

Determinación del grado de conversión global del jugo de piña en etanol por medio de la fermentación alcohólica

Briceida C. Fernández A.¹, Maite V. Gómez S.¹, José R. Ferrer G.^{1,2}, y Marisela Rincón²

¹Escuela de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad Rafael Urdaneta. Estado Zulia. Venezuela.

²Escuela de Ingeniería Química. Departamento de Ingeniería Bioquímica. Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. Apartado 526, Maracaibo 4001-A. Estado Zulia.

e-mail: *heybri_89@hotmail.com*, *etiam_1989@hotmail.com*, *joseferrer1@gmail.com*, *mariselarincon@gmail.com*

Recibido: 18-01-2013 Aceptado 20-06-2014

Resumen

El presente estudio tuvo como propósito la determinación del grado de conversión global del jugo de piña en etanol por medio de la fermentación alcohólica, utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En la caracterización físico química realizada al jugo de piña se determinó: pH, el contenido de azúcares totales por el método de Dubois, azúcares reductores utilizando el método DNS y °Brix por medio de la utilización de un refractómetro. Este proceso se realizó por triplicado en envases plásticos de 20 litros cada uno, con un volumen de trabajo de 6 litros a una temperatura de 29°C, para un crecimiento óptimo de esta levadura. Los resultados obtenidos fueron: pH promedio de 4,03; °Brix promedio de 11,6; un valor de 46,75% p/p para el contenido de azúcares totales y de 28,52% p/p para los azúcares reductores y $1,81 \times 10^8$ UFC/mL para el conteo de células. Luego de culminado la fermentación se obtuvo una concentración de etanol de 43.724,20 mg/L, un promedio de etanol obtenido por destilación simple de 28,67 ml por cada 500 ml de mezcla y una conversión promedio de 5,73%.

Palabras clave: Fermentación alcohólica, etanol, piña, conversión, levadura

Determination of the conversion degree of pineapple juice through alcoholic fermentation

Abstract

The purpose of this study is to determine the global conversion degree of pineapple juice into ethanol through alcoholic fermentation using yeast from the *Saccharomyces cerevisiae* genus. A physicochemical characterization made to the pineapple juice was used to determine its: pH, using a pH-meter; total sugar content by the Dubois method; reducing sugar using DNS method and Brix degrees through the use of a refractometer. This process was carried out in triplicate on 20-liter plastic containers, each with a 6-liter of work volume at 29°C of temperature, for an optimum growth of this yeast. The results gotten from the experiments were: average pH 4,03; average Brix degrees 11,6; a value of 46,74% w/w for the total sugar content and 28,52% w/w for reducing sugars and $1,81 \times 10^8$ cell/mL for cell counting. Once the fermentation process was finished, an ethanol concentration of 43.724,20 mg/L was obtained. The average of ethanol obtained by simple distillation was of 28,67 ml per each 500 mL of the mixture with an average conversion of 5.73%.

Key words: Alcoholic fermentation, ethanol, pineapple, conversion, yeast.

Introducción

Con el paso de los años se ha observado un crecimiento bastante acelerado de la población a nivel mundial, lo que trajo consigo, un aumento en las exigencias de la misma en cuanto a tecnología se refiere.

Este aumento de la población en los últimos años y la incesante búsqueda por parte del ser humano de un estilo de vida, lleno de tecnología y comodidades ha conllevado a la explotación indiscriminada de los recursos naturales no renovables como lo es el petróleo [1,2].

Es por ello que a nivel mundial surge la idea de trabajar en fuentes de energía alternas, las cuales permitan no solo satisfacer las necesidades del ser humano complementando los recursos ya existentes, sino que también permitan tener una garantía por si llegara a agotarse el petróleo [3,4,5].

Por este motivo el etanol ha adquirido un gran valor a nivel mundial, debido a su uso como combustible, bien sea solo o mezclado con la gasolina, además el etanol representa un combustible de mejor calidad y mucho más limpio.

Por otro lado, el etanol es una fuente de energía renovable ya que se puede obtener no solo por hidratación del etileno sino también a partir de frutas o productos que contengan un alto contenido de azúcares [6].

Las técnicas actuales de producción de etanol a partir de cereales y caña de azúcar presentan el problema de la seguridad alimentaria. De igual forma, la producción de etanol carburante por medio de estas materias primas no ha llenado las expectativas con respecto a la disminución de gases invernaderos y de aumento en la producción de energía con respecto a la gastada. Es por ello que se está trabajando a nivel mundial en la búsqueda de nuevas frutas o productos que permitan obtener dicho combustible sin la necesidad de representar una amenaza para la alimentación del ser humano [7,8,9,10].

Venezuela se ha interesado bastante en este tema y en los últimos años ha empezado una búsqueda de nuevas alternativas en la producción de etanol, para liberar de algún modo los otros rubros que ya están siendo explotados.

La piña podría ser una de estas alternativas puesto a que es una fruta que aunque es consumida por muchos, debido al agradable sabor y vitaminas que posee, es de menos importancia en la alimentación del ser humano como lo es el maíz. Es por ello que surge la necesidad de realizar esta investigación, con la finalidad de determinar que conversión se obtiene de jugo de piña en etanol utilizando la fermentación alcohólica como proceso de producción [11,12,13,14,15].

Para la realización de este experimento resulta necesario la realización de una serie de análisis o caracterizaciones previas al proceso de fermentación como lo son °Brix, pH y contenido de azúcares totales y reductores, los cuales nos indicaran si la fruta cuenta con los requerimientos mínimos necesarios para la obtención del biocombustible [16].

Luego de conocer si la fruta cuenta con los niveles de azúcares necesarios se procede a realizar el proceso de fermentación alcohólica, el cual nos permitirá determinar que tan eficiente resulta la producción de etanol utilizando la piña como materia prima.

Parte Experimental

La primera fase correspondió a la determinación de las propiedades físico químicas que conforman la materia prima utilizada en el proceso de fermentación alcohólica.

Se adquirieron las piñas en el Mercado de Mayoristas Mercamara (MercaSur) ubicado en el Municipio San Francisco del Estado Zulia. Se seleccionaron 17 piñas de 3 Kg cada una, aproximadamente. Una vez seleccionadas las piñas se procedió a lavarlas con agua destilada para, de esta forma, disminuir cualquier posibilidad de contaminación a la hora de preparar el jugo. Luego de lavadas todas las piñas se realizó la remoción de la concha de cada una de ellas, para luego cortar en pequeños trozos esta pulpa y así poder extraer el jugo. Para separar el jugo del material fibroso se utilizó un colador plástico de malla, para garantizar así, una fermentación mucho más efectiva.

Ya extraído el jugo se obtuvo una cantidad de 18 litros, los cuales se conservaron en cantidades iguales en tres envases de plástico, con una capacidad de 20 litros cada uno de ellos. Estos envases se encontraban previamente lavados con agua caliente y meta bisulfito de sodio, con la finalidad de prevenir el crecimiento de bacterias, levaduras u hongos extraños a los usados en el experimento. Los envases fueron cerrados con papel de aluminio de modo que no existiera ningún tipo de contacto con el ambiente

Para determinar los °Brix, se vertieron cuatro (4) gotas de la muestra en el lente del refractómetro portátil, Model RHB-32, y se observó en la escala que muestra el equipo los grados °Brix. Para determinar el pH, se utilizó un pHmetro de marca OAKTLON PH 510, el cual, estando previamente calibrado, muestra en la pantalla el pH de la solución.

Para la determinación de los azúcares totales presentes en el jugo de piña es necesario construir una curva, la cual se realizó utilizando el método de Dubois. Este método consiste en una reacción fenol-acido. Para la realización de la curva de calibración se toman soluciones con concentraciones conocidas de sacarosa. Una vez elaborada es posible, con la Absorbancia, determinar la concentración de la muestra, esto se cumple cuando las concentraciones se hallan en el rango de la curva de calibración. [1]

Para la determinación de azúcares reductores, se utilizó el método Sumer. En este método se trabaja con el ácido dinitrosalicílico (DNS) y es necesario, al igual que para la determinación de azúcares totales, la construcción de una curva de calibración; la cual se determinó con concentraciones conocidas de glucosa, a diferencia de la curva de azúcares totales para la que se empleó sacarosa. [2]

Una vez construida la curva de calibración de azúcares reductores se procedió a tomar los valores para el jugo de piña.

Para realizar la fermentación alcohólica del jugo de piña se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* instantánea o levadura de panadero, agregándose 0.8 gramos por cada litro de jugo.

Para que la levadura trabajara en forma óptima fue necesario mantener la temperatura en un rango comprendido entre 27° C y 30°C. [3]

Se utilizó una cámara de conteo para el conteo de células. El tipo de cámara empleado es el hematocitometro o hematimetro.

A la muestra del jugo de piña con la levadura se le agregó solución de ácido cítrico 0.1 M conteniendo 0.1% (p/v) de violeta de cristal y finalmente se contaron las células utilizando un microscopio con un ocular de 10 y objetivo de 10.

Para la caracterización del licor se utilizó un Cromatógrafo Agilent Technologies 6890N de gases, en el cual se pasó la muestra por triplicado. Previo a este experimento el mosto a utilizar fue purificado por centrifugación. Se tomó una muestra de 500 mililitros y se separó utilizando un rotavapor,

Por último se determinó la eficiencia del proceso, determinando cuanto etanol se produjo en la fermentación alcohólica del jugo de piña. Para esto, se procedió de la siguiente manera:

$$X_i = \left(\frac{V_{bi}}{V_{ai}} \right) * 100$$

Donde:

X_i : Porcentaje de Conversión para la muestra .

V_{ai} : Volumen del jugo usado para el ensayo. Se expresa en mililitros.

V_{bi} : Volumen de etanol obtenido al final del proceso. Se expresa en mililitros.

Resultados y Discusión

Para la caracterización fisicoquímica del jugo de piña se realizaron análisis correspondientes a pH, °Brix, conteo de células, azúcares totales y azúcares reductores. Para estos experimentos se tomó una muestra representativa por triplicado del jugo de piña, con la finalidad de comprobar los resultados.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se muestran a continuación:

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica del jugo de piña

Muestra	pH	° Brix
1	4,02	11,1
2	4,05	11,4
3	4,01	12,3
Promedio	4,03	11,6

En esta tabla se puede observar que los valores arrojados por la caracterización físico química del jugo de piña en cuanto a pH y °Brix son adecuados para que se pueda realizar el proceso de fermentación alcohólica, ya que el pH más favorable para el crecimiento de la *Saccharomyces cerevisiae* se encuentra entre 4.0 - 5.0, con un pH de 4.5 para su crecimiento óptimo [3].

Por otro lado, los valores obtenidos en cuanto a °Brix se encuentran dentro un rango común en lo que se refiere a esta fruta, siendo igualmente favorables para la realización de la fermentación.

Tabla 2. Azucares totales

Muestra	% P/P
1	46,73 %
2	46,81 %
3	46,70 %
Promedio	46,75 %

Al comparar el valor promedio obtenido para los azucares totales (46,75%) con la bibliografía consultada (40,8%) observamos que el valor se haya por encima del de la literatura, esto puede deberse a que las fuentes consultadas fueron de mango ya que no se hallaron sobre la piña[16]. Este valor se considera aceptable ya que el contenido de azucares es asociado a los grados Brix,

Tabla 3. Azucares reductores

Muestra	% P/P
1	28,70 %
2	28,52 %
3	28,34 %
Promedio	28,52 %

Al igual que para los azucares totales, los valores obtenidos se compararon con fuentes sobre el mango, encontrando los valores igualmente aceptables.

Tabla 4. Contaje de células

Muestra	Contaje de células (UFC/mL)
1	1,93x10 ⁸
2	1,98 x10 ⁸
3	1,51 x10 ⁸
Promedio	1,81 x10 ⁸

Al estudiar la literatura encontramos que el valor óptimo para que se lleve a cabo la fermentación se haya dentro de un rango entre 10^6 - 10^8 UFC/mL, ya que de encontrarse por encima la fermentación podría ser muy acelerada presentando pérdidas de etanol. En la Tabla 4 puede apreciarse el valor promedio obtenido. Si comparamos dicho valor con las fuentes consultadas encontramos que es acorde a lo establecido por la literatura.

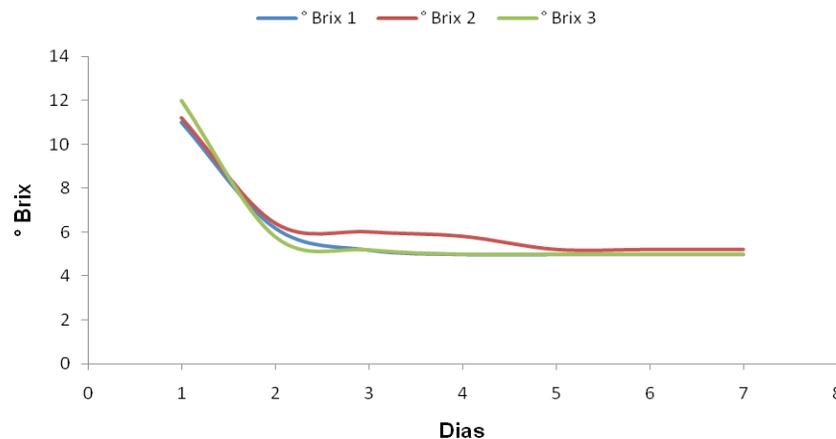
En la tabla que se muestra a continuación, se observa el comportamiento de los °Brix en cada uno de los envases donde se llevó a cabo el proceso de fermentación.

Tabla 5. Comportamiento de ° Brix durante el proceso de fermentación

Muestra	°BRIX							
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
1	11,1	11,0	6,2	5,2	5,0	5,0	5,0	5,0
2	11,4	11,2	6,4	6,0	5,8	5,2	5,2	5,2
3	12,3	12,0	5,8	5,2	5,0	5,0	5,0	5,0

En esta tabla se hace notable el consumo de sustratos a medida que pasa los días, lo cual se debe al consumo de los azúcares fermentables por parte de la levadura. Es de importancia destacar que los °Brix se mantienen constantes a partir del cuarto día en los envases 1 y 3 y del quinto en el envase 2, lo cual indica que la fermentación ha terminado. En la grafica 1 se observa el comportamiento de la fermentación.

Grafica 1. Comportamiento de ° Brix durante el proceso de fermentación



Una vez finalizada la fermentación se realizó la caracterización físico-química de la mezcla. Se habla de mezcla ya que durante el proceso de fermentación se producen diversos compuestos (además de etanol y agua).

Los valores obtenidos para la cantidad de etanol, así como su valor promedio se observan en la Tabla 6.

Tabla 6. Cantidad de Etanol en la muestra por cromatografía

Muestra	mg/L etanol
1	44.006,1
2	44.205,6
3	42.960,9
Promedio	43.724,2

En la investigación realizada por Sansen [16] se reporta un valor promedio de 25.000 mg/L etanol. Comparando con esta investigación podemos considerar que el valor que se obtuvo es mayor, considerando que para los fines de la presente investigación se trabajó con un tipo de levadura de uso común en las panaderías mientras que para la tesis del mango se utilizó un tipo de levadura productora de etanol.

Entre otros factores podemos mencionar los °Brix; en el caso de esta investigación fueron mayores que los valores de la investigación anterior lo cual favorece la generación de etanol

El método de destilación que se utilizó fue vía rota-vapor utilizando como muestra 500mL. Los resultados se muestran en la Tabla 7:

Tabla 7. Etanol obtenido con rota-vapor

Muestra	mL etanol obtenido
1	27
2	29
3	30
Promedio	28,67

Considerando los resultados obtenidos por el Cromatografo podemos afirmar que según dicho resultado en los 500 ml de muestra deberían estar contenidos 27,9mL de etanol. Puede apreciarse que los valores obtenidos para esta investigación se hayan ligeramente por encima, se considera que esto puede deberse a que el etanol no es completamente puro; es decir, que durante la destilación se obtuvo una mezcla agua-etanol, hallándose el agua en menor cantidad.

Los resultados obtenidos por Sansen [16] fueron en promedio 26,7 mL en comparación con el valor promedio de esta investigación (28,67 mL) se puede observar que el volumen de etanol obtenido se encuentra levemente por encima.

Tabla 8. Conversión de jugo de piña a etanol

Muestra	% Conversión
1	5,4 %
2	5,8 %
3	6,0 %
Promedio	5,73 %

Finalmente, para esta investigación, se determinó el grado de conversión de jugo de piña a etanol alcanzándose un promedio de 5,73% v/v. Si lo comparamos una vez más con la investigación realizada por Sansen [16]. de la cual tenemos que el porcentaje fue, en promedio 5,33%, podemos afirmar que los valores obtenidos fueron buenos, y en un rango que podría, decirse, acorde para el tipo de separación.

Agradecimiento

Los autores agradecen la colaboración de los miembros del Laboratorio de Fermentaciones Industriales, de la Facultad de Ingeniería, de la Universidad del Zulia.

Conclusiones

- Durante la caracterización fisico-química del jugo de piña se pudo corroborar que este cumple con los parámetros necesarios para poder llevar a cabo el proceso de fermentación alcohólica, debido a que los valores de: pH fue de 4,03; °Brix de 11,6; contaje de células de $1,81 \times 10^8$ UFC/mL; azúcares totales 46,75% p/p y azúcares reductores 28,52% p/p, los cuales entran en los parámetros establecidos en la literatura.
- El proceso de fermentación culminó aproximadamente entre el cuarto y quinto día. Esto se observó al momento en que los °Brix se mantuvieron constantes, lo cual indicó el consumo de sustrato por la levadura.
- El valor obtenido por cromatografía fue de 43.724,2 mg/L, llevándolo a unidades de volumen serían 55,18mL por cada litro de mezcla, esto nos lleva a concluir que a mayor cantidad de °Brix se produce mayor cantidad de etanol.
- La cantidad de etanol obtenida fue de 28,67mL, la cual estuvo ligeramente por encima de lo esperado, en comparación a lo determinado en la cromatografía. Es por ello que se considera que el etanol obtenido no es completamente puro; presentando una pequeña cantidad de agua.
- La conversión de jugo de piña en etanol obtenida fue de 5,73 % a pesar de que el tipo de levadura empleado en esta investigación no fue del tipo productora de etanol se considera un buen valor para el método empleado.

Referencias bibliográficas

1. Michel Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and Fred Smith "Colorimetric method for determination of sugars and related substance" 1956
2. G. L. Miller., "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar". March 1959 31 (3), pp 426-428
3. Universidad Nacional de Colombia. Lab de Operaciones Unitarias III. Guías de Fermentación. 2000.
4. Tanaka K., Hilary, Z. D. y Ishizaki, A. Investigation of the utility of pineapple juice and pineapple waste material as low-cost substrate for ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 87, No. 5, (1999),642-646.
5. J.N. Nigam. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste. Journal of Biotechnology, Vol.72, No.3, (1999),197-202.

6. Paulo A.G. Soares, Antônio F.M. Vaz, Maria T.S. Correia, Adalberto Pessoa Jr., MariaG.Carneiro-da-Cunha. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. *Separation and Purification Technology*, Vol. 98, (2012), 389-395.
7. Chalerm Ruangviriyachai, Chatchanun Niwaswong, Narong Kosaikanon, Saksit Chanthai,PatiwatChaimart. Pineapple Peel Waste for Bioethanol Production. *Journal of Biotechnology*, Vol.150,(2010),10-25.
8. Sonali Patle, Banwari Lal. Investigation of the potential of agro-industrial material as low cost substrate for ethanol production by using *Candida tropicalis* and *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy*, Vol. 32, No. 7, (2008), 596-602.
9. Aporn Laorko, Zhenyu Li, Sasitorn Tongchitpakdee, Suphitchaya Chantachum, Wirote Youravong. Effect of membrane property and operating conditions on phytochemical properties and permeate flux during clarification of pineapple juice. *Journal of Food Engineering*, Vol. 100, No. 3, (2010), 514-521.
10. Nana O.K. Mainoo, Suzelle Barrington, Joann K. Whalen, Luis Sampedro. Pilot-scale vermicomposting of pineapple wastes with earthworms native to Accra, Ghana. *Bioresource Technology*, Vol. 100, No. 23,(2009), 5872-5875
11. Vasimon Ruanglek, Damrongdech Maneewatthana, Sudarut Tripetchkul. Evaluation of Thai agro-industrial wastes for bio-ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, Vol. 41, No. 6, (2006), 1432-1437
12. F. Tao, J.Y. Miao, G.Y. Shi, K.C. Zhang. Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition. *Process Biochemistry*, Vol. 40, No. 1, (2005), 183-187.
13. Roberta T.P. Correia, Patrick McCue, Margarida M.A. Magalhães, Gorete R. Macêdo, Kalidas Shetty. Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus* .*Process Biochemistry*, Vol. 39, No. 12, (2004), 2167-2172.
14. On-ong Chanprasartsuk, Cheunjit Prakitchaiwattana, Romanee Sanguandeeekul, Graham H. Fleet.. Autochthonous yeasts associated with mature pineapple fruits, freshly crushed juice and their ferments; and the chemical changes during natural fermentation. *Bioresource Technology*, Vol. 101, No. 19, (2010), 7500-7509.
15. Dominica Del Mundo Dacera, Sandhya Babel. Removal of heavy metals from contaminated sewage sludge using *Aspergillus niger* fermented raw liquid from pineapple wastes. *Bioresource Technology*, Vol. 99, No. 6,(2008), 1682-1689.
16. Sansen, Luis F; Vargas F. Marlon J. 2009 “Obtención de Etanol por medio de la Fermentación Alcohólica del jugo de mango”. Universidad del Zulia. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química. Trabajo Especial de Grado..