

# Universidad Nacional de Ingeniería

FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA  
Y MANUFACTURERA



## “ HIDROLISIS DEL ALMIDON DE YUCA POR FERMENTACION SUMERGIDA CON Aspergillus niger PARA LA OBTENCION DE GLUCOSA Y PRODUCCION DE ALCOHOL ETILICO ”

### TESIS

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

**INGENIERO QUIMICO**

**RAUL RICARDO VELIZ FLORES**

PROMOCION : 1977 - 2

**LIMA • PERU • 1984**

## R E S U M E N

El presente estudio es un trabajo de investigación, que considera la factibilidad técnica de la obtención de alcohol etílico por fermentación a partir de yuca. El almidón de harina de yuca fue transformado en alcohol mediante un proceso de dos etapas; primero el almidón fue hidrolizado a glucosa utilizando el método de hidrólisis por fermentación sumergida con Aspergillus niger, célula viva responsable de la transformación bioquímica, que asimila diversas sustancias, se reproduce y produce enzimas que degradan el almidón; segundo la glucosa en solución obtenida, fue transformado en alcohol etílico por acción anaerobia de las levaduras, Saccharomyces cerevisiae.

Los experimentos para la hidrólisis por fermentación sumergida fueron llevados a cabo en frascos erlenmeyer de 250 ml y la hidrólisis fue estudiado en función de la fuente de nitrógeno, temperatura, pH inicial y concentración de substrato; obteniéndose como resultados los siguientes parámetros óptimos: 4.3 g/l de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, pH inicial del medio 3 a 4, temperatura de incubación 30 a 32°C, concentración de substrato 10 a 12 % (w/v) y un tiempo de fermentación de 110 horas. El avance de la reacción se controló siguiendo el curso de formación de glucosa por el método de Miller modificado por Mandels, con el ácido 3,5-dinitrosalicílico.

La concentración óptima de sustrato 10 a 12 % (w/v) para la hidrólisis, fue determinado mediante el estudio cinético de la reacción bioquímica (saturación de la enzima por el sustrato) siguiendo el modelo de la ecuación cinética de Michaelis-Menten, considerando como tiempo inicial para la velocidad inicial de reacción, el término de la fase de latencia del microorganismo determinado para este estudio (46 horas), sin embargo la mejor conversión de almidón a glucosa 94.1 %, se obtuvo al 2 % (w/v) de concentración de sustrato.

Para la obtención de alcohol: se realizaron dos experimentos batch en dos fermentadores diferentes de cinco litros. Primero se llevó a cabo la hidrólisis por fermentación sumergida del almidón de yuca en un erlenmeyer de cinco litros conteniendo tres litros de medio, bajo condiciones óptimas determinadas en frascos de 250 ml agregándose una cantidad adecuada de inóculo de Aspergillus niger, obteniéndose 242.2 g de glucosa en solución con 74.1 % de conversión. El mosto fermentescible obtenido (glucosa en solución) fue acondicionado para la fermentación alcohólica, con fosfato de amonio al 0.05 % (w/v), ajustando el pH del medio a 4.65 e inoculando una cantidad suficiente de inóculo de Saccharomyces cerevisiae, llevándose enseguida en marcha la fermentación; durante las diez primeras horas la fermentación fue en condiciones aerobias y a 28°C; la segunda parte de la fermentación se realizó bajo condiciones anaerobias y a 30°C, protegiendo al fermentador de la atmósfera de tal manera que el sistema permita pasar solamente CO<sub>2</sub> formado, a las 72 horas de fermentación se obtuvo 4.08 % de alcohol en volumen, representando una eficiencia fermentativa de 80.6 %.

El procesamiento global de conversión de almidón a glucosa mediante fermentación sumergida, multiplicación de fermentos y producción de alcohol de buena calidad presentó resultados satisfactorios, justificando la utilización de la yuca (33.12 % de almidón en base húmeda) como materia prima renovable en la obtención de alcohol etílico, como una alternativa en la producción de energía e insumo industrial.

## I N D I C E

	Pág.
ABROGACION.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN.....	v
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION BIBLIOGRAFICA:	
2.1 Materia prima: juca.....	
2.1.1 Clasificación taxonómica.....	7
2.2 Microorganismos.....	7
2.2.1 Factores ambientales.....	8
2.2.2 <u>Aspergillus niger</u> .....	10
2.2.3 <u>Saccharomyces cerevisiae</u> .....	11
2.3 Insumos y productos.....	12
2.3.1 Almidón.....	12
2.3.2 Enzimas.....	15
2.3.2.1 Algunas enzimas producidas por <u>Aspergillus niger</u> .....	16
2.3.2.2 Algunas enzimas de las levaduras.....	16
2.3.3 Glucosa.....	17
2.3.4 Alcohol etílico.....	19
2.3.4.1 Productos secundarios.....	21
2.3.4.2 Rendimiento del alcohol.....	22
2.4 Operaciones básicas y químicas.....	22
2.4.1 Hidrólisis del almidón.....	22
2.4.1.1 Métodos de hidrólisis del almidón.....	23
2.4.2 Fermentación alcohólica.....	24
2.4.2.1 Vía de la fermentación alcohólica.....	25
2.4.2.2 Factores que favorecen el proceso fermentativo.....	26

	Pág.
2.5 Cinética de las transformaciones bioquímicas.....	29
2.5.1 Reacciones catalizadas por enzimas.....	30
2.5.2 Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de reacción.....	31
2.5.3 Ecuación de Michaelis-Menten.....	32
 III. MATERIALES Y METODOS:	
3.1 Materia prima.....	35
3.1.1 Tratamiento de las raíces.....	35
3.1.2 Composición química.....	35
3.2 Microorganismos.....	36
3.2.1 <u>Aspergillus niger</u> .....	36
3.2.2 <u>Saccharomyces cerevisiae</u> .....	36
3.3 Sustrato.....	36
3.4 Medios de cultivo.....	37
3.5 Determinación de glucosa por el método de Miller..	37
3.6 Determinación del porcentaje de alcohol en volumen.....	38
3.7 Control del pH.....	38
3.8 Inoculación.....	39
3.9 Obtención de glucosa a partir de yuca.....	39
3.10 Estudio de la hidrólisis del almidón de la harina de yuca por fermentación <u>sumergida con <u>Aspergi-</u></u> <u>llus niger</u> , para la obtención de glucosa.....	40
3.10.1 Ensayos para la fermentación sumergida.....	42
3.10.2 Efecto de la fuente de nitrógeno.....	42
3.10.3 Efecto del pH inicial.....	42
3.10.4 Efecto de la temperatura.....	43
3.10.5 Efecto de la concentración de sustrato....	43
3.11 Estudio de la obtención de glucosa en un fermentador de cinco litros.....	43

	Pág.
3.12 Obtención de alcohol etílico por fermentación.....	44
3.12.1 Estudio de la fermentación alcohólica en un fermentador de cinco litros.....	44
3.12.2 Destilación-rectificación.....	44
IV. RESULTADOS Y DISCUSION:	
Materia prima.....	46
4.2 Estudio de la hidrólisis del almidón de la harina de yuca por fermentación sumergida con <u>Aspergillus</u> <u>niger</u> , para la obtención de glucosa.....	48
4.2.1 Ensayos para la fermentación sumergida.....	49
4.2.2 Estudio de los parámetros que influyen la hidrólisis.....	52
4.2.2.1 Efecto de la fuente de nitrógeno....	52
4.2.2.2 Efecto del pH inicial.....	55
4.2.2.3 Efecto de la temperatura.....	58
4.2.2.4 Efecto de la concentración sustrato	62
4.2.2.5 Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de reacción.....	66
4.3 Ecuación cinética: Michaelis-Menten.....	69
4.4 Estudio de la obtención de glucosa en un fer- mentador de cinco litros.....	74
4.5 Estudio de la fermentación alcohólica en un fermentador de cinco litros.....	79
4.6 Rendimientos.....	84
4.7 Destilación y rectificación.....	84
V. CONCLUSIONES.....	86
VI. RECOMENDACIONES.....	88
BIBLIOGRAFIA.....	89
APENDICE.....	94

## I. I N T R O D U C C I O N

La problemática resultante de la creciente escasez de petróleo en el mundo y su elevado costo, aumentó la demanda por fuentes renovables para la producción de energía en lugar de los compuestos de origen fósil, que son agotables; considerando la tecnología agro-industrial disponible, la obtención de alcohol etílico por fermentación a partir de fuentes baratas de materias primas renovables, constituye una de las alternativas de producción de energía, además de aquellas que se pueden obtener de fuentes no convencionales (energía nuclear, solar, eólica, etc.).

La industria alcoholera en el Perú, utiliza como materia prima melaza que es un sub-producto de la industria azucarera, actualmente ésta atraviesa una situación productiva crítica, habiendo sido restringido el uso de la melaza para ciertos fines. La producción de etanol utilizando productos amiláceos en el Perú es posible, porque existe grandes cantidades de recursos energéticos que por la carencia de tecnología no han sido todavía aprovechados convenientemente. La yuca (Manihot sp.), se destaca entre las materias primas amiláceas por ser un vegetal con alto contenido de almidón y de fácil cultivo.

La región de la selva de nuestro país, presenta condiciones ecológicas favorables para el cultivo de la yuca, sin embargo la fal-

ta de vías de comunicación y la distancia con respecto a los principales centros de consumo, condiciona y limita el cultivo de la yuca a determinadas áreas geográficas. La producción de yuca en el Perú está exclusivamente destinada a la alimentación humana y animal; por tanto, la producción para la obtención de alcohol debe originarse a partir de nuevos cultivos de yuca a fin de evitar el desabastecimiento. Los nuevos cultivos abastecerían a las destilerías de alcohol que se instalarían en zonas descentralizadas, incentivando de esta manera al agricultor con amplias perspectivas, creando nueva fuente de trabajo en el campo, así como en la industria, con el consiguiente beneficio para el desarrollo agro-industrial de las zonas rurales del país.

La finalidad principal del estudio, es contribuir a la investigación, para la obtención de alcohol etílico por fermentación a partir de yuca, el motivo fundamental que ha incentivado la utilización de la materia prima es su renovabilidad y alto contenido de almidón; la producción de alcohol es importante porque constituye uno de los insumos fundamentales en la industria química, además de nueva fuente de energía. Para fabricar alcohol de yuca, primeramente se debe hidrolizar el almidón, a fin de obtener azúcares fermentescibles; la fase de hidrólisis requiere una especial atención, teniendo en cuenta que la referida etapa constituye un factor que eleva el costo de producción de alcohol, en comparación con el obtenido de caña de azúcar. La segunda etapa del proceso de fabricación es la fermentación alcohólica, que ha sido objeto de muchos estudios en las últimas décadas, donde se ha dado especial atención al comportamiento fisiológico de las levaduras (Saccharomyces cerevisiae), y la cinética del proceso fermentativo.

El proceso de hidrólisis puede realizarse mediante la vía ácida o enzimática. La hidrólisis ácida es un proceso obsoleto, de ele-



vado costo y no recomendable; cuando se utiliza el método enzimático con enzimas vegetales o animales el proceso es relativamente costoso, pero al utilizar enzimas microbiales (puras o farelos) el costo disminuye considerablemente. La importancia del presente estudio reside en la utilización de un tercer método de hidrólisis "HIDROLISIS POR FERMENTACION SUMERGIDA", donde el agente responsable de la transformación bioquímica es una célula viva (Aspergillus niger) que asimila diversas sustancias, se reproduce y produce enzimas que degradan el almidón.

Existen trabajos de investigación sobre la obtención de alcohol por fermentación a partir de yuca efectuados en Brasil por ARAUJO (1), UEDA (44), VERA (47); en Paraguay por ROMERO (40); en Australia por McCAAN-SADDLER (31), quienes utilizan la vía enzimática microbiana con farelo enzimático para la hidrólisis del almidón reduciendo el costo de esta etapa limitante del proceso alcohólico a partir de sustancias amiláceas. McCAAN-SADDLER (31) reportan además resultados de un estudio comparativo sobre costos de producción de alcohol a partir de yuca y petróleo, informando que el obtenido a partir de yuca, resulta más económico.

En base a los antecedentes descritos, los objetivos fundamentales del presente trabajo comprenden los siguientes:

- Determinación de la composición química de la yuca.
  
- Determinación de los parámetros óptimos (fuente de nitrógeno, pH inicial, temperatura, concentración de sustrato) que afectan el desarrollo de la hidrólisis por fermentación sumergida con Aspergillus niger, para la obtención de glucosa.

- Estudio de la cinética bioquímica del proceso de hidrólisis por fermentación sumergida mediante la ecuación cinética de Michaelis-Menten.
- Obtención de glucosa a partir de yuca en un fermentador de cinco litros.
- Obtención de alcohol etílico en un fermentador de cinco litros a partir de la glucosa obtenida.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MATERIA PRIMA: YUCA

La yuca es un arbusto originario de Sud-América (Brasil), de tamaño variable de 1 a 5 m de altura, el tamaño promedio de las raíces es de 50 cm, con un diámetro de 10 cm, constituida externamente de una película fina llamada córtex, por debajo de ésta existe otra película blanca o amarillenta denominada entrecáscara, por debajo de la cual se encuentra el cuerpo de la raíz rica en almidón y pequeñas partículas de celulosa, en cuya parte central está localizada la nervadura central, estructura fibrosa lignificada; el tallo es de consistencia leñosa, unas veces derecho, otras ramificada, según la edad cambia parcialmente de color verde a grisáceo, de pardo a rojizo; las hojas son alternas simples, tienen vida corta, de forma palmipartidas con cinco a siete lóbulos; las flores son de color amarillo, unisexuales, ubicadas en panículos terminales; el fruto es una cápsula ovoidea, de color verde, generalmente con cinco bordes longitudinales ondulados de color rojizo; las semillas son de forma aplanada de 10 mm de largo por 5 mm de ancho y presentan una cubierta brillante con manchas oscuras BRAMBILA (7), MONTALDO (33) y ZUMAETA (48).

En el Perú se le conoce con el nombre de yuca, en el Brasil con el nombre de mandioca, nombre que fue reconocido por el Primer Encuentro de Investigadores de Yuca, realizado en Sao Paulo-Brasil,

en general en los países como Venezuela, Colombia, Cuba, Costa Rica y el Perú se utiliza la palabra yuca, en México con el nombre de huacamote, en países de habla inglesa se utiliza el de cassava MONTAÑO (33).

La yuca es uno de los cultivos alimenticios más importante de los trópicos, es una planta muy adaptable que puede crecer dentro de amplios límites ambientales, desde el nivel del mar hasta 1500 m.s.n.m. o quizás hasta 2100 m de altitud. Siendo extremadamente resistente a las sequías, puede crecer bajo condiciones muy áridas, pero también prospera en regiones de precipitación excesiva. Sin embargo se necesita de un clima cálido homogéneo, el óptimo es de una temperatura media anual al rodeior de 24°C y prospera mejor bajo condiciones de humedad relativamente alta MONTAÑO (33) y PEREZ(35).

El cultivo en el Perú para el año 1979 ha sido de 35,044 hectáreas sembradas de yuca, con un rendimiento promedio de 11,487 Kg por Ha, con una producción total de 402,565 TM que alcanza un valor calculado de 7'881,563 en miles de soles oro; también cabe hacer mención que la yuca ocupa el segundo lugar entre los tubérculos que produce el Perú, después de la papa<sup>+</sup>.

La mayor parte de la producción nacional (70 %), se encuentra en la selva, principalmente en los departamentos de Loreto y San Martín. En la costa la superficie más importante de este cultivo está concentrada en el norte BRAIBILA (7).

+ Anuario Estadístico Agrícola: Ministerio de Agricultura y Alimentación, 1979.

Son numerosas las variedades de yuca que se cultivan en el Perú, no se ha establecido aún la clasificación y evaluación de todas ellas y existe confusiones respecto a los nombres. Según Mc Bride reportado por BRAMBILLA (7), existe cinco especies de manihot en la selva peruana: Manihot esculenta, Manihot weberbaueri, Manihot pavoniana, Manihot lancsrifolia, y Manihot dulcis.

### 2.1.1 CLASIFICACION TAXONOMICA

MONTALDO (33), presenta la siguiente clasificación:

Reino	: Vegetal
División	: Phanerogamas
Sub-div.	: Angiospermas
Clase	: Dicotiledóneas
Sub-clase	: Choripetales
Orden	: Geraniales
Sub-orden	: Tricoccae
Familia	: Euphorbiaceae
Sub-fam.	: Crotonidae
Tribu	: Manihoteae
Género	: Manihot

### 2.2 MICROORGANISMOS

Los microorganismos son organismos vivos unicelulares o multicelulares que se agrupan dentro del reino Protista, propuesta por Haeckel en 1866, los miembros de este reino se distinguen de las plantas verdaderas y de los animales por su organización simple. Los protistas se sub-dividen como se muestra en la figura 1 BAILEY (3), JAMETZ (23).

Los microorganismos de importancia industrial transforman y/o

se alimentan del componente útil de la solución o suspensión de sustrato por un mecanismo de difusión y no por ingestión de las partículas sólidas. Al igual que todos los seres vivos ellos cumplen el ciclo vital de crecimiento y reproducción, el cual tiene como resultado las transformaciones bioquímicas COULSON (13).

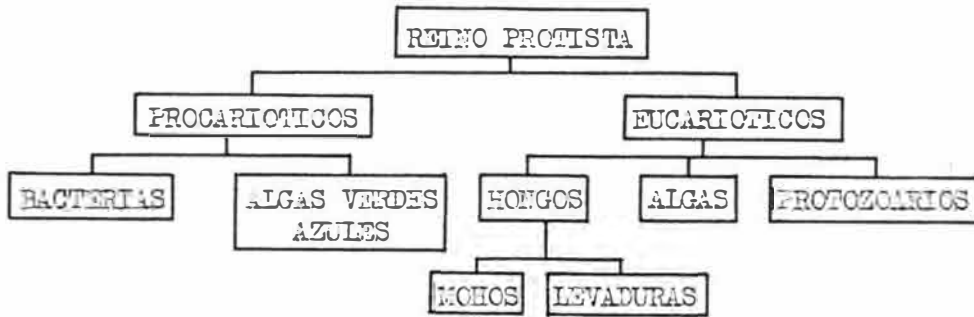


Fig. 1.-REINO PROTISTA

### 2.2.1 FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO MICROBIANO

El objetivo industrial, por lo menos donde se consideran productos bioquímicos, es usar una parte del metabolismo global para una transformación bioquímica particular. Esto se logra de manera ventajosa suministrando materia prima o sustrato que contenga el compuesto orgánico primario, aparte de aquellos metabolitos requeridos para la supervivencia del microorganismo BROCK (10), GEBHARDT (16), INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA (22), JAWETZ (23). Los requerimientos básicos son:

#### a.- Nutrientes

-Fuente de carbono.-Todos los organismos requieren una fuente de carbono para la síntesis de los numerosos compuestos orgánicos que constituyen el protoplasma celular. Frecuentemente la fuente de energía y carbono es el compuesto orgánico que se oxida

para liberar energía y a la vez provee el carbono estructural para la síntesis de un nuevo material celular.

-Fuente de nitrógeno.-La forma en la cual se requiere el nitrógeno depende de las facultades enzimáticas reductoras del microorganismo, encontrándose en el protoplasma celular combinado en forma orgánica. Siendo las fuentes más importantes: Sulfato de amonio, cloruro de amonio, úrea y nitrato de amonio.

-Sustancias inorgánicas.-Además de carbono y nitrógeno las células microbianas requieren otros minerales para su crecimiento (P, K, S, Mg, Na), los fosfatos de potasio y sodio son importantes en la síntesis de ácidos nucleicos y como amortiguadores del pH del medio, cloruro de calcio como un estabilizador de las enzimas extracelulares e interviene en el proceso de esporulación y germinación microbiana.

-Factores de crecimiento.-Son las vitaminas, tales como; B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>; ácido pantoténico, purina, pirimidina, aminoácidos.

#### b.- pH inicial

Cada organismo tiene un margen de pH dentro del que es posible su crecimiento y generalmente también tienen un pH óptimo bien definido.

#### c.- Temperatura

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que influyen en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos; cuando se aumenta la temperatura las reacciones químicas y enzimáticas de las células se producen a un ritmo más rápido y el crecimiento se acelera, el aumento excesivo de temperatura inactiva irreversiblemente las proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares; la temperatura óptima está siempre más cerca del máximo que del mínimo.

d.- Agua

Permite la disolución de los sólidos facilitando el intercambio iónico a través de la membrana citoplasmática de los microorganismos, ejerce función reguladora de la presión osmótica y de regulación térmica extra e intracelular.

e.- Aereación

Muchos microorganismos son aerobios obligatorios, requiriendo específicamente un volumen determinado de oxígeno, otros son facultativos y capaces de vivir aerobia o anaerobiamente, por último, otros son anaerobios obligatorios requiriendo una sustancia diferente al oxígeno.

2.2.2 Aspergillus niger

Son hongos filamentosos (mohos), multicelulares en que los filamentos, hifas, se ramifican y a veces se unen para formar una masa enmarañada, cualquier parte grande de la misma se le conoce como micelio.

Suelen distinguirse dos tipos de hifas; las hifas vegetativas, que penetran al substrato y están distribuidas en su superficie, obtienen agua y nutrientes; las hifas fecundas suelen sobresalir en el aire y llevar los cuerpos reproductores o esporas. La reproducción es principalmente por esporas y puede ser asexual o se-



xual CARPENNER (11), GERHARDT (16).

Aspergillus niger, se utiliza en la producción comercial de sustancias orgánicas, como el ácido cítrico, oxálico, glucónico y produce muchas enzimas, entre las cuales se tiene: las proteasas, glucosa oxidasas, naringinasas y amilasas, ésta última degrada el almidón BAILEY (3).

### 2.2.3 Saccharomyces cerevisiae

Es una especie de levadura (hongo), cuya forma corriente y dominante de crecimiento es unicelular, las células de levaduras son esféricas, elípticas y cilíndricas; el protoplasma incluye una pared celular y una membrana citoplasmática, contiene un núcleo, un gran vacuolo, numerosos gránulos y glóbulos de grasa. Su reproducción es por gemación, fisión binaria y reproducción sexual CARPENNER (11).

El género Saccharomyces posee muchas especies útiles, tienen predilección especial por alimentos ácidos que contengan azúcares de los que producen alcohol etílico y gran cantidad de  $CO_2$ .

Saccharomyces cerevisiae, es la levadura utilizada en la producción alcohólica y son seleccionados por métodos especiales, se mantienen en geles a baja temperatura para inhibir su actividad biológica GERHARDT (16), INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA (22). Los criterios de evaluación que se tienen para seleccionar las levaduras son:

- Rendimiento alcohólico
- Eficiencia fermentativa
- Velocidad de fermentación
- Baja formación de congénicos (aldehidos, ésteres, aceite fusel, etc.)
- Resistencia a la competencia de otros microorganismos
- Estabilidad en conservar sus características individuales a través de múltiples generaciones.

### 2.2.3.1 CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS DE LAS LEVADURAS ALCOHOLIFERAS

Las levaduras para la producción de alcohol industrial deben tener las siguientes características mínimas CASIDA (12), INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA (22) :

-Producción de alcohol etílico	: 7.7 ‰
-Eficiencia fermentativa teórica	: 84.0 ‰
-Azúcar residual	: 1.5 ‰
-Alcoholes superiores	: 30.0 mg/100 ml

Existen leyes biológicas que rigen la fermentación por levaduras, establecidas por Kluver-Windisch-Dekker INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA (22), KRETSCHMAR (27), estas son las siguientes:

-Si una levadura no fermenta glucosa (dextrosa), no fermenta ningún otro azúcar.

-Si fermenta glucosa, puede fermentar fructuosa (levulosa) y manosa

-Ninguna levadura puede fermentar a la vez, maltosa y lactosa.

Las principales levaduras alcoholíferas se presenta en el cuadro 1.

## 2.3 INSUMOS Y PRODUCTOS

### 2.3.1 ALMIDÓN

Es un polisacárido de alto peso molecular, de fórmula global  $(C_6H_{10}O_5)_x$ , formado por moléculas de glucosa; de color blanco, insípido e inodoro PEREZ (35). El almidón es la variedad de almacenamiento de carbohidratos de las plantas TOPOREK (43).

El almidón se halla en forma de gránulos, de tamaño y forma característicos de la planta de cual se le obtiene (forma poliédrica en la yuca). Cuando los gránulos están intactos, son insolubles en agua fría; si se rompe su membrana exterior al ser molidos, estos gránulos se hinchan en el agua fría y forma un gel. Cuando se tratan los gránulos enteros con agua tibia, se difunde a través de sus membranas, una parte soluble del almidón; en agua caliente se

Cuadro 1.-PRINCIPALES LEVADURAS ALCOHOLIFERAS

Levaduras	Fermenta		
	con facilidad	con dificultad	no
<u>Saccharomyces cerevisiae</u> Hansen Levadura de destilería raza II Raza M (levadura mixta Cuatro razas	Dextrosa Levulosa Manosa Maltosa Sacarosa	Galactosa Rafinosa (un tercio)	Lactosa Lactosa Lactosa
<u>Saccharomyces cerevisiae</u> Lindner <u>Saccharomyces carlbergensis</u> , Hansen	Dextrosa Levulosa Manosa Maltosa Sacarosa Galactosa Rafinosa Melibiosa		Lactosa Lactosa
<u>Saccharomyces cerevisiae</u> variedad ellipsoideus	Dextrosa Levulosa Maltosa Sacarosa Galactosa	Rafinosa (un tercio)	Lactosa Melibiosa
<u>Saccharomyces pasteurianus</u> , Hansen	Dextrosa Levulosa Manosa Maltosa Sacarosa Rafinosa		Lactosa

Ref. HILLET (19).

hinchán a tal extremo que revientan. El almidón contiene generalmente alrededor de un 20 % de una fracción soluble en agua, llamada amilosa, y un 80 % de una fracción insoluble, denominada amilopectina MORRISON (34).

AMILOSA.-Es un polímero consistente de 250 a 300 moléculas de D-glucosa, ligados por enlaces, alfa-1,4-glucosídicos (ver figura 2); su peso molecular puede variar desde 500 mil hasta unos millones; el análisis con rayos X, indica que una cadena se halla enrollada en

forma helicoidal ARENAS (2), LEENINGER (29).

AMILOPECTINA.-Es un polímero ramificado, en el cual los enlaces, alfa-1,4-glucosídicos, son ramificados por enlaces alfa-1,6-glucosídicos (ver figura 2), en un promedio de cada 20 residuos, su peso molecular puede llegar hasta 100 millones; todas estas pequeñas ramas se juntan a la cadena larga de amilosa, pero las moléculas están unidas a otras de tal modo que el grupo reductor libre, de la glucosa final está ligada glucosídicamente a través del sexto carbono de la glucosa unidad ARENAS (2), LEENINGER (29).

Tanto la amilosa como la amilopectina, dan colores característicos con la solución de iodo. La amilopectina reacciona formando un color rojo violeta; la amilosa color azul. ARENAS (2).

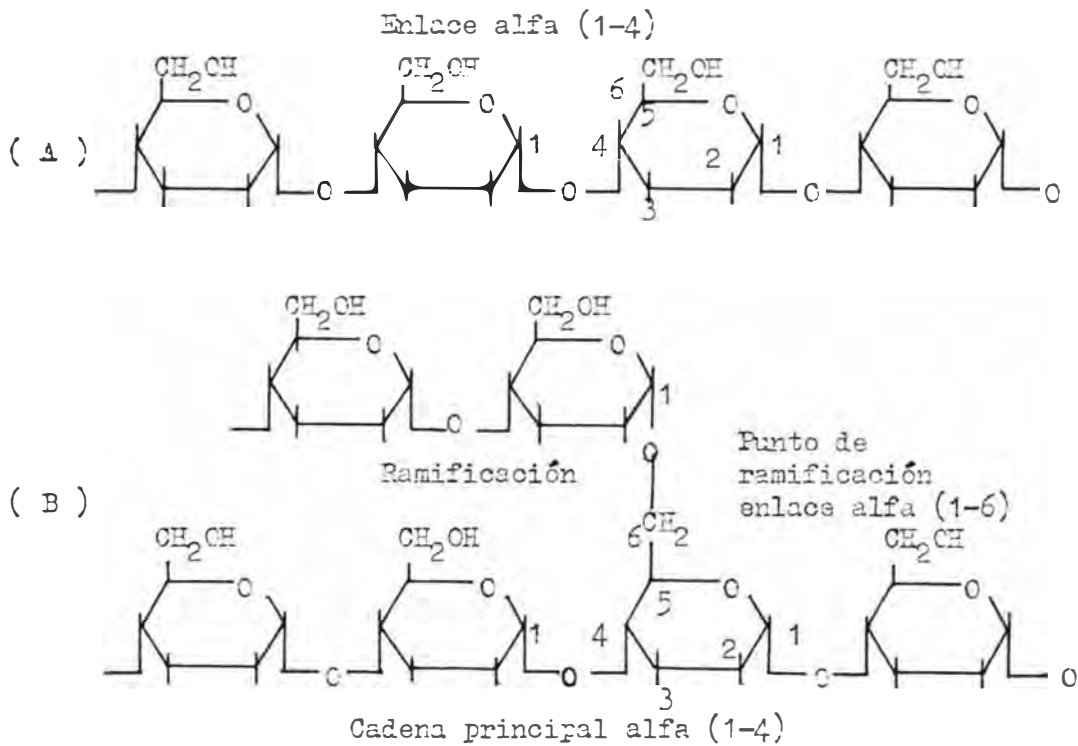


Fig. 2.-ESTRUCTURA DEL ALMIDÓN: (A) AMILOSA, (B) AMILOPECTINA

Por tratamiento con ácido o por acción de las enzimas los componentes del almidón se hidrolizan dando sucesivamente: dextrinas, maltosa y glucosa, el procedimiento de desdoblamiento y coloración con las reacciones características con el iodo se puede ver en la figura 3 ARENAS (2).



Fig. 3.-MECANISMO DE DESDOBLAMIENTO DEL ALMIDON: REACCION CON IODO

El almidón tiene un alto poder higroscópico; su densidad varía de acuerdo al contenido de humedad y según su procedencia, en la yuca 1.5 g/ml; el calor de combustión varía entre 4000 y 4200 cal; los gránulos de almidón se comportan como cristales birrefringentes desviando el plano de la luz polarizada hacia la derecha; es insoluble en agua fría, alcohol, éter, bencina, aceites grasos esenciales.

### 2.3.2 ENZIMAS

Son catalizadores coloidales orgánicos generalmente solubles en agua, formado dentro de células vivas, de vegetales o animales, capaces de actuar también en el exterior de las células, sin conexión alguna con ellas. Las enzimas facilitan que las reacciones químicas y biológicas tengan lugar a velocidades suficientes; sin

recurrir a condiciones extremas de pH, temperatura y concentración BRAVERMAN (8), TOPOREK (43). Todas las enzimas son proteínas que favorecen reacciones específicas o grupos de reacciones relacionadas, tienen dos propiedades fundamentales: catálisis y especificidad. Los organismos vivos contienen y producen muchísimas enzimas diferentes FERNIETA (14), TOPOREK (43).

#### 2.3.2.1 ALGUNAS ENZIMAS PRODUCIDAS POR Aspergillus niger, QUE DEGRADAN EL ALMIDÓN

-alfa amilasa (alfa-1,4-glucan-4-glucanohidrolasa), hidroliza indistintamente al azar los enlaces alfa-1,4-glucosídicos a lo largo de la cadena de la amilosa y amilopectina, de tal modo que finalmente rinde una mezcla de glucosa y maltosa libres, ésta última no es atacada BAILEY (3), LEWININGER (29).

-Alfa-1,6-glucosidasa (alfa-1,6-glucan-6-glucanohidrolasa), hidroliza los enlaces alfa-1,6-glucosídicos en los puntos de ramificación de la amilopectina LEWININGER (29).

-Amiloglucosidasa (alfa-1,4-glucan glucohidrolasa), hidroliza los enlaces alfa-1,4-glucosídicos comenzando por el extremo no reductor del almidón, produciendo glucosa libre BAILEY (3), MERCK (32).

La acción combinada de una alfa amilasa y una glucosidasa puede, por tanto, degradar completamente el almidón a glucosa pura.

#### 2.3.2.2 ALGUNAS ENZIMAS DE LAS LEVADURAS

En las levaduras se han encontrado numerosas enzimas; los que intervienen en la fermentación alcohólica pueden agruparse en cuatro categorías BRAVERMAN (8), JORGENSEN (24) :

-Enzimas fosforilantes; cuya función consiste en ligar grupos de ácido fosfórico a las hexosas o separarlos del ácido pirúvico o glicerol, la enzima más importante de este tipo es la hexo-

quinasa.

-Enzimas óxidorreductoras; la más importante de este grupo es la acetaldeshidrogenasa, que contiene como grupo prostético NAD (nicotin adenin dinucleótico), esta enzima desempeña el papel fundamental en el control de todo el ciclo de la fermentación alcohólica.

-Enzimas carboxilasas; la descarboxilación del ácido pirúvico a acetaldehído es catalizada por la carboxilasa, una enzima que posee tiamina difosforilada como grupo prostético.

-Enzimas mutasas, enolasas, isomerasas y aldolasas; enzimas que participan en la fermentación realizando transformaciones de isomerización, enclización, etc..

### 2.3.3 GLUCOSA

Es un carbohidrato, que se encuentra en estado libre en los alimentos, distribuido en la naturaleza en forma natural, así también, combinado bajo forma de disacáridos; sacarosa y lactosa. La glucosa es la unidad de base de los polisacáridos; almidón, glucógeno y celulosa. La glucosa es el azúcar que se encuentra normalmente en la sangre; también se le conoce con el nombre de dextrosa o azúcar de uva, cristaliza en pequeños prismas rómbicos transparentes TOFCREK (43).

La glucosa interviene directamente en las actividades metabólicas de la mayor parte de los organismos vivos; al obtenerse por hidrólisis de la sacarosa y el almidón, constituye la principal fuente de energía de la dieta de la mayor parte de los seres humanos GEISSMAN (17).

El peso molecular de la glucosa,  $C_6H_{12}O_6$ , es 180.16 g/mol-g, con un porcentaje en peso de: 40.00 % de C, 6.72 % de H, 53.28% de O. Por debajo de los 50°C la alfa-D-glucosa. $\cdot H_2O$ , es un cristal de

forma estable, por encima de los 50°C, la forma anhidra es obtenida, y a temperaturas más altas la beta-D-glucosa es formada MARCH (32).

Algunas propiedades de la glucosa se presenta en el cuadro 2, en solución 0.28M, tiene un pH de 6.0 en solución con agua al 5%, w/v, tiene una densidad de 1.019 g/ml a 17.5°C. La glucosa deshidratada se disuelve en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, formándose el ácido glucosulfúrico, el H<sub>2</sub>C<sub>3</sub>, lo transforma en ácido sacárido y oxálico; todos los álcalis carbonatados y acuosos disuelven fácilmente la glucosa, con formación de compuestos salinos. La glucosa es altamente reductora, se oxida dando origen a productos como, el ácido fórmico, oxálico, tartárico, etc., o se escinde dando CO<sub>2</sub> y agua FERRER (35).

El principal uso de la glucosa es, como alimento humano, ya sea directamente como alimento energético; o en la fabricación de confituras, caramelos, helados, conservas, etc.. Se utiliza para disminuir la solubilidad de la sacarosa y también para regular el grado relativo de dulzura, en iguales concentraciones es menos viscosa, determina así, una cristalización más lenta. En medicina se usa en el tratamiento y profilaxis de la deshidratación humana.

Cuadro 2.-PROPIEDADES DE LA ALFA, BETA-D-GLUCOSA Y ALFA-GLUCOSA.H<sub>2</sub>O

Propiedad	Alfa-D-glucosa	Beta-D-glucosa	Alfa-glucosa hidratada
Rotación específica $[\alpha]_D^{20}$	+112.20°	+18.70°	+102.00°
Punto de fusión, °C	146.0	148-155	83.0
Solubilidad en agua, g/100ml	82.5	178.0	100.0

Ref. LEENINGER (29).



Se emplea como materia prima, en la obtención de ciertos productos químicos por fermentación, como alcohol, ácido láctico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido itacónico, etc..

En la actualidad en nuestro país la producción de glucosa está restringida a una sola fábrica productora DEMSA (Derivados del Maíz S.A.), con 3966 Tn, para el año 1983 ZUMAETA (48).

#### 2.3.4 ALCOHOL ETÍLICO

Es uno de los compuestos orgánicos, conocido desde los tiempos mas antiguos, pues, se forma en la fermentación de los zumos de frutas por la acción de las levaduras naturales GEISSMAN (17).

Muchas son las materias primas de las cuales se puede partir para obtener alcohol etílico; generalmente cada país emplea las que posee en mayor escala, y por lo común los subproductos de otras industrias VALLEJO (46). Manufacturado: por fermentación del azúcar, almidón y otros carbohidratos (los dos últimos previamente hidrolizados); por síntesis del etileno, acetileno, residuo de lejías sulfitadas y gas ( $\text{CO} + \text{H}_2$ ); por hidrólisis del sulfato etílico y oxidación del metano MERRICK (32).

Cualquiera que sea el método de preparación, primero se obtiene alcohol etílico mezclado con agua y otras impurezas, luego se concentra esta mezcla por destilación fraccionada; pero sucede que el componente de punto de ebullición mas bajo no es alcohol etílico (p.e.  $78.5^\circ\text{C}$ ., si no un azeótropo binario que contiene 95 % de alcohol en volumen (p.e.  $78.15^\circ\text{C}$ ). Por ser azeótropo su vapor tiene la misma composición que el líquido, por lo que no puede ser concentrado mas por destilación, cualquiera que sea la eficiencia de la columna de rectificación que se emplee MORRISON (34).

El alcohol etílico se conoce como alcohol absoluto libre de impurezas y humedad, para obtenerlo desde el alco-

hol rectificado, existen dos métodos de purificación: el primero trata el alcohol con **desecantes** sólidos y líquidos; el segundo, hace uso del comportamiento azeotrópico de mezclas de alcohol acuoso con hidrocarburos en líquidos, este método se denomina destilación azeotrópica KRETZSCHEMAR (27).

El alcohol etílico absoluto (etanol),  $C_2H_5OH$ , de peso molecular 46.07 g/mol-g, con un porcentaje en peso de 52.14 % de C, 13.13% de H, 34.73 % de O; es un líquido inodoro, muy móvil, liviano, de olor característico y absorbe agua rápidamente del aire. Es miscible con agua y con muchos compuestos orgánicos líquidos, hierve a 78.5°C, solidifica a menos 130°C, su densidad a 15.56°C (60°F) es de 0.798 g/ml MERCK (32), VALLEJO (46).

El alcohol de 95 %, contiene 92.3 % en peso o 94.8 % en volumen de alcohol etílico a 15.56°C, con una densidad de 0.816 g/ml alcohol obtenido desde las columnas de rectificación.

El alcohol con  $H_2SO_4$  concentrado, da el ácido etilsulfúrico, éter o etileno; con el  $HNO_3$  concentrado y fumante, origina una gran cantidad de vapores nitrosos de color rojo, favoreciendo la formación de algunos compuestos VALLEJO (46).

El alcohol etílico es uno de los compuestos de origen orgánico mas usado, tanto en la industria como en el laboratorio, en la vida doméstica, como en medicina y farmacia.

La industria usa extensamente, el alcohol etílico, como solvente; para lacas, barnices, perfumes, condimentos; como medio para reacciones químicas; en la recristalización de numerosos productos; en la elaboración de saborizantes y bebidas; en la industria de la nitrocelulosa, de la seda artificial y del PVC; también como materia prima para obtener: vinagre, éter, éter acético y sus derivados, etc.. En los últimos años, gracias a su propiedad carburante, el alcohol, es aprovechado como combustible mezclado con gasolina.

Cuadro 3.-PRODUCCION NACIONAL DE ALCOHOL DE MELAZA

Año	No Rectificado, lt	Rectificado, lt
1970	33'539,585	6'105,640
1971	29'438,862	10'025,761
1972	27'923,167	11'978,192
1973	31'013,296	12'507,204
1974	35'543,853	14'223,457
1975	33'359,047	12'229,400
1976	31'165,468	10'797,048
1977	29'382,881	10'462,868
1978	30'787,092	12'069,454
1979	25'373,588	21'079,104
1980	26'045,377	21'142,588

Fuente: Banco de la Nación-División de Alcoholes y Bebidas Alcohólicas.

#### 2.3.4.1 PRODUCTOS SECUNDARIOS EN LA PRODUCCION DE ALCOHOL

-Aceite de fusel.-Es un líquido amarillento de olor desagradable, cuya composición varía según la materia prima de la cual se ha obtenido el alcohol, por lo general este aceite, está constituido: por los alcoholes; amílico, isoamílico, n-propílico, isopropílico, n-hexílico; ácidos libres, ésteres, aldehidos, cetonas, alcoholes terciarios, fenoles. El punto medio de ebullición de la mezcla es aproximadamente de 120°C y la gravedad específica a 15°C corresponde a 0.830 FRESCOTT (38), TICOMA (42), ULLMAN (45).

-Anhidrido carbónico.-Desprendido durante la fermentación, aproximadamente a razón de 1 Kg por Kg de alcohol, se puede recuperar en un 70 %, para luego ser purificado en forma líquida para su comercio (35 atm a 0°C) ULLMAN (45).

-Vinazas.-Constituye el producto de fondo de la destilación, en término promedio contiene 93.3 % de agua, 2.2 % de proteína bruta, 0.1 % de grasa, 3.1 % de extracto nitrogenado, 10.6 % de fibra cruda, 0.7 % de cenizas KRETZSCHMAR (27), ULLMAN (45).

#### 2.3.4.2 RENDIMIENTO DEL ALCOHOL

La densidad del alcohol etílico a 15°C es 794.25 g/l, tomando como base este dato se calculan los siguientes rendimientos teóricos:

- 100 Kg de glucosa o fructuosa rinde 64.39 l de alcohol etílico.
- 100 Kg de almidón rinde 71.54 l de alcohol etílico.
- 100 Kg de sacarosa o maltosa rinde 67.77 l de alcohol etílico.

Algunos rendimientos experimentales se presenta en el cuadro 4 KRETZSCHMAR (27); en la práctica, las siguientes razones impiden que se alcancen dichos resultados

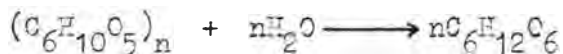
- El almidón nunca se transforma completamente en azúcares fermentescibles cuando se utilizar materias primas amiláceas.
- Determinadas cantidades de hidratos de carbono quedan sin fermentar, y otras se pierden debido a la formación de ácidos por acción bacteriana.
- Parte del alcohol etílico se transforma en ácido acético o acetaldehído o se pierde por evaporación.

### 2.4 OPERACIONES BASICAS Y QUIMICAS

#### 2.4.1 HIDROLISIS DEL ALMIDON

La hidrólisis, es una reacción química que consiste en el desdoblamiento de moléculas estructurales de gran tamaño (proteínas, almidón, celulosa, grasa, etc.), en sus partes constituyentes por la introducción de una molécula de agua en los enlaces adecuados.

La hidrólisis del almidón, consiste en la ruptura de las cadenas o enlaces glucosídicos por medio de la inclusión de moléculas de agua para dar lugar a carbohidratos de menor peso molecular o azúcares, en este fenómeno el hidrógeno de la molécula de agua va a una molécula de glucosa y el OH se fija a la otra, si la hidrólisis es total el producto final es la D-glucosa.



Cuadro 4.-RENDIMIENTO EXPERIMENTAL DE ETANOL POR 100 Kg DE ALGUNOS ALMIDONES Y AZUCARES

Materia prima	Almidón %	Azucar %	Alcohol de 100°
Almidón puro, seco	100	—	60.0 - 67.0
Papas frescas	22	—	13.2 - 14.7
Trigo	62	—	37.2 - 41.5
Maíz	60	—	36.0 - 40.2
Arroz	70	—	42.0 - 46.9
Cebada	50	—	30.0 - 33.5
Azucar pura	—	100	58.0 - 64.0
Remolacha de azucar	—	18	10.4 - 11.5
Melaza de caña de azucar	—	55	31.9 - 35.2

Ref. KRETZSCHMAR (27).

#### 2.4.1.1 METODOS DE HIDROLISIS DEL ALMIDON

Se puede hidrolizar por tres diferentes métodos:

**-Reacciones con soluciones diluidas de ácidos fuertes:** En estos casos se usan HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Estos procesos se

llevan a cabo a presiones y temperaturas moderadamente altas por lo que en la actualidad está quedando en desuso ya que el consumo energético eleva el costo del proceso.

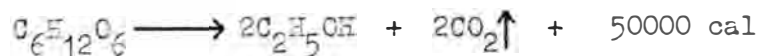
-Reacciones catalizadas enzimáticamente: En estos casos se utilizan enzimas provenientes de diversas fuentes (vegetales, animales y microbiales). Cuando se utilizan enzimas vegetales o animales el proceso se hace relativamente costoso, pero al utilizar enzimas microbiales el costo disminuye considerablemente. Estas enzimas son amilasas y glucosidasas. El comportamiento de las enzimas y sus actividades varían considerablemente; dependiendo mucho de las fuentes de donde provienen, así, la alfa-amilasa de la saliva humana tiene su máxima actividad a un pH casi neutro y 37°C, mientras que alfa-amilasa proveniente de Aspergillus niger (microbial), tiene su máxima actividad a pH 4 y 30°C ARRENAS (2).

-Fermentación sumergida: Esta técnica suele ser incluida en la hidrólisis enzimática, ya que el microorganismo responsable de la fermentación durante la fase de acondicionamiento produce enzimas celulares o extracelulares las cuales hidrolizan posteriormente el almidón.

#### 2.4.2 FERMENTACION ALCOHOLICA

La fermentación es un proceso metabólico, que da lugar a cambios químicos en substratos orgánicos mediante la acción de enzimas, producidos por microorganismos.

La fermentación alcohólica se produce por transformación de los azúcares fermentescibles (material azucarado o amiláceo hidrolizado), a alcohol y CO<sub>2</sub> de acuerdo con la reacción básica:



La pérdida total de energía durante el proceso de fermentación

es de unas 50000 cal por cada mol gramo de glucosa fermentada BRAVERMAN (8).

En la fermentación alcohólica se emplean exclusivamente levaduras, para el caso de hexosas el mas usado es la Saccharomyces cerevisiae. Durante la fermentación alcohólica se distinguen 3 fases: la fase preliminar que se caracteriza por la multiplicación celular, donde la aereación es beneficiosa; la fase tumultuosa completamente anaerobia, que se caracteriza por la elevación de la temperatura con intenso desprendimiento de  $CO_2$  y una fase complementaria que se caracteriza por la disminución del desprendimiento del  $CO_2$  y calor CASIDA (12), ROMERO (40).

#### 2.4.2.1 VIA DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA

La degradación anaeróbica de la glucosa a ácido pirúvico, se denomina glucólisis, la secuencia de reacciones entre estos compuestos se conoce generalmente con el nombre de ruta de Embden-Meyerhof BAILLY (3), BRAVERMAN (8), LEHNINGER (29), RHODES (39); dependiendo el destino posterior del ácido pirúvico de las condiciones ambientales. En organismos como las levaduras, que fermentan glucosa a etanol la descarboxilación del ácido pirúvico se presenta en condiciones anaeróbicas, resultando acetaldehido y  $CO_2$  por medio de la enzima Co-carboxilasa, para luego reducirse a etanol mediante la enzima alcohol deshidrogenasa.

En la figura 4, se presenta la vía de la fermentación alcohólica; la glucólisis comienza con la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato por medio del ATP (adenosin-trifosfato) y catalizada por la enzima hexoquinasa (A), la glucosa-6-fosfato se isomeriza en forma reversible a fructuosa-6-fosfato mediante la fosfoglucoisomerasa (B); la fructuosa-6-fosfato nuevamente es fosforilada por otro ATP en presencia de la fosfohexoquinasa (C) a fructuosa-1,6-difosfato.

La fructuosa-1,6-difosfato adquiere del ATP, la cantidad de energía necesaria para su fisión en dos triosas: fosfato de dihidroxiacetona y D-gliceraldehído-3-fosfato. Esta fisión de la fructuosa-1,6-difosfato (D), es catalizada por la aldosa, estableciéndose un equilibrio entre las dos triosas por acción de una isomerasa de fosfato de triosa (E). Si la fermentación prosigue normalmente, sin interferencias internas el equilibrio se desplaza hacia el ácido-1,3-difosfoglicérico, esta oxidación es catalizada por la acetaldéhidodeshidrogenasa (F,; que contiene NAD (nicotinadeninucleótido) y en presencia de fósforo inorgánico (P). El fosfato en posición uno del último compuesto se halla unido a una molécula del ácido por medio de un enlace rico en energía, el cual es transferido al ADP (adenosin difosfato), en una reacción que produce ácido-3-fosfoglicérico y ATP en presencia de la fosfoquinasa (G).

El ácido-3-fosfoglicérico es isomerizado ahora, por la acción de la fosfogliceromutasa (H) a ácido-2-fosfoglicérico, que pierde una molécula de agua y por acción de la enolasa (I) se convierte en ácido fosfoenolpirúvico, éste pierde una molécula de ácido fosfórico donándola al ADP, formándose una molécula de ATP, por acción de la fosfoquinasa (J) transformándose en ácido pirúvico. En la siguiente etapa se descarboxila la forma ceto del ácido pirúvico, liberando una molécula de  $CO_2$ , etapa que es catalizada por la carboxilasa (K), la descarboxilación deja evidentemente como residuo acetaldéhid, el cual es deshidrogenado por el  $(2H^+ + 2H^+O^-)$  y catalizada por la enzima deshidrogenasa alcohólica (L), a alcohol etílico.

#### 2.4.2.2 FACTORES QUE FAVORECEN EL PROCESO FERMENTATIVO

-Efecto de nitrógeno: El mosto a fermentar debe contener su suficiente cantidad de sustancias nitrogenadas para el desarrollo celular, siendo necesario adicionar sales amónicas (sulfato de amonio



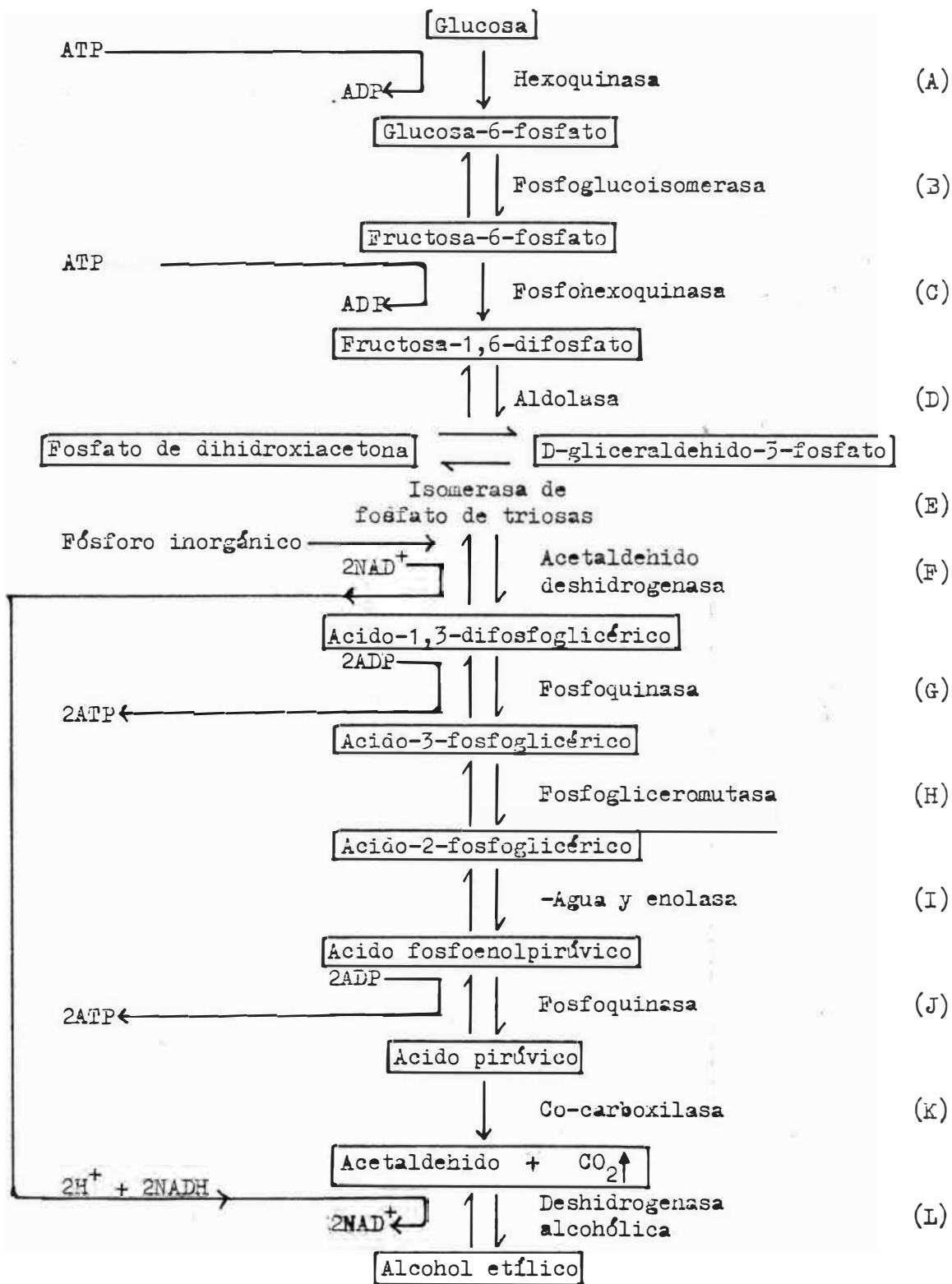


Fig.4.-VIA DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA

o fosfato de amonio) en un 0.5 ‰ como mínimo. Si este porcentaje es menor disminuye el rendimiento INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA (22)

-Efecto de la concentración de azúcares: Se ha establecido que lo ideal es operar con un 10 a 18 ‰ de azúcares totales en el mosto (de 10 a 17° Brix), a esta concentración el azúcar residual no pasará del dos por ciento como máximo. Bajo estas condiciones la eficiencia fermentativa es óptima (30 a 90 ‰), pero la producción de alcohol en volumen es bajo 6 ‰. Estudios realizados en la destilería de Paramonga indican que, para aumentar el rendimiento de producción de alcohol es necesario sacrificar parte de la eficiencia fermentativa aumentando la concentración de azúcares a 50 ‰ (28° Brix), obteniéndose una producción de alcohol de 9.6 % y 13° Brix de azúcar residual en 60 horas INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA (22).

-Efecto de temperatura: Los fermentadores se preparan a condiciones ambientales o pre-calentando el agua de dilución ( con una dureza máxima de 300 ppm), para obtener un mosto de unos 28°C. La fermentación es una reacción exotérmica por lo que la temperatura tiende a subir a partir de las tres horas de iniciada, pudiendo sobrepasar los 40°C fácilmente, la temperatura ideal de operación es de 36°C como máximo INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA (22).

-Efecto de aereación de los mostos: La aereación es importante durante la primera fase de la fermentación para la multiplicación celular y es completamente anaeróbica en las fases siguientes TICOMA (42).

-Efecto de la adición de ácido: el pH del mosto debe ser ajustado de 4 a 5, el mas usado es entre 4.8 a 5; añadiendo  $H_2SO_4$  o ácido láctico a fin de favorecer la multiplicación celular e inhibir la contaminación microbiana. Bajo esta condición el mosto requiere solamente ser pasteurizado CASIDA (12), ROEMER (40), UEDA (44).

### 2.4.3 DESTILACION Y RECTIFICACION

La destilación es un proceso físico por el cual los diversos componentes de una mezcla son separados en virtud de la diferencia de sus puntos de ebullición. El principio de la destilación se basa en el fenómeno de fraccionamiento de los líquidos, donde los mas volátiles con puntos de ebullición mas bajos se separan en primer lugar, seguido por los componentes en secuencia correspondiente en sus respectivas volatilidades. Mediante la destilación tanto el alcohol como los componentes volátiles son separados de los líquidos fermentados, prosiguiendo con la eliminación de las impurezas por rectificación ARAUJO (1).

La rectificación es una destilación realizada de tal manera que el vapor que sale del alambique o de la columna, se pone en contacto con una porción condensada del vapor previamente producido en el mismo aparato. De este contacto resulta una transferencia de material y un intercambio de calor, consiguiéndose así un mayor enriquecimiento del vapor en los elementos mas volátiles del que podría alcanzarse con una simple operación de destilación que utilizará la misma cantidad de calor. Los vapores condensados que se retornan para conseguir este objetivo se denomina reflujo. Los dispositivos o aparatos empleados para la rectificación del alcohol se denominan columnas o torres de rectificación FERRY (37).

### 2.5 CINETICA DE LAS TRANSFORMACIONES BIOQUIMICAS

Un aspecto importante que debe ser considerado en el estudio de la cinética, reside en el hecho de que las concentraciones de las enzimas catalizadoras de las reacciones que se procesan no se mantienen constantes con el tiempo, en muchos casos aumentan frecuentemente como consecuencia de la reproducción microbiana res-

niger, fue estudiado usando 2.0 % (w/v) de concentración de harina de yuca como sustrato, sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y pH 3.5 . Los resultados obtenidos a 18°C, 24°C, 27°C, 30°C, 33°C, 37°C y 45°C; se muestra en el cuadro 13, figura 11 y en el apéndice figura 3A.

La comparación de los resultados de la máxima conversión del almidón de la harina de yuca a glucosa a las temperaturas estudiadas se presenta en el cuadro 14, observándose que a 37°C se obtiene la mejor conversión, 93.6 %, con una formación de glucosa de 17.0 mg/ml en 115 horas, seguido por las temperaturas de 33°C y 30°C, con 16.9 y 16.6 mg/ml de glucosa, con 93.0 y 91.4 % de conversión respectivamente, ambas a 115 horas.

En el cuadro 14, se observa que las temperaturas comprendidas en el rango de 30 a 37 °C, favorece el crecimiento y desarrollo del Aspergillus niger, así como la formación del producto; a temperaturas entre 18 a 28°C el tiempo de conversión del almidón a glucosa se incrementa y el rendimiento disminuye; por encima de los 42°C el microorganismo parece no desarrollar o su desarrollo es muy lento; a 50°C el Aspergillus niger muere en 24 horas; a temperaturas menores que 18°C, no se realizó el estudio por no contar con un equipo especial. Consideramos como óptimo el rango de temperatura entre 30 y 33°C, porque la cantidad de glucosa obtenida es similar al de 37°C, además estas temperaturas pueden alcanzarse al medio ambiente en las zonas tropicales donde se cultiva la yuca, lugar donde puede instalarse una planta industrial. Los resultados descritos guardan relación con los reportados por BROCK (10) y CARPENTEN (11).

Con relación al presente trabajo se tiene a VERA (47), que reporta el proceso de hidrólisis del almidón de yuca con farelo enzimático de Aspergillus awamori, obtenido a una temperatura de 28°C, temperatura cercana al obtenido en el estudio, la pequeña diferencia que

Cuadro 12.- VALORES MAXIMOS DE CONCENTRACION DE GLUCOSA, TIEMPO Y CONVERSION DEL EFECTO DEL pH INICIAL EN LA HIDROLISIS DEL ALMIDON DE LA HARINA DE YUCA POR FERMENTACION SUMERGIDA CON Aspergillus niger ATCC 1015, PARA LA OBTENCION DE GLUCOSA A 30°C, 2% DE SUBSTRATO Y  $(NH_4)_2SO_4$  COMO FUENTE DE NITROGENO

pH Inicial	Tiempo h	Conc. Glucosa mg/ml	Conversion %
2.0	159	14.8	82.1
2.5	155	15.0	82.6
3.0	120	16.0	83.1
3.5	115	16.6	91.4
4.0	130	16.2	89.2
4.5	151	16.2	89.2
5.0	155	15.4	84.8
5.5	156	14.8	82.1
6.0	144	7.9	43.5

Cuadro 13.-RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL EFECTO DE TEMPERATURA EN LA HIDROLISIS DEL ALMIDON DE LA HARINA DE YUCA POR FERMENTACION SUMERGIDA CON Aspergillus niger ATCC 1015, PARA LA OBTENCION DE GLUCOSA A pH 3.5, 2% DE SUBSTRATO Y SULFATO DE AMONIO COMO FUENTE DE NITROGENO

Temperatura °C	Tiempo, h									
	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156
	Concentración de Glucosa, mg/ml									
18	0.3	0.9	1.3	2.1	3.3	3.5	4.5	6.0	6.4	7.8
24	0.6	2.6	5.8	8.9	11.5	13.0	14.1	15.6	14.9	14.2
27	0.8	4.0	7.8	11.0	12.5	14.1	15.6	14.8	14.9	13.9
30	1.1	4.4	7.8	10.5	12.3	15.5	16.1	14.2	13.4	12.1
33	1.4	6.9	10.5	12.8	14.2	16.0	16.6	13.8	14.1	12.5
37	1.2	6.7	6.8	9.8	13.0	16.3	16.8	16.2	15.7	14.9
45	0.8	0.9	0.8	1.1	1.0	1.2	1.1	1.0	0.8	0.8

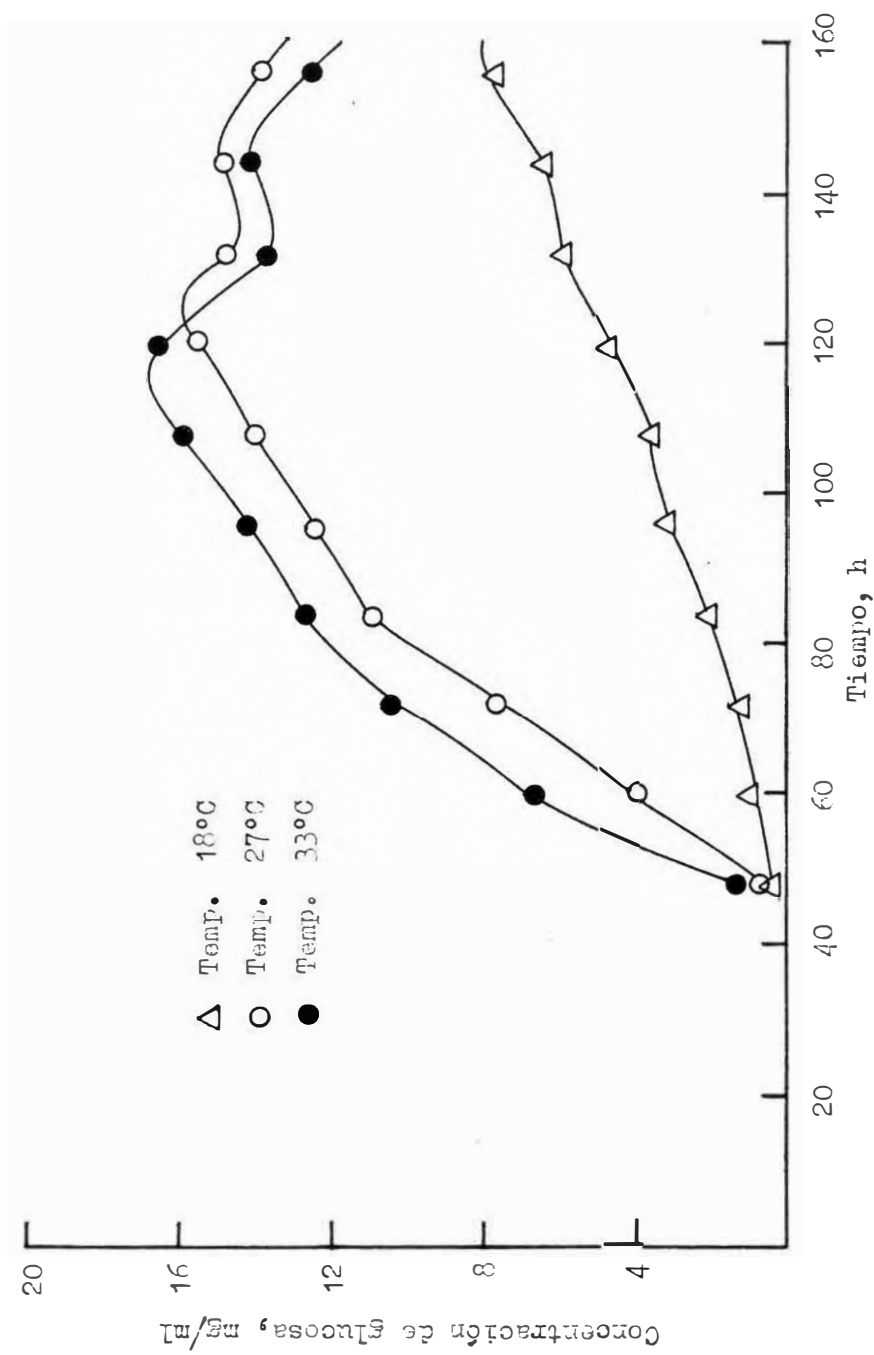


Fig. 11.-EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA HIDROLISIS DEL ALMIDON DE HARINA DE YUCA POR FERMENTACION SUPERGIDA CON *Aspergillus niger* ATCC 1015, PARA LA OBTENCION DE GLUCOSA, A pH INICIAL 3.5, 2 % (w/v) DE CONCENTRACION DE SUBSTRATO Y SULFATO DE AMONIO COMO FUENTE DE NITROGENO

de atribuirse al hecho de que son dos especies diferentes de microorganismo.

#### 4.2.2.4 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL SUBSTRATO EN LA HIDROLISIS DEL ALMIDON DE LA HARINA DE YUCA POR FERMENTA - CION SUMERGIDA CON Aspergillus niger ATCC 1015, PARA LA OBTENCION DE GLUCOSA

Esta parte del estudio fue realizado empleando: 2 %, 4 %, 5 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 %, 15 % (w/v) de concentración de substrato de harina de yuca, bajo condiciones óptimas determinadas en los estudios anteriores. Sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, pH 3.6 y temperatura 32°C.

Los resultados obtenidos, hasta la máxima formación de glucosa, se presenta en el cuadro 15 y figura 12. El cuadro 16, compara los máximos valores de formación de glucosa, tiempo y porcentaje de conversión, a las concentraciones de substrato estudiados.

Cuando la concentración de substrato fue incrementado y la concentración de otros nutrientes se hizo permanecer constante, el medio de cultivo tórnase más espeso y gelatinoso. Después de dos días de incubación, tiempo considerado como fase de latencia para el Aspergillus niger en este estudio, el medio comenzó a licuefacterse, empezando la formación de glucosa.

A concentraciones altas de substrato, obtenida la máxima formación de glucosa, ésta permanece casi constante antes de consumirse, por un tiempo aproximadamente de 24 horas, a concentraciones menores, la desaparición de la glucosa fue mas rápida.

En el cuadro 16 se observa, que al incrementar la concentra

Cuadro 14.-VALORES MAXIMOS DE CONCENTRACION DE GLUCOSA, TIEMPO Y CONVERSION DEL EFECTO DE TEMPERATURA EN LA HIDROLISIS DEL ALMIDON DE LA HARINA DE YUCA POR FERMENTACION SUMERGIDA CON Aspergillus niger ATCC 1015, PARA LA OBTENCION DE GLUCOSA A pH 3.5, 2% DE SUBSTRATO Y  $(NH_4)_2SO_4$  COMO FUENTE DE NITROGENO

Temp. °C	Tiempo h	Conc. Glucosa mg/ml	Conversion %
18	156	7.8	43.3
24	135	16.0	88.1
27	124	16.0	88.1
30	115	16.6	91.4
33	115	16.9	93.0
37	115	17.0	93.6
45	155	00.8	4.4

Cuadro 15.-RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL SUBSTRATO EN LA HIDROLISIS DEL ALMIDON DE LA HARINA DE YUCA POR FERMENTACION SUMERGIDA CON Aspergillus niger ATCC 1015 PARA LA OBTENCION DE GLUCOSA A pH 3.6, 32°C Y SULFATO DE AMONIO COMO FUENTE DE NITROGENO

Conc. de Substrato %	Tiempo, h						
	48	60	72	84	96	108	115
	Concentración de Glucosa, mg/ml						
2.0	0.8	7.1	10.8	12.7	15.0	16.5	17.2
4.0	1.0	10.2	22.5	29.1	33.4	33.6	
5.0	1.4	11.1	24.8	33.4	38.8		
6.0	1.9	15.8	30.6	38.5	45.7		
8.0	1.9	15.8	29.4	43.3	53.5	59.7	
10.0	2.1	19.2	41.2	57.3	66.8	73.8	
12.0	2.2	19.9	37.0	51.6	69.4	83.2	
15.0	2.2	20.1	41.3	57.5	71.1	93.3	



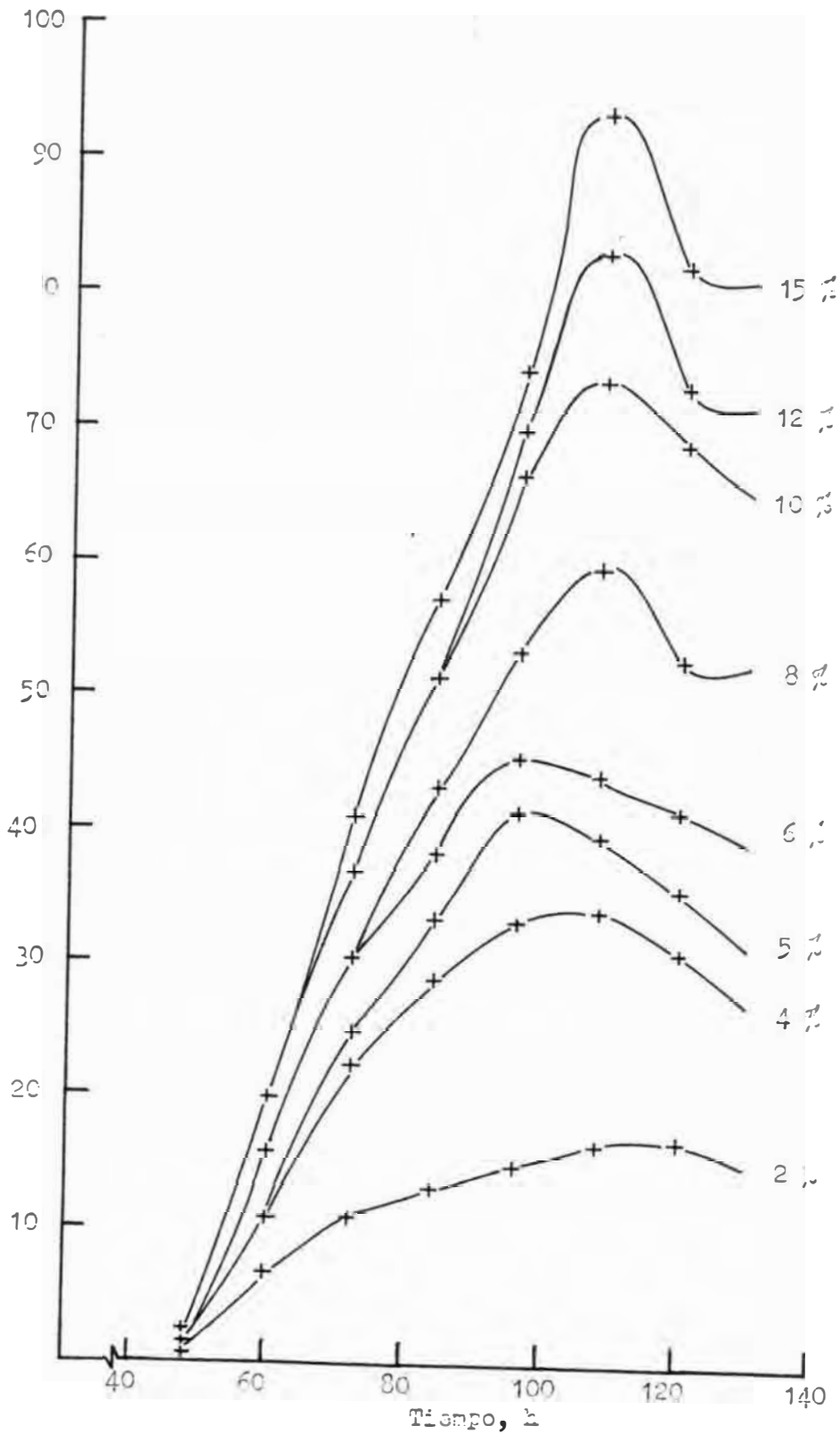


Fig. 12.-FORMACION DE PRODUCTO EN EL ESTUDIO DEL EFECTO DE CONCENTRACION DE SUBSTRATO (w/v), SOBRE LA HIDROLISIS DEL AMIDON DE HARINA DE YUCA POR FERMENTACION SUMERGIDA CON *Aspergillus niger*, PARA LA OBTENCION DE GLUCOSA A: pH 3.6, 32°C,  $\text{NH}_4\text{SC}_4$  COMO FUENTE DE NITROGENO

ción de sustrato inicial la eficiencia de conversión decrece; comparando los resultados obtenidos con 2 % y 15 % (w/v) de concentración de sustrato, se tiene al 2 % la mejor eficiencia 94.1 %, pero solamente 17.1 mg/ml de glucosa, en cambio al 15 % se obtiene 93.3 mg/ml de producto, pero, la eficiencia es menor, 68.5 %.

Para hallar la concentración óptima de sustrato, es necesario realizar el estudio cinético del proceso bioquímico, es decir el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de reacción, porque en estos procesos la enzima se satura con el sustrato.

La menor eficiencia fermentativa hallada a la mayor concentración de sustrato, sin tener en cuenta el efecto de saturación de la enzima por el sustrato, puede atribuirse a las siguientes aplicaciones:

-Inhibición del desarrollo del microorganismo, ya que en medios donde existe alta concentración de glucosa, disminuye la actividad y disponibilidad del agua, por lo que se ve limitado el transporte de nutrientes hacia las células o puede ocurrir la deshidratación de las células en soluciones concentradas.

-La proporción carbono-nitrógeno puede no estar en la óptima relación que permite el desarrollo del microorganismo, ya que se a variado la fuente energética, pero los otros nutrientes han permanecido constantes.

-Limitación en los procesos de transferencia de masa por difusión y transferencia de calor, ya que al aumentar la concentración de sustrato, todo el medio de fermentación adquiere una consistencia gelatinosa, la cual induce a la transferencia de calor por conducción en lugar de convección, ARENAS (2).

4.2.2.5 EFECTO DE LA CONCENTRACION INICIAL DE SUBSTRATO SOBRE LA VELOCIDAD INICIAL DE REACCION EN LA HIDROLISIS DEL ALMIDON DE LA HARINA DE YUCA POR FERMENTACION SUMERGIDA CON Aspergillus niger ATCC 1015, PARA LA OBTENCION DE GLUCOSA

La finalidad de este estudio es encontrar un rango de concentración inicial óptimo de sustrato, para llevar a cabo el proceso de hidrólisis del almidón de la harina de yuca por fermentación sumergida; teniendo en cuenta, que la enzima producida por el Aspergillus niger en la fase de latencia, se va a saturar, con una concentración determinada de sustrato.

El método cinético de Michaelis-Menten, es aún hoy día, uno de los más aceptados, como objetivo básico de explicar la influencia de la concentración de sustrato en la cinética de una reacción enzimática, una vez fijada las demás condiciones experimentales. El único instante en que las condiciones experimentales son bien conocidas, es al inicio de la fase logarítmica (término de la fase de latencia) del crecimiento microbiano, obteniéndose así la velocidad inicial de consumo de sustrato o formación de producto.

La fase de latencia para este estudio, como se indicó anteriormente, fue de 46 horas, por tanto, se debe hallar la velocidad inicial de reacción ( $v_0$ ), en ese instante para las diferentes concentraciones de sustrato. En el cuadro 17, se presenta los valores de la desaparición del sustrato con respecto al tiempo y graficados en la figura 13, para las diferentes concentraciones estudiadas. Para obtener la velocidad inicial de reacción del consumo de sustrato para cada concentración, se ha realizado un gráfico especial (ver apéndice, figuras: 4A, 5A, 6A, 7A, 8A, 9A, 10A y 11A ); la pendiente trazada en cada una de las curvas a las 46 horas representa la velocidad inicial de reacción para cada concentración de sustrato.

Cuadro 16.-VALORES MAXIMOS DE CONCENTRACION DE GLUCOSA, TIEMPO Y CONVERSION DEL EFECTO DE CONCENTRACION DE SUBSTRATO EN LA HIDROLISIS DEL ALMIDON DE LA HARINA DE YUCA POR FERMENTACION SUMERGIDA CON Aspergillus niger ATCC 1015, PARA LA OBTENCION DE GLUCOSA A pH 3.6, 32°C Y  $(NH_4)_2SO_4$  COMO FUENTE DE N

Conc. Substrato	Tiempo h	Conc. Glucosa mg/ml	Conversion %
2.0	115	17.1	94.1
4.0	100	33.6	92.5
5.0	96	38.9	85.7
6.0	95	45.7	83.9
8.0	100	59.7	82.2
10.0	106	73.8	81.3
12.0	106	83.2	76.3
15.0	106	93.3	68.5

Cuadro 17.-VALORES DE DESAPARICION DE SUBSTRATO EN EL ESTUDIO DEL EFECTO DE CONCENTRACION DE SUBSTRATO EN LA HIDROLISIS DEL ALMIDON DE LA HARINA DE YUCA POR FERMENTACION SUMERGIDA CON Aspergillus niger ATCC 1015, A pH 3.6, 32°C Y SULFATO DE AMONIO COMO FUENTE DE NITROGENO

Conc. de Substrato Inicial, %	Tiempo, h							
	46	48	60	72	84	96	108	115
	Concentración de Substrato, g/l							
2.0	16.4	15.6	10.0	6.6	4.9	2.9	1.5	1.0
4.0	32.7	31.8	23.5	12.4	6.5	2.6	2.5	
5.0	40.9	39.7	30.9	18.6	10.8	5.9		
6.0	49.1	47.4	34.9	21.5	14.4	7.9		
8.0	65.4	63.7	51.2	39.0	26.4	17.3	11.6	
10.0	81.8	79.9	64.5	44.6	30.2	21.7	15.3	
12.0	98.1	96.1	80.2	64.8	51.7	35.7	23.2	
15.0	122.6	120.7	104.5	85.4	70.9	58.7	38.7	

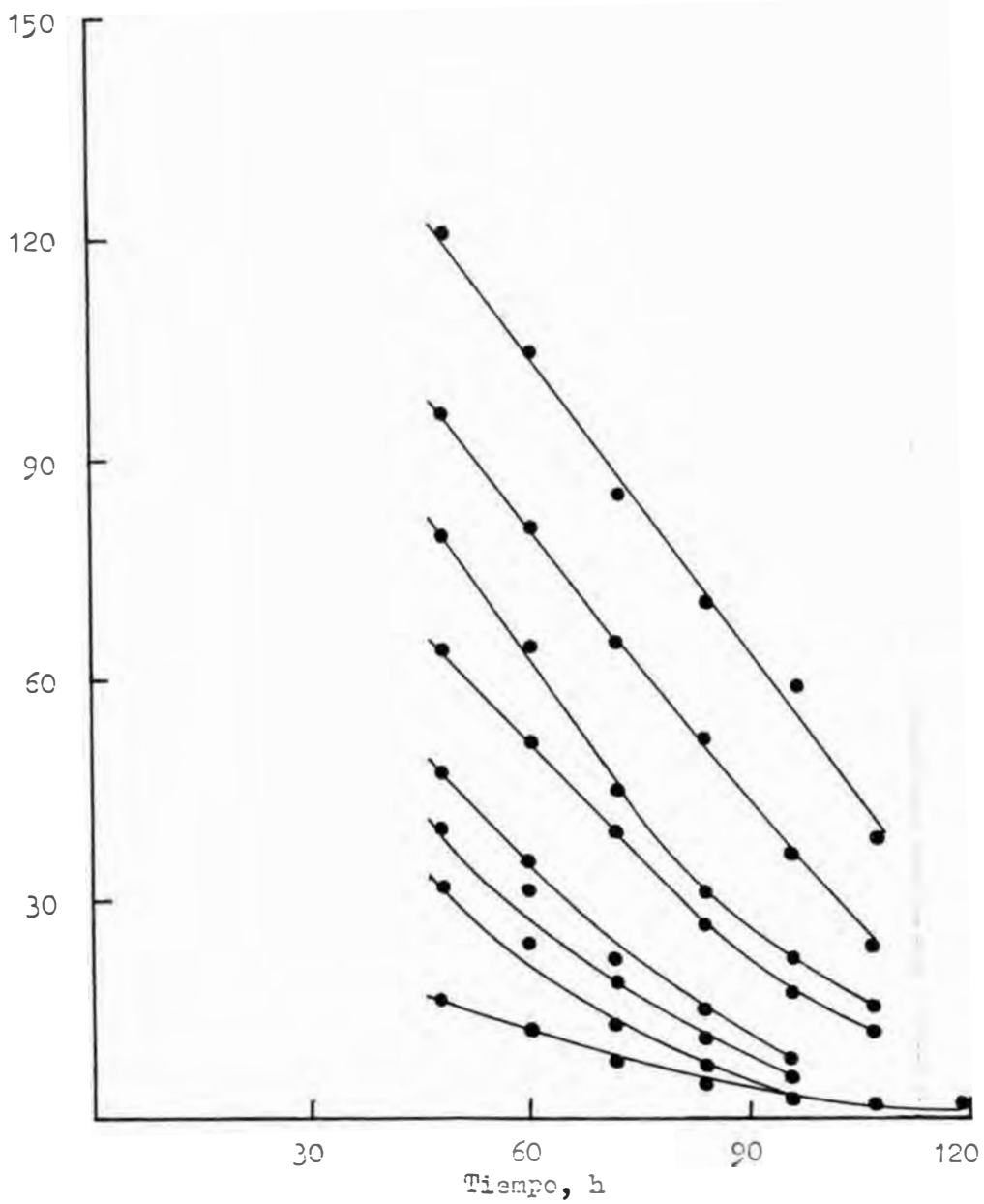


Fig. 13.-DESMEARICION DE SUBSTRATO EN EL ESTUDIO DEL EFECTO DE CONCENTRACION DE SUBSTRATO (w/v), SOBRE LA HIDROLISIS DEL AMIDON DE RAIZ DE YUCA POR FERMENTACION SUBMERGIDA CON Aspergillus niger ATCC 1015, PARA LA OBTENCION DE GLUCOSA, A pH INICIAL 3.6, 32°C, Y SULFATO DE AMONIO COMO FUENTE DE NITROGENIO

El resultado de las pendientes halladas gráficamente se muestra en el cuadro 18 frente a la concentración inicial de substrato, así como también sus inversas.

En la figura 14 se ha graficado la velocidad inicial de reacción con respecto a la concentración inicial de substrato, en la cual se observa: para una concentración baja de substrato hasta el 5 % la velocidad inicial de reacción es proporcional a la concentración de substrato y la reacción es de primer orden con respecto al mismo. A medida que la concentración de substrato aumenta de 5 a 12 %, la velocidad inicial de reacción disminuye y deja de ser proporcional a la concentración, en esta zona el orden de reacción es mixto. Al aumentar la concentración de 12 a 15 % de substrato la velocidad inicial de reacción es independiente de la concentración y se aproxima asintóticamente a una velocidad inicial de reacción constante, por consiguiente el orden de reacción con respecto al substrato es cero y se puede afirmar que la enzima se encuentra saturada con el substrato. Con los resultados de la sección 4.2.2.4 y la presente se puede concluir que la concentración óptima de substrato está en el rango del 10 al 12 %.

#### 4.3 ECUACION CINÉTICA: MICHAELIS-MENTEN

La ecuación cinética de Michaelis-Menten: es la ecuación de velocidad para una reacción de un sólo substrato catalizada enzimáticamente, relaciona la velocidad inicial de reacción ( $v_o$ ), la velocidad máxima de reacción ( $v_m$ ) y la concentración inicial de substrato ( $[S]_o$ ), a través de la constante de Michaelis-Menten ( $k_M$ ).

$$v_o = (v_m [S]_o) / (k_M + [S]_o) \quad \text{Ec. Michaelis-Menten}$$

El valor aproximado de  $v_m$  y  $k_M$  son obtenidos gráficamente a partir de la figura 14:

Guadro 18.- VALORES DE LA VELOCIDAD INICIAL DE REACCION ( $v_o$ ), DETERMINADOS GRAFICAMENTE PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE CONCENTRACION DE SUBSTRATO SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCION, EN LA HIDROLISIS DEL ALMIDON DE LA FARINA DE YUCA POR FERMENTACION SUMERGIDA CON *Aspergillus niger* ATCC 1015, A pH INICIAL 3.6, 32°C Y SULFATO DE ALUMINIO COMO FUENTE DE NITROGENO

Concentración Substrato (w/v)	$v_o$ (g/l)/h	$[S]_o$ g/l	$1/v_o$ h/(g/l)	$1/[S]_o$ l/g
2 %	0.457	16.35	2.188	0.061
4 %	0.702	32.70	1.425	0.031
5 %	0.805	40.87	1.242	0.025
6 %	0.910	49.65	1.099	0.020
8 %	1.019	65.40	0.981	0.015
10 %	1.125	81.75	0.889	0.012
12 %	1.182	98.10	0.846	0.010
15 %	1.329	122.63	0.752	0.008

$$v_m = 1.5 \text{ g/l h}$$

$$k_M = 36.0 \text{ g/l}$$

Reemplazando los valores anteriores de  $v_m$  y  $k_M$  en la ecuación de Michaelis-Menten se tiene:

$$v_o = (1.5 [S]_o) / (36.0 + [S]_o)$$

La ecuación de Michaelis-Menten puede transformarse algebraicamente en otras formas que son más útiles para la interpretación de los datos experimentales; tomando los recíprocos a ambos miembros de la ecuación de Michaelis-Menten se tiene:

$$1/v_o = (k_M + [S]_o) / v_m [S]_o$$

$$1/v_o = 1/v_m + (k_M/v_m)(1/[S]_o)$$

La última relación es la ecuación de Lineweaver-Burk y tiene la forma de la ecuación de una línea recta, cuando se grafica:

$$1/v_o \text{ vs } 1/[S]_o$$

La línea recta tiene pendiente positiva  $k_M/v_m$ , con intersecciones de  $-1/k_M$ ,  $1/v_m$  sobre los ejes  $1/[S]_o$  y  $1/v_o$ .

La figura 15 representa la ecuación de Lineweaver-Burk, doble recíproca, obtenida al graficar  $1/v_o$  vs  $1/[S]_o$ , con los datos de las dos últimas columnas del cuadro 18.

La representación doble recíproca tiene la ventaja de que permite una determinación mucho más exacta del valor de  $v$ , ya que en la representación sencilla (figura 14), se obtiene un valor aproximado, puesto que es un valor límite a una concentración de sustrato in finita. Los valores más exactos de  $v_m$  y  $k_M$ , pueden obtenerse gráficamente de la figura 15. Considerándolos como resultados finales:

$$v_m = 1.6 \text{ g/lh}$$

$$k_M = 39.2 \text{ g/l}$$



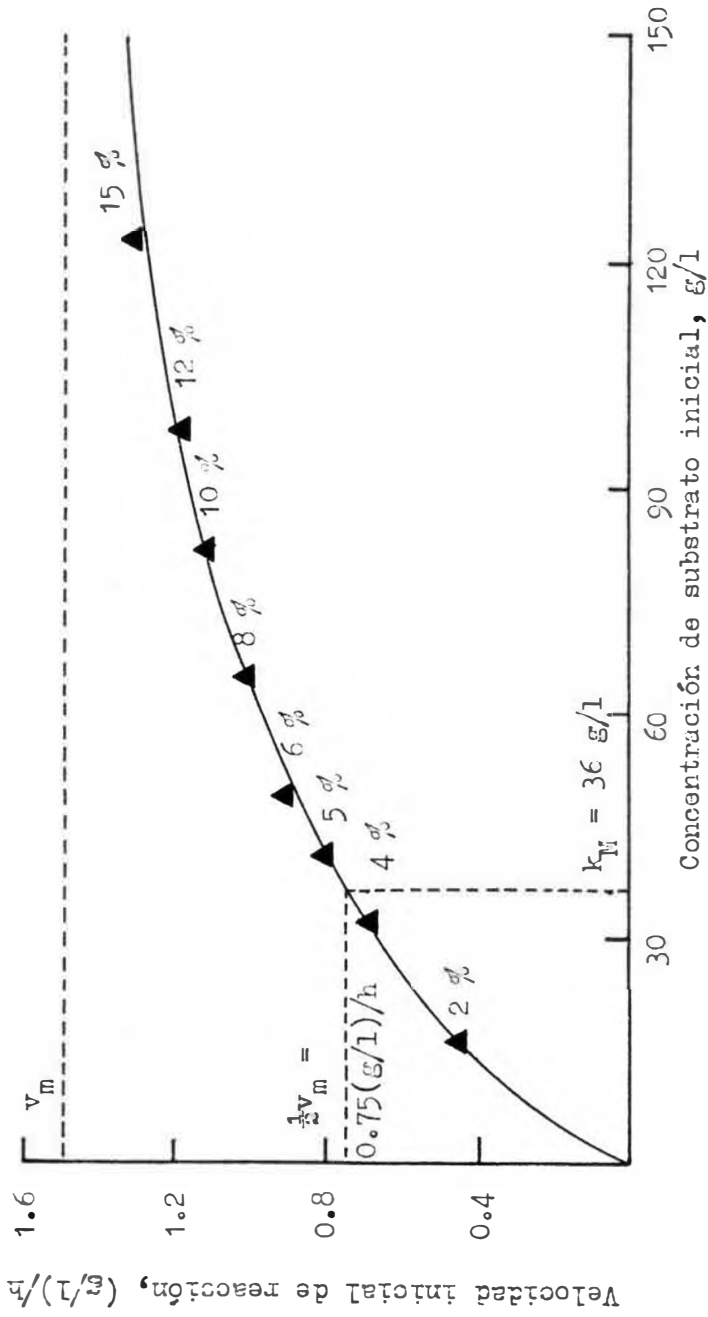


Fig. 14.—EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUBSTRATO (w/v), SOBRE LA VELOCIDAD INICIAL DE REACCION EN LA HIDROLISIS DEL ALMIDON DE LA HARINA DE YUCA POR FERMENTACION SUMERGIDA CON Aspergillus niger ATCC 1015, PARA LA OBTENCION DE GLUCOSA, A pH INICIAL 3.6, 32°C, Y SULFATO DE AMONIO COMO FUENTE DE NITROGENO

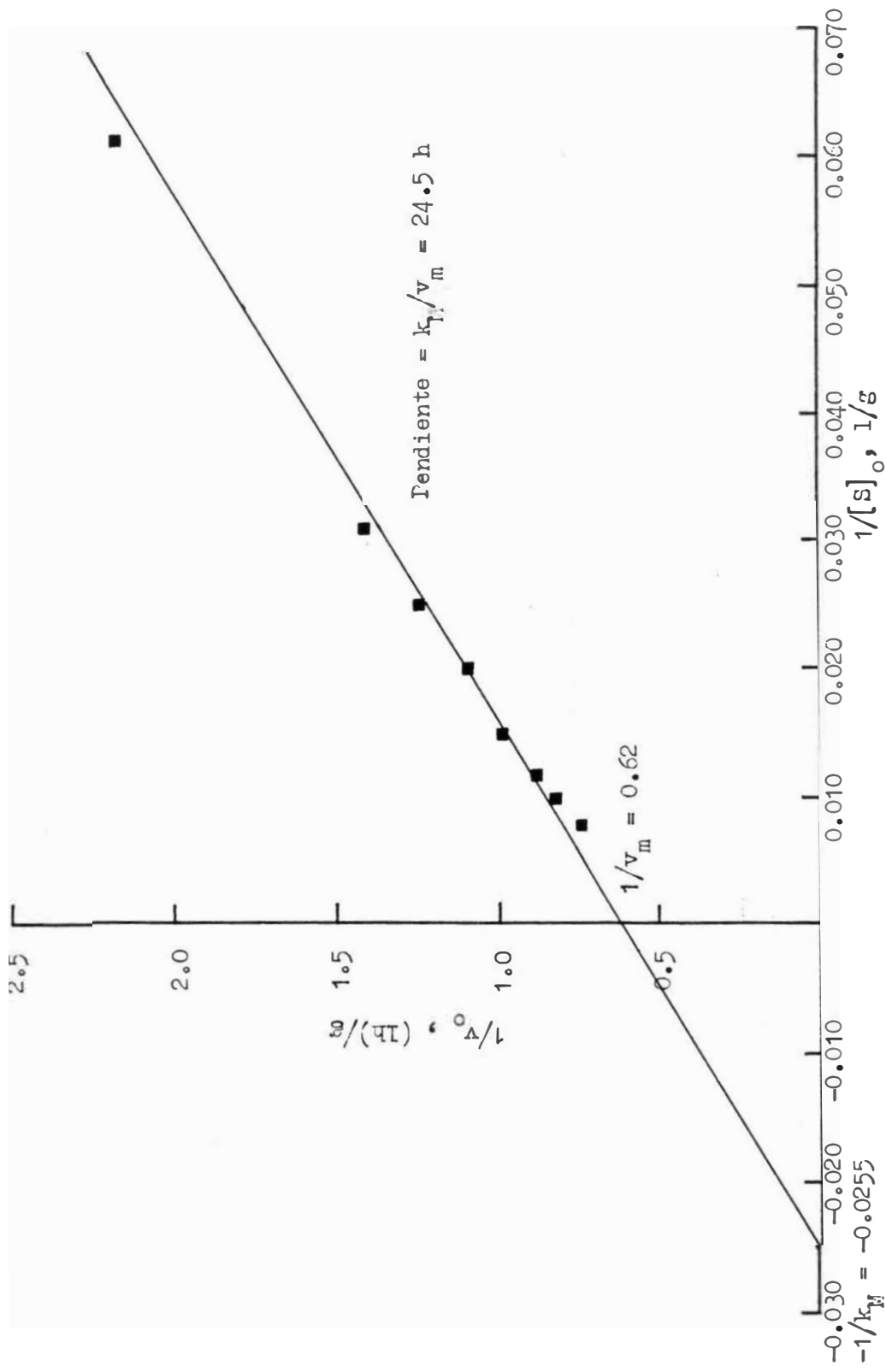


Fig. 15.-TRANSFORMACION DE LA ECUACION DE MICHAELIS-MENTEN, MEDIANTE LA ECUACION DE LINeweaver-BURK, PARA EL EFECTO DE CONCENTRACION DE SUBSTRATO SOBRE LA VELOCIDAD INICIAL DE REACCION EN LA HIDROLISIS DEL ALMIDON DE HARINA DE YUCA CON Aspergillus niger ATCC 1015

La constante de Michaelis-Menten, no es un valor fijo, sino que puede variar con la estructura del sustrato, con el pH y la temperatura; por consiguiente el valor de  $k_M$  hallado es solamente para las condiciones del presente trabajo.

Finalmente, la ecuación cinética de Michaelis-Menten para el presente estudio es la siguiente:

$$-d[S]_0/dt = d[F]/dt = v_0 = 1.6[S]_0/(39.2 + [S]_0)$$

No existe trabajos relacionados sobre el tema para poder comparar la  $k_M$  hallada, pero se puede afirmar que la curva de la figura 14 guarda relación a los reportados por la bibliografía, para la ecuación cinética de Michaelis-Menten.

#### 4.4 ESTUDIO DE LA OBTENCIÓN DE GLUCOSA EN UN FERMENTADOR DE CINCO LITROS

**PREPARACION DEL INOCULO.-** El inóculo fue preparado a partir de una cepa pura, por inoculación directa de esporas del microorganismo Aspergillus niger, en un frasco erlenmeyer conteniendo 50 ml de medio de cultivo al 2 % (w/v) de concentración de sustrato a pH 3.5 e incubado a 32°C por 50 horas, el todo fue resembrado en otro erlenmeyer conteniendo 150 ml de medio, con las mismas condiciones anteriores e incubado a 32°C por 46 horas. Posteriormente los 200 ml de inóculo fueron transferidos al fermentador de 5 litros.

**HIDROLISIS O SACARIFICACION.-** La obtención de glucosa en un fermentador de cinco litros se realizó con las condiciones óptimas determinadas en los experimentos en frascos de 250 ml.

Un volumen de 3000 ml de medio de cultivo al 12 % (w/v) de con

centración de sustrato, con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, ajustado a pH 3.55, fue inoculado con 200 ml de inóculo de Aspergillus niger, luego incubado a 32°C.

En este experimento el crecimiento de la masa celular flota sobre el caldo, consecuentemente fue dificultoso obtener muestras homogéneas. Desde el inicio del proceso el medio fue agitado con el fin de proveer al microorganismo de oxígeno. Después de dos días se observó un aumento de masa celular y licuefacción del medio.

Los resultados de la determinación de glucosa y medición del pH, como control del proceso, se presenta en el cuadro 19 y figura 16, observándose que el pH inicial se incrementa desde 3.55 a 3.71, pH que se mantiene casi constante desde el cuarto día. Por otro lado la concentración de glucosa aumenta hasta 82.1 mg/ml, valor máximo de formación de producto en 108 horas. Después de este tiempo no hay incremento de glucosa, dándose por finalizado el proceso.

Cuadro 19.- RESULTADOS DEL CONTROL DEL PROCESO EN EL ESTUDIO DE LA OBTENCION DE GLUCOSA EN UN FERMENTADOR DE CINCO LITROS

Tiempo, h	0	48	72	108
pH	3.55	3.60	3.66	3.71
Temp., °C	32	32	32	32
Concentración Glucosa, mg/ml	0.0	6.2	35.7	82.1

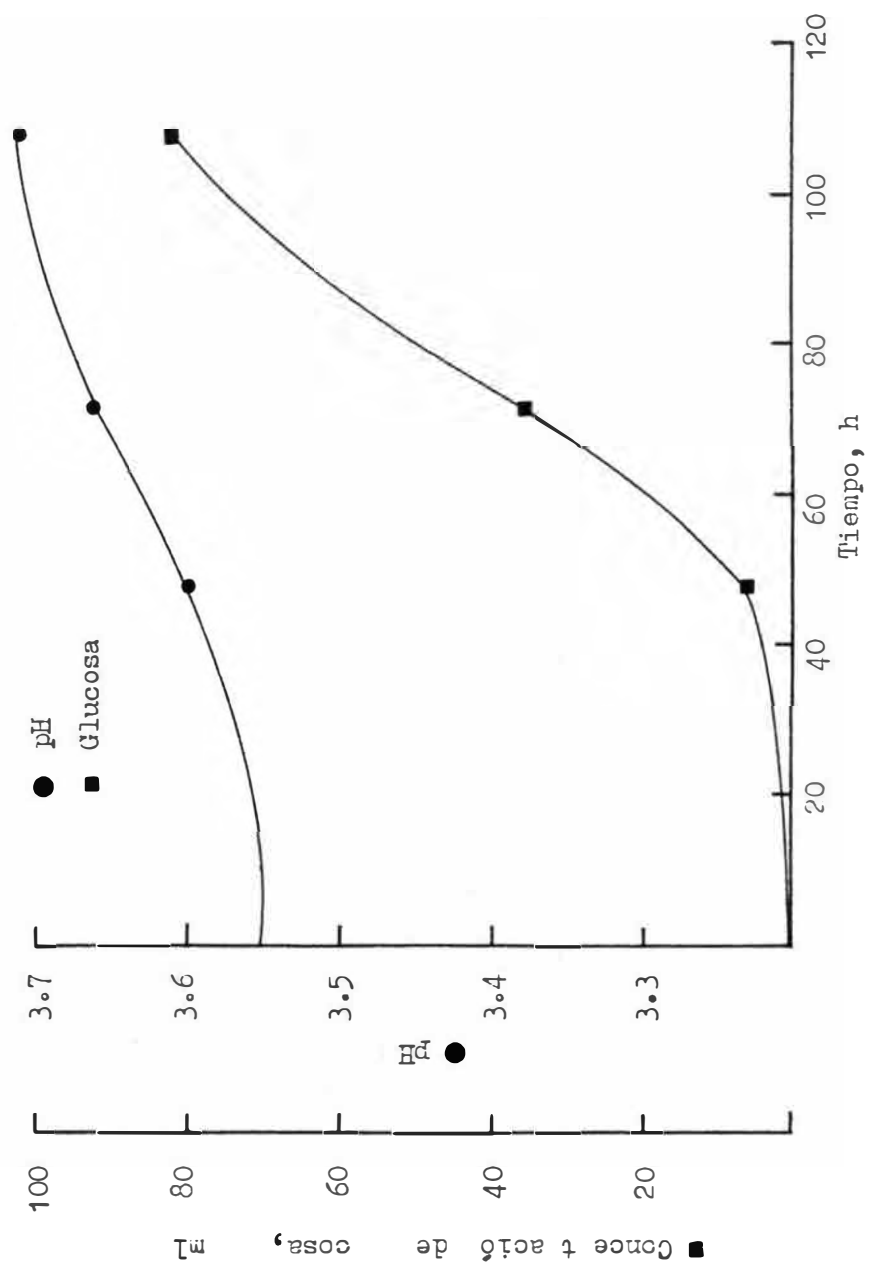


Fig. 16.-AVANCE DEL PROCESO DE HIDROLISIS DEL ALMIDON DE HARINA DE YUCA POR FERMENTACION SUMERGIDA CON *Aspergillus niger* ATCC 1015, PARA LA OBTENCION DE GLUCOSA, EN UN FERMENTADOR DE CINCO LITROS

El contenido resultante de la sacarificación fue filtrado al vacío, con la finalidad de separar la masa celular y otros sólidos de la solución. La solución total recuperada fue de 2950 ml con los siguientes resultados: 242.2 g de glucosa, este valor representa 8.2 g % de glucosa en solución, con un rendimiento de hidrólisis de 74.1 %

No existe información sobre trabajos específicos relacionado con la presente investigación o sea sobre la hidrólisis por fermentación sumergida con Aspergillus niger, pero si se tiene los trabajos de investigación de ARAUJO (1), BOS (6), ROMERO (40), UEDA (44) y VERA (47), que obtienen alcohol a partir de yuca utilizando farelo enzimático obtenido de Bacillus subtilis, Aspergillus awamori, Aspergillus niger y Aspergillus carbonarius, para el proceso de sacarificación o hidrólisis, encontrando buenos resultados.

La sacarificación del almidón por vía enzimática puede realizarse utilizando, malta, enzimas puras, farelo enzimático. La sacarificación con malta no parece aconsejable en nuestras condiciones porque los granos utilizados no se encuentran en grandes cantidades en nuestro país, además la obtención de malta es un proceso trabajoso y de elevado costo en función de su utilidad, aunque es un método tradicional de hidrólisis usado en Europa y Estados Unidos de Norte América; las enzimas puras tampoco pueden ser empleadas, ya que no existe en el Perú centros especializados que lo produzcan en grandes cantidades y su adquisición del extranjero eleva el costo; el farelo enzimático microbiano se obtiene luego de una fermentación sumergida con Bacillus subtilis y/o Aspergillus, esta solución de enzimas es posteriormente utilizada primero, para licuefactar el almidón con el farelo de Bacillus subtilis a una temperatura de 85°C por 30 minutos, luego se procede a la sacarificación con el farelo enzimático fúngico a 60°C por 72 horas. Utilizando

el método de sacarificación por fermentación sumergida con Aspergillus niger (método empleado en la investigación), todo el proceso de obtención de glucosa se realiza en una sola etapa comparado con el método de farelo enzimático.

El Instituto Nacional de Tecnología del Brasil (INT), reportado por ARAUJO (1), realizó estudios de los métodos de hidrólisis enzimática, cuando fueron determinadas las proporciones y condiciones óptimas para los procesos de sacarificación y fermentación; estos estudios revelan un índice medio de sacarificación del orden del 97.0 % para enzimas puras, y 95.0 % de sacarificación con malta y farelo enzimático. En el presente estudio utilizando el método de hidrólisis por fermentación sumergida, se encontró un índice de sacarificación del orden del 74.1 %, este valor inferior al reportado para el método por vía enzimática por el INT, puede atribuirse al hecho de que son métodos diferentes, además a la deficiente aereación proporcionada al medio para el desarrollo del microorganismo Aspergillus niger, que por ser estrictamente aerobio y el medio bastante espeso era necesario insuflar aire esterilizado directamente. Esta deficiencia no se observó a bajas concentraciones de sustrato en los experimentos en frascos de 250 ml.

Sobre el proceso de hidrólisis ácida existe los trabajos realizados por INDUSTRY PROFILES (21), LIMACO (30), SAISON (41), quienes obtienen glucosa a partir de yuca, con bajos rendimientos con relación a los obtenidos mediante la vía enzimática. Además el método de hidrólisis ácida es un proceso obsoleto y no recomendable por las siguientes razones: el ácido ataca cierta porción de los azúcares formados, transformándolos en azúcares infermentescibles, requiere un elevado costo de energía, presenta un alto índice de desgaste de materiales por tratarse con sustancias ácidas y es un método altamente polutivo puesto que produce residuos inaprovechables ARAUJO

(1), BCS (6) y VERA (47).

#### 4.5 ESTUDIO DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA EN UN FERMENTADOR DE CINCO LITROS

**PREPARACION DEL INOCULO.**- Se preparó siguiendo los mismos pasos para la obtención del inóculo en el proceso de hidrólisis, pero utilizando la cepa de Saccharomyces cerevisiae ATCC 4126, caldo maltosado como medio de cultivo, ajustado a pH 4.8, primero por inoculación directa de dos asadas del microorganismo a un volumen de 50 ml, incubado a 26°C por 24 horas, luego trasvasado a 100 ml de medio e incubado a 28°C por 10 horas.

**FERMENTACION ALCOHOLICA.**- En esta fase el mosto de harina de yuca anteriormente hidrolizado, sufre la acción bioquímica de las levaduras, resultando la conversión de la glucosa en alcohol etílico y CO<sub>2</sub>, además de pequeñas cantidades de compuestos secundarios.

A la solución de glucosa obtenida en un volumen de 2950 ml, se añadió 0.05 % (w/v) de fosfato de amonio, ajustando a pH 4.65, este medio fue llevado a ebullición y enfriado a temperatura ambiente, luego inoculado con 150 ml (5 % del volumen total) de inóculo de Saccharomyces cerevisiae, e incubado. El análisis del mosto fermentescible antes de la incubación dio una concentración de glucosa de 7.83 % (w/v).

Las 10 primeras horas del proceso fermentativo se llevó a cabo en condiciones aerobias a 28°C y constante agitación, mediante un agitador magnético, luego la temperatura fue mantenida en 30°C en condiciones anaerobias, agitando el mosto cada 5 horas por un tiempo de 10 minutos, estas agitaciones tenían la finalidad de ayudar la buena



distribución de la levadura en todo el medio.

Después de 80 horas se dio por finalizado el proceso de fermentación alcohólica, al permanecer constantes las determinaciones de concentración de glucosa y porcentaje de alcohol en volumen.

En el cuadro 20 y figura 17, se observa el desenvolvimiento de la marcha de la fermentación alcohólica. Desde el inicio de la fermentación, el pH disminuye sistemáticamente de 4.65 a 4.35, en una forma característica al mecanismo bioquímico de las oxidaciones y reducciones del desdoblamiento desmolítico; lo mismo ocurre con relación a la concentración de glucosa que va disminuyendo en función de su transformación en alcohol etílico y CO<sub>2</sub>, hasta 1.48 g %. Paralelamente al desarrollo de la fermentación, se observa un incremento de alcohol, alcanzándose la mejor formación entre las 20 y 48 horas; a las 72 horas se tiene la máxima concentración 4.09 % en volumen de alcohol en el mosto.

Cuadro 20.- RESULTADOS DEL CONTROL DEL PROCESO EN EL ESTUDIO DE LA FERMENTACION ALCOEOLICA EN UN FERMENTADOR DE 5 LITROS

Tiempo, h	0	24	48	72	80
pH	4.65	4.47	4.42	4.36	4.35
Temp., °C	28	30	30	30	30
Glucosa, mg/ml	78.3	28.3	19.9	14.9	14.8
Glucosa, g%(w/v)	7.83	2.83	1.99	1.49	1.48
Peso CO <sub>2</sub> , g	0	76.2	88.1	96.4	96.4
Alcohol, %V, 20°C	0	3.16	3.75	4.08	4.09

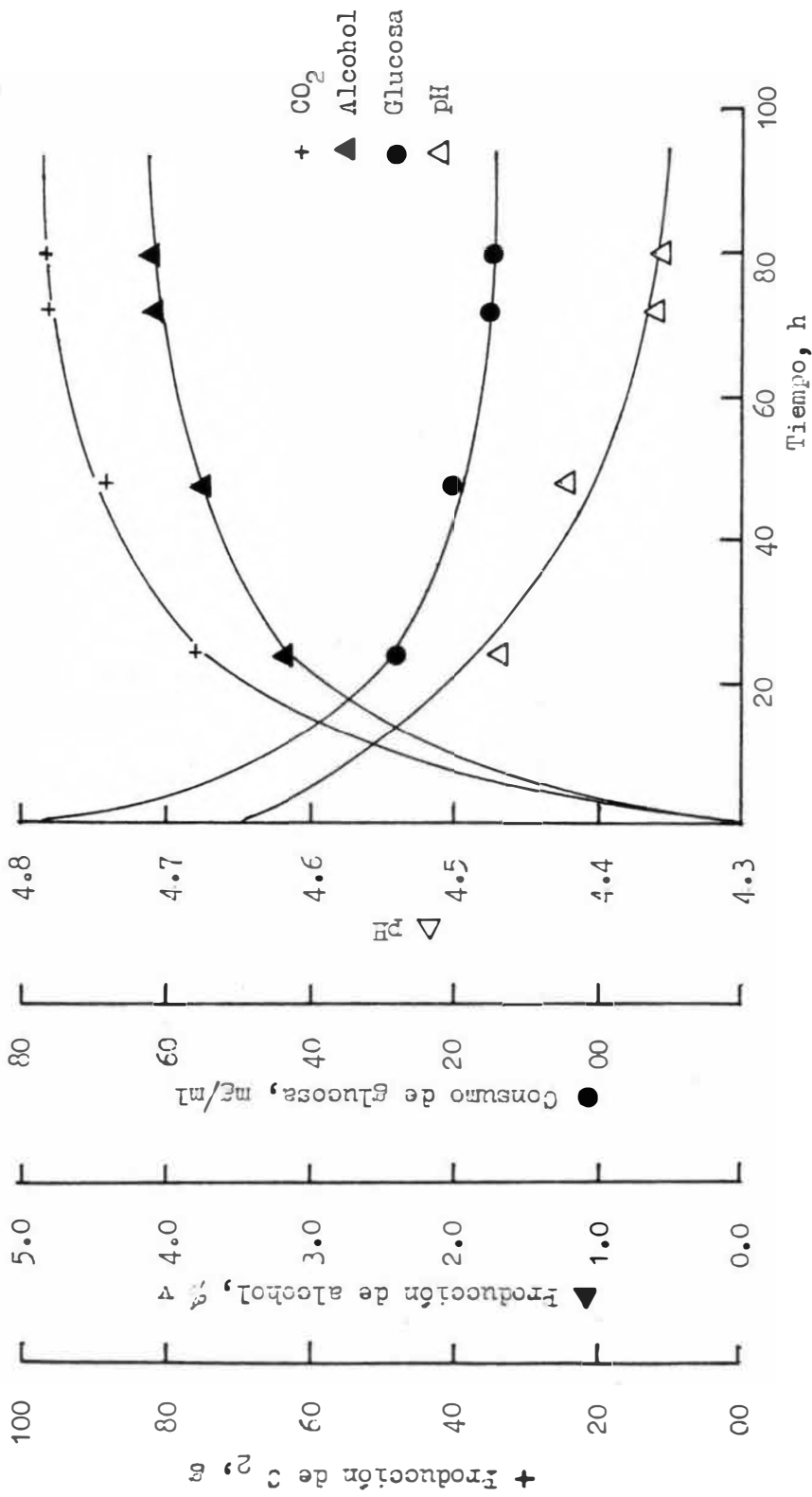


Fig. 17.-AVANCE DEL PROCESO DE FERMENTACION ALCOHOLICA CON *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126, EN UN FERMENTADOR DE CINCO LITROS

El sistema matraz-frasco lavador, tenía la función de proteger al mosto fermentescible de la atmósfera y dejar pasar solamente anhídrido carbónico, el ácido sulfúrico contenido en el frasco lavador absorbe totalmente el vapor de agua formado en el proceso de fermentación alcohólica. La pérdida de peso del medio representa la formación de  $\text{CO}_2$ ; obteniéndose 96.4 g de  $\text{CO}_2$  al finalizar el proceso.

La fermentación alcohólica es típicamente un crecimiento asociado, donde la formación de producto está relacionado al consumo del substrato y al crecimiento del microorganismo VERA (47).

Teniendo en cuenta la afirmación anterior, podemos relacionar el proceso de fermentación alcohólica, con la formación de alcohol etílico, siguiendo el curso de éste en la figura 17. La primera fase de la fermentación, caracterizado por la multiplicación de las levaduras, hasta adquirir una concentración celular suficiente para una eficiente fermentación, tuvo una duración 10 horas aproximadamente, esta fase se llevó a cabo en condiciones aerobias por ser beneficioso el aire para la multiplicación celular. La segunda fase de la fermentación, caracterizado por la mayor producción de alcohol con intenso desprendimiento de  $\text{CO}_2$  y calor, tuvo una duración de 38 horas después de las 10 horas de haber iniciado el proceso, esta fase se llevó a cabo en condiciones completamente anaerobias. La fase complementaria, caracterizado por la disminución de la producción de alcohol y  $\text{CO}_2$ , es considerada a partir de las 48 horas hasta el término del proceso, también llevado a cabo en condiciones anaerobias.

El fosfato de amonio fue agregado al mosto fermentescible, como fuente de nitrógeno y estimulante de la levadura en un porcentaje de 0.05 % (w/v), cantidad tomada de acuerdo a las siguientes

referencias bibliográficas; la destilería de Paramonga reportado por el INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA (22), utiliza 0.5 % como mínimo de fosfato de amonio, para obtener alcohol de melazas; TICONA (42), emplea 0.01 % para la obtención de alcohol de plátano; VERA (47), luego de haber realizado dos ensayos para la obtención de alcohol de yuca, in forma que la adición de 0.01 % de fosfato diamónico no alteraron significativamente los resultados obtenidos sin la adición extra de este nutriente, demostrando que no era necesario el mejoramiento del medio obtenido por hidrólisis de la yuca.

La concentración de glucosa utilizada en el estudio fue de 7.83 g % (w/v), cantidad baja en relación a los reportados por ARAUJO (1), VERA (47), quienes utilizan 18 % y 10 % respectivamente, para la obtención de alcohol de yuca, los valores de 18 % y 10 % guardan relación con la concentración utilizada en la destilería de Paramonga, mencionado en la revisión bibliográfica, sección 2.4.2.2 del trabajo. Lo ideal era utilizar las concentraciones dadas por los autores mencionados. Para obtener un mejor rendimiento en la fermentación alcohólica, los 8.2 g % (w/v) de glucosa obtenida en el proceso de hidrólisis, debió de concentrarse hasta por lo menos alcanzar 10 g % de glucosa en el mosto fermentescible.

ARAUJO (1), ROMERO (40) y VERA (47), reportan un pH óptimo entre 4.5 a 5.5 para la obtención de alcohol de yuca, en el presente estudio el mosto fermentescible fue ajustado a pH 4.65, teniendo en cuenta además, la recomendación dada por CASIDA (12) de la utilización de un pH cercano a 4.8 para obtener buenos resultados. El pH menor que 5 inhibe a las bacterias del ácido láctico y no hay contaminación bacteriana.

Los procesos de fermentación alcohólica en la mayoría de las destilerías trabajan eficientemente cuando la temperatura del mosto

se mantiene entre 28 a 30°C. ARAUJO (1), ROMERO (40) y VERA (47), también informan temperaturas de 28 a 30°C obteniendo buenos rendimientos, en el estudio se utilizó el mismo rango de temperatura. La destilería de Paramonga reportado por el INSTITUTO DE MICROBIOLOGÍA (22) informa que la fermentación alcohólica puede sobrepasar fácilmente los 40°C por ser una reacción exotérmica, llegando a establecer que la temperatura de operación debe ser 36°C como máximo. Pero se debe tener en cuenta que si la temperatura sobrepasa los 30°C se corre el riesgo de activar bacterias y fermentos peligrosos, además la fermentación puede experimentar una paralización ARAUJO (1).

#### 4.6 RENDIMIENTOS

La licuefacción y sacarificación de 360 g de harina de yuca con 10.12 % de humedad por fermentación sumergida con Aspergillus niger, en las condiciones descritas, produce 242.2 g de glucosa, presentando una conversión de 74.1 %.

La concentración de alcohol en el mosto fermentado al final del proceso fue de 4.08 % de alcohol en volumen, presentando un rendimiento de 80.6 %, basado en glucosa consumida en la fermentación.

Una eficiencia global de 60.0 % fue alcanzado en el proceso descrito, lo que significa una producción de aproximadamente de 350 litros de alcohol a 20°C por tonelada métrica de harina de yuca procesada.

#### 4.7 DESTILACION-RECTIFICACION

El mosto fermentado fue inmediatamente centrifugado, determinándose el porcentaje de alcohol en volumen de 4.08 %. A fin de obte

ner alcohol etílico concentrado libre de impurezas, se llevó primero, la solución de mosto fermentado a un proceso de destilación simple, seguido por otro de rectificación. el alcohol obtenido al final del proceso de rectificación fue evaluado, presentando 0.8171 g/ml de densidad a 20°C, esto equivale a 93.82 % de alcohol en volumen a 15.56°C (60°F).

## V. CONCLUSIONES

En base a las condiciones de trabajo y a los resultados obtenidos, se han establecido las siguientes conclusiones:

1.- La yuca es una de las plantas que presenta mayor capacidad generadora de almidón, el análisis de la composición química del cuerpo central de la yuca en estudio presentó 33.18 % de carbohidratos en base húmeda. La harina con 10.12 % de humedad utilizada en los experimentos contenía 81.75 % de almidón.

2.- Es posible la hidrólisis del almidón por fermentación sumergida con Aspergillus niger, con buenos resultados. Esta nueva técnica puede reemplazar eficientemente a los métodos químicos de hidrólisis (ácida-básica), incluso a la enzimática, porque inclusive se puede realizar en medios no estériles, lo cual economiza tiempo y consumo de energía, necesario en los otros métodos.

3.- Las condiciones óptimas determinadas en el presente trabajo para el desarrollo de la hidrólisis por fermentación sumergida fueron los siguientes: concentración de sustrato 10 a 12 % (w/v); temperatura 30 a 32°C; pH inicial 3 a 4; sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y un tiempo de fermentación entre 100 a 115 horas.

4.- La mejor conversión en el proceso de hidrólisis 94.1 %, se obtuvo al 2 % (w/v) de concentración de sustrato. La concentración óptima de sustrato 10 a 12 % (w/v), fue determinado mediante el estudio cinético de la reacción bioquímica; esta concentración representa la saturación de la enzima por el sustrato, proporciona mayor cantidad de glucosa formada, con relación al obtenido al 2 %.

5.- La cinética bioquímica del proceso de hidrólisis por fermentación sumergida fue estudiado siguiendo el modelo de Michaelis-Menten, obteniéndose como resultado la siguiente ecuación cinética:

$$-d[S]_0/dt = d[F]/dt = 1.6[S]_0/(39.2 + [S]_0)$$

6.- El mosto fermentescible obtenido por hidrólisis mediante el método descrito, fue un medio de excelente calidad para la multiplicación de las levaduras (Saccharomyces cerevisiae), en el proceso de fermentación alcohólica. La fermentación alcohólica se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 8 % (w/v) de concentración de glucosa; 0.05 % (w/v) de fosfato de amonio; temperatura 28 a 30°C; pH inicial 4.65. La fermentación alcohólica tuvo una duración de 72 horas, obteniéndose 4.08 % de alcohol en volumen en el mosto, representando un rendimiento fermentativo de 80.6 %. El sistema anaeróbico, diseñado para el reactor alcohólico (kitasato-frasco lavador) trabajó eficientemente permitiendo hallar el peso de CO<sub>2</sub> formado (96.4 g).

7.- El procesamiento global de conversión de almidón a glucosa mediante fermentación sumergida, multiplicación de fermentos y producción de alcohol de buena calidad presentó resultados satisfactorios, por tanto, cumple con la expectativa y objetivos trazados en el estudio: la utilización de la yuca como materia prima renovable en la obtención de alcohol etílico, como una alternativa en la producción de energía e insumo industrial. Por el proceso descrito se puede obtener 350 l de alcohol por TM de harina procesada.



## R E C O M E N D A C I O N E S

1.- Realizar estudios del proceso de hidrólisis mediante los métodos de fermentación sumergida y farelo enzimático, utilizando raíces frescas de yuca.

2.- Realizar estudios con los parámetros óptimos determinados en el proceso de hidrólisis por fermentación sumergida, utilizando muestras de yuca de una determinada especie y variedad.

3.- Estudiar el diseño de un reactor, tratando de adecuar un buen sistema de aereación para el proceso de hidrólisis por fermentación sumergida con Aspergillus niger (microorganismo aerobio), con las condiciones óptimas determinadas en el presente estudio.

4.- Realizar estudios para el cambio de escala; del nivel de Laboratorio a nivel de Planta Piloto para la obtención de alcohol de yuca.

5.- Estudiar la posibilidad del uso de la masa celular del Aspergillus niger, para la alimentación humana o animal (proteína unicelular).

6.- Las Plantas de producción de alcohol de yuca deben instalarse en las zonas rurales del país donde se cultive la materia prima a fin de crear nuevas fuentes de trabajo para el desarrollo agro-industrial.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- ARAUJO, F.. Obtención de Alcohol Anidro a Partir da Mandioca. Banco do Nordeste do Brasil S.A.. Brasil, 1977.
- 2.- ARENAS, S.. Potato Waste as a Substrate for Single Cell Protein and Enzyme Production. Thesis. University of Rhode Island. USA, 1981.
- 3.- BAILEY, J.; OLLIS, D.. Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw-Hill Book Company. New York, 1977.
- 4.- BENDER, M.; Brubacher, L.. Catálisis y Acción Enzimática. Editorial Reverté S.A.. Barcelona, 1977.
- 5.- BORZANI, W.; ALMEIDA, U.; AQUARONE, E.. Biotecnologia, Vol. III: Engenharia Bioquímica E. Blucher e EDUSP. Sao Paulo. Brasil, 1975.
- 6.- BOS, E.. Direct Hydrolysis of Wet Milled Cassava Roots. Viena Unido, 1979.
- 7.- BRAMBILA, A.. Cultivos Alimenticios I: Cultivo de la Yuca. Publicación de la U.N.A. La Molina. Lima, 1982.
- 8.- BRAVERMAN, J.. Introducción a la Bioquímica de los Alimentos. Segunda Edición. Ediciones Omega S.A.. Barcelona 1978.

- 9.- BRICENO, J.. Manual de Laboratorio de Bioquímica I. Universidad Nacional Agraria. Lima, 1977.
- 10.- BROCK, T.. Biología de los Microorganismos. Ediciones Omega S.A.. Barcelona, 1973.
- 11.- CARPENTER, P.. Microbiología. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.U.. México, 1969.
- 12.- CASIDA, Jr.. Industrial Microbiology. John Wiley and Sons INC New York, 1968.
- 13.- COULSON, J.; RICHARDSON, J.. Chemical Engineering, Volume III Pergamon Press Ltd.. Great Britain, 1971.
- 14.- FENNELA, O.. Principles of Food Science, Part I—Food Chemistry. Marcel Dekker, INC.. New York, 1980.
- 15.- FERSHT, A.. Estructura y Mecanismo de los Enzimas. Editorial Reverté S.A.. Barcelona, 1980.
- 16.- GEBHARDT, L.. Microbiología. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V.. México, 1972.
- 17.- GEISSMAN, T.. Principios de Química Orgánica. Editorial Reverté. Barcelona, 1973.
- 18.- GUNTHER, M.. Microbiología de los Alimentos Vegetales. Editorial Acribia. Zaragoza, 1981.
- 19.- HAHN, H.. Bioquímica de las Fermentaciones. Ediciones Aguilar S.A.. Madrid, 1956.
- 20.- HODGE, J.; MONTGOMERY, E.. Hydrolysis of the Amilopectins from various Starches with Beta-amylase. 1948.

- 21.- INDUSTRY PROFILES. Glucosa from Cassava Starch. I.P.N°67313 .  
S.I.C. 2041 . 1967 .
- 22.- INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA. Fermentaciones Industriales. Uni-  
versidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 1979.
- 23.- JAWETZ, E. y Col.. Microbiología Médica. Editorial El Manual  
Moderno S.A.. México, 1979.
- 24.- JORGENSEN, A.. Microbiología de las Fermentaciones Industria-  
les. Editorial Acribia. Zaragoza, 1959.
- 25.- KAMEL, B.. Utilization of Date Carbohydrates as Substrate in  
Microbial Fermentation, in Process Biochemistry. Ju-  
ne, 1979.
- 26.- KIRK and OTHERS. Enciclopedia de Tecnología Química. Editorial  
UTEHA. México, 1962.
- 27.- KREZSCHEMAR, H.. Levaduras y Alcoholes. Editorial Reverté S.  
A.. Zaragoza, 1961.
- 28.- LAPIDUS, L.; ALMUNDSON, N.. Chemical Reactor Theory a Review  
Precentice Hall Inc.. New Jersey, 1977.
- 29.- LUBINGER, A.. Bioquímica. Ediciones Omega S.A.. Barcelona,  
1981.
- 30.- LIDACO, C.. Estudio Experimental del Acondicionamiento de la  
Harina de Yuca para Substratos Fermentativos. Tesis.  
Universidad Nacional Mayor San Marcos. Lima, 1976.
- 31.- McCANN, D.. Cassava Utilization in Agro-Industrial Systems .  
Proceedings of the Symposium of the International So-  
ciety for Tropical Root Crops a Held at Ciaticall.  
Colombia, 1976.

- 32.- MERCK, DDEX. Encyclopadia of Chemical and Drugs. Published by Merck & CO. Inc.. Rahway, N.J., 1968.
- 33.- MCNTALDO, A.. La Yuca o Mandioca. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José de Costa Rica, 1979.
- 34.- MORRISON y BOYD. Química Orgánica. Fondo Educativo Interamericano S.A.. Bogotá, 1976.
- 35.- PEREZ Aronés. Estudio del Diseño de una Planta de Obtención de Almidón, Glucosa y Dextrina de la Yuca en la Zona de Ayacucho. Tesis. Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga. Ayacucho, 1972.
- 36.- PEREZ Alcazar. Estudio de Integración Agro-Industrial: Factibilidad de una Planta de almidón de Yuca. Tesis. Universidad Nacional Agraria. Lima, 1971.
- 37.- PERRY, J.. Manual del Ingeniero Químico. Tercera Edición. Editorial UTEHA. México, 1974.
- 38.- PRESCOTT, S.; DUNG, C.. Industrial Microbiology. McGraw-Hill Book Company. New York, 1957.
- 39.- RHODES, A.; FLETCHER, D.. Principios de Microbiología Industrial. Editorial Acribia. Zaragoza, 1974.
- 40.- ROMERO, M.. Producción de Alcohol a partir de Mandioca. Departamento de Alimentos I.N.T.N.. Paraguay, 1978.
- 41.- SAMSON, G.. Liquid Glucose from Cassava Starch. Institute of Hygiene. Philippina, 1951.
- 42.- TICONA, O.. Obtención de Etanol y Vinagre de Plátano. Tesis. Universidad Nacional Agraria. Lima, 1981.

- 43.- TOFCZEK, M.. Bioquímica. Nueva Editorial Interamericana S.A. México, 1977.
- 44.- UEDA, S. y Col.. Production of Ethanol from Raw Cassava Starch by a Nonconventional Fermentation Method. Universidad Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas S.P.. Brasil, 1980.
- 45.- ULLMAN, F.. Enciclopedia de Química Industrial. Editorial Gustavo Gili S.A.. Barcelona, 1958.
- 46.- VALLEJO, F.. Alcoholes, su Fabricación y Usos. Editorial Hispano Americana S.A.. Buenos Aires, 1945.
- 47.- VERA, S.. Alcool de Mandioca por Fermentacao continua. Instituto Nacional de Tecnología. Río de Janeiro, 1973.
- 48.- ZUMABTA, V.. Estudio de Pre-factibilidad Técnico-económico para la Instalación de una Fábrica de Glucosa a partir de la Yuca. Tesis. Universidad Nacional Agraria Lima, 1978.