

**IMPACTO DE LA MICROBIOLOGIA EN  
LA FABRICACION DEL AZUCAR**

Programa Fondo de Nuevos Desarrollos  
ASOCAÑA - ORSTOM  
1992 - 1993

*Informe elaborado por:*  
Dr. Maurice RAIMBAULT  
*en el marco del Convenio*  
ASOCAÑA / ORSTOM

A 41.706 ex 1



- FEBRERO de 1994 -

asocaña  
cenicaña

13 JUIN 1995

ORSTOM Fonds Documentaire  
N° : 41.706 ex 1  
Cote : A

# índice

1 - Presentación General del Proyecto

2 - Analisis de los resultados

3 - Anexos de los trabajos de tesis

4 - Referencias bibliograficas

## Presentación General del Proyecto

## PROYECTO PRESENTADO AL FONDO DE NUEVOS DESARROLLOS ASOCAÑA

*Titulo: Programa de Estudios Preliminares sobre el impacto de la Microbiología en la fabricación del azúcar.*

### Antecedentes:

En el cuadro del convenio Asocaña/Orstom estaba previsto iniciar unos estudios sobre los aspectos de bioconversiones de los desechos y subproductos de la caña de azúcar, en relación con los aspectos prioritarios encontrados en los ingenios causados por los microorganismos.

### Justificación:

El presente programa de investigación esta relacionado con las perspectivas de mejoramiento de los procesos de fabricación del azúcar, particularmente en lo que concierne las perdidas de azúcar, la calidad de la caña y el aprovechamiento de los desechos y subproductos de caña.

Después del analisis realizado y presentado el 25 de Mayo, se propone el siguiente programa que se realizará con estudiantes de grados de la Universidad del Valle en relación con los Ingenios y Cenicaña. Eso permitirá definir los criterios de manera mas precisa acerca de los proyectos previstos, y capacitar estudiantes a las tecnicas microbiológicas y fermentativas. Este programa se realizara en el cuadro de la prolongación del convenio con Orstom prevista para un año, con la asesoria del Dr. M. Raimbault.

Se espera que el presente programa permitira obtener las informaciones necesarias para la toma de decision sobre un Centro de Transferencia de Tecnologia.

### Objetivos y Estrategia:

El Objetivo general del Programa consiste en la realización de cuatro estudios:

1. Estudio de la microflora lactica de los jugos de caña en relación con la calidad de la caña y las perdi das de azúcar.
2. Efecto de la adición de enzimas sobre la extracción del jugo de caña.
3. Fermentación alcohólica del bagazo de caña inoculado con levaduras por FMS.
4. Producción de Acido Láctico a partir de Vinazas de destileria.

Cada uno de estos estudios debe permitir obtener la información necesaria para asegurarse de la factibilidad y definir los criterios para desarrollar un proyecto a escala preindustrial.

Estos estudios permitirán también establecer la metodología básica para la evaluación del impacto de los microorganismos en la fabricación del azúcar.

Este programa se realizará a través de 4 trabajos de tesis de grado de la Universidad del Valle, tanto en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud (Responsable Prof. Miriam Astudillo), como en el Departamento de Procesos Químicos y Biológicos de la Facultad de Ingeniería (Responsables Prof. Olga Rojas y Jairo Alonzo).

### Actividad y Ejecución:

En el anexo adjunto, se detallan los objetivos específicos, el programa de actividad y la metodología que se aplicarán para cada uno de los cuatro temas de investigación.

El programa se realizará en el cuadro del convenio Orstom / Asocaña, bajo la responsabilidad del Dr. Maurice Raimbault. Los trabajos se realizarán en los laboratorios de la Universidad del Valle en relación con los ingenieros y técnicos del sector.

### Calendario:

	Julio	Agos	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Juni
<b>1. Microflora láctica de jugos de caña</b>												
- Conteo de los grupos bacterianos	-----											
- Microflora láctica		-----										
- Correlación con pérdidas					-----		-----					
- Efecto de bactericidas							-----					
- Evaluación calidad microbiol. caña										-----		
<b>2. Uso de enzimas de maceración</b>												
- Ensayos de enzimas en ARE	-----											
- Definición concentración; mezclas				-----								
- Efecto sobre composición jugos							-----					
- balance azúcar en jugo y bagazo										-----		
<b>3- Ferment. alcohol. del Bagazo</b>												
- selección y cultivo de levadura	-----											
- FMS de bagazo inoculado			-----									
- balance azúcares alcohol							-----					
- balance calorico										-----		
<b>4- Acido láctico con vinazas</b>												
- Selección de cepas de Lactobacillus		-----										
- Optimización cultivos en vinazas				-----								
- Ensayos proceso continuo							-----					
- Balance de proceso											-----	

### Administración:

El programa será realizado bajo el control del Consejo Tecnológico de Asocaña, con el apoyo de Cenicaña en lo que concierne la administración, la documentación y el apoyo técnico. Los trabajos se realizarán en la Universidad del Valle en el cuadro de un convenio entre Orstom y Univalle.

Presupuesto:

Para realizar esos trabajos se necesitan los siguientes requisitos para el año 1992-1993

Personal:..... 4 becas de 12 meses .....	2,000.000
Gastos de viajes y transportes.....	500,000
Suministros: Productos quimicos.....	1,000.000
. Vidrios de laboratorio.....	1,000.000
. Materiales de laboratorio.....	5,000.000
Gastos de Administración .....	300.000
Documentación y Publicacion.....	200.000
Equipos:..... 1 HPLC para analisis de jugos y mostos fermentados..... (prestado a la Universidad del Valle)	10,000.000
	-----
TOTAL:	20,000.000

Plan de financiación:

- Al inicio del programa:.....	Equipo: 10,000.000	
	suministros: 5.000.000.....	S/T: 15,000.000
- Julio 92/dic. 92.....	Personal.: 1,000.000	
	Admin.....: 150.000	
	Viajes y Transp.: 250.000	
	Document. : 100.000.....	S/T: 1,500.000
- Enero93/ Julio 93.....	Personal.: 1,000.000	
	suministros: 2,000.000	
	Administ.....: 150.000	
	Viajes y Transp.; 250.000	
	Publicacion : 00.000.....	S/T: 3,500.000

Riesgos:

Como todos los programas de investigacion basica aplicada, los riesgos de no obtener los resultados esperados para validar los proyectos tecnologicos a un nivel preindustrial pueden ser altos. Pero como son 4 proyectos diferentes los riesgos quedan reducidos para una inversion comun, y un monto bastante bajo en comparacion de los beneficios esperados.

En cuanto a los objetivos generales, se debe considerar que se obtendrán resultados de varias categorías. Unos son de tipo metodológico, otros de capacitación y otros de tipo tecnológicos. Los riesgos de no obtener resultados utilizables o aplicables para el mejoramiento de los procesos fabriles parecen poco probables.

### Beneficios esperados:

Los beneficios esperados conciernen las perspectivas de implementar unos de los proyectos preindustriales presentados en el documento de síntesis sobre un Centro de Transferencia de Tecnología realizado en colaboración con la cooperación francesa.

Cada uno de los proyectos tiene como perspectiva el mejoramiento de los rendimientos de fabricación del azúcar, con un objetivo de ganar uno o dos puntos de recuperación del azúcar contenido en la caña. Eso procuraría una ganancia de un nivel mucho más alto que el costo del presente programa.

Además, otros proyectos tienen como perspectivas valorizar el azúcar no recuperado que todavía queda poco valorizado en mieles o en bagazo, y aplicar nuevas alternativas de tratamiento de los efluentes o desechos de la actividad azucarera.

### Seguimiento del Proyecto:

En lo que conciernen los informes y resultados se prevé lo siguientes:

Cada uno de los estudiantes presentará un informe trimestral de sus actividades antes los ingenieros y técnicos en Cenicaña o en Univalle. Además deberán entregar un informe por escrito en Septiembre 92 para la presentación de su programa de actividad, en Marzo de 1993, un informe de avances, y las memorias de su tesis de grado en Junio de 1993.

### Terminación del Proyecto:

El programa se terminará después de 12 meses con la entrega de las memorias de los trabajos de tesis de grado, y una síntesis de evaluación de los resultados presentada por el responsable del programa.

## Programa de Tesis de Grado - UNIVALLE

Nombre del estudiante : **Zoraida Alejandra MORA H.**

disciplina: **Biología**

Laboratorio: Univalle, San Fernando / Ing. Castilla

Financiamiento: Programa ASOCAÑA / ORSTOM

Responsable: Dr. Maurice RAIMBAULT

**TITULO: Estudio de la microflora lactica de los jugos de caña en relación con la calidad de la caña y las perdidas de azúcar.**

### *Antecedente:*

- La revision bibliografica del Dr Raimbault y el interes de los ingenios, el de Central de Castilla en particular, indican el impacto importante de las bacterias lacticas (sobre todo de *Leuconostoc*) sobre la calidad de la caña y la eficiencia de la fabricacion de azucar.
- Se iniciaron unos trabajos con Carlos Figueroa sobre *Leuconostoc* en fermentacion agria del almidon de yuca
- Los dextranas de *Leuconostoc mesenteroides* tienen importancia en el sector azucarero y en el sector agro-alimenticio.

### *Objetivos:*

- Definir la metodologia para evaluaci3n de la contaminaci3n de la caña
- Aislar y estudiar cepas de *Leuconostoc* en relaci3n con la produccion de dextranas
- Medir el efecto de la microflora lactica en jugo de caña

### *Programa:*

- Definir la tasa de contaminacion bacteriana de un jugo de caña
- Aplicar la metodologia para definir la presencia de microflora lactica en las varias etapas de fabricaci3n del azucar (Molienda, filtraci3n, clarificaci3n, cristalizaci3n, centrifugaci3n, melzas) y ver el efecto de los bactericidas.
- Correlacionar la cantidad de dextranas, acido lactico, invertasa, alcohol, con la micoflora lactica y levaduras
- Evaluar el efecto de los bacteriocidos sobre la perdida de azucar
- Aislar cepas de *Leuconostoc* productoras de dextranas y estudiar sus caracteristicas fisiologicas de cultivo

### *Metodo:*

Definir las muestras de caña y la extracci3n del jugo de caña con el laboratorio de calidad del Ingenio Central de Castilla  
Aplicar medios de cultivos selectivos para microflora total, lactica, levadura, *Leuconostoc*  
Analizar los jugos con HPLC para azucares, dextranas, acido lactico, alcohol.

### *Literatura:*

Bibliografía sobre pérdidas de azúcares por bacterias y problemas de dextranas de *Leuconostoc* en procesos de elaboraci3n.



## Programa de Tesis de Grado - UNIVALLE

Nombre del estudiante : **Maria Cilia SARRIA**

diciplina: Bioquimica / Biologia

Laboratorio: UNIVALLE / CENICANA

Financiamiento : Programa ASOCAÑA / ORSTOM

Responsable: Dr. Maurice RAIMBAULT / Jesus LARAHONDO

***TITULO: Efecto de la adicion de enzimas sobre la extraccion del jugo de caña.***

### *Antecedente:*

La extraccion del jugo de caña se opera durante la fase de la molienda de la caña. Esta operación fue objeto de optimizacion mecanica y hidrolíca. Resulta un rendimiento muy bueno de la recuperacion del azucar; pero todavia se pierde 4 à 5 % del azucar en el bagazo. Ademas es necesario añadir agua de maceracion lo que provoca una dilucion del jugo de caña (de 20 a 16 Brix), para despues reconcentrarlo hasta 60 Brix.

En otros procesos se ha demostrado el interes de adicionar enzimas hidrolíticas para facilitar la extraccion de jugos de planta. Es el caso de la extraccion de aceites de coco y de aceituna.

### *Objetivos:*

El objetivo principal consiste en definir el potencial que tiene la adicion de enzimas de maceracion sobre la tasa de recuperacion del azucar del bagazo. Optimizar la adicion de enzimas y definir cuales enzimas son más eficientes en el proceso de la molienda de la caña.

Se tratara tambien de saber si con rendimientos equivalentes se puede obtener jugos mas concentrado para mejorar la eficiencia y bajar el costo de concentracion de los jugos.

### *Programa:*

- Evaluar el potencial de adicionar ciertas enzimas sobre la tasa de recuperación del azúcar
- Definir la concentracion de las enzimas efectivas (lignocelulasas, pectinasas, hemicelulasas, amilasas, dextranasas) solas o en forma de mezclas.
- Efecto de las enzimas sobre el % de extraccion del azucar, la viscosidad y la composicione del jugo.

### *Metodo:*

- Utilizar un molinito de laboratorio (CENICAÑA) para realizar las pruebas de extraccion
- Utilizar enzimas comerciales (lignocelulasas, amilasas, pectinasas, hemicelulasas) para hacer los ensayos y definir las cantidades necesarias
- Analizar los jugos de caña obtenidos con HPLC, viscosimetro, polarografo
- Analizar el bagazo por contenido de azucares, fibras, agua
- Definir en cada caso el balance de azucares

### *Literatura:*

- Bibliografia Cenicaña / Orstom

## Programa de Tesis de Grado - UNIVALLE

Nombre del estudiante : **Fernando BOLIVAR M. y Alejandro LOPEZ M.**

diciplina: Ingeniería procesos / Biología / Saneamiento Ambiental

Laboratorio: Saneamiento Ambiental Univalle / Ingenios

Financiamiento: Programa ASOCAÑA / ORSTOM

Responsable: Dr. Maurice RAIMBAULT

**TITULO: Producción de Acido Lactico a partir de Vinazas de destileria.**

### *Antecedentes:*

- Estudios sobre tratamientos de vinazas para producir Biogas
- Estudio de Dr. J. Rockey sobre analisis de oportunidad de tratmientos de vinazas
- Perspectivas en tratamiento de vinazas y manipueras de yuca

### *Objetivos:*

- Verificar las cifras de la literatura sobre produccion de acido lactico a partir de vinazas
- Seleccionar las cepas mas adaptadas a las vinazas
- Definir las bases de un estudio pre-industrial

### *Programa:*

- Fermentacion lactica de las vinazas con varias cepas de Lactobacillus homolacticos.
- Utilizacion de vinazas concentradas de 1 a 6 veces como medio de cultivo
- Estudiar la toxicidad de ciertos componentes (cenizas, acidos)
- Influencia de la temperatura y del pH
- Precipitacion con cal y recuperacion de lactato
- Balance del proceso

### *Metodo:*

Fermentacion liquida de vinaza  
Evaporador bajo vacio  
control de pH  
analisis de jugos de fermentacion con HPLC  
analisis de cenizas

### *Literatura:*

- J. Rockey in Food microbiology (elsiever)
- Tratamiento de vinazas par produccion de Biogas (Univalle, Sucromiles) por UASB
- Perspectivas de aplicacion en sector azucarero y yuquero

## Programa de Tesis de Grado - UNIVALLE

Nombre del estudiante : **Dario BALLESTEROS H. y Jose A. ESTELA**

diciplina: .....Ingenieria de Procesos, Ingenieria Ambiental, Biologia

Laboratorio: Departamiento de procesos Fac. Ingenieria / Ingenios

Financiamiento: Programa ASOCAÑA / ORSTOM

Responsazble: Dr. Maurice RAIMBAULT

**TITULO: Fermentación alcohólica del bagazo de caña inoculado con levaduras por FMS.**

### *Antecedente:*

- Tesis de Doctorado de G. Saucedo en Orstom, Francia
- Analisis de oportunidad de bio-procesos en sector azucarero
- Proyecto CEE STD3 sobre tratamiento anaerobico de desechos de yuca

### *Objetivos:*

- Aplicar los resultados y metodolgia de G. Saucedo a fermentacion alcohólica del bagazo
- Evaluar el interes potencial de la fermentacion del bagazo en termino de valor termico
- Definir las condiciones de fermentacion y limitaciones de recuperacion de alcohol.

### *Programa:*

- Realizar fermentacion anaerobica con levaduras del bagazo saliendo de los molinos
- Estudiar el efecto de la levadura y de la cantidad de inculo necesaria
- Efecto de las condiciones ambientales encontradas en ingenio
- Definir la bioconversion de azucares en alcohol
- Definir el valor calorico como combustible del bagazo antes y despues de la fermentacion alcohólica.

### *Metodo:*

- Micro fermentadores de columnas (100 g, 10 Kg)
- Cultivos de levaduras en reactores liquidos
- Levaduras cultivadas, levaduras de panaderia, mostos de fermentacion alcohólica, vinazas
- HPLC, CPG, balance fuente de carbono
- Bomba calorimetrica o valor BTU equiv.

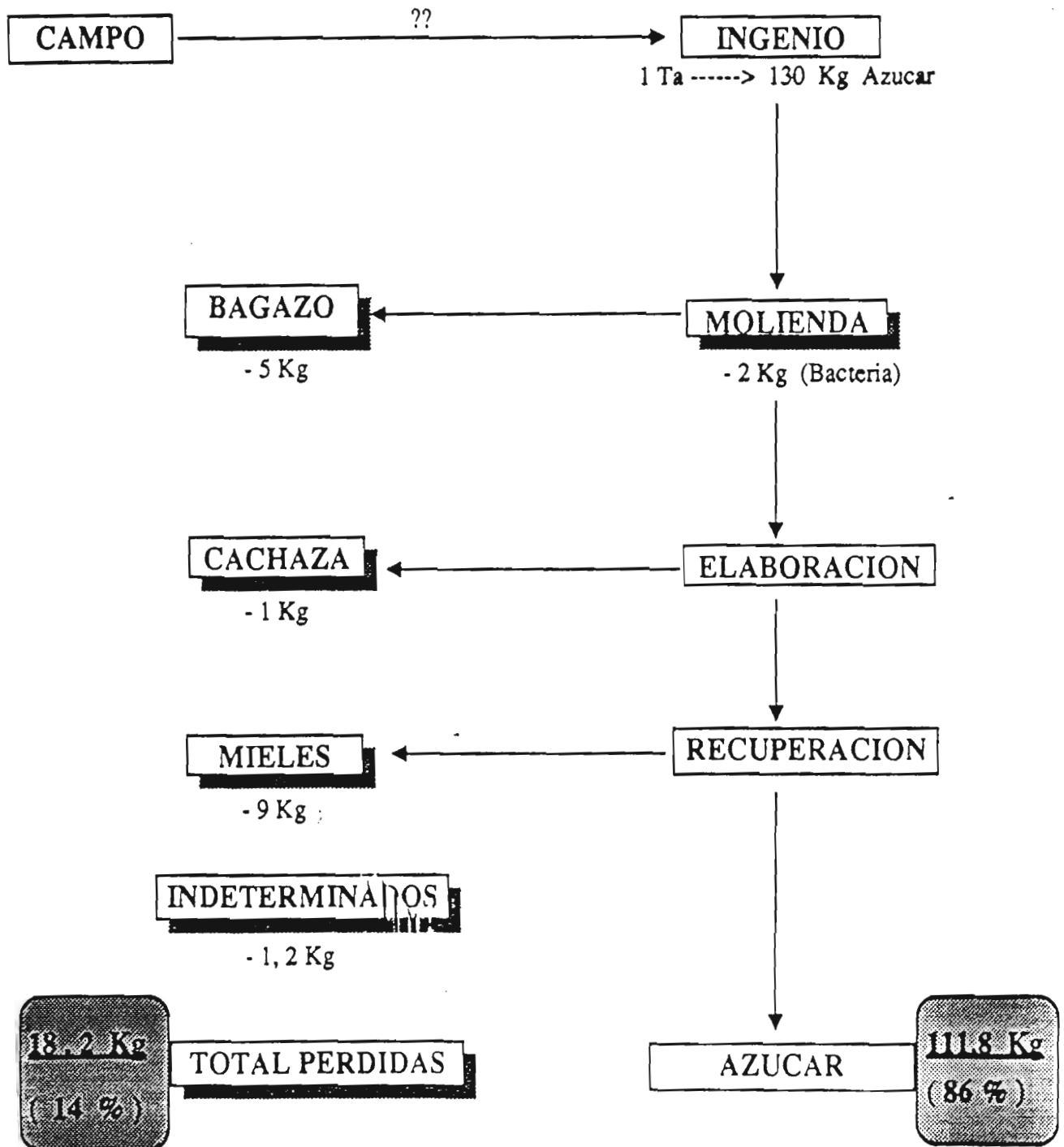
### *Literatura:*

- Bibliografia de G. Saucedo
- Informacion tecnica de calderas de bagazo en ingenios

## Analisis de los Resultados

- 1 - Extracción del azúcar de la caña molida con enzimas
- 2- Evaluación de la microflora en los jugos de caña en la molienda
- 3- Valor calórico del Bagazo en relación con la fermentación
- 4- Tratamientos de vinazas de destileria y fermentación láctica

# PERDIDAS DE AZUCAR



## Preambulo:

Como parte del convenio firmado entre ORSTOM y ASOCAÑA, el Fondo de Nuevos Desarrollos aprobó un programa de estudios preliminares sobre el impacto de la Microbiología en la fabricación del azúcar. El Desarrollo del programa esta coordinado por Consejo Tecnológico.

Para la realización de este trabajo se conformo 4 grupos de trabajos con estudiantes, profesores de la Universidad, tecnólogos e ingenierios del sector. Además con el presupuesto asignado, manejado en Cenicaña, se compró un equipo de HPLC de marca MERCK HITACHI especialmente conformado con columna y metodolgia par analisis de azucares ; acidos organicos y alcoholes provenientes de la actividad microbiana. Este material esta ya instalado y foncionando en el Laboratorio de Bioconversion Orstom/Univalle en la Universidad del Valle.

Los trabajos de estudiantes se desarrollan pro parte en la Universidad del Valle (sede Melendez y San Fernando), en el Ingenio Castilla y en el laboratorio de Quimica de Cenicaña.

### 1. Efecto de enzimas sobre eficiencia de extraccion de los azucares de la caña. (anexo n°1)

Este programa fue realizado por Maria Cilia SARRIA, estudiante de pregrado de Biología en la Universidad de Santiago de Cali desde el fin de 1992, hasta fines de 1993. El trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Quimica del Centro de Investigación de CENICAÑA, con el apoyo del Dr. Jesus LARRAHONDO.

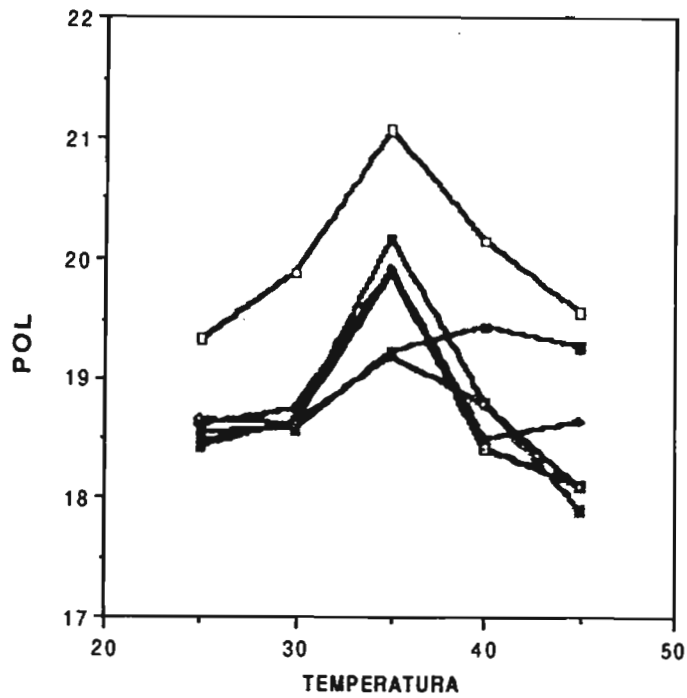
Se ha establecido la metodologia de medición de eficiencia de extracción del azucar, aplicando un metodo de agitación mecanica, ya usada en este laboratorio.

Despues se estudió el efecto de la temperatura del agua de maceración y el tiempo de maceración.

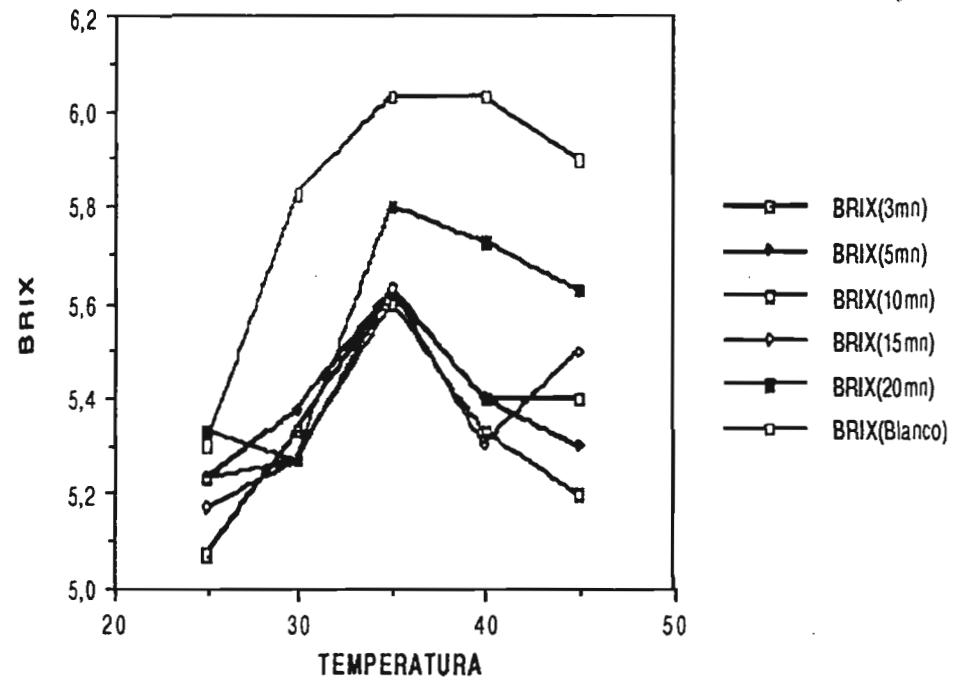
Obtuvimos de los representantes de Novo y de Gist Brocades de Colombia la información pertinente acerca del uso de enzimas en la fabricaión del azucar, y muestras de las enzimas comerciales siguientes:

ENZIMA	DOSIS (solucion madre)	Precio / Kg	Condiciones optimas	COSTO (US\$ /TaAz)
DEXTRANASA	200/100ml	35 \$US/Kg	pH = 5,5 Temp. = 55°C	5
TERMAMYL 120L	20 mg/ 100 ml	5,5 \$US/Kg	pH= 7 40<Temp.<95°C	0,075
CELLUCLAST 1,5 SP-262	300mg/100ml	23 \$US Kg	pH=4,8 Temp.=400C t=20 mn	4,6
CELLULASASP-249	300mg/100ml	---	pH=5,5 Temp. 40-50 °C	---
RAPIDASE C80	50 mg/100ml	---	pH = 3 - 6 opt. 4,5 Temp. = 50-55°C	---

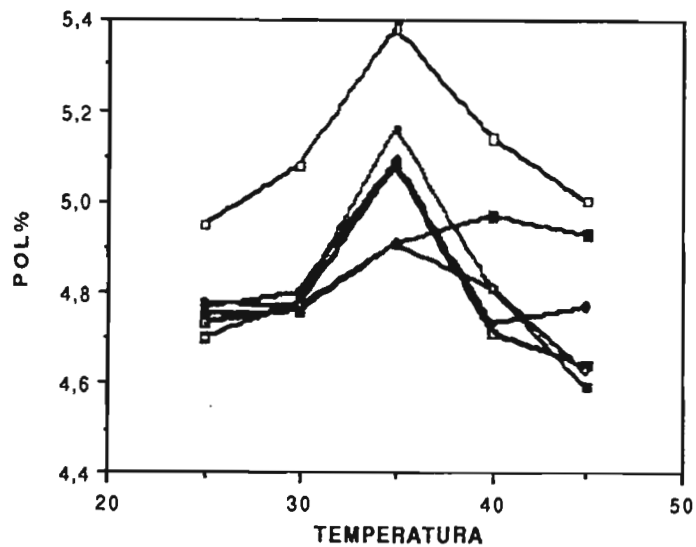
Influencia de la temperatura sobre POL



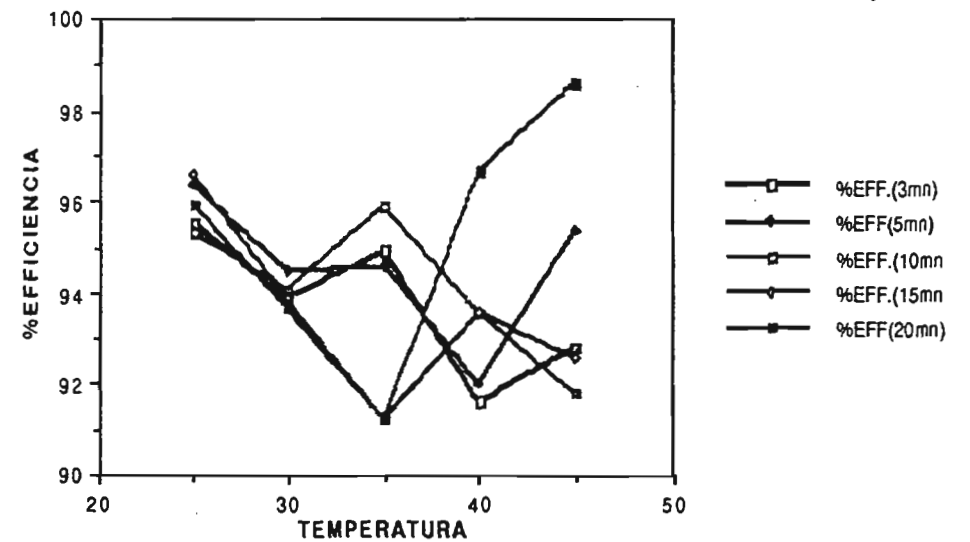
Influencia de la temperatura sobre BRIX



Influencia de la temperatura sobre POL%



Influencia de la temperatura sobre el % eficiencia



Variedad : V 7151

TEMPERATURA °C	% POL	% BRIX	% POLEXT
Agosto 10 de 1993			
25	22.07	6.30	5.63
30	22.26	6.30	5.68
35	22.50	6.50	5.73
40	22.38	6.40	5.70
45	19.98	6.30	5.09
Agosto 19 de 1993			
25	21.90	6.20	5.59
30	22.10	6.10	5.64
35	22.45	6.50	5.72
40	22.39	6.30	5.70
45	21.82	6.10	5.57
Agosto 24 de 1993			
25	18.38	5.10	4.71
30	18.66	5.40	4.78
35	20.19	5.60	5.16
40	18.87	5.30	4.83
45	18.27	5.20	4.68
Agosto 30 de 1993			
25	19.25	5.40	4.93
30	19.46	5.40	4.98
35	20.52	5.70	5.23
40	19.94	5.50	5.10
45	19.16	5.40	4.90



## ANALISIS CON DIFERENTES ENZIMAS

T = Testigo                                      Variedad = V 7551  
 M = Muestra + Enzima                        Edad = 12 meses  
 Método utilizado = Extracción por agitación mecánica

Temperatura = 35°C                      Tiempo de extracción = 17min

Cellulast SP262

Tipo	%Pol	%Brix	%PolExt	PH	HPLC			Almidones ppm	Polisacar ppm
					%Sac	%Gluc	%Fruc		
T	23.96	6.5	5.10	6.7	6.009	0.075	0.099	28	298
M1	23.40	6.4	5.96	6.9	5.953	0.086	0.115	33	323
M2	23.08	6.9	5.87	6.8	6.019	0.099	0.136	28	266

Cellulasa SP249

Tipo	%Pol	%Brix	%PolExt	PH	HPLC			Almidones ppm	Polisacar ppm
					%Sac	%Gluc	%Fruc		
T	22.35	6.4	5.70	6.6	5.742	0.026	0.048	70	351
M1	22.39	6.4	5.71	6.6	5.394	0.051	0.070	64	361
M2	22.48	6.4	5.73	6.6	5.928	0.145	0.065	81	387

Rapidace C80

Tipo	%Pol	%Brix	%PolExt	PH	HPLC			Almidones ppm	Polisacar ppm
					%Sac	%Gluc	%Fruc		
T	21.86	6.19	5.58	6.6	5.514	0.056	0.076	66	311
M1	21.30	6.06	5.44	6.6	5.416	0.074	0.079	69	323
M2	21.37	6.07	5.46	6.6	5.069	0.095	0.123	68	235

En una primera etapa se realizó una investigación sobre el efecto de la temperatura y del tiempo sobre la eficiencia de extracción. Los resultados indicaron que el efecto de la temperatura es mucho más significativo que el tiempo de maceración, siempre y cuando es suficiente y superior a 10 minutos. (figura anexa 1)

Por eso se realizó una segunda serie de ensayos para averiguar el efecto de la temperatura entre 25 y 45 ° C con un tiempo de 10 mn (tabla anexa 2). Los resultados correspondientes confirman el efecto anterior, y un máximo de eficiencia de extracción a 35°C. Este efecto es similar para el POL, BRIX o el POL%.

Este resultado tiene bastante importancia porque hasta la fecha no se había demostrado tal efecto, y los ingenios aplican agua de diferentes temperaturas. La única referencia que encontremos al respecto concierne el artículo referenciado de GARCIA (1992) cual indica la influencia de la temperatura de 30 a 150°C del agua de imbibición sobre los polisacáridos. Valdría la pena profundizar nuestra observación, para apreciar el interés de hacer recomendaciones al respecto.

Después se hizo una investigación sobre el efecto de tres de las enzimas (Celluclast SP 262, Celulasa SP-249 y Rapidase C80) sobre la eficiencia de extracción a 35 y 45 ° C a 10 y 20 mn de maceración. Se incluyó en los análisis la determinación de los azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) con el apoyo de Myriam ROJAS ingeniera de CENICAÑA. De los resultados obtenidos por Cilia María SARRIA, no se puede concluir sobre un efecto positivo de adición de estas 3 enzimas sobre el contenido de sacarosa. Parece que la actividad de las enzimas es limitada a la temperatura y pH utilizados en la etapa de la molienda.

Se puede concluir que los mejores resultados son obtenidos en una temperatura de 35°C y un tiempo de 10 minutos. No tuvo posibilidad de hacer los ensayos con las otras enzimas (Termamyl 120L y Dextranasa por razón de tiempo y facilidades.

## **2. Estudio de la microflora contaminante de los jugos de caña durante la etapa de la molienda. (Anexo nº2)**

Este programa está realizado por Alejandra MORA, estudiante de pregrado de Biología en Univalle desde el mes de febrero de 1993. Este trabajo está desarrollado con el apoyo del Ingenio Castilla en el laboratorio de microbiología del Departamento de calidad, bajo la responsabilidad del Ing. Oscar OSPINA.

La revisión bibliográfica, la conformación de la metodología y los primeros ensayos fueron realizados en el laboratorio de Microbiología de San Fernando Univalle. Después, cuando el laboratorio de microbiología fue instalado, los trabajos continuaron en el Ingenio Castilla.

Una primera fase del trabajo consistió en el conteo de las microfloras naturalmente presentes en los jugos de primera extracción y en jugo diluidos representativos de la etapa de la molienda. Una campaña de determinación se realizó desde Abril hasta Diciembre de 1993. Se realizó el conteo de las microfloras en diluciones de jugo y numeración de los microorganismos viables en caja petri sobre medios de cultivos específicos:

- Microflora total en medio PCA
- Microflora láctica total en medio MRS
- Género *Leuconostoc* en medio MHS
- Levaduras y hongos en medio PDA

El seguimiento durante los 9 meses indica que la microflora se encuentra a un nivel básico bastante estable del orden de 2 Millones de microorganismos viables por ml de jugo. Parece que el número de microorganismos en el jugo diluido es parecido a lo del jugo de primera extracción, pero hay que tener en cuenta la dilución del jugo con agua de lavado, de un promedio de 25 a 15%. En este caso si, tendría un aumento de 13 a 38 % dependiendo del tipo de microflora.

	<u>Jugos de Primera Extracción</u> (Num. / ml de jugo)	<u>Jugos diluidos /0,85</u> (Num. / ml de jugo)	<u>% de Aumento</u>
Microflora total	1,95 . 10 <sup>6</sup>	2,21.10 <sup>6</sup>	13,00 %
Bacterias lacticas	1,61 .10 <sup>6</sup>	2,22.10 <sup>6</sup>	37,80 %
Leuconostoc	1,67 .10 <sup>6</sup>	2,10.10 <sup>6</sup>	25,70 %
Levaduras y hongos	1,36.10 <sup>6</sup>	1,53.10 <sup>6</sup>	12,50 %

Eso representa un nivel promedio del mismo orden que la inoculación de fermentadores para cultivo de microorganismos. Es decir que es un nivel aceptable comparativamente a otros líquidos naturales, y más limpio que muchos efluentes que contienen hasta mil millones de germen/ml, pero representa un nivel significativo que puede causar pérdidas y daños en el procesamiento del jugo.

Se observó también una variabilidad del contenido en azúcar de los jugos, cuales varían de 15,2 hasta 21,3 Brix en los jugos de primera extracción y entre 13,4 y 17,1 Brix en los jugos diluidos. Se analizó la posible correlación entre las pérdidas de sacarosa y el tiempo de permanencia de la caña. A pesar de que el coeficiente de correlación lineal no es significativo, existe un aparente tendencia de relación entre los dos factores.

En lo mismo sentido, los datos presentados en el anexo 2 indican una tendencia de relación entre el número de bacteria en los jugos de caña y el contenido de sacarosa. Este resultado podría ser interesante y significativo en cuanto a la relación entre los microorganismos contaminantes y la concentración de azúcar, apoyando la tesis de que una parte de las pérdidas de azúcar por la actividad de la biomasa microbiana, y la importancia de la calidad microbiológica de la caña. Eso necesitaría profundizar los análisis con más datos.

Este método de análisis de microflora se podría aplicar a una serie de datos sobre conteo de las bacterias en lotes de caña de buena calidad o de mala calidad, con y sin aplicación de bactericidas en los molinos para apreciar el efecto de dicho tratamiento. Eso podría permitir profundizar la posible correlación de contenido bacteriano con la calidad de la caña y el contenido de sacarosa en la etapa de molienda.

Paralelamente, el análisis de las mismas muestras de jugo de primera extracción y de jugo diluido, en HPLC permitiría apreciar la relación entre los azúcares, los ácidos orgánicos (acético, láctico) y el etanol y el contenido microbiano y la calidad de los jugos.

La microflora láctica global es la más activa con un crecimiento de 37,8%. Finalmente las bacterias de tipo Leuconostoc tienen un nivel de multiplicación de 25,7% y representan una gran parte de la microflora contaminante. Si se considera que en este tipo de medio hipersacarosado los Leuconostoc tienen la capacidad de producir dextranas, se debe dedicar más atención al desarrollo de esta microflora, porque no solamente provoca pérdidas de azúcar, sino también causan daños a los procesos de elaboración del azúcar.

### 3. Fermentación láctica de las Vinazas de destilería ( Anexo nº 3).

El trabajo se realizó por Alejandro LOPEZ y Fernando BOLIVAR en el Laboratorio de Bioconversión de la Universidad del Valle, con el apoyo de infraestructura microbiológica, y Biológica, incluyendo el uso de la HPLC comprada por Asocaña. Las muestras utilizadas vienen de la fábrica de Sucromiles, por razones de comodidad y del interés prestado.

Después de un análisis de la literatura seleccionada sobre los numerosos estudios realizados sobre el tratamiento de las vinazas, se inició el estudio más específico de la caracterización de las vinazas de Sucromiles, incluyendo el contenido de materia orgánica, y de los minerales, especialmente el potasio.

Se realizó después un estudio microbiológico del efecto tóxico de la vinaza sobre bacterias lácticas del cepario disponible en el laboratorio. Para eso se compara el efecto de 5 medios especialmente diseñados para eso, a base de medios específicos para bacterias lácticas y con varias concentraciones de vinaza, incluyendo un medio puro Vinaza. De las 7 cepas estudiadas, 4 pudieron crecer correctamente en caja Petri.

Después se realizó un ensayo de búsqueda de cepas de bacterias lácticas nativas a partir de varias muestras de vinazas o de lodos de las mismas. Eso permitió aislar unas diez cepas naturales de tipo láctica que fueron comparadas con las cepas de referencias, especialmente, *Lactobacillus plantarum*, *brevis* y *delbrückii*.

La última etapa del trabajo consistió comparar el crecimiento de 11 cepas seleccionadas sobre medios de cultivos a base de vinazas de varias concentraciones, incluyendo la posibilidad de fermentar vinazas concentradas (antes, y después de la precipitación del potasio). Para apreciar las cinéticas de fermentaciones en los varios medios de cultivo, el uso de la HPLC especialmente diseñada para análisis de azúcares y ácidos orgánicos es indispensable.

Los resultados presentados en la tabla 15 del anexo permite seleccionar las cepas que funcionan de manera homoláctica o heteroláctica en medios de cultivos a base de vinaza no diluida. Entonces se puede decir que las bacterias lácticas son operativas en este tipo de medio de cultivo, y que no existe la necesidad de diluir las vinazas, como en el caso de la digestión anaeróbica metánica. Pero el contenido de azúcares asimilables es relativamente bajo (un promedio de 10 g/l) que no permite alcanzar un nivel de concentración de ácido láctico suficientemente elevado para aplicar un proceso de recuperación industrial. Tendría por eso o concentrar las vinazas, o adicionar otra fuente de azúcares, como melazas de baja calidad o efluentes concentrados) para alcanzar una concentración suficiente de ácido láctico.

La cromatografía por HPLC de las vinazas permitió obtener información acerca de las concentraciones respectivas en sacarosa, glucosa, fructosa, y en ácido láctico, acético y etanol.

En el cromatograma se observan diferentes picos de los cuales seis han sido identificados. Estos picos y sus respectivas áreas nos dan una idea de qué cantidad de carga orgánica se puede reducir mediante las bacterias lácticas. Hay otros picos que aparecen en el cromatograma que no han sido identificados y cuya contribución (área) es grande, y que valdría la pena investigar más.

También con base en esta información se pudo hallar una DQO teórica y calcular en

que cantidad se puede reducir este valor. Los resultados son mostrados en la tabla No. 13 del anexo nº3. El alto contenido de ácido acético tanto en las vinazas antes y después de fermentación láctica debe ser debido a la proveniencia de las vinazas de la fábrica de Sucromiles que también procesa este mismo ácido acético en la misma fábrica.

#### **4. Fermentación alcohólica del bagazo de caña inoculado con levaduras por FMS. (Anexo nº4)**

Este trabajo fue realizado por Dario BALLESTEROS y Jose ESTELA en el Laboratorio de Procesos químicos y Biológicos con la participación de un Profesor, Jairo ALONSO.

Se realizó un estudio bibliográfico, y un informe sobre los métodos de cálculo de la energía calorífica de los combustibles utilizados en las calderas, particularmente el bagazo.

Después se desarrolló un estudio teórico, en el cual se realizaron los cálculos de simulación de una fermentación alcohólica del bagazo de caña. Se concluyó que la cantidad total de energía contenida en el bagazo fermentado disminuye con la fermentación, lo que es lógico a partir de la ecuación estequiométrica de la reacción de fermentación. Pero como el peso total baja también, con la pérdida del  $\text{CO}_2$ , la concentración calorífica y el poder combustible, puede aumentar ligeramente. Como el bagazo contiene poco azúcar, el efecto de la fermentación queda bastante limitado.

En la última etapa, se esperaba obtener información práctica y concreta sobre la variación de los parámetros del bagazo, sin fermentar, y después de fermentación con inoculación con *Saccharomyces cerevisiae*, a dos niveles de humedad (50 y 60%) con o sin adición de vinaza como líquido de impregnación del bagazo. Como la vinaza contiene azúcar, alcohol entre otros, se esperaba que la fermentación de los azúcares en alcohol, permitiría compensar la humidificación del bagazo para obtener un combustible comparable al bagazo, y permitir así eliminar una cantidad apreciable de vinaza sin costos altos.

Este trabajo experimental está en proceso de realizar, utilizando las infraestructuras disponibles de cultivos de microorganismos, cepas, reactores de fermentación y la HPLC proporcionada por Asocaña. Pero a la fecha no tenemos los resultados por razón de tiempo disponible de los estudiantes, y de la falla del termómetro de la bomba calorimétrica que se esperaba utilizar.

La conclusión más significativa de este trabajo de simulación teórica del Valor Calorífico Neto del bagazo que se realizó, consiste en lo que el parcial secado del bagazo, de 50 a 30% de humedad, tiene un efecto más significativo que la sola conversión del azúcar en etanol. Eso podría permitir eliminar una parte significativa de vinazas, mezclando el bagazo parcialmente secado con vinazas, para obtener rendimientos en calderas similares. Para eso podría ser interesante obtener la información del anterior.

#### **5. Método de análisis por HPLC de azúcares, ácidos orgánicos y metabolitos en jugos y efluentes.**

En el programa aprobado por el Fondo de Nuevos Desarrollos, se compró una HPLC de marca MERCK HITACHI equipada con columna Aminex HX80 para análisis de jugos de fermentación (azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes) con detector de refractometría. El

equipo fue instalado en el laboratorio de Bioconversion de la Universidad del Valle. Una cesion de formación de personal (tecnico, científico, y estudiantes del programa ) fue realizada con la participación de especialistas de Merck Columbia que vinieron de Bogota.

Despues de los ajustes necesarios (precolumna) y de la adquisición de otros materiales necesarios para el buen uso de este equipo (centrifuga, filtracion) el equipo esta funcionando desde el mes de junio. Despues de la verificaciones necesarias y de la validacion de los metodos de intergracion de los picos, se realizo estudios preliminares para analizar los jugos y liquidos .

Particularmente, aprovechemos la estadia de un investigador frances (Ph. Caulet) durante 3 meses en el laboratorio de Bioconversion para efectuar los ajustes en vista analisis de jugos de caña. Ahora el metodo esta establecido, y los analisis de jugo de caña pueden ser realizados de manera rutinaria sobre jugos de caña centrifugados, diluidos y filtrados. Las condiciones generales se encuentran a continuación:

#### Naturaleza de la columna y tipo de separación

- Columna : BIORAD amino HPX 87 H- Soporte : resina transplantada H+ ( copolymero de estireno y de sulfato de divinil-benseno)- Tipo de separación : interacción hydrophobe y cambio de iones

#### Condiciones Operatorias

- Disolvente - elutante : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 mM ( 12 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N, H<sub>2</sub>O bidistilada )-Flujo de elución : 0,8 ml/min- Presión : 800-900 PSI- Volumen inyectado : 20 µl- Temperatura del horno : 65°C

#### Tratamiento de las muestras

- Todas las muestras deben estar centrifugadas 10 min a 5000 tr/min después filtradas 0,45 µm antes del análisis

- Las diluciones de las muestras, o las soluciones de referencia, estan efectuadas dentro del l' éluent.

*Nota : Las muestras encierran las moléculas gruesas no podran estar dosificadas dentro de las condiciones operativas definidas. En efecto, las moléculas gruesas ( celulasas , pectinas...) salen primero, y al mismo tiempo que el almidon dentro de las aplicaciones. Por esto, el amidon no puede estar dosificado precisamente por esta técnica ( a menos que no haya impurezas dentro del medio*

#### Detector

- Detector del Refractómetro : permite detectar y d quq=antificar un gran numero de azucares, acidos orgánicos y alcoholes, pricipalmente presentes en jugos de caña, mieles, melazas y vinazas.

*Preeferimos la detención por "Refractométrica " a la detención "UV" , esta última es más sensible pero revela una alta cantidad de compuestos parasitos.*

El equipo y el apoyo tecnico esta disponible en este laboratorio para la realizacion de jugos de caña de varios tipos, en funcion del interes que pueden dedicar los ingenios, para conocer el enfoque de dicha analisis en relacion con la calidad de la caña.

En las tablas siguientes se reportan los compuestos que pueden detectarse en este tipo de metodologia asi como un ejemplo de los resultados obtenidos por nuestro equipo, y los principales compuestos detectados de manera rutinaria.

**Tiempos de retención (Rf) de diversos compuestos y áreas de los picos por una concentración determinada de 5 o 2,5 g/l en la solución inyectada. Clasificación por orden creciente de los Rf de refractometría**

**Condición de análisis :**

Columna BIORAD Aminex HPX 87 H

- Fase móvil : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 mmol/l dentro del agua

- Producción : 0,8 ml/min

- Temperatura : 65°C

- Volumen de inyección : 20 µl

Nombre	Conc. (g/l)	Rf refra	Area refra
Almidon	5,10	4,73	4,95E+05
Pectina	-	4,74	-
Rafinosa	5,00	5,63	4,43E+05
Ac. oxalico	5,00	5,68	4,45E+05
Celobiosa	5,00	5,71	4,62E+05
Maltosa	5,00	5,82	4,62E+05
Ac. citrico	5,00	6,22	4,40E+05
Ac. Tartrico	5,00	6,67	4,33E+05
Glucosa	5,00	7,04	5,01E+05
Sorbosa	4,80	7,24	4,72E+05
Ac. malico	5,00	7,39	3,95E+05
Manosa	4,90	7,47	4,56E+05
Galactosa	5,00	7,49	4,98E+05
Xilosa	5,50	7,54	5,54E+05
D- Fructosa	5,00	7,62	4,98E+05
Pyruvate de sodio	5,00	7,72	4,09E+05
Manitol	5,20	7,92	5,04E+05
Arabinosa	5,00	8,18	4,61E+05
Ribosa	5,00	8,63	4,38E+05
Ac. succinico	5,00	8,79	3,65E+05
Diacetil	5,00	12,67	3,79E+05
Acetaldehíde	-	14,11	1,12E+05
2,3 Butanediol	5,00	14,26	4,75E+05
PNPG	-	17,97	6,26E+05

**Condición de análisis :**

Columna BIORAD Aminex HPX 87 H

- Fase móvil : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 mmol/l dentro del agua

- Producción : 0,8 ml/min

- Temperatura : 35°C

- Volumen de inyección : 20 µl

Nombre	Conc. (g/l)	Rf refra	Area refra
Sacarosa	5	7,53	2,02E+06
Glucosa	5	9,07	2,96E+06
Fructosa	5	9,75	2,89E+06
Ac. Lactico	2,5	12,99	1,00E+06
Ac. acetico	2,5	15,51	5,14E+05
Etanol	2,5	21,79	6,45E+05

Utilización en el laboratorio de Univalle

Unos compuestos detectables con este metodo

## 6. Conclusion y Perspectivas.

Se puede apreciar que del programa previsto se ha realizado un porcentaje aceptable.

En vistas a unas demoras de entrega del equipo de HPLC, no se pudo todavía concluir sobre el interés de este método en el análisis de los jugos, pero valdría la pena completar los primeros resultados obtenidos.

De los resultados obtenidos se puede señalar:

- el efecto de la temperatura sobre la eficiencia de extracción del azúcar de la caña.
- la relación entre el contenido microbiológico y la concentración del jugo en sacarosa.
- La prueba de funcionamiento de las bacterias lácticas en vinazas no diluidas.
- El método de cálculo teórico del Valor Calorífico Neto del bagazo y el impacto del secado del bagazo.
- La disponibilidad de un método establecido de HPLC para el análisis de los jugos, mieles y vinazas y la determinación del contenido en azúcares, ácido acético, láctico y en etanol.

Quedamos disponibles a seguir adelante, asesorando unos trabajos de biología y de microbiología en función del interés del sector azucarero y de los ingenios.

Una de las líneas de trabajos que podrían desarrollarse podrían ser de las siguientes:

- Comprobación de la importancia de la temperatura del agua en la molienda para el porcentaje de extracción de la sacarosa.
- Precisar el interés del uso de unas enzimas, como la dextranasa y amilasa.
- Analizar los jugos de caña en HPLC en relación con la calidad y la elaboración del azúcar, (la inversión y bioconversiones)
- Valor calorífico del bagazo de caña parcialmente secado y mezclado con vinazas para la eliminación de las mismas.
- Procesamiento de vinazas con vistas a la eliminación del potasio, concentración y recuperación de compuestos de interés.
- Procesamiento de mieles con mismas vistas a la recuperación y a mejor calidad



Anexo nº 1

**EFFECTO DE LA ADICION DE ENZIMAS SOBRE LA EXTRACCION DE  
SACAROSA EN LA CAÑA DE AZUCAR**

**MARIA CILIA SARRIA**

**Trabajo de grado presentado como  
requisito parcial para la materia  
Ecología de X semestre.  
Profesor:  
Francisco TORRES**

**Universidad Santiago De Cali  
Facultad de Educación  
Departamento de Biología y Química**

**Trabajo realizado en CENICAÑA  
en el marco del programa ASOCAÑA / ORSTOM**

**Responsables: Dr. Maurice RAIMBAULT  
Dr. Jesus LARRAHONDO**

**CALI DICIEMBRE 1993**

## **RESUMEN**

El presente trabajo evalúa el potencial que tiene la adición de enzimas de maceración sobre la tasa de recuperación de azúcar en el bagazo de caña. Para ello se investigó la eficiencia de extracción de azúcar con un método de agitación mecánica donde se estudió bajo condiciones de temperatura y tiempo su influencia en la maceración.

Se emplearon métodos de análisis polarimétrico , refractométrico y de cromatografía HPLC. Los resultados indicaron que a una temperatura de 40°C el porcentaje de extracción fue muy significativo con el aumento del tiempo de extracción. Esto permitió definir las condiciones de aplicación para las enzimas Celluclast SP 262, Cellulasa SP 249 y Rapidase C80L. La enzima que presentó comportamiento significativo fue la Cellulasa SP 249, a una temperatura de 45°C y 10 minutos de extracción.

## 1. INTRODUCCION

La Industria Azucarera Colombiana se encuentra concentrada en el valle geográfico del río Cauca, representando un pilar fundamental en el desarrollo agroindustrial de la región. En 1991 la industria produjo cerca de 1.633.000 toneladas métricas en valor crudo de azúcar, de las cuales el 81% se destinó al consumo interno y el 18% se exportó como azúcar crudo, a Estados Unidos, Venezuela y Suriname. Azúcar blanco a Perú, Chile, Haití, México y Puerto Rico. Además de la producción azucarera, los subproductos del proceso fabril sirven de materia prima a otros sectores industriales como el de derivados por vía fermentativa, la alcoquímica y la industria papelera. Así por ejemplo, la producción de mieles es la base fundamental en procesos fermentativos para la elaboración de ácido cítrico, ácido acético, vinagre, alcohol etílico, acetato de etilo y levadura. La miel invertida (" High text molasses"), miel de 65° Brix, transformada en una mezcla de glucosa y fructosa mediante la acción de invertasas y la catálisis ácida, se utiliza en la industria panificadora, de licores y en la industria de dulces. El bagazo es usado como combustible en calderas ó es comercializado como materia prima en la industria papelera.

En resumen la industria azucarera con su mercado de exportación, no sólo es un mecanismo generador de divisas sino que se ha constituido en un factor importante en el desarrollo sucroquímico y bioindustrial del país.

En Colombia al igual que en otros países, el proceso de fabricación de azúcar consta de varias etapas, cada una de las cuales es optimizada de acuerdo a los requerimientos de cada factoría. Las etapas en general van desde la extracción del jugo por molinos; purificación del jugo que comprende sulfitación, alcalinización y clarificación con floculantes, evaporación por sistema de múltiple efecto, cristalización por simple efecto, centrifugación y secado del producto. De éstas etapas la extracción constituye la primera etapa del procesamiento del azúcar crudo. En este primer paso la caña es preparada para la molienda mediante cuchillas giratorias y desmenuzadoras que no extraen el jugo para pasar después al molino o trapiche en donde es exprimida; obteniéndose el jugo (guarapo) y un residuo de caña o bagazo. Para ayudar a la extracción del jugo, se aplican porciones de agua sobre la capa de bagazo cada vez que sale de cada unidad de molienda; esto contribuye a

extraer por lixiviación el azúcar. En las prácticas de molienda más eficientes el porcentaje de extracción de sacarosa (pol de extracción) es del 94-95%.

El bagazo final que sale del último molino contiene fibra leñosa, agua de un 45% a 55% y azúcar no extraído que puede alcanzar un valor de 1,5% a 2,2%. Aunque la pérdida en sacarosa es aparentemente pequeña, representa una cantidad elevada de dinero. Hasta el momento no existe ninguna alternativa que permita recobrar el azúcar contenido en el bagazo. Por esta razón, el presente trabajo de investigación tiene como objeto presentar un modelo experimental de recuperación del azúcar "pérdida" empleando un método de adición enzimática, incrementando así la tasa de recuperación sin alterar los costos de inversión.

## 2. ANTECEDENTES Y EVALUACION DE LA LITERATURA

La caña de azúcar es una gramínea tropical de la tribu (*Andropogoneae*); que se cultiva como un híbrido complejo (variedad) de dos ó más de las cinco especies del género *Saccharum*.

Actualmente en Colombia las variedades de caña más comercializadas son:

MZC 74-275 (Mayagüez Colombia).

CP 57-603 (Canal Point, Florida).

PR 61-632 (Puerto Rico).

Aunque cada una de estas variedades tiene características predefinidas en cuanto a composición y resistencia a plagas, éstas se ven generalmente afectadas por condiciones ambientales como salinidad, sequías, humedad, composición del suelo, lluvias etc. En general la caña de azúcar está compuesta de un 70% a 75 % de agua y un 25% a 30% de sólidos. Estos sólidos son unos de carácter soluble (15% a 20%) como la sacarosa, glucosa, fructosa y otros polisacáridos (sacarán, indigeno sugar cane polisacharide, glucano de robert's, galactomanano y dextranas) y otros de carácter insoluble o fibra (celulosa, hemicelulosa) que alcanza de un 10% a 15%. Además, en el guarapo se pueden encontrar ácidos orgánicos (aconítico, cítrico); aminonitrogenados que incluyen los aminoácidos (aspártico y glutámico), amidas (asparagina, glutamina) y proteínas. Así, como compuestos fenólicos (ácido caféico, flavonoides), polisacáridos insolubles (almidón), sales inorgánicas y minerales como potasio, calcio, magnesio, fósforo, hierro y silicio.

En el mundo existen tres procesos fabriles para extracción de sacarosa:

1. Extracción por molienda.
2. Extracción por difusión.
3. Combinando los dos anteriores.

El proceso de extracción por molienda se divide en dos partes: primero se prepara la caña para la molienda, con el objeto de hacer más fácil la alimentación de los molinos, de romper las estructuras duras y células para mejorar la extracción del jugo y segundo, la verdadera molienda de caña.

La preparación de la caña se lleva a cabo de varias maneras:

- Mediante uno ó dos juegos de cuchillas giratorias, que giran a velocidades que oscilan entre 400 y 700 rpm y un espaciamiento entre ellas de dos pulgadas aproximadamente, estas cuchillas cortan la caña en trozos pero no extraen el jugo.

- Una desfibradora que desgarrar los pedazos de caña, provenientes de las cuchillas, convirtiéndolas en tiras sin que haya extracción del jugo. Esto permite una alimentación más uniforme de los molinos, asegurando un aumento en la capacidad del trapiche en la extracción de sacarosa y haciendo que se pierda menos sacarosa en el bagazo.

En cuanto a la molienda, esta comienza en algunos países con una desmenuzadora o trituradora que consiste en dos ó tres rodillos con muescas profundas que pican la caña, exprimiendo de un 40% a un 70% del jugo. En Colombia, la mayoría de ingenios no tienen una desmenuzadora y la caña entra de la desfibradora directamente al primer molino (simulando una desmenuzadora). Generalmente hay cinco a seis molinos compuestos cada uno de tres masas dispuestas en forma triangular. Los rodillos se conocen respectivamente como rodillo superior o mayor, rodillo cañero (por donde entra la caña) o de alimentación y rodillo bagacero o de descarga. Los rodillos inferiores tienen una presión fija, mientras el superior es controlado por un émbolo hidráulico pudiendo subir, bajar o flotar según sean las variaciones en la alimentación de la caña.

Durante el proceso de molienda la caña preparada con un 70% a 80% de su peso en jugo, pasa a través de la desmenuzadora y de cada uno de los molinos, añadiéndose agua o jugo diluido al bagazo después de salir de cada molino diluyendo el jugo contenido y aumentando la extracción en

el siguiente molino a medida que se exprime el jugo. Este uso del agua se conoce como maceración, imbibición o saturación. La práctica general de imbibición se conoce como imbibición compuesta, en donde se aplica agua al bagazo que se dirige al último molino; el jugo del último molino es devuelto al bagazo que va al penúltimo molino; este jugo a su vez, se regresa al bagazo del molino anterior y así sucesivamente.

En los ingenios colombianos la extracción total alcanza un 95%, representada en un 70% de extracción por el primer molino y un 25% a 30% de extracción por imbibición. El porcentaje de agua de imbibición que se aplica en nuestro país es de un 30% en peso de agua y se hace en caliente.

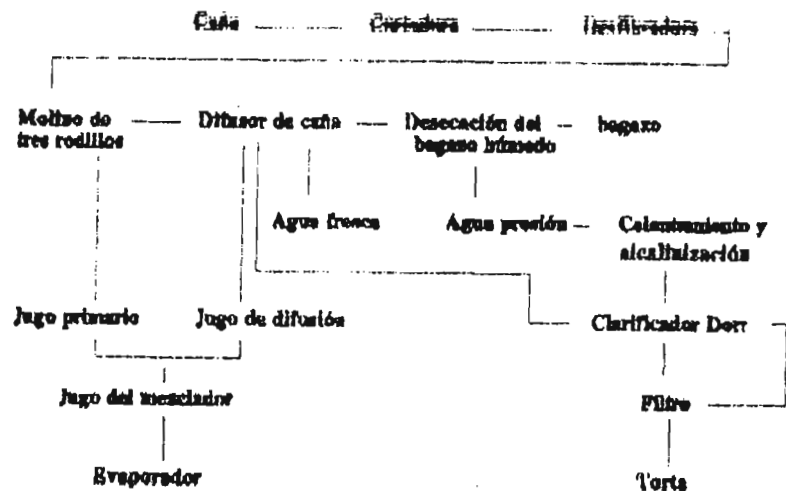
Toda la maquinaria de la molienda, incluye además, equipos que aumentan la capacidad y eficiencia de la molienda, como bandas transportadoras de caucho y rodillos y tornillos de alimentación.

En cuanto al proceso de extracción por difusión este no es utilizado en Colombia, pero tiene buena acogida en países como Australia, Sudáfrica y Estados Unidos (Hawai, Louisiana y Puerto Rico).

Un sistema de difusión emplea preparación de la caña, el propio difusor y deshidratación del bagazo. La deshidratación de la caña se lleva a cabo desfibrando o triturando (o ambas cosas) la caña. La combinación del equipo preparativo puede presentar diferentes alternativas; como instalar antes del difusor una desmenuzadora o un molino, dos juegos de cuchillas, dos juegos de cuchillas más desfibradoras; un juego de cuchillas más un triturador y un desfibrador; o un juego de cuchillas además de un desfibrador picador.

El difusor es una especie de licuadora con distintos aditamentos, dependiendo del diseño de fábrica para el flujo del jugo y del agua de difusión. El sistema en general trabaja en contracorriente con el agua de difusión y opera en secciones longitudinales, transversales o en combinación las dos anteriores. En la mayoría de los casos el sistema de difusión es usado en combinación con una preextracción por un molino y con tratamiento de agua a presión:

FIGURA 1. Diagrama del sistema de extracción por difusión



Cuando el bagazo abandona el difusor, lleva consigo agua absorbida así como agua libre (el bagazo seco puede absorber cinco ó más veces su peso en agua). El agua se elimina entonces, utilizando bandas transportadoras con perforaciones y por aplicación de presión al colchón de bagazo.

En la molienda recae una gran responsabilidad, por ser la primera etapa en el proceso de manufactura del azúcar, pues su eficiencia marca la pauta en las demás etapas del proceso. Por ejemplo, la imbibición en caliente fuera de contribuir a extraer mayor cantidad de sacarosa, también extraen otros polisacáridos indeseables que con el calentamiento, forman un gel ocasionando múltiples problemas en el proceso; provocando incrementos en la viscosidad de jugos, meladuras, mieles, templeas y licores de azúcar fundido, disminuyen la eficiencia de la evaporación, al elevar el punto de ebullición de la meladura; prolonga los períodos de templa; hacen más difícil la cristalización; dificultan el agitamiento de templeas y causa mayores pérdidas de sacarosa en las mieles finales; reducen la viscosidad de filtración en filtros de lona y hacen que éstos se tapen más rápidamente. Forzan a la refinería a manejar un menor brix en el licor, disminuyendo la capacidad de procesamiento y disminuyen la pureza y calidad del producto terminado.

Además, el jugo de caña tibio ofrece un medio ideal para el crecimiento de microorganismos deterioradores perjudiciales en el proceso. Por ello, el jugo es llevado rápidamente a



los clarificadores, donde tiene lugar la cristalización por medio de calor. También, se utilizan materiales bactericidas (sales de amonio cuaternario) y compuestos yodados como el Q2000.

En cuanto al bagazo de caña de azúcar, no figura en la literatura ningún estudio o metodología experimental que plantee una alternativa para recuperar la sacarosa que en él se encuentra. Generalmente los trabajos en bagazo están dirigidos hacia la producción de celulosa y hemicelulosa en la industria papelera, su potenciabilidad térmica como combustible en calderas y a nivel biotecnológico se citan trabajos sobre sacarificación (degradación a glucosa), tratamientos y pretratamientos hidrolíticos con ácidos y álcalis minerales acoplados con enzimas hidrolíticas.

### 3. FORMULACION DEL PROBLEMA

Los inconvenientes que se presentan por deterioro y polisacáridos indeseables (gomas) en el proceso azucarero, pueden controlarse a su debido tiempo con biocidas, enzimas y controladores de temperatura o limpieza a vapor. Aunque estos mecanismos brindan una solución a los problemas ya mencionados, siempre se presentará pérdidas indeterminadas de azúcar al final del proceso.

Fuera de estas pérdidas en sacarosa, que se pueden evaluar en un 1%, existe otra un poco mayor encontrada en el bagazo.

Las pérdidas de sacarosa en bagazo se pueden estimar de la siguiente forma:

Por ejemplo para los ingenios Riopaila y San Carlos, los datos de fabricación y laboratorio son;

TABLA 1. Informe mensual de fabricación y laboratorio del Ingenio Riopaila S.A. para 1992.

CONCEPTO	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAY
Tonelada caña molida	117.984,12	123.468,61	122.091.03	62.468,30	104.618,4
Sacarosa % caña	13,49	13,68	13,67	14,02	13,55
Bagazo % caña	31,65	31,53	30,73	30,96	31,09
Sacarosa % bagazo	1,53	1,56	1,63	1,54	1,56

TABLA 2. Informe mensual de fábrica del Ingenio San Carlos S.A. para 1992.

CONCEPTO	JUNIO	JULIO	AGOSTO
Toneladas caña molida	54.142,160	59.063,385	57.197,182
Sacarosa % caña	14,193	14,655	15,337
Bagazo % caña	30,562	29,351	29,377
Sacarosa % bagazo	1,895	1,894	2,523

Con el valor de azúcar por tonelada puesta en el ingenio, que es de \$ 173.780,00, el promedio en pérdidas de azúcar en bagazo para estos es:

TABLA 3. Promedios en pérdidas de azúcar en bagazo para los Ingenios Riopaila y San Carlos en 1992.

INGENIO	Toneladas de azúcar promedio estimado que se pierden por mes	Total promedio estimado en pérdidas por mes	Total promedio estimado en pérdidas por día
RIOPAILA S.A	595	\$ 103'399.100,00	\$ 3'400.000,00
SAN CARLOS SA.	356	\$ 61'806.443,00	\$ 2'000.000,00

Como se puede evidenciar, las pérdidas aunque dependen de la capacidad y eficiencia en la molienda de cada ingenio, representan una cantidad elevada de dinero. Es por eso que la presente investigación plantea una alternativa a nivel de laboratorio, que en primera instancia establece una metodología de medición experimental para la extracción, simulando condiciones de fábrica, pudiendo así definir estados óptimos de temperatura y tiempos de maceración. Con base en estas condiciones se cuantifica el efecto enzimático de extracción en el bagazo.

#### 4. PARTE EXPERIMENTAL

##### 4.1. ESTANDARIZACIÓN DEL METODO DE EXTRACCIÓN

###### A. Materiales y reactivos:

- Desintegrador Jeffco, modelo 264B de 2880 rpm
- Licuadora Essen, Modelo especial con 3.5 L de capacidad
- Agitador mecánico Eberbach, de 240 opm
- Balde plástico de 15 L de capacidad
- Balanza digital de precisión  $\pm 0.01$  g Mettler PC4400
- Tarros plásticos de boca ancha con tapa rosca de 3.5 L de capacidad
- Probeta de 1000 ml
- Equipo de filtración al vacío de tamiz plástico
- Beakers de 250 ml

###### B. Procedimiento:

La estandarización se inició con muestras de variedades de caña utilizadas en análisis de rutina en otros experimentos a temperatura ambiente. Se implementó el método de extracción mecánica para tiempos de 3, 4, 5, 7, 9, 11 minutos, empleando como referencia (blanco) el método de análisis directo para evaluación de caña de azúcar del laboratorio de CENICAÑA bajo los mismos tiempos.

###### 4.1.1. Análisis directo:

Se desfibraron los tallos de caña en el desintegrador, hasta producir una fibra fina. La fibra fue recogida en un balde plástico y homogeneizada con la mano. Para la extracción de los constituyentes solubles de la caña, se pesaron 500 g del material desintegrado y se adicionaron 1000 ml de agua; esta solución se licuó durante tres minutos en la licuadora. La mezcla se filtró al vacío para remover la fibra. Con el filtrado se determinó el pol y el brix del extracto.

###### 4.1.2. Método de extracción mecánica:

La muestra de tallos de caña se desfibró en el desintegrador, hasta producir una fibra delgada. La fibra fue recogida en un balde plástico y homogeneizada con la mano. Del material desintegrado se pesaron 500 g en un tarro plástico de boca ancha y se adicionaron 1000 ml de agua. El tarro se tapó y se llevó al agitador mecánico a 240 opm por espacio de tres minutos. Al final de este tiempo la mezcla se filtró al vacío removiendo la fibra y utilizando el filtrado para medir el pol y brix del extracto.

Nota: Se siguió el mismo procedimiento de 3.1.1 y 3.1.2 para los demás tiempos de extracción (4, 5, 7, 9, 11 min).

#### **4.2. MEDIDA DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA A DIFERENTES TIEMPOS DE EXTRACCIÓN**

##### **A. Materiales y reactivos:**

- Desintegrador Jeffco, modelo 264B de 2880 rpm.
- Licuadora Essen, Modelo especial con 3.5 L de capacidad
- Agitador mecánico Eberbach, de 240 opm
- Balde plástico de 15 L de capacidad
- Balanza digital de precisión  $\pm 0.01$  g Mettler PC4400
- Tarros plásticos de boca ancha con tapa rosca de 3.5 L de capacidad
- Probeta de 1000 ml
- Plancha de calentamiento Corning
- Termómetro de 360°C
- Equipo de filtración al vacío de tamiz plástico
- Beakers de 250 ml

##### **B. Procedimiento:**

En esta etapa se realizaron ensayos con los métodos descritos en 3.1.1 y 3.1.2 utilizando temperaturas de 25, 30, 35, 40 y 45 °C. El tiempo de extracción para el método de análisis directo (método 3.1.1) fue de 5 minutos, mientras que para el método de agitación mecánica se realizaron extracciones con tiempos de 3, 5, 10, 15 y 20 minutos. Para cada tiempo de extracción se emplearon todas las temperaturas mencionadas.

Para obtener las diferentes temperaturas, el agua se depositó en el beaker de 4 L, se calentó e inmediatamente se traspasó al tarro plástico con la muestra rectificando siempre la temperatura. Con los diferentes extractos se hicieron las lecturas de pol y brix.

#### **4.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA A UN TIEMPO CONSTANTE DE EXTRACCIÓN.**

En esta fase se aplicó sólo el método de agitación mecánica (procedimiento 3.1.2) para temperaturas de extracción de 25, 30, 35, 40 y 45 °C a un tiempo de 10 minutos para cada uno de los ensayos.

**4.4. EXTRACCIÓN CON ENZIMAS**

En esta fase se analizó el efecto de extracción para cada una de las enzimas utilizadas ( Celluclast SP 262, Cellulasa SP 249 y Rapidase C80L).

**A. Materiales y reactivos:**

- Desintegrador Jeffco, modelo 264B de 2880 rpm
- Licuadora Essen, Modelo especial con 3.5 L de capacidad
- Agitador mecánico Eberbach, de 240 opm
- Balde plástico de 15 L de capacidad
- Balanza digital de precisión  $\pm 0.01$  g Mettler PC4400
- Tarros plásticos de boca ancha con tapa rosca de 3.5 L de capacidad
- Probeta de 1000 ml
- Plancha de calentamiento Corning
- Termómetro de 360°C
- Micropipeta de 0.02 ml
- Matraz aforado de 100 ml
- Equipo de filtración al vacío de tamiz plástico
- Beakers de 250 ml
- Agua (No es necesario que sea destilada)

**B. Procedimiento:**

Cada enzima se ensayó por duplicado y con un testigo. La extracción se hizo en la misma forma como se describe en el numeral 3.1.2. (agitación mecánica) a una temperatura de 35 °C y un tiempo de extracción de 10 minutos. Para este análisis se empleó una muestra de caña de la variedad V 7551. Posteriormente se hizo otro ensayo a una temperatura de 45 °C con el mismo tiempo y un segundo a un tiempo de 20 minutos. Las cantidades de enzima utilizada (ver tabla 4) se diluyeron a un volumen de 100 ml, de esta dilución se tomaron 10 ml que se adicionaron al agua previamente calentada a la temperatura requerida.

TABLA 4. Características de las enzimas utilizadas

<b>E N Z I M A</b>	<b>D O S I S</b>	<b>CONDICIONES</b>
Celluclast SP 262	30 mg / 100 ml	pH=4.8, T=40°C Densidad= 1.00 g/ml
Cellulasa SP 249	30 mg / 100 ml	pH=3-6, T=40-50°C Densidad= 1.00 g/ml
Rapidase C80L	5 mg / 100 ml	pH=3-6, T=50-55°C Densidad= 1.04 g/ml

#### 4.5. METODOS DE ANALISIS

Después de efectuada cada extracción se realizaron análisis de contenido de sacarosa y sólidos totales. Los métodos de análisis que se emplearon fueron:

##### 4.5.1. Brix % Extracto

###### A. Materiales y reactivos:

- Beaker de 250 ml
- Beaker de 50 ml
- Servilleta gruesa
- Embudos Plásticos
- Espátula
- Refractómetro automático Brixomat Dr Kernchen
- Celite (Tierra de algas diatomeas)

###### B. Procedimiento:

Se colocó una servilleta en un embudo común y éste sobre la boca del beaker de 50 ml limpio y seco. Encima de la servilleta se depositó aproximadamente 1,0 g de celite. Luego se filtraron por gravedad cerca de 40 ml del extracto. Por último al filtrado colectado, se le leyó el brix en el refractómetro aproximadamente 25 ml (tamaño de la celda del Brixomat) .

##### 4.5.2. Pol % Extracto

###### A. Materiales y reactivos:

- Beaker de 250 ml
- Beaker de 100 ml
- Servilleta
- Varilla de agitación plástica
- Polarímetro automático Sucromat Dr Kernchen
- Embudos plásticos
- Pipeta plástica de émbolo graduada para 1.0 ml
- Solución de Subacetato de plomo: 1 g de Subacetato por 1 ml de agua.

###### B. Procedimiento:

Se calculó a partir del valor del brix por ciento extracto (según 3.5.1) y de la lectura del sacarímetro que se determinó en la siguiente forma:

Se tomaron 150 ml del extracto obtenido en un beaker de 250

ml, se adicionó 1.0 ml de solución de subacetato de plomo para realizar la clarificación, se agitó vigorosamente y se dejó en reposo durante 1 minuto para permitir la floculación del precipitado formado. Se filtró el extracto descartando los primeros 2 ml, verificando su claridad (en casos en donde el filtrado fue turbio, se filtró nuevamente empleando celite como se indica en 3.5.1.) y se colectaron 60 ml para realizar la lectura sacarimétrica en el polarímetro.

Nota: El porcentaje pol del extracto se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Pol \% extracto} = \frac{S(I)}{3.814 + 0.017 * B(I)}$$

Donde:

S(I) = Lectura sacarimétrica.

B(I) = Brix % extracto.

#### 4.5.3. Análisis Cromatográfico

##### A. Materiales y reactivos:

- Cromatógrafo Líquido Waters 745/745B con detector de IR
- Beakers de 25 ml
- Matraz aforado de 50 ml
- Pipeta volumétrica de 10 ml
- Balanza analítica de precisión  $\pm 0.0001$  Mettler H35AR
- Espátula
- Equipo de filtración al vacío Schott de 500 ml
- Agua ultrapura Milli-Q
- Baño Ultrasonido Branson 1200
- Filtrador Holders
- Membranas de filtración de 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore
- Membranas de filtración de 0.22  $\mu\text{m}$  Millipore
- Jeringa Hamilton de 20  $\mu\text{l}$
- Acetato de calcio reactivo
- Sacarosa reactivo Baker Analyzed
- D-Glucosa anhídrida reactivo Baker Analyzed
- D-Fructosa reactivo Baker Analyzed

##### B. Procedimiento:

- Fase móvil utilizada: Se pesaron 0.025 g de acetato de calcio y se adicionaron a 1000 ml de agua milli-Q. Se filtró al vacío empleando una membrana millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ . Posteriormente se desgasificó en un baño de ultrasonido durante 15 minutos.



- Preparación del Estándar: En un vaso de 50 ml se pesaron 0.75 g de sacarosa, 0.05 g de fructosa y 0.05 g de glucosa con una precisión de 0.0001 g. El estándar se diluyó en agua milli-Q hasta completar 50 ml de dilución.

- Preparación de la muestra: Se tomaron 10 ml de muestra del filtrado utilizado para la lectura del brix y se registró su peso con una precisión de 0.0001 g. Se diluyó a 50 ml con agua milli-Q y se filtró en una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ .

- Condiciones del Análisis:

- . Cantidad de muestra inyectada 20  $\mu\text{l}$ .
- . Temperatura del detector 48 °C
- . Temperatura de la Columna 90 °C
- . Flujo 0.5 mililitros por minuto.

Después de la calibración del equipo se inyectaron 20  $\mu\text{l}$  del estándar y posteriormente se inyectó la misma cantidad de muestra a analizar.

## 5. RESULTADOS

## 5.1. ESTANDARIZACION DEL METODO DE EXTRACCION

La caña que se utilizó correspondía a la variedad MZC-74275.

TABLA 5. Ensayo por el método de análisis directo (blanco).

No. muestra	Tiempo de licuado (min)	% P o l	% B r i x	Pol % extracto	Promedio <sup>(1)</sup>
1	5	21.91	4.6	5.63	
2	5	21.91	4.7	5.63	
3	5	22.30	5.0	5.72	5.66
4	4	21.90	5.2	5.61	
5	4	21.89	5.0	5.61	
6	4	22.04	4.7	5.66	5.63
7	3	21.41	5.0	5.49	
8	3	21.31	5.1	5.46	
9	3	22.05	5.3	5.65	5.53

(1) Se promediaron los datos de Pol % extracto correspondientes a aquellas muestras en las cuales se hizo licuado y macerado varias veces, utilizando un mismo tiempo y teniendo en cuenta únicamente los efectuados en cada fecha.

TABLA 6. Ensayo por el método de agitación mecánica (Estándar).

No. muestra	Tiempo de agitación (min)	% P o l	% B r i x	Pol % extracto	Promedio
1	5	17.39	3.4	4.49	
2	5	17.26	3.8	4.45	
3	5	16.29	3.4	4.39	4.44
4	4	16.73	3.7	4.32	
5	4	16.45	3.7	4.24	
6	4	16.44	3.5	4.24	4.27
7	3	15.93	3.5	4.11	
8	3	16.17	3.2	4.18	4.15

Datos obtenidos con la variedad CC 8566:

En el siguiente cuadro se presenta sólo el valor promedio de tres replicaciones por cada tiempo de extracción

TABLA 7. Promedio de datos del ensayo (blanco)

Tiempo de licuado (min)	% P o l promedio	% B r i x promedio	Pol % extracto promedio
3	14.87	4.85	3.82
4	15.15	4.91	3.89
5	14.99	4.68	3.85
7	19.32	5.90	4.94
9	19.77	5.91	5.05
11	19.42	5.92	4.96

TABLA 8. Promedio de datos del análisis (estándar)

Tiempo de agitación (min)	% P o l promedio	% B r i x promedio	Pol % extracto promedio
3	11.65	3.68	3.01
4	11.42	3.66	2.95
5	11.72	3.76	3.03
7	15.81	4.70	3.98
9	15.84	4.71	4.07
11	15.76	4.70	4.05

### 5.2. MEDICION DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA A DIFERENTES TIEMPOS DE EXTRACCION

Estos ensayos se hicieron con muestras de la variedad CC 8568.

TABLA 9. Efecto de la temperatura a diferentes tiempos de extracción.

TIEMPO (mn)	TEMPERATURA °C	% POL	% BRIX	% PPOLEXT
3	25	18.44670	5.06667	4.72975
5	25	18.60670	5.23330	4.76732
10	25	18.42670	5.23330	4.72119
15	25	18.65330	5.16667	4.78065
20	25	18.55000	5.30000	4.75142
3	30	18.63000	5.33330	4.77122
5	30	18.73670	5.36667	4.79784
10	30	18.64000	5.26667	4.77516
15	30	18.61670	5.23333	4.76988
20	30	18.57330	5.26667	4.75808
3	35	19.88000	5.63333	5.08470
5	35	19.90330	5.63333	5.09068
10	35	20.16670	5.60000	5.15877
15	35	19.18670	5.63333	4.90738
20	35	19.23000	5.80000	4.91489
3	40	18.39500	5.40000	4.70966
5	40	18.49000	5.40000	4.73399
10	40	18.80330	5.33333	4.81560
15	40	18.77330	5.30000	4.80862
20	40	19.42670	5.73333	4.96660
3	45	18.11330	5.40000	4.63755
5	45	18.63000	5.30000	4.77173
10	45	17.90000	5.20000	4.58692
15	45	18.08000	5.50000	4.62700
20	45	19.26330	5.63333	4.92697

**5.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA A UN TIEMPO DE EXTRACCION**

Se trabajó con muestras de la variedad V 7151.

TABLA 10. Efecto de la temperatura a 10 minutos de extracción.

TEMPERATURA °C	% POL	% BRIX	%PPOLEXT
25	22.07	6.30	5.21
30	22.26	6.30	5.27
35	22.50	6.50	5.46
40	22.38	6.40	5.33
45	19.98	6.30	5.06

**5.4. EXTRACCION CON ENZIMAS**

Los ensayos de extracción con los tres tipos de enzimas se hicieron con muestras de la variedad V 7551 con 12 meses de edad.

T = Testigo

M = Muestra + Enzima

5.4.1. Extracción a temperatura de 35°C y 10 minutos.

TABLA 11. Resultados analíticos para Celluclast SP 262.

Tipo	%Pol	%Brix	%PolExt	pH	H P L C			Almidon (ppm)	Polisacar ppm
					%Sac	%Gluc	%Fruc		
T	23.96	6.5	6.10	6.7	6.009	0.075	0.099	28	298
M1	23.40	6.4	5.96	6.9	5.953	0.086	0.115	33	323
M2	23.08	6.9	5.87	6.8	6.019	0.099	0.136	28	266

TABLA 12. Resultados analíticos para Cellulasa SP 249.

Tipo	%Pol	%Brix	%PolExt	PH	H P L C			Almidon ppm	Polisac ppm
					%Sac	%Gluc	%Fruc		
T	22.35	6.4	5.70	6.6	5.742	0.026	0.048	70	361
M1	22.39	6.4	5.71	6.6	5.394	0.051	0.070	64	361
M2	22.48	6.4	5.73	6.6	5.928	0.145	0.065	81	387

TABLA 13. Resultados analíticos para Rapidace C80L.

Tipo	%Pol	%Brix	%PolExt	PH	H P L C			Almidon ppm	Polisac. ppm
					%Sac	%Gluc	%Fruc		
T	21.86	6.19	5.58	6.6	5.514	0.056	0.076	66	311
M1	21.30	6.06	5.44	6.6	5.416	0.074	0.079	69	323
M2	21.37	6.07	5.46	6.6	5.069	0.095	0.123	68	235

5.4.2. Extracción a temperatura de 45°C y 10 minutos.

TABLA 14. Resultados analíticos para Celluclast SP262.

Tipo	%Pol	%Brix	%PolExt	PH	H P L C		
					%Sac	%Gluc	%Fruc
T	15.95	4.73	4.09	6.5	3.997	0.061	0.081
M1	16.25	4.77	4.17	6.7	3.876	0.071	0.089
M2	16.05	4.80	4.12	6.6	3.899	0.087	0.096

TABLA 15. Resultados analíticos para celulasa SP249.

Tipo	%Pol	%Brix	%PolExt	PH	H P L C		
					%Sac	%Gluc	%Fruc
T	15.40	4.60	3.96	6.6	3.876	0.076	0.082
M1	16.50	4.85	4.23	6.7	4.209	0.074	0.138
M2	16.25	4.79	4.17	6.6	3.999	0.070	0.159

TABLA 16. Resultados analíticos para Rapidase C80L.

Tipo	%Pol	%Brix	%PolExt	PH	H P L C		
					%Sac	%Gluc	%Fruc
T	16.10	4.78	4.13	6.6	4.049	0.073	0.121
M1	16.00	4.72	4.11	6.6	3.930	0.063	0.162
M2	16.25	4.79	4.17	6.7	3.626	0.076	0.159

5.4.3. Condiciones de Temperatura = 45°C y Tiempo de extracción de 20 minutos.

TABLA 17. Resultados analítico para Celluclat SP 262

Tipo	%Pol	%Brix	%PolExt	PH	H P L C		
					%Sac	%Gluc	%Fruc
T	19.10	5.41	4.89	6.6	4.569	0.053	0.060
M1	18.75	5.35	4.80	6.5	4.537	0.063	0.081
M2	19.45	5.51	4.98	6.4	4.864	0.063	0.088

TABLA 18. Resultados analíticos para Cellulasa SP249

Tipo	%Pol	%Brix	%PolExt	PH	H P L C		
					%Sac	%Gluc	%Fruc
T	19.75	5.61	5.05	6.7	4.938	0.055	0.078
M1	18.65	5.35	4.77	6.7	4.782	0.089	0.092
M2	19.00	5.43	4.86	6.7	4.972	0.088	0.106

TABLA 19. Resultados analíticos para Rapidase C80L

Tipo	%Pol	%Brix	%PolExt	PH	H P L C		
					%Sac	%Gluc	%Fruc
T	19.15	5.52	4.90	6.7	5.060	0.106	0.130
M1	19.30	5.56	4.94	6.7	5.250	0.093	0.110
M2	19.10	5.51	4.89	6.7	5.237	0.076	0.103



**6. ANALISIS DE LOS RESULTADOS**

**6.1. ESTANDARIZACION DEL METODO DE EXTRACCION**

Para simular las condiciones de los ingenios en cuanto a eficiencia de la extracción, que en la práctica es del 80% al 90%, se tomó el método de análisis directo (Blanco) como el 100% de extracción, así:

$$\%EM = \frac{B \times 100}{M}$$

%EM = % Eficiencia de Extracción de sacarosa en el método mecánico.

B = Pol % Extracto según el blanco

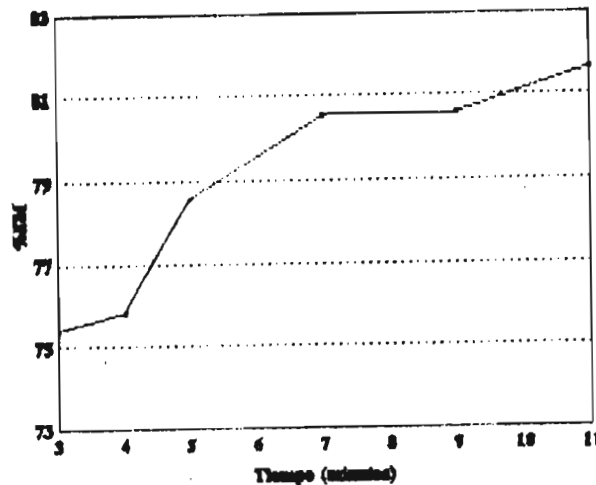
M = Pol % Extracto obtenido por el método de agitación mecánica.

Porcentaje de eficiencia en la extracción de sacarosa según el método mecánico a diferentes tiempos de extracción.

TABLA 20. Porcentaje de eficiencia en la extracción con el método mecánico a diferentes tiempos.

TIEMPO (minutos)	% EM
3	75.42
4	75.84
5	78.57
7	80.57
9	80.60
11	81.65

FIGURA 2. %EM a diferentes tiempos de extracción.



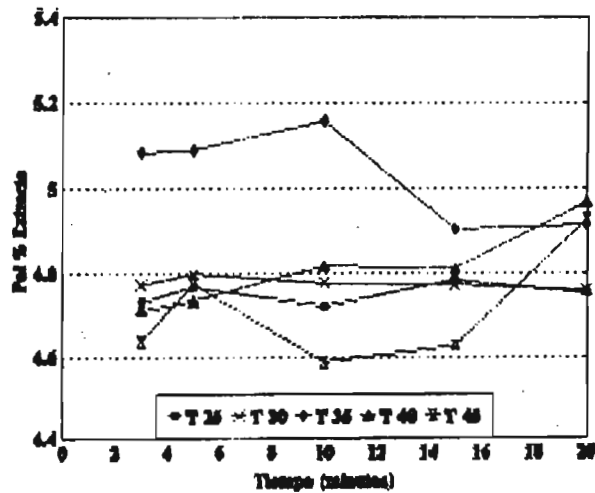
Como se observa (tabla 20, figura 2), los porcentajes de eficiencia para la extracción de sacarosa en los tiempos de 7, 9, 11 minutos, cumplen con los porcentajes de extracción del 80% a 90% preestablecidos para el método de extracción mecánica.

Se puede destacar que la diferencia de extracción entre los tiempos 7, 9, 11 es bajo (menos del 1,05%) es decir, un tiempo de 10 minutos representa un valor ideal para el método de extracción mecánica.

**6.2 MEDICION DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA A DIFERENTES TIEMPOS DE EXTRACCION.**

Con los datos obtenidos en 4.2. se calculó el tipo de ecuación más representativa para la relación Pol % Extracto y tiempo de extracción a diferentes temperaturas (figura 3)

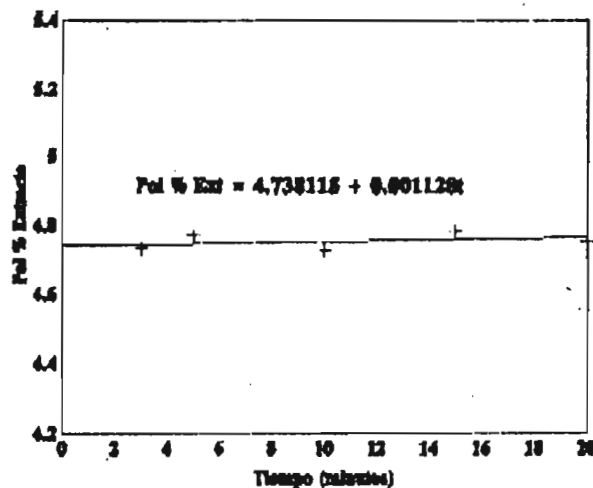
Figura 3. Efecto del tiempo de extracción sobre el Pol % extracto .



Como se observa el efecto de la temperatura es muy significativo para tiempos superiores a 10 minutos.

Para la gráfica correspondiente a  $T = 25^{\circ}\text{C}$  (figura 4), se observa que el pol% Extracto permanece estable aunque el tiempo de extracción se aumente. Su  $Pr > F$  es mayor a 0.05, por lo tanto estos datos no poseen significancia.

Figura 4. Pol % Extracto a  $T = 25^{\circ}\text{C}$ .



La gráfica correspondiente a  $T = 30^{\circ}\text{C}$  (figura 5), se presenta un comportamiento similar al anterior con pendiente decreciente.

Figura 5. Pol % Extracto a  $T = 30^{\circ}\text{C}$

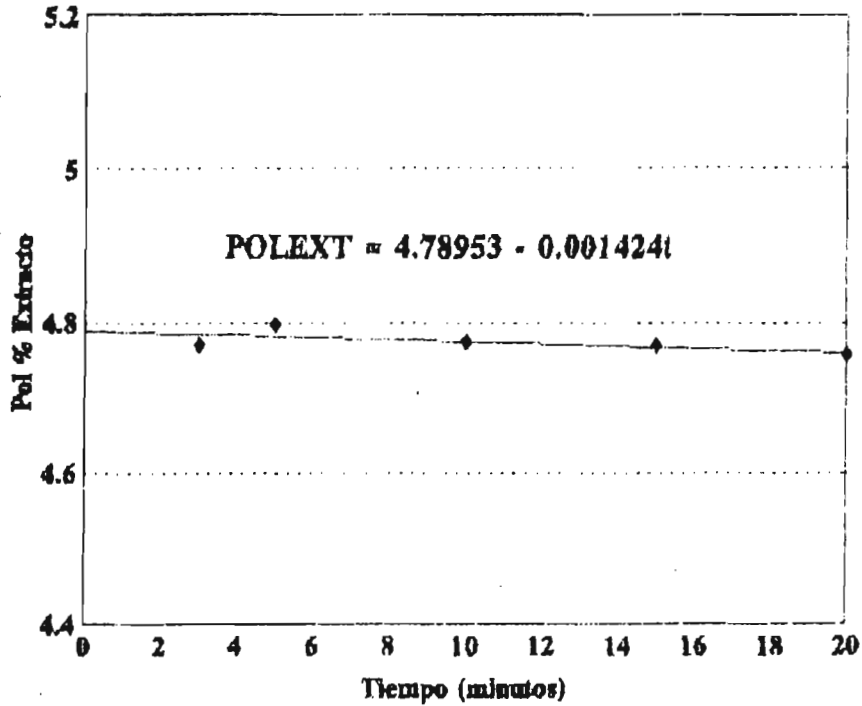
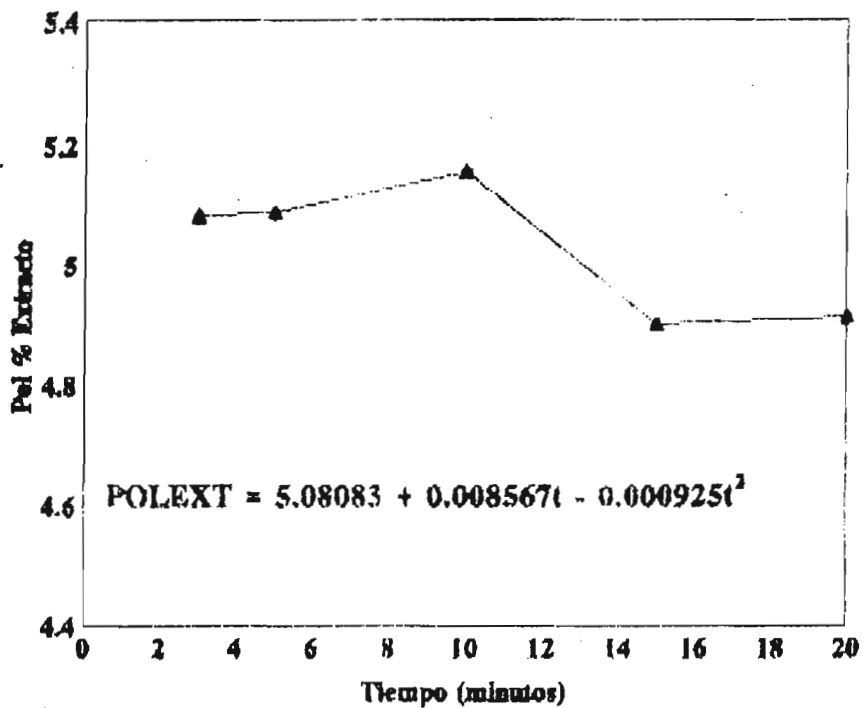


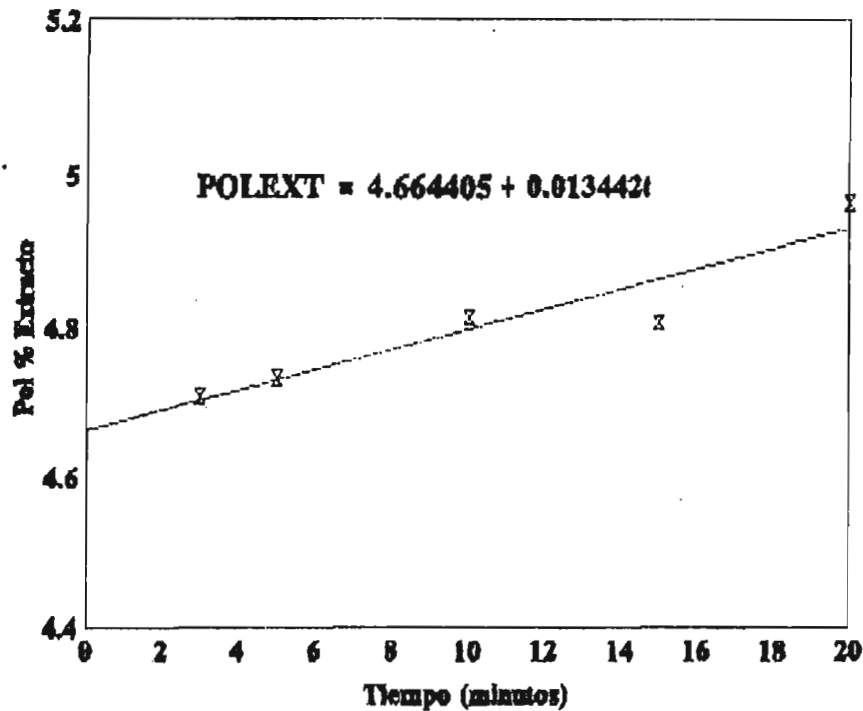
Figura 6. Pol % Extracto a  $T = 35^{\circ}\text{C}$



Para la gráfica correspondiente a  $T = 35^{\circ}\text{C}$  (figura 6), existe variabilidad del pol % extracto con incremento del tiempo, la ecuación cuadrática es la que más se ajusta a esta gráfica. La  $Pr > F$  es menor que 0.05 pero presenta pendiente decreciente.

En la gráfica correspondiente a  $T = 40^{\circ}\text{C}$  (figura 7), se observa una relación directamente proporcional entre el pol % extracto y el tiempo de extracción. La  $Pr > F$  es menor que 0.05 y el tipo de gráfica que se ajusta es lineal con pendiente creciente.

Figura 7. Pol Extracto a  $T = 40^{\circ}\text{C}$



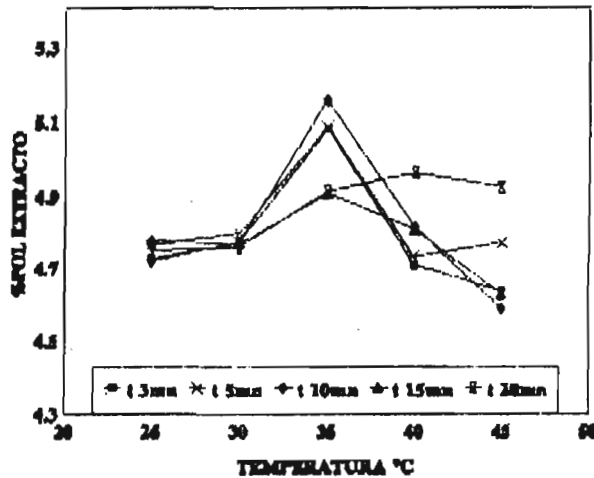
Para la gráfica correspondiente a  $T = 45^{\circ}\text{C}$ , los valores de  $Pr > F$  son mayores a 0.05 y su gráfica es difícil de adaptar como modelo experimental.

Hasta esta etapa se puede concluir estadísticamente que la eficiencia en la extracción es muy buena trabajando a una temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  y aceptable a una temperatura de  $35^{\circ}\text{C}$ .

**6.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA A UN TIEMPO CONSTANTE DE EXTRACCION**

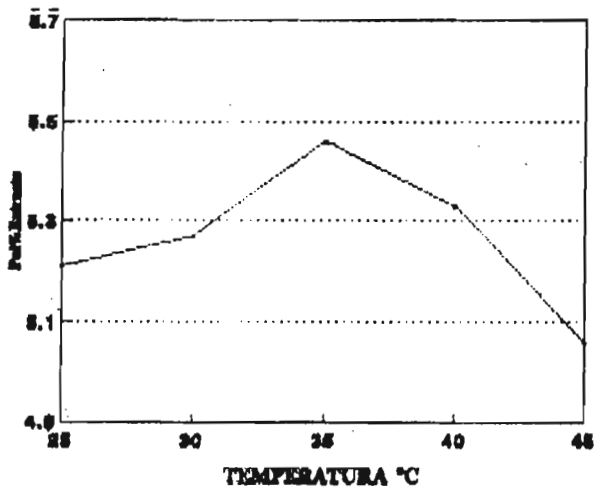
Como se demostró en 5.1., el tiempo de extracción a 10 minutos es el óptimo. Además el análisis de la relación Pol % Extracto y temperatura (ver 6.2.) a diferentes tiempos de extracción lo verifica (figura 8)

Figura 8. Influencia de la temperatura sobre el pol a diferentes tiempos de extracción.



Con base en lo anterior se realizó una segunda serie de ensayos (ver 4.3.) para constatar el efecto de la temperatura sobre la extracción entre 25 y 45 °C (Figura 9). Estos resultados muestran que el máximo de eficiencia en la extracción es a 35°C.

Figura 9. Efecto de la temperatura sobre el Pol % Extracto a 10 minutos.



**6.4. EXTRACCION CON ENZIMAS**

De los datos obtenidos en 4.5, donde T representa el testigo (sin enzima), M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> son las muestras que contienen la enzima.

Para analizar el efecto enzimático sobre la extracción, se hizo la diferencia entre las muestras con enzimas y el testigo así:

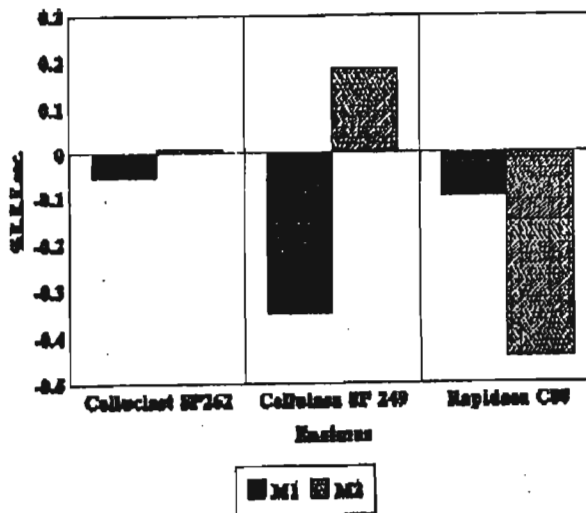
$$\%EEEsac = \%sac_M - \%sac_T \quad \text{donde:}$$

$\%EEEsac$ : Porcentaje de extracción por efecto enzimático.

$\%sac_M$  : Porcentaje de sacarosa en la muestra por HPLC.

$\%sac_T$  : Porcentaje de sacarosa en el testigo.

FIGURA 10. Efecto enzimático en la extracción a T=35°C t=10 min.



Al efectuar el análisis de M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> a temperatura de 35°C y tiempo de 10 minutos de extracción, se observa que en general el efecto es negativo en todas las enzimas. (Figura 10)

A temperatura de 45°C y tiempo de extracción de 10 minutos la enzima Cellulasa SP 249 es representativa para M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> mostrando un efecto positivo de extracción entre 0,2- 0.48 (Figura 11)

FIGURA 11. Efecto enzimático en la extracción a T=45°C y t=10 min.

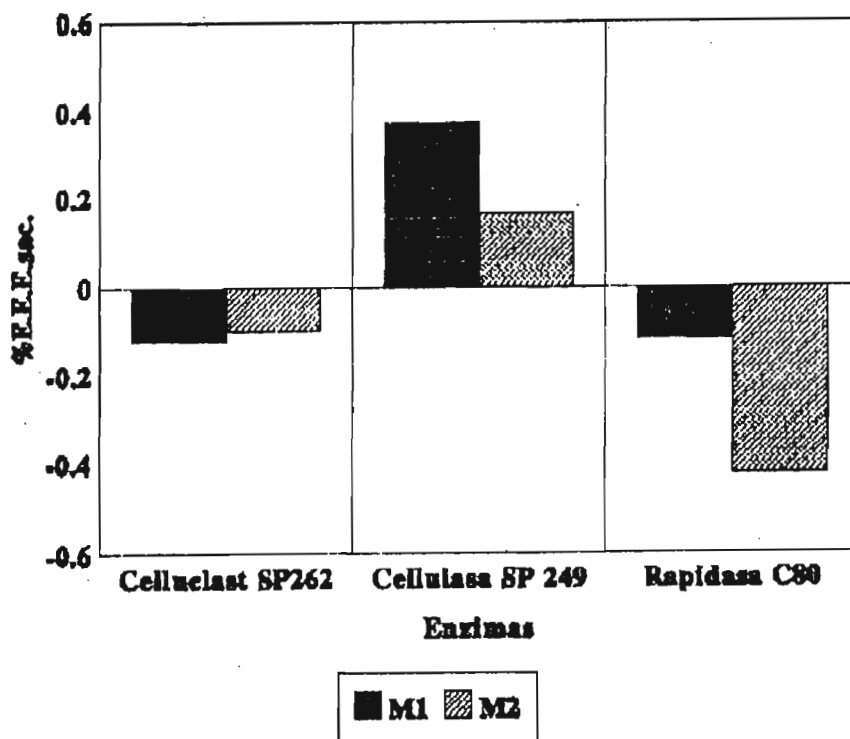
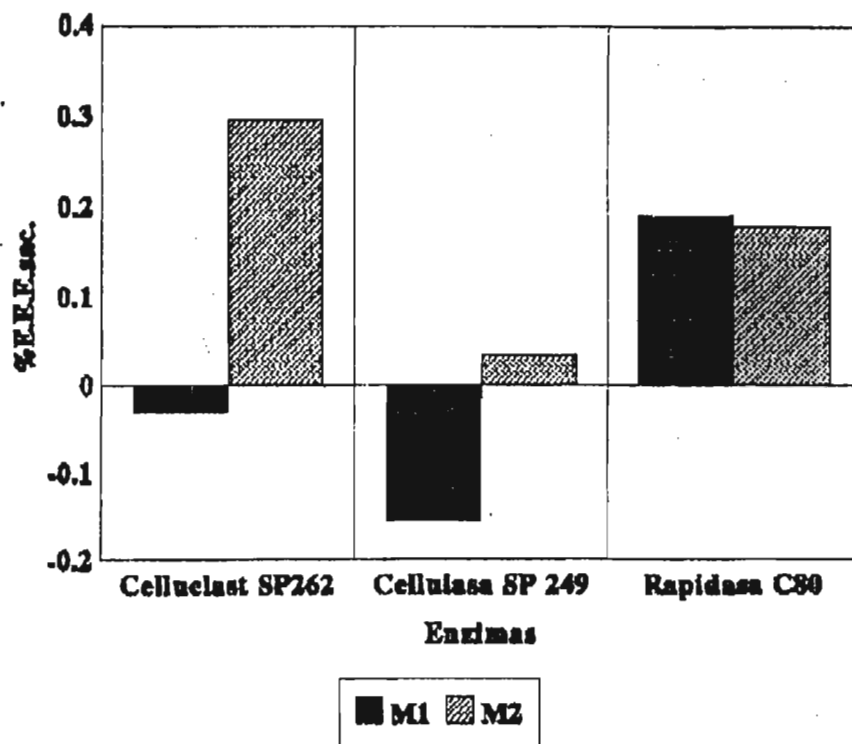




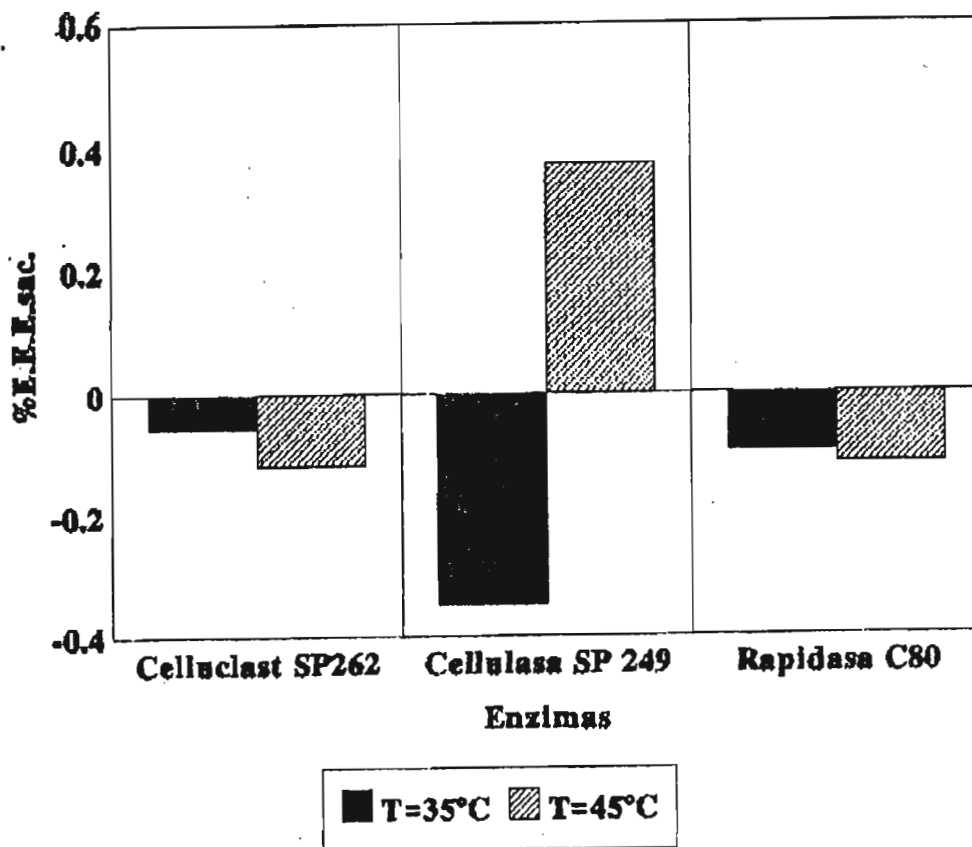
FIGURA 12. Efecto enzimático en la extracción a  $T=45^{\circ}\text{C}$  y  $t=20$  min.



Al aumentar el tiempo de extracción a 20 minutos y mantener la temperatura en  $45^{\circ}\text{C}$  se verifica representatividad en  $M_1$  y  $M_2$  para la enzima Celluclast SP 262. (ver figura 12)

Para ver el efecto de la temperatura en la extracción enzimática se examinó  $M_1$  y  $M_2$  por separado a un tiempo constante de 10 minutos (ver figura 13 y figura 14), se aprecia que la enzima Cellulasa SP 249 es la única que presenta efecto positivo de extracción.

FIGURA 13. Efecto de la temperatura en la extracción enzimática para  $M_1$  a un tiempo constante de 10 minutos.



Como la temperatura óptima es de 45°C para enzima Cellulasa SP 249, se estudió el efecto del tiempo en la extracción enzimática, demostrándose que el mejor tiempo es el de 10 minutos (ver figura 15 y figura 16).

FIGURA 14. Efecto de la temperatura en la extracción enzimática para M<sub>2</sub> a un tiempo constante de 10 minutos.

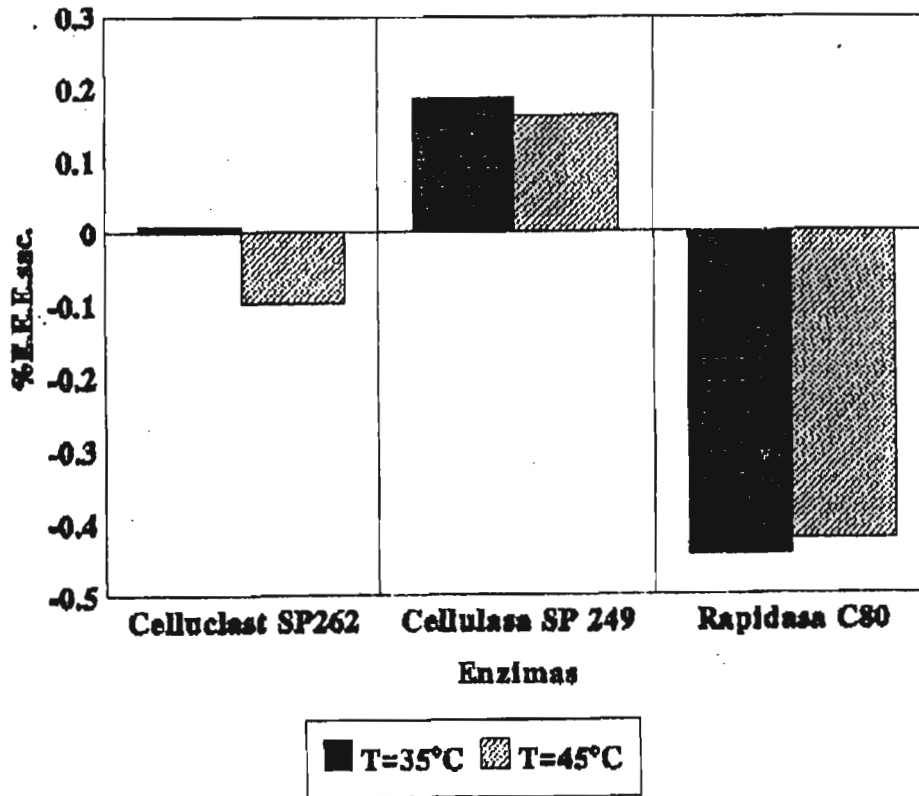


FIGURA 15 Efecto del tiempo en la extracción enzimática para M<sub>1</sub> a una temperatura de 45 'C.

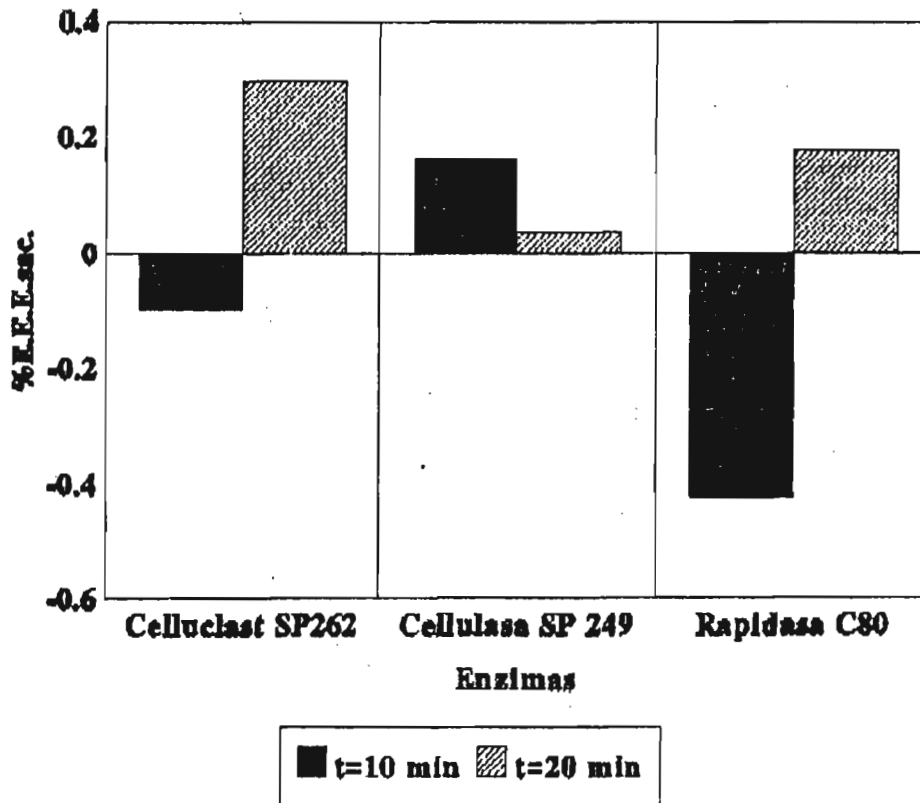
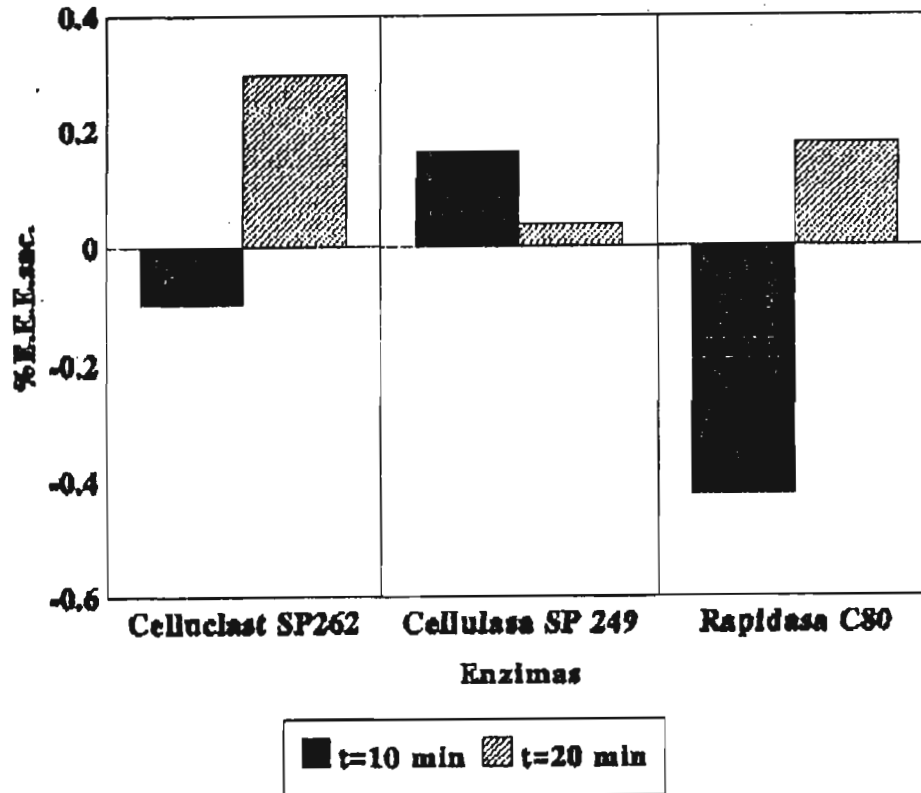


FIGURA 16 Efecto del tiempo en la extracción enzimática para M<sub>2</sub> a una temperatura de 45 °C.



Además a 20 minutos se presenta algo de respuesta para Rapidasa C80L y Celluclast SP 262, alcanzando un máximo cercano al 0.3%.

Al determinar el efecto enzimático en el pol % extracto, como:

$$\%EEE_{pol\text{ext}} = \%Pol\text{ext}_M - \%Pol\text{ext}_T$$

donde,

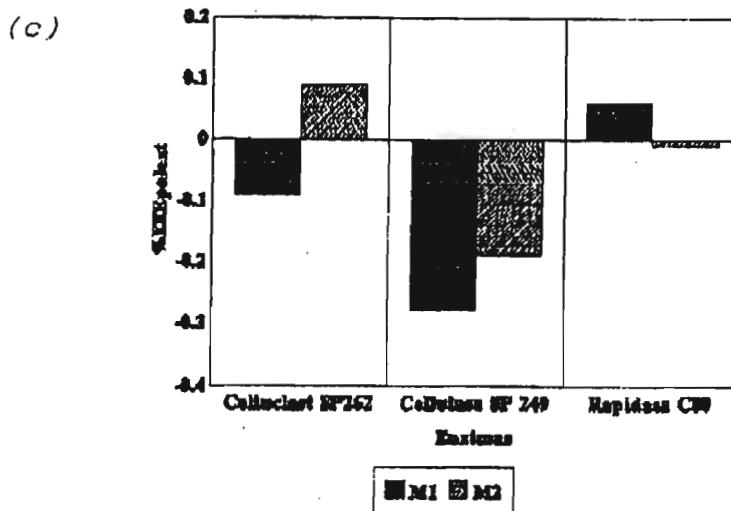
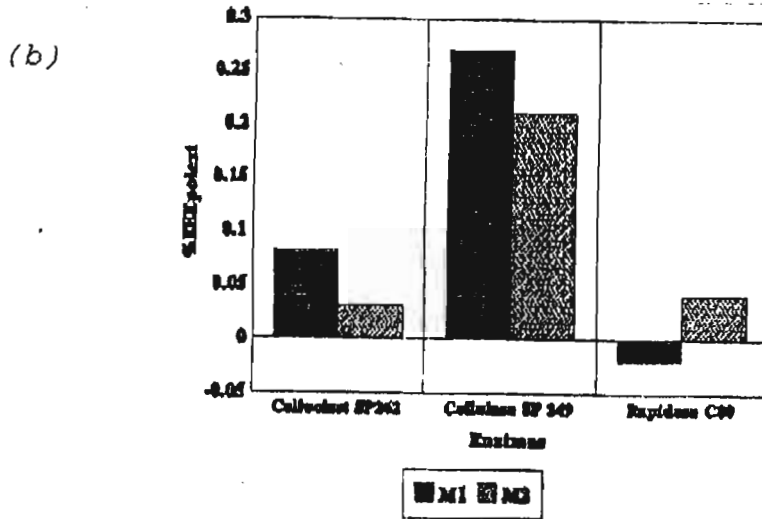
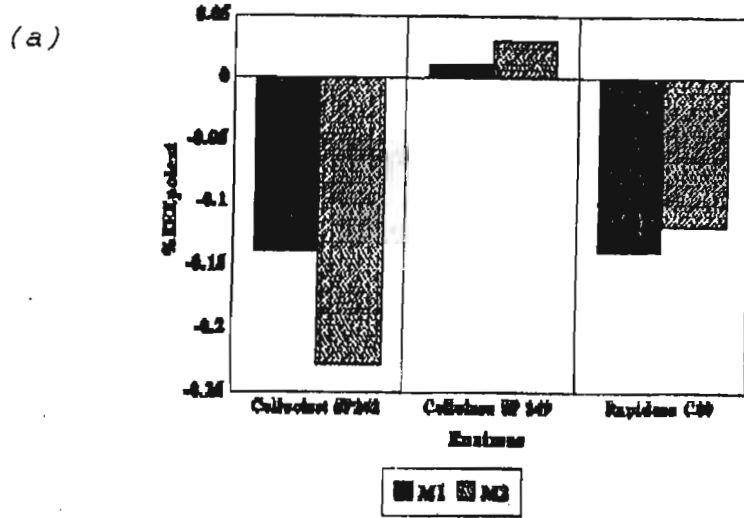
$\%EEE_{pol\text{ext}}$  : Porcentaje de extracción por efecto enzimático como pol extracto.

$\%Pol\text{ext}_M$  : Porcentaje pol extracto en la muestra.

$\%Pol\text{ext}_T$  : Porcentaje pol extracto en el testigo.

se concluye que la Cellulasa SP 249 es la que presenta efecto de extracción (ver figura 17).

FIGURA 17. Efecto enzimático en el pol extracto. (a) a T=35°C, t=10 min. (b) a T=45°C, t=10 min. (c) a T=45°C, t=20 min.



## 7. CONCLUSIONES

Uno de los propósitos fundamentales de este trabajo, fue recuperar parte de la sacarosa que queda en el bagazo después de la extracción utilizando enzimas de maceración; por medio de un sistema que imite las condiciones fabriles en el laboratorio. De acuerdo con lo anterior se puede afirmar que:

La extracción por el método de agitación mecánica está relacionada con la temperatura y el tiempo que se utiliza, siendo más significativo a una temperatura de 40°C y tiempo superior o igual a 10 minutos.

Se estableció que las enzimas utilizadas, presentaron una tendencia positiva a una temperatura de 45°C, encontrándose esta temperatura dentro del rango de actividad de ellas.

La enzima Cellulasa SP 249 fue la más eficiente en el proceso, con un efecto de extracción alrededor del 0.4%. Para fines prácticos este efecto es muy bajo; valdría la pena continuar ensayos con otras condiciones como: pH, temperatura, tiempo, pretratamientos del bagazo y mezclas de enzimas.

## **GLOSARIO**

**ALCALIZACION:** Adición de cal, generalmente alrededor de 1 libra de CaO por tonelada de caña, para neutralizar la acidez natural del guarapo.

**BAGAZO:** Residuo de la caña prensada en un molino o un tren de molienda.

**BRIX:** Es el porcentaje en peso de los sólidos solubles en el extracto. Si se determina mediante un refractómetro se denomina brix por refractometría.

**CENICAÑA:** Centro de Investigación de la Caña de Azúcar.

**CLARIFICACION:** Proceso diseñado para remover las impurezas tanto solubles como insolubles del extracto con el uso de un floculante.

**CRIZTALIZACION:** Proceso al vacío donde el jarabe de caña se evapora hasta quedar saturado de azúcar.

**FLOCULANTE:** Polímero, generalmente acrilamidas que a manera de red rodea iones, formando flóculos insolubles.

**g:** Gramo... **°C:** Grados centígrados... **L:** Litro... **opm:** Oscilaciones por minuto... **HPLC:** Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.

**GUARAPO:** Es el jugo de caña de azúcar sin diluir.

**ORSTOM:** Instituto Francés de Investigación Científica para el Desarrollo en Cooperación.

**POL:** Contenido aparente de sacarosa de cualquier sustancia expresada como un porcentaje en peso y determinado por polarización directa o sencilla.

**POLARIMETRO:** Equipo óptico que mide la rotación de la luz, al pasar por una muestra.

**POL % EXTRACTO:** Definición matemática de la lectura sacarimétrica corregida por Brix.

**REFRACTOMETRO:** Equipo óptico que mide la refracción de la luz en un determinado medio.

**SULFITACION:** Proceso en el cual el jugo es colocado en contacto con SO<sub>2</sub> con el fin de reducir los materiales formadores de color.

**T:** Temperatura. **t:** Tiempo.

**µm:** Micras. **µl:** Microlitros. **V:** Venezuela.

## BIBLIOGRAFIA

- ASOCAÑA Aspectos generales del sector azucarero. 1991-1992.
- BACARAT, M.C., C. VALENTIN y J. MUCHOVEJ Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. *Biototechnology letters*. 1989.; 899 - 902 p.
- BATEMAN, D.F. y R.L. MILLAR. Pectic enzymes in tissue degradation. *Annual Review Phytopathol.* Vol 6. 1966. 119-198 p.
- CHEN, James C.P. Manual del Azúcar de Caña. Editorial Limusa. México. 1991. 27, 73, 90-92, 95-117
- DE LEO, P., D. TRAVERSI y A. MICELI. Synergic effects of cellulase, pectinase and hemicellulase on cell wall hydrolysis *Food Hydrolysis*. Vol. 5. No.12. 1991. 223-224
- KEWALRAMANI, N. y otros. Bioconversion of sugarcane bagasse with white rot fungi. *Biotechnology letters*. Vol. 10. No.5 1988. 369-372
- KHAN, A. W., LAM KA y K.G. JOHNSON. Formation of enzymes required for the hydrolysis of plant cell wall polysaccharides by *Trichoderma reesei*. *Mircen Journal*. No.5. 1989. 49-54.
- KOBAYASHI, Y.K. y otros. Approach to maceration mechanism end enzymatic pulping of bast fibers by alkalophilic pectinolytic enzymes produced by *Erwinia* species. *Biotechnology Adv.* Vol.6. 1988. 29-37 p.
- LARRAHONDO, Jesús. E. Manual de Laboratorio para Análisis de Caña de azúcar. Ceninaña. 1981.
- PESSA, E. y M.J. BAILEY. Enzymic maceration of fruits and vegetables in: *Bioconversion of plant raw materials by microorganisms*. Helsinki. The academy of Finland, Alko Ltd. 1988. 192-203 p.
- RIVERS, D.V. y G.M. EMERT Factors affecting the enzymatic hydrolysis of bagasse and rice straw. *Biological wastes*. Vol.26. 1988. 85-95 p.
- ROMBOUKS, F.M. y K.W. PILNI. Enzymes in fruit and vegetable juice technology. *Process Biochemistry*. Vol.8. 1978. 9-13 p.



- SANDHU, D.K. y M.K. WARAICH. *Thermophilas fungi of the composing sugarcane bagasse canadian. Journal Botany. Vol.58. 1980. 2015-2016 p.*
- TECNICAÑA *Agenda Azucarera. 1992.*
- TANABE, H. y otros *Optimal constitution of pectinolytic enzymes from Erwinia carotovora for enzymmaceration of mitsumata (edgeworthia papyrifera Sieb. et Zucc.) bast. Agr. Biol. Chem., Vol.51. No.2.1987. 589-590 p.*
- TANABE, H. y Y. Kobayashi *Effect of lignin-carbohydrate complex on maceration of mitsumata (edgeworthia papyrifera sieb. et zucc.) bast by pectinolytic enzymes from Erwinia carotovora. Holzforschung., Vol 41. No.6. 1987. 395-399 p.*

Anexo nº 2

"ESTUDIO DEL IMPACTO DE LAS MICROFLORAS  
CONTAMINANTES DURANTE LA ETAPA DE MOLIENDA DE  
CAÑA Y SUS EFECTOS EN EL PROCESO DE ELABORACION DE  
AZUCAR "

Zoraida Alejandra Mora Henao

*Informe de tesis de grado.*

*Director: Maurice Raimbault. (Cenicaña).  
Co-director: Miryan Astudillo H. (Univalle).  
Asesor: Oscar Ospina L. (Central Castilla).*

Ingenio Central Castilla, Febrero 3 de 1994

## 1. INTRODUCCION

Uno de los problemas de la industria azucarera, es la pérdida de sacarosa durante la fabricación del azúcar la cual empieza con la caña misma y su cosecha. Dichas pérdidas pueden ser causadas por varios factores tales como: inversión a altas temperaturas (mayores a 80°C), pérdidas debidas a la acción de microorganismos a temperaturas menores de 70 °C, por acidez y degradación alcalina.

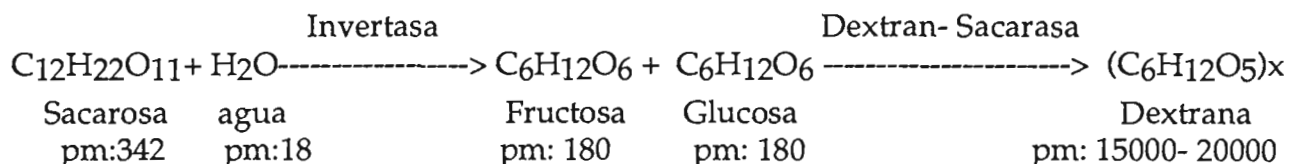
La inversión es un proceso en el cual la enzima invertasa, convierte la sacarosa obtenida en el jugo en glucosa y fructosa, hecho que afecta el rendimiento de azúcar y ocasiona pérdidas económicas. Los agentes responsables de la inversión son:

- Caña caída,
- Tiempo transcurrido entre el corte de la caña y molienda,
- Temperatura del jugo,
- Acidez del jugo y
- Presencia en el jugo de microorganismos que excretan invertasa.

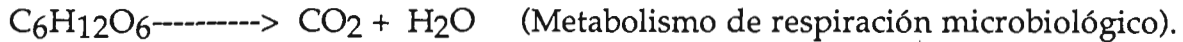
Uno de los microorganismos que se puede encontrar contaminando el jugo pertenece al género *Leuconostoc*, el cual durante su metabolismo induce inversión de sacarosa, formando a partir de glucosa un polisacárido denominado dextrana que se caracteriza por ser gomoso. Entre los efectos que ocasiona la dextrana en la fábrica se hallan:

- Dificultad en determinar el verdadero contenido de sacarosa de la caña que entra a molienda.
- Pérdidas en la producción a causa de la degradación de azúcar en el molino.
- Problemas de gomas y olores en el área de molienda.
- Aumento en los productos químicos requeridos para la clarificación.
- Dificultades en la filtración.
- Taponamiento de bombas, cedazos y tuberías.
- Dificultades para obtener cristales de azúcar de calidad y tamaño satisfactorios, por consiguiente bajo agotamiento en las mieles finales.

La reacción de inversión y formación de dextrana es la siguiente:



La glucosa puede también ser bioconvertida en otros subproductos:



Glucosa



Glucosa

Etanol



Glucosa

Acido láctico

Estas reacciones amplifican el fenómeno de inversión y alteran las medidas de pureza.

Es de gran importancia determinar cuales especies de microorganismos se hallan presentes en el jugo de primera extracción y el jugo diluido y su incidencia en la degradación de sacarosa, confirmar la presencia de la bacteria **Leuconostoc** determinando que especies producen dextranas influyendo en la calidad y el proceso de producción de azúcar.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Generales

- Caracterizar la flora microbiana existente en los jugos extraídos de la caña y determinar su efecto sobre la inversión de sacarosa.

### 2.2 Especificos

- Aislar e identificar los microorganismos más representativos en los jugos de primera extracción y diluido.

- Establecer un método de muestreo y análisis de rutina para cuantificarlos.

- Evaluar las pérdidas de sacarosa producidas por microorganismos específicos, en especial por la microflora láctica.

- Evaluar la efectividad de los bactericidas sobre los microorganismos aislados que inducen inversión de sacarosa.

### 3. REVISION BIBLIOGRAFICA

#### 3.1 GENERALIDADES DE LA SACAROSA

##### 3.1.1 DEFINICION

Sacarosa es el nombre científico del azúcar de caña o de remolacha de fórmula  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , es un sólido blanco que se cristaliza en el agua en grandes prismas monocíclicos, en solución desvía a la derecha la luz polarizada. La sacarosa se puede desdoblar por fijación de una molécula de agua en glucosa y fructosa. La d- fructosa es levógira y tiene mayor poder rotatorio que la glucosa que es dextrógira, así se modifica la desviación de la luz polarizada, de ahí el nombre de inversión de azúcar dado a esta hidrólisis. (Meade & Chen, 1975).

##### 3.1.2 PERDIDAS DE SACAROSA POR ACCION MICROBIANA

Una vez se corta la caña se produce un deterioro microbiano, que aumenta en época de lluvia, cuando el tiempo entre corte y molienda es muy prolongado y cuando la caña se quema.

El desarrollo microbiano se favorece al deteriorarse las estructuras vegetales externas que sirven de protección. Tales microorganismos son los responsables de muchas de las pérdidas de sacarosa ocurridas durante la fabricación del azúcar. (Duarte et al, 1982).

Clarke, et al (1980) estudiaron pérdidas de sacarosa durante la fabricación del azúcar de caña, ocasionadas por este factor, concluyeron que el mayor causante de tales pérdidas era la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, que además de producir dextrana induce la inversión, con producción de diversos ácidos (láctico, acético) y alcohol.

#### 3.3 LOS MICROORGANISMOS EN LA CAÑA

##### 3.3.1 ESPECIES IDENTIFICADAS

Egan, Kirby & Noble (1977) realizaron una revisión sobre el biodeterioro de la caña y hallaron que además de *L. mesenteroides* existen otros microorganismos que también podrían tener un efecto significativo en la descomposición de sacarosa. Así fueron halladas bacterias lácticas en caña provenientes de las Antillas, las especies eran: *L. mesenteroides*, *L. dextranicum*, y *Lactobacillus plantarum*, *L. casei* y *L. confusus*. Las dos primeras son las productoras de dextrana en gran cantidad.

Lacey (1980) halló *Leuconostoc* bajo la vaina de las hojas y en grietas o fisuras del tallo fueron halladas levaduras del

género *Saccharomyces* y bacterias lácticas. Dichas grietas proveen un sitio excelente para el desarrollo microbiano y permiten que los microorganismos sobrevivan durante las quemas. Después de diez minutos de haberse producido la quema, fué posible aislar bacterias desde las cañas, especialmente desde las grietas en donde *Leuconostoc* sp, sobrevivió simultáneamente con levaduras resistentes al calor, también se aislaron esporas bacterianas termorresistentes.

### 3.3.2 MICROORGANISMOS EN EL JUGO

Duarte et al (1982) realizaron unos análisis microbiológicos del jugo de caña, empleando medios de cultivo selectivos para microflora abundante y variada: bacterias mesófilas, bacterias termófilas, bacterias del género *Leuconostoc*, levaduras y mohos.

Los microorganismos aislados en el tándem fueron agrupados de acuerdo con su número y frecuencia en el siguiente orden: género *Bacillus*, *Leuconostoc*, grupo coliforme, levaduras, mohos y otros. Todos estos microorganismos con excepción de los mohos influyen en las pérdidas de sacarosa en el jugo del tándem.

### 3.4 LOS BACTERICIDAS

#### 3.4.1 USO

La adición de productos químicos bactericidas como el cloro, el formaldehído, el bióxido de azufre y las sales cuaternarias de amonio en las fábricas de azúcar está justificado desde hace tiempo, ya que se ha comprobado que emplearlos es económicamente más eficaz que el no hacerlo. La aplicación de bactericidas debe considerarse como un complemento y no un sustituto de las operaciones de limpieza. (Kopper, 1982).

Costa et al (1987) evaluaron el uso de seis diferentes biocidas con principio activo diferente, aplicandolos en concentraciones de 5, 10, 15 y 20 ppm. en jugo de primera extracción; los resultados indican la importancia de la aplicación de biocidas en molienda para minimizar las pérdidas de sacarosa; no siempre las dosis recomendadas por las informaciones técnicas corresponden a las necesidades exigidas para el control efectivo, ya que la frecuencia de uso y la concentración de germicida dependerá de los problemas operacionales de la fábrica y/o si esta para y el jugo extraído debe esperar un posterior procesamiento.

### 3.5.MICROFLORAS en JUGO de CAÑA

Se dan a continuación unas informaciones acerca de las microfloras estudiadas :

**3.5.1. MICROFLORA:** Población de microorganismos presentes en un ambiente determinado por la temperatura, el habitat, la localización. Por ejemplo microflora mesófila, microflora intestinal, microflora normal de suelo, etc.

En este trabajo la microflora a estudiar es la siguiente:

**3.5.2.MICROFLORA MESOFILA:** Microorganismos cuyo crecimiento óptimo se presenta entre los 25 y 40° C. Para su aislamiento y recuento se usa el medio PCA (Plate-Count-Agar), su estudio se realiza porque ésta microflora es indicadora de calidad higiénica, además utilizan los azúcares (glucosa) como fuente de energía para realizar su respiración. Ej: **Escherichia coli, Staphylococcus aureus.**

**3.5.3.MICROFLORA LACTICA:** Microorganismos cuyo crecimiento óptimo se presenta a 30° C. Para su aislamiento y recuento se utiliza el medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) + azul de anilina. De acuerdo con las investigaciones realizadas el colorante es un indicador del potencial de óxido-reducción, por lo tanto la presencia de bacterias lácticas se observa por el cambio de color (azul) en el medio de cultivo. Esta microflora se estudia porque fermenta los hidratos de carbono (glucosa) con producción de ácido láctico, etanol y CO<sub>2</sub>.Ej: **Streptococcus lactis, Lactobacillus plantarum.**

**3.5.4.GENERO Leuconostoc:** Está incluido en la microflora láctica, crece a una temperatura óptima de 30 °C. Para su aislamiento y recuento se usan los medios Mayeux e Hipersacarosa + azul de anilina. Estas bacterias son muy importantes en la industria azucarera ya que inducen la inversión de sacarosa con producción de fructosa y glucosa, ésta última a su vez es utilizada para elaborar un polímero denominado dextrana.Ej: **L. mesenteroides, L dextranicum.**

**3.5.5.MICROFLORA TERMOFILA:** Microorganismos cuyo crecimiento óptimo se presenta entre los 45 y 60°C. Para su aislamiento y recuento se recomienda el medio ADT + púrpura de bromocresol (Agar-Dextrosa-Triptona) , el colorante es un indicador de pH (colonias acidificantes cambian el color del medio de morado a amarillo). Esta microflora se estudia porque: algunas especies producen esporas (estructuras de resistencia) que sobreviven en condiciones ambientales adversas, lo que garantiza su subsistencia en varias etapas del proceso. Además por que la energía necesaria para su metabolismo respiratorio la obtienen de los carbohidratos (glucosa).Ej: **Bacillus stearothermophilus.**

**3.5.6.LEVADURAS OSMOFILAS:** Son hongos unicelulares cuyo crecimiento se presenta entre los 20 y 30°C. Para su aislamiento y recuento se utiliza un medio que se denominó AFE cuya composición es Agar, Fructosa y Extracto de levadura. Estas levaduras se caracterizan por que se desarrollan bien en medios con presión osmótica elevada, es decir en presencia de concentraciones altas de azúcares, sales u otros solutos, que



afectarían a otro tipo de células. Su estudio se realiza debido a que degradan los azúcares (fructosa, glucosa) produciendo alcohol y CO<sub>2</sub>. Ej: *Sacharomyces rouxii*, *S. mellis*.

#### **4.METODOLOGIA**

##### **4.1 MUESTREO**

El muestreo se realizó en dos tipos de jugo: jugo de primera extracción y jugo diluido. Las muestras fueron tomadas en el Ingenio Central Castilla en las horas de la mañana (durante los meses Abril-Agosto y Octubre-Diciembre) de 1993, empleando para ello frascos de boca ancha con tapa previamente esterilizados en autoclave. El jugo fué colectado en forma directa usando el tomamuestras diseñado al efecto; las muestras se trasladaron en frío (nevera de icopor) directamente al laboratorio (UNIVALLE), una vez en el laboratorio se procedió a realizar las respectivas siembras en los diferentes medios de cultivo y el posterior análisis de la población microbiana.

##### **4.2 RECUENTO DE MICROFLORA TOTAL Y MESOFILA**

###### **4.2.1 MEDIOS DE CULTIVO**

Para hacer el recuento de la microflora total y mesófila, se utilizó el medio PCA (Agar-Plate-Count, Merck 5463) esterilizado previamente a 121° C durante 15 minutos.

###### **4.2.2 SIEMBRA**

Las siembras se realizaron cerca de un mechero a gas y en un recinto cerrado para impedir la entrada de corrientes contaminadoras (UNIVALLE) y en cabina de flujo laminar (Laboratorio de microbiología del Ingenio). Las muestras fueron homogenizadas, se tomó 1 ml de cada uno de los jugos y se vertió en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua peptonada estéril, a partir de esta dilución se efectuaron las diluciones decimales hasta 10<sup>-7</sup>. De las diluciones

10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> y/o 10<sup>-6</sup> se extrajeron 0.5 ml para sembrar en superficie y 1 ml para sembrar en profundidad, figura No 1. La muestra se distribuyó en la caja de petri con la ayuda de perlas de vidrio estériles. Una vez sembradas las cajas se colocaron a incubar a 30°C durante 24-48 horas. Luego en las diluciones adecuadas (10- 150 colonias por placa) se contaron las colonias bacterianas, multiplicando el número obtenido por dos y reportando el resultado por mililitro de jugo.

### **4.3 RECUENTO DE MICROFLORA LACTICA**

#### **4.3.1 MEDIO DE CULTIVO**

Para el seguimiento de la microflora láctica se empleó el medio MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, Merck 10660) glucosa + azul de anilina, previamente esterilizado y a un pH de 6.7

#### **4.3.2 SIEMBRA**

La siembra se efectuó igual que la anterior, las cajas se incubaron durante 48 horas a 30°C. El 28 de diciembre se efectuó un ensayo, en el cual las cajas fueron incubadas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (campana de anaerobiosis), observando en cuales condiciones se presentó un mejor crecimiento y se aislaron tres tipos diferentes de colonias, de ambos jugos en la dilución  $10^{-5}$ , para su identificación.

### **4.3.3 RECUENTO DE *Leuconostoc***

#### **4.3.3.1 MEDIOS DE CULTIVO Y SIEMBRA**

Para el recuento de bacterias del género *Leuconostoc*, se usó el medio Mayeux (Leveau J.V- Bouix M. 1978). También se empleó el medio Hipersacarosa para realizar los aislamientos. Las siembras se efectuaron igual que en el medio anterior.

Se realizó un ensayo el 2 de septiembre de 1992 empleando básicamente la metodología ya explicada, pero se sembró 1 ml de todas las diluciones en cada una de las cajas que contenían el medio Hipersacarosa + azul de anilina; estas fueron incubadas a 30°C en una cámara de anaerobiosis por 48 horas, se realizaron los recuentos y se escogieron algunas colonias para ser aisladas y purificadas.

### **4.4 DETERMINACION DE MICROFLORA TERMOFILA (Bacterias esporógenas)**

#### **4.4.1 MEDIOS DE CULTIVO**

Para la determinación de esta microflora se utilizaron los medios: Agar-Dextrosa-Triptona + púrpura de bromocresol para las cajas de petri y caldo de hígado + agar al 2% y agar sulfito contenidos en tubos de ensayo. (Duarte et al 1982).

#### **4.4.2 TECNICA**

Se midieron 10 ml de jugo, se pasaron a un balón aforado de 100 ml y se enrasó con diluyente estéril (agua peptonada). Se tapó y se calentó la muestra hasta que ebulló en baño de agua, dejando ebullir por 5 minutos, por último fué reemplazado el

líquido evaporado por diluyente estéril; esto se dejó enfriar y se sembraron 2 ml en los tubos que contenían agar sulfito, incubándose en una campana de anaerobiosis a 55°C durante 72 horas.

Otra técnica que se empleó fue la de realizar las diluciones desde  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  con las muestras de los jugos, sembrándose 2 ml de cada dilución en los tubos con caldo de hígado y agar sulfito. Incubando a 55°C en campana de anaerobiosis por 72 horas.

También se sembró 1 ml de las diluciones  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  en profundidad en el medio Agar-Dextrosa-Triptona + púrpura de bromocresol.

#### **4.5 RECUENTO DE LEVADURAS OSMOFILAS**

##### **4.5.1 MEDIO DE CULTIVO Y SIEMBRA**

Para el recuento de levaduras osmófilas se utilizó el medio de cultivo que se denominó AFE (Agar-Fructosa-Extracto de Levadura) con un pH de 7.0 ; a este medio se le añadió un antibiótico: amoxicilina 500 mg a razón de 0.1 gr por litro de agua destilada.

##### **4.5.2 SIEMBRA**

La siembra se realizó en profundidad utilizando 1 ml de las diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ , las cajas se colocaron a incubar durante 72 horas a 30°C.

Para los trabajos de recuentos de microorganismos, se aplicó el proceso de diluciones que se describe en la figura N° 1 (1)

---

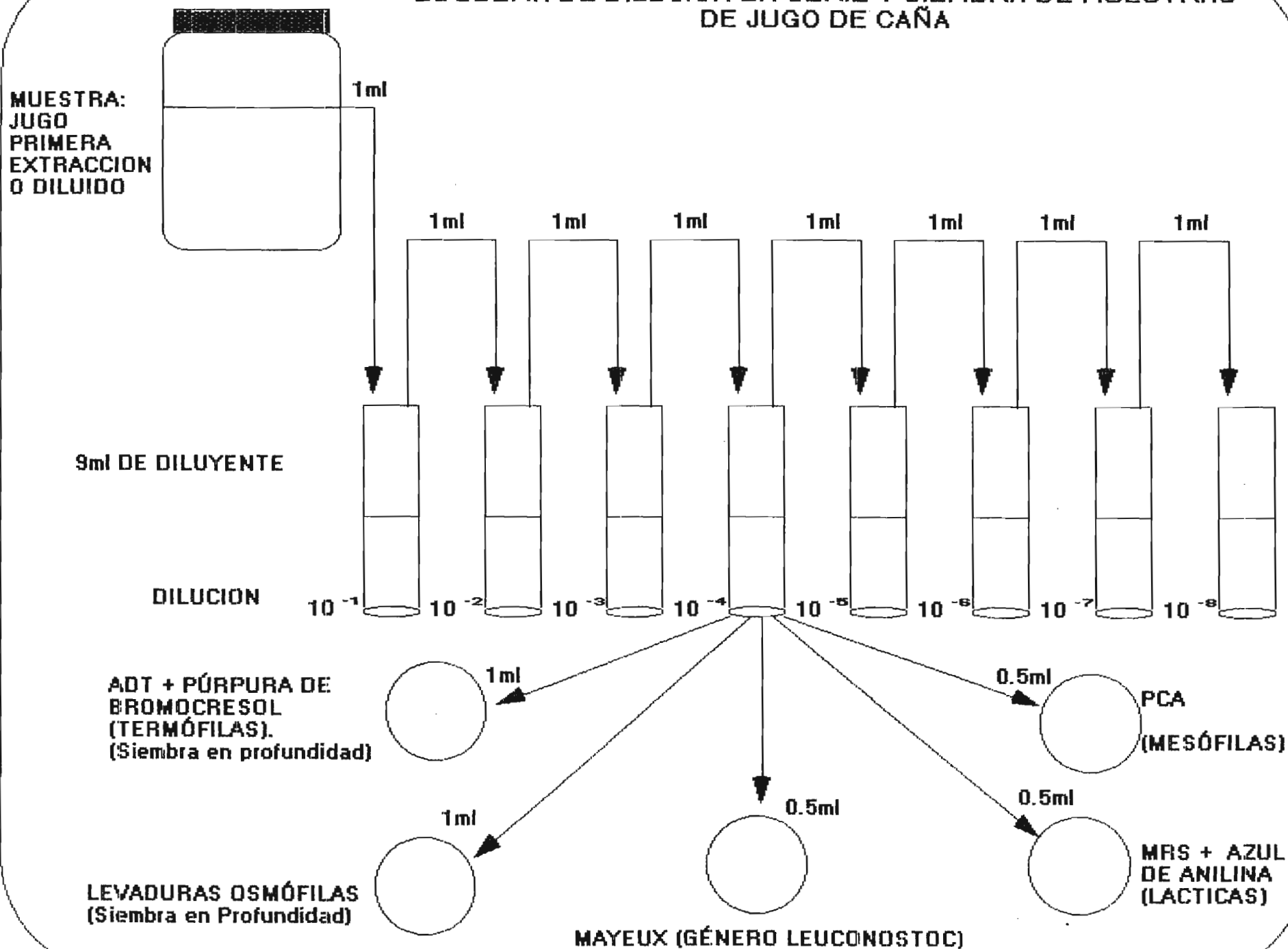
1 - CEPA: Especies de microorganismos de caracteres conocidos (usados como referencia) que se conservan estérilmente cultivados en el laboratorio para determinados ensayos y experiencias.

- DILUCION: Acción de aumentar la proporción de disolvente o diluyente al soluto, en este caso la muestra de jugo.

- DLUCION EN SERIE: Es la dilución sucesiva de la muestra. Por ejemplo 1:10, 1 ml de muestra + 9 ml de diluyente, dilución 10-1 ; 1:100, 1 ml de muestra y 99 de diluyente, dilución 10-2; etc.

FIGURA No.1

ESQUEMA DE DILUCIÓN EN SERIE Y SIEMBRA DE MUESTRAS DE JUGO DE CAÑA



## 5. PRESENTACION DE LOS RESULTADOS

Se realizó un ensayo el 2 de septiembre de 1992, con el fin de estandarizar el aislamiento de *Leuconostoc*. Se presentó un crecimiento muy abundante en las cajas con diluciones altas y el recuento se hizo en la dilución  $10^{-6}$  que fué de:

<u>Jugo primera extracción</u>	<u>Jugo diluido</u>
27 colonias	79 colonias
$27 \times 10^6$ UFC	$79 \times 10^6$ UFC

Donde UFC : Unidades Formadoras de Colonias.

Algunas colonias fueron aisladas y purificadas debido a sus características: colonias gomosas típicas de *Leuconostoc* y a su gran frecuencia de aparición; se conservan hoy en la Universidad del Valle, en agar inclinado son los aislados identificados con el #: 7, 8, 10, 15, 15', 16', 17, 21 y 23 .

También se realizaron ensayos con jugo de caña para usarlo como sustrato (medio de cultivo) para las colonias bacterianas. Pero no dió resultado debido a dos aspectos : Alta concentración de sólidos disueltos, lo que requería una filtración extrema con filtros de asbesto que se obstruían rápidamente y al final la cantidad de jugo obtenida era muy pequeña.

El jugo filtrado al mezclarlo con el agar no se solidificaba bien y al sembrar allí no se producía ningún crecimiento, debido al pH.

En cuanto a los muestreos en sí, una vez se tomaban las muestras, se efectuaban las diluciones y las cajas eran sembradas, estas se colocaban a incubar a una temperatura y tiempo determinado, tabla 1.

**Tabla 1.** Temperatura y tiempo de incubación de los medios de cultivo utilizados en el estudio.

Medio de cultivo	Temperatura	Tiempo
PCA (bact. mesófilas)	30°C	24-48 horas
MAYEUX (Gén. <i>Leuconostoc</i> )	30°C	24-48 horas
MRS/azul anilina(bact lácticas)	30°C	24-48 horas
AFE (levaduras osmófilas)	30°C	72 horas
ADT + púrp. bromocr.(bact. termófilas)	55°C	24-48 horas

*Los muestreos se realizaron en las siguientes fechas:*

Fecha	Jugo1a Ext.	Jugo Diluido	# de muestra	Hora
Abril 7	X		5	8-8:20 a.m.
Abril 28	X		5	8-8:20 a.m.
Mayo 12	X	X	6	7:10-7:20 a.m.
Junio 1	X	X	2	7:30 a.m.
Junio 2	X	X	2	7:30 a.m.
Junio 3	X	X	2	7:30 a.m.
Junio 4	X	X	2	7:30 a.m.
Junio 5	X	X	2	8:00 a.m.
Julio 22	X	X	2	7:10-7:50 a.m.
Agosto 10	X	X	2	7:30 a.m.
Agosto 11	X	X	2	7:30 a.m.
Agosto 12	X	X	2	7:40 a.m.
Agosto 13	X	X	2	8:00 a.m.
Octubre 14	X	X	2	9:00 a.m.
Octubre 15	X	X	2	11:10 a.m.
Octubre 16	X	X	2	9:30 a.m.
Octubre 17	X	X	2	9:30 a.m.
Octubre 27	X	X	2	10:50 a.m.
Octubre 28	X	X	2	9:30 a.m.
Octubre 29	X	X	2	10:15 a.m.
Octubre 30	X	X	2	8:30 a.m.
Noviembre 30	X	X	4	9:40 a.m.
Diciembre 28	X	X	4	2:30 p.m.

*Nota: Los datos del 27 al 30 de octubre, y de Noviembre 30 y Diciembre 28 corresponden a muestras que contienen bactericida.*

*Respecto a los medios de cultivo se han presentado problemas con el medio ADT + púrpura de bromocresol, utilizado para el recuento de bacterias termófilas, ya que el crecimiento aquí fué muy deficiente y las colonias eran poco definidas. Se realizaron tres ensayos con otros medios:*

*El 20 de Septiembre, se usó un medio descrito en el libro del ICUMSA (1980), dicho medio se recomienda en la diferenciación de termófilos anaerobios productores de gas y reductores de sulfito; su composición es la siguiente:*

- Peptona .....0 g
- Glucosa .....5 g
- Púrpura de bromocresol .....0,4 g
- Almidón soluble .....2 g
- Agar .....15 g
- Agua destilada .....1000 ml

Tabla 2. Datos de lluvias, Brix y Sacarosa de jugos de primera extracción y diluido, pérdidas de sacarosa y tiempos de permanencia de caña en cada uno de los muestreos.

Fecha 1993	Lluvias	Bx J1a Ek	Sac J1a	Bx J. dil.	Sac. J. dil.	Pérdidas Kg/ Tc	Tiempo de permanencia
Abril 7	0	18,0	16,54			1,50	44,74
Abril 28	66 mm			14,5	12,76	-0,12	63,22
Mayo 12	0	17,7	16,04	15,1	13,03	-0,49	47,82
Junio 1	0	15,2	13,48	16,1	14,00	0,76	53,16
Junio 2	0	20,9	18,78	17,0	15,66	0,22	53,51
Junio 3	0	16,0	14,40	15,6	13,81	0,65	59,39
Junio 4	0	17,8	15,57	15,3	13,31	1,97	67,00
Junio 5	0	18,0	15,51	15,2	12,75	1,24	67,97
Julio 22	0	17,0	14,73	13,4	11,45	1,03	84,05
Agosto 10	0	16,6	13,39	15,0	12,56	2,42	89,51
Agosto 11	0	19,8	15,79	15,9	13,55	2,29	67,00
Agosto 12	0	21,3	18,05	17,1	15,05	1,07	54,74
Agosto 13	0	19,4	16,44	14,6	12,31	2,09	59,05
Oct. 14	0	17,0	14,66	15,6	13,81	0,81	58,36
Oct. 15	15 mm	16,9	15,30	15,2	13,09	0,39	62,83
Oct. 16	14 mm	18,1	16,52	15,3	13,26	0,65	66,70
Oct. 17	0	16,0	14,20	15,4	13,38	0,12	74,94
Oct. 27	0	18,4	15,58	15,5	13,30	1,66	68,65
Oct. 28	0	19,0	16,13	14,7	12,11	0,88	55,79
Oct. 29	0	19,0	16,95	16,4	13,91	0,64	79,05
Oct. 30	28.6 mm	20,6	17,35	15,3	13,11	1,64	73,33
Nov. 30	8 mm	16,2	12,99	14,2	11,88	1,06	51,74
Dic. 28	0	16,7	14,53	14,3	12,32	0,9	52,08
X		17,98	15,59	15,30	13,20	1,02	63,24

Informe Asocaña / Orstom - Anexo nº 2, p:11

La siembra se realizó en profundidad en aerobiosis (no se presentó crecimiento) y en anaerobiosis (el crecimiento fué similar al que se presentó en el medio usado inicialmente).

El 14 de Octubre, se empleó el medio Agar Sulfito, usado en la detección de bacterias anaerobias productoras de H<sub>2</sub>S, la siembra se efectuó en tubos de ensayo que contenian el medio y se incubaron por 72 horas, pero no se presentó crecimiento.

El 4 de noviembre se usó el medio PCA (Agar-Plate-Count) empleado en el recuento de microflora mesófila. Se tomaron 4 muestras (dos de cada jugo) y se sembraron en profundidad incubando por 48 horas a 55°C. El recuento fué el siguiente:

**Muestra A: (Termofilas con medio PCA)**

Dilución	Jugo 1aExtracción	Jugo Diluido
10-1	65 colonias	62 colonias
10-2	14 colonias	7 colonias
10-3	5 colonias	1 colonias

**Muestra B:**

Dilución	Jugo 1aExtracción	Jugo Diluido
10-1	70 colonias	47 colonias
10-2	9 colonias	3 colonias
10-3	0 colonias	0 colonias

Sin embargo este medio no se considera alternativo, debido a que su composición es pobre y excluye microorganismos como lactobacilos termófilos, que pueden estar presentes y desempeñar un papel importante en la degradación de sacarosa.

A algunas colonias que crecieron en el medio ADT + púrpura de bromocresol, se les efectuó una coloración de Gram, la forma predominante fué: bacilos cortos y alargados Gram positivos y esporulados.

El 10 de diciembre se realizó un ensayo con otro medio de cultivo: el caldo de hígado, que es utilizado en el crecimiento de bacterias esporógenas anaerobias productoras de gas y el medio medio agar sulfito. Se tomaron dos muestras de jugo de primera extracción y dos de jugo diluido, se realizaron la siembras correspondientes en las diluciones 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup>; y se colocaron a incubar los tubos en campana de anaerobiosis a 55°C durante 72 horas. Sin embargo no se presentó crecimiento.

En cuanto a los medios de cultivo utilizados para el recuento de otras microfloras, se tiene que el PCA (Agar-Plate-Count) utilizado para bacterias mesófilas, se presentó un buen crecimiento de colonias. Estas eran redondas, aplanadas de bordes irregulares y de color blanco o amarillo, opacas o



Tabla 3. Recuento del número de microorganismos en los medios PCA y MAYEUX para los jugos de primera extracción, diluido/0,85 y diluido.

No. de microorganismos	Dilución 10-4						
	Medio PCA (bacterias mesófilas).			Medio MAYEUX (género Leuconostoc).			
	J. 1 Ext.	J. Dil/085	J. Diluido	J. 1 Ext.	J. Dil/085	J. Diluido	
1	212	308	262	1	53	222	189
2	220	206	175	2	151	152	129
3	154	146	124	3	192	165	140
4	62	19	16	4	62	122	104
5	146	104	88	5	124	113	96
6	60	172	148	6	84	151	128
7	301	207	176	7	204	259	220
8	284	271	230	8	243	242	206
9	301	354	301	9	301	354	301
10	124	339	268	10	82	348	296
11	86	122	104	11	118	259	220
12	200	216	184	12	268	344	292
13	266	153	130	13	54	85	72
14	132	125	106	14	72	56	48
15	80	354	301	15	142	188	160
16	301	322	274	16	164	118	100
17	301	354	301	17	301	354	301
18	160	155	132	18	296	235	200
19	301	354	301	19	301	354	301
20	84	146	124	20	48	99	84
21	220	196	167	21	133	191	162
22	301	244	207	22	301	226	192
X	195,27	221,23	188,05	X	167,91	210,77	179,14

Tabla 4. Recuento del número de microorganismos en los medios MRS y AFE para los jugos de primera extracción, diluido/0,85 y diluido.

		Número de microorganismos en la dilución 10 <sup>-4</sup>						
		Medio MRS (bacterias lácticas)			Medio AFE (levaduras osmófilas)			
		J. 1 Ext.	J. Dil/0,85	J. Diluido	J. 1 Ext.	J. Dil/0,85	J. Diluido	
1		145	254	224	1	60	135	115
2		93	107	91	2	223	179	152
3			181	154	3	140	136	116
4		92	80	63	4	164	113	96
5		76	71	60	5	162	165	140
6		64	120	102	6	200	278	236
7		254	264	224	7	248	127	108
8		284	301	256	8	267	336	266
9		296	354	301	9	213	332	282
10		36	289	246	10	68	125	106
11		148	339	283	11	96	79	67
12		160	354	301	12	74	91	77
13		160	94	80	13	39	33	28
14		82	193	164	14	75	60	51
15		120	188	160	15	56	52	44
16		84	118	100	16	52	71	60
17		268	354	301	17	250	324	280
18		301	354	301	18	103	135	115
19		301	354	301	19	100	132	112
20		40	158	134	20	54	71	60
21		98	107	91	21	210	189	161
22		279	247	210	22	141	215	183
	n	161,29	222,32	188,95		136,36	153,77	130,68

brillantes. En la coloración de Gram se observaron formas: cocos Gram positivos y negativos y bacilos Gram positivos.

En medio MRS + azul de anilina (bacterias lácticas), crecimiento de colonias definido. Colonias redondas, aplanadas, bordes regulares de color: azul (lácticas) de 1-5 mm de diámetro, habanas (bacilos) de 8-15 mm de diámetro y blancas (levaduras) de 4-8 mm de diámetro. En cuanto a la coloración de Gram se observan cocos y bacilos Gram positivos.

Medio Mayeux (género *Leuconostoc*) buen crecimiento de colonias, estas se observan de forma redondeada y convexas; transparentes y gomosas, blancas de bordes irregulares y amarillas aplanadas. La coloración de Gram mostró: cocos Gram negativos, cocos Gram positivos y cocobacilos Gram positivos.

En el medio AFE para levaduras osmófilas, la siembra se realizó en profundidad; el crecimiento de las colonias fué bueno, en los primeros recuentos efectuados crecieron también colonias bacterianas: 1- blanca superficial que a veces se deslizaba por el medio. y 2- amarilla brillante cuya forma celular era cocobacilos Gram positivos. Por esta razón se agregó un antibiótico (amoxicilina 500 mg) y crecieron solo colonias de levaduras de formas variadas: redondas, planas, estrella, plato que crecen inmersas en el agar. De estas cajas de petri se desprende un olor característico.

Durante el muestreo del 28 de diciembre se realizó una siembra en el medio MRS + azul de anilina en las diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ , incubando en condiciones de anaerobiosis; el recuento fué el siguiente:

Muestra A: 9Medio MRS: Lactobacillus)

Dilución	Jugo 1aExtracción	Jugo Diluido
10-4	280 colonias ----> 2,8. 10e6	> 300 colonias ----> 3.10e6
10-5	80 colonias ----> 8,0.10e6	22 colonias ----> 2,2.10e6

Muestra B:

Dilución	Jugo 1aExtracción	Jugo Diluido
10-4	> 300 colonias ----> 3.10e6	202 colonias----> 2,0.10e6
10-5	128 colonias ----> 1,28.10e7	22 colonias ----> 2,2.10e6

Durante el muestreo de agosto 11 al 13 fueron seleccionadas en todos los medios de cultivo algunas colonias, debido a su frecuencia de aparición en muestreos anteriores y a características tales como: color, producción de goma y de gas. Estas colonias se aislaron y purificaron, conservandose en agar inclinado en el Ingenio Central Castilla. Adicionalmente

Tabla 5. Logaritmo del recuento del número de microorganismos hallado en los medios FCA y Mayeux para los jugos de primera extracción, diluido/0,85 y diluido.

				Dilución 10-4			
Medio PCA (bacterias mesófilas)			Medio MAYEUX (género Leuconostoc)				
	J. 1 Ext.	J. Dil/0,85	J. Diluido	J. 1 Ext.	J. Dil/0,85	J. Diluido	
1	6,32	6,49	6,41	1	5,70	6,35	6,24
2	6,34	6,31	6,22	2	6,18	6,18	6,11
3	6,19	6,16	6,09	3	6,28	6,22	6,15
4	5,79	5,28	5,20	4	5,79	6,09	6,02
5	6,16	6,02	5,94	5	6,09	6,05	5,98
6	5,78	6,24	6,16	6	5,92	6,18	6,11
7	6,48	6,32	6,25	7	6,31	6,41	6,34
8	6,45	6,43	6,36	8	6,38	6,38	6,30
9	6,48	6,55	6,48	9	6,48	6,55	6,48
10	6,09	6,53	6,46	10	5,91	6,54	6,47
11	5,93	6,09	6,02	11	6,07	6,41	6,34
12	6,30	6,33	6,26	12	6,43	6,54	6,47
13	6,42	6,18	6,11	13	5,73	5,93	5,86
14	6,12	6,10	6,03	14	5,86	5,75	5,68
15	5,90	6,55	6,48	15	6,15	6,27	6,20
16	6,48	6,51	6,44	16	6,21	6,07	6,00
17	6,48	6,55	6,48	17	6,48	6,55	6,48
18	6,20	6,19	6,12	18	6,47	6,37	6,30
19	6,48	6,55	6,48	19	6,48	6,55	6,48
20	5,92	6,16	6,09	20	5,68	6,00	5,92
21	6,34	6,29	6,22	21	6,12	6,28	6,21
22	6,48	6,39	6,32	22	6,48	6,35	6,28
x	6,23	6,28	6,21	x	6,15	6,27	6,20

Tabla 6. Logaritmo del recuento del número de microorganismos hallado en los medios MRS y Afe par los jugos de primera extracción , diluido/0,85 y diluido.

Dilución 10-4									
Medio MRS (bacterias lácticas).					Medio AFE (levaduras osmófilas)				
	J. 1 Ext.	J. Dil/0,85	J. Diluido		J. 1 Ext.	J. Dil/0,85	J. Diluido		
	1	6,15	6,42	6,35		1	5,77	6,13	6,06
	2	5,98	6,03	5,94		2	6,35	6,25	6,15
	3		6,26	6,19		3	6,15	6,13	6,06
	4	5,96	5,90	5,83		4	6,21	6,05	5,93
	5	5,88	5,85	5,78		5	6,21	6,22	6,15
	6	5,81	6,08	6,01		6	6,30	6,44	6,73
	7	6,40	6,42	6,35		7	6,39	6,10	6,03
	8	6,45	6,48	6,40		8	6,42	6,53	6,46
	9	6,47	6,55	6,48		9	6,33	6,52	6,45
	10	5,56	6,46	6,39		10	5,83	6,10	6,03
	11	6,17	6,53	6,46		11	5,98	5,90	5,83
	12	6,20	6,55	6,48		12	5,87	5,96	5,89
	13	6,20	5,97	5,90		13	5,53	5,52	5,45
	14	5,91	6,29	6,21		14	5,68	5,78	5,71
	15	6,08	6,27	6,20		15	5,75	5,72	5,64
	16	5,92	6,07	6,00		16	5,72	5,85	5,78
	17	6,43	6,55	6,48		17	6,40	6,52	6,45
	18	6,48	6,55	6,48		18	6,01	6,13	6,06
	19	6,48	6,55	6,48		19	6,00	6,12	6,05
	20	5,60	6,20	6,13		20	5,73	5,65	5,78
	21	5,99	6,03	5,96		21	6,32	6,28	6,21
	22	6,45	6,39	6,32		22	6,15	6,33	6,26
	x	6,12	6,29	6,22		x	6,06	6,11	6,06

durante el muestreo del 28 de diciembre se efectuaron otros aislamientos y purificaciones de levaduras y de colonias bacterianas que crecieron en el medio MRS + azul de anilina en condiciones de anaerobiosis.

A estos aislados se les han realizado las pruebas iniciales para su identificación: coloración de gram, catalasa y motilidad, y se está preparando un test de azúcares en el medio MRS además de otros ensayos adicionales. Una vez identificados se procederá a realizar ensayos con bactericidas para analizar cual y en que concentración es más efectivo en el control de la población de microorganismos.

Para establecer una comparación entre jugo de primera extracción y jugo diluido, se halló el factor de dilución (utilizando los valores promedios de brix de jugo primera extracción y jugo diluido) que fué de 0,85. Los datos de los microorganismos obtenidos en jugo diluido fueron divididos por ese factor.

En las tablas y gráficas se presentan los tres tipos de datos: No. de microorganismos en jugo de primera extracción, No. de microorganismos en jugo diluido y No. de microorganismos en jugo diluido/0,85.

Los resultados corresponden a la dilución  $10^{-4}$ , que es la que mayor información ha suministrado.

Los recuentos realizados se correlacionan con varios datos: brix y sacarosa de jugo de primera extracción y diluido, pérdidas por inversión en molinos y tiempos de permanencia de caña, cuyos valores aparecen en la tabla 2. Para hallar el contenido de sacarosa, se emplea el método del sub acetato de plomo y polarización de soluciones sin diluir: primero se mide el brix de la muestra en el refractómetro, a continuación se toman aproximadamente 200 ml de jugo, se le agrega el sub acetato de plomo mezclando muy bien y se coloca a filtrar, el líquido obtenido se polariza en un tubo de 200 milímetros de longitud; una vez obtenido el dato se busca en la tabla de Schmitz ubicando en la primera o última columna la lectura polarimétrica y en el encabezamiento de la tabla se busca el grado brix más próximo al observado en la muestra de jugo. El número que se sitúa entre la lectura polarimétrica y el grado brix es el porcentaje de sacarosa.

Las **pérdidas por inversión** se calculan diariamente empleando la fórmula de Cloninger:

$$0.099 \cdot \left| \begin{array}{c} \text{Brix de} \\ \text{primera} \\ \text{Extrac.} \end{array} \right| \cdot \frac{\text{Gluc}}{\text{Bx}} \text{ Jugo Dil.} \cdot \frac{\text{Gluc}}{\text{Bx}} \text{ Jugo la Ext} = \text{Kg de azúcar / Ta de caña}$$

Utilizando los valores promedios obtenidos durante el día de brix y glucosa de los jugos de primera extracción y diluido.

El tiempo de permanencia de caña (horas) está constituido de dos etapas: A-campo y B-patio.

A- es el tiempo que inicia con la quema, (incluyendo corte y alce) y termina con el transporte de la caña hasta el patio de la fábrica.

B- es el tiempo que va desde el patio hasta la molienda.

Las lluvias (mm) que se reportan en la tabla 2, corresponden a datos tomados en el campo, en los diferentes sectores.

## 6. DISCUSSION DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la temporada de abril a Diciembre se presentant en las tablas 2 a 6. Por otra parte se graficaron los resultados de las diferentes microfloras tanto al respecto de la fecha de muestreo como en fuccion del Brix y/o del contenido Brix /Saccarosa. Se puede hacer los siguientes comentarios:

Las figuras 2 a 5 corresponden al logaritmo del número de microorganismos en cada uno de los medios de cultivo para los jugos de primera extracción y diluido/0.85 , en función de las fechas de muestreo; las gráficas indican que no existe una gran diferencia entre las microfloras en ambos jugos. No fué posible sinembargo estimar el número de bacterias termófilas debido al medio de cultivo que no ha sido el adecuado. El promedio de microflora contaminante se halla en  $1,75 \times 10^6$  UFC/ml de jugo, es decir 1'750.000 UFC / ml de jugo.

Comparando los datos de jugo de primera extracción y diluido, se observa que no se presentó un crecimiento significativo de microorganismos, debido a que el tiempo entre uno y otro no es suficiente como para que se presente una alta tasa de reproducción, sin embargo los microorganismos presentes se encuentran en un periodo activo fisiológicamente en el cual requieren consumir azúcar para realizar así funciones vitales de metabolismo.

Informe Asocaña / Orstom - Anexo nº 2. p:15

De acuerdo con los valores promedios, los microorganismos predominantes en orden descendente son :

<u>Jugo de la extracción</u>	<u>Jugo diluido (: 0.85)</u>
Bacterias mesófilas: 195 col.	Bacterias mesófilas: 221 col.
Género <i>Leuconostoc</i> : 167 col.	Género <i>Leuconostoc</i> : 210 col.
Bacterias Lacticas: 161 col.	Bacterias Lacticas: 222 col.
Levaduras osmófilas: 136 col.	Levaduras osmófilas: 153 col.

En cuanto a los recuentos, el 22 de julio se presentó un alto número de microorganismos, esto se debe probablemente al estado de la caña ese día, que en su mayoría era incendiada lo que implica caña de mala calidad a veces inmadura. Además el tiempo de permanencia en campo y en patio fué alto: 84,05 horas.

El 10 de agosto también se presentaron recuentos altos en todos los medios, debido al elevado tiempo de permanencia de caña en campo y patio que fué de 89,51 horas. Adicionalmente las pérdidas ese día fueron de 2,42 Kg de azúcar/ton. de caña.

En la figura 6, se muestra que la variación del Brix en jugo de primera extracción va desde 15,2 hasta 21,3 y en jugo diluido varia desde 13,4 hasta 17,0 con valores promedios de:

Jugo de primera extracción---> 17,98  
Jugo diluido-----> 15,30

Lo que da una relación  $\frac{\text{Jugo diluido}}{\text{Jugo 1a Extrac.}} = 0,85$

Este valor corresponde al factor de dilución durante la etapa de molienda con adición de agua de lavado, y coincide con el factor usado para comparar los dos tipos de jugo en las fabricas de azúcar.

Es importante anotar este factor de dilución porque influye directamente sobre el número de microorganismos en los jugos de caña. Por eso utilizamos este mismo factor de corrección para la presentación de los resultados y evaluar la evolución de las microfloras.

De la misma manera, a partir de la figura 7, se obtienen los valores promedios de sacarosa en los jugos:

Jugo 1a Extracción---> 15,59  
Jugo Diluido-----> 13,20

Dando una relación de 0,846 aproximando: 0,85, lo que



Figura 2. Logaritmo del número de microorganismos en el medio PCA, para los jugos de primera extracción y diluido/0,85

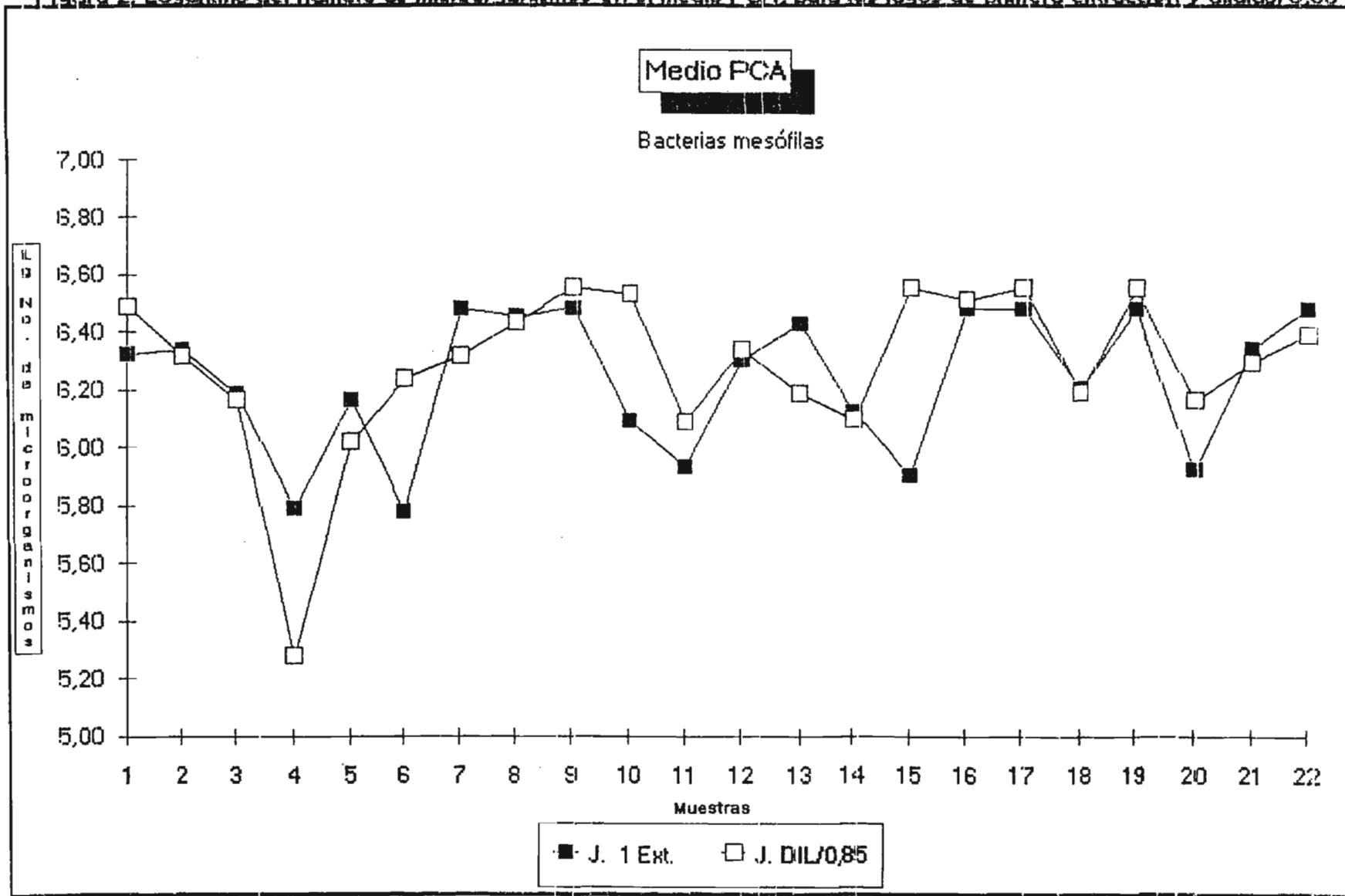


Figura 3. Logaritmo del número de microorganismos en el medio MAYEUX, para los juegos de 1a extracción y diluido/0,85

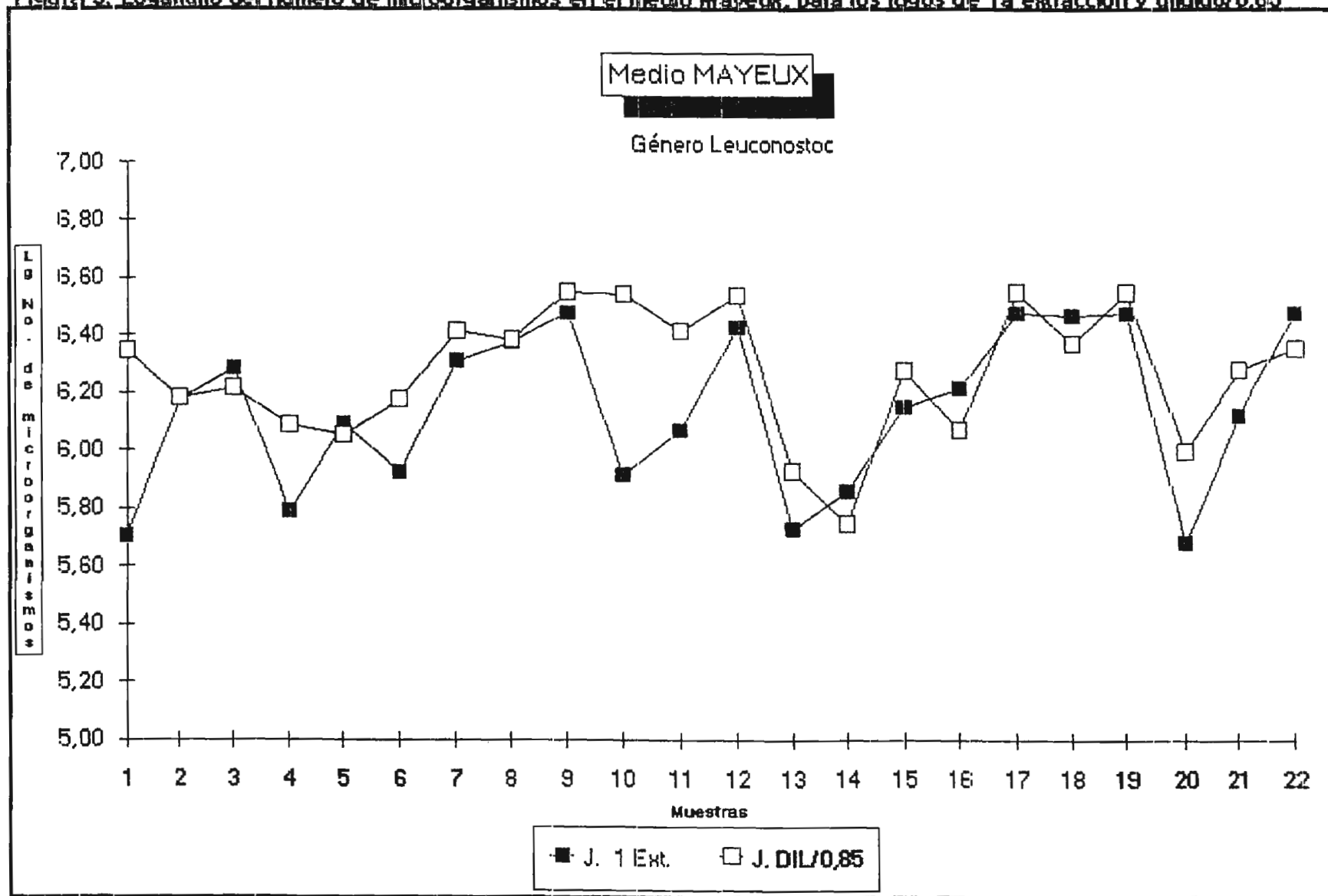


Figura 4. Logaritmo del número de microorganismos en el medio MRS, para los jugos de primera extracción y diluido/0,85

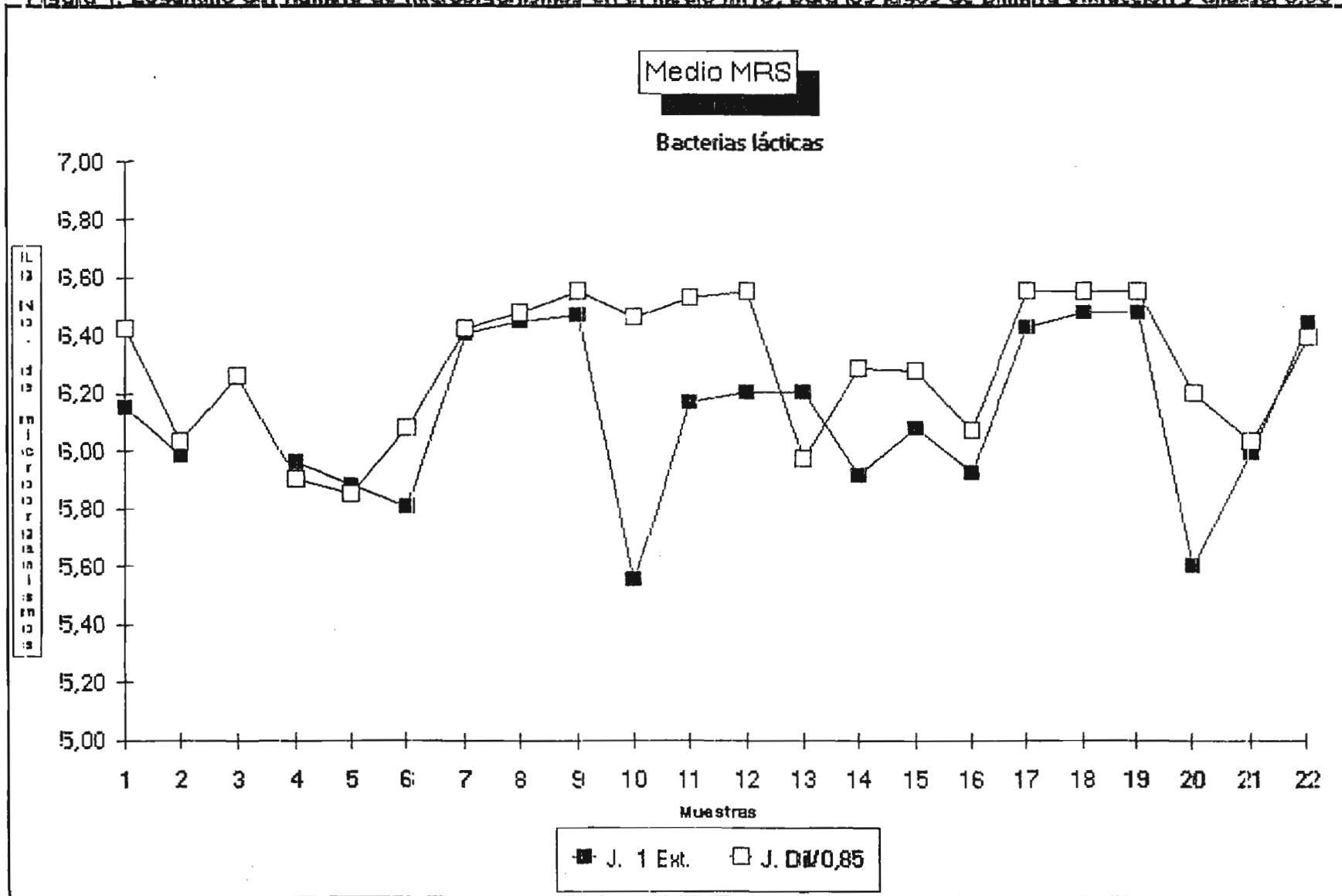


Figura 5. Logaritmo del número de microorganismos en el medio AFE, para los jugos de primera extracción y diluido/0,85

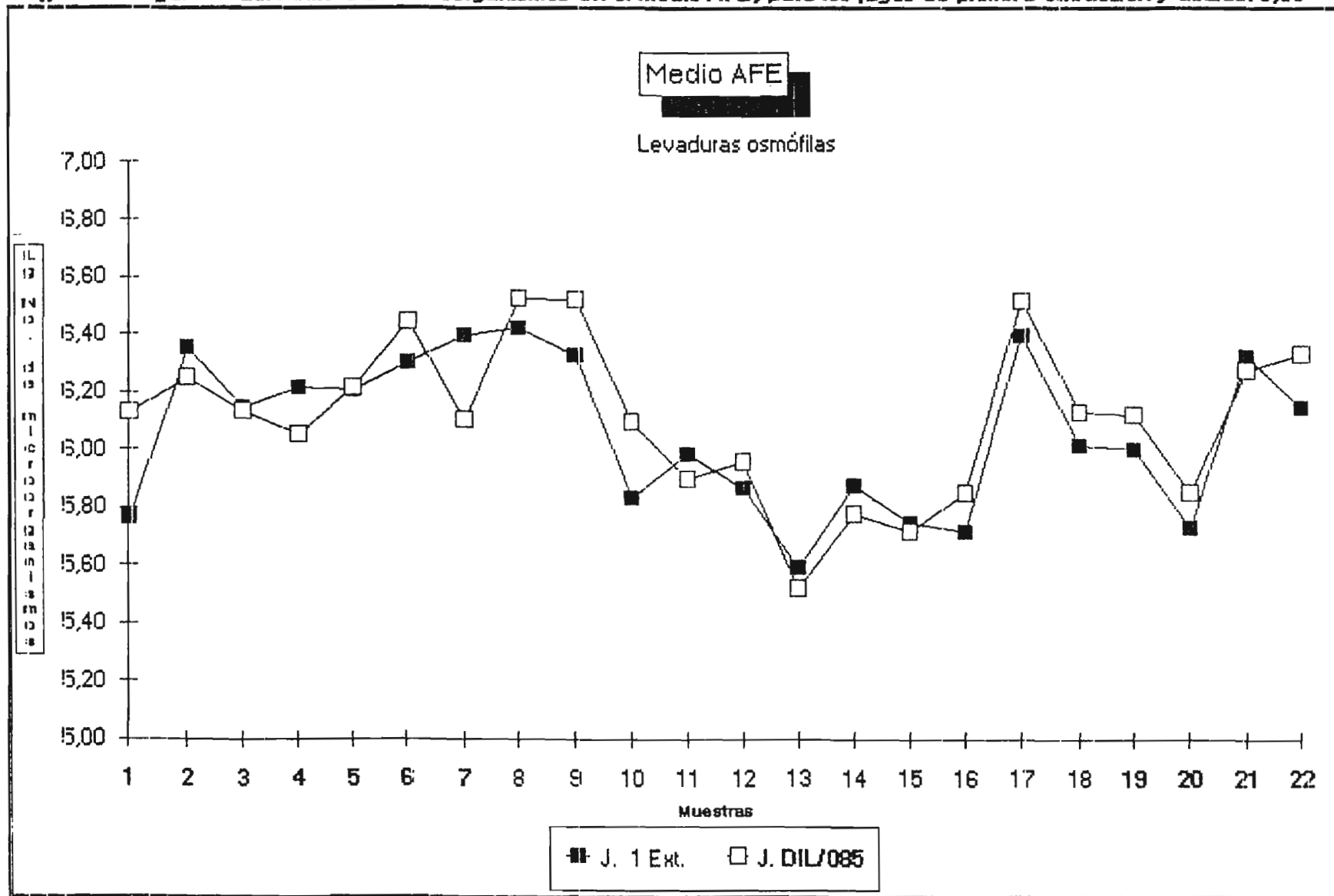


Figura 6. Valores de Brix para los jugos de primera extracción y diluido, en función de las fechas de muestreo.

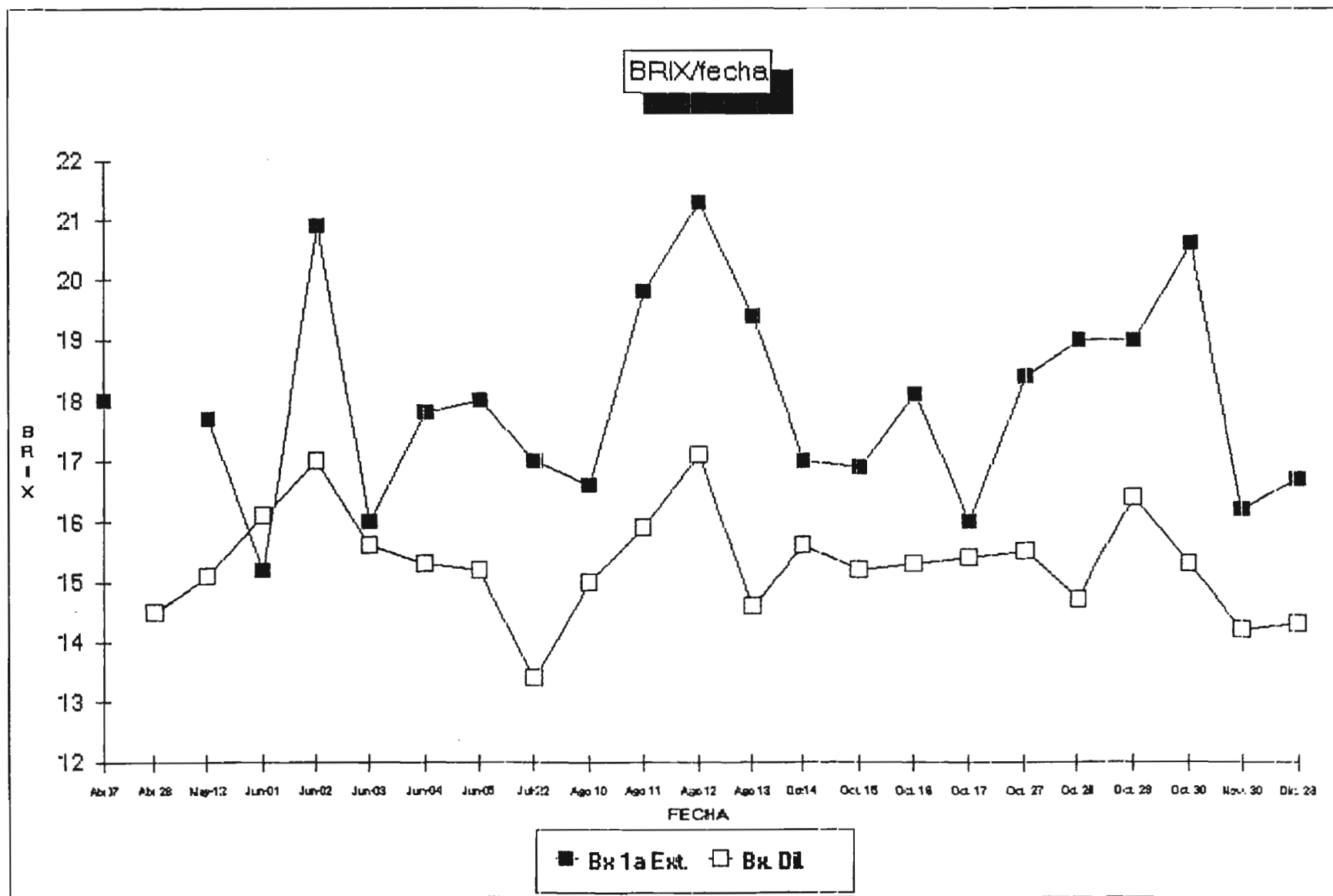


Figura 7. Contenido de sacarosa en los jugos de primera extracción y diluido en función de las fechas de muestreo.

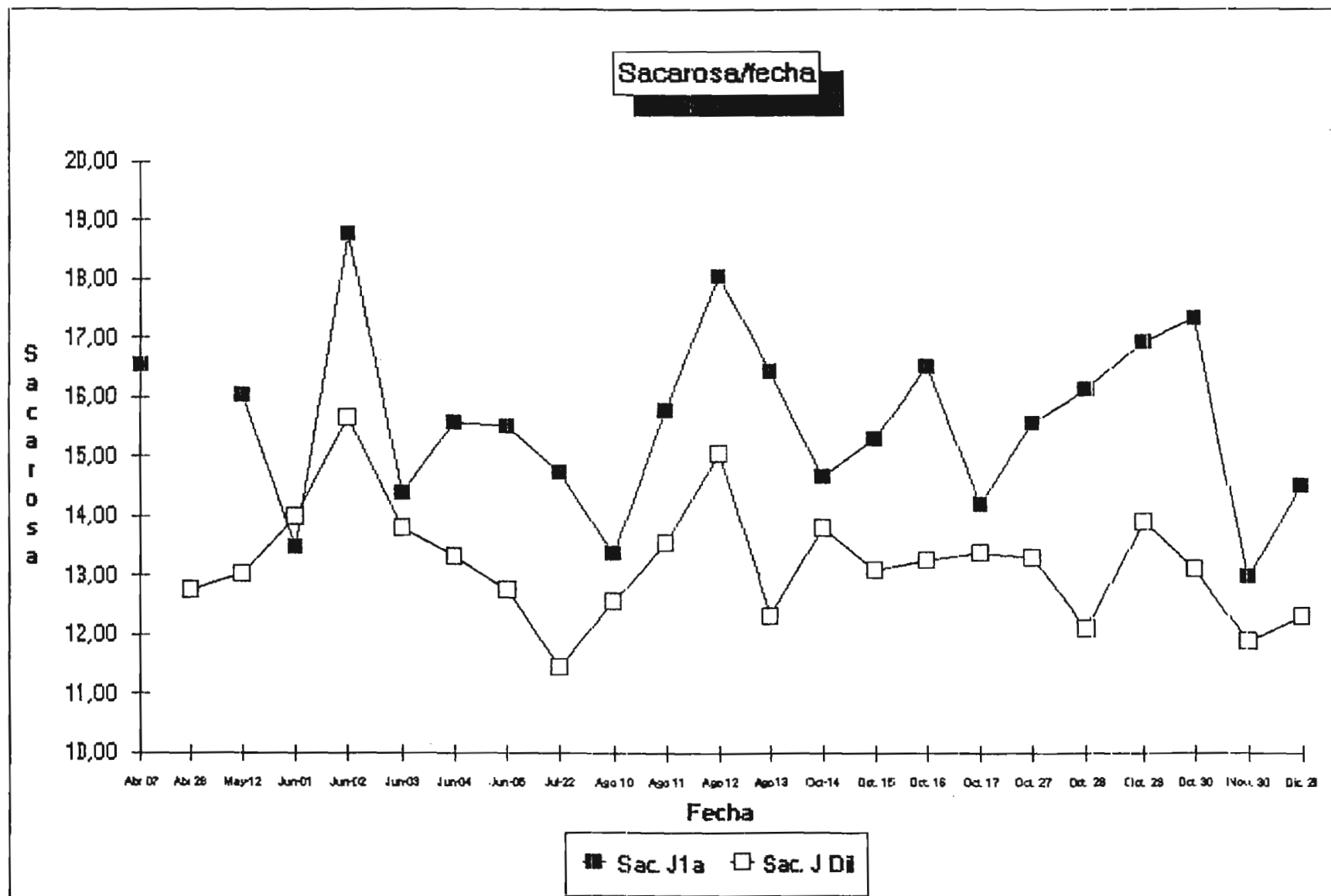


Figura 8. Datos de pérdidas de sacarosa en función de las fechas de muestreo.

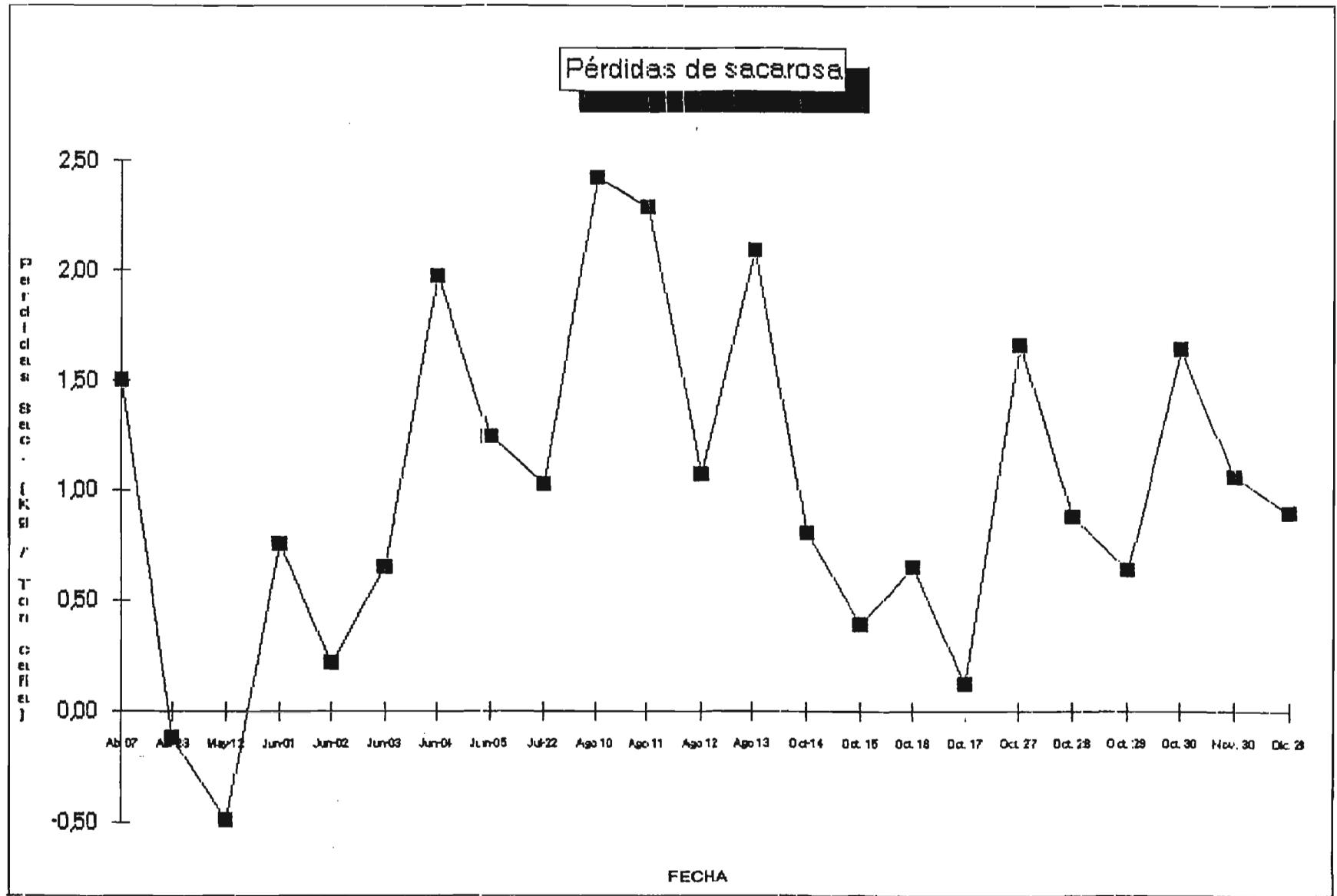
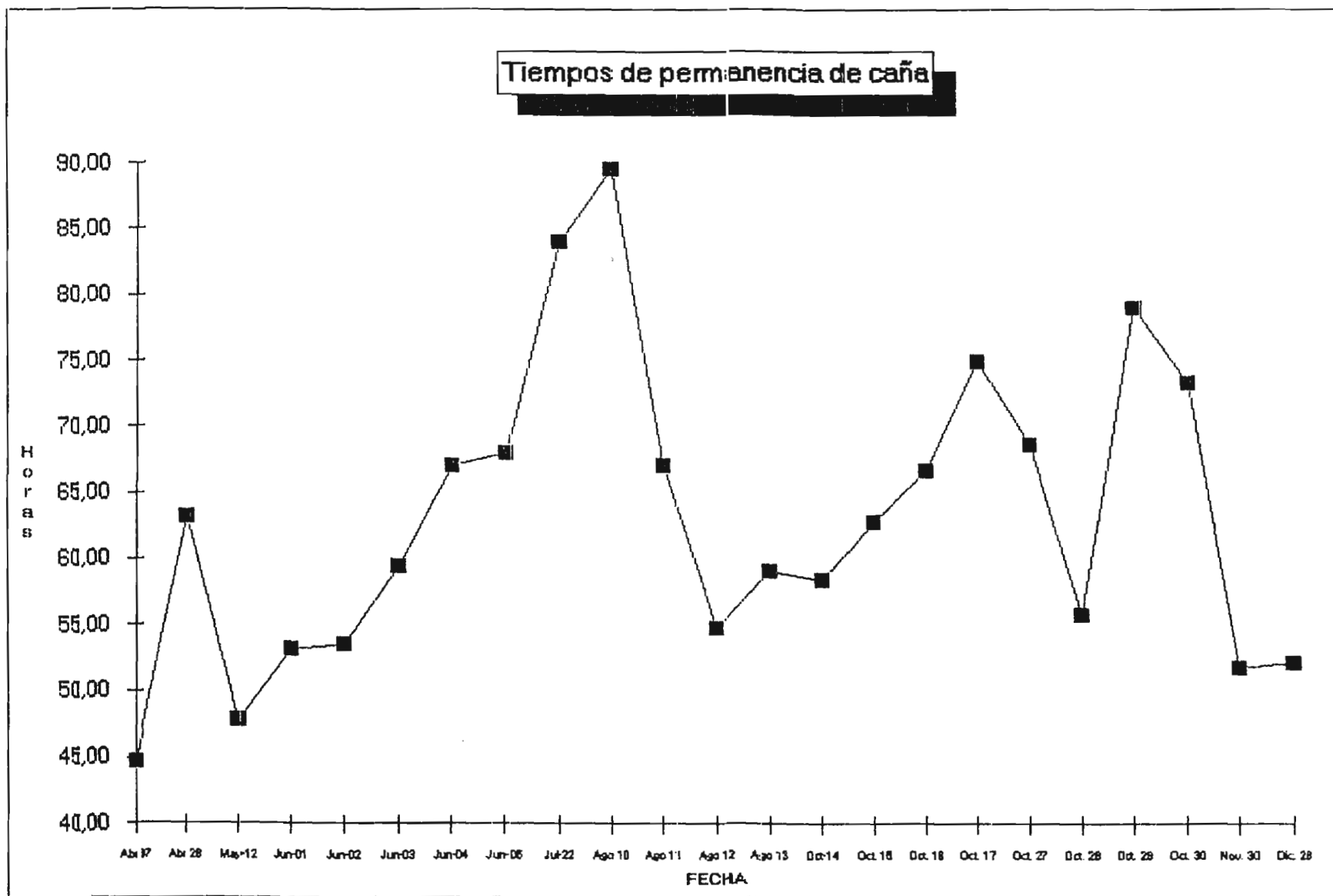


Figura 9. Valores de tiempos de permanencia de caña en función de las fechas de muestreo.





corroborar los resultados anteriores de Brix; así se puede referir tanto al brix como al contenido de sacarosa para comparar los jugos.

Figura 8: las pérdidas por inversión de sacarosa se calculan con la fórmula de Cloninger (indicada anteriormente). Los valores varían desde -0,2 hasta 2,5 Kg de azúcar/ Tonelada de caña; con un promedio de 1,02 Kg azúcar/ Tonelada de caña. Eso también coincide con el factor generalmente aceptado tanto en los ingenios como en la literatura. Esta pérdida de azúcar resulta de varios aspectos como inversión, degradación química, condiciones operativas y, por parte, de la actividad microbiana.

Figura 9, el tiempo de permanencia de caña es muy variable; va desde 44,74 horas mínimo hasta 89,51 horas con un valor promedio de 63,24 horas. Se recomienda generalmente no rebasar las 50 horas, para evitar un aumento en las pérdidas por inversión de sacarosa. Tratemos de correlacionar la pérdida de azúcar, contenido de sacarosa y Brix con este tiempo de espera tanto en el campo como en el ingenio, pero los coeficientes de correlación no son significativos.

Figura 10 a 12. Tampoco fueron significativos los coeficientes de correlación entre el número de microorganismos y el contenido de azúcares, aun que si, parece que exista una tendencia negativa entre el número de microorganismos y el contenido de sacarosa o Brix. Es decir que más microorganismos hay en los jugos, menos sacarosa hay en los mismos. Pero como el contenido de microorganismos no es el único factor que interviene en la pérdida de azúcar, el factor de correlación no es correcto. Entonces no se puede esperar recuperar todo el azúcar perdido con la sola inhibición de la actividad microbiana.

Se ha observado que los días 22 de Julio y 10 de Agosto, el alto número de bacterias coincide con los tiempos más largos de permanencia de la caña en campo y patio.

Figura 10: Perdidas de sacarosa en relacion con el tiempo de espera en campo

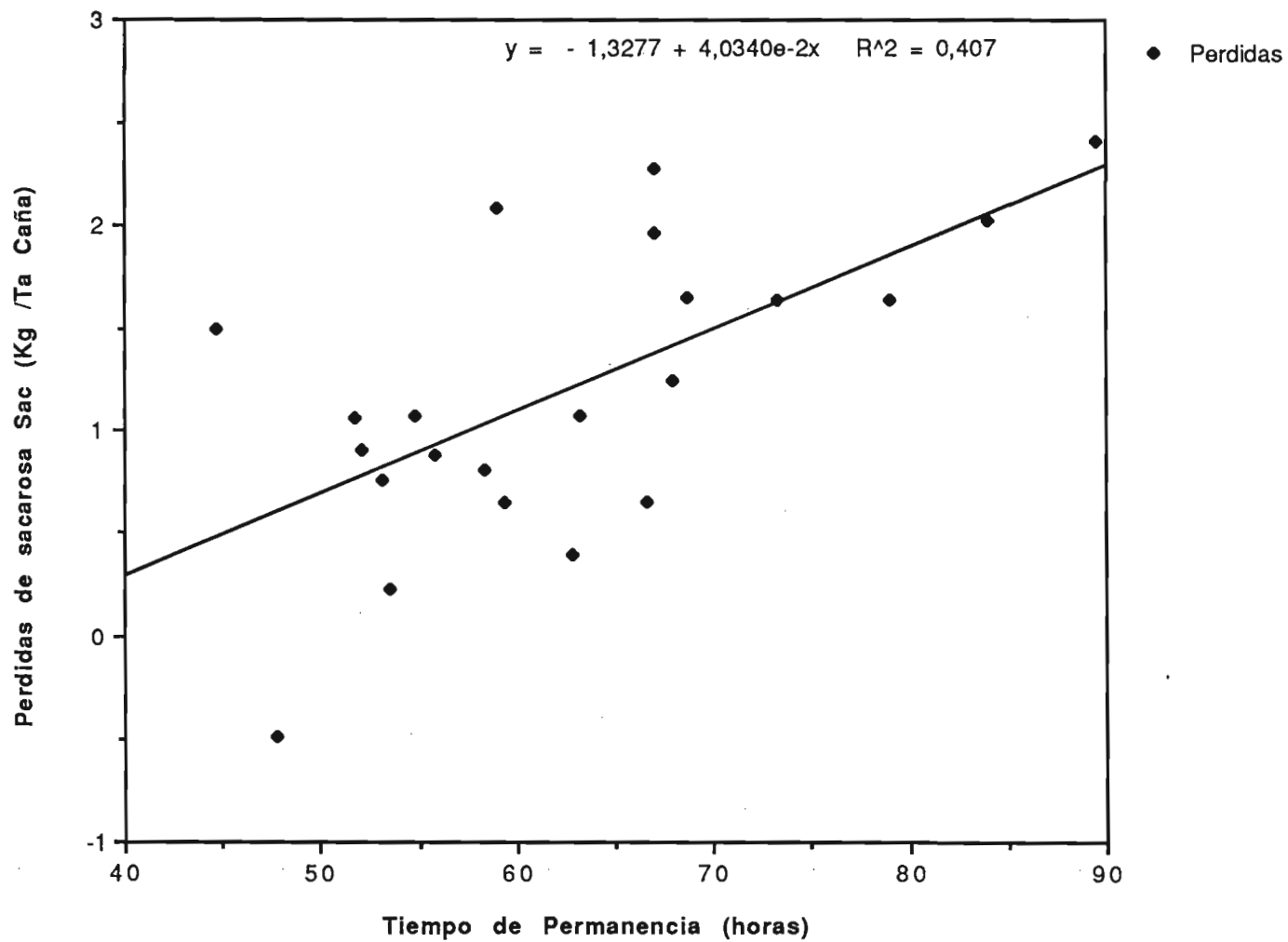


Figura 11: Numero de bacterias contra el tiempo de espera en campo

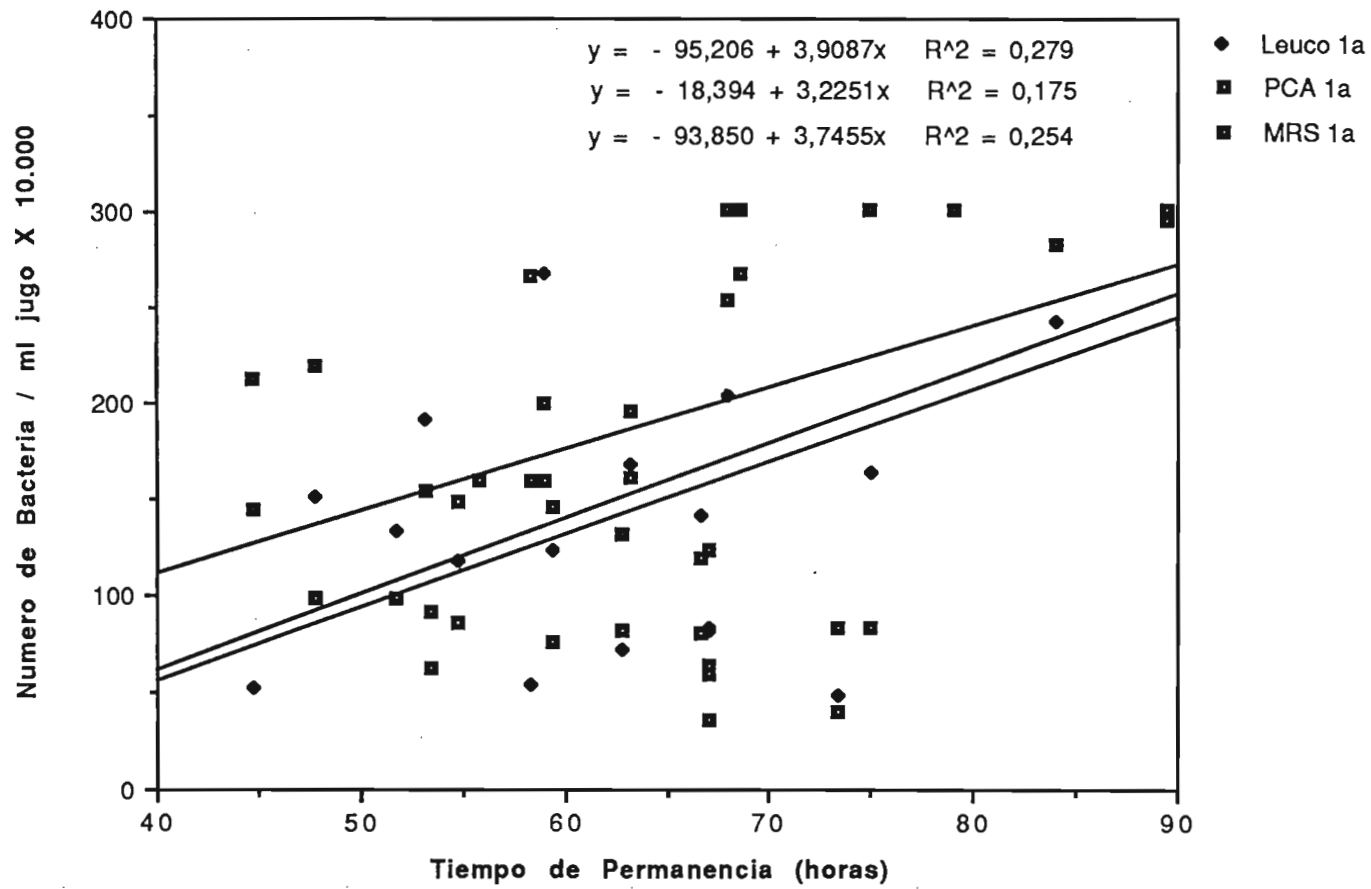


Figura 12a: Relación entre las microfloras y sacarosa en jugos de 1a extracción

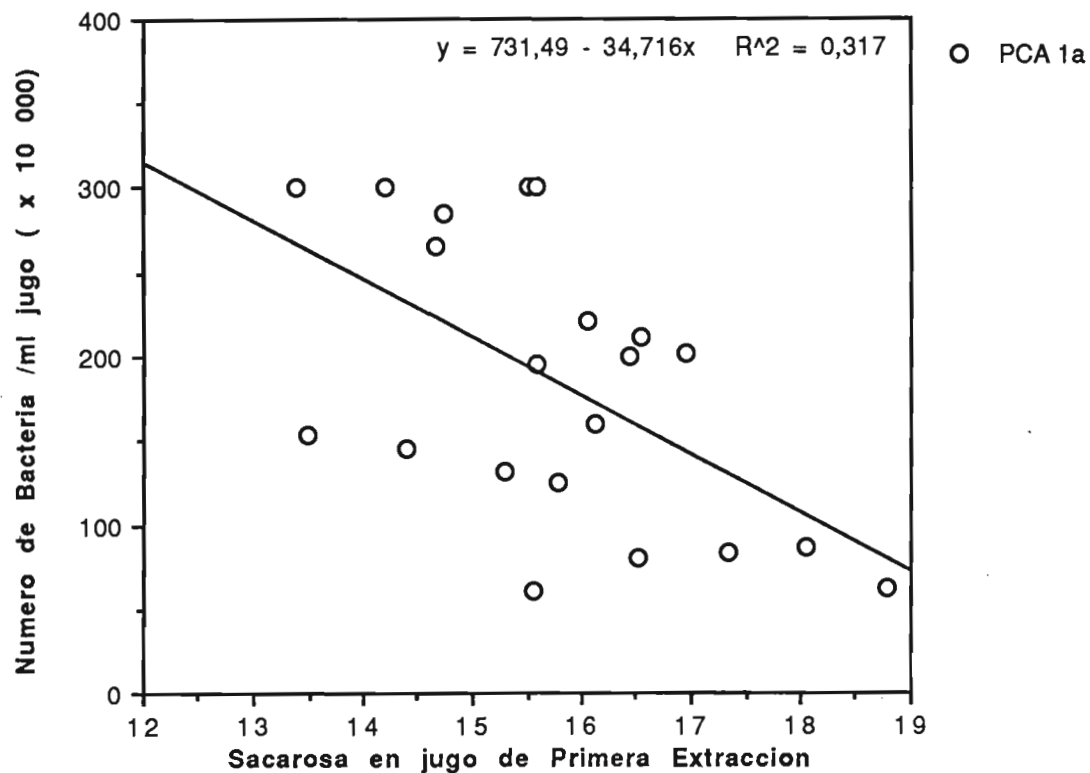
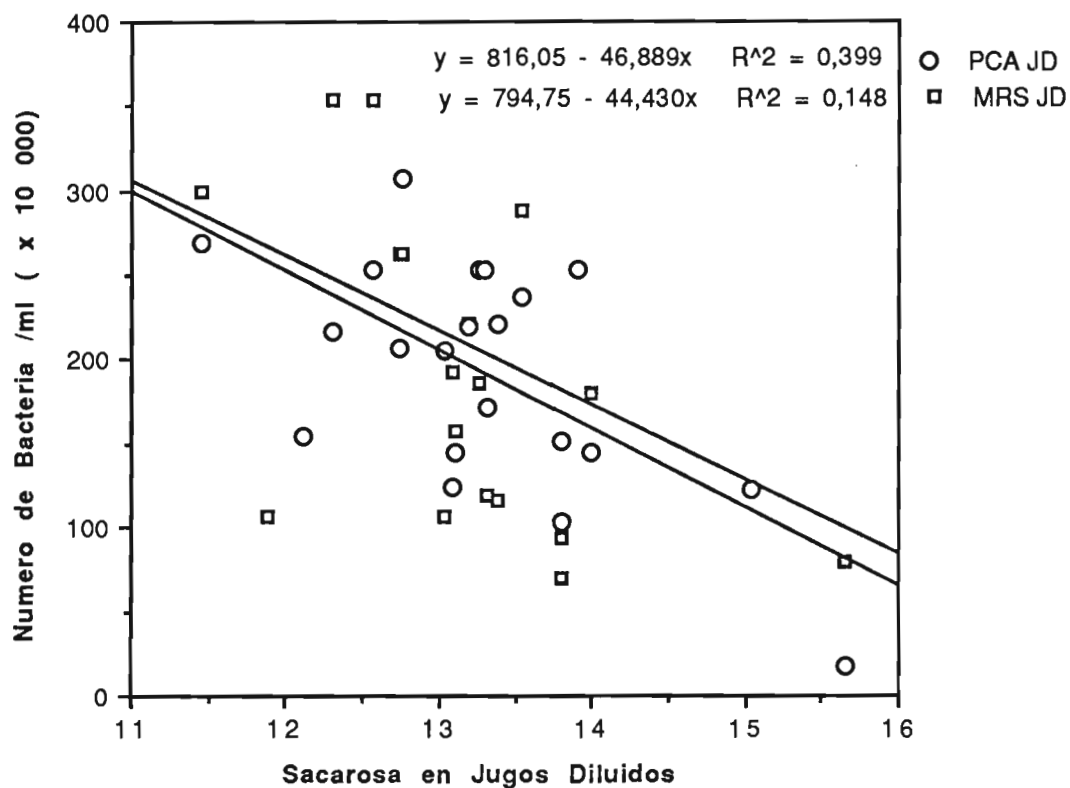


Figura 12b: Relación entre las microfloras y sacarosa en jugos diluidos



### 7. CONCLUSION

La table 7 presenta los datos de manera resumida:

TABLA 7 : Numero de Bacteria por ml de jugo de caña

Tipo de Microflora	Jugo de 1º Extr.	Jugo Diluido (/0,85)	% Aumento
Microflora Mesofilica Total	1,95e+6	2,21e+6	13,00%
Microflora Lactica (Lactobacillus)	1,61e+6	2,22e+6	37,80%
Microflora Lactica (Leuconostoc)	1,67e+6	2,10e+6	25,70%
Levaduras mesofilicas	1,36e+6	1,53e+6	12,50%

Con respecto al contenido y desarrollo de las bacterias en los jugos de caña, los resultados obtenidos nos permitieron apreciar el rango de variabilidad, y calcular un promedio de las poblaciones contenidas en los jugos. La tabla x nos presenta los resultados del promedio de cada tipo de microflora en jugos de primera extraccion y el nivel de crecimiento durante la etapa de la molienda. Particularmente, se puede observar que el nivel global promedio de la contaminacion natural es cerca de  $2 \cdot 10^6$  celulas/ml de jugo.

El nivel de esta microflora natural se multiplica por un factor de 13% en la etapa de la molienda. Las levaduras se multiplican a un nivel similar de 12.5% y son presentes en un porcentaje bastante importante.

La microflora lactica global es la mas activas con un crecimiento de 37,8%. Finalmente las bacterias de tipo Leuconostoc tienen un nivel de mutiplicacion de 25,7% y repensentan una gran parte de la microflora contaminante. Si se considera que en este tipo de medio hypersacarosado los Leuconostoc tienen la capacidad de producir dextranas, se debe dedicar más atención al desarrollo de esta microflora, porque no solamente provoca perdidas de azucar, sinon tambien causan daños a los procesos de elaboraci3n del azucar.

## 8. BIBLIOGRAFIA

CLARKE, M., et al. 1980. Sucrose loss in the manufacture of the cane sugar. Congress of the ISSCT XVII Manila- Filipinas. Proceedings Manila. (3) : 2192 - 2203.

COSTA, M., et al. 1987. Proposta de uma rotina rapida para avaliacao da perda de sacarose mediante aplicacao de biocida em caldo primario. Congreso Nacional de Stab e convecão de ACTALAC, Olinda- Brasil. p 521 - 534.

DUARTE, E., et al. 1982. Análisis microbiológico de productos azucareros. Tecnología azucarera. Editorial Científico Técnica. La Habana- Cuba. 28 pp.

EGAN, B.T., KIRBY, L.L., NOBLE, A.G. 1977. A review of recent developments concerning the biodeterioration of surcane. Congress of the ISSCT XVI Sao Paulo- Brasil. Proceedings Sao Paulo. p 321 - 326.

KOPPER, O., 1982. Perdida de sacarosa. Seminario de tecnología moderna de la caña de azúcar. Memorias p 55 - 69.

LACEY, J., 1980. The microbiology of the bagasse of the sugarcane. Congress of the ISSCT XVII. Manila - Filipinas. Proceedings Manila. (3) : 2442 - 2461.

MANUAL DE MEDIOS DE CULTIVO DE MERCK., 1990. 355 pp.

MEADE, G., CHEN, J.C., 1975. Cane Sugar Handbook. Awiley Interscience Publication. 10<sup>a</sup> Ed. 947 pp.

Anexo nº 3

**PRODUCCION DE ACIDO LACTICO A PARTIR DE  
VINAZAS DE DESTILERIA**

**FERNANDO BOLIVAR MARINEZ**

**ALEJANDRO LOPEZ MANRIQUE**

*Tesis de Grado presentada como requisito  
parcial para optar al título de Ingeniero  
Químico.*

*Director: Dr. Maurice Rimbault*

*Co-director: Química Olga Rojas*

CALI  
UNIVERSIDAD DEL VALLE  
FACULTAD DE INGENIERIAS  
INGENIERIA QUIMICA  
1994



## **INTRODUCCION**

Una parte inevitable de cualquier actividad humana e industrial es la obtención de desechos, es así como en la industria alimenticia se producen cantidades considerables de subproductos de desecho, los cuales necesitan costosos tratamientos para poder cumplir con la legislación legal de residuos. Por este motivo, cualquier método que reduzca el costo de disposición de residuos, o que incluso genere ganancias a partir de otros productos obtenidos del efluente, es de interés económico para la industria. La mayor contribución a la carga contaminante de la industria alimenticia es el contenido de carbón orgánico.

Los métodos tradicionales de tratamiento de aguas residuales están basados en la transformación microbiana de la materia orgánica por medio aeróbico o anaeróbico, con el objetivo principal de reducir el contenido de contaminantes y no el hecho de recuperar algunos recursos contenidos dentro de estos residuos (azúcares, proteínas, vitaminas y minerales).

Las vinazas son un residuo líquido que se produce después de la fermentación alcohólica de las mieles finales de la caña de azúcar, proceso realizado en la mayoría de las industrias de licores y de alcohol en nuestro medio. Este líquido es evacuado desde la parte inferior de la columna de destilación y finalmente es descargado al sistema de drenaje. A este residuo se le analiza solamente su contenido de alcohol, para así mantener un control de las cantidades perdidas y calcular las eficiencias en la destilación.

En nuestro caso, el efluente a tratar son las vinazas, las cuales poseen un contenido de sólidos del 7-10% y su disposición (en vista del alto DBO y el volumen a manejar: 13 litros de vinazas se producen por cada litro de etanol ) puede traer muy serios problemas. Es evidente que la utilización eficiente de estas vinazas tiene gran importancia en los costos finales de producción de alcohol.

En pequeñas destilerías rodeadas por cultivos de caña de azúcar se ha vuelto práctica común bombear estos efluentes al cultivo de caña como fertilizante. Esta práctica se vuelve más difícil para grandes destilerías, especialmente si éstas vinazas tienen un alto nivel de DBO, de cerca de 40-50.000 ppm y con un contenido de materia orgánica de cerca de 7.5 gr/mL.

Una destilería que produce 2500 Hectolitros de alcohol por día debe manejar 3250 toneladas de vinazas diarias, representando una carga alta de polución.

Por esto, la utilización de los residuos de un proceso primario como materia bruta en un proceso secundario podría tener un doble efecto :

- a. La producción de un producto secundario el cual puede ser vendido o reciclado al proceso primario.
- b. La reducción de los costos totales de la disposición de residuos debido a la disminución de la carga contaminante del efluente.

El presente trabajo pretende contribuir con algunas soluciones a estos puntos, mediante el uso de las vinazas para la producción de una sustancia útil, como lo es el ácido láctico, y que contribuya en la disminución de la carga contaminante de estos efluentes.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVOS GENERALES

Estudiar la factibilidad de la obtención de un producto secundario, tal como el ácido láctico, mediante el tratamiento de las aguas residuales que se obtienen después de fermentaciones alcohólicas de mieles finales de caña de azúcar (vinazas) usando un microorganismo homofermentativo y las condiciones óptimas de trabajo, tales como concentración o dilución de las vinazas, temperatura, pH, clases de microorganismos, etc., para así obtener un mayor rendimiento.

Obtener resultados que sean reproducibles para estudios posteriores que conlleven a complementar la información acerca de las fermentaciones lácticas.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Verificar las cifras obtenidas de la literatura sobre la producción de ácido láctico a partir de las vinazas.

- Seleccionar las cepas más adaptadas a las vinazas y las mejores condiciones a las que se obtienen el mayor rendimiento.

- Estudiar, definir y establecer las variables que

intervienen en el proceso de fermentación láctica.

- Estudiar la proporción óptima de vinaza concentrada a utilizar para un mayor rendimiento.

- Estudiar la toxicidad de ciertos componentes (cenizas, ácidos).

- Hacer un seguimiento estricto de cómo influyen la temperatura, el pH y los microorganismos en el medio de cultivo y por ende en el rendimiento de la producción del ácido láctico.

- Definir las bases de factibilidad del diseño de un proceso a nivel pre-industrial para la obtención de ácido láctico.

## 2. ANTECEDENTES

Antiguamente se preparaba el ácido láctico de una manera primitiva, agregando a soluciones azucaradas queso en estado de descomposición y creta levigada (o también óxido de zinc o carbonato de zinc) y abandonándolas a sí mismas a una temperatura de 35 - 50 °C. Según otra receta antigua, se utilizaba el suero extraído por filtración de leche agria, se agregaba más azúcar de leche y óxido de zinc y se dejaba fermentar a 25 - 35 °C.

El lactato de zinc que se formaba se descomponía, después de su cristalización, por medio de ácido sulfhídrico. Como es natural, el rendimiento obtenido con estos procedimientos era malo; con mucha frecuencia se obtenía más ácido butírico que láctico, juntamente con ácido acético, alcohol, etc. (ULLMANN)

El ácido láctico es un producto que se puede obtener por fermentación del azúcar, mediante la intervención de un grupo de microorganismos llamados fermentos lácticos.

El ácido láctico fue identificado por Scheele en 1780 en la leche agria y por esto recibió el nombre que lleva. Durante largo tiempo se creyó que la caseína era en la leche la causa de su acidificación hasta que Pasteur en 1857 descubrió que la formación del ácido láctico era debida a bacterias.

Los químicos franceses Thenard, Fourcroy y Vauquelin y Bouillon-Lagrange negaron que el ácido láctico de Sheelee era

un solo componente; ellos postularon que el ácido era ácido acético combinado con un material animal. Otro químico suizo, Berzelius, repitió el experimento de Scheele y concluyó que el ácido láctico era un solo componente. El también encontró ácido láctico en leche fresca, en la sangre y en otros líquidos animales. El ácido láctico fue redescubierto por el químico francés Braconnot y poco después, un químico alemán proveyó la identidad del ácido de Scheele. En 1839, Fremy produjo ácido láctico por la fermentación de carbohidratos tales como la sucrosa, lactosa, manitol y la dextrina.

Su producción por fermentación fue descubierta por Blondeau en 1847. Schultze (1868) demostró la presencia de bacterias de ácido láctico en cultivos de levadura en destilerías. Pero no fue sino hasta el año 1877 que una bacteria del ácido láctico fuera aislada en cultivo puro; Lister había aislado el *Streptococcus lactis*. Durante este mismo período, Delbruck estuvo tratando de determinar la temperatura más favorable para la fermentación del ácido láctico en las destilerías. El concluyó que a relativamente altas temperaturas se favorecen altos rendimientos de ácido láctico.

La producción comercial del ácido láctico empezó probablemente en 1881 cuando O. E. Avery en Littleton, Massachusetts, trató, sin éxito, de reemplazar la crema de tartar por ácido láctico en el polvo para hornear.

La producción mundial de ácido láctico se incrementó lentamente, con Alemania a la cabeza, y después de 1930 el uso industrial principal del ácido láctico fue en la industria del cuero.

Sin embargo, sus buenas propiedades como solvente, su facilidad de polimerizar y la alta solubilidad de la mayoría de sus sales, son ventajas las cuales fueron progresivamente utilizadas en la industria alimenticia, farmacéutica y plástica.

Estudios sobre fermentaciones para la producción de ácido láctico se iniciaron a comienzos del siglo XX. En 1938, H. Papineu Coutore presentó una visión general y descripción del proceso de preparación del ácido láctico por fermentación. Posteriormente en 1939 fué estudiada la fermentación industrial para producir ácido láctico y su probable futuro en la agricultura y la industria química de sintéticos (37); finalmente, en 1940 C. Pan, W. H. Peterson, y Marvin J. Jhonson realizaron un estudio muy importante sobre la aceleración del proceso de fermentación para la producción de ácido láctico por sustancias termolábiles (24).

Posteriormente se pasó a estudiar las fermentaciones lácticas continuas, cuyas experiencias fueron realizadas por T. B. Vick Roy et al. [17]

Recientemente se han realizado estudios por K. P. Tiwari, S. P. Singh y A. Pandey, en 1978, que tratan sobre la influencia de las vitaminas, sustancias éstas que estimulan la fermentación por lactobacilos. [15]

S. Steross y Y. Linko encontraron que utilizando lactobacilos inmovilizados en reactores batch con recirculación, teniendo como sustrato glucosa se alcanzan los rendimientos máximos al adicionar levadura. [14]

### **3. IMPORTANCIA Y JUSTIFICACION**

Pese a Colombia ser un país conocido en el mercado exterior como exportador de una gama de diferentes productos, es necesario a veces, por la gran demanda interna, la importación de algunos productos. Tal es el caso del ácido láctico, cuya demanda para el año 1989 fue de 33739 kg y para el año 1990 se duplicó casi la importación a 65056 kg.

El ácido láctico posee un amplio rango de aplicación, como lo son los campos de la industria alimenticia, la farmacéutica, la de textiles y la de tintas.

Debido a la gran cantidad de vinazas que resultan de las fermentaciones alcohólicas y a la gran carga contaminante que éstas poseen, es necesario la depuración de dichas vinazas para la obtención de cargas contaminantes permisibles que cumplan con las normas exigidas por el gobierno.

La utilización de microorganismos homofermentativos para el tratamiento de estas vinazas, además de disminuir la carga contaminante, proporciona la obtención de un producto secundario útil, como es el caso del ácido láctico, metano, acetona, butanol, etc., los cuales contribuyen con una ganancia extra al proceso principal. Este procedimiento a nivel industrial es una generación de empleo.

Poco a poco la utilización de microorganismos para las conversiones va tomando auge en nuestro país, demostrando así que la biotecnología va en creciente desarrollo.

#### 4. REVISION TEORICA

##### 4.1 VINAZAS. ASPECTOS GENERALES

###### **El problema de las vinazas**

Como se conoce, las vinazas representan un grave problema de contaminación ambiental, considerando sus grandes volúmenes ( 1 Lt de alcohol genera entre 15 y 2 lts de vinaza ). La producción de ácido láctico puede ser una buena oportunidad de generar ganancias adicionales para las insdutrías. Las vinazas son el causante del 70% de la contaminación ocasionada por las industrias de licores; tienen un pH que varia entre 3.7 y 4.5 ; temperatura entre 60 y 80°C, posee ácido sulfúrico libre que lo hacen altamente corrosivo, elevados valores de DQO y DBO; debido a esto, al ser descargado directamente en los rios se convierte en un agente contaminante de grandes efectos nocivos en la flora y fauna acuática. Los mayores inconvenientes y problemas cuasados por las vinazas son :

- Elevado DBO causa toxicidad en animales acuáticos, matandolos por asfixia.

- Disminuye la microflora y microfauna que forman el platoon de los rios.

- Provoca la propagación de la malaria y enfermedades debido al aumento de la población de insectos nocivos.

- Causa de olores fétidos provocados por la descomposición y putrefacción de materia orgánica .

- Resiste a cualquier tipo de tratamiento empleado para otros residuos industriales.

- Debido a la temperatura de descargo ( 60 - 80 °C ) provoca efectos nocivos por conta minación térmica .

###### c)- Composición de las Vinazas

La composición química de la vinaza depende de cuatro factores: naturaleza y composición de la vinaza, naturaleza y composición del mosto, naturaleza y composición del vino y tipo de trabajo realizado por las columnas de destilación.

La tabla No. 3 nos muestra cuatro caracterizaciones de vinaza en diferentes países, incluyendo Colombia.

En general, se puede evidenciar que se trata de un material que contiene más del 93% de agua; siendo que el 74.8% de los constituyentes sólidos que la componen son sustancias orgánicas, consecuentemente se puede definir como un residuo líquido orgánico. De sus constituyentes minerales el 25.15% son sólidos, de los cuales el 63.47% corresponden al potasio.

Las siguientes son algunas caracterizaciones de las vinazas realizadas en diferentes fechas: de acuerdo a Underkofler y Hickey, la composición de las vinazas secas es aproximadamente como sigue [9]:

DQO promedio VINAZA MELAZA : 75 - 80.000 mg/l  
 DQO promedio VINAZA DE HTM : 40 - 45.000 mg/l

TABLA #3 : CARACTERISTICAS DE LAS VINAZAS

ITEM* (mg/L)	O R I G E N			
	CUBA	BRASIL	ARGENTINA	COLOMBIA
DQO *	67258	31350	80000	78055
DBO5 *	-	17070	-	30257
pH	4.5	3.73	4.6-5.1	4.0
Acidos Volátiles *	410	3100	-	-
Calcio *	2033	-	-	995
Magnesio *	1209	-	-	145.43
Fósforo *	268	100	400	665.00
Nitrógeno	1100	410	2500	-
Potasio *	-	1470	-	8333.00
Sólidos Totales *	-	25200	90000	77.949
Sólidos Volátiles *	-	19300	70000	58.634

\* Base: 50000 L/d Etanol.

**TABLA #6 : CARACTERIZACION DE LAS VINAZAS (Sucromiles)**

PARAMETRO	UNIDAD	VALOR	PARAMETRO	UNIDAD	VALOR
DQOt	mg/L	70000	Fósforo	mg/L	32
DQOs	mg/L	58000	PO4	mg/L	100
DBO5	mg/L	26450	Cobre	mg/L	1.0
SST	mg/L	13000	Zinc	mg/L	8.0
SSV	mg/L	10000	Hierro	mg/L	21
Azúcar	% p/v	0.8	Sodio	mg/L	186
Alcohol	% v/v	0.2	Potasio	mg/L	5000
Densidad	g/mL	1.0	Calcio	mg/L	316
pH		4.3	Magnesio	mg/L	860
Temperatura	°C	96	Manganeso	mg/L	3.7
Nitrógeno	mg/L	633	Plomo	mg/L	0.7

Materia mineral	29.0%
Azúcares ( reductores )	11.0%
Proteínas	9.0%
Acidos Volátiles	1.5%
Gomas	21.0%
Ac. Láctico combinado	4.5%
Otros ac. orgánicos	1.5%
Glicerol	5.5%
Lignina, cuerpos fenólicos	17.0%

**Posibles usos y/o tratamientos de vinazas.**

Tratamientos fisicoquímicos :

Los tratamientos fisicoquímicos son usados como métodos previos para etapas posteriores tales como evaporación, biodigestión, recirculación, entre otros.

Los mecanismos para tratamientos de vinazas por vías fisicoquímicas son variados, al igual que los medios usados para este efecto. En Brasil, se han llevado a cabo ensayos en tratamientos de floculación, coagulación y decantación , algunos ya de uso tradicional como etapas preliminares en actividades industriales de destilerías principalmente.



Para el caso de la coagulación, se llevaron a cabo ensayos con cal comercial, bentonita cálcica y sódica, polielectrolitos aniónicos, cloro-sulfato-ferrico, entre otros arrojando resultados en remoción de DQO en el orden del 32% y 30% con cal y bentonita respectivamente.

Otros estudios usando bentonita y poliacrilamina en proporciones definidas, como coagulantes han logrado resultados entre el 90% y el 95% en reducción de sólidos suspendidos entre un 30% a 35% en DQO.

Otros tratamientos tales como la ósmosis, ultrafiltración, ultracentrifugación, electrodiálisis, han sido estudiados de manera limitada debido a sus altos costos.

#### Electrocoagulación :

Mediante este proceso se alcanza la desestabilización de un sistema coloidal; se puede llevar a cabo mediante dos métodos dependiendo de la composición del electrodo.

a. Con ánodo noble, estos generalmente son fabricados en platino, plomo y grafito. En este proceso se aprovechan los iones presentes en el medio activando sus cargas por medio de los ánodos.

b. Con ánodo soluble, fabricados de materiales metálicos (Hierro, aluminio, acero) los cuales se disuelven durante el proceso proporcionando los iones para la formación de hidroxidos metálicos que sirven como agentes floculantes.

El proceso de electrocoagulación se rige por las leyes de Faraday: " La cantidad de iones liberados por los electrodos es directamente proporcional a la intensidad de corriente que circula a través de ellos, así la misma cantidad de electricidad libera el mismo número de equivalentes".

Para realizar la electólisis se requiere energía eléctrica, para producir un diferencial de potencial entre los electrodos y electrolitos.

Al provocar la desestabilización de los coloides se producen una serie de reacciones electrolíticas dando como producto la formación de complejos que pueden ser desde hidróxido-metálicos; los primeros son absorbidos sobre la superficie formando así una capa turbia, que posteriormente va siendo cubierta por el coagulante. La atracción electrostática entre los iones y los productos de la reacción electrostática aumentan la formación de los floculos produciendo la anulación de las cargas electricas.

Este proceso es factible técnicamente solo en casos en que la contaminación se deba en gran parte a la presencia de sólidos suspendidos ya que las remociones de DQO no sobrepasan

el 22% y el porcentaje en términos de color es muy bajo.

Por otra parte, la presencia de contaminantes que no coagulan y se encuentran en forma de soluciones dificultan su remoción.

### Ferti-riqación o aplicación de vinazas sobre los suelos

Esta técnica de ferti-irrigación es una de las soluciones al gran problema de la contaminación producida por las aguas residuales recogidas en el proceso de obtención de alcohol. Consiste en extenderlas sobre terrenos cultivados ( Fertilización ) , con el objeto de depurarlas y a la vez aportar fertilizantes y agua.

A pesar de la acidez de este desecho, su aplicación al suelo produce el desarrollo de la vida microbial del mismo, llevandolo a un descenso de la acidez, lo que representa un aumento del pH.

De la misma forma se incrementa la capacidad de intercambio catiónico, principalmente por el aumento de las concentraciones de  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$ .

La distribución de las vinazas : se realiza por riego en surcos requiriendo estaciones de bombeo permanentes, como en tuberías y canales de distribución . Este método requiere una topografía adecuada, una perfecta nivelación y la preparación previa de las vinazas para satisfacer las necesidades del suelo que se va a irrigar.

Para llevar a cabo esta técnica se deben tener en cuenta factores como :

- No contaminar la capa subterránea ni el aire.
- No deteriorar los suelos
- La pendiente del terreno debe ser menor al 3% para evitar un lavado del mismo y no una buena fertilización.
- Próximidad de la destilería al sitio de esparcimiento
- Conocimiento previo del tipo del suelo

El mal uso de vinazas como fertilizantes puede provocar inconvenientes como:

- Malos olores a que el efluente puede tener altos contenidos de sulfatos que en su composición generan ácido sulfúrico.

- Variaciones del pH, debido a la formación, desarrollo y crecimiento de la población de microorganismos mostrándose

inicialmente un pH bajo y un posterior aumento de este.

- En estudios realizados en Brazil por el Dr. Jaime Rocha de Almeida se concluye que el esparcimiento de este desecho provoca un aumento en el rendimiento del cultivo de caña de azucar por hectarea, pero una disminución de su riqueza azucarera.

- La irrigación frecuente y sin control provoca putrefacción del suelo y proliferación de mosquitos.

- Se recomienda espaciar al máximo una vez cada tres años, debido a los factores nocivos por superfertilización salina.

### Recirculación

Este método consiste en la recirculación de las vinazas a la cuba de fermentación, la implantación de este tipo de tratamientos no requiere mayores modificaciones en los circuitos de fermentación lo cual puede facilitar su uso. Este tipo de tratamientos soluciona en pequeña cantidad los problemas provocados por la industria destilera.

Este método presenta las siguientes ventajas tales como

- Disminución en costos de tratamientos de agua por cuanto disminuye el agua de dilución de las melazas para su tratamiento de fermentación.

- Proporciona buena parte de los nutrientes requeridos por la levadura, debido a que incluye la recirculación de componentes del medio fermentativo y de materiales adicionados durante el proceso.

- Disminución de volúmenes de ácidos sulfúrico y clorohídrico pues ayuda a ajustar el pH en el medio.

- Disminuye costos energéticos durante la dilución de la melaza, ya que son recirculados inmediatamente después de la destilación a una temperatura de 87° C aproximadamente.

Pero su desarrollo e implementación a nivel industrial requiere del conocimiento de diversos factores tales como materia prima, tipo proceso empleado, condiciones de operación, tipo de levadura usada, entre otros; pues se pueden producir efectos secundarios y negativos en el proceso fermentativo.

Por ejemplo, la recirculación de vinazas incluye la presencia de sustancias formadas durante la fermentación y destilación al igual que la recirculación de materiales adicionados posteriormente en el proceso, los cuales influyen en la formación y/o recuperación del producto, existiendo así,

la posibilidad de aumento del número y concentración de sustancias inhibitoras provenientes de la recirculación. Estos efectos inhibidores pueden ser debidos a :

Inhibición por componentes del alimento : Puede limitar la productividad y restringir el proceso incrementando los requerimientos energéticos para regular la concentración iónica interna en niveles no tóxicos.

Inhibición iónicas : Las levaduras requieren un número de iones inorgánicos en concentraciones apropiadas para su crecimiento y fermentación óptimos. Un desbalance en la nutrición iónica produce alteraciones tanto enzimáticas como morfológicas las cuales determinan la respuesta de las levaduras.

Inhibición por subproductos en la vinaza : La formación de subproductos en la fermentación etanólica como son el glicerol; 2-3 butanodiol; ácido acético, etc, se ve incrementada durante la recirculación de las vinazas. Ejemplos :

- Efectos del ácido acético : su inhibición sobre la levadura es detectable en concentraciones del 1 g/l , por la cual parece ser el más significativo.

- El glicerol puede afectar las levaduras en concentraciones altas. Otro tipo de efecto nocivo producido por la recirculación de vinazas es el aumento de la presión osmótica debido al aumento en la concentración de sólidos, el cual retarda la excreción del alcohol desde las células de la levadura provocando una disminución del porcentaje final del alcohol a medida que aumenta el porcentaje de recirculación.

La implantación de tratamientos alternos es importante ya que el porcentaje recirculado de vinazas debe estar entre el 10% y el 40% del agua de dilución, sin embargo, no se presentan estudios profundos al respecto.

Pese a ser un sistema atractivo por sus bajos costos y sus ventajas, su estudio e información es muy limitada y es un método de uso parcial, el cual no elimina el problema de contaminación debido al porcentaje de recirculación es limitado.

#### Producción de Acido Láctico.

Este ácido proviene principalmente de la fermentación de materias primas ricas en carbohidratos ( glucosa, hexosa, maltosa, etc.) por acción de micro-organismos, entre los cuales se destaca la bacteria "Lactobacillus delbrückii".

# ANALISIS de OPORTUNIDADES de TRATAMIENTOS de VINAZAS

M. Raimbault  
Asocaña/Orstom

Unidad: 70,000 m <sup>3</sup> /a	Fermentación ACETONA+ BUTANOL (252 Ta/a) (840 Ta/a)		Fermentación ETHANOL (850 Ta/a)		Fermentación ACIDO LACTICO (1470 Ta/a)		Fermentación GAS METANO (500,000 m <sup>3</sup> /a)		Fermentación PROTEINAS (SCP) (840 Ta/a)	
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
<b>Costos Anuales Operación:</b>										
Materiales (vinazas)	-770	0	-770	0	-770	0	-770	0	-770	0
Utilidades	588	588	931	931	784	784	35	35	858	858
Maniobra	72	72	72	72	58	58	10	10	48	48
Varios	29	29	29	29	35	35	3	3	181	181
<b>Costos Totales:</b>	-81	689	262	1032	106	876	-723	47	317	1087
Venta de producto(1):	353	353	210	210	882	882	78	78	319	319
Ingreso :	434	-336	-52	-822	776	6	801	31	3	-76
Venta de producto(2):	1058	1058	425	425	2940	2940	80	80	336	336
Ingreso:	1139	705	163	-607	2834	2058	803	33	19	-431
<b>Resultado:</b>		**				****		*		

(a): 90% eliminación de DQO ; valor = -11 US \$ / m<sup>3</sup> vinazas (futuro)

(b): situación actual; valor de las vinazas = 0 US \$ / m<sup>3</sup>

(1) : Precios subvaluados 1988; según J. Rockey et al. ;1988 (\*)

(2) : Precios actualizados

Precios en Miles de Dolares

(\*): Alternative strategies for the treatment of food processing waste waters. in Developments in food microbiol., vol4, Ed Elsevier, pp.187-221.

	Precios (Rockey, 1988)		Precios actualizados	
Acetona	400	US \$/Ta	1200	US \$/Ta
Butanol	300	US \$/Ta	900	US \$/Ta
Ethanol	250	US \$/Ta	500	US \$/Ta
Acido Lactico	600	US \$/Ta	2000	US \$/Ta
Gas Metano	0,16	US \$/ m <sup>3</sup>	0,20	US \$/m <sup>3</sup>
Proteina (SCP)	380	US \$/Ta	400	US \$/Ta

## TRATAMIENTOS de VINAZAS

	ACETONA BUTANOL	ETANOL	GAS METANO	ACIDO LACTICO	PROTEINAS (SCP)
RESULTADO A ( sin impuestos)	- 336	-822	31	6	-767
RESULTADO A ( con impuestos)	434	-52	801	776	3
RESULTADO B ( sin impuestos)	705	-607	33	2,058	-431
RESULTADO B ( con impuestos)	1,1139	163	803	2,834	19
	***		***	***	

Unidad de 70,000 m<sup>3</sup> de vinazas anual

Ref. Rockey et al. (1988)

Precios en Miles de US \$

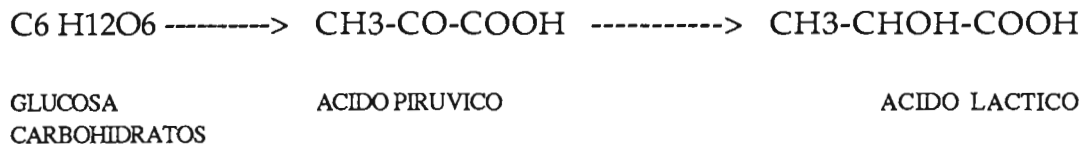
A: Datos 1988

B: Datos actualizados 1992

Su utilización en diferentes industrias ( Alimenticia, plástica, médica, cosmética, etc) hace de este ácido una alternativa de interés tomando en cuenta la situación actual de la gran demanda nacional ( 50 Ton/a), la cual es cubierta actualmente por las importaciones realizadas desde Brazil, Alemania y Estados Unidos principalmente.

Estudios realizados recientemente en Inglaterra ( ref. Rockey ) arrojan resultados positivos acerca de las posibilidades de valorización de las vinazas de destilerías ; otras investigaciones realizadas bajo el auspicio de la Corporación Andina de Fomento (CAF) indica que este ácido presenta grandes oportunidades de producción en los países andinos, y particularmente en Colombia.

Debido al contenido en azucares y carbohidratos no metabolizados durante el proceso de obtención del alcohol, las vinazas se convierten en una fuente de metabolitos aptos para la producción de ácido láctico . Mediante el uso de "Lactobacilus delbruckii" y bajo condiciones adecuadas de fermentación los carbohidratos se convierten en ácido láctico mediante la siguiente reacción.



Las condiciones adecuadas para el uso del "Lactobacilos Delbruckii" durante el proceso fermentativo son :

- Concentracion de azucar (Carbohidratos ); 10 - 12%
- pH 6.0 ( 6.3 para máxima velocidad de fermentación, 5,7 máxima producción de ácido láctico).
- Temperatura : 45 - 50°C

El proceso general para la producción del ácido láctico a partir de vinazas consiste en la adición de las melazas hasta el porcentaje adecuado ( 10 - 12% ) ; seguido de la estandarización de la mezcla durante 30 minutos y el calentamiento hasta 50°C donde se ajusta el pH a 6,0 con carbonatos de Calcio ( clarificación / floculación para eliminación del potasio y otros minerales ) se inocula la mezcla con un 5% de cultivo de la bacteria manteniendo la temperatura constante.

El proceso de obtención se muestra esquemáticamente a continuación :

Los resultados obtenidos por recientes estudios arrojan datos alentadores acerca de este nuevo tratamiento y debido a las necesidades actuales de consumo de éste producto .

**Tratamientos Biológicos :** Según la necesidad de oxígeno que presenten los microorganismos para la descomposición de la materia orgánica, se tienen dos formas para llevar a cabo esta degradación.

**Tratamiento Aeróbios :** La materia orgánica es oxidada por microorganismos aeróbios que utilizan al oxígeno como fuente de electrones desprendidos por la descomposición de la materia orgánica . Este proceso aeróbico se puede realizar en lagunas de oxidación aireadas ya sea natural o artificialmente.

**Tratamiento Anaeróbicos :** Es aquel proceso donde se degrada la materia orgánica por acción de grupos microbianos en ambientes, sin oxígeno, obteniéndose por reacción productos como biogas que en su descomposición presenta CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y un poco de H<sub>2</sub>, Na, NH<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>S.

En la digestión anaerobia la energía contenida en los compuestos orgánicos queda en su mayor parte en el gas metano.

#### CARACTERISTICAS DE PROCESOS AEROBICO Y ANAEROBICO

AEROBICO	ANAEROBICO
- Mejor eficiencia de remoción de materia orgánica.	- Menor producción de lodos
-Altos costos, para requerir gran cantidad de O <sub>2</sub>	- Bajos costos de operación por no requerir O <sub>2</sub>
- Limitaciones físicas en cargas orgánicas que pueda manejar	- Obtención de metano utilizable
- Tiene gran aceptación de cargas orgánicas	Gran posibilidad de degradación de productos tóxicos
- Existe gran apariencia en el proceso	- Menos requisitos de nutrientes
- Facilidad de operación	- Inestabilidad, lo cual dificulta la operabilidad
	- Arranque lento y delicado del proceso

En los estudios realizados por el grupo de biotecnología en la Universidad Nacional para la descontaminación producida por las



vinazas, empleando un filtro anaeróbico en la empresa de licores de Cundinamarca. Se encontraron los siguientes resultados:

- Los intervalos de pH afluente 6,5 - 8 y efluente de 7 indicando la capacidad buffer del sistema.

- El tiempo de retención hidráulico ( T.R.H. ) varia entre 12 y 2 días presentando el mayor número de ensayos entre 2,5 y 4 días.

- La producción de biogas varia entre 0,069 y 0,633 m<sup>3</sup>/kg de DQO aunque la mayor parte se mantuvo en el intervalo de 0,2 a 0,3 m<sup>3</sup>/kg DQO removido.

- Para valores altos de DQO en los efluentes, el comportamiento entre el porcentaje de remoción y el tiempo de retención hidráulico ( T.R.H ) son directamente proporcionales.

- No se puede trabajar con cargas orgánicas volumétricas muy altas debido a que el porcentaje de remoción disminuye notablemente.

- La carga volumétrica (1) máxima aplicable varia entre 12 y 14 kg de DQO/m<sup>3</sup> día; si se sobrepasa de este valor, se detectan incrementos notables de acidez y poca producción de biogas.

$$CV \text{ (Carga Volumétrica) } = \frac{DQO \text{ (Demanda química de oxígeno)}}{TRH \text{ (Tiempo de retenimiento hidráulico)}}$$

- Para lograr un buen rendimiento del tratamiento de vinazas es necesario llevar acabo una etapa de presedimentación de estas, debido al taponamiento presentado en los ductos que conecta el filtro con la bomba.

- En lo posible ( si el equipo lo permite ) no se deben modificar simultáneamente las condiciones de operación (DQO, afluentes, TRH, flujo de alimentación ) pues se produce una desestabilización del sistema. Esto implica más costos porque un operario debería estar vigilando el sistema con una previa capacitación en manejo de filtros.

- Uno de los objetivos de este estudio era analizar cual carga para filtro presentaba la mejor descomposición para obtener gran cantidad de biogas. En todos los filtros se observó que la producción de biogas es inversamente proporcional a la carga, de tal forma hay que diluir las vinaza para obtener el mejor rendimiento.

#### 4.2 ACIDO LACTICO

El ácido láctico (ácido 2 hidroxipropiónico,  $\alpha$ -hidroxipropiónico) es el más simple ácido hidróxido conteniendo un átomo de carbón asimétrico, existente en dos formas ópticamente activas un isómero de configuración L(+) que es el metabolizado por el organismo humano y un isómero de configuración D(-) que no es metabolizado y que cuando se acumula provoca hiperacidez de la orina por una decalcificación y una modificación racémica constituida por fracciones equimolares de las formas L(+) y D(-), todas solubles en agua.

Este ácido está ampliamente distribuido en la naturaleza. Es un constituyente primario del suero de la leche y un constituyente normal en la sangre y tejidos de los músculos de los animales. El ácido láctico es uno de los principales acidulantes en alimentos y productos para beber. Es también usado en el curtido de cueros.

Los ésteres del ácido láctico son útiles como lacas solventes y pequeñas cantidades son usadas directamente en plásticos.

El ácido láctico entra al campo farmacéutico como lactato de calcio y otras sales como lactatos de sodio y potasio, que son higroscópicos, han sido utilizadas como sustituto del glicerol.

Muchos de los recientes estudios van encaminados a fenómenos fisiológicos, así como aspectos de la química del ácido láctico y la transformación de carbohidratos, a través del ácido láctico como intermedio, en productos industriales, incluyendo intermedios químicos, solventes, plastificantes y resinas. El ácido láctico es un compuesto importante en bioquímica; la energía necesaria para la acción muscular aparece normalmente suministrada por la conversión de glicógeno a través de una serie complicada de reacciones, en ácido láctico racémico.[4]

El ácido láctico posee tres formas de presentación :

\* Comercial : Con impurezas, color acaramelado 55 - 60 % o también 45 - 50 % de pureza.

\* Comestible : 45 - 50 %, transparente y claro pero con un ligero tinte acaramelado.

\* Productos químicos : Incoloro con una concentración de 80 - 85 %

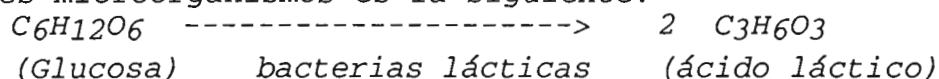
Es corrosivo por lo cual se utiliza níquel o aleaciones de acero con un porcentaje alto de níquel y cromo para su manejo.

4.2.1 Propiedades[9]

El ácido láctico es incoloro, inodoro, miscible en todas proporciones en agua, alcohol, acetona y éter, pero insoluble en cloroformo. Es un ácido débil ( $K=1.38E^{-4}$ ). Es sumamente higroscópico y delicuescente. Con un reposo prolongado, o más rápidamente calentándolo a 140 °C, se convierte en su anhídrido (ácido lactílico).

Fórmula	C3H6O3
Peso Molecular	90.08
Índice de refracción	1.4414
Pto de Fusión	D(+) y L(+): 52.8 a 54°C DL (según composición): 16.8 a 33 °C.
Punto de ebullición	122 °C
Gravedad específica	1,206
Calor de combustión	3616.0 cal/gr
Viscosidad	28.5 cp
Densidad	1.1748 gr/ml

La mayor parte del ácido láctico se produce industrialmente mediante las bacterias lácticas homofermentativas u otras parecidas. La reacción global en la producción de ácido láctico a partir de glucosa bajo la acción de tales microorganismos es la siguiente:



De hecho, tiene lugar en varias etapas, produciéndose, además, pequeñas cantidades de otras sustancias. Se calcula que aproximadamente la mitad del ácido láctico producido por fermentación es utilizado para fines alimenticios.

4.2.2 Microorganismos empleados[2],[10]

Depende de la materia prima a fermentar. Para la producción de ácido láctico a partir de glucosa, maltosa o sacarosa solía emplearse *Lactobacillus delbreuckii*. Sin embargo, cada día se tiende más a la utilización de las bacterias que producen el agriado de los alimentos enlatados, tales como *Bacillus coagulans*.

Para la fabricación de ácido láctico a partir del suero de la leche se ha seleccionado *Lactobacillus bulgaricus*. Para

la producción en aguas sulfitadas del papel se recomienda el empleo de *Lactobacillus pentosus*, que fermenta las pentosas, y cuando se utiliza hidrolizado de maíz, cáscaras de semillas de algodón y otros materiales, el microorganismo recomendado es *Lactobacillus brevis*.

Algunos hongos (por ejemplo *Rhizopus oryzae*), se han empleado experimentalmente para producir ácido láctico a partir de un medio de glucosa y sales.

#### 4.2.3 Producción de ácido láctico

La masa tratada por el calor se mantiene a una temperatura favorable al desarrollo del microorganismo con que ha sido inoculada: 45 °C para *Lactobacillus delbreuckii*, de 45 a 50 °C para *Lactobacillus bulgaricus* y *Bacillus coagulans* y 30 °C para *Lactobacillus plantarum*. El contenido óptimo en azúcar del medio varía del 5 al 20% dependiendo de la materia prima y del microorganismo. Se mantienen condiciones anaerobias y pH ligeramente ácido, neutralizándose el ácido láctico formado mediante la adición periódica de hidróxido o carbonato cálcico. El lactato cálcico se puede hacer precipitar como tal, o se convierte en ácido láctico mediante la adición de ácido sulfúrico. El ácido láctico que se emplea en alimentación debe estar mucho más purificado que el empleado para uso técnico.

#### 4.2.4 Usos [2], [9]

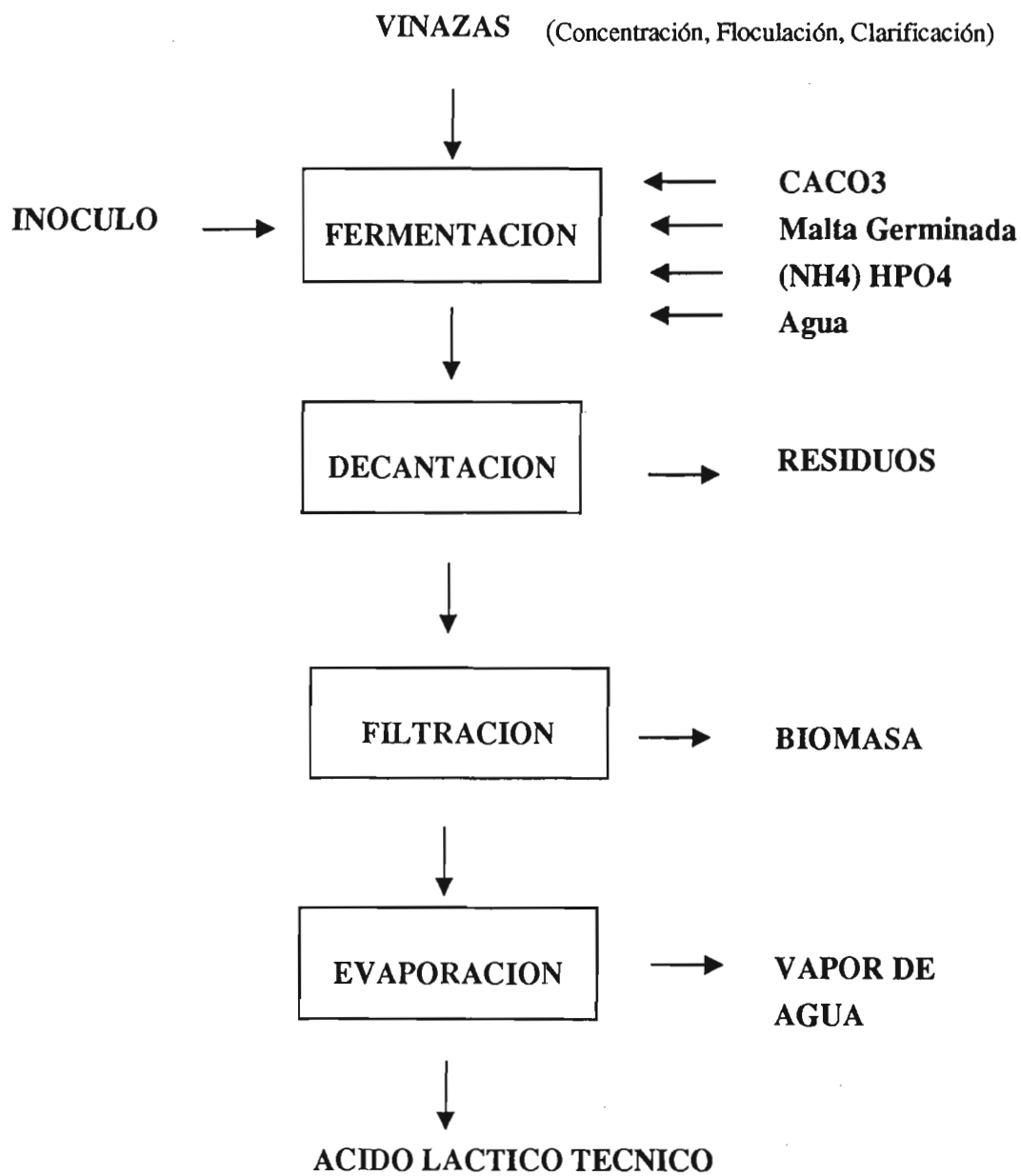
Abarcan un amplio campo en la industria alimenticia, farmacéutica, de textiles, litografía y de tintas. Se ha incrementado el uso del ácido láctico de calidad comestible en productos de repostería, en la cerveza, la mantequilla, el queso, los dulces, las claras de huevo desecadas, la pectina líquida, la jalea, extractos saborizantes, encurtidos, bebidas carbonatadas, sopas, etc.

Se utiliza como intermediario en la industria farmacéutica, en el tratamiento tópico de verrugas y como coagulante. Los plásticos biodegradables hechos en poliácidos lácticos son utilizados para suturar en cirugía.

En el campo químico es de gran interés para la síntesis química por ser un ácido no hidroxilado. Se emplea en la preparación de celofanes y resinas fenolformaldehído y puede combinarse con alcoholes y ácidos para producir poliésteres; se aplica en el curtido de pieles y en la industria textil y también se utiliza en la producción de algunos herbicidas, fungicidas y pesticidas.

Por sus propiedades ácidas y humectantes es muy utilizado en la formulación de cosméticos y lociones para la piel.

Es también considerado como un eficaz bactericida pulverizado



en el aire. Un germicida conteniendo lactato n-dodecilmanina y salicilato n-dodecilamina se utiliza como desinfectante, fungicida y como agente a prueba de moho.

En la industria del cuero ha sido usado desde hace mucho tiempo para desencalar las pieles, para remojar el cuero para suelas y en el curtido con vegetales. Además tiene uso en adhesivos, plásticos y resinas, tintas especiales y textiles, tratamiento de pozos de petróleo y agua.

Se utiliza en la acidificación de mermeladas, gelatinas, sorbetes, productos de pastelería, bebidas no alcohólicas y otros productos. Se añade a las salmueras utilizadas en la conservación de los encurtidos, olivas, rábanos picantes y pescado. Se adiciona a la leche de los niños para hacerla más digerible. También se utiliza en productos de limpieza por ser un compuesto no volatill.

#### Métodos sintéticos de producción de ácido láctico.

- (i) La reacción de sucrosa con óxido de calcio a altas temperaturas (240°C) .
- (ii) Monóxido de carbono y acetaldehído cuando reacciona en la presencia de ácido sulfúrico a 200°C y 900 atmosferas produce ácido láctico.
- (iii) Reacción de acetaldehído y ácido hidrocianico.
- (iv) Reacción de ácido nitroso sobre alanina (  $CH_3CH(NH_2)COOH$  )
- (v) Oxidación de propilen glicol.
- (vi) Un proceso para producir ácido láctico sintético de alta pureza desde lactonitrilo. (H processing)

### **4.3. BACTERIAS LACTICAS**

#### **4.3.1. Clasificación**

Se conocen distintas clasificaciones de este grupo de bacterias, unas de índole industrial y otras de acuerdo a características morfológicas y fisiológicas. Una clasificación más completa es la derivada por Orla Jensen, cuya división se hace según la propiedad de formar o no productos secundarios. [2]

#### I- Fermentos lácticos verdaderos sin catalasa.

- 1. Producen ácido láctico
- a. Forma alargada

Género *Thermobacterium*: Se caracterizan porque se desarrollan a altas temperaturas (45 55 °C), no haciéndolo debajo de 15 °C. Su forma es como bastoncitos alargados, entre otros : *helveticus*, *jogurti*, *bulgaricus*, *delbreuckii*,

*acidophilus, leichmanii, solvarius.*

Género *Streptobacterium* : Bastoncitos cortos, en largas cadenas. Desarrollan bien alrededor de 30 °C y no desarrollan debajo de 10 °C, entre otros: *plantarum, casei.*

b- Formas esféricas.

Género *Streptococcus* : En cadenas largas y cortas o diplococos, son : *lactis, cremoris, thermophilus, pyogenes, liquefaciens, glicerinaeus, mulinaceus, faecium.*

2- Producen ácido láctico y otros productos secundarios en cantidades apreciables.

a- Formas alargadas.

Género *Betabacterium* : Anaerobios absolutos, se asemejan a una "Y", entre ellos : *fermenti, bucheri, cellobiosus, viridescens.*

Género *Bifidobacterium* : Aerobios, bastoncitos cortos, entre ellos : *caucasicum, brevis, longum.*

Género *Betacoccus* : Muy abundantes en la naturaleza, forman cadenas muy cortas, entre ellos: *arabinnosaceus, bovis, cremori.*

## II- Seudo fermentos lácticos con catalasa.

a- Formas alargadas.

Género *Microbacterium* : Gram positivos son : *lacticum, mesentericum, floicum.*

b- Formas esféricas.

Género *Tetracoccus* : Entre ellos : *casei, liquefaciens, mycodermatis.*

TABLA 8. GENERALIDADES. Bacterias Lácticas[3]

<u>Bacteria</u>	<u>Característica</u>	<u>T(°C)</u>	<u>Cultivo</u>	<u>Ac. Producido</u>
<i>L. Delbrueckii</i>	Homofermentativo	45	Féculas	D(+) láctico
<i>L. Casei</i>	Homofermentativo	30	Suero-Leche	D(+) láctico
<i>L. Leichmannii</i>	Homofermentativo	36	Suero-Leche	L(-) láctico
<i>L. Bulgaricus</i>	Homofermentativo	35	Suero-Leche	Mezcla (D y L)
<i>Strep. Lactis</i>	Aeróbico	30	Suero-Leche	D(+) láctico

Estas bacterias crecen fácilmente en la superficie de medios sólidos expuestos al aire, incluso no produciendo energía a través de la respiración. No poseen citocromos, lo que se refleja en la ausencia de metabolismo respiratorio generador de energía. Por tanto, el crecimiento de las bacterias del ácido láctico es el mismo en presencia de aire que en anaerobiosis.

Los fermentos lácticos presentan una capacidad de síntesis extremadamente limitado; todos estos organismos requieren factores de crecimiento complejos, invariablemente necesitan vitaminas del grupo B y un número considerable de

aminoácidos.

Las colonias lácticas son siempre relativamente pequeñas, no son nunca pigmentadas como consecuencia de la falta de citocromos; el cultivo tiene un aspecto blanco yesoso muy característico. El pequeño tamaño de las colonias se debe principalmente al poco rendimiento del crecimiento, consecuencia de su metabolismo generador de energía exclusivamente fermentativo.

Otro rasgo fisiológico que las caracteriza es su gran tolerancia al ácido, aunque pueden iniciar su crecimiento en medios neutros o alcalinos; la mayoría de las formas bacilares no pueden crecer en medios con pH superior a 6.

Esta capacidad de tolerancia de la acidez, tiene un gran valor selectivo en la competencia con otras bacterias.

Las bacterias lácticas homofermentativas transforman la glucosa en ácido láctico. Las heterofermentativas la transforman en una mezcla de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono. Los distintos productos terminales expresan la diferencia básica en cuanto a los mecanismos bioquímicos de degradación del azúcar.

Otra característica útil de las bacterias lácticas desde el punto de vista taxonómico, es la configuración del ácido láctico formado. En algunas bacterias, esta relación se lleva a cabo por una única enzima estereoespecífica, produciéndose bien sea el isómero del ácido láctico L(+) o bien el D(-).

Otras especies poseen dos enzimas de distinta estereoespecificidad y el producto terminal de la fermentación es una mezcla racémica de los isómeros D y L.

Como último aspecto para el reconocimiento de esta bacteria es que son Gram positivas, las cuales con un reactivo de Gram se colorean a violeta.

#### 4.3.2 Género *Lactobacillus*

Son bacilos, generalmente largos y delgados, que en la mayoría de las especies forman cadenas. Son microaerófilos, aunque existen algunos anaerobios estrictos; catalasa negativos y Gram positivos, fermentan los azúcares dando ácido láctico como producto principal.

Los **homofermentativos** dan, sobre todo, ácido láctico y únicamente pequeñas cantidades de ácido acético, CO<sub>2</sub> e indicios de otros productos; los **heterofermentativos** producen cantidades apreciables de productos volátiles como alcohol, además del ácido láctico. Los lactobacilos homofermentativos presentan temperaturas óptimas de 37°C o incluso superiores y comprenden especies como *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. thermophilus* y *L. delbrueckii*. *L.*



*fermentum* es el mejor ejemplo de un lactobacilo heterofermentativo, que crece bien a las temperaturas más altas. Los lactobacilos homofermentativos que poseen temperaturas óptimas menores comprenden *L. casei*, *L. plantarum* y *L. leichmanii*, mientras que las especies homofermentativas son *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. pastorianus*, *L. hilgardii* y *L. trichodes*. Todas las especies citadas excepto *delbreuckii*, *L. leichmannii*, *L. hilgardii*, *L. trichodes* y algunas cepas de *L. brevis* son fermentadoras de la lactosa con producción del ácido láctico y, en consecuencia, de inters en la industria láctea. Son fuentes importantes de lactobacilos las superficies de los vegetales, el estircol y los productos de lechera.

Los lactobacilos son interesantes en los alimentos por las siguientes características: (1) fermentan los azúcares, produciendo cantidades considerables de ácido láctico, lo que permite su empleo en la elaboración de productos fermentados vegetales y lácteos y en la elaboración industrial del ácido láctico, pero son perjudiciales para otros productos, por ejemplo, vino o cerveza; (2) la producción de gas y de otros productos volátiles por las especies heterofermentativas a veces perjudica la calidad de algunos alimentos, como el *L. fermentum* que crece en el queso suizo o *L. hilgardii* y *L. trichodes* en los vinos; (3) su imposibilidad de sintetizar la mayoría de las vitaminas que se necesitan, lo que les impide crecer bien en alimentos pobres en vitaminas y por esta causa se utilizan en ensayos para determinar el contenido vitamínico de los alimentos, y (4) la termoresistencia o propiedades termodricas de la mayoría de los lactobacilos que crecen bien a temperaturas altas, lo que les permite sobrevivir a la pasterización y a otros tratamientos trmicos, como el que se da a la cuajada en la elaboración de queso suizo y similares.

Especies de lactobacilos diferentes de las ya citadas se han encontrado en carnes refrigeradas, aunque slo se ha hecho referencia de algunos pocos; por ejemplo, *L. viridescens* que causa el enverdecimiento de los embutidos y *L. salinmandus* que también prolifera en los embutidos. Estos lactobacilos son excepcionales, en razón a su capacidad de crecer a bajas temperaturas.

## 5. PROGRAMA Y METODOLOGIA

### 5.1. PROGRAMA

El programa global considera los siguientes puntos :

5.1.1. Fermentación láctica de las vinazas con varias cepas de *Lactobacillus homolácticos*.

5.1.2. Utilización de vinazas concentradas de 1 a 6 veces como medio de cultivo.

5.1.3. Estudiar la toxicidad de ciertos componentes (cenizas, ácidos) y observar su influencia en los medios de cultivo y por ende en las bacterias lácticas.

5.1.4. Precipitación con cal y recuperación de lactato.

5.1.5. Balance del proceso.

### 5.2. METODO

5.2.1. Fermentación líquida de vinaza.

Se harán varias corridas para conocer el comportamiento de las bacterias lácticas en diferentes medios para así escoger las mejores. Con estas se experimentará utilizando como sustrato la vinaza en diferentes concentraciones para hallar la mejor, es decir la que permita un mayor rendimiento. En seguida se iniciará un escalamiento hasta llegar a nivel de reactor donde se realizaran pruebas de variación de las condiciones de operación (Temperatura y pH) partiendo de los rangos obtenidos en la literatura y un estudio cinético.

5.2.2. Tratamiento de Vinazas

El tratamiento de las vinazas está dividido en tres partes: (1) Utilización de la vinaza pura. (2) Utilización de la vinaza diluída. (3) Utilización de la vinaza concentrada, para lo cual se empleará un evaporador. Se adicionarán aportes (nutrientes) si es necesario, tal es el caso de aminoácidos y vitaminas que permitan obtener un medio en el cual se produzca un mayor crecimiento de las cepas.

5.2.3. Control de pH

Debe ser llevado un control del pH dentro de cierta flexibilidad que es permitida, ya que cada organismo tiene un pH de crecimiento

óptimo mínimo y máximo.

La mayoría de las especies crecen a pH casi neutro, algunas se ven favorecidas por una reacción ácida y otras crecen bien en medios débilmente ácidos o alcalinos.

El salirse de los rangos permisibles influye en el medio de cultivo y puede ocasionar inactividad o muerte de los organismos.

Los mismos productos originados por las bacterias son inhibidores.

#### 5.2.4. Análisis de jugos de fermentación con HPLC.

Es necesario hacer análisis de las muestras para tener un conocimiento del ácido láctico obtenido, así como del azúcar no convertida para encontrar la eficiencia del proceso y realizar el balance de materia.

#### 5.2.5. Análisis de cenizas.

Es necesario el conocimiento de la composición de las cenizas para conocer la carga contaminante, estudiar su toxicidad y como ayuda para el balance de materia.

#### 5.2.6 EXAMEN DE CONFIRMACION DE LA PRESENCIA DE ACIDO LACTICO.

##### PRIMER METODO.

El exámen de confirmación se lleva a cabo como sigue:

Prepare 0.01 N de solución de permanganato de potasio.

Adicione esta solución a la muestra, chequee la existencia del olor a acetaldehído que puede ser generado por calentamiento.

##### SEGUNDO METODO

El ácido láctico transforma el color azul oscuro, del reactivo de Uffelmann, (añadiendo 1 gota de disolución de cloruro ferrico a una disolución de 0.4 gr de fenol en 500 ml de agua destilada), en amarillo.

## 6. RESULTADOS Y ANALISIS

Con base en los datos obtenidos experimentalmente se presentarán los correspondientes informes en los cuales se mostrarán los balances del proceso con el fin de obtener el rendimiento y las condiciones óptimas de trabajo.

Se han abarcado los siguientes puntos dentro del programa previsto :

### 6.1.. Cultivo de cepas de colección.

Se cultivaron los microorganismos del cepario de ORSTOM en MRSc.

Se eligieron siete (7) microorganismos del cepario de ORSTOM, básicamente del género *Lactobacillus*, los cuales se reportan en la literatura como los de mejor crecimiento en las vinazas.

Los *Lactobacillus* en su mayoría de especies son homofermentativos, pero algunas son heterofermentativas.

Para las bacterias homofermentarivas el principal producto generado a partir de glucosa es el ácido láctico (>85%). No forman gas (CO<sub>2</sub>) a partir de glucosa.

Las heterofermentativas producen cerca del 50% de ácido láctico a partir de glucosa; producen gas carbónico y etanol; son bacilos largos.

Las cepas seleccionadas fueron las siguientes :

- <i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 1268.
- <i>Lactobacillus amylophilus</i>	CNCM 102988T.
- <i>Lactobacillus plantarum</i>	Lacto Labo.
- <i>Lactobacillus plantarum</i>	Boll.
- <i>Lactobacillus plantarum</i> A6	ABBL A6.
- <i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 14917.
- <i>Streptococcus equinus</i>	CNCM 103233.

### 6.2. Medios de cultivo con vinazas.

Para la investigación se prepararon los siguientes medios a partir de vinazas y con algunos otros nutrientes tales como los que proporciona el MRSc Broth (De Man Rogosa and Sharpe):

El MRS es utilizado para el enriquecimiento, o cultivo y aislamiento de toda especie de *Lactobacillus*; con la ventaja de que ofrece favorables condiciones de crecimiento. El medio contiene sustancias reconocidas como factores especiales de crecimiento para los *Lactobacillus* (polysorbato, acetato, magnesio, manganeso), así como una base rica de nutrientes. Además el MRSc es altamente selectivo.

Inicialmente se trabajó con cinco tipos de medios de cultivo de vinaza en diferentes proporciones.

- Medio A : Vinaza diluida al 50% + Agar (15 g/L) + MRSc(25g/L)
- Medio B : Vinaza pura + Agar
- Medio C : Vinaza diluída al 50% + Agar
- Medio D : Vinaza diluída al 50% + MRSc (sin glucosa) + Agar
- Medio O : MRSc + Agar (medio de control, testigo)

### **6.3. Selección de las cepas de colección.**

Para la selección fueron inoculadas las cepas anteriormente mencionadas en los diferentes medios de vinaza.

Puesto que la vinaza presenta un pH ácido es conveniente neutralizar hasta aproximadamente un pH de 6 a 7, esto para facilitar el desarrollo de las bacterias lácticas. La neutralización se realizó con hidróxido de sodio al 20%.

Una vez realizada la neutralización, los medios de cultivo se sometieron a una esterilización en autoclave a 20 psia (110 °C).

Después de la esterilización se obtuvo un precipitado en los medios el cual presentaba el siguiente orden en magnitud o cantidad :

Medio A > Medio B > Medio C > Medio D

De acuerdo con la caracterización de la vinaza, este precipitado puede ser debido a fosfatos y cationes libres existentes ( $K^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ )

El paso siguiente fue el de servir los medios en cajas petri usando una cámara de flujo laminar para este fin y una vez listos los medios de cultivo se procedió a inocular las cepas.

La primera siembra fue en cajas petri utilizando un volumen de 15

ml de cada medio.

Posteriormente se realizaron varias siembras de las mismas cepas, pero esta vez en tubos inclinados utilizando un volumen de 7 ml.

Los resultados obtenidos son mostrados en la tabla No. 1.

**Tabla No. 1**

BACTERIAS LACTICAS	TIPOS DE MEDIOS			
	A	B	C	D
L. Boll	creció	creció	creció	creció
L. Labo	creció	creció	no	creció
L. Brevis		creció	no	creció creció
L. P. A6	no	no	no	no
L. Amilophilus	no	creció	creció	creció
S. Equinus	no	no	no	no

El crecimiento de las cepas fue medido de forma cualitativa. De acuerdo con lo mostrado en la Tabla No. 1 se seleccionaron cuatro de las siete cepas.

**Lactobacillus Brevis.**

El aspecto de la colonia es de color blanco, lisas regularmente, ligeramente embombadas y de 2 a 3 mm de diámetro. Son bacilos GRAM + de pequeño tamaño, a veces en cadenas de 3 a 4 no disociadas. Poseen un metabolismo heterofermentativo. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C. No crece a 40 °C .

**Lactobacillus Plantarum Boll.**

El aspecto de la colonia es lisa, regulares, embombadas de color crema, de 2 a 3 mm de diámetro. Son pequeños bacilos, GRAM +, normalmente solos o en parejas. Poseen un metabolismo homofermentativo. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 35 °C.

**Lactobacillus Plantarum Labo.**

El aspecto de las colonias es lisa, regulares, de color blanco, opacas, de 1 a 2 mm de diámetro. Son bacterias no móviles, su forma es de pequeños bastoncitos más o menos cortos, solos o en parejas o

trios. Son GRAM +.

**Lactobacillus Amylophilus.**

El aspecto de la colonia es translúcido, de 1 mm de diámetro. Son pequeños bacilos, GRAM +, solos o en cadenas no disociadas. Su metabolismo es homofermentativo amilolítico. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C y no crece a 45 °C.

**6.4. Aislamiento de cepas naturales.**

Para el aislamiento de nuevas cepas se realizó un muestreo en los canales por donde circula la vinaza. En los bordes de estos canales se forman unos lodos densos. Se tomaron varias muestras de estos lodos y, ya después, en el laboratorio, se escogieron para su utilización cuatro muestras.

De las muestras se realizaron diluciones hasta de  $10^{-7}$ , las cuales posteriormente fueron sembradas en los diferentes medios de vinazas (A, B, C, D).

Por observación en los diferentes medios se seleccionaron las que parecían posibles bacterias lácticas; éstas fueron inoculadas en MRSc y se utilizó azul de anilina como indicador de la presencia de ácido.

Las cepas que produjeron una coloración azul intenso dentro del medio fueron seleccionadas para ser inoculadas en MRS líquido ; hasta el momento se han seleccionado 7 cepas naturales, las cuales van a ser analizadas en el cromatógrafo HPLC.

**6.5. Depotasificación de las vinazas.**

Puesto que el potasio es un elemento que en demasiada cantidad no permite un buen crecimiento de los microorganismos se hace necesario retirar el exceso.

De acuerdo con la literatura existen varios métodos para retirar el potasio, entre ellos están los que utilizan ácidos tales como el clorhídrico o el sulfúrico; los cuales tienen el inconveniente de disminuir el pH de la vinaza; lo que representaría gastos adicionales en la posterior adecuación del pH.

Otra forma es utilizar resinas de intercambio iónico (zeolitas), con el problema de requerirse cantidades muy grandes para un proceso a escala industrial, lo cual también representaría altos costos.

Por lo anterior, el método más adecuado consiste en adicionar sulfato de amonio ( o el fosfato de amonio ) a la vinaza, el cual,

al reaccionar con el potasio ( $K^+$ ) presente en la vinaza, genera un precipitado coloidal ( sulfato de potasio,  $K_2SO_4$  ), que será retirado como lodos por filtración, utilizables en la producción de compuestos agrícolas.

La utilización de sulfato de amonio en la depotasificación de la vinaza, ayudaría también en la proporción de nitrógeno a la vinaza, el cual es un nutriente necesario para el crecimiento y la reproducción de los microorganismos.

#### **6. Caracterizaciones.**

La vinaza es considerado un desecho líquido cuya composición química depende de la naturaleza y composición de la vinaza, naturaleza y composición del mosto, naturaleza y composición del vino y del tipo de trabajo realizado en las columnas de destilación.

Tabla No. 9 VINAZAS

Agua .....	93.4%
Etanol.....	0.1%
Impurezas.....	6.5%

En general se puede evidenciar que se trata de un material que contiene más del 93% de agua; siendo que 74.8% de sus constituyentes sólidos que la componen son sustancias orgánicas.

De sus constituyentes minerales (25.15% son sólidos ) el 63.47% corresponde al potasio.

De acuerdo con Underkofler y Hickey, la composición de las vinazas secas es aproximadamente como se muestra en la tabla No. 3.

Tabla No. 10



Materia mineral	29.0%
Azúcar	11.0%
Proteínas	9.0%
Acidos volátiles	1.5%
Gomas	21.0%
Acido láctico combinado	4.5%
Otros ácidos orgánicos	1.5%
Glicerol	5.5%
Ceras, cuerpos fenólicos	17.0%

*Según esta referencia, para grandes destilerías, el contenido de materia orgánica es de cerca de 7.5 g/L.*

*El aporte de los iones presentes en la vinaza al DQO es 7161,47 mg/l.*

*En la tabla No. 11 se presenta una caracterización detallada de la vinaza.*

**Tabla No. 11 - Caracterización de la vinaza  
( Sucromiles )**

DQOt	mg/l	70000
DQOs	mg/l	58000
DBO5	mg/l	26450
SST	mg/l	13000
SSV	mg/l	10000
Azúcar	% p/v	0.8
Alcohol	% v/v	0.2
Densidad	g/ml	1.0
pH		4.3
Temperatura	°C	96
Nitrógeno	mg/l	633
Fósforo	mg/l	32
PO4	mg/l	100
Cobre	mg/l	1.0
Zinc	mg/l	8.0
Hierro	mg/l	21
Sodio	mg/l	186
Potasio	mg/l	5000
Calcio	mg/l	316
Magnesio	mg/l	860
Manganeso	mg/l	3.7
Plomo	mg/l	0.7
Cobalto	mg/l	0.07

### **6.7. Análisis de datos**

La DBO5 es una forma de estimar el oxígeno que una población microbiana heterogénea requiere en un tiempo y a una temperatura dadas para oxidar la materia orgánica en una muestra de agua.

La DQO es una estimación de la materia susceptible de ser oxidada por un oxidante químico fuerte.

De acuerdo con información obtenida, los valores promedios para la vinaza como medidas de contaminación son mostrados en la tabla No. 12.

**Tabla No. 12**

DQO	mg/l	68775
DBO5	mg/l	26454
SST	mg/l	7569

*Y para los lodos de levadura:*

**Tabla No. 13**

DQO	mg/l	68775
DBO5	mg/l	26454
DQO	mg/l	68775

*El flujo promedio de producción de vinaza es de 17.88 m<sup>3</sup>/h.  
El flujo promedio de lodos de levadura es de 0.312 m<sup>3</sup>/h.*

*- Carga Orgánica (DQO )*

$$(17.88 * 68775 + 0.312 * 473877) * 24 / 1000 = 33.06 \text{ t/dia}$$

*-Carga Orgánica ( DBO5 )*

$$(17.88 * 26454 + 0.312 * 215350) * 24 / 1000 = 12.96 \text{ t/dia}$$

*- Carga de sólidos ( SST )*

$$(17.88 * 7569 + 0.312 * 290441) * 24 / 1000 = 5.42 \text{ t/dia}$$

*- Carga combinada*

$$C C = \frac{2 * DBO5 + DQO + SST}{3} \quad (7.1)$$

$$C C = \frac{2 * 12.96 + 33.06 + 5.42}{3} = 25.08 \text{ t/dia}$$

*Al pasar una muestra de vinaza por el cromatógrafo HPLC se obtuvo el cromatograma mostrado en la fig No. 1  
En este cromatograma se observan diferentes picos de los cuales seis han sido identificados. Estos picos y sus respectivas áreas*

nos dan una idea de qué cantidad de carga orgánica se puede reducir mediante las bacterias lácticas. Hay otros picos que aparecen en el cromatograma que no han sido identificados y cuya contribución ( área ) es grande; es el caso de los picos con tiempos de retención de 5.7, 12.30 y 17.68.

Se deben realizar otras corridas en HPLC en donde la integración se realice en todo el intervalo de tiempo, para así poder ver cuantos picos hay presentes, qué sustancias pueden ser y conocer el porcentaje de las sustancias de interés (glucosa, sacarosa y ac. láctico) en la carga contaminante total.

También con base en esta información se puede hallar una DQO teórica y se puede calcular en que cantidad se puede reducir este valor. Los resultados son mostrados en la tabla No. 13.

Tabla No. 13

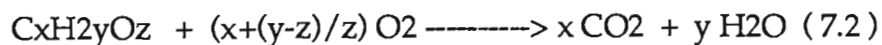
mM	Sustancia	g/L	PM
5,6	Sacarosa	1,9152	342
1,62	Glucosa	0,2916	180
5,45	Fructosa	0,981	180
27,64	Lactato	2,0454	74
86,42	Acetato	5,1852	60
6,23	Etanol	0,2866	46
-----		-----	
132,96		10,705	

El ácido láctico presente es debido a que se han encontrado dentro de las vinazas cepas lácticas.

De la tabla No. 13, asumiendo que se transforma toda la glucosa en ácido láctico, tendremos al final una producción total de ácido láctico de 30.88 mM.

Utilizando el flujo promedio de vinaza de 17.88 m<sup>3</sup>/h y trabajando 360 días al año, se obtendrían aproximadamente 36 toneladas de ácido láctico.

Aplicando la reacción química para la transformación de materia orgánica es posible calcular la DQO .



El aporte teórico de la materia orgánica presente a la Demanda

Química de Oxígeno de acuerdo con el cromatograma es mostrado en la tabla No. 14.

Dicho aporte se calcula teniendo en cuenta las relaciones estequiométricas siguiendo la ecuación 7.2 para cada compuesto.

Tabla No. 14

	DQO
Sacarosa	2150,4
Glucosa	311,4
Fructosa	1046,4
Ac. Láctico	2653,4
Acetato	5530,8
Etanol	797,4
-----	
DQO total	12489,9

La suma de los azúcares presentes según la tabla No. 8 es 3508.2 mg/l.

Observando el valor obtenido de DQO del cromatograma, éste difiere bastante del valor de DQO promedio y del valor de DBO5 promedio ( haciendo la suposición de que las bacterias degradan totalmente la materia orgánica determinada ), por lo que es necesario investigar qué otras sustancias están aportando a la DBO5, que es el contenido de materia orgánica.

Según \*\*\*\*

Una aproximación de acuerdo a la información de la tabla No. 8 sobre una posible remoción de carga orgánica se obtendría sumando los aportes de las sustancias a transformar y a retirar.

$$\begin{aligned} \text{DQO retirado} &= 7964.4 \text{ mg/l} \\ \text{DBO5 retirado} &= 2964.4 \text{ mg/l} \end{aligned}$$

La DQO tiene en cuenta la glucosa, el ácido láctico y el potasio

TABLA 15.- Analisis por HPLC de los cultivos de cepas lacticas en medios Vinazas

CEPAS	MEDIO	GLUCOSA	FRUCTOSA	AC. LACTIC	CAC. ACETIC	ETANOL
5	D	0,285	-	0,110	2,331	0,041
5	D	0,478	-	0,111	2,330	0,024
6	D	0,291	-	0,115	2,400	-
11	D	0,319	-	0,114	2,418	0,022
14	D	0,480	-	0,102	2,141	0,126
DELBRUCKII	D	0,616	0,066	0,110	1,976	0,019
LP A6	D	0,461	-	0,110	2,188	0,033
LABO	D	0,460	-	0,109	2,577	0,030
BOLL	D	0,527	-	0,096	2,542	0,039
5	D	0,264	0,026	0,092	1,994	-
6	D	0,278	0,026	0,096	2,020	0,036
11	D	0,320	0,028	0,107	2,338	-
14	D	0,337	-	0,112	2,551	-
BREVIS	D	0,330	-	0,093	2,439	-
BOLL	D	0,328	0,018	0,092	2,433	-
DELBRUCKII	D	0,367	-	0,108	1,936	-
LABO	D	0,298	0,027	0,096	2,227	-
LP A6	D	0,279	-	0,104	1,996	-
BOLL	D	0,330	-	0,092	2,416	-
6	A	0,243	-	0,216	1,103	0,104
5	A	0,174	-	0,266	1,483	0,039
7	A	0,177	-	0,150	1,391	0,750
8	A	2,527	-	0,072	1,202	0,024
11	A	0,268	-	0,256	1,350	0,010
14	A	0,793	-	0,224	1,314	0,009
13	A	0,202	-	0,156	1,347	0,632
BOLL	A	0,496	-	0,253	1,507	0,019
BREVIS	D	0,304	0,060	0,101	2,135	0,062
5	D	0,330	0,065	0,109	2,389	-
6	D	0,293	0,061	0,105	2,156	-
11	D	0,276	0,061	0,101	2,098	-
MEDIO D	D	0,353	0,024	0,081	1,844	-
14	D	0,312	-	0,104	2,376	-
BREVIS	D	0,302	0,065	0,091	1,992	-
BOLL	D	0,312	-	0,094	2,217	-
LP A6	D	0,318	-	0,119	2,412	-
LABO	D	0,302	0,027	0,104	2,372	-
?	D	0,364	-	0,107	1,830	-
LABO	A	0,161	0,247	0,278	1,764	0,070
LP A6	A	0,300	0,031	0,281	1,736	0,063
BREVIS	A	1,569	-	0,112	1,638	0,251
11	A	0,191	0,259	0,252	1,380	0,094
7	A	0,168	-	0,152	1,619	0,675
8	A	2,752	0,290	0,075	1,335	0,105
6	A	0,192	0,275	0,266	1,428	0,086
5	A	0,197	0,283	0,266	1,422	0,092
BREVIS	A	1,344	-	0,104	1,423	0,265
14	A	0,586	-	0,285	1,584	0,080
13	A	0,168	-	0,160	1,483	0,886
BOLL	A	0,557	-	0,266	1,522	0,060
LP A6	A	0,466	-	0,272	1,625	0,102
LABO	A	0,158	0,239	0,277	1,502	0,052
BOLL	A	0,456	-	0,273	1,669	0,103
BREVIS	A	1,311	-	0,113	1,477	0,451
11	A	0,187	0,249	0,249	1,368	0,090
13	A	0,111	-	0,099	1,044	0,436

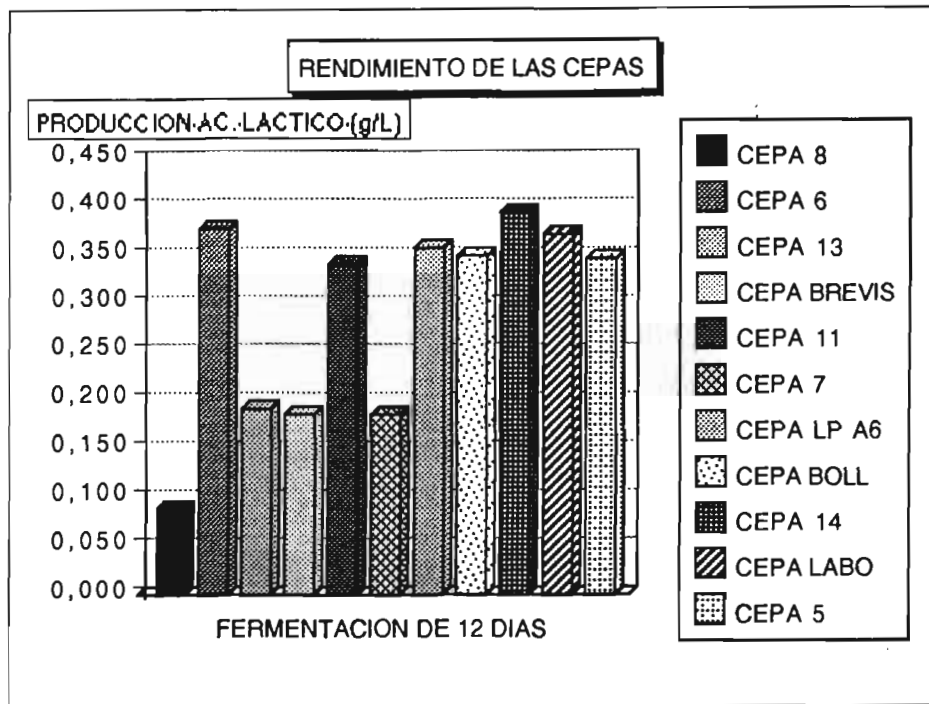


FIGURA No 1. PRODUCCION DE ACIDO LACTICO. MEDIO A.

Segun la figura No 1 los microorganismos que más producen ácido láctico son en cuanto a las cepas naturales las cepas denominadas con el número "6" y la "14" y en cuanto a las del cepario las que presentaron mejores resultados fueron *L. Boll*, *L. Labo* y *L. Plantarum* (ver anexo No 2).

En la figura número 2 es presentada la producción de ácido láctico de cada uno de los microorganismos en el medio D.

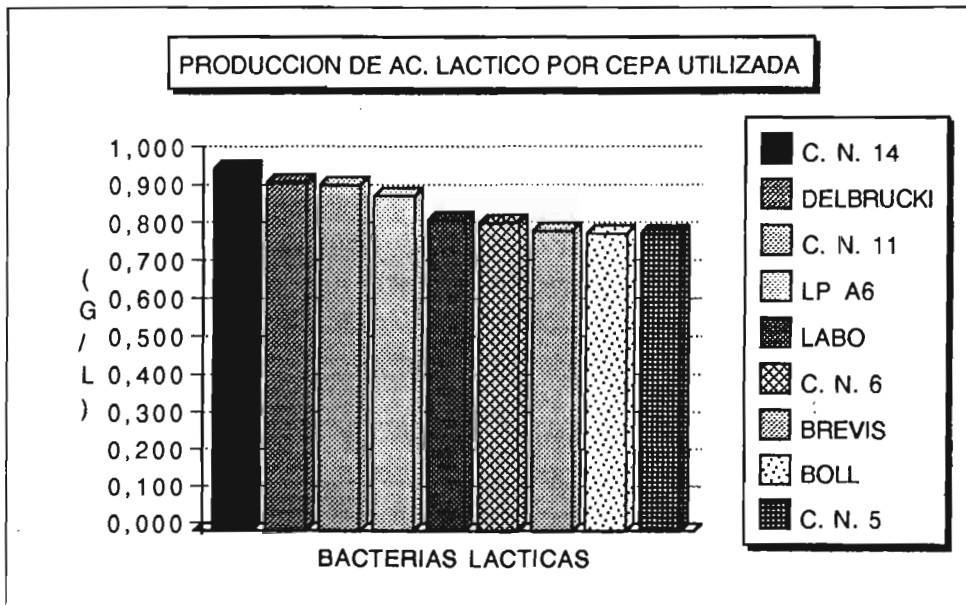


FIGURA No. 2 PRODUCCION DE ACIDO LACTICO. MEDIO D

De acuerdo con la figura No 2 los microorganismos que más producen ácido láctico en el medio D fueron en cuanto a las cepas naturales las denominadas con los números "6", "11" y la "14" y de las del cepario el *L. Delbrueckii*, *L. Plantarum* y el *L. Labo*.

**8. CONCLUSION.**

Según la caracterización de la vinaza y el cromatograma, la cantidad de glucosa a transformar es muy pequeña, por lo tanto se debe pensar en una fuente adicional de glucosa. Un aporte se lograría con la inversión de la sacarosa presente y mediante la selección de una bacteria amilolítica que degrade el almidón posiblemente presente.

Observando la tabla No. 3, posibles compuestos que aportan a la DQO y a la DBO5 y que todavía no han sido reconocidas pueden ser glicerol, ácido propiónico, ácido butírico, úrea (compuesto que es utilizado como nutriente en la fermentación para la producción de alcohol etílico) y algunos azúcares tales como almidón, maltosa y otros azúcares reductores, etc.

La disminución de la toxicidad del medio mediante la utilización de sulfato de amonio para depotasificar la vinaza posee un alto rendimiento, además de que proporciona nitrógeno al medio, que es un nutriente esencial para el crecimiento y reproducción de los microorganismos.

Balance de Materia

	mM
Sacarosa	5,6
Glucosa	1,62
Fructosa	5,45
A. Láctico	27,64

Por inversion de la sacarosa.

Láctico

	mM	mM
Láctico	27,64	27,64
Glucosa	7,22	14,44
Fructosa	11,05	22,10
		-----
		64,18 mM
		5776,2 mg/l

	Láctic		Subtot
	mM	mg/l	mg/l
Sacarosa	22,4	2016,0	
Fructosa	10,9	986,0	2997,0



Glucosa	3,24	291,6	3288,6
Láctico	27,64	2487,6	
			-----
			5776,2

Turno = 8 h/dia

Flujo de vinaza = 18000 l/h

	Lactic kg/h	Subtot kg/h	Lactic kg/dia
Sacarosa	36,288		290,304
Fructosa	17,658	53,946	141,264
Glucosa	5,2488	59,194	41,9904
Láctico	44,7768		358,2144
	-----		-----
	103,9716		831,7728

TIEMPOS DE RETENCION

### BIBLIOGRAFIA

- [1] CUCALON C., A., QUINTERO J., M., Producción de ácido láctico por fermentación de melazas. Tesis de Grado Ing. Química, 1975.
- [2] FRAZIER W., C., WESTHOFF D., C., Microbiología de los alimentos. Edit. Acribia S.A.. 3ra Ed., Zaragoza 1978.
- [3] GARASSINI L.A, Microbiología Tecnológica, Caracas, Universidad Central de Venezuela, 1964.
- [4] INSKEEP C. G., TAYLOR G.G., y BREITZKE W. C., Lactic acid from corn sugar, Ind. Eng. Chem., 44, :1955 - 1966,1986.
- [5] LAVERDE J., C., MUÑOZ P., Producción a escala de laboratorio de ácido láctico por fermentación de melaza. Tesis de grado Ing. Química, Junio 1990.
- [6] LLANO F., FERNANDEZ C.,A., Producción de ácido láctico a partir de la miel final de la caña de azúcar por vía química. Tesis de grado Ing. Química, 1971.
- [7] METCALF E., Tratamiento y depuración de aguas residuales. Edit. Labor. 1ra Ed., 1977.
- [8] PAN S. C., PETERSON W. H. y JHONSON M. J., Acceleration of lactic acid fermentation by heat labile substance, Ind. Eng. Chem., 32: 709-714, 1940.
- [9] PATUREAU M., By-products of the cane sugar industry. 1982.
- [10] PELCZAR M., J., Elementos de microbiología. Edit. McGraw-Hill, 1ra Ed., Madrid 1984.
- [11] PULGARIN M.,M., SANCHEZ A.,L., Obtención de ácido láctico a partir de sacarosa, utilizando como catalizador zeolita tipo Y. Tesis de grado Ing. Química, 1986.
- [12] ROCKEY J., ZAROR C., Alternative Strategies for the Treatment of Food processing Waste Waters. Cap 7.
- [13] ROJAS O., Evaluación de la potencialidad de depuración de aguas residuales por digestión anaerobia-Estudios a escala piloto. Tesis de grado Ing. Química.
- [14] STEROSS S. L., LEE Y. Y. y LINKO P., Production of lactic acid with immobilized lactobacillus delbreuckii, Biotechnol. Lett., 4, :

159 - 164, 1982.

[15] TIWARY K. P. y SINGH S. P., Influence de aminoacids on fermentative production of lactic acid by lactobacillus delbrueckii, Proc. Nalt. Acad. Sci., 43: 219-22, India, 1978.

[16] VALENCIA J., F., CONCHA C., E., Diseño de procesos químicos. Utilización de vinazas para producción de candida utilis y fertilizantes. 1975.

[17] VICK ROY T. B., MANDEL D. K., BLANCH H. W. y WILKE C. R., The aplication of cell- recycle to continuos fermentative lactic acid production, Biotechnol Lett., 5, :665-670. 1983.

18. PRECOTT S. C., "Microbiología Industrial", Cecil Gordon. Dumm, ed 2, 1952.

19. STANIER C. P., "Microbiología", Mejico, Limusa, 1976.

Anexo nº 4

**FERMENTACION ALCOHOLICA DEL BAGAZO DE CAÑA  
INOCULADO CON LEVADURAS POR FMS**

**DARIO BALLESTEROS H.**

**JOSE A. ESTELA P.**

**Trabajo presentado para la asignatura  
PROYECTO DE GRADO I**

**Drs. Maurice Raimbault y Jairo Alonso .  
Directores de tesis.**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE**

**FACULTAD DE INGENIERIA**

**DEPARTAMENTO DE PROCESOS QUIMICOS Y BIOLÓGICOS**

**SANTIAGO DE CALI DEC. 1993**

## 2. ANTECEDENTES

El desarrollo de los derivados de la caña de azúcar se ha incrementado en los últimos años, potenciado por la necesidad de diversificar la industria del sector, necesidad que a su vez tiene origen en la independencia que es deseable sobre las alzas y bajas de un único producto (el azúcar); además las tendencias alcistas de los precios de los derivados refuerza tal deseo.

El bagazo, subproducto, es uno de los derivados de la caña sobre el que los interesados en la diversificación, tenemos más expectativas. Entre los usos industriales del bagazo de caña podemos enumerar :

- Como combustible.
- Como materia para producir papel.
- Como precursor en la obtención de furfural.
- Insumo en la fabricación de tableros de fibra.
- Materia prima en la industria alimenticia animal.

De los anteriores, los dos primeros son los de más trascendencia en nuestro medio . El uso del bagazo de caña como combustible y su mejoramiento se ha estudiado en diferentes latitudes del planeta.

El poder calorífico del bagazo es función del contenido de fibra, sacarosa y humedad que trae cuando sale del tandem de molinos; de los tres, el contenido de humedad ha sido el elemento sobre el que más se ha trasegado, buscando reducirlo para aumentar el poder calorífico del bagazo. Antes de entrar a las calderas el bagazo tiene un contenido porcentual aproximado de [7] :

50 - 53 % Humedad  
2.5 - 3.0 % Sacarosa  
48 - 44 % Fibra

Esta composición porcentual queda definida por las condiciones de la molienda , los investigadores como ya dijimos han centrado su atención sobre el contenido de humedad que se ha logrado reducir hasta un 30 % en peso, implementando un secado antes de la caldera, aumentando considerablemente el calor obtenido del bagazo [2].

## 2.1. VALOR CALORIFICO DEL BAGAZO

Se conoce como valor calorífico (V.C.) la cantidad de calor que puede producirse por la combustión de una unidad de peso del combustible en consideración.

Se distinguen dos valores caloríficos diferentes [7]:

Valor Calorífico Superior, que es el producido por la combustión de un kilogramo de combustible, a 273 K y 1 atmósfera de presión; todos los productos de la combustión se reducen a las mismas condiciones. El agua presente en la combustión, así como el agua formada por la combustión del hidrógeno se condensan en consecuencia (por condiciones de temperatura y presión). El valor calorífico superior se determina en laboratorio, con la ayuda de calorímetro Mahler.

Valor Calorífico Inferior, también definido por otros autores como valor calorífico neto, este supone por el contrario, que el agua que se forma en la combustión, así como el agua presente en el combustible, permanecen en estado de vapor.

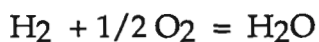
El valor calorífico neto es el que indica de una manera más precisa el calor que puede obtenerse realmente en la combustión, es por tanto el valor que debe usarse en la práctica; sin embargo no existiendo un medio para determinarlo directamente, debe calcularse.

Hugot [7] referencia varias ecuaciones para determinar el V.C.N. Estas diferentes formas de calcular el V.C.N. dependen básicamente, de si el bagazo está húmedo o no y de la cantidad de sacarosa contenida en el bagazo, debe también tenerse en cuenta el agua producida por la combustión, que origina una pérdida de calor al evaporarse en el hogar de la caldera; por esta razón el valor calorífico neto de un combustible seco está dado por:

$$V.C.N. = V.C.S. - 600 * E \text{ Kcal/Kg de combustible} \quad (EC.1)$$

Donde E = Peso del vapor de agua presente en los gases producidos por la combustión de 1 Kg de bagazo, expresado en kilogramos.

La combustión del hidrógeno toma lugar de acuerdo con la siguiente reacción y debe tenerse en cuenta por la correspondiente aparición de agua.



$$2g + 16g = 18g$$

El peso del agua formada es entonces igual a 9 veces el peso del hidrógeno; por consiguiente se tiene que para un combustible

seco:

$$E = 9 * H \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde H = peso del hidrógeno contenido en 1 Kg de combustible.

Remplazando la Ec. 2 en la Ec. 1 tenemos que:

$$\begin{aligned} \text{V.C.N.} &= \text{V.C.S. } 5,400 * H \quad \text{Kcal/Kg} \quad (\text{Ec. 3}) \\ &= \text{V.C.S. } 9,720 * H \quad \text{BTU/Lb} \end{aligned}$$

Valor Calorífico Superior del Bagazo Seco. A pesar de las diferencias que en apariencia pueden presentar las diferentes variedades de caña, el valor calorífico superior del bagazo seco se puede considerar constante en todos los países y en todas las variedades de caña. En la siguiente tabla se presentan distintos valores del V.C.S. para diferentes variedades de caña en el mundo [7].

Como podemos observar se cometerá un error mínimo al considerar el valor calorífico superior del bagazo seco como:

$$\text{V.C.S.} = 8,280 \text{ BTU/Lb} = 4,600 \text{ Kcal/Kg}$$

Tabla 1. VALOR CALORIFICO SUPERIOR DE BAGAZO SECO

Autor	País	Referencia	V.C.S. del bagazo seco	
			Kcal/Kg	BTU/Lb
Behne	Queensland	I.S.J.(1935) Pg.160	4,542	8,177
Hedley	Sudáfrica	I.S.J.(1936) Pg.349	4,585	8,253
Gregory	Cuba	F.A.S.(1944) Pg.126	4,691	8,444
Gregory	Pto. Rico	F.A.S.(1944) Pg.26	4,594	8,270
<b>Promedio</b>			<b>4,603</b>	<b>8,286</b>

Valor Calorífico Neto del Bagazo Seco. El contenido de hidrógeno del bagazo seco es del 6% al 7% [7]; tomando como promedio el 6.5% tenemos que la ecuación 3 queda:

$$\text{V.C.N.} = \text{V.C.S.} (0.065 * 9 720) = 8,280 - 630 = 7,650 \text{ BTU/Lb}$$

$$\text{V.C.N.} = 4,249 \text{ Kcal/Kg}$$



Valor Calorífico del Bagazo Húmedo. Partiendo del valor calorífico de bagazo seco, podemos llegar ha desarrollar una expresión que calcule el V.C. del bagazo húmedo, teniendo en cuenta la tabla 2 tenemos que es la siguiente:

$$\text{V.C.S.} = 4,600 * \frac{F}{100} + 4,000 * \frac{S}{100} \quad \text{Kcal/Kg}$$

Tabla 2. VALOR CALORIFICO DE LOS COMPONENTES DEL BAGAZO

Componente	VALOR CALORIFICO	
	Kcal/Kg	BTU/Lb
Fibra (F)	4,600	8,280
Azúcar (S)	4,000	7,120
Agua (W)	0	0

El agua no solamente tiene un valor calorífico nulo sino que además absorbe calor al evaporarse durante la combustión (V.C.N.) :

$$(100 - W) \text{ V.C.N.} = 4,600 * \frac{F}{100} + 4,000 * \frac{S}{100} - 350 * \frac{100-W}{100} - 600 * \frac{W}{100} \quad \text{Kcal/Kg}$$

de donde:

$$\text{V.C.S.} = 46 * F + 40 * S \quad \text{Kcal/Kg} \quad (\text{Ec. 4})$$

$$\text{V.C.N.} = 46 * F + 40 * S - 2.5 * W - 350$$

Además de la fibra, el agua y el azúcar, el bagazo contiene glucosa y mieles secas, que poseen un valor calorífico de 3,743 Kcal/Kg y 4,100 Kcal/Kg respectivamente. Todas éstas materias solubles se pueden incluir junto con la sacarosa y se tendrá:

$$F = 100 \quad S' = W \quad (\text{Tomando como base de cálculo } 100 \text{ Kg de bagazo húmedo})$$

Donde S' = Sacarosa + combustible no azúcares  
con valor calorífico medio = 4,000 Kcal/Kg.

Con una pureza del jugo residual del ochenta por cien (80%) se tiene:

$$S' = \frac{S}{0,80} = 1,25 * S$$

de donde:

$$F = 100 - 1,25 * S - W$$

Reemplazando en la ecuación 4, S por S'y F por su valor tenemos:

$$V.C.S. = 4,600 - 17,5*S - 46 * W \quad (\text{Kcal/Kg}) \quad (\text{Ec. 5})$$

$$V.C.N. = 4,250 - 17,5*S - 48,5 * W$$

$$V.C.S. = 8,280 - 13,5*S - 82,8 * W \quad (\text{BTU/Lb}) \quad (\text{Ec. 6})$$

$$V.C.N. = 7,650 - 13,5*S - 82,5*W$$

Teniendo en cuenta los materiales insolubles (glucosa y mieles secas) separados de la sacarosa, la ecuación del V.C.S. varía de la siguiente manera:

$$V.C.S. = 4,600 \frac{F}{100} + 3939 \frac{S}{100} + 3921 \frac{I}{100} \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde I: Kgr de insolubles en 100 Kg de bagazo húmedo. (3939 y 3921 son los valores de entalpías de combustión de la sacarosa y los insolubles en Kcal/Kg).

Siguiendo la misma metodología en la obtención del V.C.N. se tiene que:

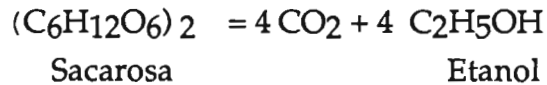
$$V.C.N. = 46*F + 39,39*S + 39,21*I - 2,5*W - 350 \quad (\text{EC. 8})$$

La posibilidad de incrementar tal valor calorífico, con una fermentación alcohólica, supone una mejor disponibilidad energética del combustible a usar (bagazo húmedo), por efecto del alcohol producido.

## 2.2 La fermentación Alcohólica

La fermentación Alcohólica puede ser definida como un proceso en donde un sustrato orgánico, sufre cambios estructurales por acción de una catálisis bioquímica enzimática, realizada por microorganismos específicos.

Históricamente la fermentación fue asociada con la conversión de azúcar en alcohol etílico y dióxido de carbono y así fue como a principios del siglo XIX Gay Lussac sintetizó el proceso en la siguiente reacción .



Pero la fermentación no solo produce alcohol etílico, en las fermentaciones día a día se amplía la gama de productos alcanzables, actuando no solamente sobre el microorganismo en uso, sino también en el resto de variables que intervienen (sustrato, acidez, medio de cultivo, etc.).

Las fermentaciones se clasifican de varias formas dependiendo de diferentes factores entre los que podemos enumerar el sustrato a usar, el medio de cultivo, la utilización que se le dará al producto y otros.

La fermentación que se adelantará en el presente proyecto será una fermentación alcohólica en medio sólido, para especificar mejor el término, usaremos la definición propuesta por Losane y referenciada por Saucedo [8]... "La fermentación en medio sólido; consiste en un procedimiento microbiano donde el cultivo se desarrolla no solamente en una superficie, sino que también puede ocurrir en el interior de una matriz porosa sólida y en ausencia de fluidos líquidos . Tal matriz porosa puede estar constituida de un sustrato húmedo donde el soporte, inerte, es capaz de absorber los nutrientes que se difunden en solución".

En la tabla 3 resume las ventajas de la fermentación en medio sólido.

Tabla 3. FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO.

<b>Ppales Ventajas</b>	<b>Ppales desventajas</b>
Simplicidad en el medio de cultivo.	Riesgo de una excesiva elevación de temperatura
Disminución de contaminantes por la baja humedad del medio de cultivo.	Necesidad de pretratar el soporte.
Condiciones de cultivo cercanas a las naturales.	
Volumen de fermentación más pequeño que el del cultivo sumergido, para igual cantidad de sustrato.	

La Fermentación sólida a su vez, se clasifica dependiendo de si el soporte es inerte o si también hace las veces de sustrato.

Para el caso nuestro, el bagazo hace las veces de sustrato y soporte .

Las reacciones producidas y la entalpia involucrada en cada una de ellas es [1] :

<u>REACCION</u>	<u>CAL/GRMOL SACAROSA</u>
1) $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = 2(C_6H_{12}O_6)$ SACAROSA + AGUA = (GLUCOSA & FRUCTOSA)	8,32
2) $2(C_6H_{12}O_6) = 4(C_2H_5OH) + 4(CO_2)$ GLUCOSA & FRUCTUOSA = ETANOL	33,16

Las anteriores reacciones nos muestran, que en codiciones ideales, de un gmol de sacarosa se obtienen 4 gmol de etanol y que en ese paso se liberan 41.48 cal/gmol de sacarosa (0.218 BTU/Lb sacarosa); teniendo en cuenta que el valor calorífico neto del bagazo es de 1,835 Kcal/Kg de bagazo húmedo (3,303 BTU/Lb de bagazo húmedo) (Pag. 10), con un contenido de sacarosa del 3% ; la maxima liberación de energía del proceso fermentativo sería de  $2.42 \cdot 10^3$  Kcal/Kg de bagazo húmedo ( $4.356 \cdot 10^3$  BTU/Lb bag. hum.) que representa un valor despreciable frente al calor producido en la combustión del bagazo.

A continuación se listan los calores de combustión de los compuestos involucrados en el proyecto , [9].

Tabla 4. CALORES DE COMBUSTION

Compuesto	Calor combustión	
	Kcal/Kg	BTU/Lb
Etanol	7,200	12,960
Fibra	4,600	8,280
Sacarosa	3,939	7,090
Bagazo húmedo	1,835	3,303

Como podemos ver el uso de etanol podría incrementar la cantidad de vapor generado en las calderas, al tener un calor de combustión mayor.

El estudio deberá al final definir la conversión de sacarosa a alcohol asi como el balance energético en la caldera, usando el bagazo con y sin fermentación.

### 3. METODOLOGIA

El desarrollo del proyecto está planteado en dos grandes etapas clasificadas por el tipo de actividades a realizar en ellas .

#### 3.1. ETAPA TEORICA. Consta de las siguientes actividades:

Revisión bibliográfica.

Visitas a ingenios para revisar procesos energéticos.

Cálculo teórico del poder calorífico del bagazo antes y después de la fermentación.

Revisión de las opciones teoricas de recuperacion del alcohol producido.

**3.2. ETAPA EXPERIMENTAL.** Durante esta etapa se revisaran algunas actividades de la etapa uno (1) con un enfoque practico y se adelantara la fermentación alcohólica del bagazo. Las actividades a realizar son :

Fermentación alcohólica del bagazo en medio sólido (30% y 50% de humedad).

Reproducción de condiciones ambientales de los ingenios y diseño del silo empacado.

Balance de materia y energía del proceso fermentativo.

Determinación de la bioconversión azucares.

Determinación del poder calorífico del bagazo despues de la fermentación con 30% y 50% de humedad (Con y sin etanol)

#### Programa de actividad:

\* Estudio del rendimiento de las calderas con alcohol y sin los niveles de sacarosa habituales.

\* Visitas a 3 ingenios azucareros para conocer valores de trabajo (kg/día de molienda , concentración de la sacarosa en bagazo a la salida del molino, kcal/kg bag hum en calderas y forma de cálculo ).

\* Inicio del estudio de opciones y mecanismos de recuperación del etanol obtenido.

Propuestas , conclusiones e informe final.

#### 4. RESULTADOS

Haciendo uso de ecuación 8, podemos desarrollar una expresión que tengan en cuenta el aporte energético del alcohol producido en la fermentación alcohólica; esta expresión es la siguiente:

$$V.C.N. = 46 * F + 39.3 * + 39.21 * I + 72 * E - 2.5 * W - 350 \quad (Ec. 9)$$

Donde E : Kg de etanol producido.

Tomando como base de cálculo 100 Kg. de bagazo húmedo, teniendo en cuenta la ecuación de reacción de la sacarosa en etanol y CO<sub>2</sub> que se producen en la fermentación (Ec..12) así que ésta posee una pureza del jugo residual del 80% tenemos para la salida del fermentador la siguiente expresión genérica , tenemos que:

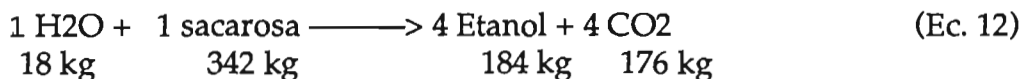
$$100 = F + S + E + I + CO_2 + W \quad (Ec. 10)$$

De los compuestos del lado derecho de la Ec.10 el CO<sub>2</sub> es el único inocuo en la combustión del bagazo , en tanto que él ya no puede oxidarse mas , pero debe tenerse en cuenta en el balance de materia. Luego de la fermentación y haciendo uso de la Ec.10, podemos expresar a F (fibra) en función de los demás compuestos . Es así como se llega a la Ec.11 :

$$F = 100 - S - E - 0.5146 X - I - W \quad (Ec.11)$$

Donde : X= kg de sacarosa que reaccionan

Teniendo en cuenta la relación estequiométrica dada por las reacciones involucradas en la fermentación , se establece el balance de materia para el proceso de fermentación con diferentes conversiones.



Por tanto la relación estequiométrica de sacarosa a etanol expresada en kg es :

$$\frac{184 \text{ kg Et}}{342 \text{ kg sac}} = 0.538$$

y la relación estequiométrica entre H<sub>2</sub>O y el etanol es:

$$\frac{18 \text{ kg H}_2\text{O}}{184 \text{ kg Et}} = 0.10$$

En la Ec.11 el término correspondiente al dióxido de carbono a sido reemplazado por otro que tiene en cuenta la relación estequiométrica de aparición del CO<sub>2</sub> y la conversión de la sacarosa (expresada en kg de sacarosa que reaccionan). Al tener en cuenta los cambios de concentración en la sacarosa (S) , el etanol (E) , y el agua (W) podemos obtener y expresar el V.C.N. en función de los compuestos presentes despues de la fermentación. Reemplazando F de la Ec.9 en la Ec.11 tenemos .

$$\text{V.C.N.} = 4581.048 - 6.7*S - 6.79*I + 26*E - 48.5*W - 350 \quad (\text{Ec.13})$$

La tabla número 5 presenta de manera explicita el cambio en la concentración de cada uno de los compuestos presentes al alcanzar la conversión de sacarosa a etanol; la última columna muestra para conversión tomada cual es el V.C.N. En este caso se considera un bagazo de 50% de humedad, lo que es el promedio normal.

Haciendo una regresión lineal podemos obtener una relación directa entre la conversión de la sacarosa y el V.C.N.

$$\text{V.C.N.} = 55.705 * X + 1785.89 \quad (\text{Ec. 14})$$

La ecuación 13 posee un coeficiente de correlación  $r = 0.9999$

La tabla número 6 sigue el mismo patrón de calculo de la tabla 5 pero se parte de una humedad menor (30%). Al analizar los resultados alcanzados hasta ahora y que presentamos en las tablas 5 y 6 se podría decir que para efectos de elevación del V.C.N. del bagazo en calderas, la fermentación del bagazo no es una alternativa a considerar , el secado del bagazo antes de entrar al generador de vapor , en cambio , incrementa el V.C.N. en un 54% convirtiendose en un elemento de estudio muy interesante para el sector azucarero .

Sin embargo falta efectuar un estudio mas detallado del rendimiento de las calderas usando el bagazo con alcohol y sin los niveles habituales de sacarosa , cuando se tengan los resultados de tal estudio podremos conocer realmente que pasa, con la fermentación alcohólica del bagazo para efectos energéticos.

Revizando desde otra optica ( ya no la energética ) la fermentación alcohólica del bagazo podría ser atrayente si se tiene en cuenta que por esta via , un central azucarero de la región estaría en capacidad de producir unas 7 toneladas día de alcohol (ver tablas 7, 8 y 9).

Este término ha sido obtenido contando con una molienda promedio de 8000 ton/día de caña y una conversión del 30% desde la sacarosa al alcohol asi como una recuperación del 60% en el etanol producido.

TABLA 5. CAMBIO DEL V.C.N. CON RESPECTO A LA CONVERSION

% Conver- sion	Kg de S que rea- cciona	Kg de W despues de ferm.	Kg de S despues de ferm.	Kg de E obtenido	V.C.N. Ec. 12 ( * )	Peso total Kg B.H.	Energia total Kcal ( ** )
0	0.00	50.00	2.40	0.00	1805.08	100.00	180508.00
20	0.48	49.97	1.92	0.26	1804.84	99.75	180038.21
30	0.72	49.96	1.68	0.39	1804.75	99.63	179807.24
40	0.96	49.95	1.44	0.52	1804.57	99.51	179565.54
50	1.20	49.93	1.20	0.65	1804.79	99.38	179365.45
60	1.44	49.92	0.96	0.78	1804.39	99.26	179101.95
70	1.68	49.91	0.72	0.90	1804.27	99.14	178868.11
80	1.92	49.90	0.48	1.03	1804.02	99.01	178619.63
90	2.16	49.88	0.24	1.16	1804.05	99.89	178399.00
100	2.40	49.87	0.00	1.29	1803.99	98.77	178171.07

\* Kcal / Kg de Bagazo Húmedo.

\*\* Contando con 100% de aprovechamiento en la caldera.

\*\*\* El % de fibra e insolubles no varía ( 47% y 0.48% respectivamente ).



TABLA 6. CAMBIO DEL V.C.N. CON RESPECTO A LA CONVERSION

% Conver- sion	Kg de S que rea- cciona	Kg de W despues de ferm.	Kg de S despues de ferm.	Kg de E obtenido	V.C.N. Ec. 12 ( * )	Peso total Kg B.H.	Energia total Kcal ( ** )
0	0.00	30.00	2.40	0.00	2775.09	80.00	222007.20
20	0.48	29.97	1.92	0.26	2781.49	79.75	221823.83
30	0.72	29.96	1.68	0.39	2784.69	79.63	221744.86
40	0.96	29.95	1.44	0.52	2787.82	79.51	221659.57
50	1.20	29.93	1.20	0.65	2791.36	79.38	221578.16
60	1.44	29.92	0.96	0.78	2794.27	79.26	221473.84
70	1.68	29.91	0.72	0.90	2797.47	79.14	221391.78
80	1.92	29.90	0.48	1.03	2800.53	79.01	221269.88
90	2.16	29.88	0.24	1.16	2803.88	78.89	221198.09
100	2.40	29.87	0.00	1.29	2807.12	78.77	221116.84

\* Kcal / Kg de Bagazo Húmedo.

\*\* Contando con 100% de aprovechamiento en la caldera.

\*\*\* El % de fibra e insolubles no varía ( 47% y 0.48% respectivamente ).

**TABLA 7. RECUPERACION DEL 20%**

% conversión sacarosa	Tonelada de alcohol dia
20	1.49
30	2.24
50	3.74
70	5.23
90	6.72

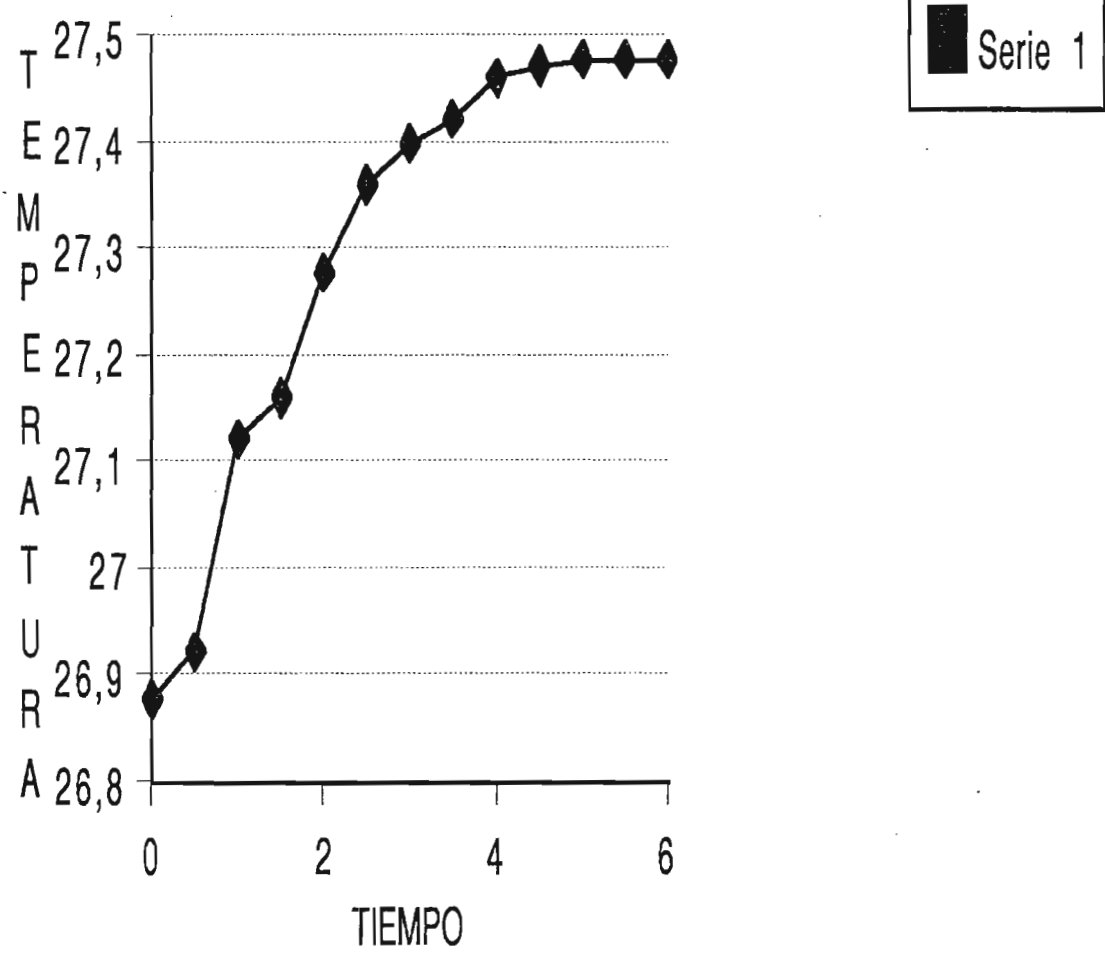
**TABLA 8. RECUPERACION DEL 50%**

% conversión sacarosa	Tonelada de alcohol dia
20	3.73
30	5.60
50	9.35
70	13.10
90	16.81

**TABLA 9. RECUPERACION DEL 70%**

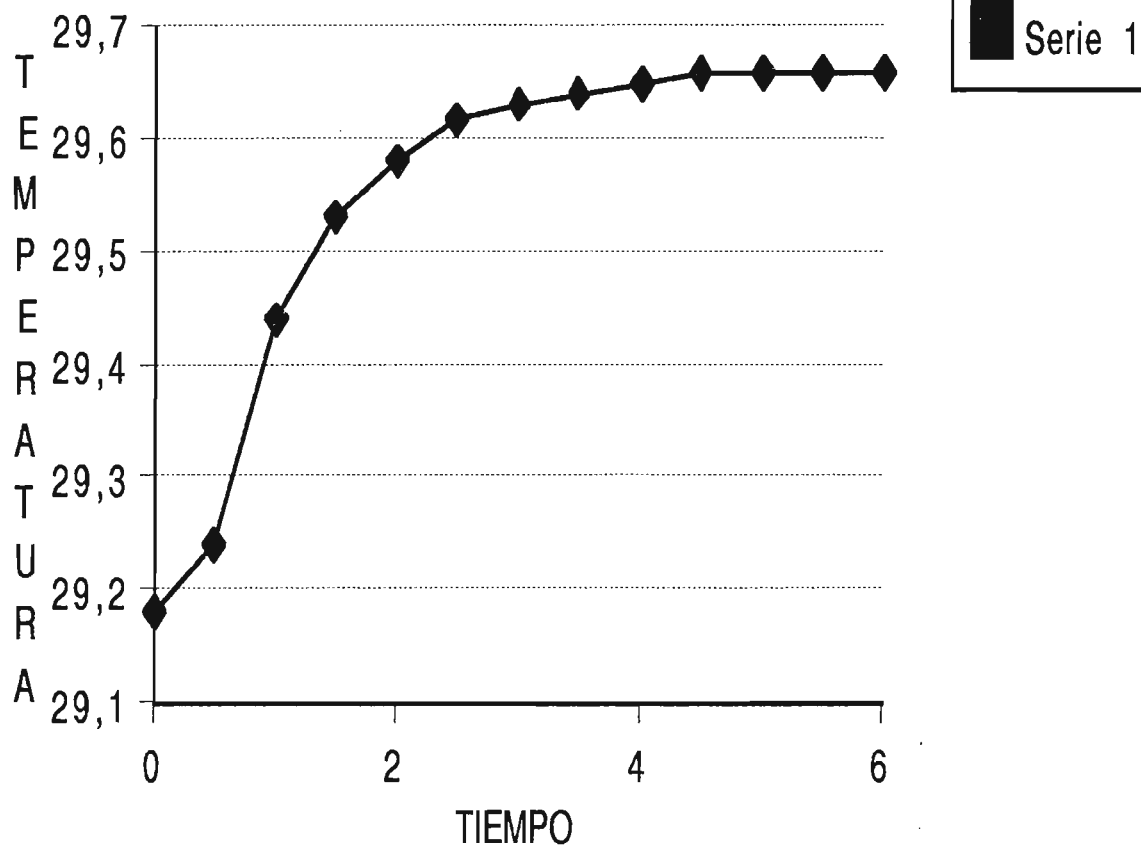
% conversión sacarosa	Tonelada de alcohol dia
20	5.23
30	7.84
50	13.10
70	18.31
90	23.5

# PERFIL DE TEMPERATURAS CON RESPECTO AL TIEMPO DE COMBUSTION



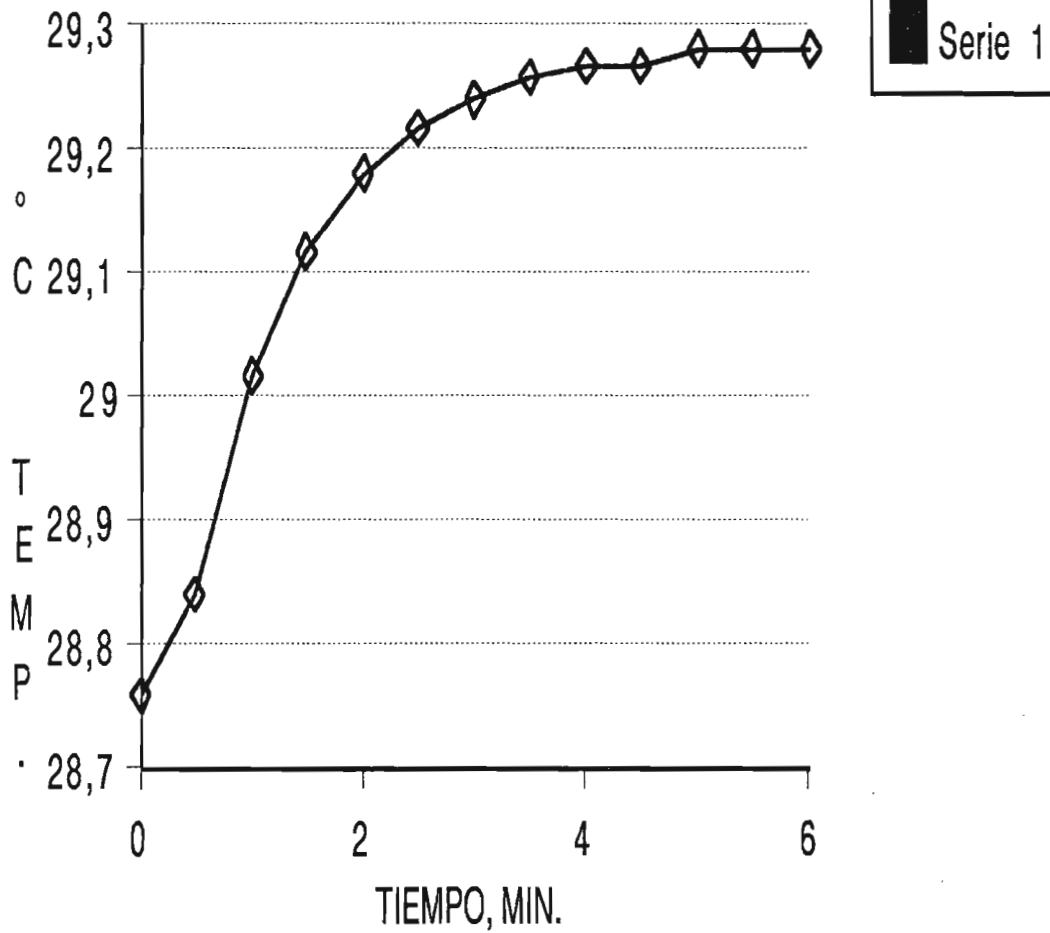
Para un peso de 0,3891 g. de bagazo, con un 2,48 % de humedad.

## PERFIL DE TEMPERATURAS CON RESPECTO AL TIEMPO DE COMBUSTION



Para un peso de 0,9068 g. de bagazo, con un 49,85 % de humedad.

# PERFIL DE TEMPERATURAS CON RESPECTO AL TIEMPO DE COMBUSTION



Bagazo de 24 h de fermentación, con un peso de 0,6260 g

**5. BIBLIOGRAFIA**

- [1]. D.S. Cusi, Conservación y almacenaje del bagazo, Tecnología, 16, OCT DIC, 1980.
- [2]. MUHAMMAD, Saechu & SOEWARNÓ Partowinoto, Energy, 12 (7) 1981.
- [3]. MILLER, D.L., Ethanol fermentation and potencial, Biotechnol, Bioeng., Symp. 5 (celunul. Chem. Energy Resour), 345 52 (1975).
- [4]. KARDOS, N. y MULCOCK, A.P., Ethanol from agricultural crops. a literature survey, Rep. N. Z. Energy Res. Dev. Comm., 28, 38 p. (1977).
- [5]. TYGI, R.D. y GHOSE, T.K., Production of ethyl alcohol celulose hydrolyzate, Bioconvers, Cellul. Subst. Energy Chem. Microb. Protein Symp Prov. (ist), 585 97 (1977).
- [6]. HERRERA, A.G., Etanol a partir del bagazo, ATAC, 40 (1) 1981.
- [7]. HUGOT, E., Manual para Ingenieros Azucareros, Ed. R C. de la Habana, 1967.
- [8]. SAUCEDO, G., Control del metabolismo de Schwanniomyces castellii cultivado en un soporte sólido, Tesis, Universidad de Montpellier II, 5 DIC. 1991.
- [9]. Hand Book of Chemistry and Physics, CRC Press., 56 ed.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BERGERON, C. BENHAM & P. WERDENE.

**Dilute sulfuric acid hydrolysis of biomass for ethanol production.**

1989 - *Appl. Biochemistry and Biotechnology*, vol. 20/21, 119-134.

A. CALERO, H. PEREA, A. CORTES. (UNIVALLE)

**Hidrolisis e inversion enzimatica de sacarosa.**

A. DIASGUPTA

**Anaerobic digestion of solid waste of cane sugar industry.**

1983 - *Tesis PhD*.

A. GARCIA, E. VALDES, M.C. OBAYA, A. REYES, O. L. LEON, D. BETANCOURT.

**Energy production from sugar and by-products industries wastewaters.**

1983 - *ISSCT - Vol. 3*.

A. RIVERA ACOSTA

**Evaluación de biocidas para molienda por metodos microbiologicos.**

1991 - *Cenicaña 4357 (44) - Memorias II Congreso ATALAC Mexico, 1991, Vol 2 - (4).; pp. 157-161*

A.A. ELKADER & A.A. YASSIN

**Filter mud cake as fuel for steam generation in egypt.**

1989 - *XX Congress of the ISSCT Sao Paulo Brasil Proceed Sao Paulo ISSCT (1989), Vol. 1326-332*

A.GUITONAS\*, M. PAPADOPOULOU\*, A.ZOUBOULIS\*\*

**The treatment of low concentrated effluent in an anaerobic fixed bed reactor with organic support**

1992 - *Fresenius Envir Bull 1:736-740(1992)(c) 1992Birkhäuser Verlag,Basel/Switzerland*

A.I.VLISSIDIS & A.I.ZOUBOULIS\*

**Thermophilic anaerobic digestion of alcohol distillery wastewaters**

1993 - *Bioresource thechnology 43 (1993) 131-140*

ACOSTA DUENAS, S.; RODRIGUEZ CRUZ, O.; CRUZ GONZALEZ, L.; MENESES LEAL, X.

**Evaluacion del Vantocil CS como desinfectante en la industria azucarera cubana.**

1988 - *Cuba Azucar p31-35*.

AGOSIN & E. ODIER

**Solid-state fermentation, lignin degradation and resulting digestibility of wheat straw fermented by selected white-rot fungi.**

1985 - *Appl. Microbiol. Biotechnol. 21, 397-403*.

AGOSIN, A. LANDA & A. HOHLBERG.

**SO<sub>2</sub> steam explosion of pine sawdust : maximization of saccharification yields after enzymatic detoxification of washing liquors.**

0 - *Biotechnology from pulp & paper manufacture*.

AGOSIN, B. MONTIES & E. ODIER.

**Structural changes in wheat straw components during decay by lignin-degrading white-rot fungi in relation to improvment of digestibility for ruminants.**

1985 - *J. Sci. Food Agric. 36, 925-935*.

AGOSIN, J.J. DAUDIN & E. ODIER

**Screening of white-rot fungi on (14C) lignin-labelled and (14C)whole-labelled wheat straw.**

1985 - *Appl. Microbiol. Biotechnol., 22, 132-138*.

AGOSIN, M.T. TOLLIER, E. HECKMANN, J.M. BRILLOUET

**Effect of fungal treatment of lignocelulosics on biodegradability.**



- AGOSIN, M.T. TOLLIER, J.M. BRILLOUET, P. THIVEND & E. ODIER.  
**Fungal pretreatment of wheat straw : effects on the biodegradability of cell walls, structural polysaccharides, lignin and phenolic acids by rumen microorganisms.**  
 1986 - *J. Sci. Food Agric.*, 37, 97-106.
- AGOSIN, M.T. TOLLIER, J.M. BRILLOUET, P. THIVEND, B. MONTIES.  
**Fungal delignification of wheat straw : characterization and effects on rumen digestibility.**  
 1987 - *Seminario Latinoamericano Biotecnología, Antigua, Guatemala.*
- AGOSIN, S. JARPA, E. ROJAS & E. ESPEJO.  
**Solid-state fermentation of pine sawdust by selected brown-rot fungi.**  
 1989 - *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 11, 511-517.
- AGOSIN, X. ROUEAU & J.M. BRILLOUET.  
**Fermentation of wheat straw xylan by the white-rot fungus *Dichomitus squalens*.**
- AGUIRRE GOMEZ, J.; GOMEZ CALVETT, A.  
**Fertilizacion de la cana de azucar.**  
 1973 - *Medellin, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agricolas*, . 65 p.
- ALBERTO HERRERA GUIROLA.  
**Etanol a partir del bagazo.**  
 1981 - *Atac*, Vol. 40, n°1, p. 22-27..
- ALMAZAN, O.; KLIBANSKY, M.; OTERO, M.A.  
**Microbial fat synthesis from blackstrap molasses.**  
 1980 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 17, Manila, Philippines.*  
 1980 - *Proceedings. Manila, Print-Inn, 1980. v.3 p. 2650-2661.*
- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.  
**Infeccao na fermentacao: como evita-la.**  
 1982 - *Alcool & Acucar (Brasil) v.2 no 5, p.12-18.*
- Anonyme  
**The Colombian sugar industry**  
 1989 - *International Sugar Journal, VOL. 91, No1090, Page 190-192*
- APPLING, J.W.; WARNER, I.  
**Microorganism control in cuban sugar mills.**  
 1959 - *Memphis, Tennessee, Buckman Laboratories, s.f. 8 p. (Reprinted from the Sugar Journal)*
- ARAKIS.  
**The impact of ethanol production on the sugar market**  
 1985 - *Proceed. Int.Symp. COPERSUCAR;327-332*
- ARAUJO, J.A. DE; PATERSON, M.  
**Qualidade e fermentabilidade de diferentes variedades de cana-de-acucar cultivadas.**  
 1983 - *Carpina, PLANALSUCAR.*; 12 p.
- ARMAS, E. DE; BARTUS, J.; ZAYAS, R.; BELLOTA, M.; LEAL, A.  
**Medicion rapida de la materia biodegradable en aguas residuales.**  
 1987 - *Revista ICIDCA sobre los Derivados de la Cana de Azucar (Cuba) v.21 no.3, p.45-50.*
- AYALA, H.G.; BRAVO LIMPIAS, D.; DELFINI, A.; GARGIULO, C.A.  
**Action of some bactericides on raw sugarcane juice.**  
 1977 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 16, Sao Paulo, Brasil. Proceedings.*  
 1977 - *Sao Paulo, Impres, 1978. v.3 p. 2909-2922.*

BADILLA F., Sergio B. Alves.

**Control del picudo de la caña de azúcar *Sphenophorus Levis*, 1978 (Col. Curculionidae) con *Beauveria bassiana* y *Beauveria brongniartii* en condiciones de laboratorio y campo.**

1991 - *Sugar Cane*, N°5, sept-oct., p. 19 - 23.

BAMBIRRA, S.

**Resultados praticos obtidos en um processo de fermentacao continua implantado na Central Utinga Leao.**

1985 - *En: Simposio de avaliacao da agroindustria da cana-de-acucar no Estado de Alagoas, 2, Maceio, Brasil. Anais.*

1985 - *Piracicaba, 1985. p. 165-167.*

BAO GUO YU

**Protein feed granules from bagacillo for fish farming.**

1990 - *Sugar y Azucar*, 30-40.

BARBER J., CHAPMAN A., HOWARD T. & GRAHAM T

**Recycling of polyketides by fungi: the degradation of citrinin by *Penicillium citrinum***

1988 - *Appl; Microbiol. Biotechnol.*, 29; 387-391

BARBOSA A.M., PASSOS M., CHOCIAI J.G., GEBARA M., HAULY M.C.O., ROMANO N.E

**Native cane bagasse fungal hemicellulosis.**

1991 - *International Sugar Journal*, Vol.93, n°1110, pp. 64-66.

BATTA S.K., SHARMA K.P., JAGDEEP SINGH & RANGIL SINGH

**Minimizing the dextran problem in sugarcane juice.**

1992 - *Tropical Sci.*, 32 (2) ; 210-212

BEJOTTES, M.; AMARAL RODRIGUEZ, A.

**Aplicacion de la relacion Fe/Mn de las vainas de la cana en la medida del estudio de aireacion de un suelo.**

1974 - *La Habana, Universidad de La Habana . 13 p. (Ciencias. Serie 3 Quimica, no.30)*

BELAMRI M.

**Determination of optimal conditions por saccharolytic bacteria from diffusion juice**

1992 - *Int Sugar J*; 94 (1126) Oct 1992; 245-248

BELAMRI M., MEKKAOUI AK. et TANTAOU I A.

**Saccharolytic bacteria in beet juices**

1991 - *Int. Sugar J.*, Vol. 93, n° 114, pp. 210-212

BELAMRI M., MEKKAOUI AK., TANTOU I A.

**Saccharolytic bacteria in beet juices.**

1991 - *Int. Sugar J.* Vol. 93 , n° 114, p. 210 - 212.

BRANCH J.W. & HENDRICK R.D.

**Bagasse composting as a volume reduction technology.**

1992 - *J.Amer.Soc. of Sugar Cane Technol.* 12; 113

BROOKS, S.A.; SMITH, P.D.

**A possible method for detection of molasses frothing.**

1980 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 17, Manila, Philippines. Proceedings.*

1980 - *Manila, Print-Inn, 1980.; v.3 p. 2582-2590.*

BROW, L.D.

**Las necesidades de nutrientes de la cana de azucar.**

1975 - *En: Congreso Centroamericano de Tecnicos Azucareros, 2, Guatemala, Memoria. Guatemala, ATAGUA, 1979.*

1975 - *p. 24-36.*

BRUIJN J., KOENIG S. & WOLF M.

**Influence of gum on molasses exhaustion.**

1980 - *ISSCT, Manilla, Phil. , vol 3; 2429-2441*

BUREAU OF SUGAR EXPERIMENT STATIONS. BRISBANE (AUSTRALIA).

**BSES investigates the effect of soil organisms on cane yields.**

1990 - *Australian Canegrower v.12 no.20, p.18.*

BYNUM, E.K.; INGRAM, J.W.; CHARPENTIER, L.J.; HALEY, W.E.

**Control of soil insects in Louisiana sugar cane fields.**

1950 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 7, Brisbane, Australia. Proceedings.*

1950 - *Brisbane, ISSCT, 1951. p. 423-434.*

CALDAS, H.E.

**Modificacoes da microflora dos solos tratados com calda.**

1962 - *Recife, Instituto Agronomico do Nordeste. 3 p. (Boletim tecnico, no.4)*

CALERO SALAZAR, L.; YANG, S.J.

**Evaluacion quimica de hierro, cobre, manganeso y zinc en ochenta suelos del Valle Geográfico del Rio Cauca.**

1987 - *Cali, CENICANA. 26 p. (Documento de Trabajo, no.137)*

CAMBRIA, S.; BONI, P.S.; STRABELLI, J.

**Estudos preliminares com micronutrientes-zinco.**

1989 - *Boletim Tecnico COPERSUCAR (Brasil) no.46, p.12-17.*

CANETE Y V. VESELY

**Secado periodico de la cachaza**

1992 - *Revista Icidca, VOL. 26, No 1, P.40-41*

CARLOS DE CASTRO A. & GILBERTO SALERNO A.

**Fermentação Contínua em Reactor Tipo Torre Usando Levadura Floculante.**

1991 - *TECNOLOGIA/PESQUINA - STAB - Março - Junho*

CARVAHLO J.C.M. & AQUARONE E.

**Optimização do Processo de Produção de Etanol Utilizando Vazões Exponencialmente Decrescentes de Mosto na Alimentação de Dornas (Nota Previa)**

1991 - *TECNOLOGIA/PESQUINA - STAB- Março-Junho/91.*

CASTELLO BRANCO, J.R.; LACAZ, P.A.; COSTA RIVERO, C.

**Economics of in-natura stillage utilization as a fertilizer.**

1980 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 17, Manila, Philippines. Proceedings.*

1980 - *Manila, Print-Inn, 1980.; v.3 p. 2662-2685.*

CASTILLO G.

**Sugar cane production computer program to calculate the mass balance of a white and/or raw sugar production process.**

1989 - *Proc.20th Congr. ISSCT, 1989, ccxli. (Abstract only)*

CASTILLO J.J.

**Preliminary evaluation of the ethanol production from enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse.**

1992 - *World J. Microbiol. Biotechnol., 8 (4), 425-427*

CEPERO S., DAVILA A. & CAIRO P.

**Possibilities of using filters cake as fertilizer in seedbeds in dark plastics soils on the north coast of Villa Clara.**

1991 - *International Sugar Journal - Vol 93, nº110, p. 64-66.*

CHANG, E.Y.; WANG, L.H.

**Kinetic characterization of product inhibition in ethanol fermentation.**

1989 - *Taiwan Sugar v.36 no.4, p.9-13.*

CHEHIN, J.V.; BARRIENTOS, N.A.

**Evaluacion de liquidos residuales de la hidrolisis acida como sustrato para fermentacion.**

1988 - *Cuaderno de Tecnologia GEPLACEA (Mexico)* p.1-9.

CHEN, W.P.; CHENG, S.L.; SANG, S.L.

**Studies on industrial gum production by fermentation. IV. Production of gum on a pilot plant scale.**

1977 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 16, Sao Paulo, Brasil . Proceedings.*

1977 - *Sao Paulo, Impres, 1978.; v3 p. 3177-3185.*

CHIANG-LIAN LAL

**Application of cultural broth as alpha-amylase preparation for starch removal in sugar processes.**

1981 - *ISSCT, Vol. 3 - CUBA.*

CHOWDHURY N.A., MONIRUZZAMAN M, NAHAR N. & CHOWDURY N.

**Production of cellulases and saccharification of lignocellulosics by a micromonospora sp.**

1991 - *World J. Microbiol. Biotechnol., 7 (6); 603-606*

CHRISTEN P., M.MINIER, H.RENON

**Extraccion en continuo del etanol producido por fermentacion por medio de membrana liquida**

1991 - *XII Encuentro Nacional del AMIDIQ, XALAPA , Ver., 24-26 Abril 1991*

CLARKE S.J. & MILLET W.

**Experimental studies of evaporator scale**

1992 - *J. Am.Soc. Sugarcane Technol., 12-113*

CLARKE, M.A.; ROBERTS, E.J.; GODSHALL, M.A.; BRANNAN, M.A.; CARPENTER, F.G.;

**Sucrose loss in the manufacture of the cane sugar.**

1980 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 17, Manila, Philippines.*

1980 - *Proceedings. Manila, Print-Inn, 1980. v3 p. 2192-2203.*

CLARKE, M.A.; ROBERTS, E.J.; GODSHALL, M.A.; CARPENTER, F.G.

**Beverage floc and cane sugar.**

1977 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 16, Sao Paulo, Brasil. Proceedings.*

1977 - *Sao Paulo, Impres 1978. v3 p. 2587-2598.*

CLEMENTS, H.F.

**Sugarcane nutrition and culture.**

1959 - *Lucknow, Indian Institute of Sugar Research. 218 p.(Apendices)*

CLEMENTS, H.F.

**Recent developments in crop logging of sugar cane.**

1959 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 10, Hawaii . Proceedings. Amsterdam,*

1959 - *Elsevier, 1960. p. 522-529.*

CLEMENTS, H.F.

**Sugarcane crop logging and crop control: principles and practices.**

1980 - *Honolulu, The University Press of Hawaii, . 520 p.*

CONSIDINE P.J., A. O'RORKE, T.J. HACKETT & M.P. COUGHLAN.

**Hydrolysis of beet pulp polysaccharides by extracts of solid-state cultures of *Penicillium capsulatum*.**

1988 - *Biotechnology and Bioengineering, Vol. 31, Pp. 433-438.*

CONSIDINE P.J., T.J. HACKETT & M.P. COUGHLAN.

**Solid-state fermentation of *Penicillium capsulatum* on beet pulp.**

1987 - *Biotechnology Letters, Vol. 9, N°2, 131-134.*

COOPERATIVA CENTRAL DOS PRODUTORES DE ACUCAR E ALCOOL DO ESTADO DE SA

**Fermentacao. Piracicaba,**

1987 - *COPERSUCAR*. 434 p.

COOPERATIVA CENTRAL DOS PRODUTORES DE ACUCAR E ALCOOL DO ESTADO DE SA

**Fermentacao.**

1987 - *Piracicaba, COPERSUCAR*; 434 p.

COSTA, M.F.; ANGELIS, D.F. DE; ZAFRATA, E.A.; BRUNELLI, W.F.

**Proposta de uma rotina rapida para avalicao da perda de sacarose mediante aplicacao de biocida em caldo primario.**

1987 - *En: Congresso Nacional da STAB, 4., e Convencao da ACTALAC, 7, Olinda, Brasil. Anais. s.l, Sociedade dos*

1987 - *Tecnicos Acucareiros e Alcooleiros do Brasil, 1987? p.531-534.*

CROFT, B.J.

**Breaking the yield barrier.**

1989 - *Australian Canegrower v.11 no.24, p.26.*

CROMARTY W.A.

**The development and outlook for high fructose corn syrup and aspartame**

1985 - *Proceed. Int.Symp. COPERSUCAR*; 133-151

CURTIN J.H. & PATON N.H.

**The quantitative analysis of phenolic acids from sugar liquors by high performance liquid chromatography**

1980 - *ISSCT, Manila, Philip.*; v.3 p. 2361,2372

DAY, D. SARKAR

**Methods of analysis for dextran in sugar molasses and juice.**

1986 - *Int. Soc. Sugar Cane Technol. Proc. XIX Congress, Vol. 2, Jakarta.*

De BRUIJN J.M., VAN DER POEL P.W., HERINGA R. & VAN DEN BLICK M.

**Sugar degradation in sugar beet extraction - a model study.**

1991 - *Zucker Industrie, Vol 116, n°8, pp. 729-732.*

DE LA TORRE M., FLORES L.B., CHONG E.

**Proceso para la producci3n continua de la levadura torula a alta concentraci3n celular en melazas de caña.**

1991 - *Cenicaña 4357 (44) - Memorias II Congreso ATALAC Mexico, 1991, Vol 2 - (4).; pp. 113-115.*

Destefano, Edgar Aguirre, Hector L.Lorens.

**Ultrafiltration as an alternative to chemical clarification in cane juice polarization analyses.**

1991 - *ASSCT, Vol. 11, p. 88 - 89*

DHAMIJA, S.S.; SHARMA, S.; DAHIYA, D.S.; BARDIYA, M.C.; TAURO, P.

**Fermentation alcohol from cane molasses by fast fermenting yeast and its cell recycling.**

1980 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 17, Manila, Philippines .*

1980 - *Proceedings. Manila, Print-Inn, 1980.; v.3 p. 2700-2710.*

DOBEREINER J.

**New nitrogen-fixing bacteria in association with non-legumes.**

1990 - *Agrokemia es Talatjan (Hungria), Vol.39 (3-4) ; 293-300 .*

DOELLE M.B., GREENFIELD P.F. & DOELLE W.

**Effect of minerals ions on ethanol formation during sugar cane molasses fermentation using *Zymomonas mobilis* ATCC 39676.**

1991 - *Process Biochemistry Int.1990, 25, (5), 151-156; through SIA, 53, Abs. 495.*

DONATO, R.A.; MENEZ, V.A.; JESENA, R.T.

**A quick process of converting filter cake into a high grade organic soil conditioner.**

1980 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 17, Manila, Philippines. Proceedings.*

1980 - *Manila, Print-Inn, 1980.; v.3 p. 2693-2699.*

DOYLEM P., APPLEBAUMR S., BARACKETTR E. & MARTHE.H.

**Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and Agricultural Commodities.**

1982 - *Journal of Food Prot. 45, 964-971.*

DUARTE PEREZ E., LEAL M.S. & PEREZ J.L.

**Perdidas de azúcar en tandem por efecto de los microorganismos.**

1977 - *ATAC, Sept-Oct. Vol. 36, n°5; 37-45*

DUARTE,

**La dextrana en el desarrollo del cristal de sacarosa.**

1981 - *ATAC, Vol. 40 n°1, p. 34-39.*

DUARTE, E.; GUILLERMO, A.; POLANCO, N.; LOPEZ, M.

**Analisis microbiologico de productos azucareros.**

1982 - *La Habana, Cientifico-Tecnica . 29 p.*

ENRIQUEZ POY M.

**La tecnologia azucarera en Mexico**

1990 - *Memorias Cong.Asoc.Tecn. TECNICANA ,vol.2; 499-508*

ERR-CHENG CHAN, CHEESHAN S. CHEN & LI FU CHEN.

**Recovery of yeast invertase from ethanol fermentation broth.**

1992 - *Biotechnology Letters, Vol. 14 No.7, pp. 573-576*

ESPIRONELO, A.

**Aduacao da cana-de-acucar.**

1979 - *Campinas, Brasil, CATI, 31 p. (Boletim tecnico, no.118)*

FEDER, J.B.

**Ethanol fermentation.**

1979 - *New York, Scientific Design Company ; 4 p.(Anexos)*

FERRARI, S.E.

**A producao do etanol a partir da cana-de-acucar.**

1978 - *s.l, PLANALSUCAR. 41 p.*

FINGUERUT, J.; LUCREDI, H.A.; FURCO, M.A.; ALTOMARI, R.; ROSSELL, C.E.V.

**Controle operacional da fermentacao.**

1987 - *Boletim Tecnico COPERSUCAR (Brasil) no.38, p.19-23.*

FOGLIATA, F.A.; LEIDERMAN, J.; MATTUSSI, R.E.

**Effects of trash burning on the temperature and microbial population on the soil.**

1968 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 13, Taiwan . Proceedings.*

1968 - *Amsterdam, Elsevier, 1969. p. 720-732.*

FORNIER ANGEL, M.L. LOPEZ VARGAS, B.E. GOMEZ MERINO.

**Estudio para la industrialización de aceite comestible a partir de mieles de caña por via microbiologica.**

0 - *TECNICAÑa, 741-747.*

FORS A.L.

**Sampling and calculation of cane payment based on quality.**

1990 - *Rev. Asoc. Téch. Azuc. Méx., 4, (3), 19 (Abstract only).*

FOSTER, D.H.; IKERMAN, P.A.; MC NEIL, K.E.

**Studies on cane deterioration in Australia.**

1980 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 17, Manila, Philippines.*

1980 - *Proceedings. Manila, Print-Inn, 1980. v.3 p. 2204-2220.*

FOURNIER ANGEL, R.; LOPEZ VARGAS, M.L.; GOMEZ MERINO, B.E.

**Estudio para la industrializacion de aceite comestible a partir de mieles de cana por via microbiologica.**

1987 - *En: Congreso de la Sociedad Colombiana de Tecnicos de la Cana de Azucar, 2, Cali .Memorias. Cali,*

1987 - *TECNICANA, 1987. v.2, p. 741-747.*

FRANCO C.J.

**Alcohol production as an alternative to the depreciation of sugar prices in the world market**

1985 - *Proceed. Int.Symp. COPERSUCAR; 429-436*

FRY J.

**The markets for alternative sweeteners and new uses for sugar: the present situation and prospects.**

1985 - *Proceed. Int.Symp. COPERSUCAR; 153-163*

GADING F. Hutasoit

**Enzymatic Conversion of Glucose to Fructose**

1986 - *Int. Soc. Sugar Cane Technol., Proc.XIX, Vol. 2, Congress Jakarta, 748-765.*

GALINDO FENTANES E.

**La goma xantana: estado del arte en tecnologia y mercado.**

1990 - *Asamblea del grupo GEPLACEA, Santa Cruz Bolivia, 104-106.*

GARCIA Ty MSASKA

**Effects of temperature of maceration water on mill extracction characteristics of polysaccharides und liquins**

1992 - *J Amer Soc Sugar (une technologists 1992 vol 12 ) sept p 114*

GARCIA RODRIGUEZ, A.; VEGA RIVERA, I.

**Cinetica de degradacion del bagazo almacenado.**

1989 - *Centro Azucar (Cuba) v.16 no.2, p.41-46.*

GARCIA T. & SASKA M.

**Effect of temperature of maceration water on mill extraction characteristics of polysaccharides and lignins.**

1992 - *J.Am.Soc. Sugarcane Technol., 12-114*

GARCIA, R.A.

**Reduccion del costo de produccion de alcohol etilico.**

1980 - *En: Consulta del Caribe sobre energia y agricultura, Santiago de los Caballeros, Republica Dominicana.*

1980 - *Santiago de los Caballeros, Instituto Superior de Agricultura, 1980.p. 282-290.*

GARLICK, L.

**Biostil. Fermentation of molasses and cane juice using continuous fermentation.**

1983 - *s.l, s.e, s.f.; 11 p. (Reprinted of paper presented at the Annual Joint Meeting of American Society of Sugar*

1983 - *Cane Technologists, 13, Fort Walton Beach Florida)*

GEORGE, E.F.

**An experiment to assess the effect of competition between sugar cane clones at the microplot stage of selection.**

1965 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 12, San Juan, Puerto Rico.*

1965 - *Proceedings. Amsterdam, Elsevier, 1967. p. 920-930.*

Georgina Michelina, Francisco Kastanek

**Modelo de flujo de un bioreactor de celulas inmovilizadas para la produccion de etanol.**

1991 - *ICIDCA, Vol. 25, n° (1-2), p. 5 - 10*

GERMEK, H.A.

**Uso de dornas fechadas com recuperacao de alcool e producao de proteina.**

1986 - *Alcool & Acucar (Brasil)* v.5 no.27, p.48-50,52.

GIANNETTI, W.A.

**The role of the capital goods industry in Proalcool.**

1985 - *En: COPERSUCAR International Symposium on Sugar and Alcohol, Sao Paulo, Brasil. Proceedings. Sao Paulo,*

1985 - *COPERSUCAR, 1985.*; p.481-494.

GIL DIAZ, V; GONZALEZ MOREJON, A.; PEREZ PONCE, J.; HERRERA O'FARRILL, I.

**Mejoramiento de la inducción del enraizamiento en plantines de caña de azúcar (Saccharum spp híbrido) obtenidas por micropropagación.**

1989 - *Centro Agrícola (Cuba)* v.16 no.4, p.17-23.

GILLASPIE JUNIOR, A.G.; DAVIS, R.E.; WORLEY, J.F.

**Diagnosis of ratoon stunting disease based on the presence of a specific microorganism.**

1973 - *Plant Disease Reporter* v.57 no.12, p.987-990.

GILLASPIE JUNIOR, A.G.; DAVIS, R.E.; WORLEY, J.F.

**Nature of the ratoon stunting disease agent.**

1975 - *The Sugar Journal* v.38 no. 4, p.

GOANKAR S.M. & KULKARNI P.R.

**Utilization of sugar cane residues in foods.**

1991 - *International Sugar Journal, Vol. 93, n°1110, p. 64-66.*

GODSMALL MA., CLARKE MA. & DOOLEY CD.

**Starch process problems and analytical developments.**

1991 - *Proceed 1990 Sugar Processing Conference, New-Orleans, SPRI; 244-264 (Eng. 19 ref.)*

GOLDEN, L.E.; ABDOL, I.B.

**Effects of nitrogen and potassium fertilizers and soil type on yield components and nutrient uptake of four sugarcane varieties.**

1977 - *Baton Rouge, Louisiana, Agricultural Experiment Station . 59 p. (Bulletin, no.700)*

GONÇALES L.M.D., BARRETO M.T.O.N XAVIER A.M., CARRONDO M.J.T. ET KLEIN J.

**Inert supports for lactic acid fermentation- A technological assessment.**

1992 - *Appl. Microbiol. Biotechnol., 38; 305-311*

GONZALEZ, L.; GONZALEZ, P.C.; RODRIGUEZ, J.

**Relaciones estequiométricas y parámetros de rendimiento del crecimiento de hongos en fermentaciones del estado sólido.**

1989 - *Revista ICIDCA sobre los Derivados de la Cana de Azucar (Cuba)* v.23 no.1, p.1-3.

GROBILLOT A., PONS M.N. & ENGASSER J.M.

**Monitoring of volatiles in alcoholic fermentation of molasses via a gas membrane sensor.**

1991 - *International Sugar Journal, Vol.93, n°1110, pp. 64-66.*

GUILARTE, B.; CUERVO, R.; RODRIGUEZ, J.; PACHECO, N.

**Aislamiento y caracterización de microorganismos productores de dextranasa.**

1988 - *Cuba Azucar* p.13-19.

GUPTA, S.C.; SHUKLA, J.P.

**Utilization of by-products and wastes from sugar factories by cellulosic fermentation.**

1968 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 13, Taiwan. Proceedings.*

1968 - *Amsterdam, Elsevier, 1969. p. 1912-1921.*



GUTIERREZ, L.E.

**Efeito dos acidos formico e propionico sobre a producao de alcoois superiores durante a fermentacao alcoolica.**

1988 - *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Brasil) v.45 Parte 2, p.369-379. 1*

GUTIERREZ, L.E.

**Efeito da adicao de sulfato de amonio sobre a producao de acido succinico durante a fermentacao alcoolica.**

1988 - *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Brasil) v.45 Parte 2, p.433-440.*

GUTIERREZ, L.E.

**Efeito da adicao de sulfito sobre a producao de alcoois superiores durante a fermentacao alcoolica.**

1988 - *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Brasil) v.45 Parte 2, p.359-368.*

HAAG, H.P.; ACCORSI, W.R.

**Deficiencia de macro e micronutrientes em cana-de-acucar (*Saccharum officinarum* spp) variedade CB 41-76 cultivada em solucao nutritiva.**

1978 - *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Brasil) v.35, p.125-167.*

HAAG, H.P.; ORLANDO FILHO, J.

**Influencia varietal e do solo no estado nutricional na cana-de-acucar (*Saccharum* spp) pela analise foliar.**

1975 - *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Brasil) v.32, p.105-147.*

HERLY NOA SILVERIO

**La diversificación de la agroindustria de la caña de azúcar.**

1991 - *Cenicafca 4357 (44) - Memorias II Congreso ATALAC Mexico, 1991, Vol 2 - (4).; pp. 89-101.*

HERNANDEZ NODARSE, M.T.; CUELLAR FARINAS, H.

**Capacidad Buffer de los jugos de cana como indicador de la actividad microbiana. Su influencia en el proceso.**

1986 - *ATAC. Revista de la Asociacion de Tecnicos Azucareros de Cuba v.45 no.3, p.13-19.*

HERNANDEZ NODARSE, M.T.; PEREZ RUIZ, M.E.; SANCHEZ MORALES, R.

**Determination of microbial losses at the tandem by means of spontaneous fermentation test.**

1983 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 18, La Habana, Cuba, . Proceedings.*

1983 - *Madrid, Sucesores Rivadeneyra, 1986?; v.3, p. 1138-1156.*

HERNANDEZ, M.T.; CUELLAR, H.; PENA, A.

**Influencia de la contaminacion microbiana de los jugos sobre la etapa de cristalizacion.**

1983 - *Centro Azucar (Cuba) v.10 no.3, p.21-28.*

HERNANDEZ, M.T.; SHEVCHENKO, A.M.; QUINTERO, N.

**La accion de los germicidas sobre los microorganismos del jugo de la cana.**

1976 - *ATAC. Revista de la Asociacion de Tecnicos Azucareros de Cuba v.35 no.3, p.42-58.*

HERRERA GUITROLA, A.

**Etanol a partir del bagazo.**

1981 - *ATAC. Revista de la Asociacion de Tecnicos Azucareros de Cuba v.40 no.1, p.22-27.*

HERRERA, A.; QUINTANA, M.; PEREZ, J.

**Proteina unicelular a partir de materiales celulosicos de la cana**

1982 - *ATAC. Revista de la Asociacion de Tecnicos Azucareros de Cuba v.41 no.5, p.34-41.*

HODGE, H.M.; HILDEBRANDT, F.M.

**Alcoholic fermentation of molasses.**

0 - *s.l, s.e, s.f.; p. 73-94.*

HONIG, P.

**Principios de tecnologia azucarera.**

1969 - *Mexico, Continental* . 3 v.

HSIE, M.C.

**Continuous fermentation of ethanol using immobilized growing yeast cells.**

1989 - *Taiwan Sugar* v.36 no.4, p.14-22.

HSIE, M.C.; YEE, W.F.; WANG, L.H.; SANG, S.L.

**The efficient ethanol fermentation of acid hydrolyzate from hemicellulose-extracted bagasse**

1984 - *Tainan, Food & Fertilizer Technology Center; p.1-11. (Technical Bulletin, no.85)*

HUANG, H.

**A study on utilization of fusel oil in the preparation of amino resins for surface coatings.**

1980 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 17, Manila, Philippines. Proceedings.*

1980 - *Manila, Print-Inn, 1980.; v.3 p. 2787-2793.*

HUMBERT, R.P.

**Soil as a factor in varietal yield decline.**

1959 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 10, Hawaii., Proceedings.*

1959 - *Amsterdam, Elsevier, 1960. p. 51-58.*

I. GUTIERREZ, N. FERNANDEZ, I. GOIRE, O. SARDIÑAS, J.C. ROMAN, N. ROMERO.

**Bagasse biologic degradation using the fungus *Sporotrichum pulverulentum*.**

1983 - *ISSCT - Vol.3, XVIII° Cong. La Havanne.*

I. JAMER, J.R. PEREZ, H. DAVILA, E. RIVAS.

**Caracterización de la producción y aplicación de enzimas en la industria azucarera cubana.**

1988 - *Revista ATAC n°6 .*

IGLESIAS, G.D.; RAMOS, C.; NAPOLES, I.; LOPEZ PLANES, R.

**Estudio de la utilizacion del meollo de la cana de azucar para la obtencion de mieles hidroliticas y forraje para la alimentacion del ganado.**

1985 - *ATAC. Revista de la Asociacion de Tecnicos Azucareros de Cuba v.44 no.5, p.35-40.*

INGENIO RISARALDA, S.A. PEREIRA(COLOMBIA).

**Manual ilustrativo sobre la preparacion, obtencion y usos de la cenichaza.**

1988 - *Pereira, Ingenio Risaralda . 37 p. illus.*

INGRAM, J.W.; BYNUM, E.K.; MATHES, R.

**Insect pest of sugar cane in continental United States.**

1950 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 7, Brisbane, Australia . Proceedings.*

1950 - *Brisbane, ISSCT, 1951. p. 395-401.*

INKERMAN P. A.

**An appraisal of the use of dextranase.**

0.- *Sugar Research Institute, Mackay, Australia.*

INSTITUTO CUBANO DE INVESTIGACIONES DE LOS DERIVADOS DE LA CANA DE AZUC.

**Produccion de acetona-butanol.**

1990 - *Boletin GEPLACEA v.7 no.6, p.1-2.*

IREY M.S. & DESTEPHANO R.P.

**Serological determination of dextran levels in raw sugar and crusher juice using polyclonal antisera in a turbidimetric assay.**

1992 - *J.Am.Soc.SugarCane Technol., 12; 115*

ISAIAS I.

**Elaboracion de caña de azucar en pequeña escala y aprovechamiento de los residuos.**

1985 - *Doc. FAO , Roma ,58p.*

ISIDRO, R.G.

**CO<sub>2</sub> recovery plant of central azucarera Don Pedro.**

1980 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 17, Manila, Philippines. Proceedings.*

1980 - *Manila, Print-Inn, 1980.; v.3 p. 2794-2806.*

Ivin P. V., J. C. Baird, P. collins

**Use of C18 reverse phase HPLC in the Australian Raw Sugar Industry**

IVIN P.C. & FOSTER D.H.

**Some aspects of cane quality affecting mill processing**

1977 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 16, Sao Paulo, Brasil . Proceedings.*

1977 - *Sao Paulo, Impres, 1978. v.3 p. 2701-2710*

IYO A.H. & ANTAI S.P.

**Protein enrichment of lignocellulose resulting from the growth of two Streptomyces strains.**

1991 - *World J. Microbiol. Biotechnol.; 7 (6); 624-625*

J. BARBER, A. CHAPMAN, T.D. HOWARD & G. TEBB.

**Recycling of polyketides by fungi : the degradation of citrinin by *Penicillium citrinum*.**

1988 - *Appl. Microbiol. Biotechnol. 29, 387-391.*

J. E. LARRAHONDO (CENICAÑA), Thomas PRESTON (CIPAV)

**Control químico de la inversion de jugos de caña de azúcar para la alimentación animal.**

0 - *TECNICAÑA*

J. H. Curtin, R.J. McCowage.

**Dextran in measurement in cane products.**

J. HORMAZA MONTENEGRO, B.E. MARTIN RECORT, E.L. RAMOS SUAREZ, A. LEON GU

**Non-sugars and their influence upon the sucrose crystal habit.**

1983 - *ISSCT XVIII° Cong. Vol.3, CUBA- La Havanne.*

J. LODOS & D. HERVE

**Integrated diversification: production of high fructose syrups and glucose-sorbitol from sugar.**

1989 - *XX° Congress ISSCT, Sao Paulo, Vol. 1, 346-354.*

J. M. de Bruijn, P. W. van der Poel, R. Heringa, M. van den Blick.

**Sugar degradation in sugar beet extraction - a model study.**

J.L. OLIVIERA & J.F.P. DE MIRANDA

**Methane gas from stillage as a motor fuel.**

1989 - *XX° Congress ISSCT, Vol.1, 381-387.*

J.M. BRILLOUET, J.C. MOULIN.

**Production, purification and properties of an alpha-L-arabinofuranosidase from *Dichomitus squalens*.**

1985 - *Carbohydrate Research, 144, 113-126.*

JACOBS, S.J.

**Micro-organisms as potential biological control agents of *Eldana saccharina* Walker (Lepidoptera:Pyralidae).**

1989 - *Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association no.63, p.186-188.*

JIMENEZ GONZALEZ, E.; PEREZ PONCE, J.; HERRERA OFARRILL, I; VELAZCO, O.

**Micropropagación in vitro de la caña de azúcar (*Saccharum* sp híbrido).**

1990 - *Centro Agrícola (Cuba) v.17 no.1, p.3-9.*

Jose Villar, Olga Torres, Edilberto Manganelly

**Evaluación de materias primas maderables para la obtención de forraje hidrolizado.**

1991 - *ICIDCA, VOL. XXV, N° 1-2, p. 38 - 43.*

K. G. Black, S. J. Snyman.

**Biomass yield and insecticidal activity of a local *Bacillus Thuringiensis* isolate in six fermentation media.**

1991 - *Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association*. 77-79.

K.R. YOUNG

**The Brazilian sugar and alcohol industry - an uncertain future**

1989 - *International Sugar Journal*, VOL. 91, No1090, Page 208-209

KAO, J.; DAMANN JUNIOR, K.E.

**Microcolonies of the bacterium associated with ratoon stunting disease found in sugarcane xylem matrix.**

1978 - *Phytopathology* v.68, p.545-551.

KARLHEINZ W.R. SHOENROCK, AVINASH GUPTA, DENNIS COSTESSO.

**New approaches to the application of ion exchange in the sugar industry.**

1977 - *Proceed, 1976, Technical Session of Cane dryer Refining Research. New-Orleans* p. 118-130.

KEO, L.J.

**Process improvement for alcohol manufacture.**

1965 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 12, San Juan, Puerto Rico.*

1965 - *Proceedings. Amsterdam, Elsevier, 1967. p. 1820-1826.*

KING R.E.

**Le cost of sugar factory losses**

0 - *J Amer Soc Sugar ( Une Technologists 1992 vol 12 ) Sept 115*

KLIBANSKY, M.; GONZALEZ, L.; ALTUNA, B.; VASALLO, M. DEL C.; DIAZ DE VILLEGAS

**Evaluacion de diferentes arreglos tecnologicos en la produccion de levadura de invertasa.**

1988 - *Revista ICIDCA sobre los Derivados de la Cana de Azucar (Cuba) v.22 no.3, p.19-27.*

KLIBANSKY, M.; GONZALEZ, L.; PENA, M.; BETANCOURT, D.; VILLA, P.; RODRIGUEZ,

**Estudio de las condiciones de almacenamiento en el deterioro quimico-fisico y microbiologico de la lisina tecnica y cristalina. Revista ICIDCA sobre los Derivados de la Cana de Azucar (Cuba) v.21 no.3, p.28-35. Sep.-Dic. 1987.**

0 - *\*lisina, almacenamiento, microorganismos, analisis quimico.*

KLINTSARE A.A., BEKER M.E., RAMANE I.A.....LISOVSKA A.K.

**Strain of bacteria *Lactobacillus casei* var. *alactosus* producer of L(+). Lactic acid, usable for preservation feeds.**

1989 - *USSR Patent SU 1500672(3 pages) - USSR, Institut Mikrobiologii IM A KIRKHENSHEINA*

KNIGHT, P.

**Research aims to track nitrogen in fertiliser.**

1988 - *BSES Bulletin no.24, p.4-6.*

KOIKE, H.

**An agar-layer method useful in detecting antibiotic-producing microorganisms against *Pythium graminicola*.**

1967 - *Plant Disease Reporter* v.51 no.5, p.334-335.

KOPPER Otto

**Perdida de sacarosa**

1982 - *Memorias Sec.Sem. Tecnol.Moderna Caña Azucar pp. 55-69; CAFESA/ATACORI/MAGILAICA-Costa Rica*

LACEY, J.

**The microbiology of the bagasse of sugarcane.**

1980 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 17, Manila, Philippines .*

1980 - *Proceedings. Manila, Print-Inn, 1980. v.3 p. 2442La conu-2461.*

LANCASTER R.S. & WEBB C.

**Separating enzyme (dextran-sucrase) production and product (dextran) synthesis within a traditional fermentation process.**

1991 - *Process Biochem.*, 1990, 25, (1), 19-23; through *Ref. Zhurn. AN SSSR (Khim.)*(4), Abs. 4R 1424.

LAPLACE J.M., DELGENES J.P. MOLETTA R. & NAVARRO J.

**Combined alcoholic fermentation of D-xylose and D-glucose by four selected microbial strains. Process considerations in relation to ethanol tolerance.**

1991 - *Biotechnology Letters*. 13 (6); pp. 445-450.

LARRAHONDO, J.E.

**La biotecnología en el desarrollo de la industria azucarera.**

1991 - *Cali, CENICAÑA*, 9 p. (Documento de trabajo, no.236) (Presentado en Seminario Regional de Biotecnología,

1991 - 1, Pasto, 26-28 Junio, 1991)

LAVERDE E., G.

**Produccion de alcohol etilico a partir de derivados de la cana de azucar.**

1981 - *Medellin, ICA*, ; p. 401-406. (Instituto Colombiano Agropecuario. Industrializacion de la cana. Medellin, ICA,

1981 - 1981)\*alcohol como combustible, produccion, Colombia, cana de azucar, fermentacion.

LEGRAND, F.; BURDINE, H.W.; THOMAS, F.H.

**Phosphorus and potassium requirements for growing sugar cane on organic soils in South Florida.**

1961 - *The Sugar Journal* v.24 no.1, p.22-26.

LEME, J.R. DE A.; LIMA, L.S. DE; LOPES, C.H.; FERRARI, S.E.; LOPES, J.J.C.; GER

**Fermento selecionado IZ-1904.**

1984 - *Piracicaba*

LEMING and R.F. McFEETERS - Erwin G. HUMPHRIES

**A fermentor for study of sauerkraut fermentation**

1987 - *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 31, Pp. 189-197 (1988) John Wiley & Sons, Inc.

LIMA, I.T.

**Efeitos da aplicacao de vinhaca sobre a microflora do solo.**

1980 - *Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*. 116 p. (Tesis Mag. Sci)

LIMA, UDE A.

**Alcohol como combustible liquido alternativo. Experiencia brasilena.**

1980 - *Piracicaba, Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.*; 24 p., (Presentado en Seminario para la

1980 - racionalizacion energetica en la industria de la cana de azucar, La Habana Cuba, 8-13 Septiembre, 1980)

1980 - \*bagazo, tecnologia, fermentacion, alcohol como combustible, Brasil, etanol, cana de azucar.

LIN, C.H.; WANG, L.H.; KUO, Y.C.; CHANG, C.Y.

**Reassessment and improvement of continuous cultivation of yeast.**

1988 - *Taiwan Sugar* v.35 no.6, p.19-22.v.36 no.1, p.21-22. Jan.-Feb. 1989.

LIN, C.H.; WANG, L.H.; KUO, Y.C.; CHANG, C.Y.

**Reassessment and improvement of continuous cultivation of yeast.**

1988 - *Taiwan Sugar* v.35 no.6, p.19-22.v.36 no.1, p.21-22. Jan.-Feb. 1989.

LIU, Y.T.; SANG, S.L.

**A potential fermentation product L-Lysine from cane molasses in Taiwan.**

1980 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 17, Manila, Philippines* .

1980 - *Proceedings. Manila, Print-Inn, 1980.*; v.3 p. 2536-2649. \*fermentacion, melaza, Taiwan, aminoacidos, cana

1980 - de azucar, subproductos.

LIU, Y.T.; SANG, S.L.

**A pilot plant test of L-Lysine fermentation with cane molasses.**

1983 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 18, La Habana, Cuba. Proceedings.*

1983 - *Madrid, Sucesores Rivadeneyra, 1986?*

LOPES, J.J.C.; DEGASPARI, N.; BOTELHO, P.S.M.; LEME, J.R. DE A.; FERRARI, S.E.;

**Effects of borer/rot complex in the alcoholic fermentation of sugarcane juice.**

1983 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 18, La Habana, Cuba, . Proceedings.*

1983 - *Madrid, Sucesores Rivadeneyra, 1986?;v.2, p.902-909.*

LOPEZ MUNGUÍA A., PELENC V., REMAUD M., BITON J., MICHEL JM, LANG C.& MONS

**Production and purification of alternansucrase, a glycosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355, for the synthesis of oligoalternans.**

1993 - *Enzyme Microbiol. Technol., 15; 77-85*

LOPEZ, M.; HERNANDEZ NODARSE, M.T.

**Estudio del contenido microbiano de azucares refinados cubanos.**

1988 - *Centro Azucar (Cuba) v.15 no.2, p.3-8.*

LOPEZ, M.; HERNANDEZ, M.T.

**Estudio comparativo de medios de cultivo empleados para la determinación de hongos.**

1988 - *Centro Azucar (Cuba) v.15 no.1, p.69-72.*

LOPEZ, M.; RAMOS, E.I.

**Estudio del efecto del tratamiento retardatriz en el poder fermentescible de las mieles.**

1988 - *ATAC. Revista de la Asociación de Técnicos Azucareros de Cuba v.47 no.6, p.52-56. ≈*

LOPEZ, M.O.; SANDOVAL, I.

**Tres nuevos integrantes de la micoflora de *Saccharum officinarum* L. variedad B 4362.**

1989 - *ATAC. Revista de la Asociación de Técnicos Azucareros de Cuba v.48 no.6, p.41-45.*

LOPEZ, Z.O.; MORENO, I.E.; FOGLIATA, F.A.; AYALA, H.G.

**Población microbiana de jugos de caña no afectadas y deterioradas por heladas.**

1988 - *Sugar y Azucar v.83 no.7, p.33-39.*

Luiz Ernesto Correia Maranhao

**Seven Years' with Bagasse Dryers**

LUNA RIVILLAS, F.; AFANADOR TRUJILLO, H.; ORTIZ ZAPATA, D.A.

**Determinación de dosis adecuadas de nutrientes en la fermentación de miel virgen invertida (H.T.M).**

1987 - *En: Congreso de la Sociedad Colombiana de Técnicos de la Caña de Azúcar, 2, Cali . Memorias. Cali,*

1987 - *TECNICANA, 1987.*

LUNA RIVILLAS, H. ATANADOR TRUJILLO, D.A. ORTIZ ZAPATA.

**El proceso de inversión de meladura o high test molasses (HTM) en ingenio riopaila S.A.**

0 - *TECNICAÑA, 633-647*

M. A. OTERO, G. BERNAL, O. ALMAZAN.

**La proteína unicelular (II)**

1981 - *ATAC, Vol. 40, n°1, p. 8-14.*

M. BUCKLEY, G. NORTON

**Experiences with a new molasse separation plant at Mallow.**

M. DAS G.F. DE OLIVEIRA, G.M. DE S. ANTUNES, S. SACRAMENTO.

**Estudios previos para normatización de técnicas para evaluación de bactericidas.**

0 - *IIEP & HOECHST DO BRASIL*

M. ENRIQUEZ P.

**The production of invert syrup in Mexico : a real alternative for the diversification of the sugar industry.**

1990 - *Mem. III Conf. Tecnicaña, 655-662 (spanish)*

M.K. SRIVASTAVA, S.P. SHUKLA, A.P. DIXIT.

**Measures to check sugar cane post-harvest biodeterioration.**

1991 - *Int. Sugar J.* Vol. 93, n° 114, p. 91 A - 103 A.

M.S.C. Alberto HERRERA, Lic. Marisel QUINTANA, Lic. Justo PEREZ.

**Proteina unicelular a partir de materiales celulosicos de la caña.**

1982 - *ATAC*, n° 5, Vol. 45, p. 34-41.

M.VAN Der MERWE & T.J. BRITZ\*

**Anaerobic digestion of baker's yeast factory effluent using an anaerobic filter and hybrid digester**

MALAVOLTA, E.

**A adubacao mineral da cana-de-acucar.**

1982 - *Alcool & Acucar (Brasil)* v.2 no.7, p.10-12.

MALAVOLTA, E.; HAAG, H.P.

**Nutricao e adubacao. Sao Paulo, Instituto Brasileiro de Potassa, 1964. p.237-278.**

1964 - (En: *Instituto Brasileiro de Potassa. ed. Cultura e adubacao da cana-de-acucar. Sao Paulo, Instituto Brasileiro de Potassa*)

MANSUR M., KLIBANSKY M., GUTIERREZ I. & GONZALEZ L.

**Evaluation of process parameters for production of Pleurotus fungi cultivated on cane straw.**

1992 - *Boletin GEPLACEA*, vol.9(8), items technol. p1-8

Marc DELPECH, Simon WAIN-HOBSON et Jean-Pierre VARTANIAN, Cristophe PANNETIER

**Les applications de la PCR**

**L'analyse de la réponse immunitaire**

1992 - *La recherche* 249 Decembre 1992 Volume 23

MARGAREY, R.C.; CROFT, B.J.; HURNEY, A.P.

**Research links yield decline with soil-borne micro-organisms. BSES**

1989 - *Bulletin no.27*, p.10-11.

Mariana Mansur, Isis Gutierrez, Miriam Klibansky, Anastasia Ginterova.

**Producción de Hongos Pleurotus a partir de los residuos de la cosecha cañera.**

1991 - *ICIDCA, VOL. XXV, N°1-2*, p. 55 - 60.

MARQUES, M.O.; HORII, J.; STUPIELLO, J.P.; MALHEIROS, E.B.

**Efeitos de hidrolises sobre a fermentacao alcoolica. 2. Hidrolises enzimicas.**

1988 - *STAB (Brasil)* v.6 no.4-5, p.49-52.

MARQUES, M.O.; HORII, J.; STUPIELLO, J.P.; MALHEIROS, E.B.

**Efeitos de hidrolises sobre a fermentacao alcoolica. 1. Hidrolises quimicas.**

1988 - *STAB (Brasil)* v.6 no.3, p.45-46,48-50.

MARTINEZ, E.; GUTIERREZ, L.; CHAMIZO, A.; ALONSO, A.; ECHAVARRIA, R.; RODRIG

**Potencialidad de levaduras deficientes respiratorias para la produccion de etanol.**

1987 - *Revista ICIDCA sobre los Derivados de la Cana de Azucar (Cuba)* v.21 no.2, p.1-3.

MARTINEZ-CARRERA D. & MORALES P.

**Reseña histórica del cultivo comercial de hongos comestibles en Colombia.**

1992 - *Micologia Neotropical Aplicada*, Vol.5, pp. 89-95

Masaki, T. Kokubu

**Study on electro dialysis desalination of Indonesian cane molasses.**

MAUCH, W.; NICKISCH, M.

**Redox potential and oxygen concentration (PO<sub>2</sub>) as criteria for the valuation of the effectiveness and for the application of disinfectants.**

1980 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 17, Manila, Philippines .*

1980 - *Proceedings. Manila, Print-Inn, 1980. v.3 p. 2164-2177.*

MC CALIP, M.A.; HALL, H.H.

**Effect on factory cane juices and sirups of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from fast damage Louisiana sugarcane of the 1937 crop.**

1938 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 6, Baton Rouge, Louisiana .*

1938 - *Proceedings. Baton Rouge, Franklin Press, 1939.p. 986-1004.*

MC GAW, D.R.; MELLOWES, W.A.; PILGRIM, A.C.

**Recent developments in ethanol production technology.**

1990 - *Sugar Journal v.52 no.9, p.16-20.*

MC MASTER, L.; RAVNO, A.B.

**The occurrence of lactic acid and associates microorganisms in cane sugar processing.**

1977 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 16, Sao Paulo, Brasil. Proceedings.*

1977 - *Sao Paulo, Impres, 1978. v.3 p. 2679-2693.*

MELO, F.DE A.D.; BORBA, J.M. DE M.; PATERSON, M.

**Cana-de-acucar integral e queimada sem desponte: Resultados preliminares obtidos.**

1988 - *Brasil Acucareiro v.106 no.5-6, p.33-37.*

MENEZES, T.J.B.

**O estado atual sobre o tratamento e aproveitamento da vinhaca.**

1980 - *Sao Paulo, Ceres . p. 187-201.*

MENSHAWI, Z.A.

**Chemical constituents of the sugarcane apex associated with floral evocation.**

1977 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 16, Sao Paulo, Brasil . Proceedings.*

1977 - *Sao Paulo, Impres, 1978. v.2 p. 1885-1901.*

MICHELINA, A. BELL, I. VALDEZ, M. OTERO, O. ALMAZAN, M. LOPEZ, A. MARTINEZ

**Estudio preliminar de la influencia de los parametros del proceso en la sintesis dirigida de dextranas de bajo peso molecular**

1992 - *Revista Icidca, VOL. 26, No 1, P.10-14*

MILLS, J.T.; VLITOS, A.J.

**The rhizosphere of sugarcane preliminary isolations of fungi from an uncultivated, heavy clay soil and from similar soil in which sugarcane is being cultivated.**

1965 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 12, San Juan, Puerto Rico .*

1965 - *Proceedings. Amsterdam, Elsevier, 1967. p. 125-136.*

MONTOYA, D.; FERREIRA, S.; GRANADOS, J.; DUMAR, J.; PARRA, C.; LOPEZ, E.; SIERF

**Evaluación de cepas de *Clostridium acetobutylicum* y optimización de un medio de cultivo industrial para fermentación acetobutílica a base de melaza de caña.**

1989 - *Bogotá, Universidad Nacional, Instituto de Biotecnología, 18 p.*

MONTOYA, D.; FERREIRA, S.; GRANADOS, J.; DUMAR, J.; PARRA, C.; LOPEZ, E.; SIERF

**Aplicación de la melaza de caña en la fermentación acetobutílica.**

1990 - *Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Biotecnología; 33 p.*

MORIYA K., SHIMOI H., SATO S., SAITO K. & TADENUMA M.

**Ethanol fermentation of beet molasses by a yeast resistant to distillery waste water and 2-deoxyglucose.**

1991 - *International Sugar Journal, Vol.93, nº1110, pp. 64-66.*



MUELLER, H.

**Industrial fermentation of sugar.**

1972 - *En: International Sugar Research Symposium, 4, Zurich, Switzerland . Expansion of sugar uses through research. Bethesda, Maryland, The Internacional Sugar Research Foundation, 1972.p. 23-26.*

Muhammad Saechu, Soewarno Partowinoto

**The Possibility of Improving the Individual Bagasse System**

MUNOZ A., R.

**Respuesta de la variedad de cana POJ 2878 a la fertilizacion con nitrogeno, fosforo, potasio, elementos menores y cal en un suelo coluvial de la vereda Muzinga en Frontino (Antioquia).**

1978 - *Bogota, ICA, p. 148-149. (En: Instituto Colombiano Agropecuario. Programa Nacional de Suelos. Informe de Progreso 1976-77, Bogota, ICA, 1978)*

MURDIYATMO, U.; TEDJOWAHJONO, S.

**Improvement of ethanol productivity from cane molasses by continuous fermentation using immobilised yeast.**

1986 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 19, Jakarta . Proceedings. Jakarta, 1986 - ISSCT, 1986.,v.2 p. 964-970.*

N. POLANCO DOMINGUEZ.

**Possibilities for the use of a bacterial amylase in the cane sugar industry.**

1983 - *ISSCT , Vol. 3 - CUBA.*

NAIDU, K.M.; RAMAKRISHNAN, S.; BHAGYALAKSHMI, K.V.

**Causative factors for the ocurrence of chlorosis in sugarcane growth in red loamy soils.**

1980 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 17, Manila, Philippines. Proceedings. Manila, Print-Inn, 1980. v.1 p. 732-741.*

NAVARRO, A.R.

**Stillage re-use in batch ethanol fermentation.**

1989 - *Taiwan Sugar v.36 no.3, p.20-25.*

NEIVA, J.L.

**Producao de alcool etilico por fermentacao; principais materias primas para fabricacao industrial de alcool.**

1977 - *Brasil Acucareiro v.89 no.5, p.27-35.*

NEVES, M.C.P.; LIMA, I.T.; DOBEREINER, J.

**Efeito da vinhaca sobre a microflora do solo.**

1983 - *Revista Brasileira de Ciencia do Solo v.7 no.2, p.131-136.*

NIGRAM P.

**Mixed-culture, solid-state fermentation of sugar cane bagasse for feed production**

1991 - *International Sugar Journal, Vol.93, n°1110, pp. 64-66.*

NUÑEZ M., CHAMY R., DOMINGUEZ H., SAN ROMAN A. & LEMA J.

**Continous fermentation of D-xylose by immobilized "P. stipilis".**

1991 - *Applied Biochem. and Biotechnol., 28(6); pp.731-739.*

O.A. MEJIA E., A. ZAPATA C.,

**Producción de lactato de calcio por hidrolisis alcalina de mieles finales.**

0 - *Universidad del Valle.*

OBREGON LUNA, J.

**Aplicacion de nutrientes por balance.**

1984 - *ATAC. Revista de la Asociacion de Tecnicos Azucareros de Cuba v.43 no.3, p.46-53.*

OLIVEIRA, D.T.; PIZAIA, W.; ACKERMANN, H.P.H.; VAZ ROSSELL, C.E.

**Alternativas de processo no tratamento do caldo para destilaria.**

1987 - *Boletim Técnico COPERSUCAR (Brasil) no.36, p.25-31.*

OLIVEIRA, E.G. DE; MORAIS, J.O.F.; LOPES, C.E.

**Fermentacao alcoolica continua com *Zymomonas mobilis*.**

1987 - *En: Congresso Nacional da STAB, 4., e Convencao da ACTALAC, 7, Olinda, Brasil. Anais. s.l, Sociedade dos*  
1987 - *Tecnicos Acucareiros e Alcooleiros do Brasil, 1987?; p.611-619.*

ONNA, K.M.; HASHIMOTO, W.K.

**Economics of using a biocide at a milling tandem.**

1989 - *International Sugar Journal v.91 no.1092, p.232-234.*

ONTIVEROS HERNANDEZ, D.

**Ensayo de fertilizantes quimicos en la region de Cordoba, Veracruz.**

0 - *s.l, s.e, s.f. p. 18-20.*

ORLANDO FILHO, J.

**Nutricao o adubacao de cana-de-acucar.**

1977 - *Brasil Acucareiro v.89 no.1, p.10-16..*

ORTEGA G.M., MARTINEZ E.O., BETANCOURT D. GONZALEZ A.E. & OTERO M.A.

**Bioconversion of sugar cane residues with white-rot fungi *Pleurotus* sp.**

1992 - *World J. Microbiol. Biotechnol., 8 (4); 402-405*

ORTIZ VILLANUEVA, B.

**La fertilizacion de la cana de azucar.**

1969 - *Boletin Azucarero Mexicano p.*

OTERO, M.A.; CABELLO, A.; CONDE, J.

**Disminucion de acidos nucleicos en *Candida utilis*; diferentes alternativas de tratamientos.**

1982 - *ATAC. Revista de la Asociacion de Tecnicos Azucareros de Cuba v.41 no.3, p.49-57.*

P.J. MANOHAR RAO.

**Production of methane gas from stillage on commercial scale in India.**

1983 - *ISSCT - Vol. 3, CUBA.*

PADMAJA G. & BALAGOPALAN C.

**Evaluation of single cell protein enriched cassava as energy source in broiler rations.**

1991 - *J. Root Crops, Vol. 17. Special Issue, pp. 249-254.*

PARISIF.

**Advances in lignocellulosics Hydrolysis and in the utilization of the hydrolyzates.**

1989 - *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol. 38, 54-87.*

PATERSON, M.; BORBA, J.M. DE M.; MELO, F.DE A.D.; MORAES, J.I. DE.

**Avaliacao do desempenho da fermentacao etanolica em diferentes situacoes do processo industrial.**

1988 - *Brasil Acucareiro v.106 no.5-6, p.27-32.*

PATIL, A.R.; JADHAV, J.T.

**Steam economy in distillery waste disposal involving spent wash concentration through an integrated heat cycle.**

1980 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 17, Manila, Philippines. Proceedings.*

1980 - *Manila, Print-Inn, 1980.; v.3 p. 1935-1950.*

PATON N.H. & DUONG M.

**Sugar cane phenolics and first expressed juice colour. Part III:role of chlorogenic acid and flavonoids in enzymic browning of cane juice.**

1992 - *Intern. Sugar J., 94 (1124); 170-176*

PAYAN A., F.; CARMEN, H.; TASCÓN, G.

**Técnicas para la micropropagación de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) mediante el cultivo de tejidos y yemas.**

1977 - *Acta Agronomica (Colombia)* v.27 no.114, p.43-79.

PAZ, L.; FERNÁNDEZ, C.

***Thermoactinomyces sacchari* en bagazo almacenado.**

1987 - *Revista ICIDCA sobre los Derivados de la Caña de Azúcar (Cuba)* v.21 no.3, p.36-39.

PEDRO GONZÁLEZ-BLANCO, GERARDO SAUCEDO-CASTAÑEDA, GUSTAVO VINIEGRA-G

**Protein Enrichment of Sugar Cane By-Products Using Solid-State Cultures of *Aspergillus terreus*.**

1990 - *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol. 70, No 5, 351-354.

Peggy S.HAYES,\* Lewis M GRAVES, B.SWAMINATHAN, Gloria W AJELLO, Georgia B.MAL

**Comparison of three selective enrichment methods for the isolation of *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods**

1992 - *Journal of food protection*, Vol.55, N° 12 Pages 952-959 (December 1992)

PRADERA V.

**Aspectos generales y actividades desarrolladas en Ingenio Castilla, Pradera, Colombia**

1990 - *Ing. Central Castilla*, 38 p.

PRADO FILHO, L.G. DO; CANTARELLI, P.R.

**Atividade antimicrobiana em vinhaca: I. Comunicacao preliminar.**

1986 - *Revista de Agricultura (Brasil)* v.41 no.1, p.9-11.

PRAMMANEE, P.; SAFFIGNA, P.G.; WOOD, A.W.; FRENEY, J.R.

**Loss of nitrogen from urea and ammonium sulphate applied to sugar cane crop residues.**

1989 - *Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists* p.76-84.

PRASAD, M.

**The effect of filter press mud on the availability of macro- and micronutrients.**

1974 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists*, 15, Durban, South Africa.

1974 - *Proceedings. Durban, Hayne and Gibson, 1974.* v.2 p. 568-575.

PRASAD, M.

**Response of sugarcane to filter press mud and N, P, and K fertilizers. II. Effects on plant composition and soil chemical properties.**

1976 - *Agronomy Journal* v.68 no.4, p.543-547.

PRESTON T.

**Perspectivas para el uso de la caña de azúcar en la alimentación animal y la producción de combustibles.**

1990 - *Geplacea: Sistemas alternativos para alimentación animal; Mexico GEPLACEA.*

PRESTON T.

**Bagazo del ingenio y del trapiche como alimento para animales rumiantes.**

1990 - *GEPLACEA: Sistemas alternativos para alimentación animal; Mexico.*

PRESTON T. - CIPAV

**Nuevos desafíos para la industria azucarera (Producción de combustibles y reducción de la contaminación ambiental)**

1991 - *CIPAV - Cali*. 10 p.

PURCHASE, B.S.; WALFORD, S.N.; WAUGH, E.J.

**An update on progress in the production of ethanol from bagasse.**

1986 - *Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association* no.60, p.33-36.

RAMALLO, J.C.

**Purificación del virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMU).**

1989 - *Avance Agroindustrial (Argentina) v.9 no.36, p.21-22.*

RAUL J.H. CASTRO GOMEZ, YONG K. PARK.

**Conversion of Cane Bagasse to Compost and Its Chemical Characteristics.**

1983 - *J. Ferment Technol., Vol. 61, N° 3, p. 329-332.*

RAVELO S., RAMOS E.L. & MEJIA R.

**Sugar cane deterioration and its implications in the factory.**

1991 - *Int. Sugar Journal; Vol. 93, n° 1108, p. 82-86.*

RAVELO S., TORRESP. & RAMOS E.L.

**Comparison of the main methods of predicting sugar cane deterioration.**

1991 - *Int. Sugar Journal; Vol. 93, n° 1109, pp. 99-102*

RAVELO S. RAMOS E.L. & TORRES P.

**Inhibition of oligo and polisaccharide formation during sugar cane deterioration.**

1991 - *Int. Sugar Journal; Vol. 93, n° 1113, p. 191.*

RENIERO R, PIVA A, MORELLI, BOTTAZ V, et COCCONCELLI

**Purification of lactobacillus secreted proteins**

1993 - *Biotechnol Techniques (1993) vol7,(7);401-406*

RIVAS, E. M. N. GARRIDO, A. BELL, A. SAEZ.

**Diseño de reactor vertical para la síntesis de la dextrana.**

1989 - *Revista ICIDCA, Vol. 23(1). p. 40-43.*

ROBERTS, M. A. CLARKE, M. AN GODSHALL.

**The analysis of dextran in sugar production.**

1983 - *ISSCT, Vol. 3.*

RODRIGUEZ CRUZ O., MENESES LEAL X. & PEREZ GONZALEZ P.

**Efecto de la cavitación sobre el genero Leuconostoc.**

1990 - *Centro Azúcar, Vol. 17, (2), pp. 52-58.*

ROLZ, C.

**A new technology to ferment sugar cane directly: the EX-FERM process.**

1980 - *Process Biochemistry v.15 no.6, p.2-4,6.*

ROLZ, C.

**Some characteristics about the EX-FERM process to produce ethanol.**

1980 - *Proc. Bioenergy p. 418-419.*

ROLZ, C.

**Ethanol from sugar crops.**

1981 - *Enzyme and Microbial Technology v.3, p.19-23.*

ROLZ, C.; CABRERA, S. DE.

**Ethanol from sugar cane: flask experiments using the EX-FERM technique.**

1980 - *Applied and Environmental Microbiology v.40 no.3, p.466-471.*

ROLZ, C.; CABRERA, S. DE; MORALES, E.

**The EX-FERM process.**

1980 - *Process Biochemistry v.15, p.1-4.*

ROLZ, C.; CABRERA, S. DE; MORALES, E.; ARRIOLA, M. DEL C. DE; MICHEO, F. DE.

**The ex-ferm process for ethanol production.**

0 - *s.l, s.e, s.f. 2 p.*

ROSA GALLO C. & PERES CANHOS V.

**Contaminantes Bacterianos na Fermentação Alcoólica - Revisão.**

1991 - *Tecnologia/Pesquisa - STAB - Março-Junho 91*, pp. 35-40

ROSS L.F., & CHAPITAL D.C.

**Simultaneous determination of carbohydrates and products of carbohydrate metabolism en fermentation mixtures by HPLC**

1987 - *J. Chromatog. Sci.*, 25, 112-117

ROTH, G.

**Studies of the effect on sugarcane of damage caused by frost and associated micro-organisms.**

1966 - *Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association v.40*, p.342-350.

ROTT P., CHATENET M. et BAUDIN P.

**L'échaudure des feuilles de canne à sucre provoquée par *Xanthomonas albilineans* I. Synthèse bibliographique.**

1988 - *L'Agronomie Tropicale vol.23 (3)*; 236-243

ROZEFF, N.

**A survey of South Texas sugarcane nutrient studies and current fertilizer recommendations derived from this survey.**

1990 - *Journal of the American Society of Sugar Cane Technologists v.10*, p.26-33.

RUBIO, M.C.; NAVARRO, A.R.

**Effect of agitation on the kinetic variables of alcoholic fermentation in batch culture.**

1989 - *International Sugar Journal v.91 no.1089*, p.171-174,177.

RUIZ E. Anzola

**Viabilidad de elaboración de productos biotecnológicos de interés industrial en Colombia**

1990 - *Universities Xavierana, N°6*,

S. J. Madaree, P. W. Rein, C. M. Wenman.

**Investigations into problem ethanol fermentations.**

129 - *Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association. 129-132.*

S. L. Cheng, L.H. Wang

**Physical Rheologie Properties of a New Microbial Gum from Sucrose**

1986 - *Int. Soc. Sugar Cane Technol., Proc.XIX, Vol. 2, Congress Jakarta, 908-919.*

S.J. Madaree, L.M. Mackrory, G.N. Coulthard.

**Lactic acid formation across a filter station.**

1991 - *Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association. 135-138.*

S; ACOSTA, O RODRIGUEZ, X MENESES, M. HERNANDEZ

**La acción antimicrobiana del formol sobre los jugos de la caña**

1991 - *In. Cuba Azucar (1991) - Oct-Doc p.32-37 (vol25)*

SAIS HERRERA, T.

**Estudios de la flora microbiana en jugos de caña de varias unidades industriales y a escala semi-industrial.**

1977 - *Centro Azucar (Cuba) v.4 no.2*, p.3-19.

SAIS HERRERA, T.

**La microflora en etapas intermedias del proceso de obtención de crudos.**

1982 - *ATAC. Revista de la Asociación de Técnicos Azucareros de Cuba v.41 no.2*, p.44-50.

SAMUELS, R.

**Sugar cane and the soil.**

0 - *Rio Piedras, Puerto Rico, Insular Experimental Station, s.f. 9 p.*

SARKAR, D.F. DAY, S.J. CLARKE, M. SASKA.

**Dextran analysis - A comparison of methods.**

1991 - *American Society of Sugar Cane Technologists*. Vol. 11.

SASKA M.

**Degradation of sugar cane dextran by ultrasonic irradiation.**

1989 - *Proc. 20th Congr. ISSCT, 1989*, 115-122.

SCHAFFER F.C. AND ASSOCIATES, INC.

**Rum and alcohol production from molasses.**

1978 - *s.l, s.e; 11 p.*

SCHELLER W.A.

**Sucro and alcochemical prospects.**

1985 - *COPERSUCAR Int. Symp. Sugar & Alcohol; Sao Paulo, Brasil; Proceed.*; 467-474

SHERWOOD, I.R.; HINES, W.J.

**Microbiological aspects of deterioration of raw sugar.**

1950 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 7, Brisbane, Australia. Proceedings.*

1950 - *Brisbane, ISSCT, 1951. p. 591-607.*

SHIN-ICHIRO & MOTOYOSHI TAKAGI.

**Simultaneous Saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid.**

1991 - *Biotechnology and Bioengineering, Vol. 37, Pp. 93-96.*

SHUKLA, J.P.; KAPOOR, B.D.

**Growth promoting factors in cane waste molasses growth and fermentation response of eluates from pretreatment sediments.**

1956 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 9, New Delhi. Proceedings. New Delhi,*

1956 - *ISSCT, 1956. v. 2 p. 498-504.*

SHUKLA, J.P.; TEWARI, K.S.

**Process control in India distilleries by instrumentation.**

1956 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 9, New Delhi. Proceedings. New Delhi,*

1956 - *ISSCT, 1956. v. 2 p. 513-519.*

SHUKLA, N.P.

**Molasses fermentor scaleup.**

1989 - *Taiwan Sugar v.36 no.6, p.23-24.*

SKOLE, R.D.; HOGU, J.N.; RIZZUTO, A.B.

**Microbiology of sugar: a taxonomic study.**

1977 - *En: Technical Session on Cane Sugar Refining Research 1976, New Orleans. Proceedings. New Orleans, U.S.*

1977 - *Department of Agriculture, Science and Education Administration, 1978. p. 82-99.*

Solis S PEREIRA S, FAVELA Torres E VINIEGRA G;G (1993)

**Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinases by *A niger* in submerged and solid state fermentation**

1993 - *Applied Microbiology and Biotechnology vol 39 (1); 36-41*

SPEITEL, G.E, MCLAYDS

**Biofilm reactors for treatment of gas streams containing chlorinated solvents**

1993 - *J. Environ. Energi. ASCE (1993) vol 119 (4) p 658-678*

SRINIVASAN, K.V.

**The role of the rhizosphere microflora in the resistance of sugarcane to pythium root rot.**

1968 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 13, Taiwan. Proceedings.*

1968 - *Amsterdam, Elsevier, 1969. p. 1224-1236.*

SRIVASTAVA M.K., SHUKLA S.P. & DIXIT A.P.

**Measures to check sugar cane post-harvest biodeterioration.**

1990 - *Proc. 52nd Ann. Conv. Sugar Tech. Assoc. India, Ag.77-Ag.90.*

Stephen J. Clarke.

**In the factory, Dextran again.**

1991 - *The Sugar Bulletin, Vol.70, N°3, p. 10 et 17.*

STUPIELLO, J.P.

**Recent progress in ethanol fermentation from sugar cane and its by-products.**

1986 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 19, Jakarta, Indonesia . Proceedings.*

1986 - *Jakarta, ISSCT, 1987.; v.3, p.1151-1159.*

SUTHERLAND C.W., ADRIAN D.D., TITTLEBAUM M. & LEGENDRE D.M.

**Correcting pH and odor problems in a sugarcane wash water treatment system**

1992 - *Sugar Journal, 55 (6); 8-13*

TARUN GHOSE

**Measurement of cellulase activities.**

1984 - *Commission on Biotechnology, International Union of Pure and Applied Chemistry. New-Delhi.*

THANGAMUTHU P.

**Bagasse for cultivation of edible Mushrooms.**

1989 - *XX° Congress ISSCT Sao Paulo. Vol. 1, 340-345.*

TILBURY, R.H.; HOLLINGSWORTH, B.S.; GRAHAM, S.D.; POTTAGE, P.

**Mill sanitation. A fresh approach to biocide evaluation.**

1977 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 16, Sao Paulo, Brasil. Proceedings.*

1977 - *Sao Paulo, Impres, 1978. v3 p. 2749-2768.*

VAJPEYI K. & AGRAWAL P.K.

**Ethanol fermentation of sugar beet juice by a yeast recycle system.**

1991 - *International Sugar Journal, Vol.93, n°1110, pp. 64-66.*

Valdes E., Maria Cristina Obaya, Olga Leon

**Evaluación preliminar de los lodos anaerobicos como biofertilizantes.**

1991 - *ICIDA vol. XXV - n° 1-2 , p. 15 - 18*

Valdes E., Pedro gonzales, Maria C. Obaya.

**Evaluación preliminar de lodos anaerobicos como completo en la dieta animal.**

1991 - *ICIDCA, Vol. XXV, N° 1-2, p. 1 - 10.*

VALDES, M.C. OBAYA, J. RAMOS Y O.L. LEON

**Definición de parametros operacionales en reactores UASB con lecho empacado para el tratamiento de vinazas de destileria.**

1992 - *Revista Icidca, VOL. 26, No 1, P.23-27*

VALDEZ, M.C. OBAYA, J. RAMOS Y O.L. LEON

**Tratamiento de los residuales de la producción de alcohol mediante el proceso UASB**

1992 - *Revista Icidca, VOL. 26, No 1, P.33-36*

VALLANCE, L.G.; LEVERINGTON, K.C.

**The effect of molasses and sweet sorghum residues on soil structure.**

1950 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 7, Brisbane, Australia . Proceedings.*

1950 - *Brisbane, ISSCT, 1951. p. 209-217.*

VANDERGETEN J.P. & VANSTALLEN M.

**Ensilage of pressed pulp.**

1991 - *International Sugar Journal - Vol 93, n°110, p. 64-66.*

VASCONCELOS, J.N. DE; SILVA, A.F.M. DA.

**Avaliacao de eficiencia do aproveitamento de fundos de dornas de fermentacao.**

1985 - *Alcool & Acucar (Brasil)* v.5 no.20, p.16-21

VASCONCELOS, J.N. DE; VALDMAN, B.

**Optimizacao do processo de fermentacao alcoolica atraves da batelada alimentada. Brasil Acucareiro v.106 no.2, p.38-48. Mar.-Abr. 1988.**

0 - *\*fermentacion, alcoholes, Brasil, sucroquimica.*

VASCONCELOS, J.N. DE; VILELA FILHO, V.

**Estudio do comportamento cinetico da fermentacao alcoolica industrial conduzida pelo processo descontínuo.**

1988 - *STAB (Brasil)* v.7 no.2, p.40-42,44,46,50.

Vega Eugenio de la , Antonio Priede.

**Modelación matematica del proceso de generación de vapor.**

0 - *ICIDCA, Vol. 25, n° (1-2), p. 40 - 43.*

VEN V.H. et CHERYMN

**Electrodialysis of Model lactic acid solutions**

1993 - *J. Food Engenieer (1993)* vol 20 (3) p 267-282

VIGNES E.C.

**The implication of cane washing**

1980 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 17, Manila, Philippines . Proceedings.*

1980 - *Manila, Print-Inn, 1980.; v.3 p. 2221-2230*

VILLA GOMEZ P. Y L. DIAZ LLODRA

**Identificación por microscopia de fluorescencia de la flora metanogenica presente en un reactor en el rango termofilico**

1992 - *Revista Icidca, VOL. 26, No 1, P. 26-32*

VITOLO M. & BARROS D.P.

**Sucrose hydrolysis by invertase immobilized on chitin**

1992 - *Lebensm.Wiss. Technol., 25; 240-243*

VLITOS, A.J.

**New developments in sucrochemistry.**

1986 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 19, Jakarta, Indonesia . Proceedings.*

1986 - *Jakarta, ISSCT, 1987.;v.3, p.1182-1183.*

VLITOS, A.J.; MILLS, J.T.; BROUGH, J.W.

**The rhizosphere of sugarcane a quantitative study of microbial population on three tropical soils.**

1965 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 12, San Juan, Puerto Rico.*

1965 - *Proceedings. Amsterdam, Elsevier, 1967. p. 722-725.*

W. Keenlside

**An Economic Analysis of Cane Energy Production**

W. R. GIBBONS & C. A. WESTBY.

**A continuous, farm-scale, solid-phase, fermentation process for fuel ethanol and protein feed production from fodder beets.**

1984 - *Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXVI, Pp. 1098-1107 .*

W. R. GIBBONS & C.A. WESTBY

**Technology and economics of ethanol production from fodder beets via solid-phase fermentation.**

1988 - *Biotechnology Letters, Vol. 10, N° 9, p. 665-670.*



W. R. GIBBONS & C.A. WESTBY.

**Effect of pulp pH on solid phase fermentation of fodder beets for fuel ethanol production.**

1986 - *Biotechnology Letters* Vol. 8, N° 9, 657-662.

W. R. GIBBONS, C. A. WESTBY & E. ARNOLD.

**Semicontinuous diffusion fermentation of fodder beets for fuel ethanol and cubed protein feed production.**

1988 - *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 31, Pp. 696-704.

W.L. BRYAN

**Solid-state fermentation of sugars in sweet sorghum.**

1990 - *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 12.

WALTER, K.

**Deterioration of bulk-stored bagasse and its preservation by chemical treatment.**

1980 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 17, Manila, Philippines. Proceedings.*

1980 - *Manila, Print-Inn, 1980.*; v.3 p. 2473-2481.

WANG Z.S. & WANG H.C.

**Variación isozimática en aislamiento monospóricos de *Volvariella volvacea*.**

1992 - *Micología Neotropical Aplicada*, Vol. 5, pp. 29- 38

WANG, C.I.

**Image processing for alcohol seed culture inspection.**

1989 - *Taiwan Sugar* v.36 no.6, p.20-21.

WANG, G.S.; WANG, H.H.

**Enhancement of adhering, anaerobic, Sacharolytic thermophile on methane fermentation.**

1989 - *Taiwan Sugar* v.36 no.2, p.19-24.

WANG, G.S.; WANG, L.H.

**Improvement of ethanol-tolerance of xylose-fermenting yeast by protoplast fusion.**

1990 - *Taiwan Sugar* v.37 no.3, p.10-13.

WANG, L.H.; HSIE, M.C.; CHANG, C.Y.; KUO, Y.C.; SANG, S.L.; HSIAO, H.D.; CHEN,

**Improvement of ethanol productivity from cane molasses by a process using a high yeast cell concentration.**

1984 - *Taipei, Food & Fertilizer Technology Center*; 13 p.; (Technical Bulletin, no.84)

WANG, L.H.; KUO, Y.C.; CHANG, C.Y.

**Microbial protein produced from bagasse pith production of fungal protein by shake culture.**

1980 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 17, Manila, Philippines x.*

1980 - *Proceedings. Manila, Print-Inn, 1980.* v.3 p. 2533-2545.

Werther ANNICHINO

**Proálcool-Present situation and prospects**

1989 - *International Sugar Journal*, VOL. 91, No1090, Page 204-207.

Wilson J. R., Percival R. W.

**Ultrafiltration : a new alternative for the management of regenerant waste streams.**

1990 - *Proceed Sugar Process. Research conf. New Orleans, SRRRI (1991)*, 116 - 125 *Enf. Gref.*

WILSON TE. Jr.

**Dextran in Raw Sugar in Proceed.**

1991 - *The 1990 Sugar Processing Research conf. New-Orleans La; SPRI*, pp. 89-98.

WILSON, J.H.; WELMAN, A.C.F.; ELLIS, R.D.

**Small farm sugarcane settlement scheme at Mkwazine Estate in Zimbabwe.**

1986 - *Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association* no.60, p.212-215.

WONG-CHONG J. & MARTIN F.A.

**High pressure liquid chromatography for the analysis of sugarcane saccharides.**

1980 - *ISSCT, Manila, Philip.*, vol.3; p.2273-2388

WU, M.M.H.; CHIANG, M.H.; CHOU, J.S.F.

**Soil microorganisms in relation to yield decline of ratoon cane in Taiwan.**

1972 - *Taiwan Sugar v.19*, p.179-185.

Y. KURNIAWAN, M. MOCHTAR

**Application of different membrane treatments for desalting molasses.**

1986 - *Proceed XIX Conf. I.S.SCT. Vol. 2, Jakarta.*

Y. NAKASONE

**Polysaccharides in diffusion juice from non-limed and limed cane.**

1983 - *Int. Society of sugar cane technologists. Proceed XVIII Congres, La Havana - CUBA - Vol. 3.*

Y.D. HANG & E.E. WOODMANS

**Solid-state fermentation of apple pomace for citric acid production.**

1986 - *MIRCEN Journal*, 2, 283-287.

YAMAFUJI, K.; OHTSU, K.

**The value of cane juice as yeast nutrient medium.**

1938 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 6, Baton Rouge, Louisiana.*

1938 - *Proceedings. Baton Rouge, Franklin Press, 1939.p. 880-885.*

YANG, S.M.

**Microbial populations in soils cropped to five varieties of sugarcane.**

1971 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 14, Baton Rouge, Louisiana.*

1971 - *Proceedings. Baton Rouge, Franklin Press, 1972. p. 1045-1051.*

YASSEIN, M.

**The use of molasses for the production of acetone-butanol.**

1986 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 19, Jakarta. Proceedings. Jakarta,*

1986 - *ISSCT, 1986.; v.2 p. 956-963.*

YEE, W.F.; WANG, L.H.; HSIE, M.C.; SANG, S.L.

**A new process of xylose production from bagasse for ethanol fermentation.**

1984 - *Tainan, Food & Fertilizer Technolgy Center, p.13-25.; (Technical Bulletin, no.85)*

YEH, T.P.; FAN, C.N.; WANG, H.H.

**Effect of hog manure compost on microbial activities of sugarcane soils.**

1968 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 13, Taiwan. Proceedings.*

1968 - *Amsterdam, Elsevier, 1969. p. 815. (Solo resumen)*

YINDEEYOUNGGYEON W. & TRIRATANA S.

**Interacción hifal en apareamientos dicarióticos de *Lentinula edodes*.**

1992 - *Micologia Neotropical Aplicada, Vol.5, pp. 17-27.*

ZACHARIASSEN, B.

**Yeast as by product in alcohol distilleries.**

1968 - *En: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 13, Taiwan. Proceedings. Amsterdam,*

1968 - *Elsevier, 1969. p. 1930-1933.*

ZERVAKIS G. & BALIS C.

**Estudio comparativo de los caracteres de cultivo en especies de *Pleurotus* bajo la influencia de diferentes sustratos y temperaturas de fructificación.**

1992 - *Micologia Neotropical Aplicada, Vol.5, pp. 39-47.*

ZOSSI, S.; RUIZ, R.M.; CARDENAS, G.J.

**Influencia del dióxido de azufre en la fermentación alcohólica.**

1990 - *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán (Argentina) v.67 no.1, p.31-45.*

ZULUAGA MEJIA, C.A.; RODRIGUEZ FORTUNATO, J.A.

**Geotrichum candidum Link, cultivado en cachaza de panela como fuente proteica en dieta de pollos asaderos.**

1979 - Palmira, *Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 47 p. (Tesis Ing. Agr.)