

1989-A

REG. No. 080117744

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



APROVECHAMIENTO DE LAS VINAZAS TEQUILERAS EN LA
FERMENTACION ALCOHOLICA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A

MARICELA JUAREZ SANCHEZ

GUADALAJARA, JAL.

1991



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Sección
Expediente
Número .0955/90.....

SRITA. MARCELA JUAREZ SANCHEZ
P R E S E N T E . -

Por este conducto nos permitimos comunicar a usted que se autoriza para que el M. en C. Fernando Peraza Luna, funja como su nuevo Director de la tesis titulada "APROVECHAMIENTO DE LA VINAZASTEQUILERAS EN LA FERMENTACION -- ALCOHOLICA" en sustitución de la Q.F.B. Rosa Ma. Dominguez Arias.

Sin otro particular nos es grato reiterar a usted la expresión de nuestra consideración más distinguida.



FACULTAD DE CIENCIAS

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara Jal., 21 de Junio de 1990

EL DIRECTOR

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS

EL SECRETARIO

M.V.Z. MIGUEL CARBAJAL SORIA

c.c.p. M. en C. Fernando Peraza Luna, Director de Tesis.- Pte.
c.c.p. El expediente del alumno

cglr.



CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA EN TECNOLOGIA
Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

Octubre 25 de 1990.

M. en C. CARLOS BEAS ZARATE.
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.
PRESENTE.

Estimado M. en C. Carlos Beas Zárate:

Por este medio le comunico a Usted que la pasante de la Licenciatura en Biología MARICELA JUAREZ SANCHEZ, ha concluido satisfactoriamente el proyecto de la tesis titulada: "APROVECHAMIENTO DE LAS VINAZAS TEQUILERAS EN LA FERMENTACION ALCOHOLICA", realizado en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

Así mismo le informo que he revisado el manuscrito de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad y lo presentamos a su consideración.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

M. en C. FERNANDO A. PERAZA LUNA.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por permitirme cumplir una de las principales metas en mi vida.

A MIS PADRES

Por darme la vida, su apoyo y comprensión en todo momento.

A MIS HERMANOS

Por su apoyo constante.

A MI ESPOSO

Por su paciencia y cariño.

MI MAS SINCERU AGRADECIMIENTO.

Al Centro de Investigaci3n y Asistencia en Tecnologia y Dise1o del Estado de Jalisco, A.C., por permitir todas las facilidades para realizar este trabajo.

Al M.en C. Fernando A. Peraza Luna por su ense1anza, dedicaci3n y apoyo recibidos, y por todas las atenciones prestadas como gua y director en la realizaci3n de este trabajo.

A todos mis compa1eros y amigos por el apoyo y consejos que me dieron para la realizaci3n de esta tesis

Sinceramente a todos muchas gracias.....

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL
CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA
EN TECNOLOGIA Y DISEÑO, DEL ESTADO DE
JALISCO A.C.
EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
Y FERMENTACIONES, DE LA DIVISION DE
BIOTECNOLOGIA.
CON LA DIRECCION DE EL M. en C. FERNANDO
A. PERAZA LUNA.**

**APROVECHAMIENTO DE LAS VINAZAS
TEQUILERAS EN LA FERMENTACION
ALCOHOLICA**

MARICELA JUAREZ SANCHEZ

RESUMEN

Las vinazas constituyen un residuo contaminante, producido durante el proceso de destilación alcohólica de un mosto fermentado; recientemente se ha venido aumentando el interés acerca de su disposición adecuada. Por otro lado las melazas son empleadas como materia prima en los procesos comerciales de producción de alcohol donde representan un costo significativo en el costo total de producción.

El principal objetivo de esta tesis, entonces, fué verificar si se obtenían rendimientos de producción semejantes entre un proceso empleando una mezcla vinazas - melazas como sustrato y los procesos normales empleados en las destilerías. Dicho proceso propone como una alternativa para ayudar reducir los problemas de contaminación, representado por las vinazas, y también que debe permitir reducir el impacto del costo de las materias primas sobre los costos de producción.

El estudio fue realizado a nivel matraz y de 10 litros empleando una cepa de levadura de Saccharomyces cerevisiae (BCGC - L002).

Se compararon seis medios; dos de melazas (M1A y M1B), dos con vinazas de ingenio (M2A y M2B) y dos con vinazas tequileras (M3A y M3B). Dicha comparación fué en cuanto a rendimiento y eficiencia del proceso, observándose tanto a nivel matraz como a nivel de 10 litros un mayor rendimiento y una mejor eficiencia en los medios con vinazas tequileras.

En este caso, a nivel de 10 litros el rendimiento obtenido fue de 0.45 y 0.47 lo cual dió eficiencia de 89 % y 92 % respectivamente.

INDICE

	Pag.
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
III. JUSTIFICACION	22
IV. HIPOTESIS	24
V. OBJETIVOS	25
VI. MATERIALES Y METODOS	27
VII. RESULTADOS	36
VIII. DISCUSION	44
IX. CONCLUSIONES	51
X. TABLAS	52
XI. FIGURAS	61
XII. BIBLIOGRAFIA	83

INTRODUCCION

I.- INTRODUCCION

En nuestro País, como en muchos otros, la demanda de energéticos aumenta día con día; esto ha llevado a una constante búsqueda de fuentes alternativas de energía. En los últimos 10 años se han evaluado una gran cantidad de alternativas para la solución de este problema, entre las cuales podemos mencionar las de mayor interés: el carbón, energía nuclear, biomasa, energía solar, del mar y eólica. Sin embargo, parece ser que una de las posibilidades más económicas de producir combustibles no fósiles es la producción de etanol por fermentación, en países como Brasil, E.U.A., India, Nueva Zelanda, entre otros; la producción de este hidrocarburo con fines energéticos esta bien establecida a nivel industrial (Moreira & Goldemberg, 1981).

En México, la producción de alcohol por fermentación tradicionalmente ha estado encaminada hacia la producción de bebidas alcohólicas. En este campo la Biotecnología ha permitido desarrollar procesos novedosos, teniendo como finalidad mejorar los rendimientos, eficiencia y rentabilidad sobre los tradicionales. Sin embargo, en estos procesos como en la mayoría, se obtienen subproductos (residuos) que en la mayor parte de los casos ocasionan graves problemas de contaminación ambiental.

En las destilerías de alcohol, las vinazas son los residuos con más alta carga contaminante; son producidas en cantidades que fluctúan entre 135 y 1800 metros cúbicos por día por planta. Por lo común, debido a su elevada demanda bioquímica de oxígeno (DBO ,alrededor de 35,000 mg/l), llegan a afectar severamente los

ecosistemas acuáticos, cuando se arrojan sin ningún tratamiento. En los años recientes se han venido realizando estudios sobre el tratamiento y utilización de estas vinazas (manifestándose un renovado interés con el fin de eliminar o atenuar los efectos de polución ocasionados por estos residuos). Entre los métodos empleados podemos mencionar como ejemplos: irrigación en campos arroceros (Chandler, et al. 1984), evaporación-combustión (Maiorella, et al. 1983) y enriquecimiento proteínico (Peraza, 1990).

ANTECEDENTES

II.- ANTECEDENTES

1.- Problemática de la demanda de energía.

A partir de 1973, los energéticos se constituyeron sin duda en productos de gran interés a nivel mundial, no sólo porque representan un gasto en cualquier presupuesto nacional, sino porque han establecido una mayor diferencia entre quienes los poseen y quienes no (Moreira & Goldemberg, 1981). Actualmente, el problema energético a nivel mundial esta aumentando. Nuevas fuentes están siendo empleadas con el objeto de diversificar el abasto de energía, cuya demanda se ha vuelto un problema de primer orden.

Nuestra sociedad se alimenta, funciona y produce a base de petróleo.

El petróleo es un recurso no renovable, cuyo agotamiento en términos globales ya está a la vista; la producción de éste será cada vez más insuficiente para hacer frente a la creciente demanda (CONACyT, 1980).

El agotamiento inevitable del petróleo ha llevado a revisar nuevas fuentes de energía: el carbón, energía nuclear, energía solar, del mar, eólica y de etanol (Deleito & Cabrero, 1984).

A.- Carbón.

El carbón tiene la gran ventaja, de que sus yacimientos suelen encontrarse próximos a las zonas industrializadas y que el volumen de sus reservas se estima en tres veces las del petróleo

y las del gas natural juntas (Moreira & Goldemberg, 1981). Aunque las dificultades de explotación y transporte y su alto poder contaminante (emisiones de SO₂ y NO) imponen por el momento serias limitaciones al desarrollo del carbón, sin embargo, se considera que estos inconvenientes pueden solucionarse en tres o cinco años con la introducción de nuevas tecnologías de explotación y aprovechamiento (Deleito & Cabrero, 1984).

B.- Energía Nuclear.

De todas las energías alternativas al petróleo, la de origen nuclear es la que ha tomado mayor interés y mayor volumen de inversiones de los programas de desarrollo energético en países como E.U.A., desde hace algunos años (Deleito & Cabrero, 1984). La energía nuclear se basa en calor generado por la fisión de determinados isótopos radiactivos sometidos a bombardeos neutrónicos (Deleito & Cabrero, 1984).

C.- Energía solar.

La energía solar aprovecha la radiación del sol que llega a la tierra; esta radiación se transforma en energía térmica con rendimientos del 50%, utilizando colectores planos o concentradores, o bien en electricidad mediante sistemas fotovoltaicos con rendimientos del 15%.

La energía solar se utiliza también en sistemas de calentamiento de agua a bajas temperaturas para usos domésticos e industriales. Pero para instalaciones de este tipo se requieren altas

inversiones, así como para la producción de electricidad a partir de esta fuente (Deleito & Cabrero, 1984).

D.- Energía del Mar.

La energía contenida en el mar se puede aprovechar en diferentes formas:

a) como energía térmica, utilizando la diferencia de temperaturas entre las aguas de superficie y las aguas profundas, diferencia que en aguas subtropicales puede alcanzar entre 20 - 30 °C.

b) como energía mecánica, aprovechando el movimiento de las mareas mediante sistemas de boyas flotantes, o las corrientes marinas mediante turbinas ancladas en el fondo del mar (Deleito & Cabrero, 1984).

E.- Energía Eólica.

La energía eólica aprovecha la parte de la radiación solar que es absorbida por la atmósfera y la transforma en energía cinética. La mayor dificultad de las aplicaciones de tipo solar y eólico es la irregularidad de su producción energética, que obliga a disponer de costosos almacenadores (Deleito & Cabreo, 1984).

F.- Etanol.

Una de las posibilidades más económicas para la producción de combustibles no fósiles parece ser la producción de etanol por

fermentación (Ramírez, 1985).

La producción de este hidrocarburo, con propósitos energéticos esta bien establecida a nivel industrial en varios países (Brasil, Estados Unidos, India, Nueva Zelanda, Unión Soviética, entre otros). Se emplea como combustible en sustitución de la gasolina o mezclado con ella, para mover vehículos reduciendo de este modo el consumo de gasolina (Moreira & Goldemberg, 1981).

Entre otros de los usos más importantes del etanol se encuentran: bebidas obtenidas a partir de jugos de agaves, caña de azúcar, uva, etc., se utiliza en la industria como disolvente y en la medicina como antiséptico.

2.- Producción de alcohol.

Con el adelanto de la química orgánica en la segunda mitad del siglo XIX, el alcohol se constituyó en un producto químico indispensable como combustible, solvente y materia prima para producción de una serie de compuestos orgánicos. Durante la Primera Guerra Mundial la demanda de alcohol se incrementó significativamente y esta necesidad ocasionó la producción de alcohol sintético a partir del etileno.

Más recientemente, con la crisis del petróleo a mediados de la década de los 70's y con el consecuente aumento de los precios del etileno, la industria de producción de alcohol por fermentación tiene hoy en día un incentivo muy fuerte para su desarrollo, y se están construyendo nuevas plantas en diferentes

países de todo el mundo.

Para el caso de Latinoamérica y, en particular, de los países productores de azúcar de GEPLACEA (Grupo de Países Latinoamericanos y del Caribe Exportadores de Azúcar), el desarrollo de la producción de alcohol, con miras a las más distintas alternativas, se presenta como una de las soluciones más factibles para la actual crisis de la industria azucarera de esos países (Sturion, 1988).

Actualmente en países como Brasil, Estados Unidos, Canadá, India y Australia, se han estado llevando a cabo programas de desarrollo con el fin de reducir al mínimo el impacto del precio del petróleo sobre su propia economía, buscando producir el mayor volumen posible de etanol por fermentación para sustituir la importación de gasolina.

3.- Tecnología de la producción de alcohol.

El conocimiento de los métodos para obtener determinados productos por la acción biológica de microorganismos sobre materiales disponibles en exceso, ha sido un arte conservado de generación en generación.

Hoy la fermentación es una ciencia por derecho propio que incluye otras ciencias como la Bacteriología, la Bioquímica, la Físicoquímica, las Matemáticas y la Ingeniería.

Los métodos utilizados en la industria de la fermentación

incluyen los siguientes puntos:

- a) Selección y pretratamiento de las materias primas.
- b) Selección del organismo apropiado.
- c) Estandarización del inóculo.
- d) Transformación microbiana de sustrato a producto de interés.
- e) Recuperación y utilización de subproductos.

(Kirk & Othmer, 1966).

La palabra "fermentación" es de origen latino y, en sentido escrito, se ha usado designar la transformación del jugo de uva en vino. La palabra latina "fervere" significa hervir y se usó para describir el aspecto efervescente del jugo de uva en fermentación. La primera explicación bioquímica del proceso por el cual el azúcar en solución acuosa es descompuesto en alcohol y en gas carbónico, en virtud de la acción de las células vivas de levaduras, la dió el químico francés Louis Pasteur, el cual observó que mientras descomponen el azúcar en ausencia de aire, las células de levadura viven y se propagan en el líquido en fermentación, y llamó al proceso de la fermentación alcohólica "vida sin oxígeno" (Kirk & Othmer, 1966).

En la actualidad se sabe que en organismos como la levadura de cerveza, que fermenta la glucosa a etanol y CO₂, la ruta de fermentación es idéntica a la descrita para la glucólisis excepto en la etapa final (Lehninger, 1984), catalizada por la lactatodeshidrogenasa, que es sustituida por otras dos etapas enzimáticas.

En la primera etapa, el piruvato se descarboxila a acetaldehído y CO₂ por medio del enzima piruvato-descarboxilasa, que no se encuentra en los tejidos animales.

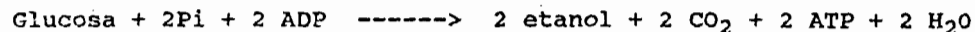


La descarboxilación del piruvato para formar acetaldehído y CO₂ es esencialmente irreversible. La piruvato-descarboxilasa precisa de Mg y posee una coenzima unida íntimamente, el pirofosfato de tiamina. La descarboxilación del piruvato se produce a través de una serie de intermediarios unidos covalentemente al pirofosfato de tiamina.

En la etapa final de la fermentación alcohólica, el acetaldehído se reduce a etanol, el NADH + H⁺ aporta el potencial de reducción y la reacción es catalizada por el enzima alcohol-deshidrogenasa:



El etanol y el CO₂ son, por tanto, los productos finales de la fermentación alcohólica, cuya ecuación global puede escribirse del modo siguiente (Lehninger, 1984):



En la elaboración de bebidas alcohólicas, la formación de productos secundarios y su naturaleza determinan los caracteres y la calidad del producto final; se forman aldehidos y ésteres,

alcoholes superiores que constituyen el aceite de fusel y algunos ácidos grasos (Cruger & Cruger, 1984).

En todos los procesos fermentativos, el éxito depende de la eficiencia del tratamiento preliminar de la materia prima en caso de haberlo, del empleo de una concentración óptima de azúcar, de un pH y temperatura óptimos; de la adición de sustancias nutritivas al mosto si es que careciera de algún constituyente esencial, de la inhibición del crecimiento bacteriano, del mantenimiento de las condiciones anaeróbicas durante la fermentación y la inmediata destilación del mosto fermentado (Blanco & German, 1987).

Desde el punto de vista tecnológico, los procesos empleados en la fabricación de etanol por fermentación dependen de la naturaleza de la materia prima, y estas pueden ser agrupadas en:

- a.- Materias primas azucaradas, que contienen una mezcla de sacarosa, glucosa y fructosa, como el jugo de caña, las mieles y las melazas.
- b.- Materias primas celulósicas, como el bagazo, las maderas, los restos de plantas, etc.
- c.- Materias primas ricas en almidón; como son los tubérculos de yuca, papa, maíz, calabacilla loca, etc (Kirk & Othmer, 1966).

Nuestro país cuenta con diferentes sustratos que pueden ser utilizados para producir alcohol, tales como la melaza y el jugo de caña, que son comúnmente usados para la fermentación por ser

disponibles y económicos (Kar & Viswanathan,1985). Asimismo en varias regiones se utiliza el jugo de agave para la producción de tequila.

3.A.- Producción de alcohol de caña.

La producción de etanol en los ingenios se realiza en forma simplificada, mediante el siguiente proceso (fig. 1): Las melazas son diluidas con agua hasta alcanzar entre 21 y 25 °Brix y se ajusta el pH entre 4.0 y 4.5 con ácido sulfúrico. Posteriormente, se realiza la inoculación con Saccharomyces cerevisiae, llevándose a cabo la fermentación. El mosto agotado es pasado posteriormente a un proceso de destilación para así finalmente obtener el alcohol.

Aunque para la producción de alcohol no se requiere de oxígeno, en los primeros momentos de la fermentación es necesaria una adecuada cantidad de este gas para la reproducción de células de levadura.

Durante la fermentación se libera CO₂ y se establecen pronto las condiciones anaerobias.

Después de la fermentación el mosto se denomina vino o mosto fermentado y se tiene una composición muy variable siendo sus principales componentes el agua y el etanol (Maiorella, et al, 1984).

3.B.- Producción de tequila (ver figura 2).

El tequila es un producto regional, cuyo origen al parecer data de la época prehispánica, cuando la tribu de los "Tiquilos" lo elaboraban para ser consumido en sus ceremonias por los sacerdotes y ancianos. Entre mediados del siglo XVII se otorgaron las primeras concesiones, por parte de la corona española, para producir tequila (Avalos,1982). Desde entonces y hasta la fecha, el proceso de producción de tequila se ha mantenido en forma tradicional, lo que ha puesto en desventaja a muchas "fábricas domésticas", entre otras causas porque sus rendimientos y productividad generalmente son bajos.

Del proceso de producción del tequila llama particularmente la atención la operación de destilación, ya que en esta se obtiene el tequila propiamente dicho y las vinazas (figura 2).

4. Problemática y tratamiento de las vinazas.

Las vinazas, en general, son los subproductos obtenidos durante la destilación alcohólica de un mosto fermentado y representa la fracción no volátil de la materia que se obtiene en la corriente del fondo de la primera columna de destilación (Sheehan & Greenfield,1980).

Dependiendo de la materia prima empleada en el proceso se derivan diferentes clases de vinazas las cuales difieren

principalmente en calidad y solamente una minoría ha sido considerada de importancia para la investigación biotecnológica (Lewicki,1978), como es el caso de las vinazas de melaza y las vinazas de jugo de agave que son producidas en volúmenes considerables (Monteiro, 1975; Avalos, 1982).

Este subproducto representa un gran porcentaje de flujo de materia (ver tabla 2) y actualmente se desperdicia vaciándolo al drenaje, con lo que se convierte en un contaminante importante, pues su contenido de sólidos, aunque bajo (2 - 3% p/v) se vuelve significativo por los volúmenes que se vierten. Lo anterior significa que para una fábrica 10,000 l de tequila al día, desperdicia 100,000 l de vinaza diariamente, que representan aproximadamente 1,800 - 2,700 Kg de sólidos al día (Guzmán,1977) (ver tabla 3).

Como ya se mencionó, las vinazas son una gran fuente de contaminación pero a la vez de nutrientes (tabla 1) por lo tanto se hace evidente la necesidad de considerarlas como un recurso con gran potencial de aprovechamiento, que hasta ahora se encuentran en general subutilizadas y causando graves problemas ecológicos.

A.- Problemática de las vinazas.

El enfoque principal que se le ha dado al problema de las vinazas es respecto a su carga orgánica (80% de sólidos totales); se ha

estimado que en una destilería tradicional de alcohol de melaza de caña (con una producción típica de 100,000 l de alcohol por día) la carga orgánica de contaminación resultante sería equivalente a la del efluente doméstico de una población de 1.7 millones de habitantes (Jackman, 1977).

Por su elevada DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno) así como por su bajo pH (3.5 a 4.0) y la temperatura a la que son descargadas (95 a 98°C) las vinazas son consideradas un desecho industrial bastante contaminante, más aún si se considera su volumen de producción el cual varía de 10 a 14 l de vinaza /l de alcohol.

La DBO de las vinazas fluctúa entre 18,000 y 35,000 mg/l y la DQO (Demanda Química de Oxígeno) entre 45,000 y 85,000 mg/l (ver fig 3).

en los últimos años, un número considerable de empresas industriales enfrenta serios problemas en relación a la descarga o disposición inadecuada de sus efluentes líquidos. Están obligadas a pagar altas multas o impuestos, por la descarga de estos efluentes en ríos o en sistemas de tratamientos municipales; o más aún, simplemente se les exige que construyan una planta para el tratamiento de sus efluentes. En cualquier situación, muchas compañías industriales están a la expectativa de una solución para sus problemas de contaminación, que reduzca sus costos de operación y que no exija altas inversiones para su implementación.

Esto mismo se aplica a las industrias de Jalisco donde la producción de alcohol se lleva a cabo en dos ingenios y,

aproximadamente, en 25 tequileras (algunas de ellas ubicadas en la zona metropolitana), que en los últimos años han tenido una producción aproximada de 54 millones de litros de tequila por año (Cámara de Tequila, 1989), y si tomamos en cuenta la relación con que se produce la vinaza, esto nos da aproximadamente 540 millones de litros de vinaza por año.

El Gobierno Federal consciente del problema que representa al país las descargas residuales de las industrias, creó la secretaría para el mejoramiento del ambiente SEDUE (Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología) a la cual se le ha encomendado la misión de vigilar las condiciones de los desechos industriales, con el fin de prevenir la contaminación en todos los aspectos fundamentales.

A fin de mantener el equilibrio ecológico y evitar la contaminación de ríos y lagos, la mencionada secretaría ha creado un reglamento para la prevención y control de contaminación de aguas. En dicho reglamento están establecidas las cantidades máximas tolerables de contaminantes que, en forma de aguas de desecho, deben ser ajustadas por las industrias en general. En caso de que las descargas de aguas residuales no cumplan con las especificaciones del reglamento, deben presentar un Informe Preliminar de Ingeniería (I.P.I.) o proyecto para el tratamiento de la descarga de aguas de desecho a fin de resolver el problema y estar dentro de las normas establecidas por la ley (Diario Oficial, 1989).

De acuerdo con lo anterior, y considerando las condiciones de

descarga de las vinazas, se puede concluir que son muy contaminantes y si a esto agregamos que este líquido residual es de marcado color café oscuro y con fuerte olor a piloncillo y tequila, es necesario tratar las vinazas y ajustarlas a las normas fijadas por la ley por medio de algún proceso de tratamiento (Figuroa,1975).

Por otro lado, considerando que cualquier tratamiento dado a estos efluentes origina serias inversiones, los industriales buscan alternativas de aprovechamiento para sus efluentes que ayuden a disminuir dichos gastos; de tal forma que en los últimos años, ha tomado considerable interés por parte de las autoridades y de investigadores, el realizar desarrollos que permitan contribuir a la solución de los problemas de contaminación ambiental.

B.- Tratamiento y usos de las vinazas.

Gran cantidad de estudios se han realizado con respecto a la recuperación de vinazas (fig.4).

Así mismo, actualmente existen diversos procesos de tratamiento que están siendo utilizados para la eliminación del efecto contaminante de las vinazas. Sin embargo, entre los procesos usados o que han sido propuestos, no existe un acuerdo generalmente aceptado sobre cuál de todos los métodos resulta más adecuado para lograr ese objetivo. Esto se ha fundamentado principalmente, por las variaciones derivadas de la naturaleza

propia de las vinazas.

A continuación se señalan los procesos en operación y su nivel de tecnología disponible, algunos procesos en desarrollo y la implementación de tecnologías potenciales, para la utilización o tratamiento de las vinazas.

RECICLAJE.

El objetivo básico es el de utilizar vinazas como agua de dilución para melazas. Realizándose a nivel laboratorio y planta piloto, se cuenta con datos de una evaluación de prefactibilidad de proceso (Peraza,1988); sin embargo, algunos autores han reportado que la máxima cantidad a utilizar de vinazas no alcanza más de un 50% de la total producida (Sheenan & Greenfield,1980).

IRRIGACION.

En Puerto Rico se han estado desarrollando una moderna industria arrocera, en una área de 16,000 acres. Se ha observado que la aplicación de vinazas en las tierras de cultivo aumenta la producción de arroz (Chandler , et al.1984). Este método, también aplicado en otros países (Brasil, Inglaterra y Australia, por ejemplo), implica una necesidad obvia de una área grande, adyacente a la destilería, en una zona de precipitación baja-media; desafortunadamente este caso no es frecuente. Hasta la fecha, los costos de tubería y bombeo han evitado la aplicación extensiva de este método.

EVAPORACION - COMBUSTION.

La incineración puede ser atractiva como un medio de recuperar el contenido mineral de las vinazas, con un consumo total del contenido orgánico (Maiorella et al., 1983). Este esquema se ha propuesto y practicado a nivel piloto en algunos países (Europa, E.U.A. y Brasil) (Eder, 1976).

Aunque se obtiene un producto de fácil manejo y transporte, la economía de este proceso descansa fuertemente sobre el costo del fertilizante; además, un factor actualmente limitante son los gastos de energía que han aumentado marcadamente.

A partir de lo anterior, podría especularse que el método tampoco sería rentable.

SUPLEMENTO PROTEINICO.

Las vinazas tienen un buen contenido de proteínas, fuentes de carbono y energía, sales minerales y vitaminas (tabla 1) (Sheenan & Greenfield, 1980). Fue en base a esta consideración por la que actualmente las vinazas en sí o usadas como sustrato, ofrecen un mayor potencial para un suplemento proteínico en raciones balanceadas. En este contexto han sido consideradas dos opciones importantes:

A.- La primera es concentrarla hasta 60 grados Brix y después secarlas. Esta alternativa ha sido investigada en varios ingenios del país; se encontró que las vinazas concentradas aumentaron su contenido proteico entre 18 y 20% en base seca; aunque desafortunadamente muestran altos niveles de potasio, entre 5 y 9% en base seca (Ozuna, 1988). Este factor (debido a los efectos

laxativos del potasio), limita la adición de vinazas en las raciones, en menos del 10% en la dieta para rumiantes y entre 2 y 3% en raciones para ganado porcino (Costa & Castello, 1981).

Debido a este problema y aunado a los costos de capital y operación elevados (uso de grandes evaporadores), la alternativa tiene una limitada viabilidad económica (Maiorella, et al. 1983).

B.- Las vinazas pueden utilizarse como fuente de nutrientes para el cultivo de microorganismos no tóxicos y ricos en proteína, que puedan ser recuperados, secados y utilizados como suplemento proteico en raciones balanceadas. Este método utilizado en Cuba, Argentina, India y México, a nivel laboratorio y piloto, es muy atractivo, destacándose por el tipo de producto obtenido (con un 51% de proteína en base seca) además de permitir la reducción de la DBO (Bebin, 1988). Para el tratamiento de vinazas de melazas ha parecido ser económicamente atractivo; sin embargo, de manera similar a otros procesos de tratamiento aeróbico, se tienen altos consumos de energía y una considerable inversión de capital (Maiorella, et al. 1983). En México la tecnología aún no está disponible y se carece de datos a nivel planta piloto, que permita evaluar su factibilidad económica; se espera que esta opción sea muy adecuada a las condiciones mexicanas, ya que genera un producto valioso, totalmente inocuo y con un contenido mínimo de potasio. Además, con las recientes mejoras técnicas logradas, y adaptadas a este proceso de fermentación, se lograría aumentar la rentabilidad global del proceso (Peraza. 1990).

LAGUNAS DE TRATAMIENTO.

Aparentemente esta es una alternativa atractiva (en términos de costos de capital y operación), con la condición de que existieran tierras disponibles y baratas para su implementación. Sin embargo, muchas destilerías están en áreas de cultivo, y el costo de oportunidad de los terrenos cercanos puede ser alto. Otras destilerías están en zonas urbanas, donde además de tenerse altos costos del terreno, pueden ocasionarse problemas de malos olores. En la India, Hindustani Sugar Mills Ltd., la destilería más grande del país, ha empleado un terreno de 7 hectáreas, donde se encuentran localizadas tres lagunas (1 a 3 metros de profundidad).

LODOS ACTIVADOS.

Este proceso raramente es efectivo en costos. En la mayoría de los casos donde es empleado, este tratamiento está combinado subsecuentemente a un tratamiento previo de vinazas (Sheenan & Greenfield, 1980).

TRATAMIENTOS FISICOQUIMICOS.

En general, los procesos empleados (sedimentación, ósmosis inversa, electrofloculación, electrodiálisis y electroósmosis, por mencionar algunos), han sido considerados muy caros y muy limitados en el grado de purificación que logran (Sheenan & Greenfield, 1980).

PRODUCTOS POTENCIALES.

Existen microorganismos (bacterias, hongos y levaduras), que tienen un valor comercial intrínseco (fuente de proteínas). Así mismo existen bacterias y levaduras que metabolizan los azúcares del efluente transformándolos en productos útiles. La Biotecnología moderna aporta herramientas nuevas para el tratamiento de vinazas, permitiendo lograr el desarrollo de procesos para la obtención de productos de alto valor comercial: Lisina, ácido cítrico, vitamina B12 y biopolímeros. Esta alternativa, constituye un arsenal con gran potencialidad, que en el futuro ofrece buenas perspectivas de explotación (Bebin, 1988).

JUSTIFICACION

III JUSTIFICACION

Dentro de la industria productora de tequila, el Estado de Jalisco es el primer productor en el país. Aquí se encuentran más de 25 tequileras, algunas de ellas ubicadas en la zona urbana, las cuales producen 780 millones de litros de vinaza por año, aproximadamente.

Siendo las vinazas un desecho con alto poder contaminante (altamente consumidor de oxígeno) se pretende ayudar a disminuir los volúmenes de descarga en los cuerpos acuíferos. Y por otro lado atendiendo la actual demanda de energéticos, la utilización de las vinazas en la fermentación le daría cierto valor agregado a este desecho.

Utilizar las vinazas como agua de dilución en la fermentación alcohólica es una alternativa con grandes posibilidades de aplicación en dichas industrias.

Esto viene apoyado por los siguientes puntos:

- 1.- En destilerías pertenecientes a ingenios, existe la posibilidad de usar vinazas como una porción del agua que se utiliza para el lavado de la caña (Sheenan & Greenfield, 1980).
- 2.- En trabajos realizados con vinazas se ha observado que estas poseen algunos compuestos que pueden ser asimilados por las levaduras, mejorando así sus rendimientos (Almazán, 1980).

3.- Algunos autores sugieren que las vinazas pueden ser recirculadas hasta en un 50% de la total producida (Sheenan & Greenfield, 1980). En estudios realizados a nivel laboratorio en el CINVESTAV del I.P.N. para producir proteína unicelular (P.U.C.) se emplearon vinazas de ingenio en un 100% como agua de dilución (Peraza, 1988).

HIPOTESIS

IV HIPOTESIS

La utilización de vinazas como agua de dilución en la preparación de los mostos para el proceso de la fermentación, permitirá obtener rendimientos similares a los obtenidos en un proceso convencional, o aún mejorarlos y así mismo ayudará a aminorar el problema de contaminación, ya que se reducirá el volumen de descarga de las mismas.

OBJETIVOS

V OBJETIVOS

1.- OBJETIVOS GENERALES

El estudio será llevado a cabo a nivel laboratorio, empleando vinazas tequileras, de ingenio y melazas de caña, para la obtención de alcohol, en las condiciones de operación utilizadas normalmente en las industrias de fermentación. A partir de esto se pretende:

- a). Verificar si los rendimientos obtenidos en la fermentación alcohólica, empleando vinazas tequileras como agua de dilución en la preparación del mosto de fermentación son similares a los obtenidos en el proceso convencional.
- b). Comparar los rendimientos de la producción de alcohol, empleando vinazas tequileras con los obtenidos empleando vinazas de ingenio.

2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a). Estandarizar el inóculo.
- b). Realizar fermentaciones a nivel matraz utilizando cada uno de los diferentes medios a probar.
- c). Realizar fermentaciones a nivel de 10 litros utilizando cada uno de los medios probados a nivel matraz.

MATERIALES Y METODOS

VI MATERIALES Y METODOS

1. MICROORGANISMO:

El microorganismo que se utilizó fue una cepa de levadura de Saccharomyces cerevisiae BCGC L-002, productora de etanol a partir de melaza.

2. REACTIVOS:

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

3. EQUIPO:

Autoclave Infra, agitador magnético Felisa, balanza analítica Chyo Jupiter SDT 200, balanza granataria Chyo Jupiter - 5000, balanza granataria Mettler Pc 4400, baño de temperatura constante Buchi 011, campana de flujo laminar, campana de extracción, centrífuga Sol-bat, centrífuga Ependorf 5414, espectrofotómetro Perkin- Elmer 559A UV/VIS, horno Felisa, estufa de incubación Felisa, fermentador Multigen New Brunswick, Hematocitómetro American Optical, microscopio compuesto One Ten American Optical, micropipetas Gilson, orbital rotatorio New Brusnswik G-25, potenciómetro Orp Test Kit Cole Palmer, potenciómetro pH 103 Corning.

4. TECNICAS ANALITICAS:

A.- Técnica de azul de metileno para conteo celular.

Los reactivos utilizados son:

- a) Azul de metileno 10 g/l
- b) Citrato de Sodio 50 g/l

Procedimiento:

En un matraz aforado de 50 ml, poner 5 ml de muestra, 2.5 de azul de metileno y aforar con agua destilada.

Tomar una muestra con micropipeta y colocarla en una cámara de Neubauer y hacer conteo de la población al microscopio. Esta técnica nos permite conocer también la viabilidad ya que la pared celular de las levaduras muertas absorbe el colorante y de esta forma es fácil distinguir las células vivas de las muertas.

B. Técnica para determinar azúcares totales por medio del método de fenol-sulfúrico (Dubois, et al. 1956).

Los reactivos utilizados son:

- a) Acido sulfúrico concentrado
- b) Fenol al 5%

Procedimiento:

A 1 ml de muestra se le adiciona 1 ml de fenol al 5% y enseguida 5 ml de ácido sulfúrico concentrado este último se agrega en forma brusca para lograr la hidrólisis total. Se deja enfriar a temperatura ambiente por 5 min., se agita y enseguida se deja a baño de agua fría durante 10 min.

Finalmente se lee absorbancia a 490 nm.

C. Técnica para determinar azúcares reductores libres por medio del método DNS (ácido dinitrosalicílico) (Miller, 1959).

Los reactivos utilizados son:

- | | |
|--------------------------------|---------|
| a) NaOH | 10 g/l |
| b) Acido 3,5 Dinitrosalicílico | 10 g/l |
| c) Tartrato de Na y K | 200 g/l |
| d) Metabisulfito de Na | 0.5 g/l |
| e) Fenol | 2 g/l |

Mezclar uno a uno y aforar en un matraz de 1000 ml.

Procedimiento:

A 0.5 ml de muestra agregar 1.5 ml de solución de DNS, agitar y poner en baño maría a punto de ebullición durante 10 min. Se deja enfriar a temperatura ambiente, se agragan 8 ml de agua destilada y se agita. Se lee absorbancia a 550 nm.

D. Técnica para determinación de etanol por dicromato de potasio
(Amerine & Ough, 1976).

Los reactivos utilizados son:

- a) Dicromato de potasio (K_2CrO_7) 33.768 g/l
- b) Acido sulfúrico (H_2SO_4) 325 ml

Preparación del reactivo:

Se diluye el ácido sulfúrico en un volumen aproximado de 400 ml de agua destilada, se deja enfriar y se agrega el dicromato diluido en aproximadamente 200 ml de agua destilada; y se afora en un matraz de 1000 ml.

Procedimiento:

A 1 ml de muestra agregar 2 ml de solución de dicromato, se agita y se deja reposar durante 10 min; enseguida se agregan 5 ml de agua destilada y se agita. Leer absorbancia a 585 nm.

5. MEDIOS DE CULTIVO

Medios para propagación de inóculo* y fermentación:

M1A.- Melaza - Agua: 24°Brix + nutrientes**, pH 4.5

M1B.- Melaza - Agua: 24°Brix sin nutrientes, pH 4.5

M2A.- Melaza - Vinaza Ing: 24°Brix + nutrientes**, pH 4.5

M2B.- Melaza - Vinaza Ing: 24°Brix sin nutrientes, pH 4.5

M3A.- Melaza - Vinaza Teq: 24°Brix + nutrientes**, pH 4.5

M3B.- Melaza - Vinaza Teq: 24°Brix sin nutrientes, pH4.

(*) En la propagación de inóculo los medios empleados son:
M1A, M2A, M3A.

(**) $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ 0.24 g/l; Ca HPO_4 0.12 g/l; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 1.31 g/l.

6. METODOLOGIA

A. Estandarización de técnicas.

- Curva de calibración para la determinación de azúcares totales.

Se obtuvo una curva de calibración para determinar azúcares totales por medio de la técnica de fenol-sulfúrico, usando una

solución patrón de sacarosa de una concentración de 0.1 g/l; el rango de concentración a probar fué de 0.01 a 0.1 g/l. Para obtener la ecuación de la curva, se realizó un análisis de regresión lineal, a fin de estimar con mayor precisión la cantidad de azúcares totales presentes en una muestra a partir de una absorbancia dada.

- Curva de calibración para determinación de azúcares reductores libres.

Se obtuvo una curva de calibración para determinar los azúcares reductores libres por medio de la técnica de DNS, usando una solución patrón de dextrosa anhidra a una concentración de 1 g/l; el rango de concentración a probar fué .1 a 1 g/l. También para este caso se realizó un análisis de regresión lineal, obteniéndose la ecuación de la curva.

- Curva de calibración para determinación de etanol.

Se obtuvo una curva de calibración para determinación de etanol por medio de la técnica de dicromato de potasio, usando una solución patrón de etanol de 20 g/l. El rango de concentración a probar fué de 2 a 20 g/l. Como en los casos anteriores, también se efectuó un análisis de regresión lineal.

B. Mantenimiento y conservación de la cepa.

La cepa de levadura fue mantenida en los medios M1A, M2A y M3A

con resiembras mensuales. Durante cada siembra los tubos con agar inclinado fueron incubados durante 24 h a 35°C; después, los cultivos se conservaron en refrigeración a 4°C (tubos de conservación).

C. Estandarización del inóculo: Determinación de población y porcentaje de viabilidad de la cepa en medio sólido.

A partir de un tubo de conservación de esta cepa, en varios tubos con agar inclinado, se sembró la cepa por estrias. Se incubaron por un período de 28 h, sacando muestras (tubo por muestra) cada hora a partir de las 16 horas de incubación. A cada tubo de crecimiento, se le adicionó 5 ml de solución fisiológica estéril, obteniéndose una suspensión celular, la cual fue empleada para conteo de la población total y viabilidad.

La población celular se determinó por conteo directo al microscopio en la cámara de Neubauer y el porcentaje de viabilidad por tinción con azul de metileno.

D. Fermentación a nivel matraz.

El procedimiento para cada una de las fermentaciones a nivel matraz fue el siguiente:

Se inocularon matraces Erlenmeyer de 4 litros conteniendo 2.7 litros de medio, con 300 ml de inóculo (1:10 v/v). Se incubaron a

35°C y se tomaron muestras a diferentes tiempos a las cuales se les determinó: azúcares totales, azúcares reductores y concentración de alcohol:

Se calculó el rendimiento de fermentación en base a la producción de alcohol y al consumo de azúcares.

También se determinó la velocidad de producción de alcohol mediante un análisis de regresión lineal de la curva de producción de alcohol, contra tiempo, cuya pendiente correspondió a la velocidad expresada como gramos de alcohol/l/h.

E. Fermentación a nivel de 10 litros.

Se utilizó el mismo procedimiento que para la fermentación a nivel matraz, sólo que aquí se trabajo con un volumen mayor.

Para la propagación de la levadura, se partió de tubos con agar inclinado, sembrados con la cepa de levadura, con estos se inoculó un matraz erlenmeyer de 500 ml conteniendo 200 ml de medio, se incubó a 35°C a 300 rpm; posteriormente, con éste se inocularon dos matraces Erlenmeyer de 4 litros conteniendo cada uno 2000 ml de medio (1:10 v/v), los cuales se incubaron a las mismas condiciones que el anterior. Con estos matraces se inoculó (1:10 v/v) un garrafón conteniendo 9 litros de medio.

La fermentación se realizó a 35°C durante 48 h y se muestreó (30 ml) a diferentes tiempos. A cada muestra se le determinó azúcares totales, azúcares reductores y concentración de etanol.

Se determinó la velocidad de producción de alcohol y el

rendimiento de fermentación para cada uno de los medios, como se mencionó en el apartado anterior.

RESULTADOS

VII RESULTADOS

1. ANALISIS DE MELAZAS Y VINAZAS.

Debido a la naturaleza propia de las materias primas empleadas como sustrato, con el propósito de tener datos de la composición de las utilizadas en el trabajo experimental, se consideró importante llevar a cabo las determinaciones analíticas que se muestran en la tabla 4.

Las melazas utilizadas en este estudio provenían de la última zafra de 1988 de ingenio " José María Martínez " de Tala, Jal. El análisis de estas indicó una cantidad normal de sólidos (85 °Brix), además de un contenido aproximado de 200 g AR/l. El pH que presentó fue entre 4.5 y 4.6.

Las vinazas procedentes del mismo ingenio, tuvieron un contenido aproximado de 40 a 50 g AR/l, con una concentración de 15 a 19 °Brix y un pH de 4.1 - 4.4 .

Según estudios realizados, las vinazas de este tipo presentan normalmente una cantidad elevada de sólidos totales (70 - 80 g/l), así como una DQO de 80,000 a 100,000 ppm, lo que las hace ser un desecho muy contaminante. Las vinazas analizadas tenían un aspecto turbio, de un color café oscuro además de un fuerte olor a piloncillo.

A las vinazas procedentes de una tequilera de Guadalajara, Jalisco se les determinó los °Brix presentando solamente entre 1 y 3. Del análisis de azúcares reductores se obtuvo una concentración aproximada entre 2 y 6 g/l, y con un pH entre 3.8 y 4.1, presentó una DQO de aproximadamente entre 20 y 30 000 ppm, así como una concentración mínima de sólidos totales (7 a 10 g/l). Estas vinazas tenían un aspecto muy diferente a las anteriores, principalmente en el olor y color; éstas eran de color café muy claro y de olor a tequila.

2. ESTANDARIZACION DE INOCULO.

La estandarización fue realizada a partir de un tubo de conservación a los tubos de siembra, con el objeto de determinar el tiempo de incubación donde se obtuviera la máxima proporción de células fisiológicamente activas. El procedimiento está mencionado en Materiales y Métodos. En este experimento se empleó el medio M1A con 3.5 % de agar bacteriológico.

La cinética de crecimiento de la levadura fue determinada en función de la población (millones de cel/ml) y el porcentaje de viabilidad (figura 6), obteniéndose dos curvas. La cinética se siguió por un tiempo de 28 h, suficiente para observar la fase logarítmica y exponencial del crecimiento celular.

Esta última se presentó a las 24 h. con una población de 336×10^6 cel/ml y una viabilidad de 99.5 %. Después de este tiempo la población empezó a disminuir poco a poco, así como su

viabilidad, llegando al último muestreo (28 h) con una población de 297.5×10^6 cel/ml y una viabilidad de 98.7 % .

En base a estos resultados, se escogió un tiempo de incubación de 24 h.

3. FERMENTACION A NIVEL MATRAZ.

Estos experimentos fueron realizados en fermentaciones por lote, con el objeto de conocer el comportamiento de la cepa durante la fermentación, además de alguna otra variante que se pudiera presentar, por lo cual se decidió partir de un volumen pequeño.

Durante los experimentos se observó un factor que fue común en todos los medios (M1A, M1B, M2A, M2B, M3A y M3B): al poco tiempo de ser inoculados los matraces, empezaba a flocular formando una pastilla en el fondo del matraz. Cuando se tomaban las muestras los matraces eran agitados para homogenizar el medio pero la pastilla no se deshacía por completo, lo cual fue un inconveniente para calcular la velocidad específica de crecimiento (μ max.), ya que en unas muestras se obtenía más cantidad de células que en otras.

Se emplearon medios con adición de nutrientes y sin adición de los mismos, con el objeto de conocer que tan necesaria era la adición de éstos para las células de levadura en la

fermentación.

En el medio M1A (figura 7) conteniendo nutrientes, a las 24 h se obtuvo una disminución por consumo de azúcares del 71.8 % , así como una producción de alcohol de 19.8 g/l. La fermentación se siguió hasta las 28 h, tiempo en el cual se habían consumido casi totalmente los azúcares reductores, produciéndose 4.19 g/l de alcohol más. En el medio M1B (sin nutrientes) se observó algo semejante, desde el inicio de la fermentación se tuvo una buena actividad fermentativa (figura 8); a las 24 h se habían consumido el 67.5 % de los azúcares y se tenía una producción de alcohol de 20.25 g/l. En las siguientes 24 h se llegó a una producción de 24.24 g/l de alcohol quedando solamente 5.5 g/l de azúcares reductores.

En los medios M2A y M2B se inició la fermentación con un poco menos de azúcares, esto pudo haberse debido posiblemente a que fueron preparados con vinazas (ingenio), tomando en cuenta que éstas contienen muchos sólidos, lo cual hizo que se necesitara menos melaza para alcanzar los °Brix deseados. Sin embargo, se obtuvieron buenos resultados.

En el medio M2A (figura 9), a las 24 h se había consumido el 61.2 % de los azúcares y se tenía una producción de alcohol de 20.10

g/l. Al final de la fermentación (48 h) se alcanzó una producción de 27.12 g/l de alcohol con un consumo 76 % de azúcares.

Mientras que en el medio M2B (figura 10) a las 48 h se obtuvo una producción de alcohol de 23.87 g/l con un consumo total de

azúcares del 68 %.

Comparando estos resultados (figura 10) con los obtenidos anteriormente (figura 9) podemos notar que la producción fue un poco más lenta, pero los rendimientos (Yp/s) son semejantes, 0.59 y 0.60 respectivamente.

Los medios M3A y M3B fueron preparados con vinazas de una tequilera, las cuales tenían un aspecto muy diferente a las empleadas en el medio M2A y M2B.

Estas vinazas eran de color más claro y con menos sólidos, es por esto que se cree justificable haber obtenido una mayor concentración de azúcares en estos medios, ya que se utilizó más melaza que en los anteriores para alcanzar los "Brix" deseados.

En estos dos experimentos la fermentación se observó un poco más activa desde el inicio hasta el final. En el medio M3A (figura 11), a las 24 h se habían consumido el 63 % de los azúcares y se tenía una producción de alcohol de 43.15 g/l, mientras que en el medio M3B (figura 12), a las 24 h se tenía una producción de 39.41 g/l de alcohol. Sin embargo, al final de los experimentos (48 h) en los dos medios se alcanzó una producción de 46.0 g/l de alcohol.

4. FERMENTACION A NIVEL DE 10 LITROS.

Empleando un volumen mayor al anterior se realizaron otra serie de experimentos por lote. Una vez más se presentó el mismo fenómeno de la floculación de la levadura, observándose que a

este nivel la pastilla era más gruesa y por lo tanto se tornó más difícil que las muestras fueran homogéneas en cuanto a la cantidad de células.

Las curvas que se obtuvieron por consumo de azúcares y producción de alcohol en los medios M1A, M1B, M2A, M2B, M3A y M3B a este nivel se presentan en las figuras 13, 14, 15, 16, 17 y 18 respectivamente.

La fermentación para el medio M1A a las 24 h presentó una disminución por consumo de azúcares del 68.5 %, así como una producción de alcohol de 19.35 g/l. Al término de la fermentación (48 h) se llegó a una producción de 24.68 g/l de alcohol.

Para el medio M1B el consumo de azúcares también fue semejante al observado a nivel matraz desde el inicio de la fermentación, llegándose a un consumo total de 90.8 % y de la misma forma la producción de alcohol alcanzó 26.0 g/l a las 48 h.

En los medios donde se empleó vinaza de ingenio se observó una actividad de fermentación un poco mayor que en los dos anteriores y esto lo podemos ver en las figuras 15 y 16.

Para el medio M2A, donde el consumo total de azúcares fue de 69%, la producción de alcohol alcanzó 31.72 g/l a las 48 h, y para el medio M2B se llegó a un consumo total de 69.7 %, así como a una producción de 28.8 g/l de alcohol.

Sin embargo, estos resultados se vieron superados en los dos experimentos siguientes donde se obtuvo una actividad de

fermentación mayor.

Cabe hacer notar que en estos dos medios que se mencionan se emplearon vinazas tequileras en su preparación.

En el medio M3A la fermentación se mantuvo muy activa desde el inicio presentando a las 24 h una disminución por consumo de azúcares del 66.6 % y una producción de alcohol de 43.3 g/l, llegando a las 48 h de la fermentación con una producción finalde 46.3 g/l de alcohol.

Así mismo en el medio M3B a las 24 h se tenía una disminución por consumo de azúcares de 63% y una producción de alcohol de 39.0 g/l, no obstante llegadas las 48 h alcanzó una producción final semejante al medio anterior, que fue de 46.8 g/l.

5. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza para determinar si existe diferencia significativa en la producción de etanol se muestran en la tabla 8, en ella se puede ver que la F calculada es mayor que la F de tablas sólo para el primer caso (medios), y por lo tanto se rechaza la primer hipótesis nula.

Lo anterior indica que existen diferencias significativas de producción de etanol debido a los medios probados, pero no, en cuanto a la adición de nutrientes y tampoco hay una interacción entre estas dos variables.

La tabla 9 presenta los resultados del análisis de varianza para

los rendimientos alcanzados, en donde la F calculada es mayor que la F de tablas para el primer caso, rechazando así la primera hipótesis, siendo lo contrario para los dos casos siguientes.

Lo que indica que sólo existe diferencia significativa en los rendimientos debido a los medios probados, pero no en cuanto a la adición de nutrientes ni en cuanto a la interacción de estos dos.

Los resultados de estas dos tablas (8 y 9) se pueden observar en las figuras 19 y 20 donde se grafican los valores promedio de la producción de etanol y los valores promedio de los rendimientos alcanzados respectivamente.

DISCUSSION

VIII DISCUSIONES

1. ANALISIS DE MELAZAS Y VINAZAS

De acuerdo a datos de composición de melaza (Peraza, 1988; Almazán et al., 1982), pudo observarse que las melazas utilizadas contenían la cantidad esperada de sólidos (85 °Brix); sin embargo, esto no concordo con la cantidad de azúcares deseada, que fue baja, en relación a los grados Brix observados.

Esto quizá se haya debido a que las melazas son mantenidas en condiciones poco controladas, lo cual puede dar lugar a pérdidas de los azúcares. Sin embargo, se considera que esta diferencia no tuvo gran importancia ya que no se vio ninguna consecuencia en los experimentos realizados.

Lewicki (1978) y Monteiro (1975) mencionan en sus respectivos trabajos que dependiendo de la materia prima empleada en el proceso se derivan diferentes clases de vinazas las cuales difieren principalmente en calidad y solamente una minoría ha sido considerada de importancia para la investigación biotecnológica, como es el caso de las vinazas de melazas y las vinazas de jugo de agave. Los resultados obtenidos en los análisis indicaron realmente esa diferencia entre una vinaza y otra, asimismo se pudo notar (tabla 4) que las vinazas tequileras son poco menos contaminantes que las de ingenios, en base a la cantidad de sólidos presentes.

Los análisis realizados a las vinazas de melazas indicaron valores semejantes a los reportados por Almazán et al., (1982) en

cuanto a azúcares reductores, aunque existen ligeras diferencias comparando con otros autores (Sheehan & Greenfield, 1980; Costa & Castello, 1981).

Entre las vinazas del ingenio y las de la tequilera se observó que las primeras tenían una concentración mayor de azúcares reductores, la razón de esta variación no es clara, posiblemente la causa básica puede explicarse en base al proceso fermentativo utilizado en cada una de las alcoholeras, siendo aparentemente menos eficiente para este caso en el ingenio. La importancia de las variaciones observadas en su composición estaría representada por las dificultades de operación que podrían presentarse en un proceso a mayor escala. Sin embargo, Davy et al. (1980) ha reportado un proceso donde se manifiestan los beneficios de emplear el sistema de cultivo continuo para ayudar a resolver dificultades como la mencionada: cuando el efluente tiene una concentración mayor de sustrato, se reduce el flujo de alimentación (disminuyendo la velocidad de dilución), y viceversa, de tal manera que la productividad se mantenga constante.

2. ESTANDARIZACION DE INOCULO

Con el objeto de determinar el tiempo de incubación donde se obtuviera la máxima porción de células fisiológicamente activas se decidió realizar una estandarización con los parámetros de crecimiento (población celular) y viabilidad en medio sólido. De este modo se pudo observar a que tiempo se obtuvo los valores

máximos de población y viabilidad de células.

En la cinética realizada se pudo observar que a partir de las 24 h las células se encontraban en condiciones óptimas presentando una población máxima de 336.25×10^6 cel/ml y una viabilidad máxima de 99.5% .

Considerando este valor de viabilidad se notó un buen porcentaje (entre 90 y 95 %) de viabilidad desde el inicio de la cinética, observándose solamente que la población alcanzó su fase exponencial a las 24 h.

A este respecto Pinal (1990) menciona que en una cinética realizada con esta misma levadura obtuvo los valores máximos de población y viabilidad a las 25 h.

De ahí que tomando como base los resultados obtenidos en estas dos cinéticas, se consideró el tiempo de 24 h como el más representativo para la incubación del inóculo.

3. FERMENTACION A NIVEL MATRAZ

Una de las razones de utilizar melazas diluidas con agua (M1A y M1B) fué por que así se usa tradicionalmente en las destilerías, y esto nos serviría para tomar como base los resultados obtenidos con vinazas. De esta forma, se consideraría si es buena o no la opción de utilizar vinazas en el proceso de fermentación alcohólica.

Desafortunadamente no se cuenta con suficiente información sobre trabajos donde se haya utilizado vinazas en el proceso de la fermentación. Sin embargo, se tiene conocimiento de que en el

CINVESTAV del IPN se están realizando estudios relacionados con este aspecto de las vinazas (López, 1987), más no se logró conseguir dicha información que hubiera sido de gran apoyo. No obstante con ayuda de otros trabajos y la experiencia en el campo de la fermentación alcohólica, de algunos investigadores del CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco), se realizaron las fermentaciones inicialmente a nivel matraz ya que desde este nivel podrían obtenerse resultados que indicaran la utilidad de las vinazas en el proceso de la fermentación, lo cual fué posible comprobar posteriormente a un nivel mayor (10 l), tomando en cuenta la eficiencia del proceso como base comparativa.

La fermentación con los medios de melaza (M1A y M1B) se llevó a cabo durante 48 h obteniéndose una eficiencia de proceso de 72 y 75 % respectivamente, así como un rendimiento de 0.37 y 0.38 para cada uno de los respectivos medios.

Con respecto a los medios con vinazas de ingenio (M2A y M2B) se observó un comportamiento semejante a los medios con melazas.

En estos medios se obtuvo rendimientos de 0.37 y 0.35 y una eficiencia del proceso de 72 y 70 % ,respectivamente.

Comparando los resultados obtenidos con los medios de vinazas tequileras (M3A y M3B) con los de melazas se puede notar la gran diferencia que hay entre estos con respecto a rendimiento y eficiencia, ya que en los medios con vinazas tequileras se obtuvo rendimientos de 0.44 y 0.46 así como una eficiencia del proceso de 87 y 90 % para cada uno de los respectivos medios.

Estos últimos resultados pueden parecer muy altos ya que están

más arriba de los alcanzados normalmente en las destilerías de ingenios (60 % de eficiencia); sin embargo, Tamayo (1984) menciona que esto va a depender de la amplia capacidad de la levadura, de la composición del medio empleado y de las condiciones de fermentación (pH, temperatura, etc).

Pinal (1990) reporta rendimientos de 0.173 para una cepa utilizada en un ingenio y una eficiencia de proceso del 34% . Sin embargo, también menciona que con la cepa L-024 obtuvo en experimentos a nivel matraz un rendimiento de .5 y una eficiencia del 98% . Dicho autor comparó estas dos cepas a niveles mayores y logró comprobar que la cepa de catálogo (L-024) tiene una mayor capacidad de fermentación.

4. FERMENTACION A NIVEL DE 10 LITROS

Tomando en cuenta los resultados obtenidos anteriormente y suponiendo que podría haber alguna variación en los mismos representada por diferencia de volumen de operación, se pasó a un nivel de 10 litros, donde se pretendía obtener resultados más representativos para un futuro escalamiento a nivel industrial.

A nivel de 10 litros las condiciones del proceso pueden considerarse con cierto rango de error, semejantes al de las destilerías principalmente por el volumen de operación (Rodríguez, 1989).

En los medios con melaza (M1A y M1B) se obtuvieron rendimientos de 0.33 y 0.34 respectivamente así como una eficiencia del 66 % en ambos.

Respecto a los medios con vinazas, nuevamente los que contenían vinazas tequileras presentaron los valores más altos en rendimiento y eficiencia en comparación con los de vinazas de ingenio y aún más con los de melazas. En los medios M3A y M3B (vinazas tequileras) se obtuvieron rendimientos de 0.45 y 0.47, con eficiencias del 89 y 92 %, respectivamente.

Rodríguez (1989) reporta rendimientos de 0.46 y una eficiencia del proceso de 90 % para la cepa L-024 seleccionada como la más alta productora de etanol en su estudio. Asimismo, se debe considerar lo que ya mencionó anteriormente Tamayo (1984): Los resultados obtenidos con los medios de vinaza tequilera se pueden deber a la capacidad de fermentación de la levadura en ese medio, así como la influencia o efecto de algún componente de las vinazas tequileras sobre la levadura. De cualquier forma resulta atractiva la utilización de este desecho agroindustrial para la fermentación alcohólica.

Finalmente, cabe señalar que los estudios efectuados, aunque comparables con los realizados con melazas, necesitan ser probados a escala piloto, a fin de comprobar los resultados obtenido y llegar a conclusiones más reales. En este renglón, el presente estudio puede considerarse del tipo preliminar con el objeto de hacerlo comparativo con los trabajos de referencia (López, 1987).

De lo anterior puede notarse que tanto a nivel matraz como a nivel de 10 litros los resultados no presentaron diferencias significativas entre los medios que contenían nutrientes y los que no, esto se muestra en la tabla 5, que presenta la

comparación de resultados de los seis medios usados a nivel de 10 litros, en cuanto a producción de alcohol, de donde podemos mencionar algunos resultados sobresalientes como, la producción final de alcohol del medio M1A (22.16 g/l) y la del medio M1B (23.33 g/l), así mismo en contraste con los obtenidos en el medio M3A (42.96 g/l) y el medio M3B (42.24 g/l) que fue en que se obtuvo la mayor cantidad de alcohol.

Y la tabla 6, que muestra la comparación de estos mismos seis medios, en cuanto a eficiencia, rendimiento (Y_p/s) y productividad.

5. ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS.

Los análisis de varianza muestran que existe una diferencia significativa en la producción de etanol y en los rendimientos con respecto a los medios empleados, y a la vez ponen de manifiesto que en cuanto a la adición de nutrientes no existe tal diferencia e incluso no hay una interacción de los medios y la adición de nutrientes.

De tal forma que de las hipótesis nulas planteadas para los dos casos, se rechaza la primera debido a que la relación F calculada es mayor que la de tablas.

CONCLUSIONES

IX CONCLUSIONES

1. Las vinazas son una gran fuente de contaminación pero como uno de los tantos desechos agroindustriales, pueden ser aprovechadas, lo cual puede representar un ahorro en la economía de las industrias tequileras y alcoholeras, al no tener que invertir en plantas de tratamiento y reducir el gasto de agua.

Las vinazas de dichas industrias pueden sustituir hasta un 100 % el agua utilizada en los procesos de fermentación (Peraza, 1988).

2. Los rendimientos alcanzados a nivel laboratorio fueron mejores que los reportados actualmente por las destilerías de ingenios (60 % de eficiencia), y por otro lado fueron semejantes a los reportados en las industrias tequileras (6-7 °GL). Asimismo, los rendimientos alcanzados utilizando vinazas tequileras (92 % de eficiencia) fueron mejores a los alcanzados con vinazas de ingenio (74 % de eficiencia).

3. Se considera innecesaria la adición de sales en medios en medios donde se emplearon vinazas, ya que se observó que en los experimentos llevados a cabo sin adición de sales los rendimientos son semejantes a los obtenidos en los experimentos con adición de sales.

TABLAS

TABLA 1.

COMPOSICION DE VINAZAS DE MELAZAS DE CANA

COMPONENTE	g/l		
	(1)	(2)	(3)
Azúcares Reductores	26.5	9.5	16.4
Nitrogeno total	1.78	1.2	0.8
Acidez total	--	--	5.6
Acido Láctico	--	--	2.5
Acido Acético	--	--	2.0
Sólidos Totales	78.5	81.5	75.4
Sólidos Suspendidos	5.1	--	--
Ceniza Total	28.9	19.2	13.0
Na ₂ O	1.4	--	--
K ₂ O	10.73	7.8	--
CaO	3.53	3.6	1.25
MgO	1.63	1.0	0.45
P ₂ O ₅	0.17	0.2	1.2
SiO ₂	1.51	--	--
Fierro Total (Fe 2)	0.69	--	--
Zinc (Zn 2)	0.12	--	--
Sulfatos (SO ₄ 2)	4.36	6.4	--
Cloruros (Cl 3)	3.79	3.0	--
Alcohol residual	--	--	2.5
DBO ₅	35.7	25.0	--

(1) Sheehan & Greenfield, 1980.

(2) Costa & Castello, 1981.

(3) Almazán et al., 1968.

TABLA 2.

PRODUCCION DE TEQUILA EN EL ESTADO DE JALISCO

AÑO	TEQUILA (miles de litros)		VINAZA * (millones de l.)
	PRODUCCION	EXPORTACION	
80	59 652	24 139	596
81	42 980	25 941	429
82	53 372	25 309	533
83	62 563	28 816	625
84	61 531	30 883	615
85	52 991	31 076	529
86	43 782	30 154	437
87	56 284	33 483	562
88	53 227	35 167	532

Fuente: Cámara de la Industria Tequilera de Jalisco, 1989.

(*) Considerando un promedio de 10 litros de vinazas por cada litro de tequila.

TABLA 3.

COMPOSICION DE MELAZAS DE CANA (85 Bx)

COMPONENTE	% P/P		VITAMINAS	ppm	
	(1)	(2)		(1)	(2)
Agua	17-25	--	Tiamina	0.6-1	1.4
Sólidos totales	78-85	--	Riboflavina	2-3	--
Azúcar total	50-58	62	Niacina	17-30	--
Sacarosa	30-40	32	Acido		
Glucosa	4-9	14	pantoténico	20-60	--
Fructosa	5-12	16			
Carbono	28-32	--	Ac. fólico	0.3-0.4	--
Nitrogeno	0.08	--	Biotina	1-3	0.65
Ac. no nitrogenados	2-8	10	Piridoxina	1-7	--
			Inositol	2000	6000
Otros compuestos			Colina	800	--
carbohidratados	2-5	--			
Ceras, esteroides					
y fosfolípidos	0.1	--			
Ceniza total	7-15	8			
P2O5	0.009	0.2			
CaO	1.2	1.5			
MgO	0.98	0.1			
K2O	4.8	3.5			
Na2O	0.1	--			
Fe2O3	0.12	0.2			
Al2O3	1.6	--			
SiO2	0.6	0.5			
SO2	1.8	1.6			

(1) Adaptado de Solomons, 1969 y Almazán et al., 1982.

(2) Tamayo, 1984.

Fuente: Sheehan & Greenfield, 1980.

TABLA 4.

ANALISIS DE VINAZAS Y MELAZAS EMPLEADAS EN LA FERMENTACION

DETERMINACIONES	V. INGENIO	V. TEQUILERAS	MELAZA
Grados Brix	15-19	1-3	85
Azúcares Reductores, g/l	40-50	2-6	200
Azúcares Totales, g/l	---	---	350
Sólidos Totales, g/l	70-80	7-10	---
DQO, ppm	80,000-100,000	20,000-30,000	---
pH	4.1-4.4	3.8-4.1	4.5-4.6

(---) No determinados.

TABLA 5.

PRODUCCION DE ALCOHOL Y RIQUEZA ALCOHOLICA OBTENIDA EN
LOS DIFERENTES MEDIOS EMPLEADOS

MEDIO	ETANOL (g/l)	RIQUEZA ALCOHOLICA (°GL)
M1A	22.16	3.4
M1B	23.33	3.6
M2A	25.23	4
M2B	22.12	3.8
M3A	42.96	6
M3B	42.24	6

CONDICIONES: 35°C; 48 h.

TABLA 6.

COMPARACION DE LOS RENDIMIENTOS, PRODUCTIVIDAD Y EFICIENCIA
OBTENIDAS EN LA FERMENTACION

MEDIO	RENDIMIENTO* Yp/s	PRODUCTIVIDAD** g/l/h	EFICIENCIA*** %
M1A	0.33	0.81	66
M1B	0.34	0.9	66
M2A	0.39	1.1	78
M2B	0.38	1.0	74.6
M3A	0.45	1.8	89
M3B	0.47	1.6	92

CONDICIONES: Vol. de op. = 10 litros; Temperatura = 35°C.

* Yp/s: gramos de etanol obtenidos / g de azúcar consumidos.

** Productividad: Máxima concentración de alcohol alcanzada a las
24 h.

*** Rendimiento obtenido en relación al rendimiento teórico
(.51).

TABLA 7.

COMPARACION DE LA PRODUCCION DE ALCOHOL
 RENDIMIENOS Y PRODUCTIVIDAD

MEDIO	ETANOL g/l	RENDIMIENTO Yp/s	PRODUCTIVIDAD * g/l/h
(Matraz) 1			
M1A	21.33	0.33	0.99
M1B	21.75	0.34	0.84
M2A	21.27	0.29	0.83
M2B	18.15	0.27	0.90
M3A	42.8	0.41	1.79
M3B	40.77	0.40	1.69
(10 litros) 2			
M1A	22.16	0.39	0.81
M1B	23.33	0.34	0.90
M2A	25.23	0.39	1.1
M2B	22.12	0.38	1.0
M3A	42.96	0.45	1.8
M3B	42.24	0.47	1.6

(1) Volumen de operación 3 litros

(2) Volumen de operación 10 litros

* (24 Horas).

TABLA 8.

ANALISIS DE VARIANZA

VARIABLE RESPONSABLE: Etanol

FUENTE VARIACION	SUMA CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA CUADRADOS	F-CALCULADA	F _{0.05} tabla
TOTAL	1052.8917	11			
MEDIOS	1004.3221	2	502.16103	81.409	5.14
NUTRIENTES	2.3585	1	2.35853	0.382	5.99
MEDxNUTRIENT	9.2009	2	4.60043	0.746	5.14

HIPOTESIS NULAS

- Ho₁. No existe diferencias significativas en la producción de etanol debido a los diferentes medios probados.
- Ho₂. No existe diferencias significativas en la producción de etanol debido a la adición de nutrientes.
- Ho₃. No existe diferencias significativas en la producción de etanol debido a la interacción entre los medios probados y la adición de nutrientes.

TABLA 9.

ANALISIS DE VARIANZA

VARIABLE RESPOENSABLE: Rendimiento

FUENTE VARIACION	SUMA CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA CUADRADOS	F-CALCULADA	F _{0.05tabl}
TOTAL	0.0312917	11			
MEDIOS	0.0242167	2	.0121083	17.094	5.14
NUTRIENTES	0.0006750	1	.0006750	0.953	5.99
MEDxNUTRI	0.0021500	2	.0010750	1.518	5.14
ERROR	0.0042500	6	.0007083		

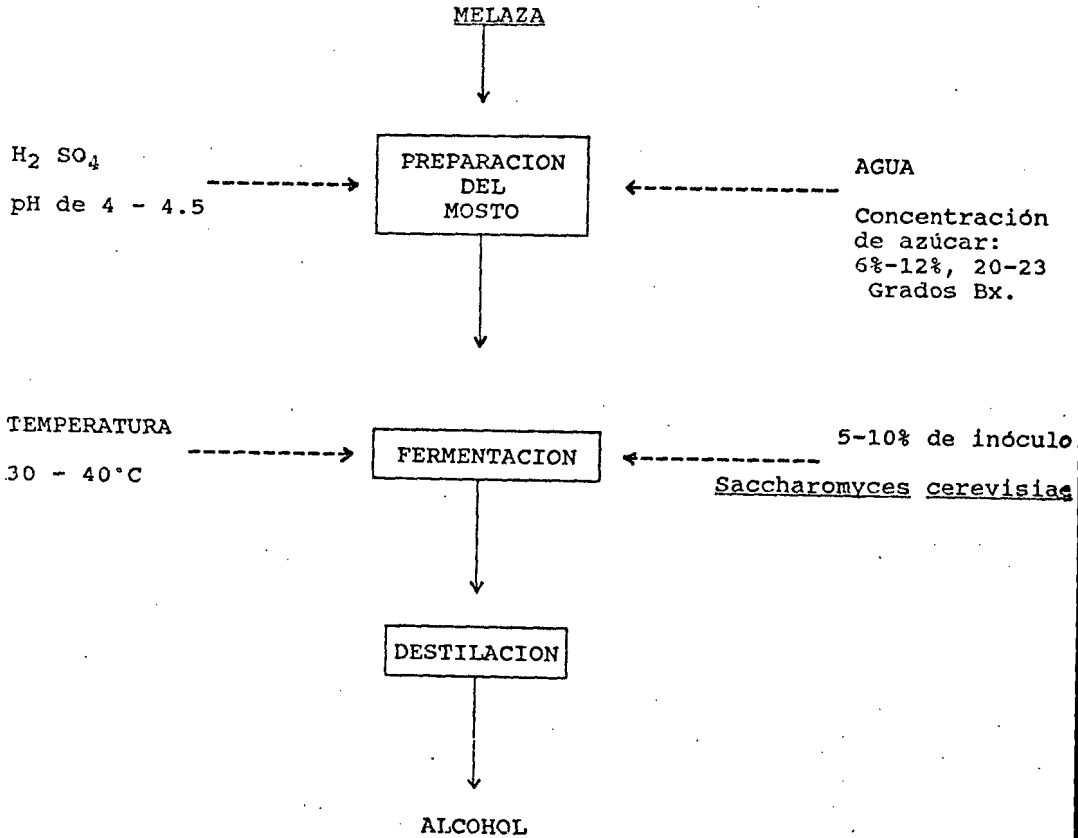
HIPOTESIS NULAS

- Ho₁. No existe diferencias significativas en los rendimientos debido a los medios probados.
- Ho₂. No existe diferencias significativas en los rendimientos debido a la adición de nutrientes.
- Ho₃. No existe diferencias significativas en los rendimientos debido a la interacción de medios con la adición de nutrientes.

FIGURAS

FIGURA 1.

ESQUEMA GENERAL DE LA PRODUCCION DE ALCOHOL
A PARTIR DE MELAZAS DE CANA



*Bx : Porcentaje de sólidos suspendidos y disueltos presentes en una muestra.

FIGURA 2.

ESQUEMA GENERAL DE LA PRODUCCION DE TEQUILA

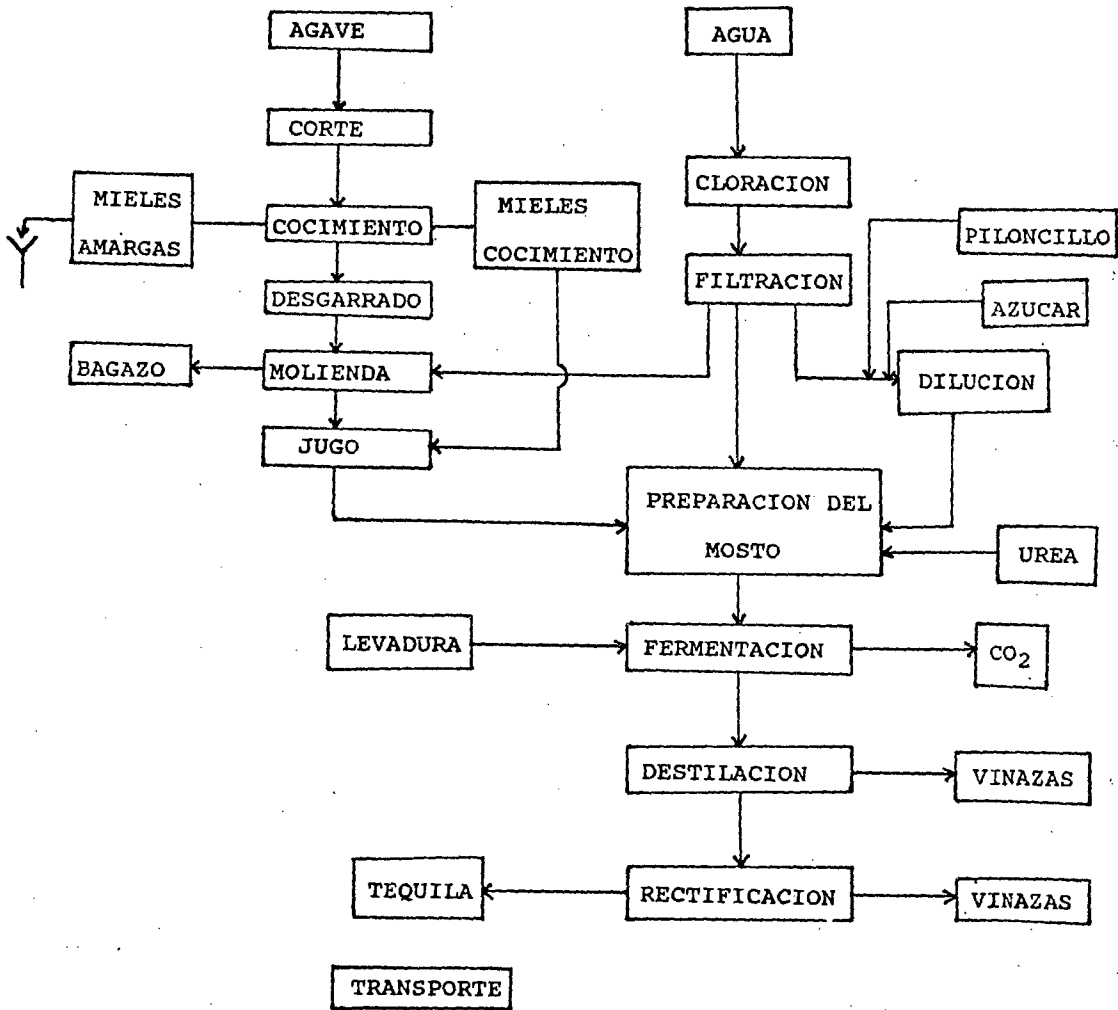
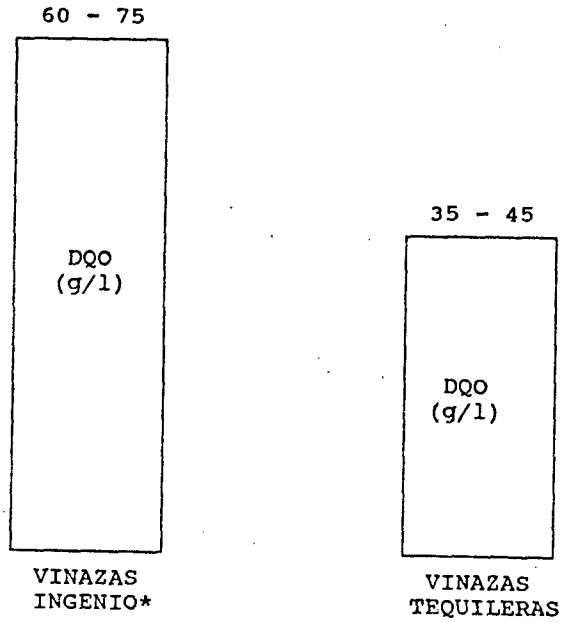


FIGURA 3.

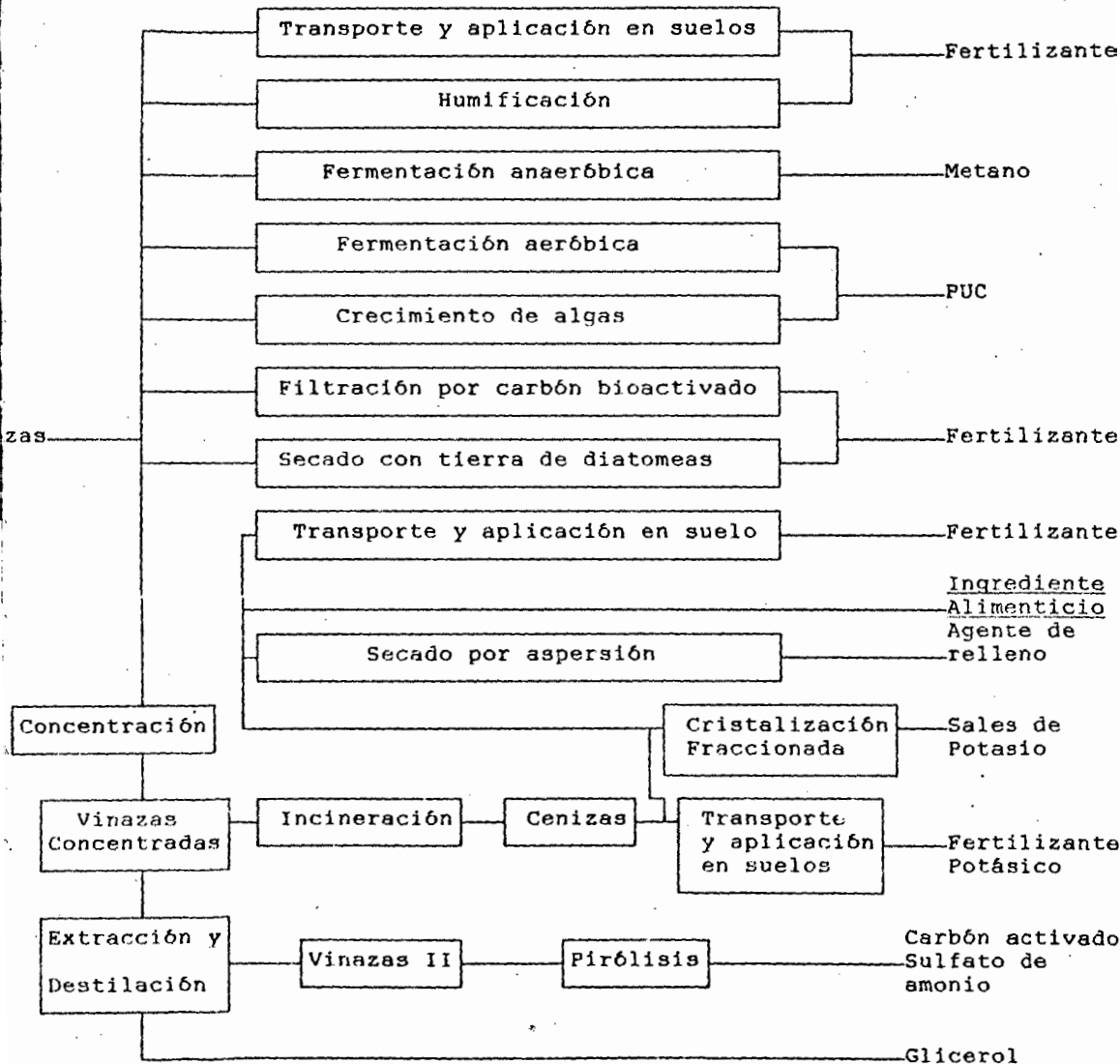
COMPARACION DE LA DQO EN VINAZAS DE INGENIO
Y VINAZAS TEQUILERAS



* Maiorella, et al. 1983.

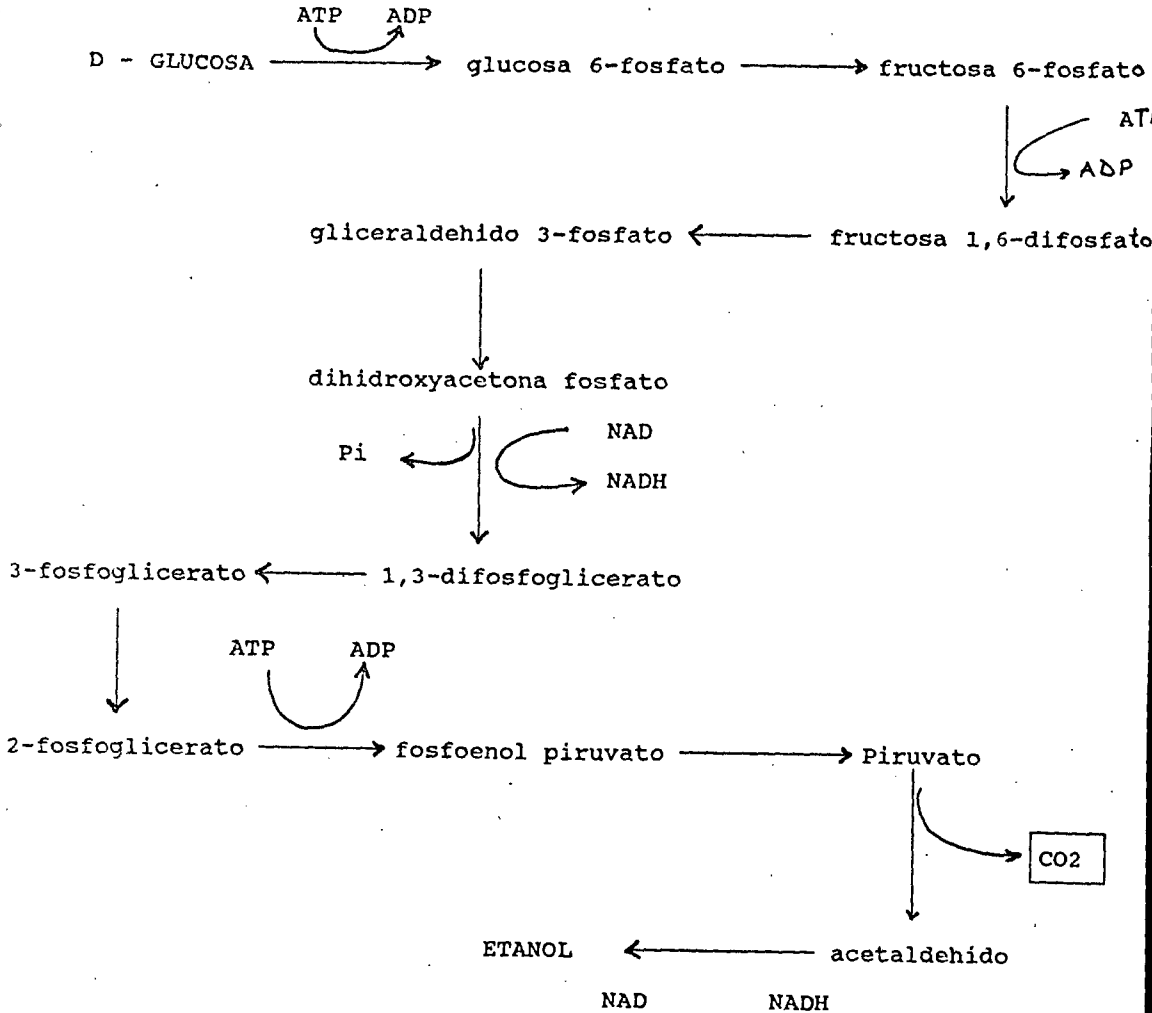
FIGURA 4.

PROCESOS DE RECUPERACION DE VINAZAS



FIDURA 5.

VIA METABOLICA EMBDEN - MEYERHOF PARA LA FERMENTACION ALCOHOL



Fuente: Rose H.A. & Harrison J.S., 1970.

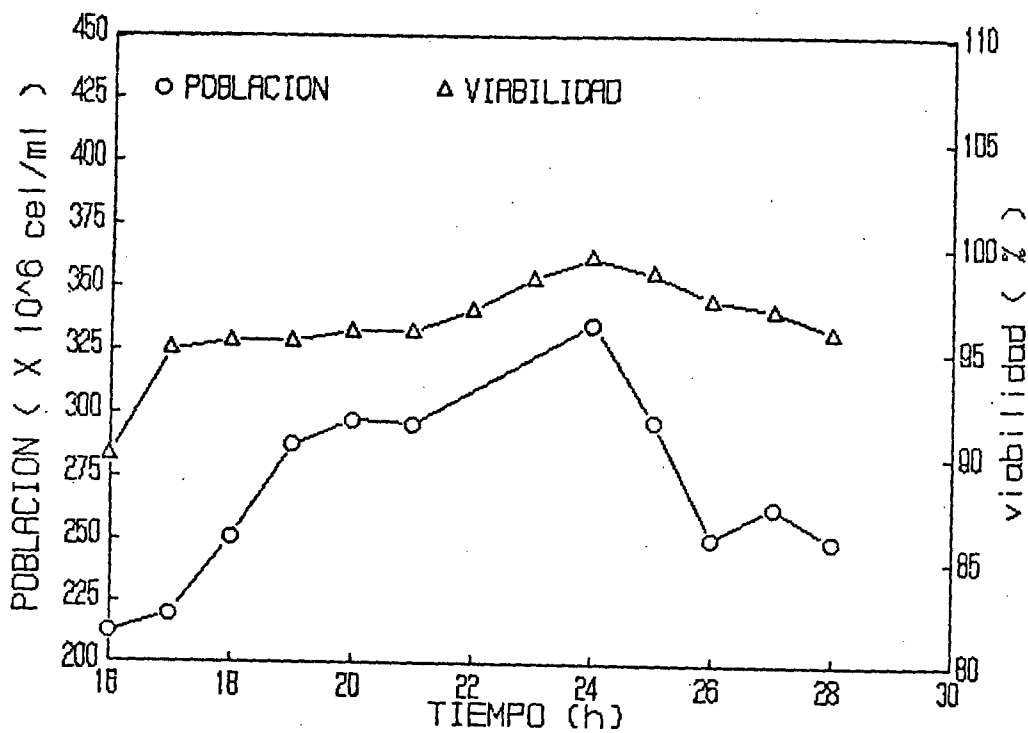


Figura: 6 Crecimiento y viabilidad de la cepa de levadura Saccharomyces cerevisiae L-002 (35°C; medio Melazas).

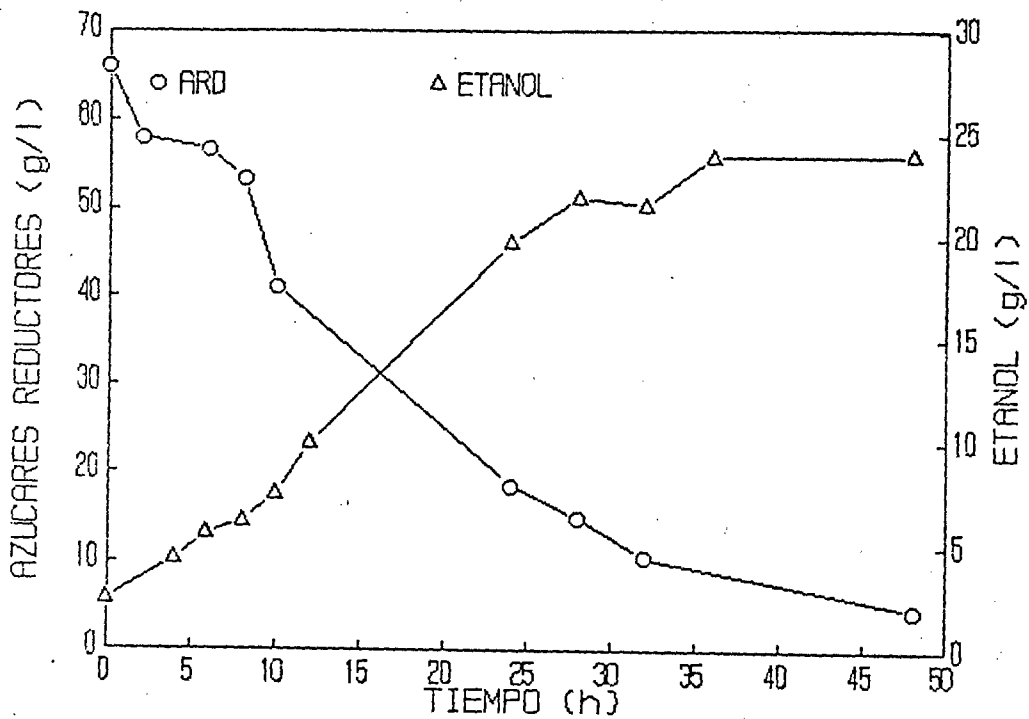


Figura: 7 Producción de alcohol y consumo de azúcares reductores a nivel matraz (35°C; medio MIA).

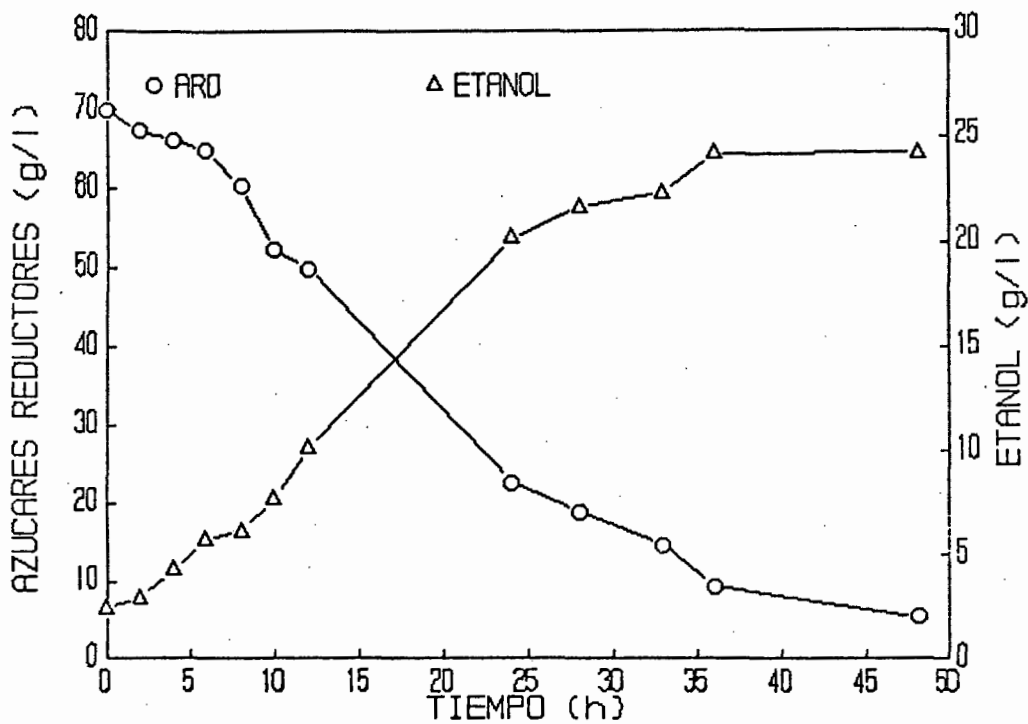


Figura: 8 Producción de alcohol y consumo de azúcares reductores a nivel matraz (35°C; medio M1B).

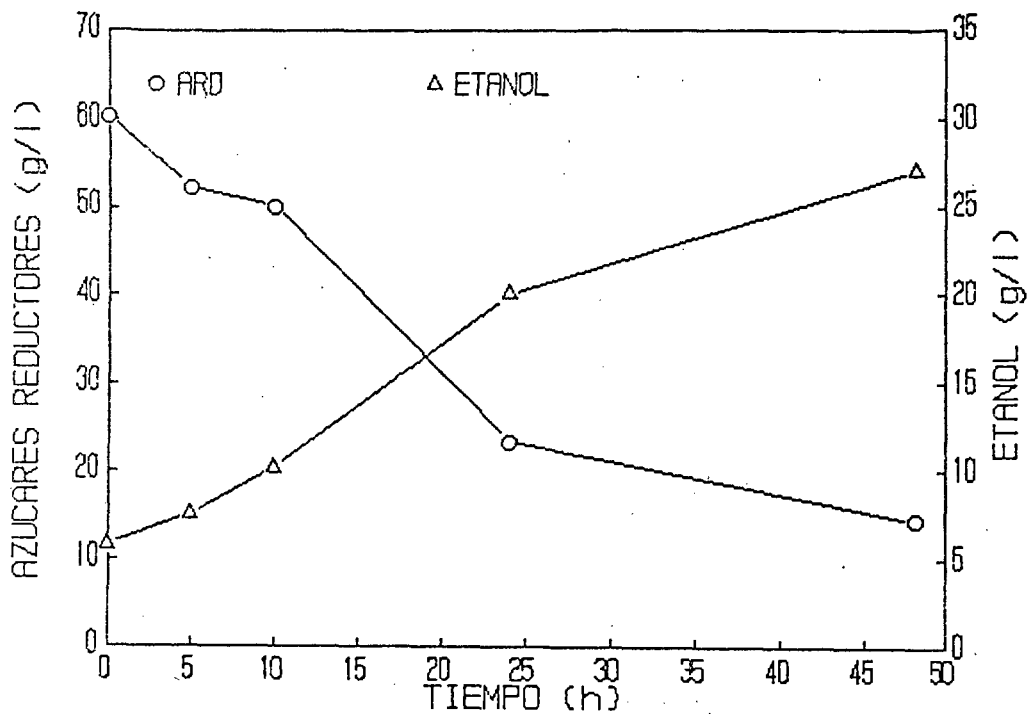


Figura: 9 Producción de alcohol y consumo de azúcares reductores a nivel matraz (35°C; medio M2A).

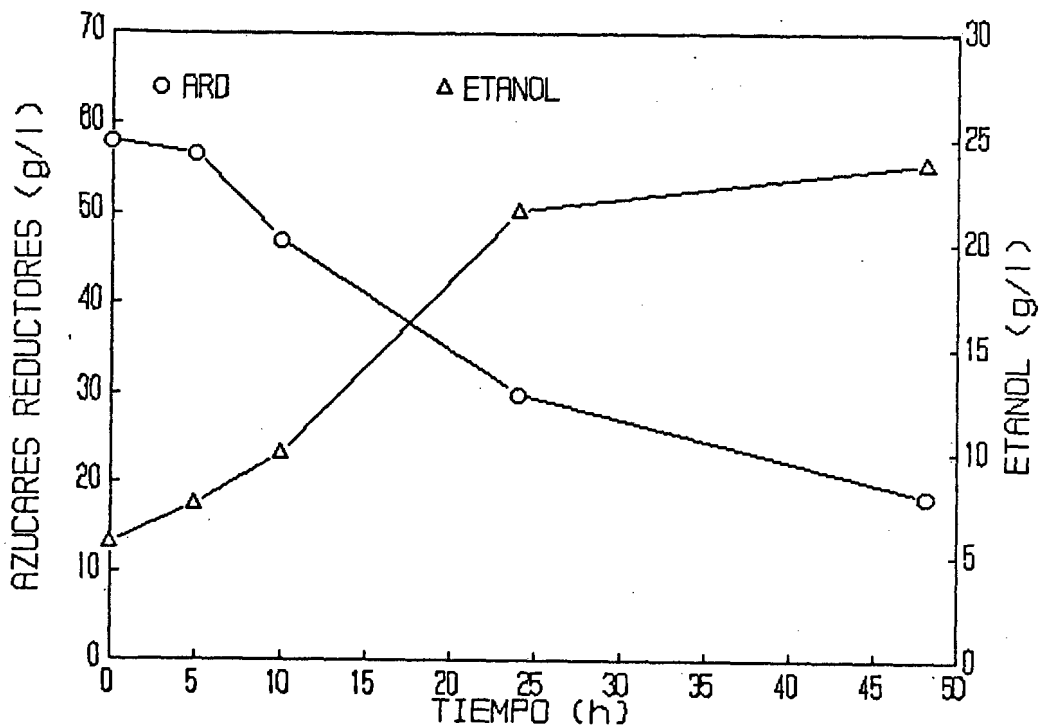


Figura: 10 Producción de alcohol y consumo de azúcares reductores a nivel matraz (35°C; medio M2B).

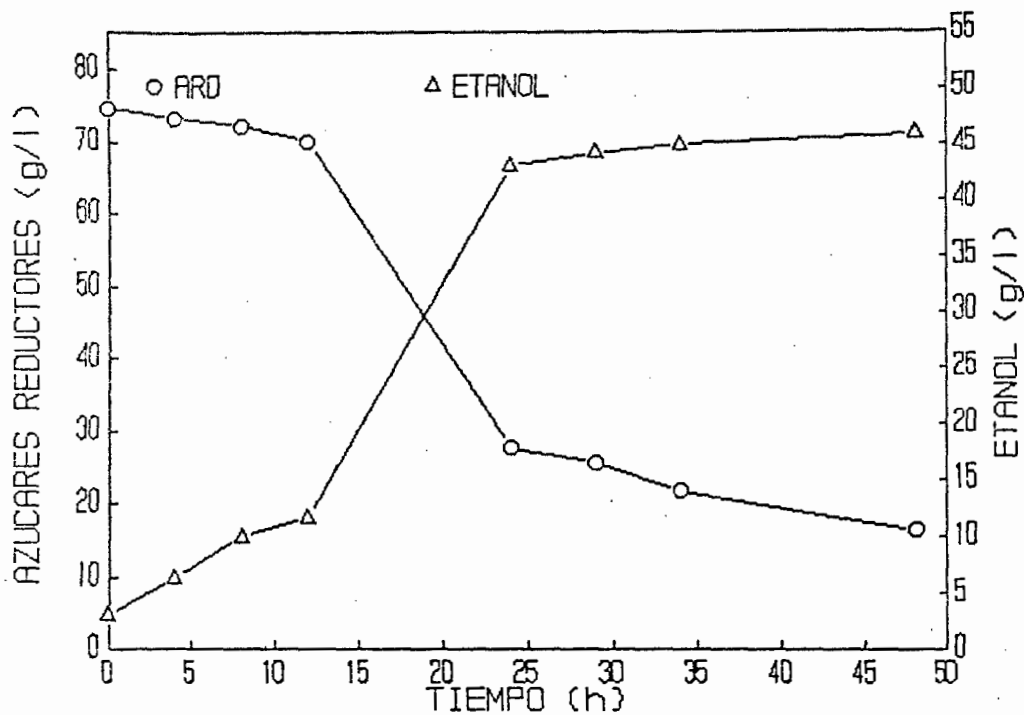


Figura:11 Producción de alcohol y consumo de azúcares reductores a nivel matraz (35°C; medio M3A)!

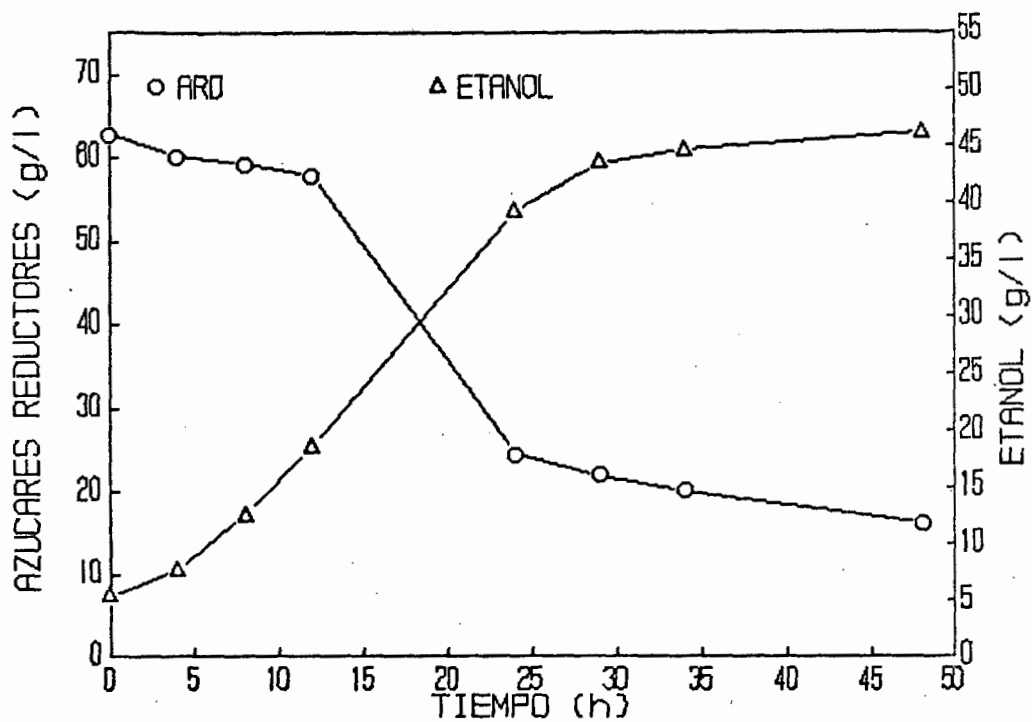


Figura:12 Producción de alcohol y consumo de azúcares reductores a nivel matraz (35°C; medio M3B).

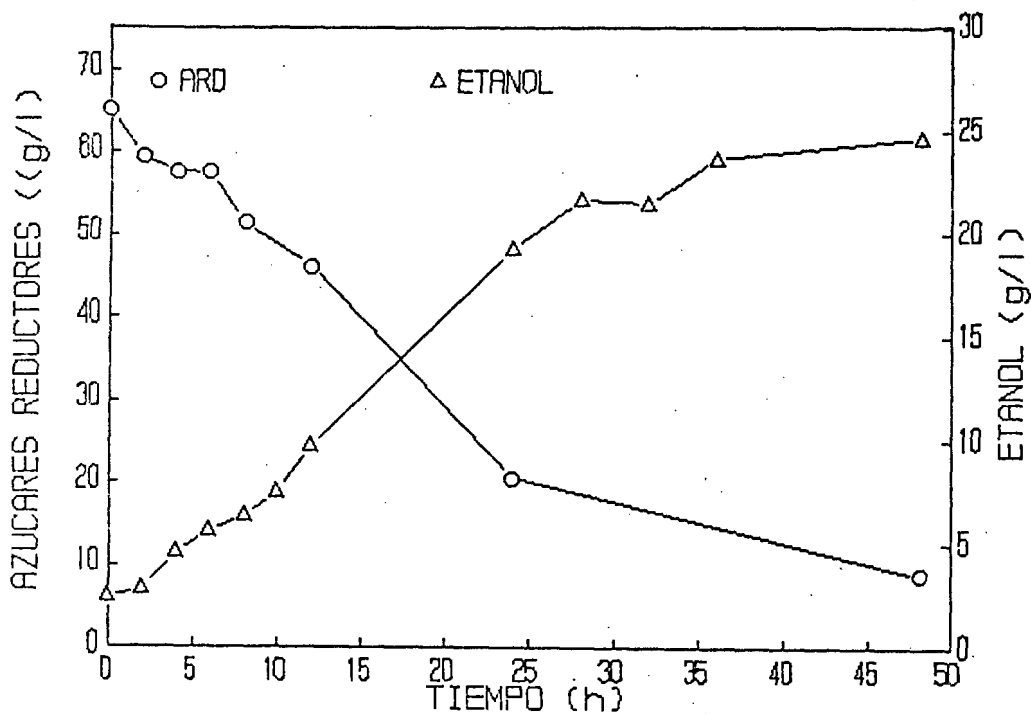


Figura:13 Producción de alcohol y consumo de azúcares reductores a nivel de 10 litros (35°C; medio M1A).

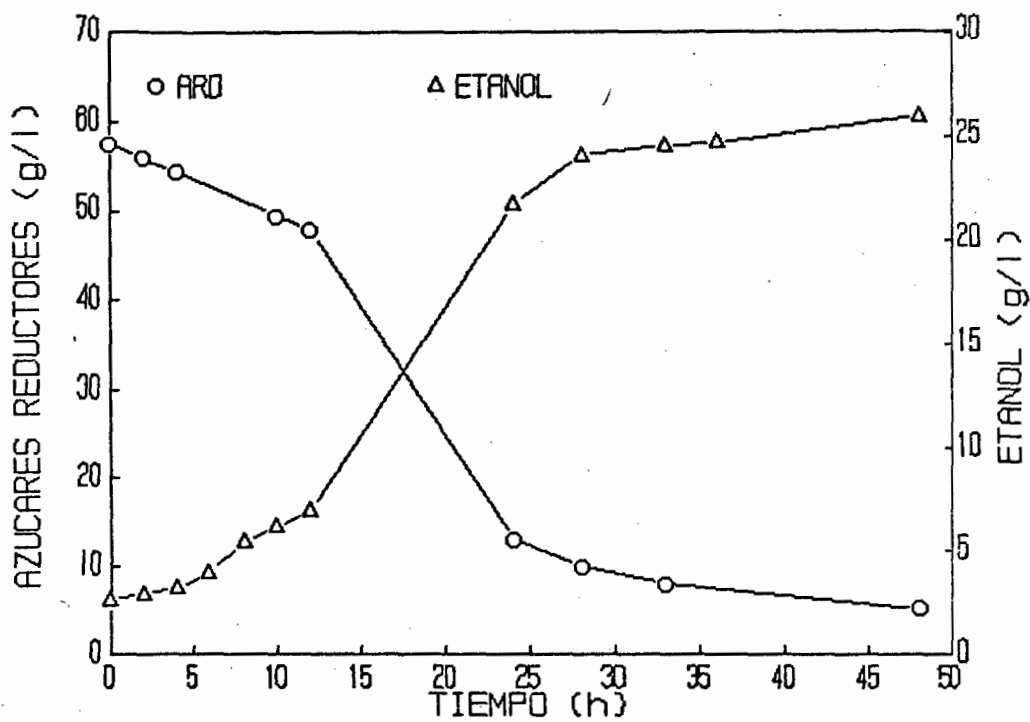


Figura:14 Producción de alcohol y consumo de azúcares reductores a nivel de 10 litros (35°C; medio M1B).

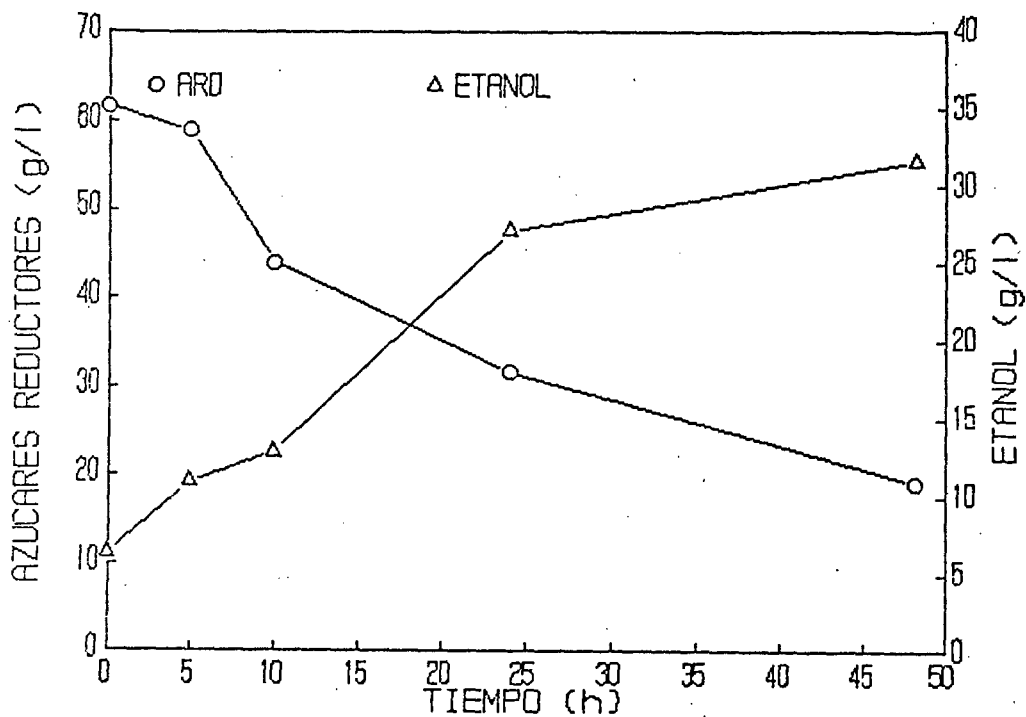


Figura:15 Producción de alcohol y consumo de azúcares reductores a nivel de 10 litros (35°C; medio M2A).

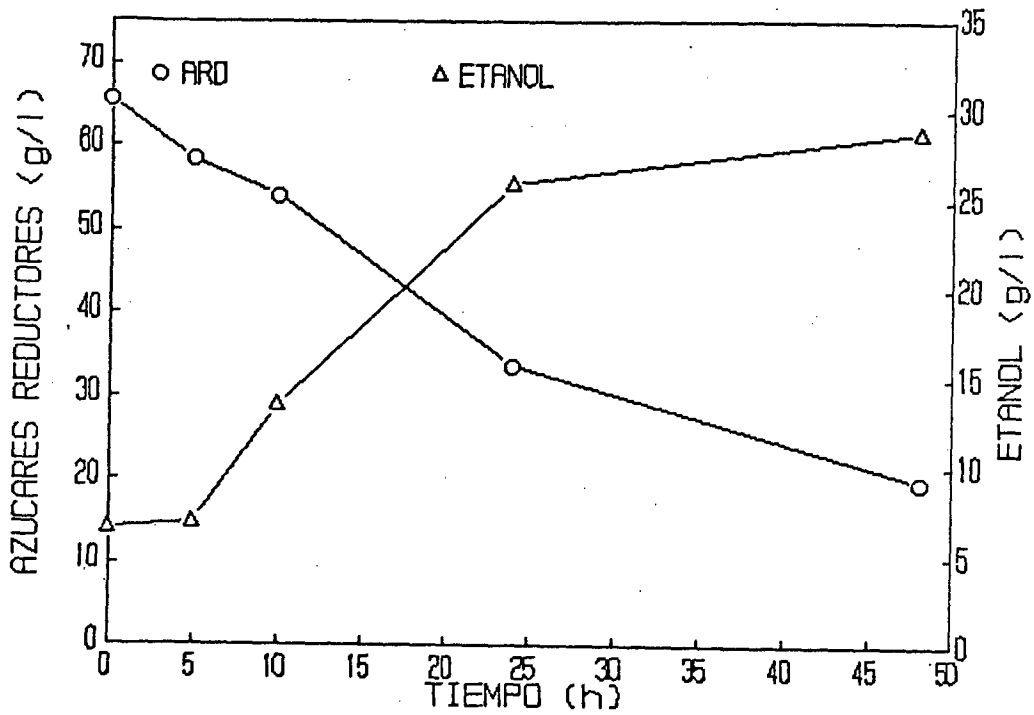


Figura:16 Producción de alcohol y consumo de azúcares reductores a nivel de 10 litros (35°C; medio M2B).

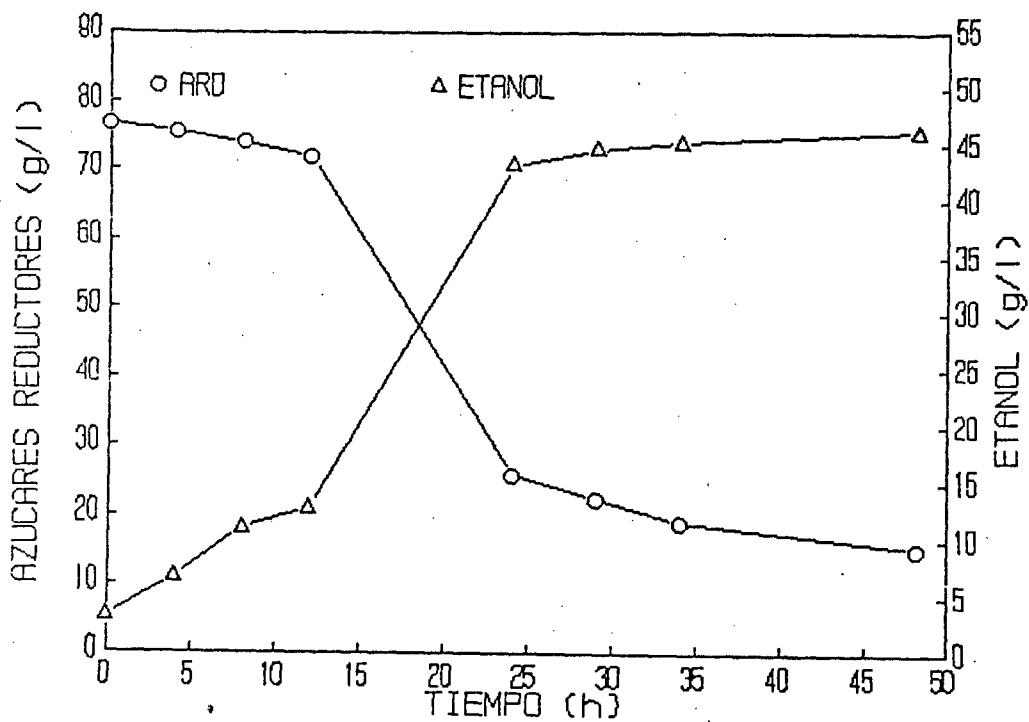


Figura:17 Producción de alcohol y consumo de azúcares reductores a nivel de 10 litros (35°C; medio M3A).

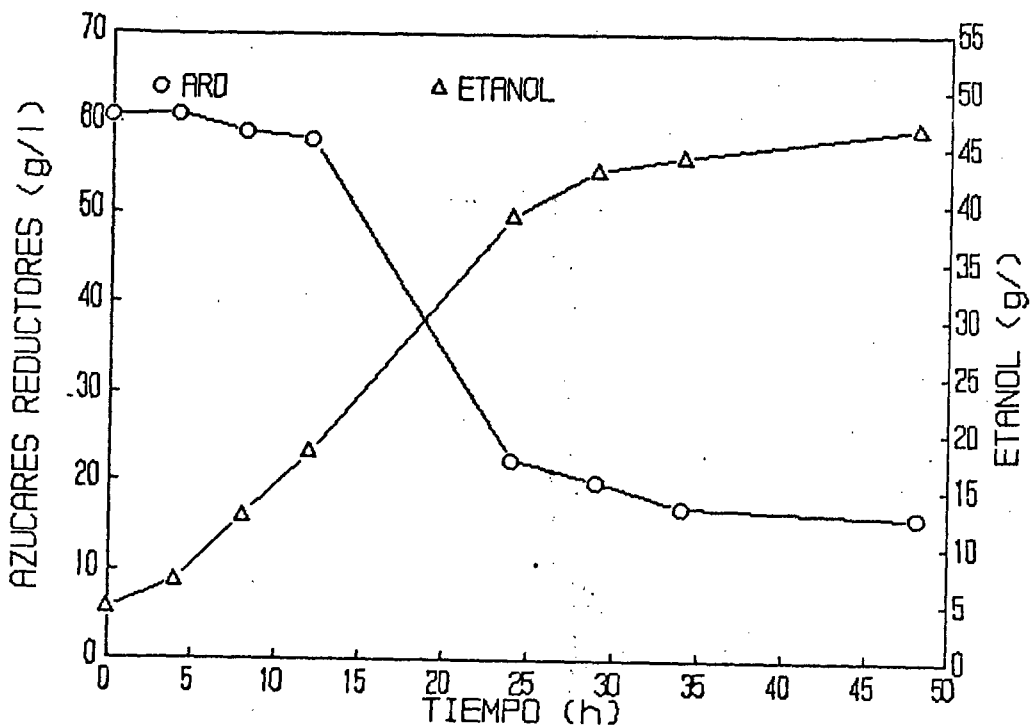
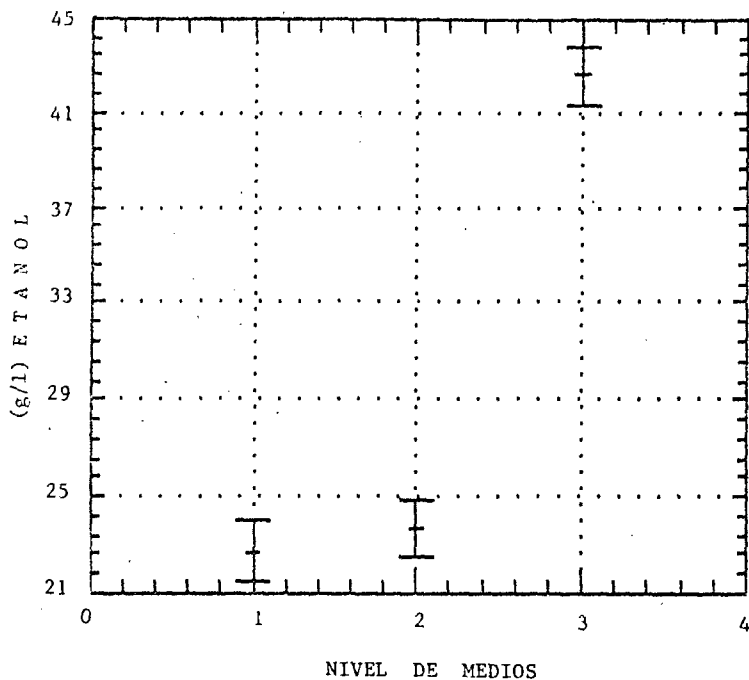
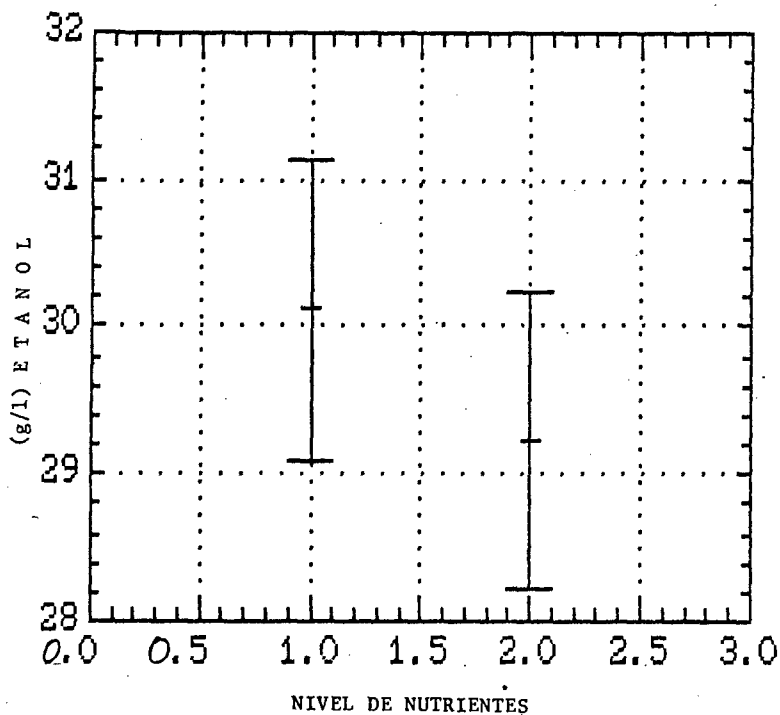


Figura:18 Producción de alcohol y consumo de azúcares reductores a nivel de 10 litros (35°C; medio M3B).



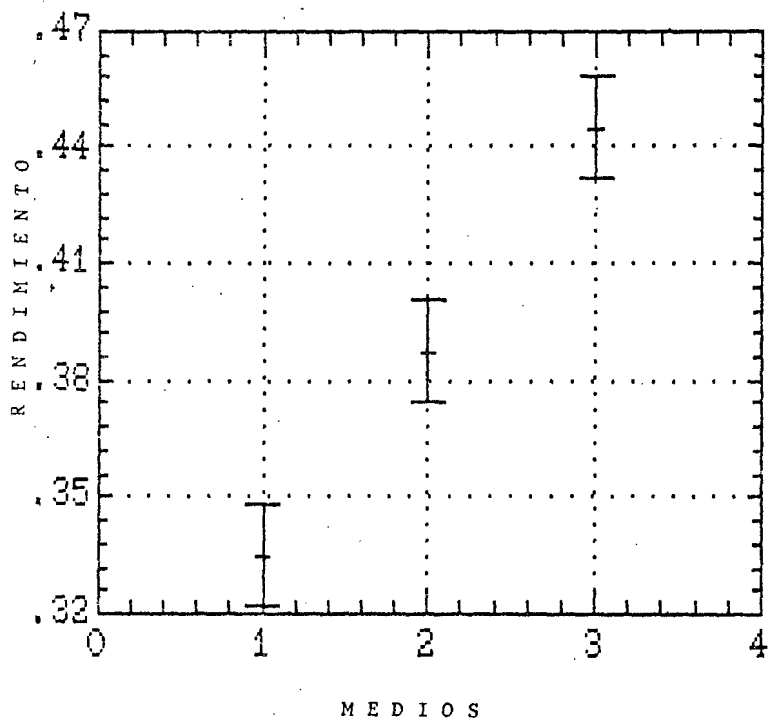
NIVEL MEDIOS	MEDIDA PROBADA	EFECTO ESTIMADO	PROMEDIO DE NIVEL	ERROR ESTANDAR
1	4	-6.92833	22.74500	1.241810
2	4	-5.99833	23.67500	1.241810
3	4	12.92667	42.60000	1.241810

Figura 19. Intervalos de error estandar por factores de promedio de la producción de etanol en nivel de medios.



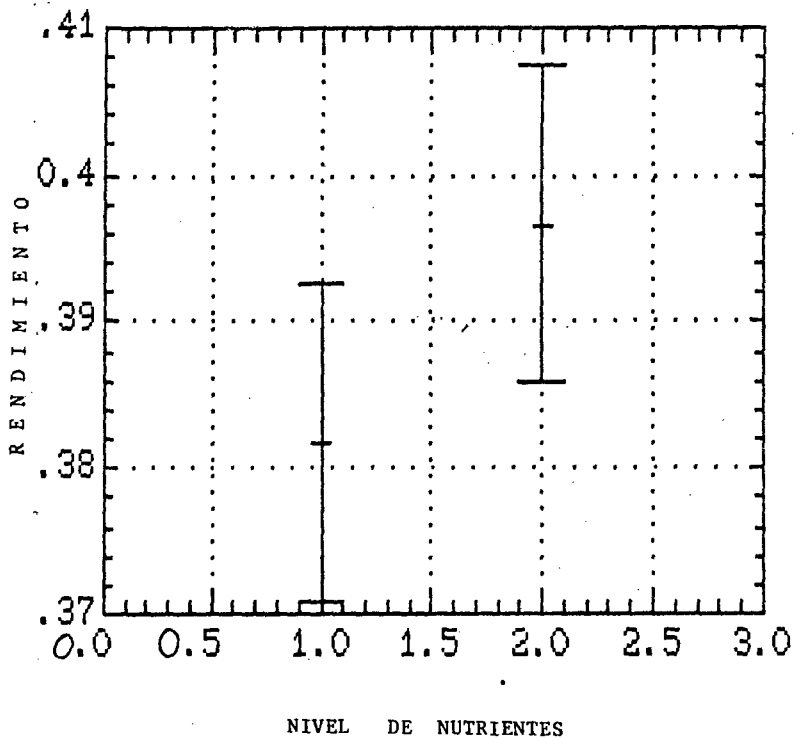
NIVEL NUTRIENTES	MEDIDA PROBADA	EFECTO ESTIMADO	PROMEDIO DE NIVEL	ERROR ESTANDAR
1	6	0.443333	30.11667	1.013933
2	6	-0.443333	29.23000	1.013933

Figura 19a. Intervalos de error estandar por factores de promedio de la producción de etanol en nivel de nutrientes.



MEDIOS	MEDIDA PROBADA	EFECTO ESTIMADO	PROMEDIO DE NIVEL	ERROR ESTANDAR
1	4	-5.41667	0.335000	1.33073
2	4	-1.66667	0.387500	1.33073
3	4	5.58333	0.445000	1.33073

Figura 20. Intervalos de error estandar por factores de promedio del rendimiento (Y_p/s) en nivel de medios.



NIVEL NUTRIENTES	MEDIDA PROBADA	EFECTO ESTIMADO	PROMEDIO DE NIVEL	ERROR ESTANDAR
1	6	- 7.50000	0.381667	1.08653
2	6	7.50000	0.396667	1.08653

Figura 20a: Intervalos de error estandar por factores de promedio del rendimiento ($Y\bar{p}/s$) en nivel de nutrientes.

BIBLIOGRAFIA

XII BIBLIOGRAFIA

Almazán O. 1968. Utilización de los mostos residuales para la producción de levadura de forraje (torula). Revista ICIDCA (sobre los derivados de la caña de azúcar). 2 (2): 17 - 26.

Almazán O.; M. Klibansky & M.A. Otero. 1982. "Producción de proteína unicelular a partir de subproductos de la industria azucarera" Editorial Científico - Técnica. La Habana Cuba.

Amerine M.A. & Ouhg C.S., 1976. Determinación de etanol en el destilado, en: Análisis de vinos y mostos, Ed. Acribia, España. 54 - 59.

Avalos T. 1982. Determinación de las condiciones óptimas para el desarrollo de una levadura utilizada en la elaboración de tequila y para mejorar la eficiencia de fermentación alcohólica. Tesis, Fac. de Ciencias Químicas U de G.

Bebin J. 1988. Depuration biologique of 1, eau, La Recherche 19 (195): 22 - 28.

Blanco g. & Herryman M. 1987. Evaluación económica de la producción de alcohol con diferentes tecnologías. Revista ICIDCA Vol. XXI, No.2 52 - 65.

Cámara de la Industria Tequilera de Jalisco, 1989.

CONACyT. 1980. El petróleo en México y en el mundo. Ciencia y Desarrollo. Segunda edición: 141 - 157.

Costa R.C. & J.R. Castello Branco 1981: Stillage: A resource disguised as a nuisance. Process Biochem. 16 (3): 8 - 12.

Cruger W. & Cruger 1984. Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology. T.D. Brock (Editor), First Edition, Sinauer Associates Inc. : 121 - 126.

Chandler V. J.; F.A. Abruña & J. Lozano 1984. J. Agric. Univ. Puerto Rico. 68 (4): 396 - 403.

Davy, C.A.E.; D. Wilson & J.C.M. Lyon 1981. Commercial production of feed yeast from carbohydrate waste. In "Advances in Biotechnology", Vol.II (M. Moo-Young and C.W. Robinson, Eds) Pergamon Press Canada Ltd. 343 - 350.

De la Torre M.M. & L.B. Flores-Cotera. 1986. Economical and technological prospect for single cell protein products in México. CINVESTAV - IPN. Presented at the Annual Meeting of the Society of Industrial Microbiology. San Francisco, CA.

Deleito, C.J.C. & J.R. Cabrero 1984. La Energía Eólica. Tecnología e Historia. Hermann Blume (Ed): 9 - 26.

Diario oficial, 1988. (Jueves 4 de Agosto).

Dubois M. et al., 1956. Colorimetric Method for Determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28 (3): 350 - 356.

Eder, K. 1976. Tratamiento y aprovechamiento de aguas residuales en fábricas de levadura y alcohol. *Ingeniería química*. 6: 103-111.

Figueroa A.J.F. 1975. Depuración de las vinazas de las destilerías de tequila para evitar la contaminación de los cauces receptores y disposición de los sólidos. Tesis, Fac. de Ciencias Químicas, U de G.

Guzmán, C.M. 1977. Aprovechamiento de los residuos de fermentación de la industria tequilera como complemento de los alimentos balanceados para ganado. Tesis, Fac. de Ciencias Químicas, U de G.

Jackman E.A. 1977. Distillery effluent treatment in the Brazilian National Alcohol Programme. *Chem. Eng. (London)* (319): 239 - 242.

Kar R. & Viswanathan L. 1985. Ethanolic Fermentation by Thermotolerant yeast. *Journal Chem. Tech. Biotechnol.* 35-B No.4 235 - 238.

Kirk, R.E. & D.F. Othmer 1966. Alcohol Industrial. Producción de alcohol. Enciclopedia de la Tecnología Química. UTHEA> Vol.1: 745 - 781.

Lehninger, A.L. 1984. Bioquímica Ed. Omega S.A. Barcelona España. 427 - 449.

Lewicki W. 1978. Production, Application and Marketing of Concentrated Molasses - Fermentation - Effluent (Vinasses). Process Biochem. 13 (6): 12.

Maiorella, B.L.; H.W. Blanch & C.R. Wilke. 1983. Distillery effluent treatment and by-product recovery. Process Biochem. 18 (4): 5 - 8.

Maiorella, B.L.; H.W. Blanch & C.R. Wilke. 1984. Economic Evaluation of alternative ethanol fermentation processes. Biotechnology and bioengineering. Vol. 26: 1003 - 1025.

Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar and alcohol industry. Process Biochem. 10 (9): 33 - 41.

Monteiro C.E. 1975. Brazilian experience with disposal of waste water from the cane sugar and alcohol industry. Process Biochem. 10 (9) 33 - 41.

Moreira, J.R. & J. Goldemberg. 1981. El programa de alcohol en Brasil. *Investigación y Ciencia*, 61: 96 - 104.

Olguín - Palacios, E.J.; P. Télles - Mora & J. González Cárdenas, 1987. Evaluación de algunas alternativas biotecnológicas para la diversificación de la industria azucarera. *Revista de la Asociación de Tecnólogos Azucareros de México*. 1 (2).

Ozuna, A. 1988. Desarrollo de un proyecto de investigación para el tratamiento de vinazas. Ponencia presentada en la I Reunión de autoevaluación del CIATEJ, A.C. Guadalajara, Jal. Abril 1988.

Peraza - Luna F.A. 1988. Producción de levadura forrajera a partir de una mezcla vinaza - melazas por fermentación continua. Tesis de Maestría. CINVESTAV - IPN. México.

Peraza - Luna F.A. et al., 1990. Proyecto riesgo compartido "Enriquecimiento Proteínico de las vinazas".

Pinal Z.L. 1990. Comparación de la producción de alcohol de cuatro cepas de Saccharomyces cerevisiae. Tesis, Fac. de Ciencias U de G.

Quintero, R.R. 1985. Prospectiva de la biotecnología en México. en "Prospectiva de la biotecnología en México". Quintero Ramírez, CONACyT: 461 - 478.

Rodriguez B.I. 1989. Optimización de la producción de etanol en los ingenios de caña de azúcar. Informe Técnico. CIATEJ.

Rose H.A. & Harrison J.S. 1970. The yeast, Yeast Technology, Vo.3 New York.

Sturión C.A. 1988. Tecnología de la Producción de alcohol por fermentación, GEPLACEA. 25 - 38.

Sheehan, G.J. & P.F. Greenfield 1980. Utilization, treatment and disposal of distillery waste water. Water Research. 14 (3): 257-277.

Tamayo C.E. 1984. Estudio microbiológico de levaduras productoras de alcohol, encaminado a obtener una cepa de alto rendimiento. Tesis, UAY Mérida Yucatán.