

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS, TECNOLOGIA E

INGENIERIA DE LOS ALIMENTOS.



UTILIZACIÓN DE CEPAS GENÉRICAS (*Saccharomyces Cerevisiae*) EN MUCILAGO DE CACAO (*Teobroma Cacao L.*)
CCNN - 51 PARA OBTENER ETANOL POR DESTILACIÓN
FRACCIONADA.

TESIS

Para optar el título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Presentado por:

RICHARD ELEAZAR, PEZO VARGAS

Tingo María – Perú

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María
FACULTAD DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
Av. Universitaria s/n. Teléfono (062) 561385 – Fax (062) 561156
Apart. Postal 156 Tingo María E.mail; fiia@unas.edu.pe

"Año de la Diversificación Productiva y del Fortalecimiento de la Educación"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 015-2015

Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 24 de octubre de 2015, a las 6:00 p.m. en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco, para calificar la tesis presentada por el Bach. **PEZO VARGAS, Richard Eleazar**, con el título: **Obtención de Etanol por Destilación Fraccionada de Mucilago de Cacao (Theobroma cacao L.) CCNN-51 para la Producción de Bebidas Alcohólicas**.

TITULACION DE CEPAS GENERICAS DE (*Saccharomyces cerevisiae*) EN MUCILAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) CCNN-51 PARA OBTENER ETANOL POR DESTILACION FRACCIONADA

Después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las preguntas formuladas, el Jurado declara **APROBADO** con el calificativo de **MUY BUENO**; en consecuencia el Bachiller, es apto para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con el artículo 45° numeral 45.2, de la Ley Universitaria N° 30220; los artículos 132 inciso "k" y 135 inciso "f" del Estatuto de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 27 de octubre de 2015

Jorge Castro Gracey
Presidente

Ing. José Blas Matienzo
Miembro

Ing. Alfredo Carmona Ruiz
Miembro

DEDICATORIA

A mi padre Richer Pezo Del águila

Por su valor y trabajo duro para salir adelante, por sus consejos, demostrándome que todo se puede lograr con esfuerzo y perseverancia.

“Si, las cosas buenas de esta vida serian fáciles, todos tendrían éxito”

A mi madre Marita Elena Vargas Rojas

Por su ejemplo de valores, perseverancia y esfuerzo de hacer las cosas bien, no porque deba hacerlo sino porque puedo hacerlo, que me ha infundado en todo momento, por el valor mostrado de salir adelante y sus consejos que me ha permitido ser una persona buena, medianamente culta y útil.

A mis hermanos Diana, Marita, Marcos y Karlla

Porque son motivos de ser mejor cada día, por compartir sus alegrías y anhelos; porque son motivos de superarme día a día y ser ejemplo para mis hermanos, por la perseverancia y esfuerzo en mis logros.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Agraria de la Selva y en especial a la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias que me dieron la oportunidad de formar parte de ellas y a todos los docentes de la carrera.

A la Blga. Margarita Alcedo Romero por confiar en mí por su apoyo incondicional y enseñanza y ser ejemplo de entrega y dedicación en la investigación.

Al técnico de laboratorio de control de calidad, sr. Pedro Condori Miguel por su apoyo y orientaciones académicas y aporte desinteresado en la investigación.

Al técnico de laboratorio de química, sr. Celidonio Yacha Melgarejo por su incondicional apoyo en la investigación.

Al técnico de la planta Piloto, sr. Michelson Cárdenas Shupingahua por apoyarme en los proceso de la investigación y transmitirme sus conocimientos que tiene en la planta piloto.

Al técnico de laboratorio de microbiología de alimentos, sr. Lucas Silva Alfaro por su apoyo desinteresado en la investigación.

Por ello muchas gracias a todos por su dedicación y esfuerzo.

El éxito no es definitivo, el fracaso no es fatal, es el coraje para continuar lo que cuenta

Winston Leonard Spencer Churchill (1874- 1965).

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Definición de Términos Básicos	6
2.2.1. Generalidades del mucilago	6
2.2.1.1 Definición	6
2.2.1.2 Composición	6
2.2.2 Generalidades de las levaduras	7
2.2.2.1. Definición	7
2.2.2.2. Clasificación de los Hongos	8
2.2.2.3. Características morfológicas y fisiológicas de la especie <i>Saccharomyces Cerevisae</i>	9
2.2.2.4. Levaduras importantes en la fermentación	11
2.2.2.5. Factores que influyen en la actividad de las levaduras	12
2.2.3 Fermentación.	15
2.2.3.1. Definición	15
2.2.3.2. Fermentación alcohólica	16
2.2.3.3. Proceso fermentativo en la producción de vinos	18
2.2.3.3.1 Levaduras en la fermentación	18
2.2.3.3.2 Nutrientes.....	23

2.2.3.3.3	Fermentaciones secundarias y subproductos	27
2.2.3.3.4	Inconvenientes en la fermentación	30
2.2.4	Destilación	31
2.2.4.1.	Definición de destilación	31
2.2.4.2.	Tipos de Destilación	33
2.2.4.2.1.	Destilación simple	34
2.2.4.2.2.	Destilación Fraccionada	35
2.2.4.2.3.	Destilación Extractiva de Etanol	37
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1.	Lugar de ejecución	39
3.2.	Materiales y Métodos	39
3.2.1.	Materiales de laboratorio	39
3.2.2.	Equipos de laboratorio	39
3.2.3.	Reactivos y soluciones	40
3.2.4.	Metodología	40
3.2.5.	Estandarización del Mosto	41
3.2.2.1.	Fermentación	41
3.2.2.2.	Destilación	42
3.3.	Diseño experimental	44
IV.	RESULTADOS	46
4.1.	Medición de Azúcares Reductores durante el Proceso Fermentativo del mucilago de cacao.	46
4.2.	Medición de Acidez durante el Proceso Fermentativo del mucilago de cacao.	51

4.3. Rendimiento de la producción de etanol a partir de mucilago de cacao.	56
4.4. Proceso Definitivo para la Obtención de Etanol por Destilación Fraccionada.	58
V. DISCUSIONES.	60
5.1 Discusión de los Resultados de Azúcares Reductores.....	60
5.2 Discusión de los Resultados de Acidez.....	63
5.3 Discusión de los Resultados de la Producción de Etanol.....	66
VI. CONCLUSIONES.....	69
VII. RECOMENDACIONES.....	70
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Componentes químicos del mucílago de cacao (%p/p).....	7
2. Características morfológicas y fisiológicas de la especie <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
3. Valores generales de la lectura de Azucares Reductores por el método de DNS.	47
4. Valores generales de la lectura de Azucares Reductores por el método de DNS.	49
5. Análisis de variancia estadístico del proceso fermentativo en función del consumo de Azucares reductores.....	51
6. Valores generales de la lectura de la Acidez por Titulación.	52
7. Análisis del proceso fermentativo en función a la Acidez Titulable.	56
8. Valores generales de la obtención de Etanol del Mucilago de Cacao.	57
9. Análisis del proceso fermentativo en función a la producción de etanol. ...	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Phylogenetic classification of the Kingdom <i>Fungi</i> (Hibbett <i>et al.</i> , 2007).....	9
2. Glucólisis, fermentación alcohólica y respiración (ANAVARRA 2007, Mathew 2004).	17
3. Esquema de una destilación simple (mezcla binaria)	35
4. Esquema general de una destilación fraccionada de una mezcla de compuestos Miscibles de diferentes puntos de ebullición	36
5. Esquema de la destilación extractiva de etanol azeotrópico con algún solvente homogéneo.	38
6. Flujograma de obtención de mucilago y destilación fraccionada de etanol. .	43
7. Diseño Experimental.	45
8. Grafico del comportamiento de los azucares reductores durante los 7 días de fermentación.	48
9. Grafico del comportamiento de los azucares reductores durante los 7 días de fermentación.	50
10. Grafico del comportamiento de acidez durante los 7 días de fermentación.	53
11. Valores generales de la lectura de la Acidez por Titulación.	54
12. Grafico del comportamiento de acidez durante los 7 días de fermentación.	55
13. Flujograma del Proceso de Destilación con un Equipo de Destilación Simple.	59
14. obtención de materia prima mucilago de cacao	85

15. Preparación del Reactivo DNS.....	86
16. Prueba del reactivo DNS con Concentraciones conocidas de sacarosa.	86
17. Pasteurización del mucilago de cacao.	87
18. Micro fermentación del mucilago de cacao.	87
19. Destilación del mucilago de cacao	88
20. Determinación de la Densidad del Destilado.....	88

RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló en la Universidad Nacional Agraria de la Selva, en los laboratorios de Bioquímica, Análisis de Alimentos, Control de Calidad y Planta Piloto. Los objetivos fueron: Evaluar durante el proceso fermentativo el comportamiento de las cepas en función de los azúcares, acidez y pH, determina la producción de etanol a partir del mucílago del cacao y caracterizar el etanol destilado por su densidad. Para la obtención del mucilago se drenaron los granos de cacao CCN-51, para evitar la contaminación utilizamos meta bisulfito de potasio, separando 0,5 L, de mucilago para cada tratamiento, pasteurizando y microférmentando. Se niveló a un pH de 3, 3,5 y 4, se inoculó con cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, a 0,2 ppm. Los resultados fueron analizados mediante el diseño completo al azar, y la prueba de Tukey ($p < 0,05$), Se determinó el rendimiento de la producción de etanol no se encontró diferencias estadísticas en producción de etanol entre las cepas, que son en promedio 7,61 mL al 74,88 % v/v de etanol para la cepa 1 y 6,77 mL al 75,33 % v/v de etanol para la cepa 2. Caracterizando el etanol destilado por su densidad, para el tratamiento c1a1 en promedio 73° gl con dilución en 1/2,4, en c1a2 en promedio 82° gl con dilución 1/2,7, c1a3 en promedio 72° gl con dilución en 1/2,4, c2a1 en promedio 76° gl con dilución en 1/2,5, c2a2 en promedio 81° gl con dilución en 1/2,7, c2a3 en promedio 70° gl con dilución en 1/2,3.

Palabras clave: CCN-51, mucilago, cacao, etanol, destilación fraccionada, *Saccharomyces*.

ABSTRACT

The present work was carried out at the Universidad Nacional Agraria de la Selva, in the biochemical, food analysis, quality control and plant pilot laboratories. The objectives were: to evaluate the behavior of the strains in their function with the sugar, acidity and pH during the fermentation process, to determine the production of the ethanol that comes from the cacao mucilage and to characterize the distilled ethanol by density. To obtain the mucilage, the cacao CCN-51 beans were drained, to avoid contamination, potassium metabisulfite was used, separating 0.5 L of mucilage for each treatment, pasteurizing and micro fermenting. It was leveled at a pH of 3, 3.5 and 4, it was inoculated with strains of *Saccharomyces cerevisiae*, at 0.2 ppm. The results were analyzed through the use of the completely randomized design and the Tukey ($p < 0.05$) test. It was determined that for the production yield of the ethanol, no significant statistical differences were found in the production of ethanol among the strains, which are an average of 7.61 mL at 74.88 % v/v of ethanol for strain 1 and 6.77 mL at 75.33 % v/v of ethanol for strain 2. Characterizing the distilled ethanol by its density, for the treatment c1a1 an average of 73° gl with a dilution in 1/2,4, for c1a2 an average of 82° gl with a dilution of 1/2.7, for c1a3 an average of 72° gl with a dilution of 1/2.4, for c2a1 an average of 76° gl with a dilution of 1/2,5, for c2a2 an average of 81° gl with a dilution of 1/2.7, and for c2a3 an average of 70° gl with a dilution of 1/2.3.

Keywords: CCN-51, mucilage, cacao, ethanol, fractionated distillation, *Saccharomyces*.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente uno de los mercados con mayor crecimiento es el del cacao, con esto aumentan los campos de sembrío, con lo cual los desechos propios de la poscosecha, fermentación y tostado, se vuelven un problema o fuente de contaminación en el ambiente, como es el caso de la fermentación del cacao, el desecho principal es el mucilago de cacao, por la falta de utilización, el cual tiene un contenido de azúcar superior a los grados 13 brix°.

La poscosecha del cacao tiene un drenaje de mucilago, previo a la fermentación en cajones dependiendo del tipo cacao, dura de 2 a 4 horas , en la cual se retira de la masa a fermentar hasta un 40% del mucilago total del cacao, esto viene a ser un 10% de la masa total a fermentar(granos y mucilago), este mucilago que se pierde, dependiendo a donde es que se encause ese flujo se tendrá diferentes problemas, si llega al suelo , creara proliferación de insectos cerca del establecimiento de benefició del cacao, si cae en fuentes de agua creara aguas dulces, que genera competencia por el oxígeno aumentando el DBQO del agua, actualmente algunos centros de beneficio, tienen posas donde este mucilago fermenta , y luego se forma en ácido acético, que se utiliza como herbicida orgánico, esta iniciativa aunque buena , no se abasteca para solucionar el problema del mucilago.

.

Es por tal motivo que el presente trabajo de investigación tiene importancia para dar un uso a este mucilago, que ayudaría con la contaminación ambiental y a la vez generar ingresos.

De acuerdo al problema presentado, se generó la siguiente pregunta ¿se podrá producir etanol, utilizando cepas conocidas de *Saccharomyces Cerevisiae*, y cuantificarlo después de una destilación fraccionada?

De acuerdo al contenido de azúcares del mucilago y la utilización de cepas de *Saccharomyces Cerevisiae* permitirá obtener un rendimiento elevado en la producción de etanol.

Ante esto se generó los siguientes objetivos evaluar durante el proceso fermentativo el comportamiento de las cepas genéricas en función de los azúcares reductores desdoblados, acidez y pH.

Con los siguientes objetivos específicos

- Determinar el rendimiento de la producción de etanol a partir del mucílago del cacao inoculado con dos cepas genéricas.

- Caracterizar del etanol destilado a través de su densidad.

.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) (2007) evaluó, debido a la carencia de sistemas de enfriamientos en la mayoría de las destilerías cubanas y las elevadas temperaturas impuestas por su clima tropical, aumento el interés por la utilización de cepas de naturaleza termófila, de mayor viabilidad bajo estas condiciones. Se aisló, a partir de un cultivo de cachaza a 50 °C, una cepa de levadura termófila identificada como *Saccharomyces cerevisiae* la cual fue nombrada XI. Se realizaron corridas, a escala de banco, para la producción de etanol a partir de miel clarificada con la cepa aislada. Se obtuvieron valores de 5.4 y 5.0 % de etanol, rendimientos del 43.5 y 42 % y eficiencia de 67.4 y 65.0 %, a 37 y 40 °C respectivamente. Estos resultados los compararon con los reportados por sus destilerías. Es importante en la cepa es el carácter killer, factor que puede ser de interés en la fermentación alcohólica ya que impediría el desarrollo de microorganismos no deseados en dicho proceso.

Revista Enología N°6 Año IV Enero-Febrero (2008), presento un trabajo de investigación probando cepas aisladas y seleccionadas tanto en mostos tintos como en mostos blancos, para determinar su comportamiento y características enológicas comparándolas con levaduras comerciales. La degustación de los vinos obtenidos en estas vinificaciones se efectuó con

jueces entrenados. Se realizan pruebas de ordenamiento y descripción de los perfiles sensoriales de los vinos elaborados. Los resultados sensoriales de los vinos obtenidos en los diferentes ensayos confirman que las cepas aisladas de las distintas regiones de la provincia de Mendoza otorgan buenas características diferenciales respecto de las cepas genéricas comerciales.

Según el CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA MÉXICO (2011) reportó un estudio en el Mezcal que es una bebida alcohólica obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves, previamente hidrolizadas o cocidas, y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras. Zacatecas, que tienen una antigua tradición mezcalera que data del siglo XVI y que actualmente para su elaboración, emplean levaduras comerciales que generan además de etanol, otros compuestos en cantidad considerable como el metanol y los alcoholes superiores que resultan tóxicos y alteran las características y la calidad del producto. Se aislaron y caracterizaron levaduras nativas; además de evaluar la producción de Mezcal en base a los parámetros fisicoquímicos contenidos en la NOM-070-SCFI-1994, comparando con levaduras comerciales; analizando así la calidad del producto. Por los resultados se obtuvo que las cepas de levadura nativa son una opción para la industria mezcalera de Zacatecas; ya que los análisis muestran que las cantidades de los subproductos están dentro del rango permitido por la Norma Oficial Mexicana 070, evitando que se modifique

el proceso original de la destilación ordinaria; así como la del rectificado para la producción del Mezcal.

GUTIÉRREZ DE PIÑERES et al (2005), analizaron el lactosuero que es la parte acuosa que resulta al separar la cuajada cuando se elabora el queso, constituye del 80 al 90% del volumen total de la producción de leche y es considerado un problema para la industria quesera por su alto poder contaminante, contiene el 50% de los nutrientes originales de la leche, entre ellos la lactosa. En esta investigación se propuso el aprovechamiento del lactosuero como sustrato para desarrollar fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. Se estudió la capacidad fermentativa de la levadura en bloques experimentales de lactosuero en un rotavapor al 5% como control, 10%, 15% y una adicional al 5% de lactosa con la agregación de 10% de sacarosa. Se determinó concentración celular, grados brix y producción de etanol para establecer la efectividad del sustrato y el microorganismo. Se encontró que la concentración donde hubo un mayor desarrollo de la levadura fue la del 5% más la adición de sacarosa. También se observó que mientras la velocidad de crecimiento disminuyó, el sustrato fue consumido de manera constante y el porcentaje de alcohol fue más alto. Se evidencio que a mayor concentración inicial del lactosuero mayor será el consumo de lactosa. Para cada bloque experimental se utilizó la misma cantidad de inculo, pasadas 72 horas comenzó a descender el crecimiento celular probablemente debido a que la levadura no posee la capacidad de tolerar altas concentraciones de alcohol.

2.2. Definición de Términos Básicos

2.2.1. Generalidades del mucilago

2.2.1.1 Definición

El mucílago es una sustancia viscosa, generalmente hialina, que contiene el cacao envolviendo los granos. Es un producto orgánico de origen vegetal, de peso molecular elevado, superior a 200.000 g/gmol, cuya estructura molecular completa es desconocida. Están conformados por polisacáridos celulósicos que contienen el mismo número de azúcares que las gomas y pectinas. Los mucílagos se suelen confundir con las gomas y pectinas, diferenciándose de estas sólo en las propiedades físicas. Mientras que las gomas y pectinas se hinchan en el agua para dar dispersiones coloidales gruesas y las pectinas se gelifican; los mucílagos producen coloides muy poco viscosos, que presentan actividad óptica y pueden ser hidrolizados y fermentados. Pérez (2004).

2.2.1.2 Composición

Se determinó la composición del mucilago del cacao, obteniéndose un contenido elevado de azucares superiores a los 10 % p/p como se muestra en la tabla 1.

Cuadro 1. Componentes químicos del mucílago de cacao (%p/p).

COMPONENTE	% p/p (Base húmeda)
Agua	79.2 – 84.2
Proteína	0.09 – 0.11
Azúcares	12.50 – 15.9
Glucosa	11.6 – 15.32
Pectinas	0.9 – 1.19
Ácido Cítrico	0.77 – 1.52
Cenizas	0.40 – 0.50

Fuente: Lozano, R.A. y Dittmar, H.F.

2.2.2 Generalidades de las levaduras

2.2.2.1. Definición

Las levaduras son organismos vivos unicelulares que pertenecen al reino de los hongos. Se alimentan de los azúcares provenientes del mosto, transformándolos en alcohol y CO₂ (gas) durante un proceso llamado fermentación que se realiza en ausencia de oxígeno, según J. S. Hough (2002).

La mayoría de las levaduras son mesófilas, con una temperatura máxima de crecimiento entre 24 y 48°C. Pocas (2%) son psicrófilas con una temperatura máxima de crecimiento por debajo de 24°C, pero dentro de este grupo el mayor número de las levaduras que tienen la temperatura óptima de crecimiento por debajo de 20°C. No hay levaduras que puedan crecer a 50°C y solamente unas

pocas pueden desarrollar cerca de 0°C, entre las que se encuentran *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii* y *Pichia membranaefaciens*. Por otra parte, *Kluyveromyces marxianus* crece a 48°C, mientras que otras de los molinos azucareros son capaces de proliferar por sobre los 40°C, entre ellas *Pichia polymorpha*, *Geotrichum capitatum*, *Saccharomyces cerevisiae* y especies de *Candida* y *Debaryomyces*. En general, la presencia de etanol o bicarbonato aumenta la temperatura mínima de crecimiento (DÉAK&BEUCHAT 1996).

En el paso de mosto a vino o licor de fruta, los microorganismos responsables son las levaduras, la variedad de géneros y especies de las mismas es verdaderamente extensa, así como sus propiedades, pero entre todas ellas, se destaca el género *Saccharomyces*, especialmente la especie *cerevisiae* y *ellipsoideus*, las levaduras son microorganismos unicelulares eucariotas, situándose en la escala evolutiva entre los mohos y las bacterias (COLLADO, 2001).

2.2.2.2. Clasificación de los Hongos

Recientemente, una clasificación filogenética integral de los Hongos tiene ha propuesto (Hibbett et al., 2007). El *Ascomycota* y *Basidiomycota* son clasificados en un subreino, dikarya (Fig. 1). El *Chytridiomycota* tradicional y *Zygomycota* son polifilético (Lutzoni et al, 2004; James, 2006) y su clasificación ha sufrido cambios importantes (Hibbett et al. ,2007) como se muestra en la figura 1.

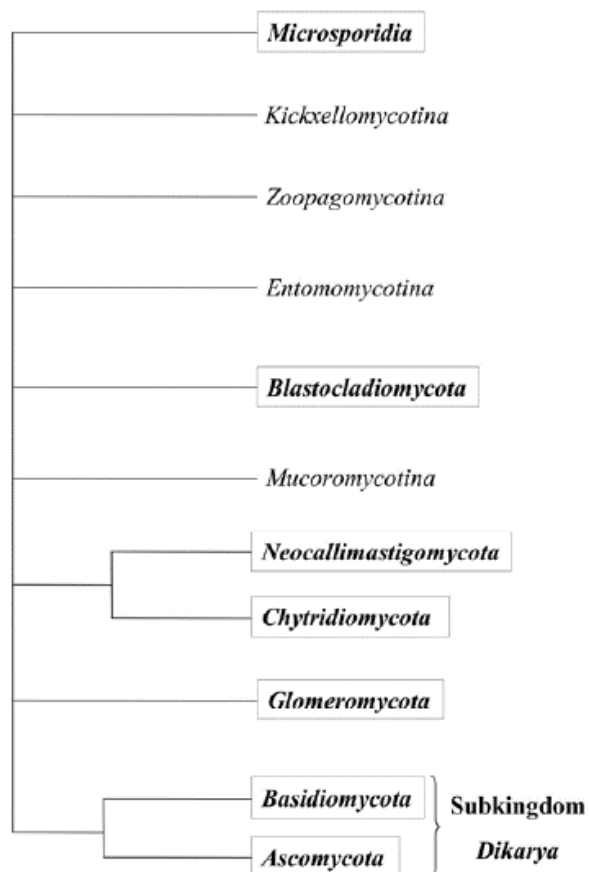


Figura 1. Phylogenetic classification of the Kingdom *Fungi* (Hibbett *et al.*, 2007).

2.2.2.3. Características morfológicas y fisiológicas de la especie *Saccharomyces Cerevisiae*.

En la tabla 2 se describe la morfología de las *Saccharomyces Cerevisiae* y sus características fisiológicas.

Cuadro 2. Características morfológicas y fisiológicas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

Características morfológicas y fisiológicas	
Crecimiento a 37°C	+
Seudohifas verdaderas	-*
Clamidiosporas	-
Tubos germinales	-
Cápsulas	-
Asimilaciones	
Glucosa	+
Maltosa	+
Sacarosa	+
Lactosa	-
Galactosa	+
Melibiosa	-
Celobiosa	-
Xilosa	-
Rafinosa	+
Trehalosa	+*
Fermentaciones	
Glucosa	F
Maltosa	F
Sacarosa	F
Lactosa	-
Galactosa	F

FUENTE: Zinsser *: Variación de cepa +: Crecimiento o presencia de estructura.

2.2.2.4. Levaduras importantes en la fermentación

- Sacaromicetos

Saccharomyces ellipsoideus. Es una de las levaduras más activas en la vinificación. Fermenta glucosa, sacarosa y maltosa

Saccharomyces apiculatus. Tiene mucha importancia en la fermentación del vino y de la sidra. Sólo fermenta la glucosa. Deja de reproducirse cuando la concentración alcohólica de un líquido alcanza un 3-4 %. En el caso de los vinos, cuando se llega a esa concentración empieza a actuar la *S. ellipsoideus*.

Saccharomyces cerevisiae. Se desarrolla en el mosto de la cerveza

Saccharomyces carlsbergensis. Se desarrolla en el mosto de la cerveza. Fermenta glucosa, maltosa y sacarosa

Saccharomyces pastorianus. Hay 3 variedades, una de ellas produce vinos seos de sabor áspero. Las otras actúan sobre la cerveza produciendo líquidos turbios y de sabor amargo

Willia anómala. Se aisló en una levadura de cerveza. Forma velo gris en la superficie de los líquidos y produce olor a esencias y frutas. Fermenta la glucosa, pero no descompone la maltosa y sacarosa

- **No sacaromicetos**

Torula: Forma velo en los líquidos fermentados comunicando sabores amargos y desagradables.

Mycoderma vini y *M. cerevisiae*. Producen también velo en la superficie de los líquidos. El primero es aerobio, transformando el alcohol en CO₂ y agua (flores del vino)

La preparación de las levaduras especiales es uno de los problemas de la industria de fermentación, ya que ciertas levaduras debidamente elegidas son las que comunican el sabor especial a las diferentes bebidas.

Dado que la mayoría de las levaduras sólo actúan sobre la glucosa mientras que, muy pocas lo hacen sobre la maltosa y la dextrina, en la obtención de alcohol a escala industrial hay que recurrir a hongos ricos en amilasas que hidrolizan el almidón y la dextrina. Algunos de estos hongos prosiguen la transformación descomponiendo los azúcares obtenidos en alcohol, como el *Aspergillus oryzae* que produce el sake CARRETERO (2008).

2.2.2.5. Factores que influyen en la actividad de las levaduras

Según EMPRESA TETRA PAK DEL GRUPO TETRA LAVAL (1995)

- **Oxígeno**

La levadura requiere para su reproducción oxígeno, pero la producción de alcohol por ella se da en ausencia de éste. Es conveniente oxigenar, inicialmente, el mosto virgen (sin fermentar) para promover el crecimiento de las levaduras y tener una masa celular adecuada que lleve a

cabo la fermentación alcohólica, la cual se realiza en ausencia de oxígeno, obteniéndose así el mosto fermentado.

- **Temperatura**

El desarrollo de la fermentación es muy dificultoso por debajo de los 13°C o 14 °C, ya que los microorganismos se inhiben a dichas temperaturas. La actividad de la levadura empieza a los 20 °C y, conforme aumente la temperatura hasta 35 °C, la fermentación se hace más rápida. Pero, por encima de estos 35 °C, la fermentación se hace más lenta y puede detenerse, debido a que muchos microorganismos empezarán a morir por efecto térmico. Una buena temperatura de fermentación debe estar comprendida entre 25 y 33 C°. Las consecuencias de realizar fermentaciones a altas temperaturas son:

Trasformación incompleta de los azúcares, obteniéndose por consiguiente un alcohol con menor grado alcohólico y con azúcares residuales.

Muerte de las levaduras y la generación de un medio propicio para el desarrollo de microorganismos contaminantes como bacterias acéticas o lácticas.

- **Acidez y pH**

La fermentación se desarrolla correctamente a un pH comprendido entre 4,5 y 5,0 que es óptimo para las levaduras y perjudicial para otros microorganismos.

La acidez real elevada no es favorable al desarrollo y a la actividad de las levaduras. Por debajo de valores de pH de 2,5 ó 2,6, la fermentación es difícil, usualmente se detiene, aunque no obstante, estas condiciones son difíciles de

encontrar en los mostos tratados. El ácido que tiene una acción negativa sobre la actividad fermentativa de la levadura es el ácido acético, pudiendo paralizar la actividad de la misma cuando existe un grado de acidificación (acetificación) mayor a 1 g / L.

- **Alcohol**

A partir de los 14 °GL, el alcohol tiene una acción tóxica sobre las levaduras. La mayoría de las levaduras alcoholeras no resisten más de 12 °GL, pero no es el caso de la levadura utilizada en el presente trabajo, la cual ha llegado a alcanzar valores hasta los 12°GL.

- **Azúcar**

El azúcar a concentraciones elevadas (mayores a 30 °Brix; 30 %), también tiene un efecto nocivo (inhibidor) sobre las levaduras, causando la deshidratación de la célula ya que el agua sale del medio intracelular (vacuola) por ósmosis y el protoplasma se retrae, produciéndose finalmente un espacio o separación entre la membrana plasmática y la pared celular (efecto plasmólisis).

- **Nutrientes**

Una dosis de 10 a 20 g / HL de fosfato de amonio, acelera el desarrollo de la levadura y por ende la fermentación alcohólica. Además, evita la formación excesiva de alcoholes superiores.

2.2.3 Fermentación.

2.2.3.1. Definición

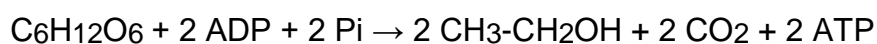
La fermentación es una de las diversas rutas catabólicas mediante las cuales muchos organismos obtienen energía química de varios combustibles orgánicos en ausencia de oxígeno molecular o, de una manera más general, cualquier compuesto inorgánico oxidado. (ANAVARRA, 2007, Epifanio Fernández 2005). Las levaduras pueden obtener la energía que les es necesaria para vivir, siguiendo dos vías en la transformación de los azúcares del mosto, respiración y la fermentación. (REGODON 2007).

La respiración es la vía oxidativa de los combustibles orgánicos por el oxígeno molecular; el oxígeno actúa, por tanto, como el aceptor electrónico final en la respiración.

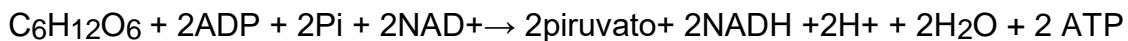


En la Fermentación ocurre una degradación incompleta de los azúcares hasta CO_2 y etanol. Los electrones pasan desde un intermediario orgánico producido en la degradación del azúcar, el dador electrónico, hasta otro intermediario orgánico, que actúa como aceptor electrónico (ANAVARRA, 2007).

Este proceso libera muy poca energía; por ello, las levaduras al utilizar esta vía deben transformar mucho azúcar en alcohol para cubrir sus necesidades energéticas (REGODON 2007).



Independientemente de la vía utilizada, la principal ruta bioquímica en la degradación de los azúcares es la glucólisis, a través de la cual la glucosa se transforma en ácido pirúvico, (REGODON 2007).



2.2.3.2. Fermentación alcohólica

En la fermentación alcohólica se pueden distinguir dos etapas. En una primera etapa las levaduras degradan algunas moléculas de azúcar por vía respiratoria: el metabolismo sigue la ruta de la glicólisis, pasando el ácido pirúvico formado al ciclo de Krebs con una elevada producción de energía, que permite una rápida multiplicación de las levaduras alcanzando una gran biomasa. Esta etapa se mantiene hasta agotar el oxígeno disuelto en el mosto. Una vez agotado el oxígeno, las levaduras comienzan a seguir la vía fermentativa. En la ruta fermentativa, el ácido pirúvico formado en la glicólisis se descarboxila a acetaldehído y éste a su vez, se reduce posteriormente, a etanol. Pero no todas las moléculas de azúcares del mosto van a seguir la ruta de la glucólisis hasta la obtención de etanol y anhídrido carbónico, sino que dependiendo del propio metabolismo de las levaduras, una parte de los azúcares son degradados mediante la fermentación gliceropirúvica, en la que además de glicerina se forma ácido pirúvico: este compuesto será el origen de los diferentes productos secundarios de la fermentación alcohólica tales como: ácido succínico, ácido acético, ácido láctico, los metabolitos del ciclodiacetilo - acetoínico, etc, como se muestra en el figura 2 (REGODON 2007).

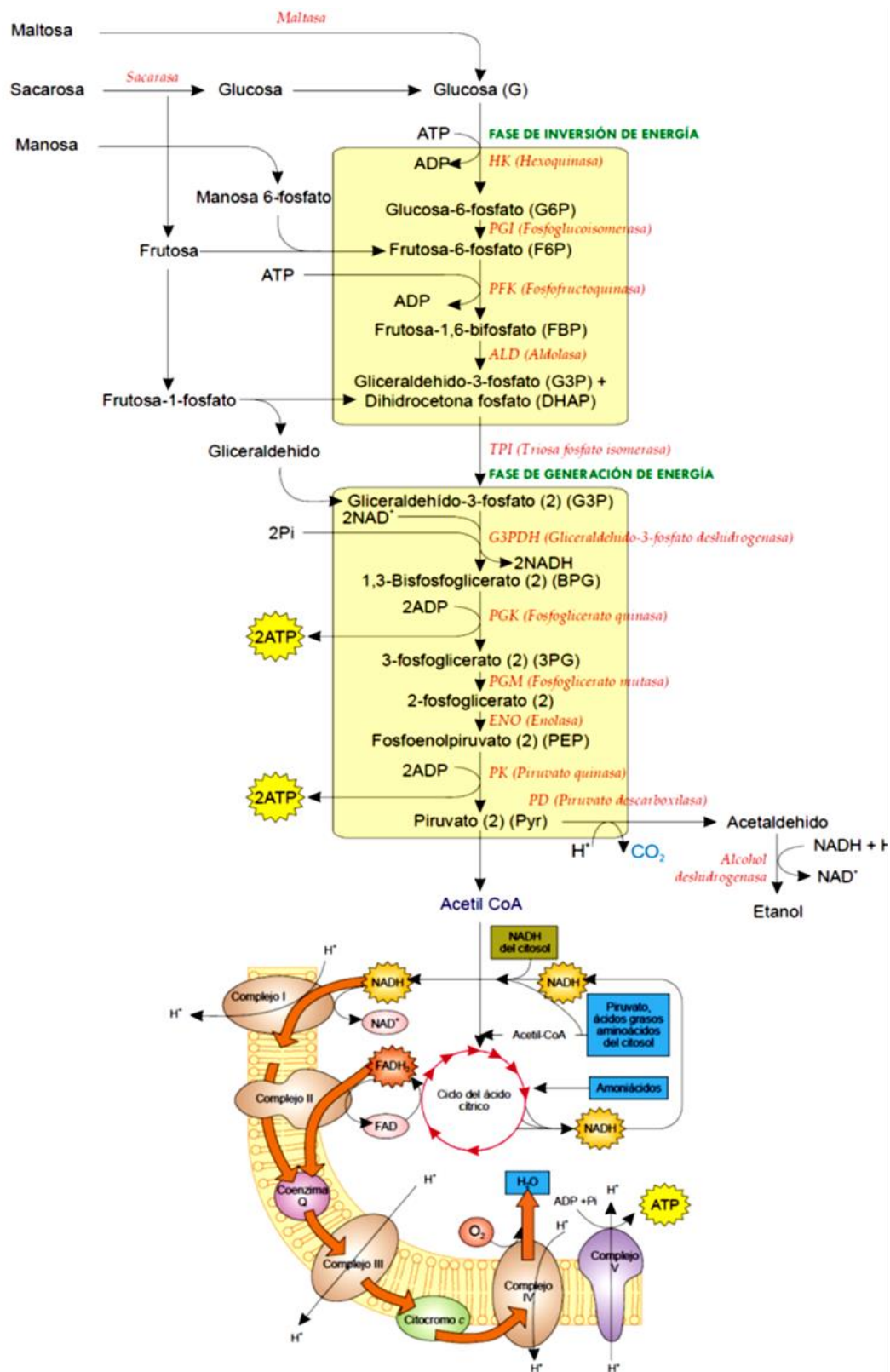


Figura 2. Glucólisis, fermentación alcohólica y respiración (ANAVARRA 2007, Mathew 2004).

2.2.3.3. Proceso fermentativo en la producción de vinos

La producción de vinos, se define como una fermentación etanólica del mosto de uvas sin adición de otras sustancias (Instituto Nacional de Viticultura 2006). Este proceso inicia con la obtención del mosto a través del prensado de la uva y la posterior inoculación del mosto con levaduras, que a través del proceso fermentativo genera vinos con concentraciones de etanol de 8 hasta 15 % en volumen.

2.2.3.3.1 Levaduras en la fermentación

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es la especie de mayor uso en la industria vinícola. Se describe normalmente como un anaerobio facultativo, de modo que crece tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, es capaz de emplear un amplio rango de sustratos entre mono-, di-, y oligo-sacáridos, así como etanol, acetato, glicerol y hasta lactatos; siendo la glucosa su fuente de carbón preferida, la cual metaboliza a etanol mediante la ruta EMP y el metabolismo anaeróbico del piruvato (DICKINSON 2003). Cuando se emplean fuentes de carbono diferentes a la glucosa, se requiere una gluconeogénesis, donde se generan carbohidratos de almacenamiento de tipo hexosas, para el mantenimiento dentro de la vía metabólica de la hexosa monofosfato, en la cual se llega a la síntesis de la ribosa necesaria en los procesos anabólicos y la posterior generación de R5P que conduce a la ruta PP (DICKINSON 2003). Esto reduce notoriamente el rendimiento del proceso, que en condiciones normales de consumo de glucosa se estima entre el 85% y 90% de la conversión de sustrato.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* presenta un requerimiento energético en condiciones anaerobias de 1 gramo de sustrato - hora por 0,036 gramo de célula y de 0,022 gramo de célula en condiciones aeróbicas. En función de la cepa empleada se tiene un contenido residual de azúcar de 10-56 g/L, lo que influencia el tiempo de fermentación, el cual va de 119 a 170 horas (SABLA Y ROLLES 2009), de manera que las condiciones de proceso deben ajustarse adecuadamente para obtener los mejores rendimientos de producción.

- **Velocidad de crecimiento**

La velocidad de crecimiento de las levaduras depende directamente de la concentración del sustrato. Este comportamiento se describe generalmente mediante la ecuación de Monod. Este modelo sugiere que el desarrollo de las levaduras depende de una máxima velocidad de crecimiento y una concentración de saturación, el cual es válido para un amplio rango de organismos y nutrientes, donde todos cuentan con un límite superior de concentración sobre el cual se genera una disminución de la velocidad de crecimiento, lo que se conoce como inhibición (BOULTON 1996).

El modelo de Monod describe una curva de crecimiento, en la cual se presenta una primera etapa de adaptación al medio, 'fase lag', que depende tanto del número de células, como del sistema metabólico. Cuando esta fase se prolonga la presencia de tóxicos o una pobre o inadecuada inoculación puede ser la razón.

Luego se presenta un crecimiento exponencial que ocurre a una máxima velocidad, la duración de esta fase depende de la concentración inicial del

sustrato limitante; así como de la habilidad del microorganismo para adaptarse a la disminución de la concentración de sustrato (RIBÉREAU 2006). En el punto, en el que se presenta limitación de sustrato, la velocidad específica de crecimiento se comporta en función de la siguiente expresión de la ecuación 1.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}$$

Ecuación 1. Cinética de Monod

Luego de la fase exponencial, donde se tiene el máximo valor de biomasa, se da una fase estacionaria durante la cual algunas células se dividen mientras otras mueren, para finalmente llegar a la fase de muerte. En general todo el comportamiento podrá definirse en función de la velocidad específica de crecimiento μ y la velocidad de lisis o metabolismo endógeno en función a la siguiente expresión de la ecuación 2. (Nielsen 2003; Ribéreau 2006).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \alpha X; \quad \mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad y \quad \frac{d\alpha}{dt} = -K\alpha = \alpha k_0 e^{-E\alpha R/T}$$

Ecuación 2. Cinética de crecimiento de las levaduras

Sin embargo factores como la temperatura, el pH y la concentración de nutrientes influyen directamente en el desarrollo de las levaduras y su efecto no siempre puede reflejarse dentro de una expresión meramente matemática ya que afecta el comportamiento general del sistema celular, alterando a su vez las características no solo fisicoquímicas sino sensoriales del producto final.

- **Influencia del pH**

El funcionamiento celular se mantiene por el constante bombeo de protones de la célula; el gradiente de concentración de iones hidrógeno junto con el potencial eléctrico de la membrana de la célula, que determinan la fuerza motora de protones, se ve influenciado por las variaciones de pH, afectándose su composición y su naturaleza tras la disociación de ácidos y bases, afectando también productos finales del metabolismo anaeróbico (SABLAYROLLES 2009). La presencia de ácidos orgánicos, incrementan el flujo de protones de los ácidos disociados, esto implica modificaciones del comportamiento general, caso de la disminución del rendimiento de glucosa por las altas concentraciones de ácidos (RIBÉREAU 2006).

Existe una dependencia de la velocidad de crecimiento con el pH, dado que el funcionamiento de los diferentes componentes intracelulares y extracelulares se ven influenciados por los valores de pH. En función de esto se ha demostrado que las bacterias, por ejemplo desarrollan un trabajo óptimo en un rango de pH de 6.5-7.5 mientras que las levaduras prefieren un ambiente ligeramente más ácido entre 4.0 y 5.0 (MATO 2005) (LAMIKARRA 1997).

- **Influencia de la temperatura**

La mayor parte de los microorganismos de uso industrial son mesófilos, los cuales alcanzan un máximo de resistencia en los 47 °C. Cuando se supera este límite se genera una rápida caída de la velocidad de crecimiento; así que el óptimo de uso para estos microorganismos está entre

30-45 C°, rango en el cual la velocidad de crecimiento se mantiene prácticamente constante (RIBÉREAU 2006).

Esta dependencia de la temperatura con la velocidad específica de crecimiento puede ser expresada mediante la 'ley de Arrhenius', que se incluye en el parámetro de velocidad de muerte celular.

Por encima de la máxima temperatura, la velocidad global disminuye como resultado del incremento de la velocidad de muerte, relacionada directamente con la energía de activación, donde valores superiores a 90 Kcal/mol prevén que esta velocidad de muerte se incrementará más rápidamente que la de crecimiento (COLOMBIÉ 2007).

La temperatura es una de las variables más importantes en el proceso de producción de vinos, la cual se maneja en un rango de 15°C para vinos blancos y 30°C en el vino tinto, sin embargo no es un valor que permanezca constante durante todo el proceso, dado que el calor debido a la reacción, establecido en 23,5 Kcal/ mol azúcar, genera una modificación continua de la temperatura sobre el proceso. Por lo tanto representa un parámetro a ser controlado a lo largo del proceso; que se relaciona directamente con el las características del producto final.

En vinos blancos, el control de la temperatura tiene un efecto directo sobre las características aromáticas, donde se beneficia el adecuado desarrollo de compuesto volátiles como esteres, acetatos, y ácidos grasos de cadena media, que promueven el perfil aromático del vino, caso del incremento en la producción de tioles en los mostos de 'Sauvignon' cuando se pasa de trabajar de 30 a 13°C (HOWELL 2004).

Esta influencia de la temperatura no es tan marcada en el caso del vino tinto, sin embargo existe cierta relación con la extracción de los compuestos fenólicos de la fase sólida a la líquida, así como el nivel de alcohol final alcanzado. No obstante es claro que el manejo de bajas temperaturas de proceso, pueden generar una ralentización de la reacción y su posible detenimiento; por lo cual debe hacerse un control global del proceso para obtener los mejores resultados. El uso de fosfatos suele emplearse en estos casos para evitar detenimientos indeseados de la reacción y a su vez contribuir con los nutrientes necesarios para el metabolismo celular (PEREZ 1999; COZZOLINO 2004).

2.2.3.3.2 Nutrientes

La adición de nutrientes busca básicamente proveer de un ambiente propicio a la levadura para que se obtengan los mejores rendimientos en la fermentación. La asimilación de nitrógeno y la demanda de oxígeno son factores importantes que influyen no solo el rendimiento del proceso sino la expresión de las características sensoriales.

En función de los nutrientes incluidos o ausentes del medio de fermentación se hacen aportes importantes en la protección de las células a factores de estrés, lo que influye directamente en la tasa de crecimiento, la degradación de sustrato y los cambios sobre el producto final (SABLAYROLLES 1996).

- **Nitrógeno**

La mayoría de los aminoácidos sirve como fuente de nitrógeno, aunque no todos se asimilen igual. Generalmente se adicionan sales de amonio y mezclas de aminoácidos; donde la glicina es el más efectivo y la metionina la menos efectiva (BELY 1990).

El proceso de asimilación del nitrógeno inicia en la conversión del amoníaco a glutamato, por la deshidrogenasa presente. Seguido de esto, parte del glutamato es convertido en glutamina, que representa una fuente importante de nitrógeno celular (COOPER 1982).

No siempre el nitrógeno asimilable incrementa el crecimiento celular, porque puede ser acumulado intracelularmente en las vacuolas celulares, como reserva en la fase estacionaria donde sería empleado en la síntesis de proteínas (HENSCHKE 1993). Esto puede reprimir el consumo de aminoácidos, con lo que se ve reducido la eficiencia de la fermentación. Por lo tanto el nitrógeno es considerado como un elemento limitante de la reacción.

No obstante una excesiva adición de nitrógeno modifica las características del producto final, generalmente por la elevada producción de alcoholes superiores, ácido acético, etil-carbamato, y etil acetato, y por la posible generación de sulfuro de hidrogeno. Por otro lado, cuando el contenido de nitrógeno asimilable es bajo se incrementa la producción de sustancias indeseables de compuestos sulfurados, como el ácido sulfhídrico y alcoholes pesados. Esto disminuye la producción de esteres y ácidos grasos volátiles de cadena larga, lo que desencadena finalmente una fermentación malo-láctica. Esto afecta adicionalmente la habilidad de multiplicación de las células durante

la fase de crecimiento y controla además la transición a la fase estacionaria (TAILLANDIER 2007).

El contenido de nitrógeno óptimo en la levadura *Saccharomyces*, por ejemplo, se considera el rango óptimo de 0,62 – 0,91 mg/g, en función de la cantidad de azúcar presente en el medio. Para mostos con concentraciones elevadas de azúcar la concentración óptima de nitrógeno está en un rango de 190 a 290 mg/l. No obstante cabe recalcar que la tasa de consumo de azúcares depende más de la cepa empleada que del contenido de nitrógeno adicionado (MANGINOT 1998; TAILLANDIER 2007).

Otro factor a considerar en la adición de nitrógeno son los tiempos de adición ya que si se consideran desde la inoculación, el nutriente es metabolizado y usado para el crecimiento mismo de las levaduras, mientras que si es empleado al comienzo de la fase estacionaria, será usado como reactivador de las levaduras existentes (CRAMER 2002), puesto que la presencia de amonio se asocia a la activación de la fosfo-fructoquinasa, enzima primordial en el inicio de la glucólisis (MANGINOT 1998).

- **Oxígeno**

Pese a que la producción de etanol se desarrolla dentro del proceso anaeróbico, la presencia de oxígeno permite el mantenimiento de la viabilidad celular al final de la fermentación. La adición de oxígeno busca mejorar la síntesis de biomasa, de modo que se incremente la tasa de fermentación, ya que es un factor importante en la síntesis de los lípidos

constituyentes de la membrana celular y que influyen la velocidad general de la reacción (SABLAYROLLES 1996; ROSENFELD 2003).

La célula emplea este oxígeno más allá de la respiración mitocondrial; de allí que tecnológicamente se adicione durante la fase estacionaria, en busca de incrementar la tasa de fermentación sin afectar la población celular. No obstante un sobre-flujo de oxígeno puede desencadenar la generación de especies reactivas de oxígeno - ROS, que generarían la aparición de peróxido de hidrogeno H_2O_2 afectando por completo la calidad final del producto (MÁTELES 1971; SALMON 1998).

Se emplea en promedio una concentración de 5 a 10 mg/L, hacia el final de la fase de crecimiento, donde resulta ser de mayor aprovechamiento para las levaduras (SABLAYROLLES 1996). Puesto que una temprana adición puede afectar las concentraciones de alcoholes y ésteres, donde adicionalmente el desarrollo de procesos oxidativos puede afectar negativamente el producto, por descenso en el rendimiento y deterioro del aroma.

De este modo, controlando la dosis y adición en la final de la fase de crecimiento de las levaduras, es posible combinar los efectos del nitrógeno y oxígeno para mejorar el rendimiento y velocidad de la reacción.

- **Vitaminas**

En cuanto a las vitaminas, suelen emplearse mezclas que incluyen biotina, tiamina, inositol y ácido pantoténico, esenciales para el desarrollo metabólico de la célula. Se ha encontrado que cuando se tienen bajos niveles de tiamina, y elevadas concentraciones de nitrógeno se genera un detenimiento de la fermentación (SABLAYROLLES 2009). Del mismo modo

la ausencia de procesos de la vía metabólica de la tiamina se asocian al incremento de sulfuro de hidrogeno dentro de la fermentación (BARTRA 2010).

2.2.3.3.3 Fermentaciones secundarias y subproductos

Los metabolitos secundarios influyen directamente en las propiedades organolépticas del producto final. Y dado que presentan umbrales de percepción diferentes, su concentración influye en la percepción. Así por ejemplo, un compuesto con un umbral de percepción bajo puede influir significativamente en el desarrollo final del aroma, incluso si está presente en concentraciones pequeñas.

Los alcoholes superiores, representan los componentes de influencia más abundantes en las características organolépticas, ya que sus umbrales de percepción son diez veces más altos que los de los ésteres y mil veces mayores que los diacetilos (Vanaclocha 1998). Algunos de estos compuestos son: 1-propanol, alcohol isobutírico, 1-butanol, ácido isobutírico, ácido isovalérico, isobutirato de etilo, butirato de etilo entre otros (Mateo 1991). Dentro de los compuestos volátiles se encuentran el acetaldehído, metanol, 1-propanol, acetato de etilo, isobutanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, entre otros (PEREZ 1999).

La mayoría de los alcoholes superiores provienen del metabolismo de los aminoácidos, en los vinos se encuentran el 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, isobutanol, feniletanol y n-propanol. Las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la fermentación, el aumento de la temperatura de la fermentación y la oxigenación del mosto aumentan la síntesis de estos compuestos. Las cepas

de levaduras utilizadas en la fermentación también influyen en la producción de estos compuestos (HERNÁNDEZ-ORTE 2005; GARDE-CERDÁN 2008).

Por otro lado, se sabe que entre los procesos bioquímicos naturales se encuentra el ciclo de Krebs, vía mediante la cual se degradan los azúcares en la fermentación alcohólica; así como también funciona el ciclo del ácido glioxílico, ciclos cuyos metabolitos son ácidos orgánicos (Ward 1989). Adicionalmente las levaduras pueden excretar ácidos cetónicos originados en la deaminación de los aminoácidos, luego que estos se han decarboxilado en aldehídos y reducidos en alcohol, mecanismo denominado 'reacción Ehrlich' (RIBÉREAU 2006).

En cuanto a la síntesis de ácidos grasos, como se mencionó anteriormente, se presenta una relación con el metabolismo de carbohidratos desde la glucosa y Acetil-CoA, como principal precursor. Indirectamente la adición de nitrógeno afecta la composición del medio de adaptación de la membrana de las levaduras. Estos ácidos contribuyen a diferenciar entre el flavour "fresco" o desagradable, si se tienen en exceso, modificándose así la percepción de otras sensaciones en el producto final (GALLART 1997).

- **Fermentación maloláctica**

Denominada también fermentación lenta. Es una de las principales reacciones secundarias que se generan en la fermentación etanólica. El ácido málico presente, se convierte en ácido láctico por acción de bacterias lácticas. El láctico resulta ser un ácido más débil que el málico; por lo

que su presencia incrementa el pH, por disminución de la acidez titulable y consecuentemente suaviza el sabor del vino (MAICAS 2001; LIU 2002).

Las bacterias encuentran en el bajo pH de los mostos y del vino un medio adecuado para su crecimiento, aunque por las propiedades reductoras del mismo, las bacterias acéticas son destruidas; mientras que las bacterias lácticas pueden metabolizar los ácidos málico y tartárico, así como el cítrico.

En función de la concentración de ácidos del vino puede o no ser beneficioso que sean reducidos por acción bacteriana, por ejemplo, para vinos de elevado pH para evitar su deterioro, la disminución de este resulta adecuada, por ejemplo en pH 3,3 -3,4 los *Leuconostococcus* fermentan el málico, mientras que los *Pediococcus* no, pero estos son acompañados por la formación de diacetilo e histamina, productos indeseables en consideraciones organolépticas (Liu 2002), de modo que son factores que deben controlarse cuidadosamente.

Así mismo, mostos con pH inferiores a 3,2 pueden resultar no tan favorables para este tipo de fermentación, puesto que eso se relaciona con la presencia de bacterias ácido lácticas, que junto con la presencia de azúcares residuales, glicerol o el mismo láctico pueden formar ácido acético; y un elevado contenido de acidez inicial genera una baja velocidad de fermentación que detendría la producción, reduciendo los rendimientos del proceso y la calidad sensorial del vino final (DEL CAMPO 2008).

2.2.3.3.4 Inconvenientes en la fermentación

Variaciones en las condiciones de trabajo determinan no sólo la efectividad del proceso sino la calidad del producto final. Drásticas modificaciones en la temperatura de proceso varía el desarrollo de la termotolerancia de las células, esto, modifica la síntesis de la mayoría de las proteínas celulares y el sistema de acumulación de trehalosa (WHIEMKEN 1990), componente que influencia la detención transitoria en la fase G1 del ciclo celular (DICKINSON 2003; FOLCH-MALLOL. J. 2004), que afecta directamente la velocidad de crecimiento celular y con esto los rendimientos y la productividad del proceso en general.

Otro factor de estrés resulta ser la concentración de azúcares en el medio; así, si las células se desplazan a un medio de mayor presión osmótica pierden el agua del citoplasma de forma casi instantánea. Esto conduce a una reducción del volumen celular en función de la osmolaridad del medio. Una reducción al 35 por ciento del volumen de células de partida puede esperarse al exponer las células a una solución al 5 OSM NaCl, por menos de 0,5 minutos (Morris 1983). Esto es parcialmente compensado por la transferencia de agua de la vacuola, pero todo el proceso lleva a una disminución o abolición de la presión de turgencia de la membrana de la pared celular. El daño celular que se produce después del estrés osmótico no se ha documentado con claridad, aunque hay indicios de que los componentes de la membrana plasmática pueden generar un desmontaje del citoesqueleto de actina (HOHMANN 1997), imposibilitándose el restablecimiento de las funciones celulares.

Por otro lado, en condiciones de alta salinidad solutos como la trehalosa pueden ser importantes, debido a una superposición entre los efectos fisiológicos del estrés salino y otras condiciones perjudiciales, como el shock de calor, el estrés oxidativo, y la habilidad de la trehalosa para proteger estructuras celulares como las membranas (ERASMUS 2003; FOLCH-MALLOL. J. 2004; BARTRA 2010).

Finalmente la concentración de alcohol también afecta el funcionamiento celular, pues la composición lípidica de la membrana celular de la levadura, se relaciona directamente con la tolerancia al etanol, ya que a medida que se incrementa su concentración, se modifica esta composición, variando su polaridad, de modo que la hidratación de la superficie de los grupos hidrófilos de la superficie de las membranas, afecta la función de transporte de nutrientes y productos, de la membrana. Por lo tanto para una concentración por encima de 15 g/l, incrementaría la permeabilidad de la membrana de manera tal que generaría la muerte celular (MORRIS 1983; BOUDAREL 1984; ANSLOW & STADFORD 1996).

2.2.4 Destilación

2.2.4.1. Definición de destilación

Los aparatos de destilación y rectificación sirven para separar mezclas de líquidos en sus partes integrantes o para descomponerlas en mezclas de líquidos de composición diferente a la inicial.

Con el nombre de destilación se entiende, en general el desprendimiento de vapor de un líquido y la condensación de líquido (licuefacción) a partir de este vapor. El vapor condensado tiene una composición diferente a la del líquido

inicial. También puede descomponerse este en varias mezclas de distintas composiciones, que se llaman fracciones, por el procedimiento designado como destilación fraccionada.

La destilación fue durante muchos siglos el único procedimiento físico para variar la concentración de mezclas de líquidos puros, o para aislar determinados líquidos (por Ej., los aceites esenciales). Solo más tarde, a causa de las exigencias prácticas de un mayor enriquecimiento de la mezcla inicial en uno de sus componentes (p. Ej., el alcohol en la mezcla alcohol-agua), se ideó un nuevo método que hizo posible la separación en una sola operación de una mezcla líquida en sus componentes puros (p. Ej., la mezcla benceno tolueno-xileno.). Este procedimiento se designó con el nombre de rectificación. En ella se ponen en contacto en contracorriente el líquido y el vapor. El esclarecimiento de los procesos físicos que intervienen en la rectificación ha ido pareja al desarrollo de los aparatos químicos necesarios para su realización, y va unida también al desarrollo de los conocimientos científicos, que recientemente han recibido un impulso considerable ESPINAL (2009).

El término destilación se emplea algunas veces para designar aquellos procesos en los que se vaporiza uno de los constituyentes de una solución. Por ejemplo, la destilación del agua. No obstante, en general esta denominación sólo se aplica correctamente a aquellas operaciones en las que la vaporización de una mezcla produce una fase vapor que contiene uno de los constituyentes en mayor cantidad y se desea recuperar uno o más de estos constituyente en estado casi puro. Así, la separación de una mezcla de alcohol y agua en sus componentes, es una destilación, mientras que la separación de una salmuera

en sal y agua es una evaporación, aun en aquellos casos en que el producto sea únicamente el agua condensada y no la sal.

La exigencia básica para la separación de los componentes de una mezcla por destilación es que la composición del vapor sea diferente a la composición del líquido con el cual se encuentra en equilibrio. Si la composición del vapor es la misma que la del líquido, el proceso de destilación no podrá efectuar la separación. Teóricamente, la destilación nunca producirá la separación de un componente puro, aunque prácticamente el producto pueda obtenerse con un grado de pureza garantizado económicamente ESPINAL (2009).

Puesto que para la realización práctica de la rectificación han de producirse vapores y condensarse líquidos, dentro del aparato de rectificación podemos distinguir el dispositivo de rectificación propiamente dicho en el que tiene lugar el contacto de las fases en contracorriente, y los intercambiadores de calor anexos para la evaporación, la condensación y el enfriamiento. La estrecha unión de la destilación con la rectificación hace que resulte adecuada la denominación común de aparatos de destilación y rectificación con la que se designan los dispositivos empleados para la realización de ambos procesos ESPINAL (2009).

2.2.4.2. Tipos de Destilación.

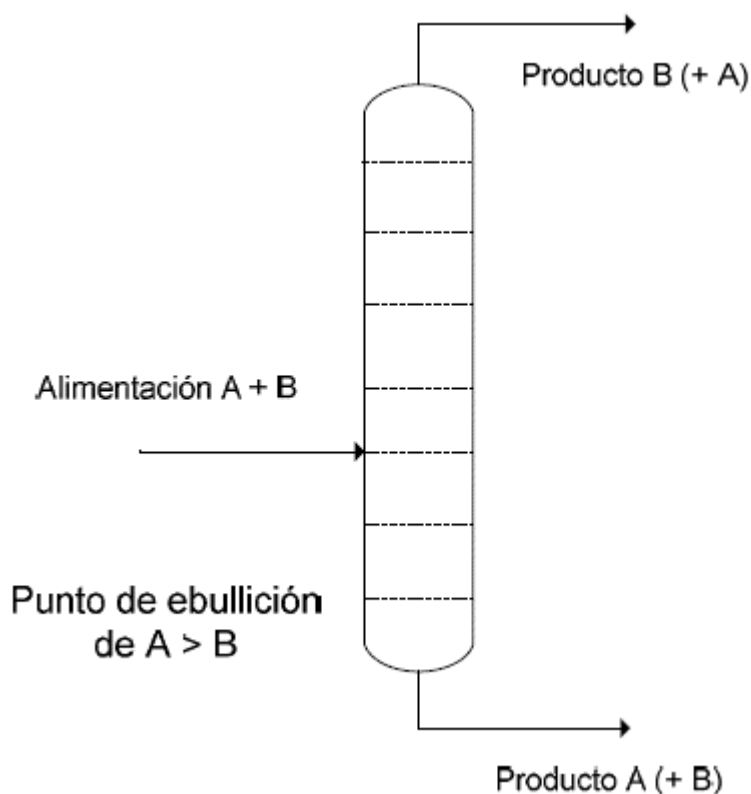
Dentro de las múltiples configuraciones existentes de destilación, en las empresas se hace uso de las tres siguientes: Destilación simple, o destilación binaria; destilación fraccionada, o destilación de múltiples componentes; y destilación extractiva, o destilación con uso de disolvente.

2.2.4.2.1. Destilación simple

En este tipo de destilación, una mezcla de dos componentes de diferentes puntos de ebullición se introduce en la columna destiladora, estableciéndose estados de equilibrio en cada una de las etapas o platos ubicados dentro de la misma. Al haber una caída de presión entre las etapas, se observará un perfil de temperaturas y presiones a lo largo de la columna, siendo la presión y la temperatura mayores en la base y decreciendo progresivamente conforme se asciende en la misma TREYBAL (1992).

Debido al perfil de presiones y temperaturas antes mencionado, se establece una diferencia entre el tope de la columna y la base, en las cuales se irá acumulando el componente de menor temperatura de ebullición (TE) y el de mayor TE respectivamente. Esto, como se explicó anteriormente, se debe a la diferencia de volatilidades relativas entre los dos componentes, lo cual viene directamente relacionado con los puntos de ebullición. En la Figura 3 se muestra un esquema general del proceso TREYBAL (1992).

Figura 3. Esquema de una destilación simple (mezcla binaria)



2.2.4.2.2. Destilación Fraccionada

En la mayoría de los casos que se observan en la industria, se presenta la necesidad de separar una serie de compuestos de una mezcla homogénea. En estos casos es insuficiente la separación en componentes más y menos volátiles, sino que se desea obtener en lo posible compuestos puros o grupos de compuestos similares ("fracciones") (TREYBAL 1992).

Estos grupos o fracciones de compuestos se caracterizan por tener puntos de ebullición de valor cercano, como por ejemplo el metanol (metil-alcohol) y el etanol (etil-alcohol) o el isobutanol (2- butano alcohol) y el alcohol isoamílico (3- metil-1-butano alcohol). Por lo cual, en una columna de destilación que posea salidas varias salidas laterales, el primer par tenderá a concentrarse en la

salida que proporcione las características de temperatura y presión propicias para su condensación, y el segundo par hará lo propio en su determinada etapa de extracción propicia TREYBAL (1992). En conclusión la extracción de los compuestos, o fracciones de compuestos, dependerá del orden de puntos de ebullición que tengan entre sí; mientras mayor sea la TE del compuesto, se obtendrá el mismo en una vía de extracción más baja, comenzando con el compuesto o fracción de compuestos de menor TE obteniéndose por la salida de tope, hasta llegar al de mayor TE, obteniéndose por la salida de base. En la Figura 4. se muestra lo mencionado TREYBAL (1992).

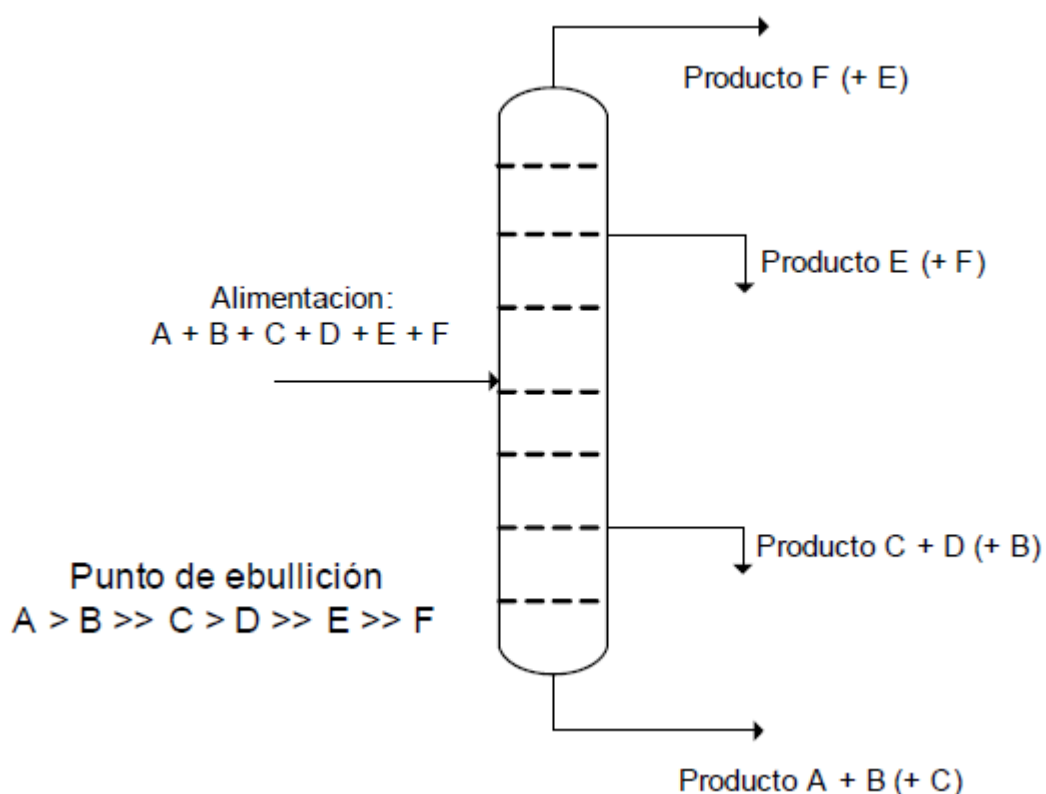


Figura 4. Esquema general de una destilación fraccionada de una mezcla de compuestos Miscibles de diferentes puntos de ebullición

2.2.4.2.3. Destilación Extractiva de Etanol

La destilación extractiva es una de las principales técnicas utilizadas para separar mezclas binarias azeotrópicas. En esta operación se adiciona un tercer componente también conocido como agente de separación o solvente, el cual se caracteriza por ser no-volátil, miscible, de alto punto de ebullición y no forma azeótropos adicionales. El solvente afecta el coeficiente de actividad en fase líquida de los componentes, de tal forma que la mezcla puede ser eficientemente separada en los productos puros (GRASSI EN LUYBEN 1992).

Una de las principales aplicaciones de la destilación extractiva está en la separación de la mezcla azeotrópica etanol-agua. Esta separación presenta un gran interés industrial, debido a la potencial fuente de energía renovable del etanol, siendo usado como aditivo o sustituto completo de la gasolina o como materia prima para el alcohol-químico (RAVAGNANI 2010).

En la columna extractiva se adiciona el solvente en una etapa cercana a la cima de la columna y se obtiene normalmente como producto de cima el componente con mayor volatilidad con una elevada pureza, para este caso el etanol, y como producto de fondos se obtiene el componente menos volátil junto con el solvente; esta corriente se alimenta a otra columna conocida como columna recuperadora en donde el segundo componente se obtiene en la cima y el solvente en el fondo el cual se vuelve a realimentar a la primera columna.

Entre los solventes estudiados para dicha separación se encuentran el etilenglicol (GIL Y UYAZAN 2003), glicerina (GIL 2006), tetraetilenglicol (RAVAGNANI ET AL., 2010) y CaCl_2 disuelta (AGUILAR 2003); la mayoría de

estos estudios se enfocan en la factibilidad de la operación en estado estacionario y en análisis de sensibilidad de las principales variables que afectan el proceso.

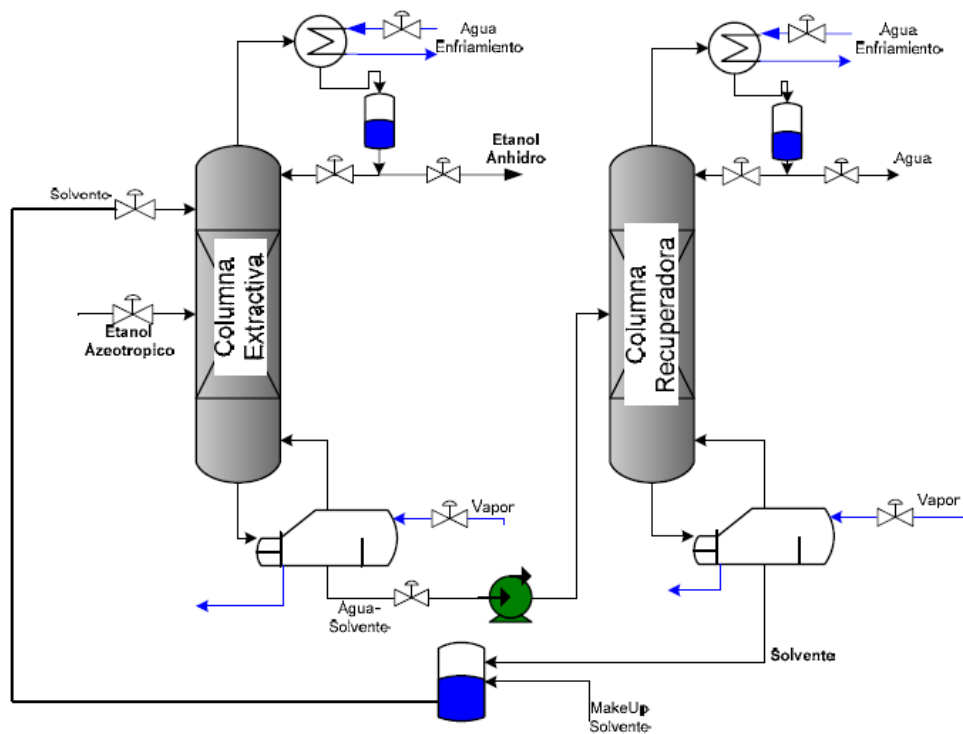


Figura 5. Esquema de la destilación extractiva de etanol azeotrópico con algún solvente homogéneo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), que se encuentra en Huánuco Provincia de Leoncio Prado en la ciudad de Tingo María a una altura de 600 msnm, específicamente en los laboratorios de Bioquímica, Análisis de Alimentos, Control de Calidad y Planta Piloto, perteneciente a la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Materiales de laboratorio

- Matraces de erlenmeyer de 500 y 250 ml.
- Vasos de precipitación de 50, 100 y 250 ml.
- Pipetas graduadas de 2, 5 y 10 ml.
- Tubos de ensayo de 10 ml.
- Asa de siembra
- Gradillas.
- Balón con cuello de cisne.

3.2.2. Equipos de laboratorio.

- Balanzas analíticas modelos Scout Pro SP2001 (OHAUS) capacidad de 200g y modelo Adventurer Pro AV114 (OHAUS) capacidad 110g.
- Equipo de titulación.
- Estufa.
- Destilador

- Potenciómetro.
- Refractómetro.
- Alcohólímetro.

3.2.3. Reactivos y soluciones

- Alcohol al 96 %
- Buffer pH 4, 6, 8
- Hidróxido de sodio, 0,1 N.
- Fenolftaleína.
- Bisulfito de sodio.
- Ácido 3,5 dinitrosalicino
- Tartrato de sodio y potasio.

3.2.4. Metodología

- Obtención de mucilago de cacao

Para la obtención del mucilago se drenó los granos inmediatamente después de la quiebra de mazorca, teniendo en cuenta el tipo de cacao en este caso CCN 51, para evitar la fermentación y contaminación con especies microbiológicas no deseadas, se utilizó metabisulfito de potasio (VERAPINTO 2009), con este antimicrobiano se trasladó el mucilago a la cámara de congelación para su posterior uso.

3.2.5. Estandarización del Mosto.

- Acondicionamiento del mosto.

Se separó 0.5 litros de mucilago de cacao, para cada tratamiento, se sometió a una pasteurización, después de descongelado se hizo micro fermentaciones con el mucilago.

- Estandarización de pH.

Se niveló cada tratamiento a un pH de 3, 3,5 y 4 para cada una de las cepas, el pH para ver cual favorece más la fermentación del mucilago. (VERAPINTO 2009).

- Inoculación de cepas genéricas.

Se inoculara cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, a niveles de 0,2 gramos de levadura por cada litro de mosto total a fermentar. (VERAPINTO 2009)

3.2.2.1. Fermentación

- Lectura de pH.

El pH fue determinado usando el potenciómetro marca ESTECH adecuadamente calibrado, se registró el valor del pH para cada muestra.

- Lectura de azúcares totales por reacción del DNS

Se agito y se realizó la lectura a 540 nm en espectrofotómetro.

- Acidez

El porcentaje de acidez se expresa en % de ácido cítrico.

3.2.2.2. Destilación

Se repetirán los pasos anteriores para las demás muestras a destilar, tomando nuevamente 150 mL de muestra, logrando así las tres repeticiones por cada tratamiento.

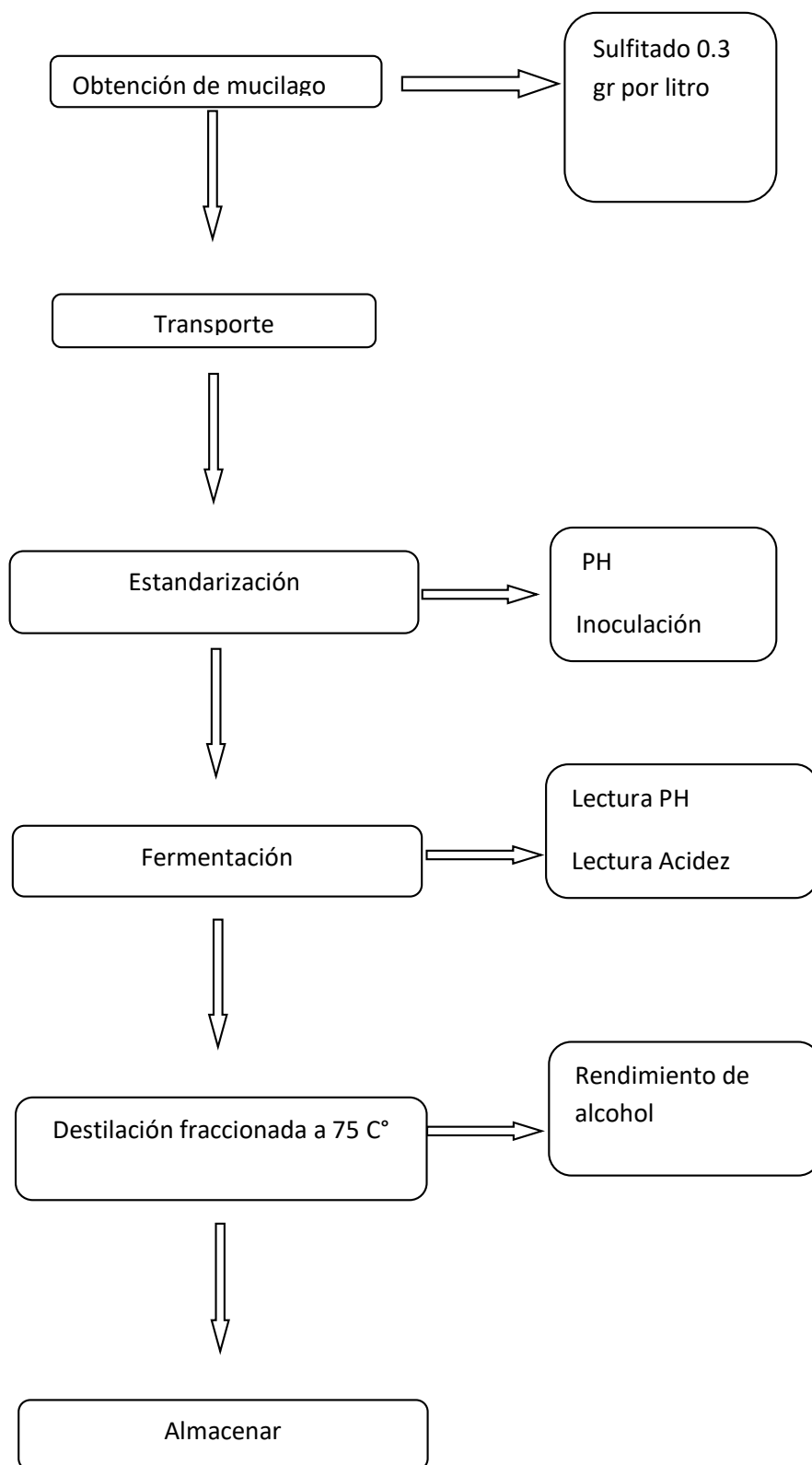


Figura 6. Flujograma de obtención de mucilago y destilación fraccionada de etanol.

3.3. Diseño experimental

Se utilizó el diseño completo al azar (DCA) con tres repeticiones aplicando el ANOVA, para los niveles de significancia estadística, con la prueba de Tukey con una significancia de 0.05.

Donde:

Cepas = Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

C1= levadura de pan.

C2= levadura de cerveza.

A: Potencial de hidrogeno

A1: 3 pH; A2: 3,5 pH; A3: 4 pH

PA = Porcentaje de alcohol en Grados gay Lussac.

R1, R2, R3 = Repeticiones

$$N T = 2 \times 3 \times 3 = 18 \text{tratamientos}$$

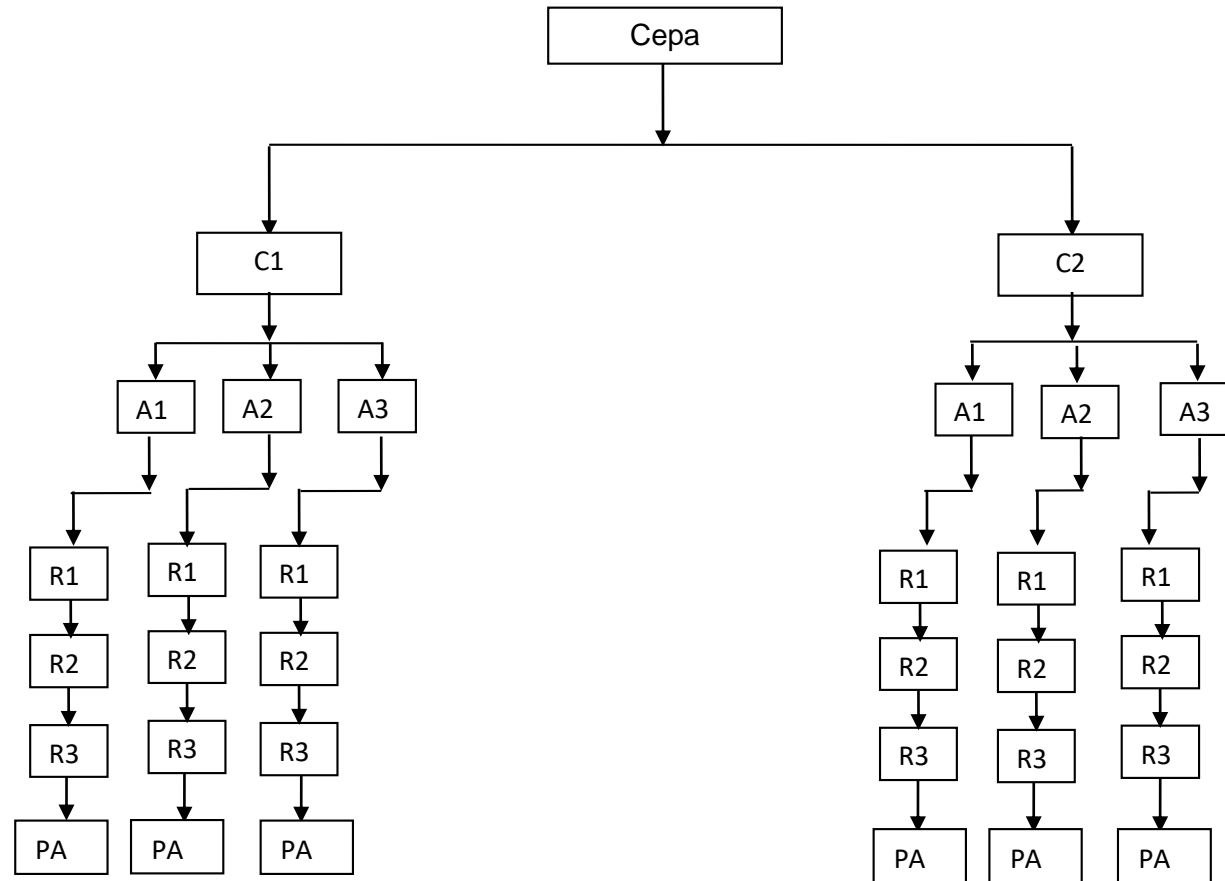


Figura 7. Diseño Experimental.

IV. RESULTADOS

4.1. Medición de Azúcares Reductores durante el Proceso Fermentativo del mucilago de cacao.

En el cuadro 1 y 2 y las figuras 8 y 9, se reporta el comportamiento del azúcar durante la fermentación del mucilago, durante los días, con sus repeticiones con un número de 27 datos para cada tratamiento.

Cuadro 3. Valores generales de la lectura de Azúcares Reductores por el método de DNS.

Lectura Azúcar Días y Repeticiones	Tratamiento C1A1(g/L)	Tratamiento C1A2(g/L)	Tratamiento C1A3(g/L)
1a	4.2	4.2	4.2
1b	4.5	4.5	4.2
1c	4.4	4.4	4.2
2a	7.4	11.9	7.1
2b	5.3	7.5	8.3
2c	6.3	9.7	7.7
3 ^a	6.4	6.3	4.3
3b	3.5	5.8	5.3
3c	5.0	6.0	4.8
4 ^a	4.7	6.1	6.0
4b	10.1	5.3	5.8
4c	7.4	5.7	5.9
5 ^a	4.6	3.9	4.6
5b	3.8	2.9	4.6
5c	4.2	3.4	4.6
6 ^a	4.7	4.2	6.0
6b	3.9	5.8	4.5
6c	4.3	5.0	5.3
7 ^a	5.4	4.7	5.0
7b	3.9	5.8	5.5
7c	4.6	5.2	5.3

Fuente: Elaboración propia (a, b y c son repeticiones)

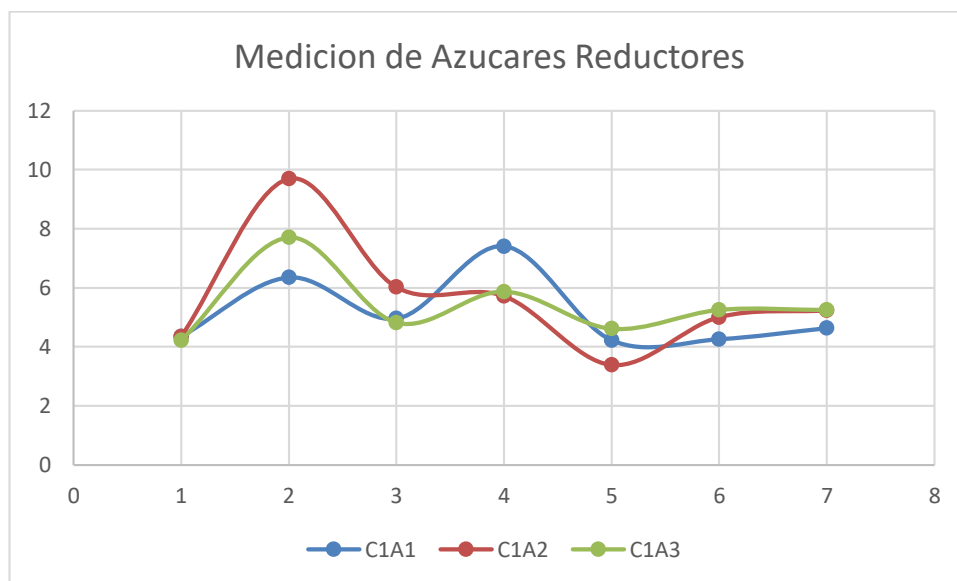


Figura 8. Grafico del comportamiento de los azucres reductores durante los 7 días de fermentación.

Cuadro 4. Valores generales de la lectura de Azúcares Reductores por el método de DNS.

Lectura Azúcar Días y Repeticiones	Tratamiento C2A1(gr/L)	Tratamiento C2A2(gr/L)	Tratamiento C2A3(gr/L)
1 ^a	4.5	4.5	3.3
1b	3.3	3.3	3.3
1c	3.9	3.9	3.3
2 ^a	4.6	9.2	4.3
2b	3.2	3.6	5.5
2c	3.9	6.4	4.9
3 ^a	7.2	7.4	6.3
3b	6.0	5.8	6.4
3c	6.6	6.6	6.4
4 ^a	5.5	5.2	3.4
4b	5.6	4.2	4.5
4c	5.5	4.7	4.0
5 ^a	10.2	3.8	3.3
5b	4.0	3.0	3.6
5c	7.1	3.4	3.5
6 ^a	3.5	4.0	3.0
6b	3.4	3.0	3.2
6c	3.4	3.5	3.1
7 ^a	3.5	4.0	3.0
7b	3.4	3.0	3.2
7c	3.4	3.5	3.1

Fuente: Elaboración propia (a, b y c son repeticiones)

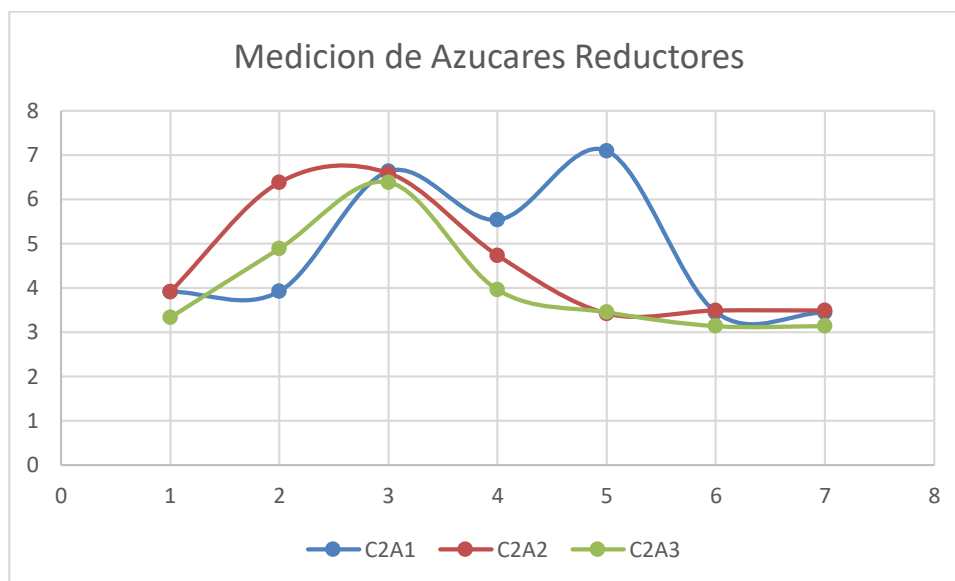


Figura 9. Grafico del comportamiento de los azúcares reductores durante los 7 días de fermentación.

En el Cuadro 5, se reporta el análisis de varianza donde se observa que para el efecto de la fermentación de los azúcares por las levaduras el valor-P es 0.0018; este valor-P es menor a 0.05, entonces con 95 % de confianza, se estableció que, estadísticamente existe diferencias altamente significativas en la reducción de los azúcares de cada tratamiento, es decir, entre las cepas utilizadas y los pH, establecidos en cada tratamiento existen valores muy diferentes en el proceso fermentativo.

En el Cuadro 3, también se observa que para el uso de los azúcares durante los días de fermentación el valor-P es 0.0000; este valor-P también es menor a 0.05, entonces con 95 % de confianza, también se estableció que, estadísticamente existe diferencias altamente significativas entre los tratamientos, es decir con las cepas y el pH estudiados se obtienen tres valores muy diferentes de eficiencia del proceso.

Cuadro 5. Análisis de variancia estadístico del proceso fermentativo en función del consumo de Azucares reductores.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón- F	Valor- P
Efectos Principales					
A:Tratamientos	35.5043	5	7.10087	4.10	0.0018
B:Tiempo	110.037	6	18.3395	10.60	0.0000
RESIDUOS	197.201	114	1.72984		
TOTAL (corregido)	342.743	125			

Fuente: Elaboración propia utilizando el software STATGRAPICS 17.0

4.2. Medición de Acidez durante el Proceso Fermentativo del mucilago de cacao.

En el cuadro 6 y 7 y las figuras 10 y 11, se reporta el comportamiento de la acidez durante la fermentación del mucilago, durante los días, con sus repeticiones con un número de 27 datos para cada tratamiento, la lectura esta expresada en miligramos por litro, en base al ácido cítrico predominante en el mucilago.

Cuadro 6. Valores generales de la lectura de la Acidez por Titulación.

Lectura Acidez Días y Repeticiones	Tratamiento C1A1(ml/l)	Tratamiento C1A2(ml/l)	Tratamiento C1A3(ml/l)
1 ^a	0.011264	0.009216	0.007936
1b	0.012544	0.008448	0.006656
1c	0.011904	0.008832	0.007296
2 ^a	0.01152	0.01024	0.008448
2b	0.011136	0.008064	0.008064
2c	0.011328	0.009152	0.008256
3 ^a	0.011776	0.009728	0.008704
3b	0.009984	0.008576	0.007936
3c	0.01088	0.009152	0.00832
4 ^a	0.01088	0.009856	0.008448
4b	0.011264	0.010624	0.008192
4c	0.011072	0.01024	0.00832
5 ^a	0.011264	0.01024	0.00832
5b	0.012672	0.01024	0.008192
5c	0.011968	0.01024	0.008256
6 ^a	0.010624	0.010752	0.008448
6b	0.012288	0.009984	0.007936
6c	0.011456	0.010368	0.008192
7 ^a	0.011008	0.010496	0.009088
7b	0.01216	0.009728	0.008576
7c	0.011584	0.010112	0.008832

Fuente: Elaboración propia (a, b y c son repeticiones)

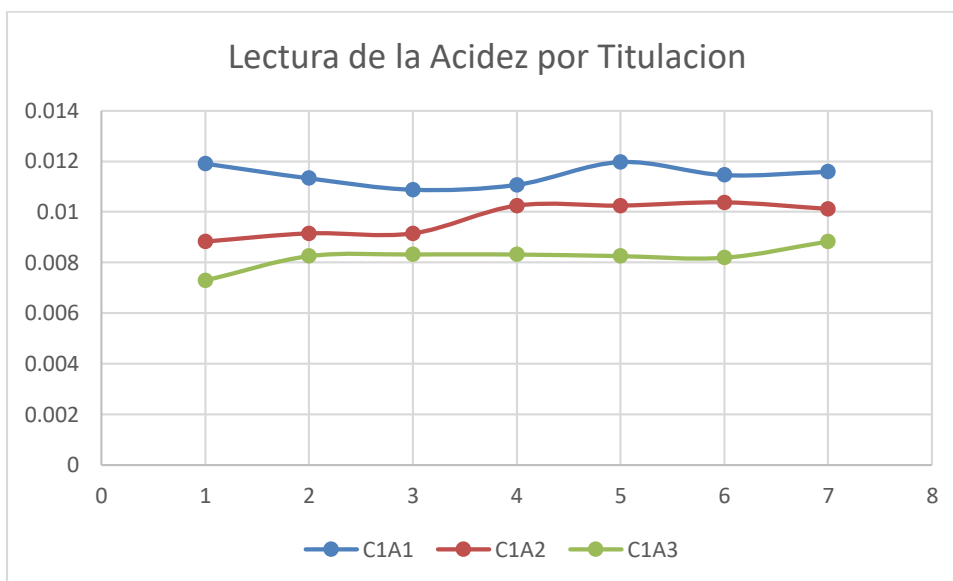


Figura 10. Grafico del comportamiento de acidez durante los 7 días de fermentación.

Figura 11. Valores generales de la lectura de la Acidez por Titulación.

Lectura Acidez Días y Repeticiones	Tratamiento C2A1(ml/l)	Tratamiento C2A2(ml/l)	Tratamiento C2A3(ml/l)
1	0.01152	0.009984	0.009472
1	0.01331	0.011008	0.009856
1	0.01242	0.010496	0.009664
2	0.013824	0.009728	0.0096
2	0.0128	0.01088	0.009728
2	0.013312	0.010304	0.009664
3	0.01472	0.009728	0.0096
3	0.014848	0.011648	0.009984
3	0.014784	0.010688	0.009792
4	0.013696	0.011136	0.010112
4	0.014976	0.011648	0.009984
4	0.014336	0.011392	0.010048
5	0.013824	0.01024	0.009344
5	0.014208	0.011904	0.009856
5	0.014016	0.011072	0.0096
6	0.012416	0.009984	0.009216
6	0.013952	0.012032	0.0096
6	0.013184	0.011008	0.009408
7	0.012416	0.009984	0.009216
7	0.013824	0.011776	0.009472
7	0.01312	0.01088	0.009344

Fuente: Elaboración propia

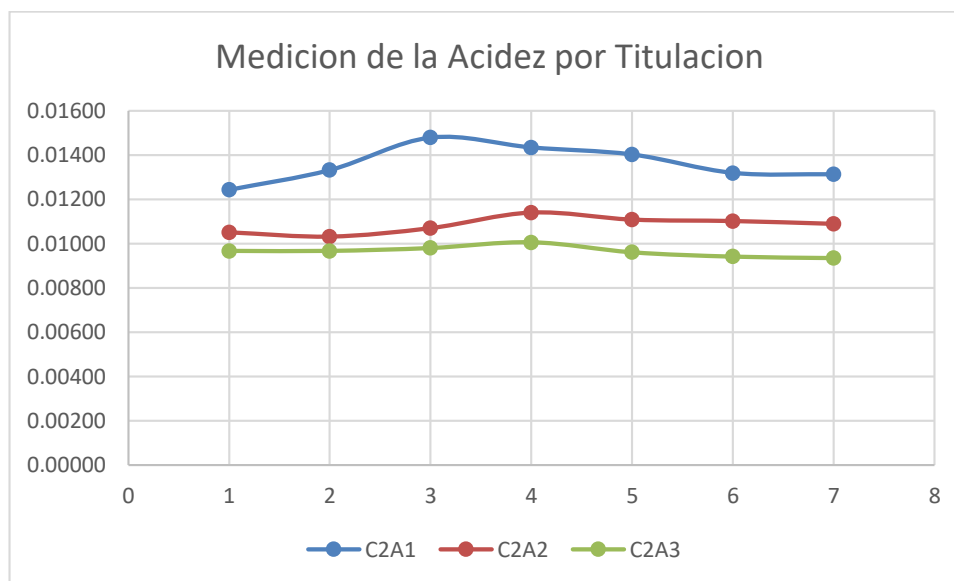


Figura 12. Grafico del comportamiento de acidez durante los 7 días de fermentación.

En el Cuadro 6, se reporta el análisis de varianza donde se observa que para el efecto de la acidez de acuerdo al pH y las levaduras el valor-P es 0.8769; este valor-P es mayor a 0.01, entonces con 95 % de confianza, se estableció que, estadísticamente no existe diferencias significativas en la acidez del mosto, es decir, entre las cepas utilizadas y los pH, establecidos en cada tratamiento existen valores parecidos en el proceso fermentativo en cuanto a la acidez.

En el Cuadro 6, también se observa que para la variación de la acidez durante los días de fermentación el valor-P es 0.455; este valor-P también es mayor a 0.01, entonces con 95 % de confianza, también se estableció que, estadísticamente no existe diferencias significativas entre los tratamientos, es decir con las cepas y el pH estudiados se obtienen valores parecidos en cuanto a la variación de la acidez.

Cuadro 7. Análisis del proceso fermentativo en función a la Acidez Titulable.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Comp. Var.	Valor -p
Total (Corregido)	0.000414874	125			
Tratamientos	0.000359923	5	0.000071984	0.000003388	0.8769
			5	43	
Tiempo	0.0000297861	36	8.27392E-7	1.75933E-7	0.455
Error	0.0000251658	84	2.99593E-7	2.99593E-7	0.775

Fuente: Elaboración propia utilizando el software STATGRAPICS 17.0

4.3. Rendimiento de la producción de etanol a partir de mucilago de cacao.

En el cuadro 7, se reporta el rendimiento de etanol del mucilago de cacao, durante los días, con sus repeticiones con un número de 27 datos en total, la lectura esta expresada en mililitro.

Cuadro 8. Valores generales de la obtención de Etanol del Mucilago de Cacao.

Repeticiones	Volumen de mosto	Tratamiento	Fracción alcohólica (ml)	Porcentaje (%v/v)
1	338	C1A1	7.6	70
2	437	C1A1	6.9	73
3	382	C1A1	7	75
1	344	C1A2	7.5	80
2	364	C1A2	9	83
3	356	C1A2	8.4	80
1	309	C1A3	6.1	70
2	367	C1A3	9	68
3	338	C1A3	7	75
1	396	C2A1	4.2	72
2	435	C2A1	7.3	73
3	410	C2A1	5.55	78
1	398	C2A2	6.9	82
2	391	C2A2	7.9	85
3	394	C2A2	7.6	78
1	405	C2A3	5.1	70
2	427	C2A3	8.9	67
3	414	C2A3	7.5	73

Fuente: Elaboración propia

En el Cuadro 9, se reporta el análisis de varianza donde se observa que para el efecto de la producción de etanol de acuerdo al pH y las levaduras el valor-P es 0.0548; este valor-P es mayor a 0.05, entonces con 95 % de confianza, se estableció que, estadísticamente no existe diferencias significativas en la producción de etanol, es decir, entre las cepas utilizadas y los pH, establecidos en cada tratamiento existen valores parecidos en el proceso fermentativo en cuanto a la producción de etanol.

Cuadro 9. Análisis del proceso fermentativo en función a la producción de etanol.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	12.4017	5	2.48034	3.01	0.0548
Intra grupos	9.8969	12	0.824741		
Total (Corr.)	22.2986	17			

Fuente: Elaboración propia utilizando el software STATGRAPICS 17.0

4.4. Proceso Definitivo para la Obtención de Etanol por Destilación Fraccionada.

En la figura 12, se muestra el flujograma del proceso de destilación fraccionada de las muestras fermentadas, con un equipo de destilación simple.

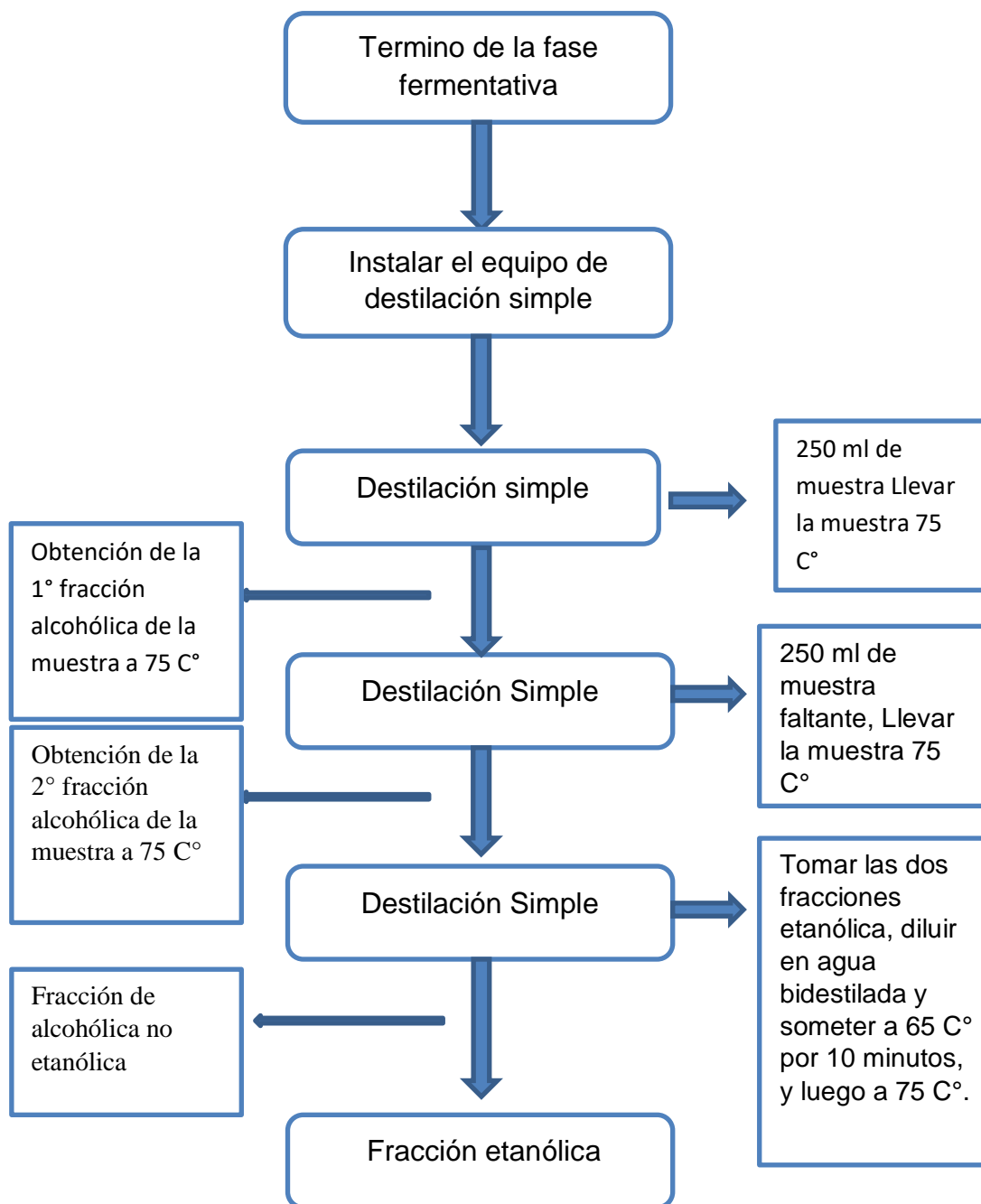


Figura 13. Flujograma del Proceso de Destilación con un Equipo de Destilación Simple.

V. DISCUCIONES.

5.1 Discusión de los Resultados de Azúcares Reductores

- De acuerdo a los cuadros 1 y 2 y las figuras 8 y 9 el azúcar aumento conforme avanzan los días, hasta llegar casi al mismo nivel de azúcares del principio, en el punto final, esto puede deberse a que el azúcar esta en parte atrapado por la pectina del mucilago que impide su lectura, las enzimas pectinolíticas de las levaduras, liberan los azúcares, aumentando la lectura a la mitad del proceso de fermentación , esto comparable con PUERTA (2010) , que reporta , las sustancias pécticas , se degradan mediante pectinasas, poligalacturonasas, pectinesterasas y pectinaliasas , que son generadas por muchas bacterias , levaduras y hongos.

- Siendo el azúcar el sustrato a consumir del mucilago de cacao, la fermentación dependerá de la capacidad de la levadura de volver disponible los azúcares retenidos por las sustancias pécticas, esto es comparable con lo expresado por Mc Kay (1990), que refiere, la capacidad de *S. cerevisiae* para degradar el ácido poligalacturónico podría tener importantes consecuencias en la fermentación de sustratos derivado de plantas.

- En la fermentación del mucilago de cacao, resulto tener un problema principal, la indisponibilidad del azúcar por ser atrapado por la pectina , para lo cual las cepas utilizadas podría ser que produjeran enzimas pectinolíticas , lo cual afectaría el tiempo de fermentación esto es referido por Van Rensburg y Pretorius (2000), donde afirman probablemente el principal problema de utilizar

enzimas pectinolíticas de levaduras en el procesado industrial, reside en los bajos rendimientos de actividad en la fermentación, por lo que una alternativa sería clonar y sobreexpresar los genes estructurales responsables de estas actividades enzimáticas.

- Como se puede notar en las figuras 8 y 9 para poner en disposición estos azúcares, debieron haber consumido los azúcares disponibles, antes de empezar a crear enzimas, la actividad de estas enzimas, dependerán de las condiciones del mosto esto se verifica según lo descrito por Blanco et al., (1999). Las pectinasas de levaduras, muestran también un pH óptimo en la región ácida, entre 3,5 y 5,5 y su temperatura óptima entre 40 y 55 C°.

- El análisis de varianza donde se observa que para el efecto de la fermentación de los azúcares por las levaduras el valor $-P$ es 0.0018; este valor $-P$ es menor a 0.05, entonces con 95% de confianza, se estableció que, estadísticamente existe diferencias altamente significativas en la reducción de los azúcares de cada tratamiento, es decir, entre las cepas utilizadas y los pH, establecidos en cada tratamiento existen valores diferentes en el proceso fermentativo. El consumo de sustrato depende de la disponibilidad de este, su concentración y de la población inicial de microorganismos, como se nota en el análisis esto se verifica con lo descrito por Gafner y Schutz (1996), que dice las cinéticas de utilización de los azúcares por *S. cerevisiae* durante las fermentaciones son llevadas a cabo mayoritariamente a través del transporte de los azúcares y, por regla general, la glucosa es consumida a mayor velocidad que la fructuosa. En las fermentaciones lentas, la velocidad máxima de fermentación se reduce cuando la mayor parte de la glucosa ha sido

consumida, y la fermentación se puede parar cuando queda una concentración significativa de fructuosa.

- El pH que influye en el comportamiento de la levadura, porque dependiendo del pH se da el intercambio iónico de la célula, y la eficiencia de las enzimas, dado que la levadura no tiene capacidad de modificar el pH de su medio, en cuanto a su crecimiento, pero también influye el tipo de cepa, y su afinidad de esta al tipo de sustrato del mosto esto se corrobora con lo que afirma Sabla Y Rolles (2009) donde dice el funcionamiento celular se mantiene por el constante bombeo de protones de la célula ; el gradiente de concentración de iones hidrogeno junto con el potencial eléctrico de la membrana de la célula , que determinan la fuerza motora de los protones , se ve influenciado por las variaciones de pH, afectándose su composición y su naturaleza tras disociación de ácidos y bases , afectando también productos finales del metabolismo anaeróbico.

- Se observa en el cuadro 3 que es estadísticamente existe diferencias altamente significativas entre los tratamientos, es decir con las cepas y los pH estudiados se obtienen tres valores muy diferentes de eficiencia de proceso .la diferencia que existe entre los resultados de azúcar respecto a las cepas y los pH, se debe a que las levaduras no producen las misma cantidad ni el mismo tipo de enzimas pectinolíticas según contreras (2003), las enzimas pectinolíticas son producidas por hongos y bacterias , para fabricar industrialmente pectinas con características especiales. Se han desarrollado enzimas que son capaces de degradar las conchas de las diferentes frutas para la separación de la pectina y también estas enzimas depende del pH para

su actividad sobre su sustrato según Gerhartz (1990), que dice las pectinesterasas de levaduras son activas a 3 y 5 de Ph, y las bacterianas a 7 y 8. Estas enzimas se inactivan por calentamiento a 80 C°.

- La diferencia que existe entre los tratamientos, se basan en los mismos parámetros, las cepas utilizadas y el pH del mosto, que se debe a su capacidad de producir enzimas y los subproductos derivados de estos , además del el pH delimita la actividad efectiva de estas según , además de la producción de metanol, que puede llegar a interferir con su metabolismo esto se verifica con lo descrito por (Calaveras , 2004; Garcia ; 2005) , que dice esta levadura crece de forma óptima a pH ácidos refiriéndose a la *S. cerevisiae*, también es descrito por Kashyap *et al* (2001), que dice las pectinesterasa también conocidas como pectina metil esterases, catalizan la desesterificación de los grupos metilo de la pectina dando lugar a ácido poligalacturónico o pectano, en lo referido al incremento del metanol Alkorta *et al* (1998) dice respecto a la pectinesterasa su actividad se puede determinar midiendo la liberación de metanol. Son sintetizadas por hongos, bacterias, levaduras y plantas superiores.

5.2 Discusión de los Resultados de Acidez

- En el cuadro 6 y las figuras 10 y 11, se observa el análisis de varianza y el comportamiento de la acidez, para el efecto de la acidez de acuerdo al pH y las levaduras el valor –P es 0.8769; este valor-P es mayor a 0.01, entonces con 95% de confianza, se estableció que, estadísticamente no existe diferencias significativas en la acidez del mosto, es decir, entre las cepas utilizadas y los pH, establecidos en cada tratamiento existen valores parecidos en el proceso fermentativo en cuanto a la acidez. De esto se puede suponer

que todos los tratamientos tuvieron una fermentación sin , contaminación por bacterias como lactobacilos y acetobacter , por lo tanto sin competencia las levaduras tuvieron todas las condiciones para desarrollarse, con la sola delimitación que les da el pH establecido en la experimentación, el que el pH del mosto se mantuviera prácticamente igual con variaciones mínimas, se puede deber al poco contenido de aminoácidos en el mucilago ambos hechos se verifican por Mato (2005) y Ríos *et al* (2005) que dicen el pH es un factor limitante en el proceso de la fermentación debido a que las levaduras se ven afectadas por el ambiente en el cual se desarrollan es decir alcalino o ácido. Las levaduras tienen un rango óptimo de pH que va desde 4 a 5 según Mato (2005). En el proceso fermentativo, el pH tiende a disminuir debido a la producción de ácidos, formados al tomar nitrógenos de los aminoácidos perdiendo su carácter anfótero. En los procesos industriales, se hace uso de soluciones tampón para mantener niveles óptimos de acidez Ríos *et al* (2005).

- En el análisis para la variación de la acidez durante los días de fermentación el valor $-P$ es 0.455; este valor $-P$ también es mayor a 0.01, entonces con 95% de confianza, también se estableció que, estadísticamente no existe diferencias significativas entre los tratamientos, es decir con las cepas y el pH estudiados se obtienen valores parecidos en cuanto a la variación de la acidez. El control de la acidez dentro de la fermentación es importante, para mantenerse al tanto del crecimiento microbiano, las levaduras no tienen mayor capacidad de modificar la acidez, el producto final de su metabolismo es el alcohol, lo cual mantiene el nivel de ácido, con variaciones mínimas, los microorganismos que mayormente modifican la acidez en los mostos, son de

lactobacilos, acetobacter y gluconobacter, estos convierten la glucosa en ácido láctico y acético, si se nota un cambio en la acidez del mosto. Se puede sospechar que estos se han contaminado con los microorganismos previamente mencionados, aunque la acidez láctica en vinos es admisible en pequeñas cantidades, la acidez dada por el ácido acético, la acidez dada por el ácido acético, no es admisible, los mostos con aumento de acidez acética, se destinan para la producción de vinagre.

Fermentación maloláctica denominada también fermentación lenta. Es una de las principales reacciones secundarias que se generan en la fermentación etanólica. El ácido málico presente, se convierte en ácido láctico por acción de bacterias lácticas. El láctico resulta ser un ácido más débil que el málico; por lo que su presencia incrementa el pH, por disminución de la acidez titulable y consecuentemente suaviza el sabor del vino (Maicas (2001); Liu (2002)).

El ácido acético aparece al comienzo de las fermentaciones alcohólicas, desapareciendo posteriormente al reducir en alcohol, dependiendo del tipo de levadura empleada y el pH del medio Zoecklein (2001).

El ácido cítrico no es un compuesto que abundan naturalmente y no se produce por el proceso principal de la fermentación. Además, se degrada con la misma facilidad que el málico para generar más acidez volátil Perez (1999); Ramirez Niño 2006).

5.3 Discusión de los Resultados de la Producción de Etanol

Como se muestran en el cuadro 8 el análisis de Varianza donde se observa que para el efecto de la producción de etanol de acuerdo al pH y las levaduras el valor $-P$ es 0.0548, este valor- P es mayor a 0.05, entonces con 95% de confianza, se estableció que estadísticamente no existe diferencias significativas en la producción de etanol, es decir, entre las cepas utilizadas y los pH, establecidos en cada tratamiento existen valores parecidos en el proceso fermentativo en cuanto a la producción de etanol. La producción de etanol depende de las condiciones extrínsecas e intrínsecas del medio en que crecen levaduras, en este caso se nota que el consumo de azúcares tiene diferencias significativas entre los tratamientos, pero no hay diferencia en la producción de etanol, esto se debe a que el alcohol, producto de la esterificación de la pectina es el alcohol metílico, los alcoholes impiden el correcto funcionamiento de la pared celular de las levaduras, cuando llega a cierta concentración, por lo tanto aunque aumente las lecturas de azúcares disponibles, estos no son utilizados del todo, además del hecho que no todas las levaduras producen la misma cantidad ni las mismas enzimas, por eso los azúcares reductores, quedan prácticamente al mismo nivel que el comienzo, la producción de etanol se ve afectada, de la misma forma para ambas cepas *S. cerevisiae* es la especie de levaduras utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial puesto que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentración de etanol, en la fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar

altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior Fajardo y Sarmiento , (2007).

Las levaduras, presentan cierta resistencia a las concentraciones de alcohol que se producen durante la fermentación, debido a que el etanol, inhibe el transporte de D-xilosa, amonio, glicina y algunos aminoácidos, así como afecta la función y estabilidad de algunas enzimas citoplasmáticas como la hexoquinasa, debido a que, a concentraciones críticas de etanol, se presenta la formación de complejo hexoquinasa – etanol el cual puede detener la reacción glucosa a glucosa-6 fosfato. En conclusión, la tolerancia al alcohol depende de la habilidad de la célula para exportar el etanol del interior al medio externo, un proceso que depende de la composición de la membrana y de la fluidez de la misma.

La célula modifica la composición en ácidos grasos de la membrana para minimizar los efectos de la fluidez que produce el etanol, de la misma manera la adaptación de las levaduras al etanol también obedece a una modificación de la composición lipídica de las membranas debido básicamente a un enriquecimiento de las mismas en esterelores y ácidos grasos de cadena larga, de esta manera para las levaduras poder adaptarse a altas concentraciones de alcohol debe existir aumento del contenido de ácidos grasos insaturados con respecto a los saturados y un aumento en la longitud de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos Tomasso (2004).

Un factor importante que caracteriza las cadenas de pectina es el grado de metilación (DE) que se define como el número de moles de metanol por 100

moles de ácido galacturónico. Según este criterio, las pectinas han sido clasificadas en dos grupos; las que presentan más de un 50 % de metilación, pectinas altamente metiladas (HM); y las que contienen menos de 50 % de metilación, pectinas de baja metilación (LM). La principal fuente de las pectinas de alta metilación es la piel de los cítricos y la manzana. La pectina de baja metilación se obtiene comercialmente mediante desmetilación química de la pectina de alta metilación Pilgrim *et al* (1991); Cónstenla y Lozano (2003).

VI. CONCLUSIONES

- Se determinó el rendimiento de la producción de etanol a partir del mucilago de cacao inoculado con dos cepas genéricas no habiendo diferencias estadísticas en la producción de etanol entre las cepas, que son en promedio 7.61 ml al 74.88 % v/v de etanol para la cepa 1 y 6.77 ml al 75.33 % v/v de etanol para la cepa 2.
- Se caracterizó el etanol destilado a través de su densidad, siendo para el tratamiento C1A1 en promedio 73 ° gl con dilución en 1/2.4, en C1A2 en promedio 82 ° gl con dilución 1/2.7, C1A3 en promedio 72 ° gl con dilución en 1/2.4, C2A1 en promedio 76° gl con dilución en 1/2.5, C2A2 en promedio 81 ° gl con dilución en 1/ 2.7, C2A3 en promedio 70° gl con dilución en 1/ 2.3.

VII. RECOMENDACIONES

- Hacer estudios al nivel de simbiosis de microorganismos, para un mayor rendimiento etanólico en el mucilago de cacao.
- Mejorar la tecnología de extracción del mucilago, para mayor obtención de este y su aprovechamiento.
- Implementar los laboratorios con reactivos y equipos, para más investigaciones en este campo.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALKORTA, I., GARBISU, C., LLAMA, M. J. y SERRA, J. L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: A review. *Process Biochemystre* 33, 21-28.
- BARTRA, E., CASADO, M., CARRO, D., CAMPAMA, C. (2010). "Differential expression of thiamine biosynthetic genes in yeast strains with high and low production of hydrogen sulfide during wine fermentation." *Journal of applied microbiology* 109(1): 272-281.
- BADGER, WALTER L. *Introduccion a la Ingenieria Quimica*. Madrid: McGraw Hill, 1965.
- BOULTON, B., SINGLETON, L., BISSON, F., KUNKEE, E. (1996). *Principles and practices of winemaking*. New York.
- BELY, J. S., M., BARRE, P. (1990). "Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions." *Journal of Fermentation and Bioengineering* 70: 246-252.
- BLANCO, P., SIEIRO, C. Y VILLA, T. G. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 175, 1-9.
- CALAVERAS, J. 2004. *Nuevo tratado de panificación y bollería*. Editorial Mundi-Prensa. España. pp. 155-250.
- CENGEL, Y. A. (2003). *Transferencia de Calor*. México D.F.: Mc Graw Hill.

- COLOMBIÉ, S., MALHERBE, S., SABLAYROLLES, J. (2007). "Modeling of heat transfer in tanks during wine-making fermentation." *Food control* 18: 953-960.
- COLLADO, Quique. Levadura y fermentación alcohólica I. [Citado 5 nov., 2001]. Disponible en Internet: <<http://www.verema.com/opinamos/tri-buna/articulos/levaduras01.asp>>.
- Constenla, D., Lozano, J. E. 2003. Kinetic Model of Pectin Demethylation. *Latin American Applied Research* 33:91–96.
- CARRETERO, PROCESOS DE FABRICACION DE BEBIDAS ALCOHOLICA 2008 PDF.
- COOPER, T., ED. (1982). Nitrogen metabolism. *The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae*.
- CHUN, J. P.; HUBER, D. J. 1998. Polygalacturonase-mediated solubilization and depolymerization of pectic polymers in tomato fruit cell walls. Regulation by pH and ionic conditions. *Plant Physiology*, 117: 1293-1299.
- CRAMER, A., VLASSIDES, S., BLOCK, D. (2002). "Kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations." *Biotechnology and bioengineering* 77: 49-60.
- COZZOLINO, D., KWIATKOWSKI, M., PARKER, M., CYNKAR, W (2004). "Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy." *Analytica Chimica Acta* 513: 73-80.

- DEL CAMPO, G., BERRIGI, I., SANTOS, J., DUEÑAS, M. (2008). "Development of alcoholic and molalactic fermentations in highly acidic and phemolic apple musts." *Bioresource technology* 99: 2857-2863.
- DICKINSON, J., SCWEISER, M., ED. (2003). *Metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*. London.
- ERASMUS, M., G., VUUREN, H. (2003). Amplia expresión genom-análisis: la adaptación metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* a estrés alto de azúcar, la levadura FEMS.: 375-399.
- ESPINAL PERLA V, JIMENEZ MORALES R, PERAZA ARTEAGA K, TINETTI CASTR, "Diseño, construcción y validación de un equipo de Destilación de alcohol etílico" UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA ESCUELA DE INGENIERÍA MECÁNICA San Salvador, Octubre de 2009.
- Empresa Tetra Pak del Grupo Tetra Laval. Artículo virtual "¿Por qué enfriar la leche?". España, 1995. http://www.delaval.es/Dairy_Knowledge/EfficientCooling/Why_Cool_Milk.htm. Visitado el 03 de marzo del 2010.
- FAJARDO C., ERIKA E., SARMIENTO F., SANDRA C. 2008. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. Facultad de ciencias Básicas. Microbiología Industrial. Bogota 2008.
- GARDE-CERDÁN, T., ANCÍN-AZPILICUETA, C. (2008). "Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the

formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation." LWT 41: 501-510.

GARCÍA, C.V. 2005. Introducción a la microbiología. Segunda edición. Editorial EUNED. Chile. pp. 113-117.

FOLCH-MALLOL. J. (2004). "La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*." Revista Latinoamericana de Microbiología 46(1-2): 24-46.

GAFNER, J., AND M. SCHÜTZ. 1996. Impact of glucose-fructose-ratio on stuck fermentations: practical experience to restart stuck fermentations. *Vitic Enol Scien.* 51:214-218.

GERHARTZ, W. Industrial uses of enzymes. En GERHARTZ, W. (ed.). Enzymes in Industry. Production and Aplicaciones Weinheim: VCH, 1990, pag. 77-149.

HERNÁNDEZ-ORTE, P., IBARZ, M., CACHO, J., FERREIRA, V. (2005). "Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine." Food Chemistry 89: 163-174.

Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Lumbsch, T., Lutzoni, F., Matheny, P.B., Mclaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A.,

Crous, P.W., Dai, Y.-C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Kõljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.-H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Midlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.-M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiß, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.-J., Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509-547.

HOWELL, K., SWIEGERS, J., ELSEY, G., SIEBERT, T., ET AL. (2004). "Variation in 4-mercapto-4methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains." *FEMS Microbiology Letters* 240(2): 125-129.

HOHMANN, S. A. M., W. (1997). Shaping up: the response of yeast to osmotic stress. *Yeast stress responses*. S. Hohmann, Austin: Landes R.G and Co.: 101-143.

HUANG, X. M.; HUANG, H. B.; WANG, H. C. 2005. Cell walls of loosening skin in post-veraison grape berries lose structural polysaccharides and calcium while accumulate structural proteins. *Scientia Horticulturae*, **104**:249-263.

INSTITUTO NACIONAL DE VITINICULTURA (2006). Informe de Comercio Exterior. Colombia. S. d. E. y. A. T. Internacionales.

JAMES, T.Y., KAUFF, F., SCHOCH, C.L., MATHENY, P.B., HOFSTETTER, V., COX, C.J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsch, H.T., Rauhut, A., Reeb, V., Arnold, A.E., Amtoft, A., Stajich, J.E., Hosaka, K., Sung, G.H., Johnson, D., O'Rourke, B., Crockett, M., Binder, M., Curtis, J.M., Slot, J.C., Wang, Z., Wilson, A.W., Schussler, A., Longcore, J.E., O'Donnell, K., Mozley-Standridge, S., Porter, D., Letcher, P.M., Powell, M.J., Taylor, J.W., White, M.M., Griffith, G.W., Davies, D.R., Humber, R.A., Morton, J.B., Sugiyama, J., Rossman, A.Y., Rogers, J.D., Pfister, D.H. Hewitt, D., Hansen, K., Hambleton, S., Shoemaker, R.A., Kohlmeyer, J., Volkmann- Kohlmeyer, B., Spotts, R.A., Serdani, M., Crous, P.W., Hughes, K.W., Matsuura, K., Langer, E., Langer, G., Untereiner, W.A., Lucking, R., Budel, B., Geiser, D.M., Aptroot, A., Diederich, P., Schmitt, I., Schultz, M., Yahr, R., Hibbett, D.S., Lutzoni, F., McLaughlin, D.J., Spatafora, J.W. and Vilgalys, R. (2006a). Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822.

J.C. CONTRERAS-ESQUIVEL, L.BANDA-REYES, J.C. MONTAÑÉZ-SAENZ; EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA DE PECTINA DE MANGO; 2003.

JARVIS, M. C. 1984. Structure and properties of pectic gels in plant cell walls. *Plant Cell and Environment*, **7**: 153-164.

KASHYAP, D. R., VOHRA, P. K., CHOPRA, S. y TEWARI, R. (2001). Applications of pectinases in the comercial sector: A review. *Bioresource Thecnology* 77215-227.

- LIU, Q. (2002). "Malolactic fermentation in wine-beyond deacidification." *Journal Applied Microbiology* 92: 589-601.
- Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, C.J., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., Padamsee, M., Hibbett, D., James, T. Y., Baloch, E., Grube, M., Reeb, V., Hofstetter, V., Schoch, C., Arnold, A. E., Miadlikowska, J., Spatafora, J., Johnson, D., Hambleton, S., Crockett, M., Shoemaker, R., Sung, G.H., Lucking, R., Lumbsch, T., O'Donnell, K., Binder, M., Diederich, P., Ertz, D., Gueidan, C., Hansen, K., Harris, R. C., H., Kentaro, L., Young-W., Matheny, B., Nishida, H., Pfister, D., Rogers, J., Rossman, A., Schmitt, I., Sipman,
- H., STONE, J., SUGIYAMA, J., YAHR, R. AND VILGALYS, R. (2004). Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* 91: 1446-1480.
- LÓPEZ, A., GARCÍA, G.M., QUINTERO, R.R., LÓPEZ-MUNGUÍA A., CANALES, L. 2002. *Biotechnología alimentaria*. Editorial Limusa. México. pp. 263-312.
- MATO, I., SUÁREZ-LUQUE, SILVIA., HUDOBRO, JOSÉ. (2005). "A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines." *Food Research International* **38**: 1175-1188.
- MATELES, R. (1971). *Biot. Bloeng* 13: 581.
- McKay, A.M. (1990). Degradation of polygalacturonic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 11, 41-44.

- MANGINOT, C., ROUSTAN, J., SABLAYROLLES, J. (1998). "Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation, importance of the stationary phase." *Enzyme and microbial technology* 23: 511-517.
- MAICAS, S. (2001). "The use of alternative technologies to develop malolactic fermentation in wine." *Applied Microbiology Biotechnology* 56: 35-39.
- MORRIS, G., WINTERS, L., COULSON, G., CLARKE, K. (1983). "Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of General Microbiology* 129: 2023-2034.
- MOUSTACAS, A. M.; NARI, J.; BOREL, M.; NOAT, G.; RICHARD, J. 1991. Pectinmethylesterase, metal ions and plant cell wall extension: the role of metalions in plant cell wall extension. *Biochemical Journal*, **279**: 351-354.
- PERRY H, CHILTON C., "Manual del Ingeniero Químico", 7ª Edición, McGraw Hill, México, D.F. 1992.
- PUERTA Q., G. I. Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café, Avances Técnicos Cenicafe No. 402. 2010. 12 p.
- PEREZ, C., BRIONES, P., EBEDA, I., MARTIN, A. (1999). "Characteristic of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region." *Food microbiology* 16: 563-573.
- Pérez, P. (noviembre de 2004). Trabajo de Especialización "Mucílago Pulverizado obtenido a partir de la cáscara de cacao una alternativa en

la clarificación de jugos en la industria panelera" Universidad Nacional. Manizales-Colombia. Recuperado el 25 de junio de 2016, de http://www.ruta.org/CDOCDeployment/documentos/Mucilago_pulverizado_obtenido.pdf

PILGRIM, G. W, WALTER, R. H. Y OAKENFULL, D.G. JAMS, JELLIES, and preserves. En Walter, R. H (ed). The Chemistry and Thecnology of Pectin, San Diego, (California): Academic Press, Inc ; 1991, pag. 23- 50.

PRESCOTT CATE, SAMUEL, CECIL GORDON, DUNN (1992). Microbiologia Industrial. Aguilar Madrid. p: 110 – 158.

RAMIREZ NIÑO, M. A. (2006). Caracterización de vinos de piña (variedad española roja) pasteurizados y sin pasteurizar elaborados con diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Ciencia y Tecnología de Alimentos. Mayagüez, Universidad de Puerto Rico Maestria.

REED, G., NAGODAWITHANA, T. (1991). Yeast Technology. **2a.** ed. AVI. Nueva York.

REGODON 2007, Las levaduras seleccionadas en enología URL disponible en: <http://perso.wanadoo.es/e/regodon/marcos.htm>

RÍOS DEL RISCO, CARLOS A., FAJARDO, MARIO, PÉREZ M., JUAN CARLOS. 2005. Evaluación de una cepa de levadura para fermentar diferentes concentraciones de miel *Apis mellifera*. Estación experimental apícola Cuba.

- RIBÉREAU, P., DUBOURDIEU, D., DONÈCHE, B., LONVAUD, A. (2006). Handbook of enology: The microbiology of wine and vinifications, John Wiley & Sons.
- RICARD, J.; NOAT, G. 1986. Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. 1. A theory of the ionic control of a complex multi-enzyme system. *European Journal of Biochemistry*, **155**: 183-190.
- ROSENFELD, E., BEAUVOIT, B., BLONDIN, B., SALMON, J. (2003). "Oxygen consumption by anaerobic *Sacharomyces cerevisiae* in enological conditions: effect on fermentation kinetics." *Applied and Environmental Microbiology* 69: 113-121.
- SABLAYROLLES, J. (2009). "Control of alcoholic fermentation in winemaking: current situation and prospect." *Food Research International* 42: 418-424.
- SABLA Y ROLLES, J., DUBOIS, C., MANGINOT, C., BARRE, P. (1996). "Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations." *Journal of Fermentation and Bioengineering*:82(4):377-381.
- SALMON, J., FORNAIRON, C., BARRE, P. (1998). "Determination of oxygen utilization pathways in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation." *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86(2): 154-163.

- SALMON J. M. 1996. Sluggish and stuck fermentations: some actual. trends on their physiological basis. *Vitic Enol Sci.* 51:137-140.
- SCHÜBLER, A., SCHWARZOTT, D. AND WALKER, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413-1421.
- TAILLANDIER, P., PORTUGAL, F., FUSTER, A., STREHAIANO, P. (2007). "Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content." *Food microbiology* 24: 95-100.
- TREYBAL, ROBERT E., "Operaciones de Transferencia de Masa", 2ª Edición, McGraw Hill, México, 1992.
- TOMASSO, MAURICIO. 2004. Tolerancia de las levaduras al etanol. Universidad de la República Uruguay. Facultad de Química
- VAN RENSBURG, P. Y PRETORIUS. I.S. (2000). Enzymes in winemaking, harnessing natural catalyst for efficient biotransformations – a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 52- 73.
- Verapinto, C. (2009). Elaboracion de destilado de pera y derivados. (Primera edicion ed.). Lima, Peru: Desco.
- VASQUEZ H.J, DACOSTA O. 2007. Fermentación alcohólica: una opción para la produccion de energia renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería Investigación y Tecnología* VIII. 4. 249 – 259. 2007 .

VERACHTERT, H. Y DE MOT, R. (1990). Yeast, Biotechnology and Biocatalysis. Marcel Dekker. Nueva York

WHIEMKEN, A. (1990). "Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate." *AntonieLeeuwenhoek*:58:209-217.

ZOECKLEIN, B., FUGELSANG, K., GUMP, B., NURY, F. (2001). Análisis y producción de vino. Zaragoza, España.

ANEXO

Apéndice 1. Preparación de Reactivo DNS

Preparación del reactivo del ácido 3,5 dinitrosalicílico: en frío

Se pesan 5 gramos de ácido 3,5 dinitrosalicílico, 150 gramos de tartrato de Na-K y 8 gramos de NaOH. Se disuelve el NaOH en 200 ml de agua (d) y se añade en agitación el tartrato de Na-K lentamente.

Se completa con agua (d) hasta 400 ml y se comienza a añadir lentamente el ácido 3,5 dinitrosalicílico. Se deja en agitación toda la noche, se enrasa a 500 ml y se filtra.

En tubos de cristal de 10 ml se adicionan 0.5 ml de muestra y 0.5 ml del reactivo DNS. Los tubos se colocan en baño de agua a 100 C° por 5 min. Se enfrían hasta la temperatura ambiente y se le añade 5 ml de agua destilada. Se agita y realiza la lectura a 540 nm en espectrofotómetro.

Apéndice 1. Cálculos para la determinación de la densidad

Densidad relativa se determina mediante la ecuación siguiente:

$$d = \frac{m_2 - m_1}{m_3 - m_1}$$

Siendo:

d = densidad relativa. m_1 = masa del picnómetro vacío, en gramos.

m_2 = masa del picnómetro con la muestra, en gramos.

m_3 = masa del picnómetro con agua destilada, en gramos.

Tabla de Densidad con Grado Alcohólico

GRADOS DE ALCOHOL	DENSIDAD	GRADOS DE ALCOHOL	DENSIDAD	GRADOS DE ALCOHOL	DENSIDAD
1	0.999	11	0.986	21	0,975
2	0.997	12	0.984	22	0,974
3	0.996	13	0.983	23	0,973
4	0.994	14	0.982	24	0,972
5	0.993	15	0.981	25	0,971
6	0.992	16	0.98	26	0,970
7	0.99	17	0.979	27	0,969
8	0.989	18	0,978	28	0,968
9	0.988	19	0,977	29	0,967
10	0.987	20	0,976	30	0,966

Fuente: NTE INEN 1994 Bebidas; Determinación del Grado Alcohólico

Apéndice 3. Panel fotográfico de la investigación realizada.



Figura 14. Obtención de materia prima mucilago de cacao



Figura 15. Preparación del Reactivo DNS



Figura 16. Prueba del reactivo DNS con Concentraciones conocidas de sacarosa.



Figura 17. Pasteurización del mucilago de cacao.



Figura 18. Micro fermentación del mucilago de cacao.



Figura 19. Destilación del mucilago de cacao

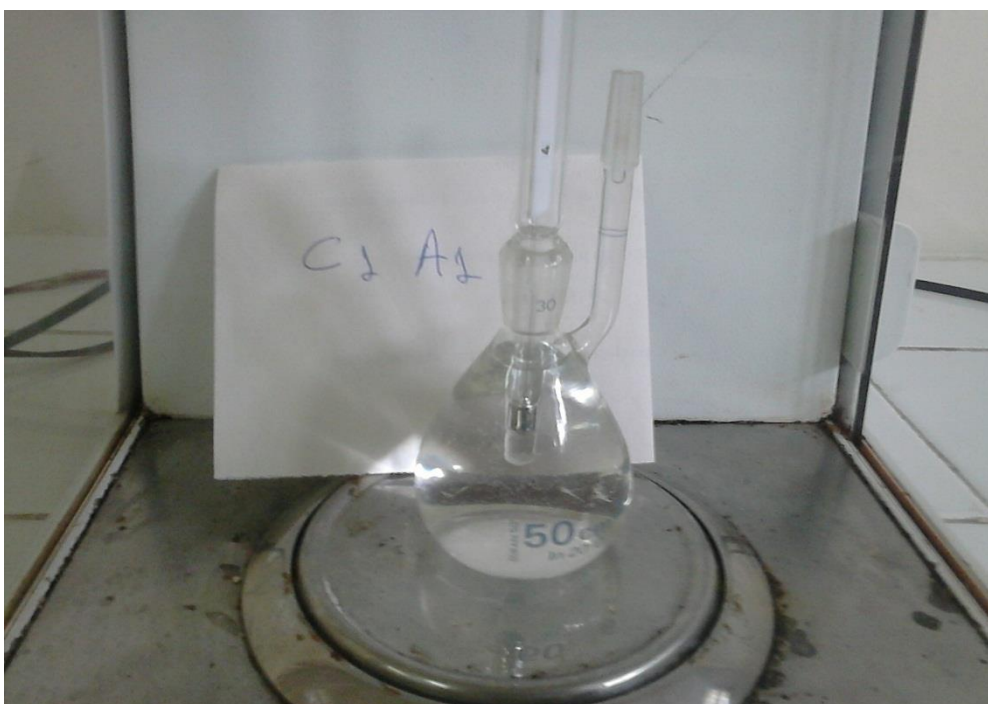


Figura 20. Determinación de la Densidad del Destilado.