

16/33

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

INHIBICION DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA EN MELAZAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA

MANOLA AGUIRRE CARRETERO

7

MEXICO, D.F.

1 9 7 4



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tesis
CATEGORIA
ABO
FECHA 1974
PROC. H. + S



QUÍMICA

PRESIDENTE: Enrique García Galeana

VOCAL: Angela Sotelo López

SECRETARIO: Alfredo Echegaray Alemán

1er. SUPLEMENTE: Jorge Soto Soria

2do. SUPLEMENTE: Ruben Berra García

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: Instituto Nacional de Investigaciones
Pecuarias.

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUSTENTANTE: Manola Aguirre Carretero

I - INTRODUCCION

INHIBICION DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA EN MELAZA

En el proceso industrial para la extracción de azúcar incristalizable, el principal subproducto es la melaza comercial, líquido denso y viscoso, de color obscuro. Debido a su composición rica en carbohidratos (sacarosa y azúcares reductores), la melaza tiene diferentes usos, siendo el principal el de su incorporación a dietas alimenticias del hombre y los animales, llegando, por ejemplo en los E.U.A., a destinarse dos terceras partes de su producción a este concepto; por esta razón, ha sido ampliamente estudiada la utilización de la melaza en la nutrición animal. A nivel industrial, la melaza es materia prima para la obtención de alcohol etílico, ron, acetona, 1-butanol, ciertos ácidos orgánicos y otros productos.

México es uno de los 10 primeros productores de melaza en el mundo (Cuadro 1); sin embargo, sólo una pequeña proporción de las mieles incristalizables son usadas en la industria pecuaria (Cuadro 2). Hay varias causas para que esto suceda, siendo sin duda una de las más importantes, los trámites de tipo fiscal que se requieren para la compra libre de melaza. Estos trámites, que son regulados por la Secretaría de Hacienda y Crédito Público a través de su Dirección General de Impuestos Interiores, tienen por objeto asegurar que la distribución haga que el subproducto llegue al ganadero o industrial, para que la incluya en dietas o alimentación directa del ganado y no vaya a manos irresponsables que elaboren alcohol en forma clandestina.

CUADRO 1

PAISES PRODUCTORES DE MELAZA (PRODUCCION 1971/72)*

País	Cantidad**	Tipo
Unión Soviética	2.9	Remolacha
Mercado Común Europeo	2.5	Remolacha
Brasil	1.8	Caña
E.U.A.	1.6	Caña/Remolacha
India	1.4	Remolacha
Cuba	1.3	Caña
México	1.04	Caña
Filipinas	0.84	Caña
China	0.77	Caña/Remolacha

* Fuente: F.O. Lichet's International molasses report

** Millones de toneladas métricas

CUADRO 2

TONELADAS DE MELAZA (ZAFRA 1973)*

Utilización

Elaboración de alcohol	200,000.00
Consumo nacional	280,000.00
Exportación	794,057.00
Total	1,274,057.00

TONELADAS DE MELAZA (CONSUMO NACIONAL 1973)

Usos:

Ganadería y alimentación animal	196,000.00
Alcoholes especiales y aguardiente	56,000.00
Levaduras	16,800.00
Usos industriales	2,800.00
Total	271,600.00

* Fuente: Unión Nacional de Productores de Azúcar, S.A.

Con el objeto de facilitar los trámites, se podría pensar en la inclusión de aditivos a la melaza que, inhibiendo la fermentación alcohólica, hagan incosteable la elaboración de alcohol.

El propósito del presente trabajo es estudiar el efecto inhibitor de algunas sustancias químicas, sobre la fermentación de las melazas a diferentes concentraciones y grados de acidez, así como evaluar desde un punto de vista económico, su posible adición para hacer factible una mayor distribución de la melaza, lo que redituaría en un abastecimiento de los costos de la producción pecuaria.

II GENERALIDADES

1.- La melaza (jarabe de purga o jarabe incristalizable) es el subproducto (o producto final) de la fabricación o de la refinación del azúcar cruda. Es el líquido denso viscoso que se separa de la masa cocida final de baja calidad y del cual no se puede cristalizar más azúcar por los métodos usuales.

La Asociación Norteamericana de Funcionarios de Control de la Alimentación (AAFCO) define a la melaza de caña para la alimentación de ganado, como un "subproducto de la fabricación de azúcar de caña y deberá contener el 48% o más de su total de azúcares, en forma de azúcar invertido. Su solución en un peso igual de agua, deberá indicar no menos de 39.75°Brix".

Las melazas comerciales de caña, son las llamadas melazas negras o prietas. Se da particularmente esta denominación a las melazas finales de la producción de azúcar de caña. El guarapo purificado se concentra en un sistema de evaporadores y se traslada a una caldera de vacío de simple efecto, en la que aumenta su concentración y se forma una magma (masa cocida) saturado de azúcar. El jarabe separado de los cristales por la acción de la fuerza centrífuga se llama melaza A o primera melaza centrífuga, y se recuece en la caldera de vacío, para obtener nueva cosecha de cristales. El líquido madre de esta cristalización es la melaza B o segunda melaza centrífuga. El líquido madre que queda de la tercera cristalización, es la melaza final o melaza negra (3, 9).

La composición de las melazas procedentes de la caña de azúcar, varía según las localidades, la clase de caña, las condiciones de suelo, el clima y los métodos de fabricación. La gama amplia de las melazas que salen de las centrífugas, tendrán de 85 a 92°Brix, o sea aproximadamente 77 a 84 sólidos por desecación (3, 9).

La mayor parte de los no-azúcares contenidos en la melaza son los que existen en el jugo del cual se obtiene y representan compuestos nitrogenados como ácido aspártico, glutámico, lisina y alanina, así como también ácido málico, cítrico y vitaminas, etc., aunque todo esto en pequeñas proporciones; además, una parte de la sacarosa y los azúcares reductores. El contenido de sacarosa varía entre 25 a 40% y los azúcares reductores entre 35 y 12% (cuya mayor parte está dada por dextrosa y levulosa); y la suma de los dos (azúcares totales) será de 50% o más (3, 9).

Las melazas de caña son ligeramente ácidas, con un pH de 5.5 a 6.5; esto es atribuible a los ácidos alifáticos presentes y al bajo pH en que se hace la clarificación.

La materia mineral o ceniza presente en la melaza varía entre 12 y 15%, en donde el 40% está dado por potasa y entre el 10 y 20% por Cal; los fosfatos, suelen ocupar el tercer lugar y las sales de magnesio, los cloruros, la sílice, óxidos y fosfatos de sodio, aluminio y fierro, componen el resto.

Acido benzoico y benzoato de sodio (3).

Una gran parte de todo el ácido benzoico que se fabrica (incluyendo el que se vende en forma de benzoato de sodio) se utiliza como inhibidor de la proliferación de microorganismos; esto es: como agente preservativo en alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos. En general, el ácido benzoico y el benzoato de sodio son más útiles en la conservación de los productos alimenticios ácidos, con un contenido relativamente elevado de humedad, no sometidos durante su preparación a temperaturas elevadas. Esta clase de productos alimenticios comprende los jugos de frutas, los jalebes, las bebidas hechas con frutas, las mermeladas, jaleas y compotas, las salsas y los encurtidos.

El ácido benzoico y el benzoato de sodio se usan comúnmente en la preparación de la oleomargarina y se emplean para preservar los productos marinos, a menudo con la ayuda de hielo o sal. Una aplicación típica en este campo es la preservación de los filetes de pescado envolviendo cada filete en una cubierta que ha sido tratada con sal y benzoato de sodio.

El interés en la farmacología del ácido benzoico se despertó al descubrirse que este ácido está relacionado químicamente con el ácido hipúrico. Se sabe que en el hombre la mayor parte del ácido benzoico ingerido se excreta en la orina en forma de ácido hipúrico, pero que no existe ninguna relación cuantitativa sencilla entre el ácido benzoico tomado y el ácido hipúrico formado.

Los benzoatos se utilizan en Medicina, aunque mucho menos que hace algunos decenios.

La actividad bactericida y bacteriostática de los benzoatos se afecta en grado notable por los cambios en la concentración del ion hidrógeno del medio. Por ejemplo: la solución de ácido benzoico de 0.11% mata el Staphylococcus aureus con un pH de 3.5, mientras que se necesita una concentración superior a 9% para matar el mismo organismo en un pH de 7.0. Pruebas análogas hechas sobre una levadura del vino demostraron que el ácido benzoico es casi 100 veces más activo en soluciones fuertemente ácidas que en solución neutra.

El Index Merck (10), da las siguientes características para el Benzoato de sodio:

$C_7H_5NaO_2$; peso molecular 144.11; Pureza menor de 99%; Polvo cristalino blanco o gránulos de olor tenue; sabor dulce y astringente.

Un gramo se disuelve en 1.8 ml. de H_2O , o en 1.4 ml. de agua hirviendo, en cerca de 75 ml. de alcohol y en 50 ml. de una mezcla de 47.5 ml. de alcohol y 3.7 ml. de agua. La solución acuosa, es levemente alcalina al papel tomasol, con un pH de 8 aproximadamente. Presenta incompatibilidad con ácidos y sales férricas.

Sus principales usos son como preservativo, especialmente para productos alimenticios, en donde no más que 1 en 1,000 es permitido. Su efecto preservativo es mayor en medio ligeramente ácido; en medio alcalino es casi inactivo. DL_{50} oral en ratas es 4.1 g/kg.

Acido sórbico y sorbato de potasio (3).

El uso principal del ácido sórbico es como agente inhibidor del desarrollo de mohos en los alimentos. Este uso ha sido patentado, y recientemente se han hecho amplios estudios sobre su eficacia en varios alimentos y sobre su toxicidad, metabolismo, mecanismo de la acción fungistática, destino en los alimentos, métodos de aplicación y métodos de determinación en los alimentos.

El ácido sórbico debe su poder fungistático a su estructura no saturada. Una reacción vital para el desarrollo de los mohos en presencia de ácidos grasos es la deshidrogenación de estos ácidos con producción de compuestos no saturados. La reacción se efectúa por un sistema enzimático deshidrogenante y es inhibida por el exceso de los productos deshidrogenados. Así, cuando hay ácido sórbico, se inhibe la reacción enzimática a causa de la estructura no saturada del ácido. El ácido sórbico inhibe el desarrollo de la mayoría de los hongos y de algunas de las bacterias que acompañan a los alimentos en des-

composición. No mata los microorganismos, pero impide su desarrollo. Las materias alimenticias en las cuales se ha mostrado eficaz su uso son: los quesos, alimentos horneados, productos cítricos, ensaladas, jugos de frutas, jarabes, encurtidos, margarina, carnes, aves y pescado. Es útil también en ciertos productos farmacéuticos y cosméticos. El ácido sórbico es generalmente de mayor eficacia que otras sustancias químicas preservativas de los alimentos, tales como benzoatos y propionatos, y comunica menos olor y sabor, en parte porque se necesita menor proporción de sustancia. Tiene de común con los otros agentes que su eficacia es mayor en pH inferior a 6. La concentración de ácido sórbico que se requiere para una protección efectiva oscila entre 0.02 y 0.2% en peso de alimento.

La toxicidad del ácido sórbico es la tercera parte de la del benzoato sódico. Los estudios realizados sobre la alimentación han mostrado que se transforma completamente en anhídrido carbónico y agua en el organismo humano, de igual manera que los ácidos grasos de los alimentos. Muchos datos farmacológicos han demostrado la inocuidad del ácido sórbico incorporado a los materiales de envase, de los que emigra realmente al alimento envasado. La administración de alimentos y medicamentos considera el ácido sórbico como un aditivo inofensivo. Puede utilizarse en los alimentos no sujetos a las normas federales de identidad y no hay objeción al uso adecuado en ciertos alimentos sujetos a dichas normas. La Administración de Alimentos y Medicamentos ha aumentado recientemente sus definiciones y normas de identidad para una gran variedad de quesos y hoy permite el uso de ácido sórbico como preservativo hasta 0.2% y advierte que no pone objeción al uso de 0.3% en pastelería.

Según el Index Merck, el Sorbato de potasio (10) es una sal potásica del ácido sórbico: sal potásica del ácido 2, 4 hexadienoico, 2, 4 hixadienodato de potasio.

$\text{CH}_3\text{CH} = \text{CHCH} = \text{CHCOOK}$; peso molecular 150.22; $\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$; se prepara a partir de ácido sórbico y KOH.

Cristales con solubilidad en agua a $20^\circ\text{C} = 58.2\%$ y en alcohol 6.5% se utiliza como inhibidor para hongos y levaduras. Es de baja toxicidad en humanos, pudiendo causar leve irritación de la piel.

Lauril sulfato de Na. Dodecil sulfato sódico (10).

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}$, peso molecular 288.38. $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$; se prepara por sulfatación de alcohol laúrico, seguida por neutralización con carbonato de sodio. En forma comercial, es una mezcla de sulfatos alcalinos de sodio y lauril sulfato de sodio, predominando este último su forma física.

Es de cristales, hojuelas o polvo de color blanco o crema. Con ligero olor a sustancias grasas y terso al tacto, presenta reacción neutra. Un gr. de lauril sulfato de sodio se disuelve en 10 ml. de H_2O , dando una solución apalescente. Baja la tensión superficial de soluciones acuosas y emulsifica a las grasas.

Usos: El lauril sulfato de sodio se ha usado como agente humectante y como detergente especialmente en la industria textil. Puede usarse en agua dura. Es ingrediente de las pastas de dientes.

III MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias.

1.- Melaza y levadura.

La melaza utilizada en el experimento fue proporcionada por la Unión Nacional de Productores de Azúcar, S.A. (UNPASA) como una muestra al azar, de las diferentes melazas existentes al momento de iniciarse el trabajo. Del lote original, se tomaron porciones de 2 kgs. a fin de ajustar el pH óptimo de fermentación (4.5) y de estos, se obtuvo el material experimental para ser usado con los inhibidores.

La levadura utilizada fue Saccharomyces cerevisiae proporcionada por UNPASA.

2.- Inhibidores:

Los inhibidores incluidos fueron: Benzoato de sodio (MAC-1), Sorbato de potasio (MAC-2), Lauril sulfato de sodio (MAC-3). También fueron probadas las mezclas de los inhibidores en relación 1:1 o sea: Benzoato + Sorbato (MAC-4), Benzoato + Lauril sulfato (MAC-5) y finalmente, se probó ácido sórbico (MAC-6). Las claves entre paréntesis se usaron posteriormente, para referimos a cada inhibidor con mayor facilidad.

3.- Análisis químico de la melaza.

Las determinaciones químicas realizadas en la melaza fueron basadas en las técnicas descritas por Spencer (1963) y A.O.A.C. (1970).

3.1. Determinación de pH (Spencer, 1963).

Ya que no es posible determinar el pH a través de técnicas colorimétricas en materiales oscuros como la melaza, se utilizan métodos electrométricos. Por lo anterior, se determinó con un potenciómetro Beckman Zeromatic.

3.2. Densidad, sólidos totales y humedad (Spencer, 1963).

En la industria azucarera, el término densidad suele usarse como sinónimo del término peso específico. La densidad es la masa por unidad de volumen, expresada en gramos por mililitro referidos a agua a 4°C, siendo esta temperatura la del agua a su máxima densidad.

El peso específico es la relación entre masas de volúmenes iguales de la sustancia y de agua, a temperatura estándar. Cuando los pesos se determinaron al vacío, la cifra es el peso específico "verdadero"; si los pesos se determinan a presión atmosférica, la cifra representa el peso específico "aparente".

Los instrumentos para medir la densidad que se utilizan en el trabajo azucarero son el areómetro, la balanza de Westphal y el picnómetro. De éstas, el areómetro es el más común y la escala más usada, es la de Brix. Por lo tanto, la determinación de la densidad de la melaza se realizó por medio de areómetro, con escala Brix.

El grado Brix de una solución des~~u~~acarosa es el porcentaje, por peso, del azúcar puro disuelto en ella; pero en la industria azucarera se suele considerar que el Brix, es el porcentaje de materia sólida por peso, sea azúcar o no, lo que contenga la solución. Esta consideración implica que los sólidos no sacarinos, poseen la misma gravedad específica que el azúcar de caña. Respecto a los carbohidratos, esto es prácticamente cierto,

pero dista mucho de serlo respecto a las sales inorgánicas que están asociadas con los azúcares de las melazas. Estas sales, cuya densidad específica es más elevada en comparación con la de los carbohidratos, influyen en grado notable en las determinaciones de la densidad. Los no azúcares orgánicos, también poseen densidades específicas mayores a la del azúcar. Es evidente que hay que aceptar con cautela los valores del Brix de las melazas y hacerlo para fines de comparación, en condiciones similares de trabajo.

Por lo anterior, se utilizó el valor del Brix para el trabajo realizado en el laboratorio por el método del doble dilución, aunque el valor de sólidos totales de la melaza original, fue determinada por desecación al vacío. Por diferencia, se calculó la humedad.

3.3 Determinación de Cenizas (A.O.A.C., 1970).

La ceniza fue determinada como ceniza sulfatada, para lo cual se pesan de 2 a 5 g de la melaza en un crisol tarado de platino. Se humedece la muestra con 5 ml. de H_2SO_4 al 10% y se calienta hasta carbonizar. Posteriormente, se coloca en una mufla a $525^{\circ}C$ hasta quemar la materia orgánica. Se deja enfriar y se añaden unas cuantas gotas más de H_2SO_4 , para calentarse a $525^{\circ}C$ hasta peso constante. Se expresa como porcentaje del peso de la ceniza, en relación al peso de la muestra.

3.4. Determinación de sacarosa y azúcares reductores (A.O.A.C., 1970).

La determinación de estos azúcares se realizó por métodos químicos, ya que son más ventajosos cuando se usan en materiales que contienen una proporción moderada de sacarosa y una cantidad apreciable de azúcares reductores, como ocurre con la melaza. En estos casos, los métodos ópticos no pueden lograr más que resultados moderadamente precisos.

El método seguido para la determinación de azúcares totales en la melaza, fue el método volumétrico (volumen constante) de Lane - Eynon, el cual se basa en la propiedad de los monosacáridos y algunos disacáridos, de reducir en medio alcalino, el cobre en estado cúprico a óxido cuproso y por esto, reciben el nombre de azúcares reductores. La determinación de estos, se realizó por medio de la precipitación del cobre presente en las soluciones de Soxhlet (modificación a la solución Fehling) y el cálculo de azúcares reductores, se informa como azúcares invertidos.

La determinación de sacarosa se realizó a través de los pasos siguientes: Primero, determinando los azúcares reductores como azúcares invertidos ya presentes; segundo, la inversión de la sacarosa por hidrólisis con ácido y finalmente, la determinación del total de azúcares reductores como invertidos. La sacarosa se determina por la diferencia entre el contenido de invertidos, antes y después de la inversión.

4.- Preparación del mosto, fermentación y determinación de alcohol.

El pH original de las melazas tuvo un rango entre 5.5 y 6, por lo que se ajustó a 4.5, usando H_2SO_4 , el cual es considerado como pH óptimo para la fermentación (7).

Con las melazas en estas condiciones, se formaron lotes para ser expuestos a diferentes inhibidores y a diferentes concentraciones de éstos. A cada lote, se le determinó la cantidad de sólidos disueltos, por medio de un areómetro con escala en grados Brix y por el método de doble dilución. En cada caso, se tomó la cantidad de melaza necesaria para preparar soluciones a 20°Brix, lo cual da la concentración óptima para la fermentación.

A las soluciones anteriores, se les adicionaron como nutrientes básicos en la fermentación, nitrógeno, fósforo, en formas de sulfato de amonio y fosfato de sodio, a una concentra-

ción de 0.1 g y 0.05 g por cada cien gramos de mosto, respectivamente.

De los mostos así preparados, se tomaron por duplicado 100 ml. y se les agregó 0.5 g de Saccharomyces cerevisiae. Se incubaron en una estufa a 28°C, la cual es la temperatura óptima* y se mantuvieron durante 48 horas, siendo este un punto intermedio entre el tiempo óptimo de fermentación, el cual ocurre entre 36 y 60 horas.

En forma similar, se trabajaron también muestras testigos que sirvieron de patrón de comparación, a las muestras tratadas con los inhibidores.

De las muestras fermentadas anteriores, se tomaron 20 ml., a los que se les adicionó una cantidad igual de H₂O. Posteriormente, fueron destilados 20 ml., en los que fue cuantificado el alcohol etílico, por medio de cromatografía de gases.

5.- Análisis Estadístico.

El análisis estadístico de los resultados se realizó por el método de regresión y correlación (Steel y Torrie, 1960) utilizando el sistema SAS (Statistical Analysis System) de la Universidad de Carolina del Norte (Barr y Goodnight, 1972). La computación electrónica, se realizó en una máquina IBM-360-20 del Centro de Cálculo Electrónico del Colegio de Postgraduados, E.N.A., Chapingo.

* Temperatura recomendada por UNPASA, para la cepa de S. cerevisiae proporcionada.

IV RESULTADOS Y DISCUSION

1.- Análisis Químico de la melaza.

En el Cuadro 3 se muestran los resultados del análisis físico-químico de la melaza utilizada en el presente trabajo. Estos resultados son promedio de todos los lotes utilizados en cuanto a los valores de pH y Densidad; sin embargo, sólo se obtuvieron las demás determinaciones, por triplicado. Como se puede notar de estos resultados, los valores obtenidos corresponden a los rangos indicados para las melazas por diferentes autores (6).

2.- Inhibición.

En el Cuadro 4 se muestran los valores obtenidos, en términos del porcentaje de alcohol etílico expresado en volúmen, para cada inhibidor y bajo diferentes concentraciones. El porcentaje, se expresa en base a la cantidad de alcohol obtenido en las muestras testigos, cuyo valor de 100% se muestra en el primer renglón del cuadro (Concentración 0).

A fin de hacer patente la reducción de alcohol obtenida con los diferentes inhibidores y en las distintas concentraciones, se preparó la Gráfica 1 en donde se puede notar el efecto inhibidor franco a partir de concentraciones superiores a 0.3 g% en melaza, a pH 4.5.

Con objeto de precisar el punto de inhibición óptimo, se probaron los tres inhibidores más costeables (MAC-1, MAC-3 y MAC-5) a rangos de 60 mg %. Esto se realizó para encontrar las concentraciones que eviten la fermentación alcohólica, hasta cantidades de alcohol poco atractivas para el productor clandestino. Estos valores se muestran en el Cuadro 5, del cual se obtuvo la Grá-

CUADRO 3

ANALISIS FISICO-QUIMICO DE LA MELAZA UTILIZADA EN EL PRESENTE TRABAJO

pH	Densidad en grados Brix	Azúcares reduc- tores directos %	Sacarosa %	Azúcares totales como invertidos %	Cenizas sulfatadas %	Sólidos totales por desecación %	Humedad por diferen- cia %
5.6	89.30	19.30	38.82	58.12	12.41	74.00	26.00

CUADRO 4

PORCIENTO DE ALCOHOL ETILICO, EXPRESADO EN VOLUMEN, PARA CADA INHIBIDOR Y A DIFERENTES CONCENTRACIONES

Concentración g % <u>1/</u>	Benzoato de sodio (MAC-1)	Sorbato de potasio (MAC-2)	Lauril sulfato de sodio (MAC-3)	Benzoato + sorbato (MAC-4)	Benzoato + lauril (MAC-5)	Acido sórbico (MAC-6)
Testigo: 0	100 (26) <u>2/</u>	100 (26)	100 (26)	100 (26)	100 (26)	100 (26)
0.1		93.05 (4)				90.56 (4)
0.2					81.63 (6)	
0.3	10.31 (20)	12.14 (10)	25.95 (6)	13.22 (10)	13.27 (6)	13.03 (4)
0.5	5.84 (4)	9.98 (5)	18.22 (14)			4.72 (4)
0.6			6.84 (10)			
0.7	6.06 (4)		5.26 (6)			
1.0			10.84 (10)	4.81 (4)		
3.0			4.14 (8)			

pH 4.5

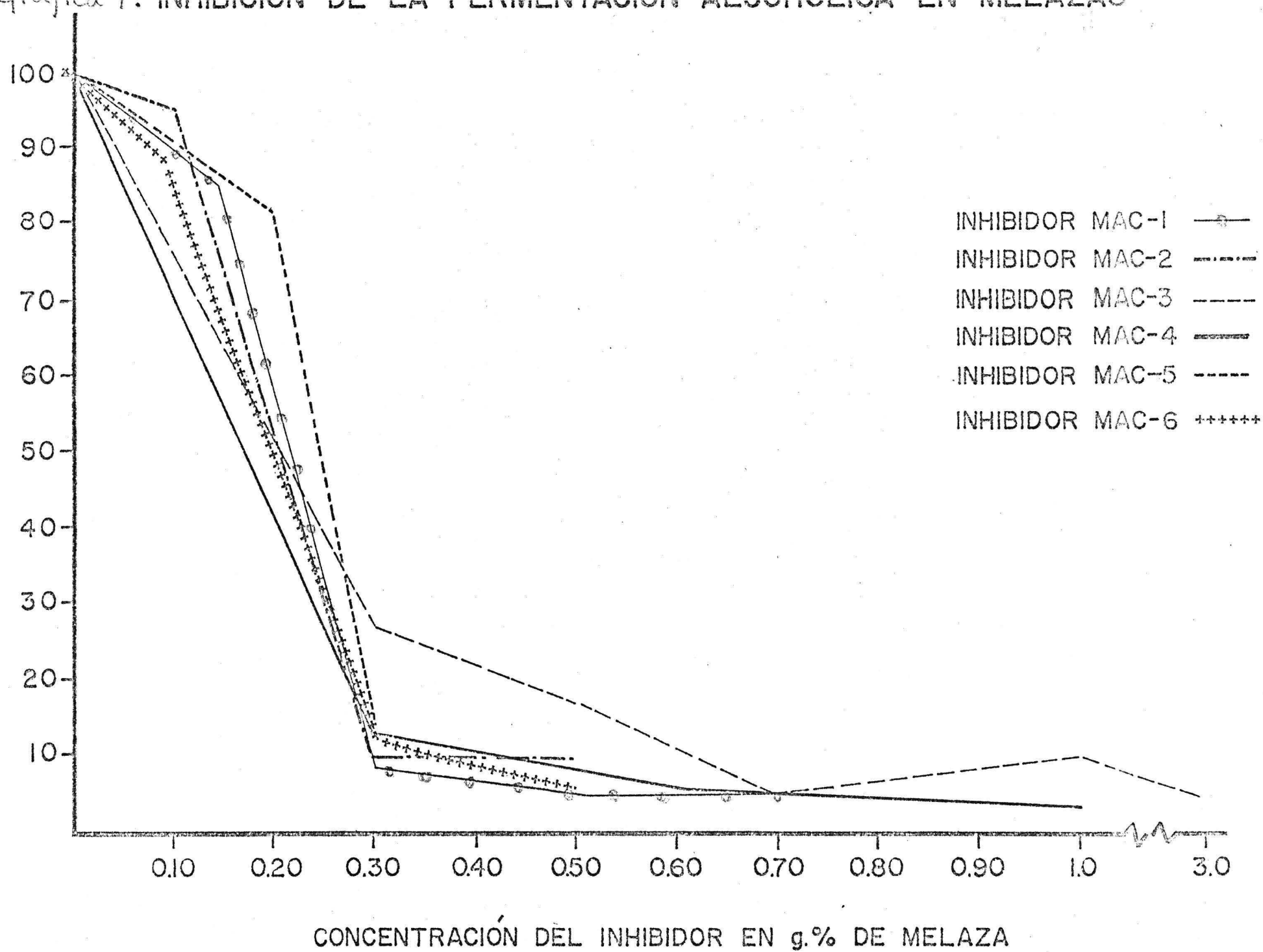
Tiempo de fermentación, 48 horas

Temperatura de fermentación 28°C

1/ Las concentraciones de los inhibidores están dados en g % en melaza; 100 porciento de alcohol representa 5.34 ml. de alcohol en 100 ml. de mosto.

2/ Entre paréntesis el número de observaciones.

% DE ALCOHOL ETILICO



fica 2. Analizando esta información se puede ver que con la concentración de 0.24 g% de los tres inhibidores, se logra un porcentaje de alcohol entre 39 y 50% (Inhibición de 50 a 61%); con la concentración de 0.3 g% se logra una inhibición entre el 82 y 92%, ya que la producción de alcohol sólo fue de entre 8 y 18%.

Existe información bibliográfica (3, 4, 8, 10) referente al mayor efecto inhibidor del Benzoato de Sodio (MAC-1) cuando se acidifica el medio. Con el propósito de estudiar este efecto así como el de cuantificar la inhibición resultante a diferentes tiempos de fermentación (48 y 72 horas), se analizaron mostos ajustados a pH 3.5, con diferentes concentraciones del MAC-1. En esta forma, además, se pueden comparar los resultados obtenidos a través de las técnicas descritas con los reportes de la bibliografía. La respuesta a la inhibición, bajo estas condiciones, se muestra en el Cuadro 6. Se puede apreciar que, aumentando la acidez a pH 3.5, la concentración de 0.10 g% logró una inhibición comparable a la alcanzada con 0.3 g% a pH 4.5 (Cuadros 4 y 5), debiéndose esto a una mayor formación de ácido benzoico. Sin embargo, considerando que el productor de alcohol usara el pH entre 4 y 5, resulta más útil la concentración de 0.3 g% de Benzoato de sodio, a pH 4.5.

Al comparar los dos tiempos de fermentación (48 y 72 horas) no se encontró una mejor producción de alcohol o cambios en la inhibición, al aumentar el tiempo de fermentación en los dos lotes estudiados.

La duración de la inhibición se estudió con cuatro inhibidores (MAC-1, MAC-2, MAC-3 y MAC-5) durante tiempos de fermentación de 24, 48, 72, 96 y 120 horas. Se escogieron los inhibidores MAC-1, MAC-3 y MAC-5 dada su costeabili-

CUADRO 5

PORCIENTO DE ALCOHOL ETILICO OBTENIDO CON TRES INHIBIDORES A DIFERENTES CONCENTRACIONES 1/

Concentración g % <u>2/</u>	Número de observaciones	I N H I B I D O R		
		Benzoato de sodio (MAC-1)	Lauril sulfato de sodio (MAC-3)	Benzoato + Lauril 1:1 (MAC-5)
Testigo (0)	6	100	100	100
0.06	2	39.62	57.03	83.52
0.12	2	38.88	57.03	83.61
0.18	2	38.88	56.66	83.52
0.24	2	38.88	46.29	49.90
0.30	2	8.33	13.33	17.96
0.36	2	4.81	12.96	6.85
0.42	2	3.70	5.92	2.03
0.48	2	3.70	5.00	2.03
0.54	2	3.70	4.62	2.03
0.60	2	3.51	4.62	1.85

pH 4.5

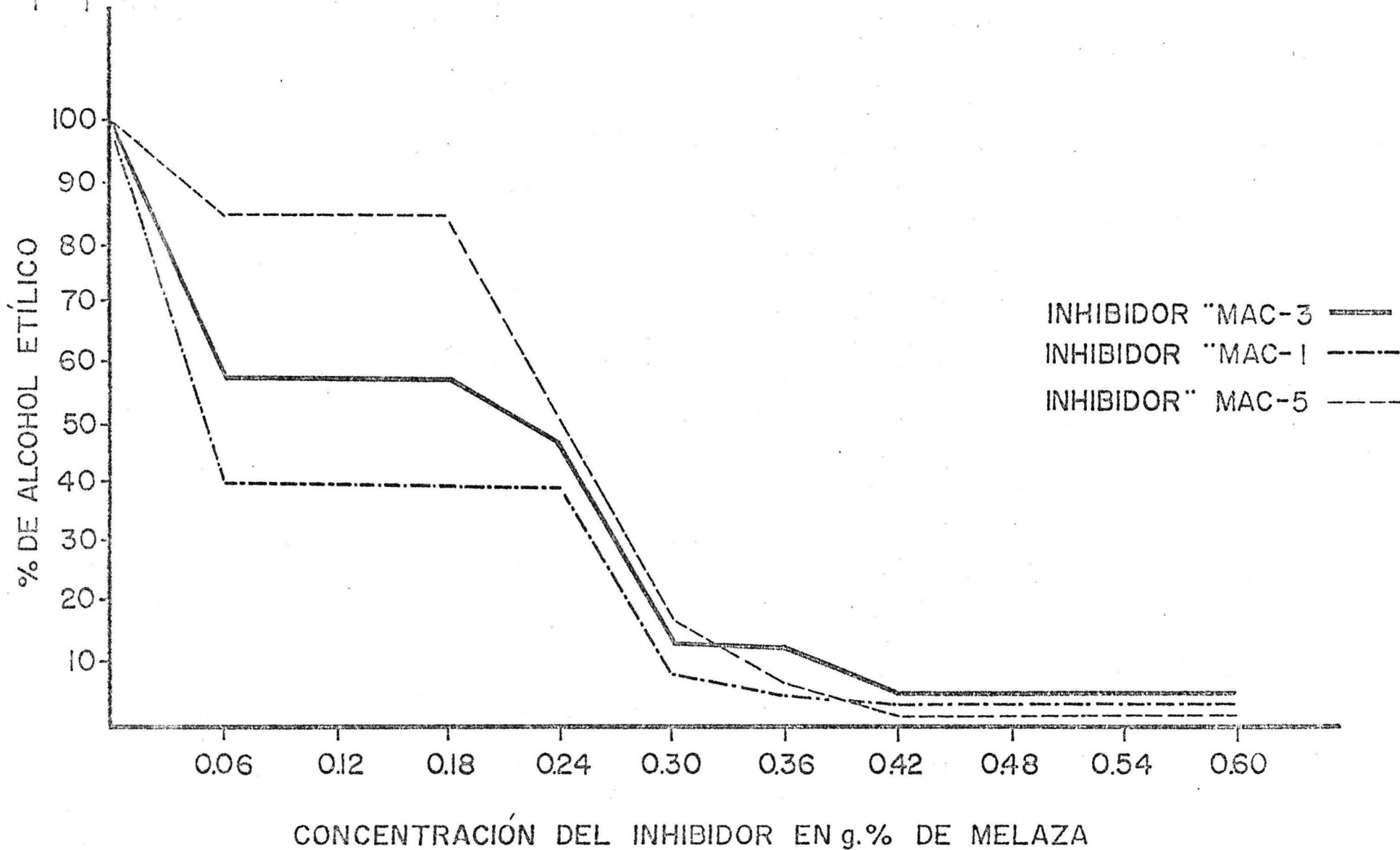
Tiempo de fermentación 48 horas

Temperatura de fermentación 28°C

1/ El % de alcohol etílico, está dado en volumen; 100% de alcohol representa 5.40 ml. de alcohol en 100 ml. de mosto.

2/ Las concentraciones de los inhibidores, están dados en g % en melaza.

Gráfica 2. INHIBICIÓN DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA EN MELAZAS



INHIBIDOR "MAC-3 ———
INHIBIDOR "MAC-1 - - - -
INHIBIDOR "MAC-5 - · - · -

FERMENTACIÓN DE 48 hrs. a 28°C
pH 4.5

CUADRO 6

RESPUESTA A LA INHIBICION ALCOHOLICA (%) USANDO MAC-1 EN UN MOSTO AJUSTADO A pH 3.5 Y CON DOS TIEMPOS DE FERMENTACION 1/

g % Inhibidor <u>2/</u>	L O T E 1		L O T E 3	
	48 horas	72 horas	48 horas	72 horas
Testigo: 0.00	1000.00	100.00	100.00	100.00
0.05	55.74	84.81	92.71	97.18
0.10	1.83	2.26	2.52	2.31
0.15	1.66	1.74	1.68	1.65

1/ El % de alcohol etílico está dado en volúmen, el número de observaciones es igual a 8 en todos los casos; 100% de alcohol representa 5.93 ml. de alcohol en 100 ml. de mosto.

2/ Las concentraciones del inhibidor está dado en g % en melaza.

CUADRO 7

INHIBICION ALCOHOLICA CON CUATRO INHIBIDORES A DIFERENTES TIEMPOS DE FERMENTACION (pH 4.5, 28°C)

Inhibidor	Concentra- ción (g %) 2/	N 3/	24 HORAS		48 HORAS		72 HORAS		96 HORAS		120 HORAS	
			% de al- cohol 1/	% de in- hibición	% de al- cohol	% de in- hibición	% de al- cohol	% de in- hibición	% de al- cohol	% de in- hibición	% de al- cohol	% de in- hibición
Testigo	0.0	8	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
MAC-1	0.30	2	4.97	95.03	7.53	92.47	9.17	90.83	9.82	90.18	10.82	89.18
MAC-2	0.15	2	6.88	93.12	10.97	89.03	10.97	89.03	12.77	87.23	14.75	85.25
MAC-3	0.30	2	8.99	91.01	11.95	88.05	15.06	84.94	13.58	86.42	14.26	85.74
MAC-5	0.30	2	5.35	94.65	6.22	93.78	15.20	84.80	15.22	84.78	15.57	84.43

1/ El % de alcohol etílico, está dado en volúmen; 100% de alcohol representa valores de 5.47, 6.11, 6.11, 6.10 y 6.10 ml. de alcohol por 100 ml. de mosto, para cada grupo de horas, respectivamente.

2/ Las concentraciones de los inhibidores están dadas en g % en melaza

3/ Número de observaciones

dad económica, mientras que el MAC-2 fue incluido, porque presenta inhibiciones mejores a menor concentración aunque su precio sea mayor.

Por los resultados obtenidos (Cuadro 7) en los testigos, se puede notar que la fermentación se completa a las 48 horas, manteniéndose el nivel de producción de alcohol en las horas subsecuentes. En el grupo de 24 horas, se obtiene la mejor inhibición, posiblemente debido a que la fermentación no se ha completado. La tendencia en los demás tiempos es similar, manteniéndose un nivel de inhibición a las 120 horas que haría incosteable su fermentación para la producción de alcohol. A pesar de que los resultados con la mitad de concentración (0.15 g%) del MAC-2, son comparables a los otros inhibidores teniendo concentraciones de 0.3 g%, el costo de el sorbato de potasio (MAC-2) es aún incosteable en comparación con los otros tres inhibidores usados.

Con el objeto de encontrar los puntos óptimos de cada inhibidor así como la tendencia general de la inhibición, se analizó a cada uno de ellos, usando para esto un modelo matemático que incluye los valores lineales, cuadráticos, cúbicos y cuárticos de concentración, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Y_{ij} = \mu + B_1X_i + B_2X_i^2 + B_3X_i^3 + B_4X_i^4 + \epsilon_{ij}$$

en donde:

Y_{ij} es el porciento de alcohol producido.

μ es la media general.

B_1 , B_2 , B_3 y B_4 son los coeficientes de regresión para las concentraciones lineal, cuadrática, cúbica y cuártica, respectivamente.

X_i es la concentración del inhibidor multiplicado por diez y

ϵ_{ij} es el error aleatorio.

CUADRO 8

MODELOS SIGNIFICATIVOS EXPLICANDO EL PROCESO DE INHIBICION (Y) PARA CADA UNO
DE LOS INHIBIDORES (X)

Inhibidor	Modelo	R ² *
MAC-1	$Y = 99.326 - 73.653 X + 24.161 X^2 - 3.736 X^3 + 0.217 X^4$	98.08
MAC-2	$Y = 100.018 + 17.228 X - 28.231 X^2 + 4.237 X^3$	99.96
MAC-3	$Y = 99.215 - 39.465 X + 6.045 X^2 - 0.368 X^3 + 0.007 X^4$	97.05
MAC-4	$Y = 100.018 - 50.081 X + 8.322 X^2 - 0.426 X^3$	99.98
MAC-5	$Y = 99.230 + 37.915 X - 43.669 X^2 + 9.391 X^3 - 0.600 X^4$	95.72
MAC-6	$Y = 100.018 + 11.352 X - 24.505 X^2 + 3.684 X^3$	99.98

* Coeficiente de determinación múltiple

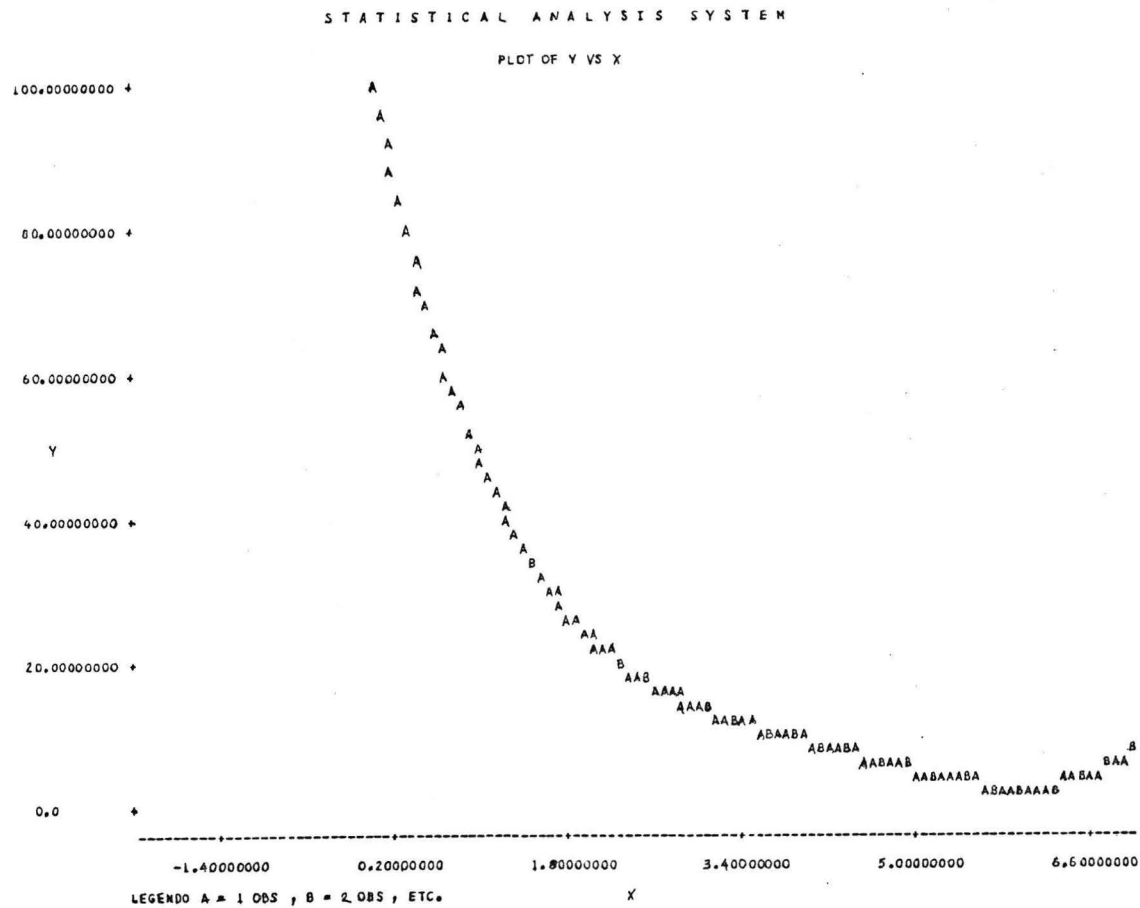
A partir de este modelo general, y usando la técnica de eliminación por retroceso de Draper y Smith (1967), la cual se basa en reducir el modelo hasta encontrar efectos significativos, se encontraron los modelos matemáticos que mejor explican la inhibición para cada uno de los inhibidores.

Estos modelos se muestran en el Cuadro 8 y la representación gráfica de cada uno de los inhibidores (MAC-1, MAC-2, MAC-3, MAC-4, MAC-5 y MAC-6) en las gráficas 3 a 8, respectivamente.

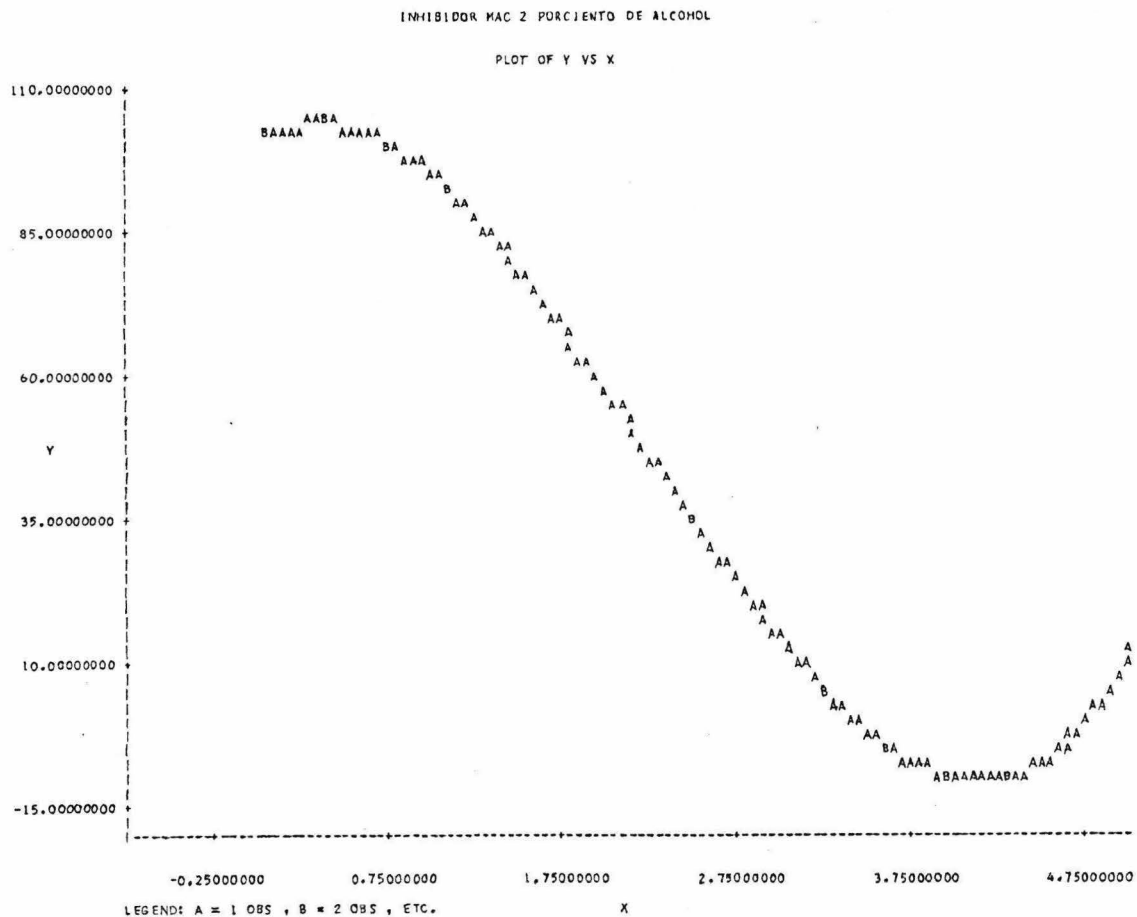
Como se puede notar en el Cuadro 8, los coeficientes de determinación múltiple (R^2) son muy altos, lo cual indica la exactitud del modelo. Es importante recordar que este coeficiente muestra en forma porcentual, que tanto de la variación en inhibición (Y) es explicada por los efectos lineales, cuadráticos, cúbicos y cuárticos de la concentración del inhibidor (X).

En las gráficas podemos notar la reducción marcada en la producción de alcohol por efecto del inhibidor. De acuerdo al modelo, las concentraciones están multiplicadas por diez, lo que hace que el eje de las abscisas esté elevado en escada diez; es decir, los valores indicados para X representan valores de X por diez y para obtener las concentraciones reales habrá que dividir entre diez.

Las tendencias generales son de disminución; sin embargo, en MAC-1, 2, 5 y 6 (Gráficas 3, 4, 7 y 8) existe un incremento en alcohol a concentraciones mayores. Este efecto debe considerarse como producto de escasa información para estas concentraciones. Debe de recordarse que no hay que realizar inferencia estadística de zonas no incluidas en el estudio; por esto, la tendencia ascendente creemos que no es de importancia.



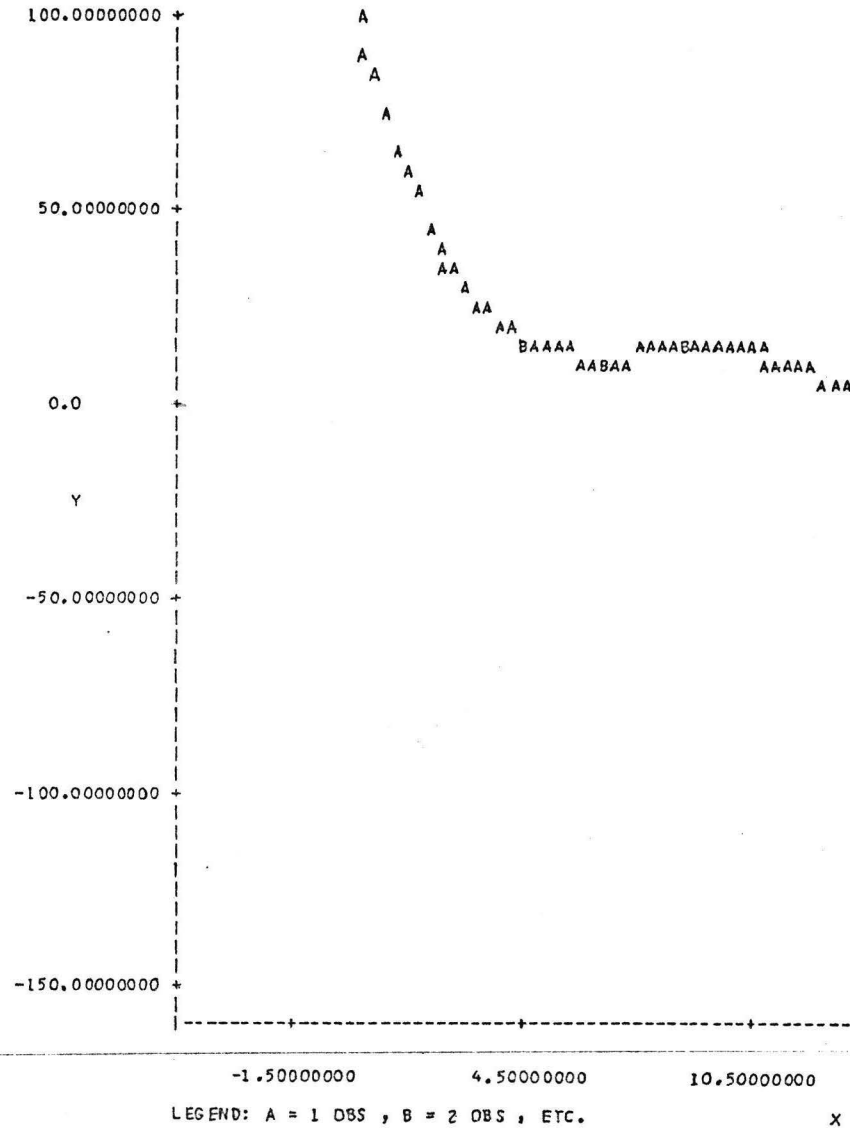
GRAFICA 3. PORCIENTO DE LA PRODUCCION DEL ALCOHOL ETILICO (Y) EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES (POR DIEZ) DEL INHIBIDOR MAC-1 (X)



GRAFICA 4. PORCIENTO DE LA PRODUCCION DEL ALCOHOL ETILICO (Y) EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES (POR DIEZ) DEL INHIBIDOR MAC-2 (X)

INHIBIDOR MAC 3 PORCIENTO DE ALCOHOL

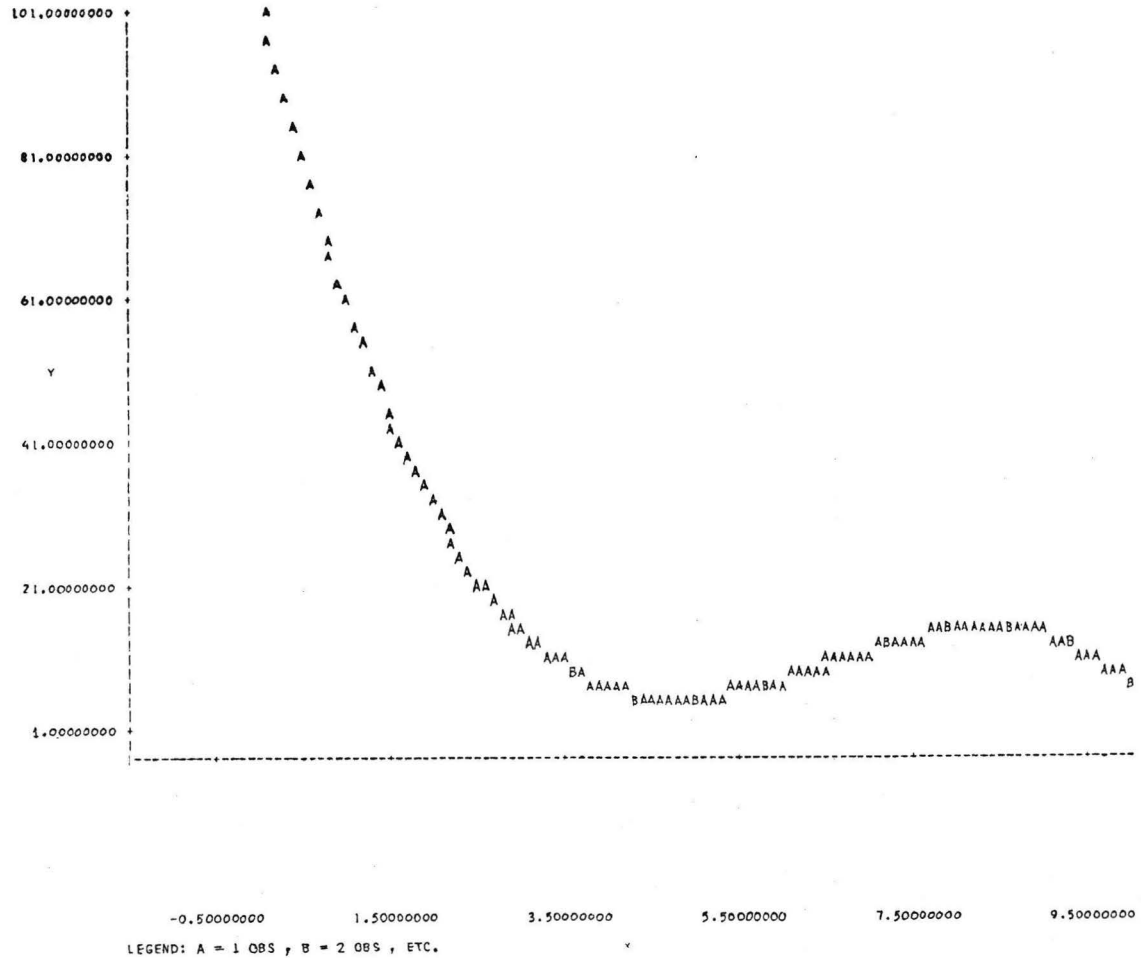
PLOT DF Y VS X



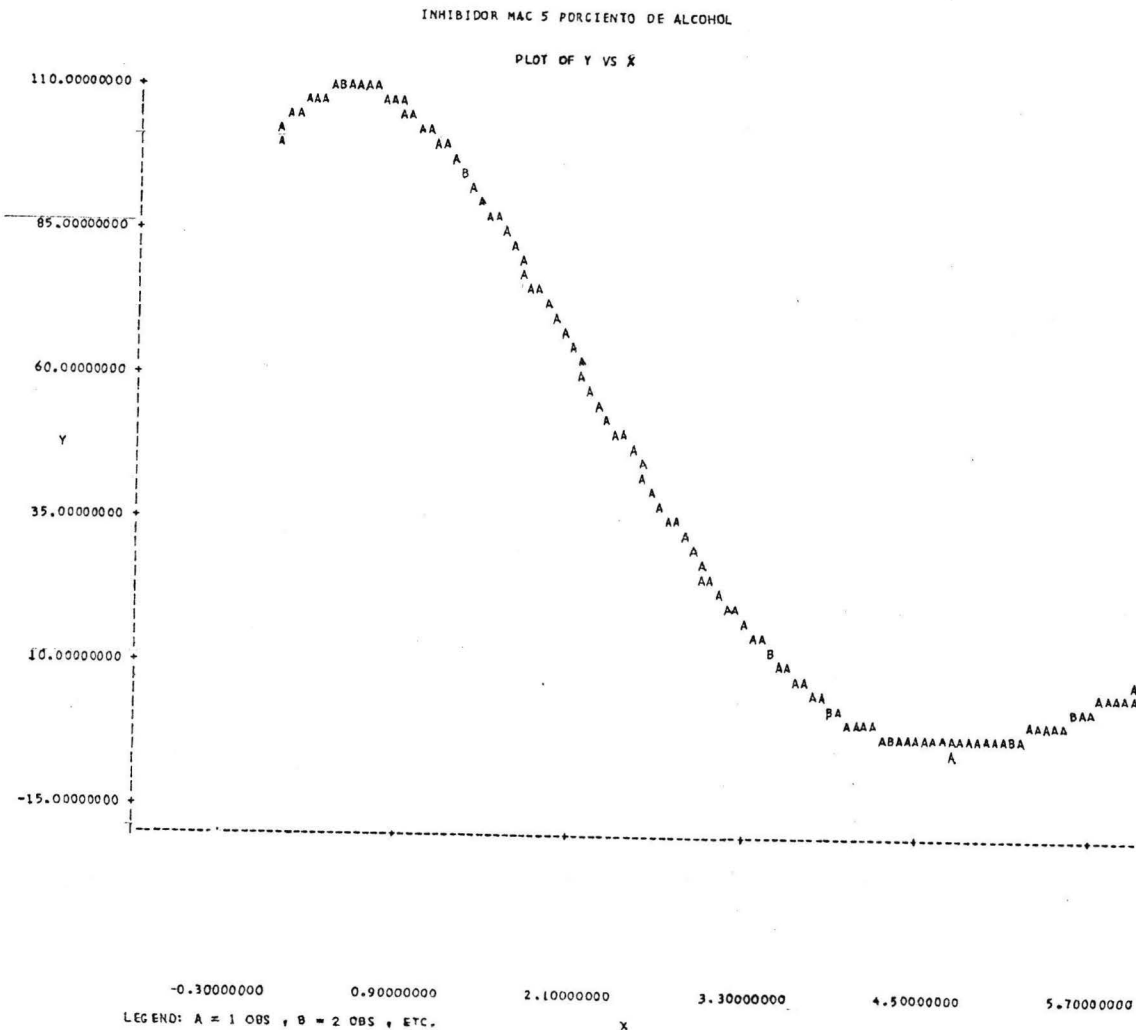
GRAFICA 5. PORCIENTO DE LA PRODUCCION DEL ALCOHOL ETILICO (Y) EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES (POR DIEZ) DEL INHIBIDOR MAC-3 (X)

INHIBIDOR MAC 4 PORCIENTO DE ALCOHOL

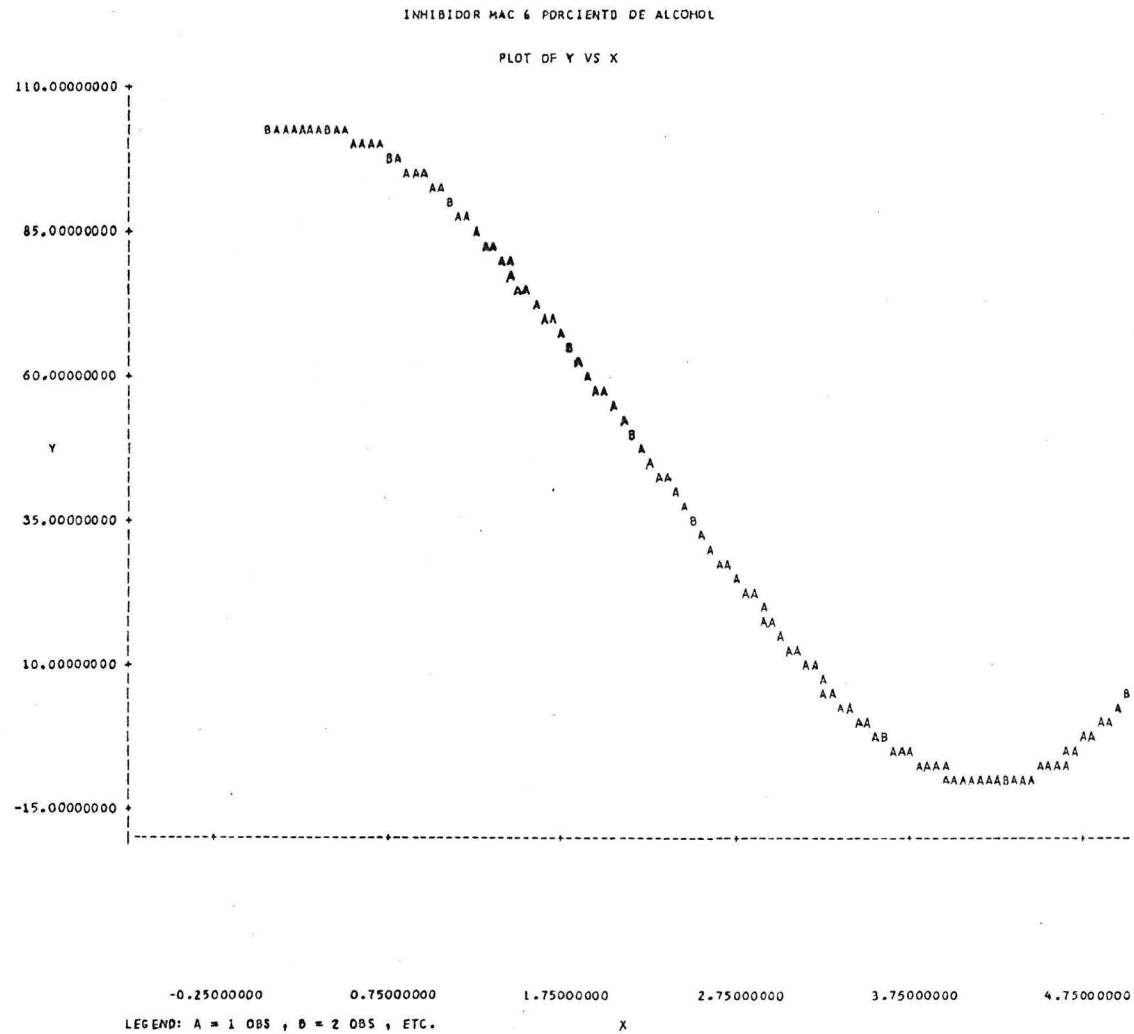
PLOT OF Y VS X



GRAFICA 6. PORCIENTO DE LA PRODUCCION DEL ALCOHOL ETILICO (Y) EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES (PO DIEZ) DEL INHIBIDOR MAC-4 (X)



GRAFICA 7. PORCIENTO DE LA PRODUCCION DEL ALCOHOL ETILICO (Y) EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES (POR DIEZ) DEL INHIBIDOR MAC-5 (X)



GRAFICA 8. PORCIENTO DE LA PRODUCCION DEL ALCOHOL ETILICO (Y) EN LAS DI

En MAC-3 y MAC-4 (Gráficas 5 y 6), hay incrementos seguidos de reducciones en la producción de alcohol, en concentraciones altas. Dado que las concentraciones estudiadas con estos dos inhibidores son mayores a las de las otras, es también factible que los demás inhibidores sólo hayan podido mostrar parte del incremento sin demostrar la caída posterior de alcohol, considerando los rangos incluidos.

Esta hipótesis podría probarse en estudios posteriores, ya que de ocurrir el incremento seguido de una reducción en las concentraciones altas, deberá de investigarse una posible interacción entre niveles de inhibidor y producción alcohólica. De todos modos, los incrementos obtenidos, no son considerables desde el punto de vista de producción clandestina.

V CONCLUSIONES

- 1.- La melaza utilizada en el presente estudio se encuentra dentro de las características físico-químicas generales para este producto.
- 2.- Los niveles de producción de alcohol en los lotes testigos son similares a los encontrados en fermentaciones comerciales donde se utiliza a la melaza como mosto.
- 3.- Todos los inhibidores utilizados mostraron efecto en la reducción del alcohol producido al aumentar la concentración de ellos. Los puntos óptimos de inhibición se encontraron a partir del 0.35 g% inhibidor en melaza, siendo desde 0.3 g%, costables por la inhibición que producen.
- 4.- Los inhibidores MAC-1, MAC-3 y MAC-5 fueron los que resultaron más económicos por el costo del inhibidor.
- 5.- La utilización de los inhibidores hace incosteable la producción de alcohol, pudiendo en esta forma, facilitar los trámites legales para la venta libre de la melaza.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- A.O.A.C. Official methods of analysis of the Association of Official Analytcs Chemists IIa. Ed. Págs. 526, 538-40 (1970).
- 2.- Azukas J.J., Costiloco, N.R. Sadaff, L.H., Inhibition of alcoholic fermentation by sorbic acid. J. Bacteriol. 81: 194 (1960).
- 2'.- Barr, J. y J. Goodnight. A user's guide to the Statistical Analysis System. Institute of Statics NCSU, Raleigh, N.C. U.S.A. (1973).
- 3.- Enciclopedia de Tecnología Química UTEHA.
- 3'.- Draper, N. y Smith, H. Applied Regression Analysis, Wiley E. Sons. Inc. New York (1967).
- 4.- F.A.O. - O.M.S. Evaluación de los aditivos alimenticios, Pág. 24 (1971).
- 5.- Neal, L.A. Weintock, O.J. Oliver Lampon J. Mechaims of Fattly Acid Toxicity for yeast. Journal of Bacterilogy, 90: 126-131 (1965).
- 6.- Preston, R.T. Molasses ason Energy Source for Cattle. World Review of Nutrition and Dietetics 17: 250-311 (1972).
- 7.- Sánchez, M.A. Principios de Microbiología Industrial, Ed. América, S.A. México, pags. 101: 164-6 (1961).
- 8.- Smith, S.E., Boven F.J. Mac Gregor, R.D. Yeast Growth as Affected by Sodium Benzoate, Potassium Sorbate and Vitamin K5, Food Tech 93-95 (March 1962).

- 9.- Spencer - Meade. Manual del Azúcar de caña, 9a. Edición. Ed. Montaner y Simon, S.A. Barcelona, pgs. 315, 319, 511-523, 543, 629-639 (1963).
- 91.- Steel, R.G.D. y J.H. Torrie. Principles and Procedures of Statistics. Mc. Grow Hill Book Co., New York (1960)
- 10.- The Merck Index of Chemicals and Drugs 8a. Edición. Ed. Merck & Co., Inc. (1968).