguir unida a la célula madre durante algún tiempo. La célula madre puede formar yemas en dos o más lugares al mismo tiempo.

La escisión es parecida al de la escisión bacteriana, donde la célula madre crece, se alarga, se va estrechando por la mitad y se forma una pared divisoria, resultando dos células nuevas (Rhodes y Fletcher, 1969).

Otro proceso de reproducción propio de las verdaderas levaduras es la esporulación sexual. Las esporas se forman en números de 1, 4, 6, 8 y raramente 12 y son conocidas por ascosporas o endosporas, llamándose las células que las contiene ascas o ascidios (Prescott, 1952).

3.5. Aspectos nutricionales

Tanto las levaduras como las bacterias y otras formas de vida, requieren de ciertos materiales alimenticios y

condiciones en el medio para un apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son básicamente necesarios como por ejemplo: carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno, fósforo, potasio, azufre, calcio, hierro y magnesio. Se requieren también algunas vitaminas y otros compuestos orgánicos para el desarrollo satisfactorio y el funcionamiento normal de muchos tipos de levaduras. Un suministro adecuado de agua es esencial para que puedan llevar a cabo sus actividades vitales (Prescott, 1952).

3.6. Efectos de las vitaminas sobre la asimilación del nitrógeno

La capacidad o incapacidad de una determinada especie de levadura para utilizar una fuente dada de nitrógeno se ha empleado como método para clasificar las levaduras.

Se ha encontrado que las levaduras utilizan diferentes clases de compuestos nitrogenados si se emplea un medio especial, que contiene vitaminas y ciertos oligoelementos; con este medio, las levaduras pueden asimilar nitrógeno de fuentes que de otra forma no utilizarían (Prescott, 1952).

3.7. Enzimas de las levaduras

Las enzimas de levadura son de dos clases: endoenzimas (intracelulares) y exoenzimas (extracelulares).

Las enzimas que producen las levaduras comprenden al menos tres grupos diferentes: las relacionadas con la respiración, las relacionadas con la escisión de azúcares hasta el grado de hexosa, por ejemplo la maltasa y la invertasa, y finalmente aquellas relacionadas con la fermentación alcohólica.

Las enzimas catalizan los cambios químicos complejos que tienen lugar en las soluciones nutritivas de azúcar. El que un carbohidrato sea o no fermentado o asimilado depende de la naturaleza de las enzimas elaboradas por la levadura y de las condiciones dadas.

Las enzimas de la levadura pueden clasificarse en hidrolasas y desmolasas. Las hidrolasas convierten los carbohidratos, proteínas y ésteres en sustancias más sencillas mediante adición de agua seguida generalmente por una escisión. Por ejemplo, la sacarosa es convertida previa absorción de agua en una molécula de glucosa y una de fructosa como resultado de la acción de la enzima sacaridasa.

Las desmolasas son enzimas o complejos de enzimas que intervienen en la respiración y el metabolismo. La zimasa es una desmolasa de origen intracelular y nunca o casi nunca pasa a través de la pared de la célula hacia el medio que la rodea.

La zimasa no es una enzima simple, sino un complejo de enzimas y coenzimas. Se ha utilizado la palabra holoenzima

para incluir los complejos de zimasa con todos sus activantes. Se considera que la hexoquinasa, la óxido-reductasa, la enolasa, la carboxilasa y la fosfatasa son algunas de las enzimas de este complejo (Prescott, 1952).

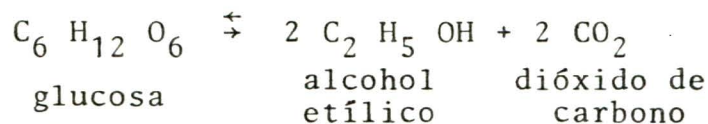
4. TEORIA DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA

4.1. Introducción

En los primeros estudios realizados sobre el mecanismo de la producción del alcohol etílico solamente interesaba el conocimiento de los productos iniciales y finales.

Black manifestó en el siglo XVIII que los únicos productos formados por el azúcar durante la fermentación alcohólica era el alcohol etílico y el dióxido de carbono. Lavoisier halló en 1789, además de los dos productos citados, otro producto al que dió el nombre de ácido acético. De 95.9 partes de azúcar obtuvo 57.7% de alcohol etílico, 33.3% de CO₂ y 2.5% de ácido acético. El trabajo de Lavoisier se considera como el primer estudio cuantitativo sobre la fermentación alcohólica, aunque sus resultados fueron poco exactos.

Gay-Lussac investigó más intensamente este campo abierto por Lavoisier y formuló la siguiente ecuación para indicar cuál era a su modo de ver, la reacción química esencial de la fermentación alcohólica.



De 45 partes de glucosa obtuvo 23 de alcohol y 22 de CO₂.

Hacia el año 1857, Pasteur empezaba a obtener los resultados de sus investigaciones sobre la fermentación. Demostró que 100 partes de sacarosa daban lugar a 105.4 partes de azúcar invertido, las que a su vez producían 51.1 partes de etanol, 49.4 de CO_2 , 3.2 de glicerina, 0.7 de ácido succínico y una parte de otras sustancias demostrando así que las relaciones establecidas por Gay-Lussac no eran muy exactas (Prescott, 1952).

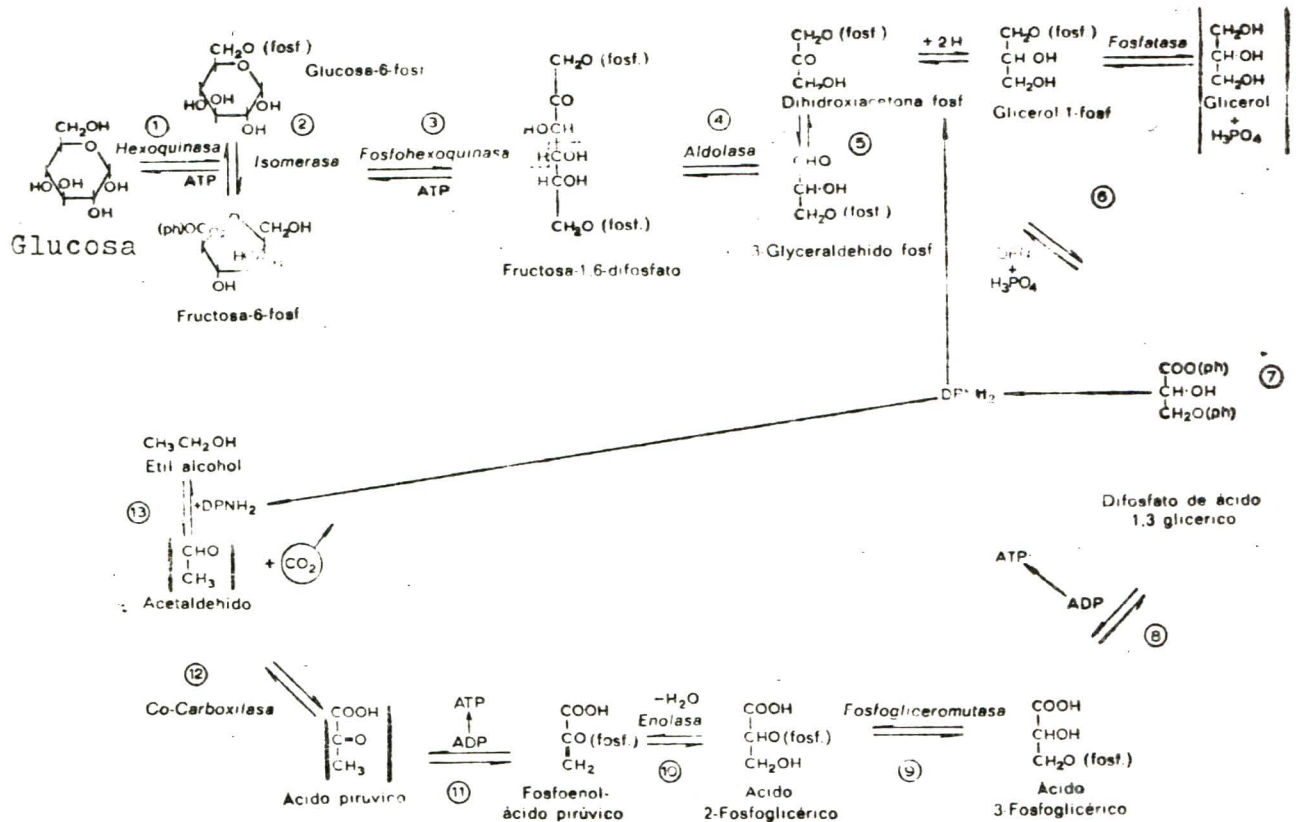
4.2. La vía de Embden-Meyerhof

Según la vía de Embden-Meyerhof (Figura N° 7), las primeras etapas (1,2 y 3 de la fermentación) consiste en la fosforilación de la hexosa por medio de una enzima (hexoquinasa) que contiene ATP como grupo prostético. La hexoquinasa, con la ayuda de la fosfoglucomutasa y la fosfoglucoisomerasa, se produce primero glucosa-6-fosfato, luego glucosa-1-fosfato, luego fructosa-6-fosfato y finalmente fructuosa-1, 6-difosfato.

La última hexosa fosforilada citada ha adquirido del ATP la cantidad de energía precisa para su fisión en dos triosas: fosfodihidroxiacetona y 3-fosfogliceraldehído. Esta fisión (paso 4) es producida por la aldolasa, estableciéndose un equilibrio entre las dos triosas. Si la fermentación prosigue normalmente sin interferencias internas el equilibrio se desplaza hacia el 3-fosfogliceraldehído porque está constantemente oxidándose a ácido 3-fosfoglicérico.

Figura N° 4

La vía de fermentación de Embden-Meyerhof



FUENTE: (Braverman, 1980).

Esta oxidación es catalizada por una deshidrogenasa que contiene NAD (Nicotinamida adenina dinucleótido) como grupo prostético. Otra molécula de fosfato se une en este instante al ácido glicérico y es transferida de nuevo al ADP (etapa 8).

El ácido 3-fosfoglicérico es isomerizado luego (Adenina difosfato) (etapa 9) por acción de la fosfogliceromutasa a ácido 2-fosfoglicérico y pierde una molécula de agua quedando convertido (etapa 10) en ácido fosfoenolpirúvico, que pierde su molécula de ácido fosfórico transfiriéndola al ADP con lo cual se forma una molécula de ATP (Adenina trifosfato) que vuelve a entrar en el ciclo y se forma el ácido pirúvico. En la próxima etapa (11) se descarboxila la forma ceto del ácido pirúvico perdiendo una molécula de CO_2 ; etapa que es catalizada por la carboxilasa (paso 12) una enzima cuyo grupo prostético está constituido por la fosfotiamina (tiamina fosforilada, vitamina B_1).

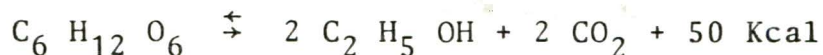
La descarboxilación deja como residuo acetaldehído que es deshidrogenado ahora por el NAD a alcohol etílico (paso 13). Si en esta etapa tiene lugar cualquier interferencia, por ejemplo la reacción entre el acetaldehído y el dióxido de azufre, el NAD no podrá transportar el hidrógeno al acetaldehído y lo transferirá a la segunda triosa formada a partir de la fructuosa 1, 6-difosfato formada al principio de la vía

(etapa 5), la fosfodehidroacetona. Esta última es reducida entonces a glicerol con lo que sólo la mitad de la hexosa queda convertida en acetaldehido, en tanto la otra mitad produce glicerol (Braverman, 1980).

4.3. Energética de la fermentación

Cada molécula de hexosa fermentada produce dos moléculas de etanol y otras dos de dióxido de carbono. En lo que al sistema ADP-ATP se refiere, se utilizan dos moléculas de ATP durante la fosforilización a fructosa-1, 6-difosfato, al comienzo del proceso, que se convierte así en ADP. Cuatro nuevas moléculas de ATP se forman, sin embargo, al final de la reacción.

La pérdida total de energía durante el proceso de fermentación es de unas 50 Kcal por cada molécula gramo de glucosa fermentada



Aproximadamente la mitad de esta energía se requiere para que las dos moléculas de ADP fijen el último fosfato rico en energía para formar ATP.

El resto de la energía se disipa en forma de calor; por lo que durante el proceso de fermentación se mantiene una temperatura ligeramente superior a la del medio.

La fermentación alcohólica, como ya se ha dicho, puede tener lugar sin células de levaduras vivas si se utiliza jugo de levadura. Esta fermentación es menos activa y mucho más lenta. La única explicación posible de este hecho es que las enzimas se hallan distribuidas al azar en el jugo de levadura y en cambio en la célula mantienen un alto grado de organización.

La fermentación alcohólica origina numerosos subproductos tales como: aceite de fusel, cuyos principales constituyentes son el alcohol isoamílico, el ácido succínico, varios ésteres e incluso algunas sustancias amargas (Braverman, 1980).

IV PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y EQUIPO

En este proyecto se desarrollaron las siguientes etapas:

- 1- Preparación de la materia prima
- 2- Hidrólisis
- 3- Fermentación del hidrolizado
- 4- Destilación alcohólica
- 5- Determinación del alcohol en la solución hidroalcohólica
- 6- Otras determinaciones.

1. PREPARACION DE LA MATERIA PRIMA

Se preparó adecuadamente la yuca mediante los siguientes pasos:

1.1. Pesado

Se realizó en balanzas granatarias con el propósito de establecer la cantidad de materia prima.

1.2. Lavado y descascarado

Después de pesar la yuca se procedió a lavar y descascarar, lo cual se realizó con cuchillo en pilas con agua potable. Ello con el fin de eliminar impurezas

1.3. Desintegrado

Esta operación se realizó en molinos de disco. La finalidad de esta operación fué de aumentar la superficie de contacto de la materia prima exponiéndola más fácilmente al calor y a los agentes sacarificantes (Tobías y De Lamo, 1976).

2. HIDROLIZADO

Se preparó la lechada de forma que tuviera un 33% de sólidos totales. El pH se ajustó a 7.0 utilizando ácido clorhídrico e hidróxido de sodio 1N. La lechada se transfirió a una marmita con agitador de velocidad variable (0-3000 RPM). En la hidrólisis se dieron dos pasos fundamentales: licuefacción y sacarificación

2.1. Licuefacción

El propósito de la licuefacción fue convertir los almidones en dextrinas y maltosas. Se realizó de la siguiente forma: a la yuca desintegrada que se encontraba en la marmita se le añadió con pipeta 0.125% (peso por peso de sólidos disueltos) de la α amilasa (Termamyl 60 L.) y se reguló el ión de calcio (con CaCl_2) para que estuviera a una concentración final de 14 partes por millón. La temperatura se llevó a 105°C entre 5 y 10 minutos utilizando vapor. La temperatura se mantuvo por 6 minutos con agitación para romper las células parenquimáticas que contienen los gránulos de almidón.

La mezcla se enfrió rápidamente a 95°C, temperatura a la cual se llevó a cabo la licuefacción. Estas condiciones se mantuvieron por 2 horas (Lages y Tennembaum, 1978).

2.2. Sacarificación

El propósito de la sacarificación fue de convertir las dextrinas y maltosas en moléculas de glucosa.

Antes de la sacarificación la temperatura se bajó a 60°C y el pH se ajustó entre 4.8 y 5.0. Luego se añadió la amiloglucosidasa (AMG. 150 L.) a una concentración de 0.05% (volumen por peso) y se mantuvo en estas condiciones por 24 horas con agitación constante (Lages y Tennembaum, 1978).

3. FERMENTACION DEL HIDROLIZADO

La fermentación del hidrolizado se realizó en tres pasos fundamentales que fueron: la preparación del inóculo, la estandarización del mosto y la fermentación del mosto.

3.1. Preparación del inóculo

El microorganismo seleccionado fue una levadura de destilería Saccharomyces cerevisiae, que se obtuvo como cultivo puro y se mantuvo en un medio de agar malta.

El inóculo se preparó introduciendo en un erlenmeyer de 250 ml, 50 ml de mosto diluido, el cual se esterilizó por 15 minutos a 15 libras de presión por pulgada cuadrada. Luego el medio se inoculó con la levadura, se agitó y se mantuvo por 24 horas a una temperatura entre 25 y 30°C (Prescott, 1952).

3.2. Estandarización del mosto

Se controlaron las variables más importantes como son: el pH, la concentración de azúcar y algunas sustancias nutritivas.

El pH fue ajustado a valores entre 4.0 y 5.0, ya que favorece a la levadura inhibiendo la mayoría de las bacterias. La concentración de azúcar se estandarizó entre 12 y 15%, puesto que concentraciones altas actúan adversamente sobre la levadura. También se ajustaron las diferentes concentraciones

utilizadas de sulfato o fosfato, siendo las siguientes:

Sulfato de magnesio : 0.25 - 0.50 - 1.0 - 2.0 gramos/litro

Fosfato de amonio: 1.0 - 2.0 - 4.0 - 6.0 gramos/litro

Complejo vitamínico: 0.025 - 0.050 - 0.075 gramos/litro

3.3. Fermentación del mosto

Una vez que el mosto estuvo debidamente estandarizado se procedió a inocularlo para dar lugar a la fermentación. La temperatura inicial fue de alrededor de los 20 a 25°C, dependiendo de la temperatura ambiente. Durante la fermentación aumentó la temperatura del mosto; la cual se mantuvo a 30°C que es la óptima temperatura, muy por encima de los 30°C el alcohol se evapora y aumenta el desarrollo bacteriano. El tiempo de la fermentación fue de aproximadamente 48 horas y se llevó a cabo en anaerobiosis (Prescott, 1952).

Las siguientes condiciones fueron constantes:

- La temperatura: 30°C.
- La concentración de la levadura: 10% P/P
- El tiempo de fermentación: 48 hr.
- La concentración de azúcares reductores: 13%
- El volumen a fermentar: 500 ml.

Pasadas las 48 horas se procedió a la destilación de el mosto.

4. DESTILACION ALCOHOLICA

Se obtuvo el alcohol de la mezcla hidroalcohólica por destilación, basado en el punto de ebullición del agua y el etanol. Esto se hizo por destilación simple. El destilado fue una solución hidroalcohólica ya que dos líquidos miscibles afectan sus tensiones de vapor recíprocamente y ninguno de los compuestos destila independientemente del otro. En consecuencia el destilado o vapor condensado fue una mezcla de los dos compuesto La destilación se detuvo cuando el vapor alcanzó una temperatura de 96°C (Saéñz y Jiménez, 1975).

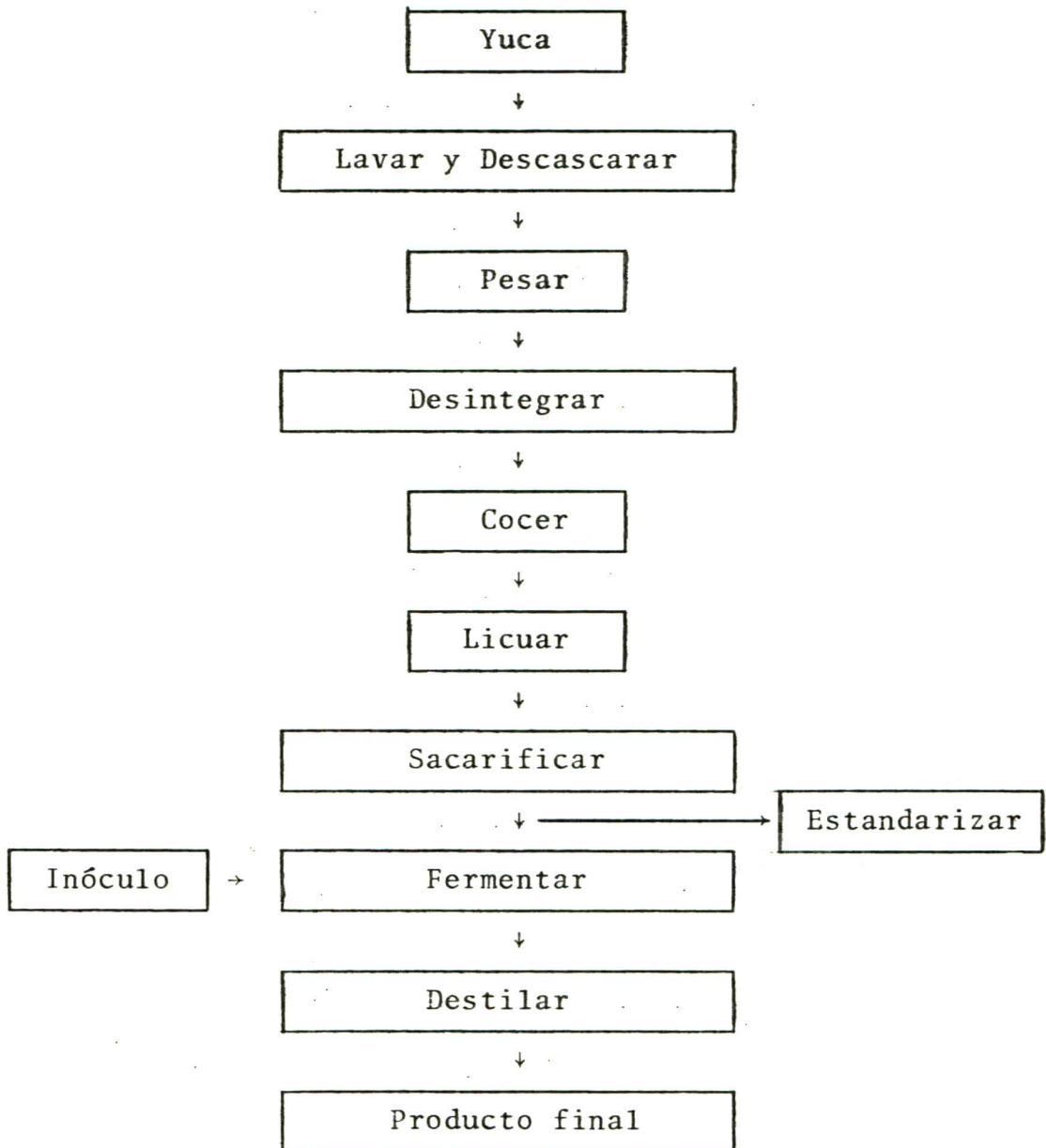
5. DETERMINACION DEL ALCOHOL EN LA SOLUCION HIDROALCOHOLICA

La solución hidroalcohólica recogida se transfirió a un balón de 200 ml., se aforó, y se enfrió determinándose con el picnómetro el peso específico. Con el peso específico se ubicó en las tablas correspondientes obteniendo así el porcentaje de alcohol en el mosto.

6. OTRAS DETERMINACIONES

Se determinó el almidón presente en la yuca por el método espectrofotométrico de Gaines y los azúcares presentes en el hidrolizado por el método de Lane Eynon y la acidez total (A.O.A.C.).

Procedimiento experimental esquemático



EQUIPO UTILIZADO

<u>EQUIPO</u>	<u>FABRICANTE</u>	<u>MODELO</u>
Agitador Metálico	Corning	HP6
Balanza Analítica	Mettler Instrument	H35AR
Calentador Eléctrico	Corning	HP6
Espectrofotómetro	Pye Unicam Ltd.	SP6
Licuadaora	John Oster M.F.G. Co.	450
Marmita Groen	Groen Division Corporation	FD20
Mini-Fermentador	Fermentation Design, Inc.	18103
Moledora	The Hobart M.F.G. Co.	1316629
pH-metro	Pye Unicam Ltd.	PW9418
Balanza Granataria	Detecto Jacobs	1U 12A
Termómetro	Weston	2261

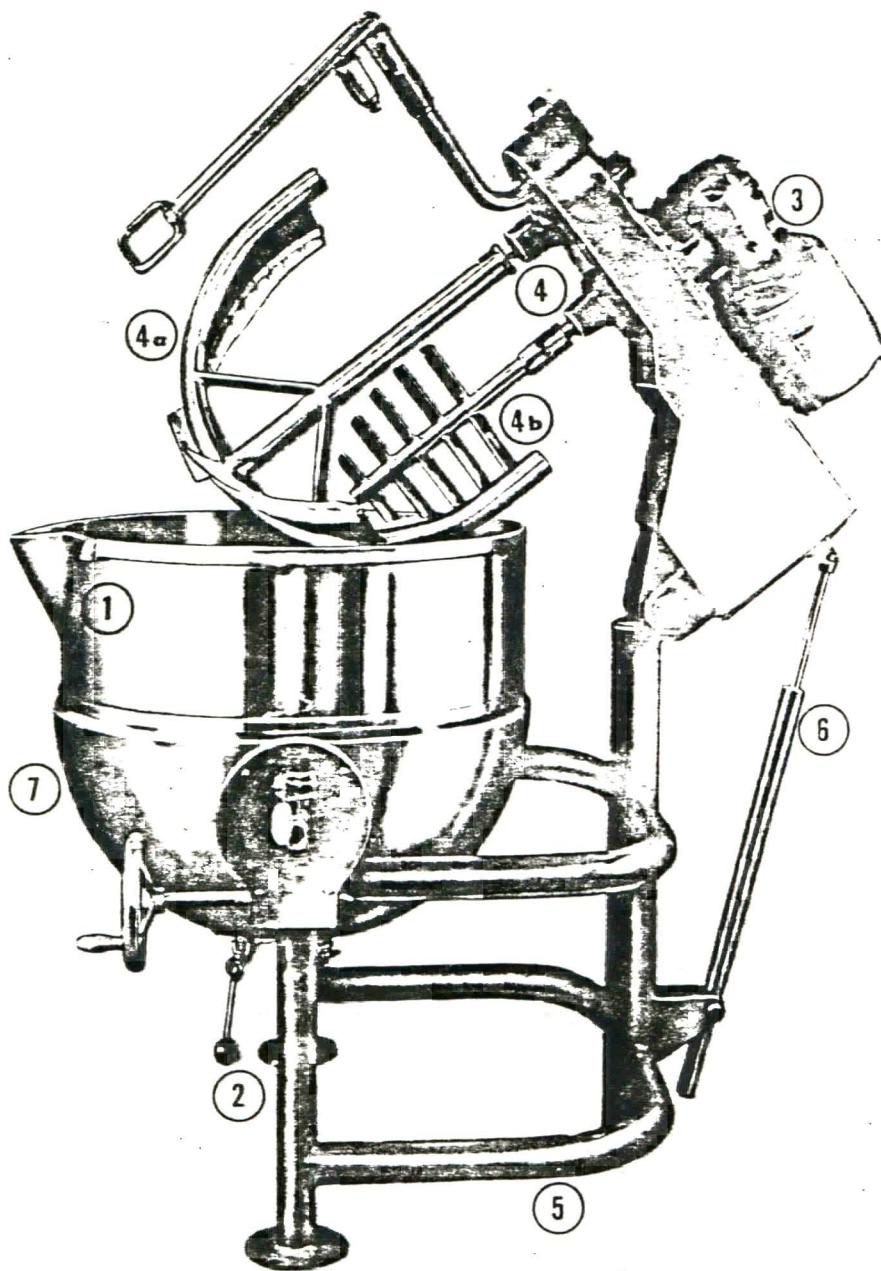
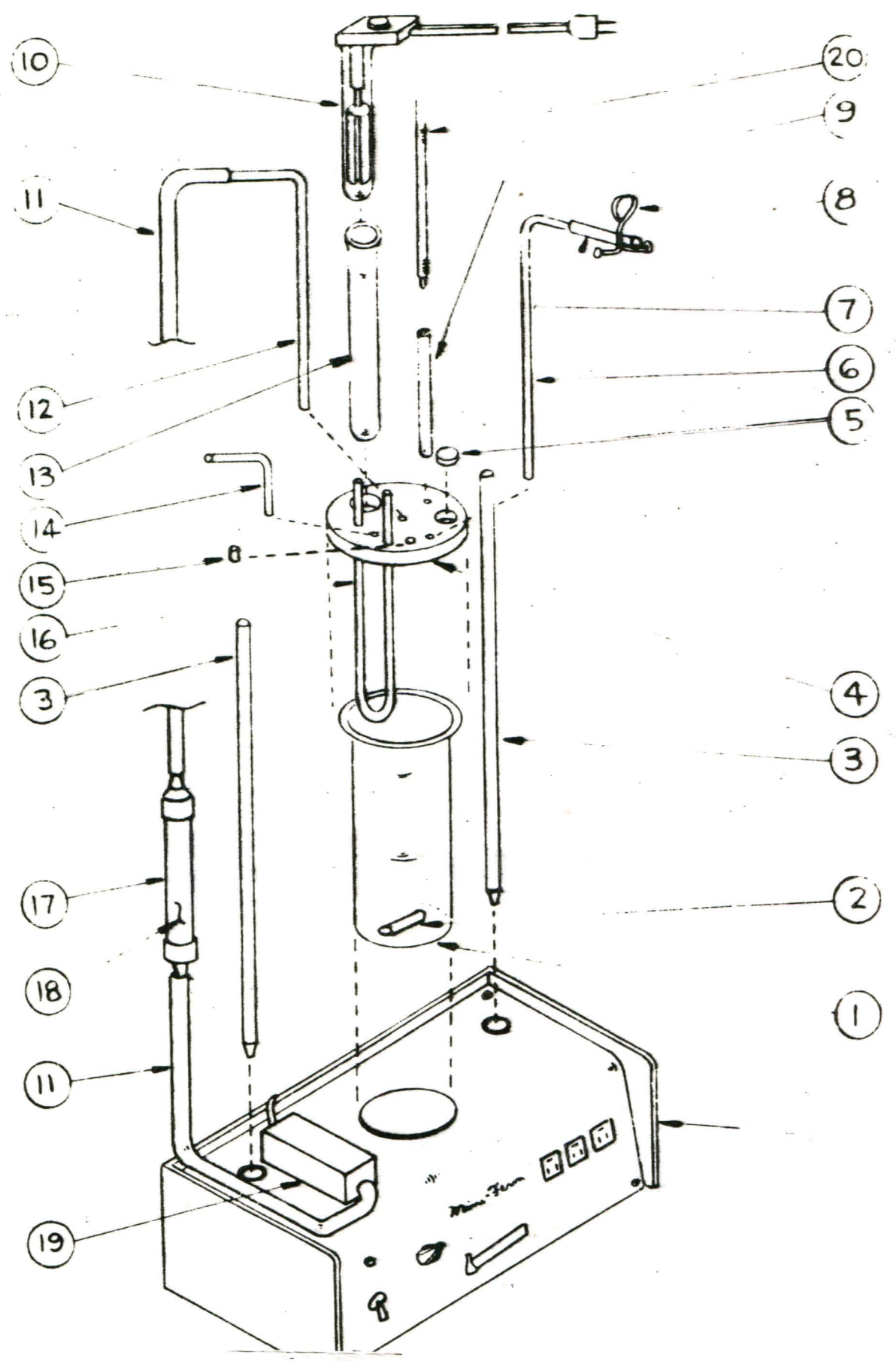


Figura N° 6

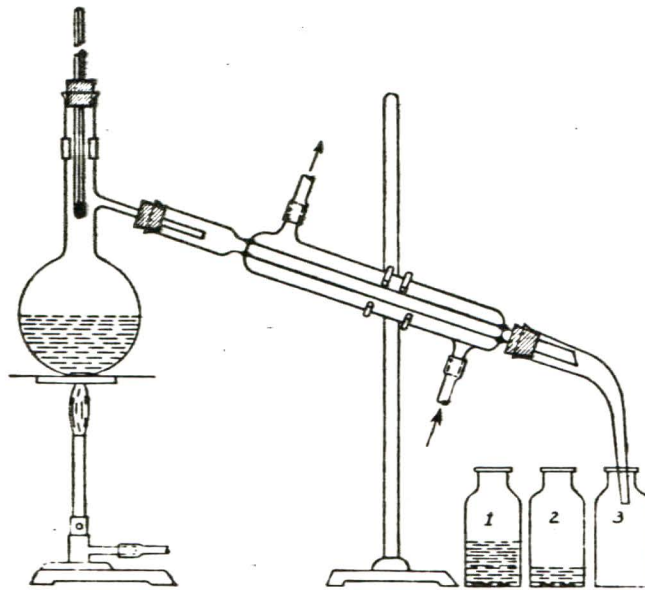
Marmita Groen utilizada en la hidrólisis de la yuca

Mini-fermentador mostrando sus partes



<u>Número de las partes</u>	<u>Nombre de las partes</u>
1	Beaker
2	Agitador magnético
3	Barra
4	Tapa
5	Jeringuilla
6	Toma muestra
7	Tubería de 3"
8	Pinza
9	Pozo para el termómetro
10	Calentador
11	Tubería de 8"
12	Tubería de entrada de aire
13	Tubo de ensayo
14	Línea de escape
15	Tapón disponible
16	Intercambiador de calor
17	Filtro de aire
18	Embalaje del filtro
19	Impulsador de aire
20	Termómetro

Figura N°8
Destilador simple utilizado en la
destilación



V RESULTADOS EXPERIMENTALES

Figura N° 9

Eficiencia de la fermentación del hidrolizado
de yuca a diferentes pH

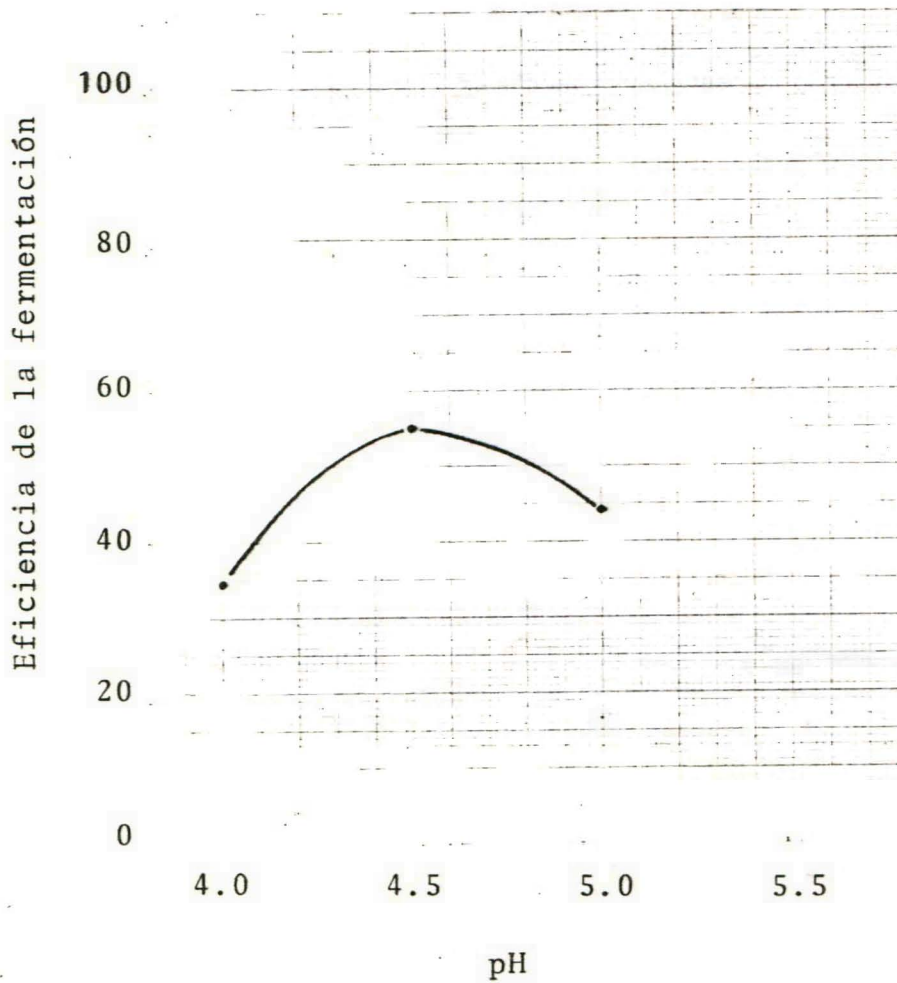
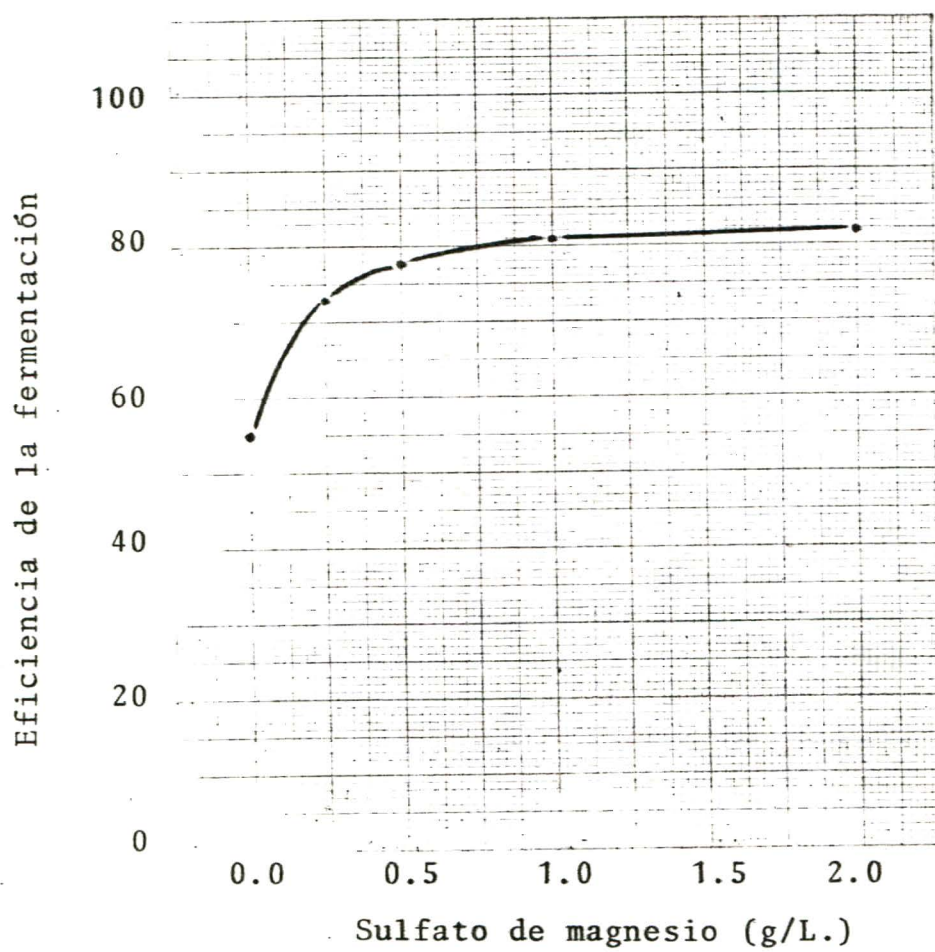


Figura N° 10

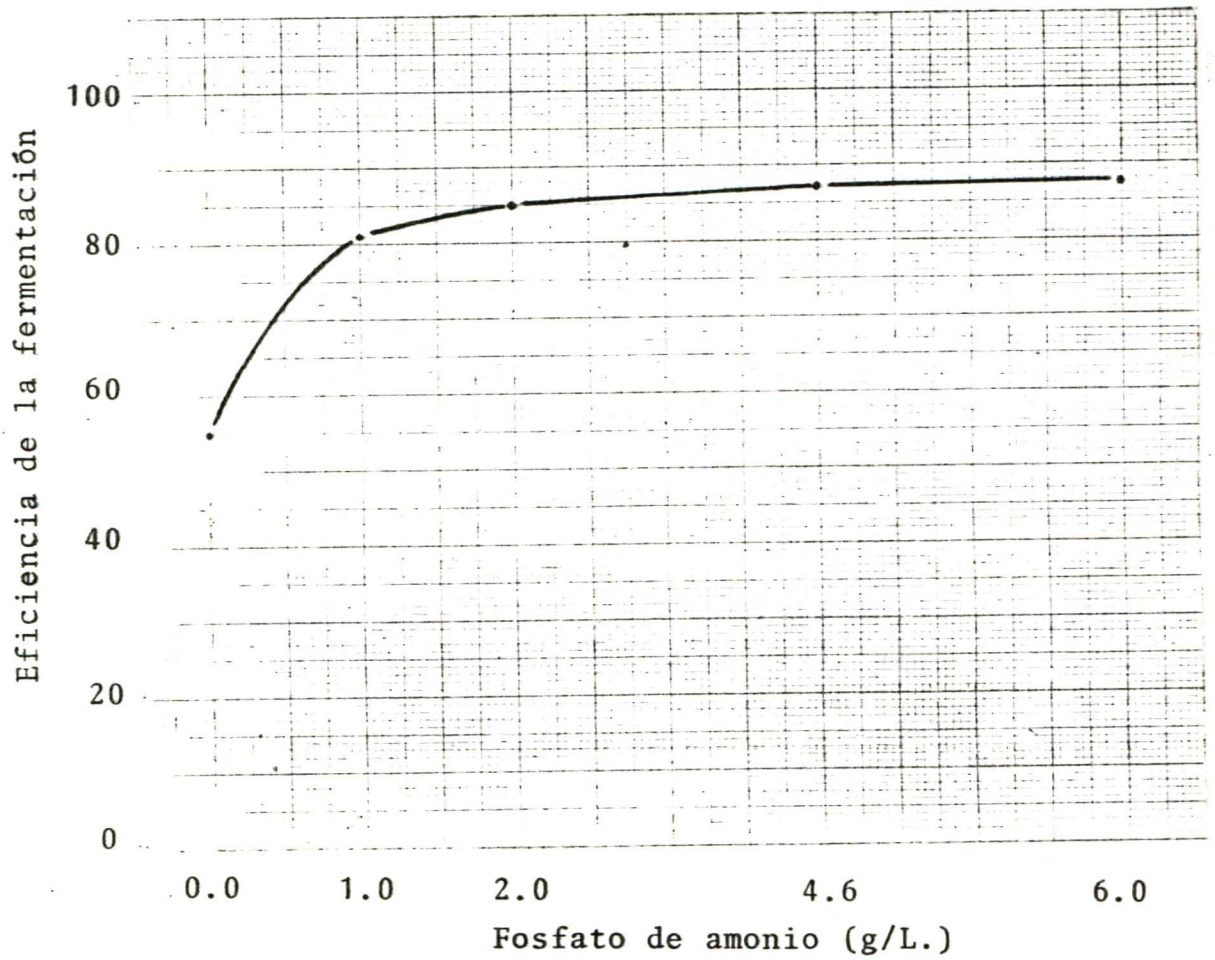
Eficiencia de la fermentación del hidrolizado a diferentes concentraciones de sulfato de magnesio*



* Se ensayó a pH 4.5.

Figura N° 11

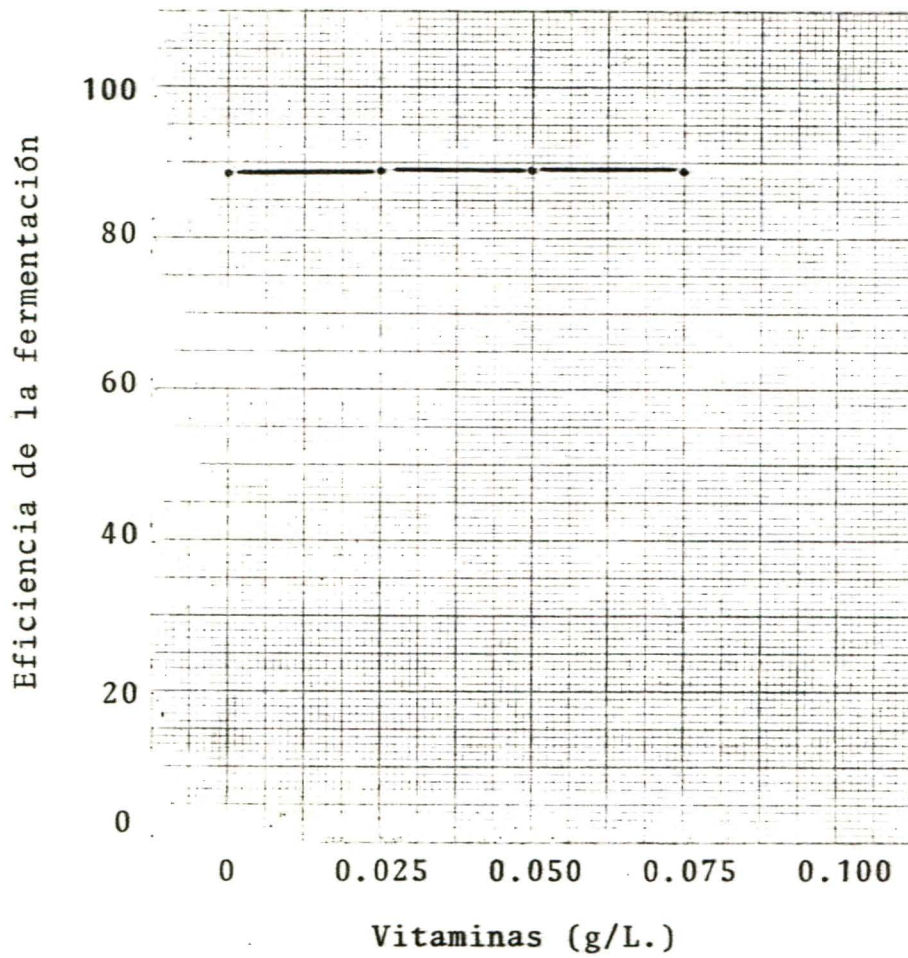
Eficiencia de la fermentación del hidrolizado a diferentes concentraciones de fosfato de amonio*



* Se ensayó a pH 4.5 y sin sulfato de magnesio.

Figura N° 12

Eficiencia de la fermentación del hidrolizado a
diferentes concentraciones de vitaminas*



* Se ensayó a pH 4.5, sulfato de magnesio de 1 g/L. y fosfato de amonio de 2g/L.

Cuadro N° 5

Resultados obtenidos de porcentaje de almidon*,
porcentaje de azúcares reductores**
y de la eficiencia de la hidrólisis

Almidón	Azúcares reductores	Eficiencia de la hidrólisis
35.3%	28.0%	75.5%

* En la yuca molida (ver apéndice A - Cuadro N° 10)

** En el hidrolizado de la yuca.

Cuadro N° 6Eficiencia de la fermentación de
un hidrolizado de yuca a diferentes pH

pH	% de alcohol en el mosto	Eficiencia de la fermentación (%)
4.0	2.9	34.5
4.5	4.6	54.8
5.0	3.7	44.7

Cuadro N° 7

Eficiencia de la fermentación de un hidrolizado de yuca
a diferentes concentraciones de sulfato
de magnesio y a pH 4.5.

MgSO_4 (g./L.)	% de alcohol en el mosto	Eficiencia de la fermentación (%)
0.00	4.5	54.8
0.25	6.1	72.8
0.50	6.5	77.5
1.0	6.7	80.9
2.0	6.8	81.8

Cuadro N° 8

Eficiencia de la fermentación de un hidrolizado de yuca
a diferentes concentraciones de fosfato
de amonio a pH 4.5.

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (g./L.)	% de alcohol en el mosto	Eficiencia de la fermentación (%)
0.0	4.6	54.8
1.0	6.8	81.3
2.0	7.1	84.7
4.0	7.3	87.1
6.0	7.3	87.6

Cuadro N° 9Eficiencia de la fermentación de un hidrolizado de yuca
con las variables en sus puntos óptimos*

<u>% de alcohol en el mosto</u>	<u>Eficiencia de la fermentación (%)</u>	<u>Rendimiento** global (%)</u>
7.2	88.6	85.21

* pH 4.5, sulfato de magnesio de 1 g/L. y fosfato de amonio 2 g/L.

** Para cálculo ver apéndice B, punto seis.

Cuadro N° 10

Eficiencia de la fermentación de un hidrolizado de yuca
a diferentes concentraciones de vitaminas*

Vitaminas (g./L.)	% de alcohol en el mosto	Eficiencia de la fermentación (%)
0.0	7.2	88.6
0.025	7.3	88.7
0.050	7.4	89.0
0.075	7.4	89.0

* pH 4.5, sulfato de magnesio de 1 g/l. y fosfato de amonio de 2 g/L.

VI DISCUSION DE RESULTADOS

En el Cuadro N° 11 podemos observar los resultados obtenidos en los análisis de porcentaje de almidón en la yuca, así como la eficiencia de la hidrólisis. El porcentaje de almidón de 35.3% obtenido en este trabajo es similar al reportado por Montaldo (1979) y González (1961), esta similitud es una consecuencia de las condiciones de suelos y climas en la cual se obtuvo la materia prima.

El rendimiento del proceso hidrolítico se obtuvo en base al dato anterior de porcentaje de almidón, obteniéndose una eficiencia de hidrólisis de 75.5%. Al comparar estos datos con los encontrados en la literatura vemos que Tobías y Lamo (1976) encontraron un 85% de conversión de los almidones presentes en azúcares reductores. Lages y Tannenbaum con el departamento de Nutrición y Ciencia Alimenticia, del Instituto de Tecnología de Massachusetts obtuvieron 90% de conversión en base a los sólidos totales presentes en la lechada de yuca.

El Cuadro N° 5 muestra el resultado del análisis de azúcares reductores presentes en el hidrolizado de yuca. Al comparar este dato con los obtenidos por los autores arriba citados, se observa una eficiencia de hidrólisis menor en nuestros ensayos.

La eficiencia de la fermentación calculada en base a la transformación de estos azúcares a alcohol etílico, se evaluó utilizando cuatro variables que consideramos podrían afectar

tal rendimiento. En primer lugar se consideró el pH, ya que se ha reportado por Prescott (1952), si el pH no oscila entre cuatro y cinco las levaduras no desempeñan adecuadamente su función, dándonos como resultado sub-productos alterando la calidad y el rendimiento del proceso. Al variar el pH en ese ámbito se obtuvo los siguientes porcentajes de alcohol, volumen en volumen, en el mosto fermentado: 2.9, 4.6 y 3.7 (Cuadro N° 6). Se observa que el pH de mayor rendimiento fué el de 4.5.

En segundo lugar fué considerado el sulfato de magnesio, según Conn y Stumpf (1977) existen pruebas reveladoras de que todos los metales, necesarios desde el punto de vista nutritivo participan a nivel molecular como cofactores o como componentes estructurales de las enzimas, haciendo éstas más eficientes en su acción catalítica. Esto se comprobó al utilizar el metal antes mencionado en cuatro concentraciones diferentes (Cuadro N° 7) rango en el que mejor se desenvuelve la levadura, obteniendo los siguientes porcentajes de alcohol volumen en volumen en el mosto fermentado: 6.1, 6.5, 6.7 y 6.8. Esos porcentajes de alcohol muestran que el mejor rendimiento está en el punto donde la concentración del sulfato de magnesio es de 2.0 g/L., pero la Figura N° 10 nos indica que el punto práctico a ser utilizado es el de 1.0 g/L. ya que se está duplicando la concentración de sulfato para obtener una diferencia de eficiencia de 0.9, lo cual no resulta rentable. Queda

demostrado que con el uso de este reactivo, la eficiencia fermentativa se mejora notablemente al compararla con el caso en donde no está presente.

El fosfato de amonio fué la tercera variable considerada, además de lo mencionado del efecto de los metales sobre las enzimas, este ingrediente al ser utilizado por la levadura llega a formar parte de los componentes estructurales de la levadura ya que este microorganismo en base seca según Prescott (1952) posee más de 50% de proteínas siendo el nitrógeno un elemento clave en la formación de ésta. El fósforo presente en el fosfato es utilizado según Braverman (1980) en las primeras etapas de la vía de fermentación de Embden y Meyerhof en la fosforilación de las hexosas, llevada a cabo por la enzima hexoquinasa que contiene ATP como grupo prostético. Este reactivo fué utilizado a diferentes concentraciones en el mosto (Cuadro N° 8), resultando los siguientes porcentajes de alcohol volumen en volumen: 6.8, 7.1, 7.3 y 7.3. Como se puede observar no hay diferencia en las dos últimas muestras, entre las cuales hay un incremento de un 50% en la concentración del fosfato de amonio lo cual no es recomendable. Se encontró que el punto óptimo fué de 2.0 g/L. La Figura N° 11 nos permite observar más claramente el efecto descrito y ver como la parte superior de la curva se mantiene constante, presentándose cambios pronunciados en la variación del soluto. Es importante hacer notar que la eficiencia fermentativa se incrementó

considerablemente con el uso de este nutriente en comparación con los anteriores.

Al conocer los valores óptimos y proceder a una sola fermentación dirigida controlando esas variables; se obtuvo un porcentaje de alcohol volumen en volumen en el mosto fermentado de: 7.2 (Cuadro N° 9), superando estos resultados a los obtenidos cuando se consideraron las variables en forma individual en sus puntos óptimos.

Además utilizamos un complejo vitamínico (niacina, tiamina y riboflavina) para evaluar el efecto de este sobre el rendimiento ya que Tobías y Lamo del Instituto de Tecnología de Alimentos del Brasil recomienda la utilización de algunos micronutrientes o sustancias de crecimiento debido a la activación que estos produce sobre las enzimas al actuar como cofactores. Estas vitaminas fueron usadas una vez obtenidas las condiciones óptimas de las otras tres variables, se utilizó diferentes concentraciones en el mosto, terminada la fermentación se obtuvo rendimientos bajos (Cuadro N° 10). Esta información nos indica que la presencia del complejo vitamínico no afecta significativamente la eficiencia fermentativa, debiendo a la presencia de estos en forma natural y en cantidades suficientes en la yuca.

Un resultado importante a considerar es el rendimiento global que es la transformación del almidón presente en la

yuca en alcohol, la cual fué de 85.21% considerada como buena al compararla con resultados obtenidos por otros investigadores. Por ejemplo Vera de Souza (1973) trabajando en el Instituto Nacional de Tecnología en Brasil tuvo un rendimiento global de 80.43%.

El costo de la materia prima para producir un litro de alcohol a partir de la yuca es de ₡ 37.50, considerando que para la producción de un litro de alcohol se necesitan 6.26 kilogramos de yuca y el costo actual es de seis colones el kilogramo (Cuadro N^o 17).

Como dato complementario se determinó en el destilado hidroalcohólico la acidez total como mililitros de ácido acético. Los resultados obtenidos fueron bajos y se observan en los Cuadros del 12 al 16. Esto se correlaciona con la presencia de bacterias que transforman la glucosa en ácidos, lo cual es perjudicial para la fermentación alcohólica.

VII CONCLUSIONES

1. La yuca es una materia prima de fácil obtención ya que está ampliamente distribuida en el país. Es el tubérculo que más aprovecha la energía solar dando como resultado altos porcentajes de almidón en el cilindro central de la raíz.
2. Se puede obtener alcohol etílico a partir de la yuca utilizando métodos sencillos adaptables a nuestro medio.
3. En presencia del fosfato de amonio y el sulfato de magnesio en la fermentación de un hidrolizado de yuca, se observó un aumento considerable en la producción de alcohol a un pH óptimo de 4.5.
4. Los puntos óptimos de las variables estudiadas para la eficiencia fermentativa en la fermentación de un hidrolizado de yuca son: concentración de sulfato de magnesio de 1.0 g/L., concentración de fosfato de amonio de 2.0 g/L.
5. La acidez total medida en mililitros de ácido acético, y presentadas en los Cuadros del 12 al 16 se puede deber a la presencia de las bacterias acéticas que convierten los azúcares en ácidos. Esta acidez se incrementa entre más tiempo permanezca el mosto entre la hidrólisis y la fermentación.
6. El costo de la materia prima para producir un litro de alcohol es de ¢ 37.50, siendo el precio actual de la yuca de seis colones por kilogramo (Cuadro N° 17).

VIII RECOMENDACIONES

1. Como complemento del presente proyecto es importante realizar otros estudios en otros tubérculos (malanga, tiquisque, ñames y patatas) de alto contenido en almidón. De este modo se aprovecharán otras materias primas que se producen en diferentes suelos y climas de nuestro país.
2. Sustituir las enzimas utilizadas en este trabajo por otras obtenidas de nuestro propio medio, evitando así su alto costo de importación.
3. Realizar estudios de factibilidad económica considerando la situación económica del país y la demanda externa que posee la yuca.
4. Realizar estudios de hidrólisis ácida, comparar los rendimientos y costos con la hidrólisis enzimática

IX BIBLIOGRAFIA

1. ABRAHAM, A. y BAMACHANDRAM, K. Tapioca as a source of alcohol. *Current Science*, 29(9):346-348. 1960.
2. AGUILAR, R.V. Enfermedades y otros aspectos del cultivo de yuca. San José, Ministerio de Agricultura y Ganadería, 19 p. 1980.
3. ASCHINGREEN, N.H. Microbial enzymes for alcohol production. *Biochemistry*, 4(8):23-25. 1969.
4. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. 10 Ed. Washington, D.C. 1094 p. 1985.
5. BANZON, J. et al. Fermentative utilization of cassava. *Iowa State Journal of Science*, 23(2):219-235. 1949.
6. BRAVERMAN, J.B.S. Introducción a la bioquímica de los alimentos. 3a. Ed. Barcelona, Omega, 355 p. 1980.
7. CONN, E.E. y STUMPF, P.K. Bioquímica Fundamental. 3a. Ed., México, D.F., Limusa, 628 p. 1977.
8. CHEFTEL, J.C. y CHEFTEL, H. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Zaragoza, Acribia, 333 p. 1980.
9. DIAZ, R.D. Costos y utilización de insumos en la producción de yuca en Colombia. Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 36 p. 1975.

10. DIAZ, R.D. World cassava production and yields trends. Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 119 p. 1972.
11. ENGELS, J. Catálogo de la colección de yuca. Turrialba, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, 25 p. 1981.
12. FRAZIER, W.C. Microbiología de los alimentos. 2 Ed. Zaragoza, Acribia, 512 p. 1976.
13. GONZALEZ, W.C. Estudios sobre evaluación de variedades de yuca. San José, Universidad de Costa Rica, 86 p. 1961.
14. GOVEA, V.S. Alcohol de mandioca por fermentación continua. Revista Latinoamericana de Microbiología, 15(3):147-150. 1973.
15. LAGES, C.A. y TANNEBAUM, S.R. Production of glucosa from tapioca and farinha de mandioca. Journal of Food Science, 43:1012-1018. 1978.
16. MONTALDO, A. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. San José, IICA, 284 p. 1977.
17. _____ La yuca o mandioca. San José, IICA, 386 p. 1979.
18. MURILLO, A.G. Estudios sobre yuca. San José, Universidad de Costa Rica, 105 p. 1962.

19. NIELSEN, J.P. Rapid determination of starch. *Industrial and Ingeneering Chemistry*, 15(3):176-179. 1943.
20. PEARSON, D. Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. Zaragoza, Acribia, 331 p. 1976.
21. PRESCOTT, S.C. Microbiología industrial. 2 Ed. Barcelona, Nuevas Gráficas, 923 p. 1952.
22. PUCHER, G.W. y BRADFORD, H.V. Determination of starch in plant tissues. *Analytical Chemistry*, 20(9):1850-1853. 1947.
23. RHODES, A. y FLETCHER, D.L. Principios de microbiología industrial. Zaragoza, Acribia, 315 p. 1969.
24. RODRIGUEZ, M.V. Espléndido porvenir tiene la industria de la yuca. *Revista del Instituto de Defensa del Café de Costa Rica*, 13:407-409. 1943.
25. CHAVES, S.F. y JIMENEZ, J.M. Prácticas de Química Orgánica. 4 Ed. San José, Universidad de Costa Rica, 219 p. 1975.
26. TEXEIRA, C.G. Producao de alcool de mandioca. *Bragantía*, 10(10):277-286. 1950.
27. TOBIAS, J.B. y LAMO, P.R. Producao de alcool de mandioca. *Boletín do Instituto de Tecnología de Alimentos*, 46:37-53. 1976.

28. WHITTAKER, R.H. New concepts of kingdoms of arganisms.
Science 163: 150 - 160. 1969.
29. WOOD, W.B. et. al. Bioquímica. México, D.F., Fondo Edu-
cativo Interamericano, 534 p. 1974.
30. YONG, K.P. Normalizacao dos metodos para determinacao
de atividade de algunas enzimas industriais. Insti-
tuto de Tecnologia de Alimentos. 1969.

A P E N D I C E

A. RESULTADOS Y DATOS INTERMEDIOS

Cuadro N° 11

Porcentaje de almidón presente en
tres muestras de yuca

<u>Muestra</u> <u>N°</u>	<u>Peso</u> <u>g.</u>	<u>Almidón</u> <u>mg.</u>	<u>Almidón</u> <u>%</u>
1	1.0093	331	32.8
2	1.0010	356	35.6
3	1.0144	380	37.5

Cuadro N° 12Prueba del pH en la fermentación de un hidrolizado
de yuca a diferentes concentraciones

	pH:4.0	pH:4.5	pH:5.0
Peso específico *	0.9900	0.9850	0.9875
Porcentaje de alcohol V/V en el destilado	7.12	11.41	9.23
Acidez total (ml. de HOAC)	0.0072	0.0090	0.0090

* Temperatura de 15°C

Cuadro N° 13

Prueba del sulfato de magnesio en la fermentación de un
hidrolizado de yuca a diferentes concentraciones

	0.25 g/L.	0.50 g/L.	1.0 g/L.	2.0 g/L.
Peso específico *	0.9810	0.9800	0.9793	0.9791
Porcentaje de alcohol V/V en el destilado	15.16	16.14	16.84	17.04
Acidez total (ml. de HOAC)	0.007	0.007	0.004	0.007

* Temperatura de 15°C

Cuadro N° 14

Prueba del fosfato de amonio en la fermentación de un
hidrolizado de yuca a diferentes concentraciones

	1.0 g/L.	2.0 g/L.	4.0 g/L.	6.0 g.L.
Peso específico*	0.9792	0.9785	0.9780	0.9779
Porcentaje de alcohol V/V en el destilado	16.94	17.64	18.14	18.24
Acidez total (ml. de HOAC)	0.012	0.007	0.008	0.009

* Temperatura de 15°C

Cuadro N° 15

Principales variables en su punto óptimo** de
un hidrolizado de yuca

Peso específico*	0.9777
Porcentaje de alcohol V/V en el destilado	18.44
Acidez total (ml. de HOAC)	0.009

* Temperatura de 15°C

** pH de 4.5, sulfato de magnesio de 1.0 g./L. y fosfato de amonio de 2.0 g./L.

Cuadro N° 16

Prueba de las vitaminas en la fermentación de un
hidrolizado de yuca a diferentes concentraciones

	0.025 g/L.	0.050 g/L.	0.075 g/L.
Peso específico *	0.9778	0.9776	0.9776
Porcentaje de alcohol V/V en el destilado	18.34	18.54	18.54
Acidez total (ml. de HOAC)	0.007	0.009	0.010

* Temperatura de 15/15°C con respecto al agua

Cuadro N° 17

Costos en colones por litro de alcohol obtenido
a partir de la yuca

<u>Ton de yuca/ H.A.</u>	<u>Ton de almidón/ H.A.</u>	<u>L. de alcohol/H.A.</u>	<u>Colones/L. de alcohol</u>
22.40	7.91	357.94	37.50

El presente cuadro contiene el costo en colones por litro de alcohol obtenido de una hidrólisis enzimática y una fermentación alcohólica de la yuca. También están presentes el rendimiento de yuca, almidón y litros de alcohol por hectárea.

NOTA: En el presente momento el precio por kilogramo de yuca es de seis colones.

B. CALCULO DE MUESTRA

1. Determinación del porcentaje de almidón de la yuca

La determinación del porcentaje de almidón se realizó con el método presente en la sección de procedimiento experimental. El cálculo es el siguiente:

$$\frac{\text{mg. de almidón de la curva}}{1000 \text{ mg./gm.}} \cdot \frac{100\%}{\text{gm. de muestra}} = \% \text{ almidón}$$

Ejemplo:

$$\frac{380.0 \text{ mg.}}{1000 \text{ mg./gm.}} \cdot \frac{100\%}{0.0144 \text{ gm.}} = 37.46\% \text{ de almidón}$$

Estos datos se encuentran en el Cuadro N° 11, para corridas similares se procede de la misma forma. El promedio de los porcentajes de almidón en la yuca se calcula de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Suma de todos los porcentajes de almidón}}{\text{Total de muestras analizadas}} = \text{Promedio del \% de almidón}$$

Ejemplo:

$$\frac{105.82}{5} = 35.3 \% \text{ de almidón}$$

2. Determinación del porcentaje de almidón en el hidrolizado

Se usó el método de LANE-Eynon para la determinación del porcentaje de azúcar en el hidrolizado, el cual se encuentra

en la sección de procedimiento experimental. En base a la síntesis de preparación de la muestra, que se encuentra en la misma sección se realizó el cálculo:

$$\frac{\text{Total de azúcares reductores requeridos} \cdot 100}{\text{Valoración (ml.)}} = \text{mg. de azúcar en 100 ml.}$$

Ejemplo:

$$\frac{50.4 \cdot 100}{36.0} = 140.0 \text{ mg. de azúcar en 100 ml.}$$

140.0 mg. — 100 ml.

140.0 mg. — 50 ml.

700.0 mg. — 250 ml.

700.0 mg. — 25 ml.

7000.0 mg. — 250 ml.

7000.0 mg. — 25.0 g.

$$\frac{7.0}{25.0} \cdot 100 = 28.0\% \text{ de azúcar (glucosa) reductor}$$

3. Cálculo de la eficiencia de la hidrólisis

La eficiencia de la hidrólisis se calcula de la siguiente forma:

1 g. de almidón	-	1.05 g. de glucosa	-	100% de E.H. (teórico)
35.3 g. almidón	-	37.07 g. de glucosa	-	100% de E.H. (teórico)
35.3 g. almidón	-	28.0 g. de glucosa	-	75.53% E.H. (práctico)

Lo anterior nos dice que de cada gramo de almidón, teóricamente se debe obtener 1.05 g. de glucosa, pero se trabajó con una yuca de 35.3 g., de la cual se espera 37.07 g. de glucosa concerniendo al 100% de hidrólisis, en la práctica se obtuvo 28.0 g. de glucosa que equivale a un 75.53% de eficiencia de hidrólisis. Estos datos fueron obtenidos del Cuadro N° 6.

4. Porcentaje Gay-Lussac de la mezcla fermentada (% G.L.)

El porcentaje Gay-Lussac se calcula de la siguiente forma:

$$\frac{\text{Cantidad de alcohol en la mezcla fermentada}}{\text{Cantidad de mezcla fermentada (ml.)}} \cdot 100 = \% \text{ G.L.}$$

Ejemplo:

$$\frac{22.82 \cdot 100}{500} = 4.6\% \text{ G.L.}$$

Este resultado se encuentra en el Cuadro N° 5, las otras corridas se realizan en forma idéntica.

5. Cálculo de la eficiencia fermentativa (E.F.)

La eficiencia fermentativa se realiza de la siguiente forma:

100 g. de glucosa - 64.4 ml. de alcohol - 100 % E.F.
 64.63 g. de glucosa - 41.65 ml. de alcohol - 100 % E.F.

Las relaciones anteriores indican que en el campo teórico, de cada 100 g. de glucosa fermentada se debe obtener 64.4 ml. de alcohol. En nuestro caso se fermentó 64.68 g. de glucosa, esperando 41.65 ml. de alcohol que concierne a 100% de eficiencia fermentativa. Los resultados prácticos se calculan así:

$$\frac{\text{Cantidad de alcohol obtenido de la fermentación} \cdot 100}{\text{Cantidad de alcohol esperado de la fermentación}} = \text{Eficiencia fermentativa}$$

Ejemplo:

$$\frac{22.82 \cdot 100}{41.65} = 54.8$$

Este resultado se encuentra en el Cuadro N° 5, para corridas similares se procede de la misma forma.

6. Cálculo del porcentaje de rendimiento global en el punto óptimo de trabajo

$$\% \text{ R.G.} = \frac{\text{Eficiencia de la hidrólisis}}{\text{Eficiencia de la fermentación}} \cdot 100$$

$$\% \text{ R.G.} = \frac{75.5}{88.6} \cdot 100 = 85.21$$

Estos datos fueron tomados de los Cuadros 5 y 9.

7. Cálculo del costo de producción de un litro de alcohol

100 g. de glucosa - 64.4 ml. de alcohol - 100% de E.F. (teóri
 280 g. de glucosa - 180.3 ml. de alcohol - 100% de E.F. (teóri
 280 g. de glucosa - 159.8 ml. de alcohol - 88.6% de E.F. (práct

Si en el campo práctico se obtiene 159.8 ml. de alcohol por cada 280 g. de glucosa proveniente esta de un kilo de yuca. Para obtener un litro de alcohol habrá que utilizar 6.26 kilos de yuca, como el precio actual de la yuca es de seis colones por kilo, el costo por materia fermenticible sería:

$$6.26 * 6 = 37.50$$