

## LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA UN PROTOTIPO DE REACCIÓN BIOCATALIZADA: La fabricación de Ron

Ajkay J.<sup>1</sup> Cortes J.<sup>2</sup> Naranjo M.<sup>3</sup>

Estudiante 7º Grado Gimnasio Campestre; 2. Profesor de Ciencias Naturales en el Gimnasio Campestre 7º Gimnasio Campestre; Estudiante 10 semestre Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia.

\*Autor para correspondencia: [Ajkay209@hotmail.com](mailto:Ajkay209@hotmail.com) [marcofidelnaranjo@hotmail.com](mailto:marcofidelnaranjo@hotmail.com)

### Resumen

El presente artículo se basa en la investigación de la dependencia de la reacción de fermentación de melaza a el catalizador, en este caso un agente biológico el *Saccharomyces cerevisiae*. En él se estudian tres montajes reactivos: el primero inoculado con un cultivo activo de la levadura; el segundo una matriz de melaza expuesta al aire y al ambiente directo; el tercero una matriz de melaza esterilizada expuesta al aire, pero aislada del ambiente. Se preparó el mosto y se dejó en reacción por dos semanas. Los resultados de estos experimentos mostraron que hubo una reacción activa con producción de etanol en el mosto inoculado con la levadura; también un enrarecimiento del mosto expuesto al aire libre con una muy baja proporción de alcohol mientras que el mosto estéril se conservó en perfectas condiciones. Del estudio se comprobó inicialmente la naturaleza de la reacción de fermentación, identificando sus productos derivados cualitativamente e identificando el perfil de composición de la primera fracción del destilado. Además desde un punto de vista cualitativo se identificó la dependencia de la reacción a la presencia de microorganismos biocatalizadores.

**Palabras Clave:** Reacción biocatalizada, melaza, fermentación alcohólica, levaduras, mosto, ron .

### Summary

The present article is based on the investigation of the dependency of the reaction of fermentation of molasses to the catalyst, in this case a biological agent the *Saccharomyces cerevisiae*. In three reactive assemblies studies first inoculated with an active culture of the yeast; the second a matrix of molasses exposed to the air and the direct atmosphere; a third matrix of molasses sterilized exposed to air but isolated for atmosphere. Grape juice prepare and left in reaction for two weeks. The results of these experiments showed that there was active reaction with ethanol production in grape juice inoculated with the yeast; there was a strange process of the grape juice exposed outdoors with a very low proportion of alcohol, whereas sterile grape juice was conserved in perfect conditions. From the study the nature of the fermentation reaction was verified qualitatively initially, identifying its products derived and the composition profile of the first fraction of the distilled one. In addition from a qualitative point of view the dependency of the reaction to the presence of bio catalyst microorganisms was identified.

**Key words:** Reaction biocataliz, molasses, alcoholic fermentation, yeasts, must, rum.

### Introducción

El proceso de fermentación más antiguo es la transformación de la uva en vino. Debido a que en él se produce abundante desprendimiento de gas carbónico (CO<sub>2</sub>) y el líquido adquiere una apariencia de estar burbujeando, se le dio el nombre de fermentación; ya que es generada por microorganismos llamados levaduras, capaces de producir sustancias conocidas como zimasas que intervienen en el proceso, con desprendimiento de gas carbónico. Este procedimiento fue estudiado científicamente por Helmont en 1648, más tarde por Lavoisier y con Luis Pasteur adquiere relevancia.

### Fermentación alcohólica

Desde épocas remotas se tiene el conocimiento que almidones y azúcares fermentados originan el alcohol etílico, el cual es parte de cervezas, vinos y licores. Fue hasta 1810

cuando un científico francés llamado Gay Lussac, aprovechó las experiencias de Lavoisier, al representar la fermentación por medio de una reacción química.

Para la obtención de bebidas alcohólicas se utiliza la fermentación anaerobia; es decir, es un proceso que se lleva a cabo sin aire. Este procedimiento es muy importante para la industria alimenticia y de elaboración de bebidas alcohólicas. Con la destilación se obtuvo licor de alta graduación—el cual contiene alta proporción de alcohol en disolución de 30% o más— como whisky, brandy y tequila. En una fermentación alcohólica se encuentran cuatro sustancias: glucosa y agua como reactivos; alcohol y gas carbónico como productos<sup>1</sup>.

### Proceso de Fermentación

No hay que confundir esta utilización del término con el proceso bioquímico de fermentación, consistente en la re-

generación del *poder reductor* (NADH) por un procedimiento no oxidativo.

El desarrollo de una fermentación industrial incluye dos tipos de procesos denominados, por sus nombres en inglés, procesos *upstream* y procesos *downstream*. Los procesos *upstream* comprenden la selección y preparación del microorganismo, la preparación del medio de cultivo y de las condiciones de fermentación (cultivo). Los procesos *downstream* incluyen la purificación del producto y el tratamiento de los residuos de la fermentación.

En el proceso de fermentación del mosto de uva para producir vino, podemos distinguir los procesos *upstream* de la selección y preparación de cepas de levadura, tratamiento del mosto y acondicionamiento de las condiciones de fermentación. Los procesos *downstream* comprenden, en este caso, el tratamiento del vino para su clarificación y el de los residuos del proceso<sup>2</sup>.

### Producción de vino

Se trata de una fermentación para la fabricación de un producto de gran volumen y bajo valor añadido. En el proceso, un hongo (*Saccharomyces cerevisiae*) crece utilizando el azúcar (glucosa) presente en el mosto de uva para producir alcohol. El proceso puede esquematizarse como sigue:

- El microorganismo (hongos)
- El crecimiento de microorganismos
- El medio de cultivo
- El proceso de fermentación

**El microorganismo:** *Saccharomyces cerevisiae*. Los hongos. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto unicelular. Los hongos son organismos eucarióticos (sus células tienen una organización interna en orgánulos membranosos) quimioheterótrofos.

Los organismos necesitan carbono y energía para poder crecer. En la naturaleza las fuentes de energía pueden ser químicas (energía presente en los enlaces de compuestos químicos) o lumínica (energía de la luz que se transforma en energía química). Por otra parte, las reacciones de oxidoreducción que tienen lugar en los seres vivos requieren donadores de electrones que pueden ser orgánicos o inorgánicos. Por último, el carbono puede encontrarse de dos formas, como carbono orgánico y como carbono inorgánico (CO<sub>2</sub>). La combinación de estas posibilidades da lugar a las diferentes categorías de microorganismos en función de su nutrición.

Los principales microorganismos de interés aplicado industrial pertenecen al grupo de los quimioheterótrofos. El microorganismo responsable de la fermentación alcohólica de la producción del vino es la levadura *S. cerevisiae*. Las levaduras son hongos unicelulares, a diferencia de otro tipo de hongos a los que conocemos como filamentosos. Estos filamentosos tienen tubos se denominan hifas y van cre-

ciendo por sus puntas (crecimiento apical) y ramificándose para formar la colonia que denominamos micelio.

El crecimiento de un hongo como levadura o como hongo filamentosos está, en algunas ocasiones, regulado por condiciones ambientales, de forma que un mismo hongo puede crecer en ciertas situaciones como levadura y en otras como hongo filamentosos<sup>4</sup>.

### Fases del crecimiento de un cultivo

La cinética del crecimiento de microorganismos que crecen en un cultivo realizado en un volumen finito, a esto se le denomina *cultivo batch* y podríamos traducirlo por *cultivo discontinuo*. El desarrollo de un cultivo discontinuo se ajusta al representado en la siguiente figura: Se pueden distinguir cuatro fases en el cultivo: (1) la *fase lag* en la que el microorganismo se adapta a las nuevas condiciones y pone en marcha su maquinaria metabólica para poder crecer activamente. La duración de esta fase es variable y en general es mayor cuanto más grande sea el cambio en las condiciones en las que se encuentra el microorganismo. (2) La *fase exponencial* cuya cinética explicamos en la página anterior. (3) La *fase estacionaria* en la que no hay aumento neto de microorganismos, lo que no significa que no se dividan algunos, sino que la aparición de nuevos individuos se compensa por la muerte de otros. (4) La *fase de muerte* en la que el número de microorganismos vivos disminuye de forma exponencial con una constante *k* que depende de diferentes circunstancias<sup>3</sup>.

### Factores ambientales que afectan al crecimiento de microorganismos

#### Temperatura

Cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento adecuada. Si consideramos la variación de la velocidad de crecimiento en función de la temperatura de cultivo, podemos observar una temperatura mínima por debajo de la cual no hay crecimiento ( $dX/dt = 0$ ); a temperaturas mayores se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento con la temperatura de cultivo hasta que se alcanza la temperatura óptima a la que la velocidad de crecimiento es máxima. Por encima de esta temperatura óptima, la velocidad de crecimiento decae bruscamente y se produce la muerte celular.

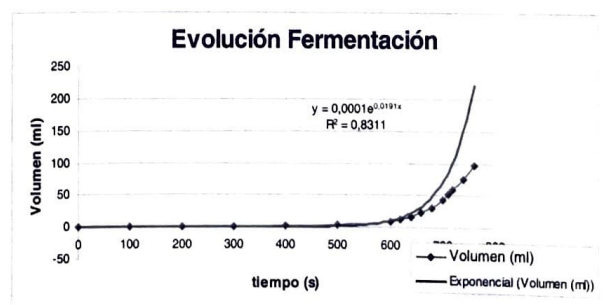


Figura 1. Cambio de la rata de fermentación

Se denomina *coeficiente de temperatura* a la relación entre el incremento de la velocidad de reacción y el de temperatura. El incremento de  $\mu$  con la temperatura se debe al incremento generalizado de la velocidad de las reacciones enzimáticas con la temperatura. En términos generales, la velocidad de las reacciones bioquímicas suele aumentar entre 1.5 y 2.5 veces al aumentar 10°C la temperatura a la que tienen lugar. La ausencia de crecimiento ( $\mu=0$ ) a temperaturas muy bajas se debe a la reducción de la velocidad de crecimiento y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular que pasan de ser fluidos a cristalinos impidiendo el funcionamiento de la membrana celular. La muerte celular a altas temperaturas se debe a la desnaturalización de proteínas y a las alteraciones producidas en las membranas lipídicas a esas temperaturas<sup>5</sup>. Figura 1.

### Objetivos

En este estudio nos interesa lograr:

Analizar la reacción química involucrada en la fermentación de la caña de azúcar para producir ron e identificar todos sus componentes.

Estudiar las etapas tecnológicas de la producción de ron en las industrias dedicadas a este fin.

Realizar una documentación sobre el proceso de fermentación, los microorganismos involucrados y los tipos de bebidas fermentadas que se obtienen de estos procesos.

Documentación sobre los efectos y las normas de seguridad para el consumo de bebidas alcohólicas.

Diseño de un montaje experimental para estudiar una reacción de fermentación y caracterización de sus productos.

### Materiales y Métodos

**Materiales reactivos:** La siguiente lista contiene todos aquellos materiales de laboratorio, reactivos y elementos de montaje necesarios para la realización de las pruebas:

#### Material de laboratorio:

- 2 Cubas de fermentación elaboradas a partir de recipientes plásticos.
- Un balón de fondo plano con desprendimiento lateral.
- Un enfriador de vidrio.
- Beakers para recoger fracciones de destilado.
- Botellas de envasado.
- 1 Soporte con orificio inferior y entrada de manguera.
- Un Cilindro graduado.
- Tubos de ensayo en gradilla.
- Espátulas, corchos, mangueras, agitadores de vidrio, soportes, mallas de asbesto, espátulas, pinzas y demás componentes genéricos de los montajes.
- barril de roble o sustituto efectivo.

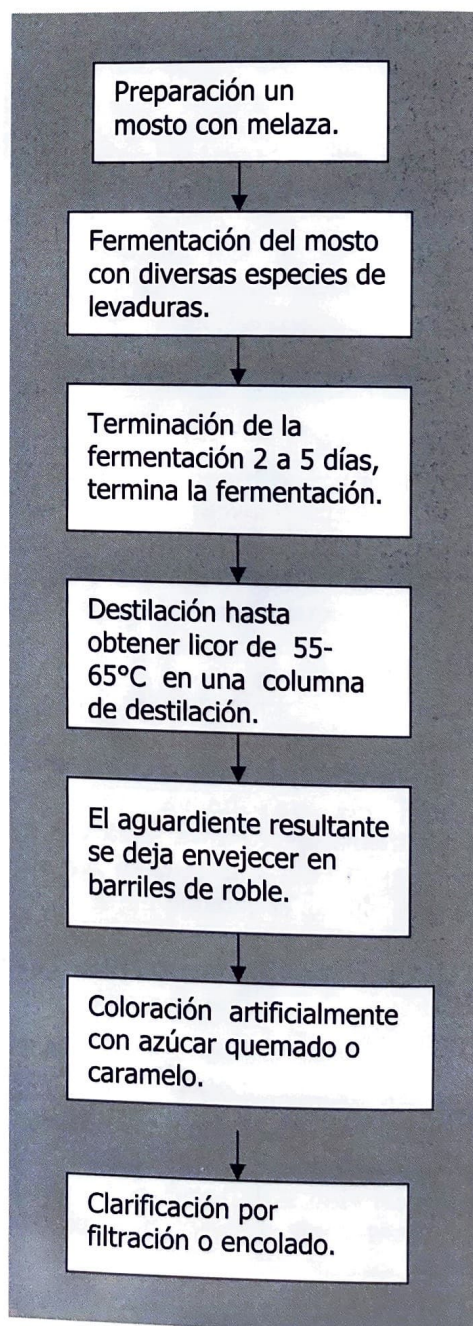
### Reactivos y sustratos:

- 5 Kg de panela.
- 1 Kg de ácido cítrico
- kg Levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- 30mL HCL <sub>(conc)</sub> + 25 g ZnCl<sub>2</sub> para activar el reactivo de Lucas:
- 10g de Ca(OH)<sub>2</sub>.
- Indicador universal.
- Agua destilada.
- Equipos especiales de laboratorio:

Cromatógrafo de gases.

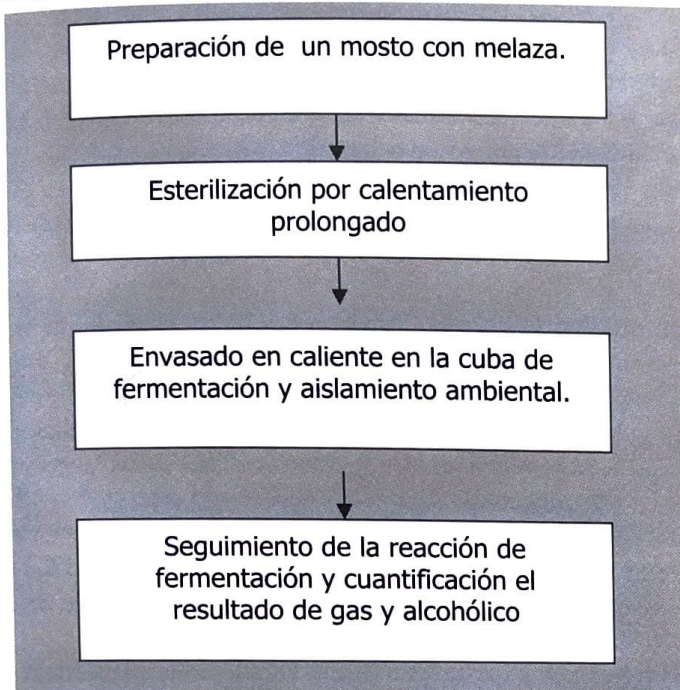
### Métodos

#### El Proceso de Producción del Ron:



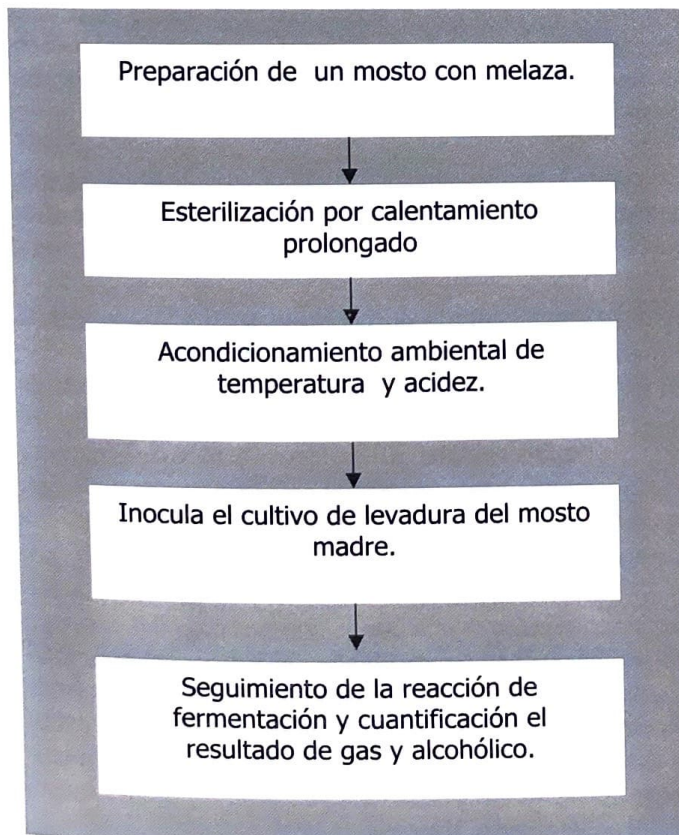
## Proceso de Análisis de la Reacción Química

### Influencia del catalizador



## Proceso de Análisis de la Reacción Química

### Influencia del catalizador



## Seguimiento e identificación de Dióxido de carbono liberado:

A través del siguiente montaje: Ver figura 2.

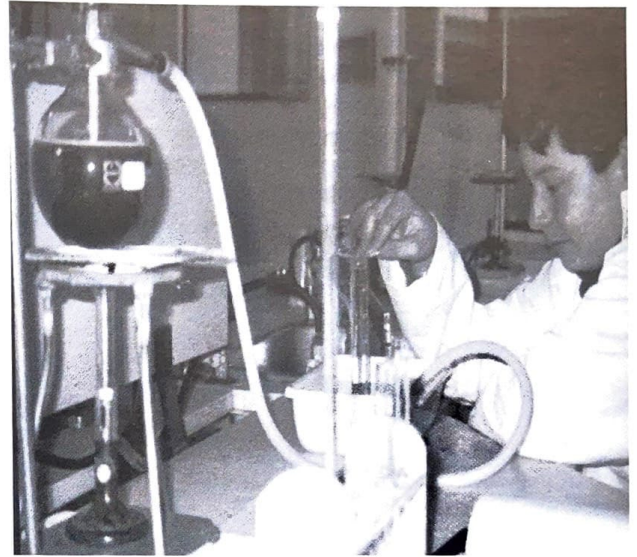
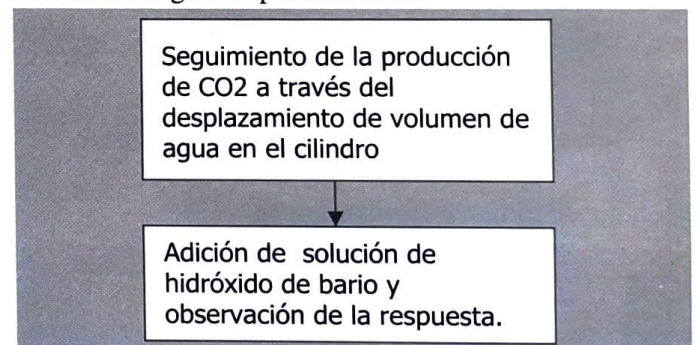


Figura 2. Montaje para la identificación de CO<sub>2</sub>

Se realiza el siguiente procedimiento:



## Seguimiento e identificación de Etanol producido de carbono liberado:

A través de los siguientes montajes se identifica el alcohol formado:

Procedimiento de toma de prueba de lucas. Figura 3.

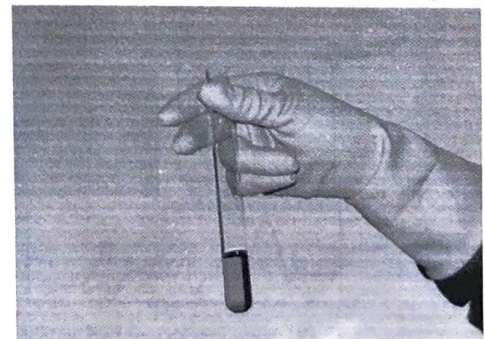


Figura 3. Montaje de aplicación de la prueba de reactivo de Lucas

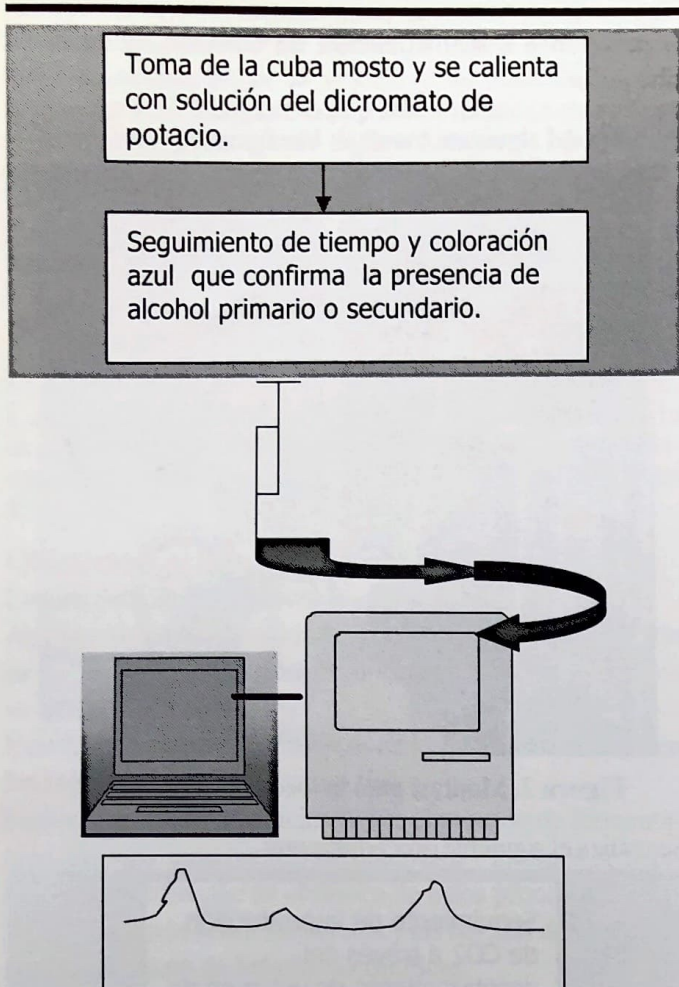
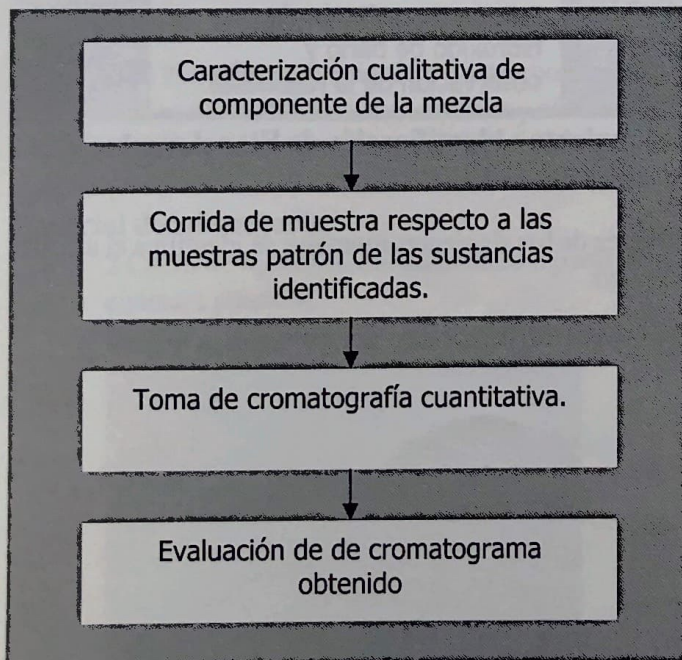


Figura 4. Procedimiento de toma de cromatografía

#### Montaje de toma de cromatografía



#### Análisis de resultados

Tras permitir la terminación de la reacción se encontraron los siguientes resultados:

#### Cualitativos de reacción

Durante el proceso se observó en los esquemas con reacción posible, la aparición de espumación y efervescencia. También se evidencia la aparición de una nata viscosa

Se desarrollaron olores desagradables y se observó la presurización del sistema si se deja hermético.

Al hacer una valoración organoléptica de las tres cubas de reacción se encuentran los siguientes resultados:

La cuba de la fermentación facilitada muestra un marcado olor a fermentado con sabor ácido-agrio y su olor es penetrante.

La cuba de la fermentación a condiciones naturales presentaba un olor a vino con sabor ligero a amargo-dulce.

La cuba a condiciones de esterilización se encontró prácticamente no perturbada, con sabor dulce típico de la panela y aroma característico de esta.

En el montaje experimental a condiciones controladas, ejecutado en el colegio, se identificó que a condiciones óptimas de reacción de 35 °C, la reacción sucede casi inmediata ( 8 minutos) y su dinámica aumenta muy rápido evidenciada por el aumento en la velocidad de desprendimiento de gas.

El resultado de la aplicación del agua de calcita al gas liberado mostró la aparición de un precipitado blanco.

El resultado de la aplicación de la prueba de dicromato de potasio a la fracción de destilado de los tres montajes ofreció el siguiente resultado:

Prueba rápida de precipitado. Fuerte azul en la muestra de la fermentación facilitada.

Prueba rápida pálida para la muestra originada de la muestra de fermentación libre.

Prueba negativa a destilado obtenido de la muestra esterilizada.

#### Cuantitativa de reacción

La cromatografía revela que la composición del destilado medio de la muestra obtenida a partir de la reacción facilitada presenta una composición de 5.65% en alcoholes y que el contenido de metanol es de 0.023%. De estos resultados se puede observar que es menor al 12 % esperado. Por otro lado se observa que la cantidad de metanol es baja y que el destilado es seguro, figura 4.

Respecto al análisis comparativo de los resultados de la reacción en tres esquemas de reacción muestra que efectivamente el microorganismo en cuestión, facilita dramáticamente la ejecución de la reacción, lo cual se deduce de la cantidad superior de alcohol de la reacción, respecto a la cantidad de alcohol de la reacción libre y la imposibilidad de la reacción de la muestra sometida a esterilización.

El análisis de la reacción controlada muestra además que bajo condiciones ambientales adecuadas de pH y temperatura la reacción puede proceder más rápido aún.

El resultado de la reacción muestra desprendimiento de gas incoloro dióxido de carbono. Al aplicar la prueba de la cerilla que se apaga y del agua de calcita que muestra un precipitado blanco se deduce que efectivamente este es el gas.

La prueba positiva de dicromato de potasio en medio ácido muestra la presencia cualitativa de etanol que, se confirma con la prueba de la cromatografía de gases que nos muestra, tanto el etanol como el metanol.

## Conclusiones

De los anteriores resultados puede concluirse que efectivamente la reacción de fermentación se ve facilitada de manera determinante por el microorganismo tanto en la consecución de estado reactivo, como en la rapidez y eficiencia de la reacción misma. Por ende el microorganismo de acuerdo a la definición de catalizador es un catalizador de carácter biológico.

Adicionalmente la reacción de fermentación efectivamente transforma el azúcar componente principal de la melaza a dióxido de carbono y alcohol.

Es evidente que por la transformación de colores y olores ocurran reacciones laterales, no tan significativas pero que en últimas producen las características de olor y sabor de estos licores.

Se concluye también que las condiciones de temperatura son fundamentales para lograr las condiciones de rendimiento y efectividad del proceso, además de la importancia del acondicionamiento previo.

Para terminar se puede concluir que a pesar del cuidado tenido para esta corrida experimental, los resultados son relativamente bajos lo cual pone en evidencia que estas reacciones que involucran catalizadores biológicas requieren de un control delicado y de unas buenas prácticas de acondicionamiento inicial y arranque para obtener los resultados esperados, que seguramente serán determinantes para viabilidad económica de la producción. Aún así, el objetivo de acercar a los interesados al estudio de las reacciones biocatalizadas y analizar sus posibilidades se logró en todo sentido.

## Bibliografía

1. "QUÍMICA GENERAL". Kennet W. Whitten. Tercera edición. Mac Graw Hill. México D.F., 1996. Capítulo 1, 2, 3, 4.
2. "MANUAL DE PROCESOS QUÍMICOS DE LA INDUSTRIA". George T. Austin. Quinta edición. Mac Graw Hill. México D.F., 1995. Capítulo 31.
3. "MANUAL DE PRÁCTICAS DE ANÁLISIS ORGÁNICO". Marco José Gómez. Segunda edición. Fondo nacional Universitario. Santafé de Bogotá 1991.