

UNIVERSIDAD DE ELSALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



OBTENCION DE ETANOL POR VIA FERMENTATIVA A PARTIR DE
CASCARAS DE *Ananas comosus* (PIÑA) EVALUANDO DOS DE SUS
PRINCIPALES VARIABLES (pH y GRADOS BRIX) USANDO COMO
MICROORGANISMO PRODUCTOR *Saccharomyces cerevisiae*.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

SANDRA YESENIA HERNANDEZ DUARTE

CARLOS ERNESTO MARTINEZ TORRES

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

SEPTIEMBRE, 2012

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licenciada María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE GESTION AMBIENTAL: CALIDAD AMBIENTAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

ASESORA DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS Y QUIMICA AGRICOLA:

MAE. María Elisa Vivar de Figueroa

DOCENTE DIRECTORA

Licenciada María Elsa Romero de Zelaya

AGRADECIMIENTOS

A Dios primeramente por todo ya que me distes la vida, la salud, las fuerzas y sobre todo la dirección de mi vida, porque nunca me abandonaste y siempre me sacaste adelante sobre todas las adversidades, este triunfo y todos te los debo a ti. GRACIAS DIOS

A mis padres Isabel y Víctor por su cariño, amor, comprensión, que lo tuve y lo tengo siempre sin condiciones, gracias por confiar en mí, y por darme su apoyo siempre, por sus sacrificios y su entrega para sacarme adelante, sin ustedes no lo hubiera logrado.

Al amor de mi vida Mario Núñez por su apoyo incondicional y por darme fuerzas siempre para continuar, por confiar en mí, y darme ánimos y palabras de aliento cuando mas los necesite, gracias amor TE AMO.

A mis maestros que me brindaron sus conocimientos para ser un profesional de éxito.

A mi maestra Asesora Licda. María Elsa Romero de Zelaya quien siempre nos apoyo incondicionalmente, quien nos guió a lo largo de nuestro trabajo de graduación dando todo lo mejor de si, para que saliéramos adelante, LE AGRADEZCO MUCHO

A mis asesores de área MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velazquez, MAE. María Elisa Vivar de Figueroa y coordinadora general Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo, por su gran ayuda y apoyo para la finalización de este trabajo.

GRACIAS A TODOS POR CREER EN MÍ

Sandra Yesenia Hernández Duarte

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios por ser mi ayuda, mi refugio, mi fortaleza en los tiempos difíciles y por brindarme la sabiduría y cada una de las bendiciones que estuvieron siempre a mi lado.

A mis padres, Ana y Carlos por todo su apoyo y su confianza en mí, a mi hermana Jennifer y mi sobrino Rodrigo que me brindaron fuerzas para lograrlo.

A Lissette, por cada segundo, hora, día y año que has pasado a mi lado, gracias por ser mi ayuda idónea, mi apoyo incondicional, por tu consejo y por escucharme, eres el amor de mi vida TE AMO.

Al Ing. Jaime Néstor Planas por brindarme su apoyo, su amistad, su consejo y confiar en que lo podía lograr. ¡Siempre le quedaré en deuda ingeniero Planas!

A la Licda. María Elsa Romero de Zelaya por todo su apoyo, por brindarnos su confianza y creer en nosotros.

A mis asesores de área: MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velázquez, MAE. María Elisa Vivar de Figueroa y coordinadora general Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo, por toda su ayuda y la culminación de este trabajo.

A mis Catedráticos, por cada palabra de sabiduría y aliento que influyeron para mi formación académica.

A mis amigos que siempre confiaron en mí.

Gracias a los que colaboraron para la realización de este trabajo.

Carlos Ernesto Martínez Torres

INDICE

Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xvi
Capítulo II	
2.0 Objetivos.	18
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	20
3.1 Breve historia de la fermentación alcohólica	20
3.2 Características principales de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
3.3 Características de la fermentación alcohólica	23
3.4 Producción de etanol vía fermentativa	27
3.4.1 Etapas que comprende el proceso de producción de etanol	28
3.5 Condiciones de la fermentación	29
3.6 Materias primas y su importancia en el proceso fermentativo	31
3.7 Tipos de fermentación alcohólicas	32
3.8 Procesos tecnológicos para la producción de etanol	33
3.8.1 Preparación del sustrato	33
3.8.2 Fermentación	34
3.8.3 Purificación	34
3.9 Cinética de la fermentación	35
3.9.1 Estequiometría del crecimiento.	36
3.9.2 Estequiometría de formación de producto	37
3.9.3 Fases del crecimiento celular	37
3.10 Usos del etanol	38
3.11 Caracterización de la planta de piña.	39

3.11.1 Generalidades	39
3.11.2 Descripción botánica de la piña	39
3.11.3 Variedades	40
3.11.4 Madurez fisiológica	40
3.11.5 Cambios composicionales durante el desarrollo	41
3.11.5.1 Ácidos	42
3.11.5.2 Pigmentos	42
3.11.5.3 Otros componentes	43
3.12 Espectrometría de absorción en el infrarrojo	44
3.12.1 Espectros de infrarrojos en el análisis cualitativo	46
3.12.2 Manejo de las muestras	47
3.13 Potencial de iones Hidrogeno. (pH)	48
3.13.1 Efectos del pH en la levadura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
3.13.2 Determinación experimental del pH de una solución	49
3.13.2.1 Papel pH	49
3.13.2.2 pH metro	50
3.14 Grados Brix	50
Capítulo IV	
4.0 Diseño metodológico	53
4.1 Preparación y estandarización del microorganismo productor (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	54
4.2 Ensayo con modificación de la variable de grados Brix	54
4.3 Análisis posterior del ensayo de la variable de grados Brix.	56
4.4 Ensayos con modificación de la variable de pH	56
4.5 Análisis posterior del ensayo de la variable de pH.	58

4.6 Realización de la cinética de fermentación con el ensayo del cual se hayan obtenido mayores rendimientos	58
4.7 Análisis posterior del ensayo con las variables óptimas de máxima producción de etanol	59
4.8 Determinación del índice de refracción y grados Brix de las muestras a analizar.	60
4.9 Determinación del grado alcohólico de la muestra de etanol obtenido por destilación	61
4.10 Identificación de muestra etanólica utilizando el ESPECTROFOTOMETRO INFRARROJO SHIMADZU PRESTIGE	62
Capítulo V	
5.0 Resultados y discusión	64
5.1 Evaluación de la variable de grados Brix	64
5.2 Evaluación de la variable de pH	69
5.3 Evaluación con las variables optimas de fermentación, tiempo de máxima producción	72
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	84
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	86
Bibliografía	87
Glosario	91
Anexos	93

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Materiales y equipos utilizados durante la parte experimental
2. Preparación y estandarización del microorganismo productor
3. Ensayo con modificación de la variable de pH
4. Ensayo con modificación de la variable de grados Brix
5. Cinética de fermentación
6. Equipos utilizados en la identificación de etanol y ***Saccharomyces cerevisiae***

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°	N° Pág.
1. Resumen de características organolépticas y porcentaje de etanol obtenido en el ensayo de la variable optima de grados Brix	65
2. Resumen de características organolépticas y porcentaje de etanol obtenido en el ensayo de la variable optima de pH	70
3. Resultados obtenidos en la Cinética de fermentación a los diferentes tiempos	73

INDICE DE TABLAS

Tabla N°	N° Pág.
1. Carbohidratos fermentables por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
2. Principales microorganismos involucrados en la fermentación, así como el nutriente esencial y formula empírica	36
3. Composición del jugo y la cáscara de piña	42
4. Resultados obtenidos de producción de biomasa en los diferentes tiempos en la evaluación de las variables optimas de pH y grados Brix	79

INDICE DE FIGURAS

Figura N°	N° Pág.
1. Vista microscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2. Ruta bioquímica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) de glucosa hasta obtención de etanol (Alcohol etílico)	26
3. Diagrama de flujo para la producción de etanol vía fermentativa	35
4. Representaciones grafica de la cinética de crecimiento (I Lag, II Aceleración, III Exponencial, IV Desaceleración, V Estacionaria y VI Declive o Muerte.)	37
5. Variedad de frutos de <i>Anana comosus</i>	43
6. Movimientos moleculares en absorción infrarroja	44
7. Movimientos en el plano de las moléculas en el infrarrojo	45
8. Espectro infrarrojo de análisis de etanol 90°	46
9. Funcionalidades internas del espectrógrafo infrarrojo	47
10. Celdas o porta muestras usados en espectrofotometría infrarroja	48
11. Aparato portátil para medir el pH	48
12. Papel pH indicador con escala	49
13. Potenciómetro o pH metro	50
14. Refractómetro de ATAGO para realizar lecturas de grados Brix.	51
15. Gráfico de grados Brix con respecto al porcentaje obtenido de etanol	68
16. Gráfico de pH con respecto al porcentaje obtenido de etanol	72
17. Gráfico de fermentacion de etanol VS tiempo	77
18. Grafico de Biomasa obtenida en la cinética de fermentación	77
19. Grafico de consumo de sustrato Vrs Producción de Biomasa	78
20. Espectro de absorción infrarroja de alcohol etílico 90°	81
21. Espectro de absorción infrarroja de la muestra de alcohol destilado	82
22. Espectros superpuestos de muestra y estándar de etanol	83

23. Esquema para la preparación y estandarización del microorganismo productor	96
24. Esquema de ensayo con modificación de la variable de grados Brix	98
25. Esquema de ensayo con modificación de la variable de pH	101
26. Esquema para la realización de la cinética de fermentación	104
27. Aparato de destilación simple para separar el etanol del medio de fermentación	107
28. Espectrofotómetro infrarrojo para identificar la muestra de etanol	107
29. Microscopio para identificar la levadura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	108
30. Vista microscópica en la identificación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	108
31. Aparato de Filtración al vacío utilizado durante la práctica.	109

ABREVIATURAS

$^{\circ}\text{Bx}$ = Grados Brix.

T = Temperatura. ($^{\circ}\text{C}$).

EMP = son las siglas de Embden meyerhoff parnas de la ruta metabólica de la fermentación alcohólica.

n_{Dreal} = índice de refracción real.

n_{Dt} = índice de refracción tomado a la temperatura a la cual registra el termómetro digital.

F_d = factor de diferencia.

T_c = temperatura de calibración del refractómetro.

T_a = temperatura a la cual se hace la lectura de la muestra en el refractómetro.

0.004 = constante refractométrica de error de incerteza.

RESUMEN

El presente trabajo trata sobre la obtención de etanol por vía fermentativa en la cual se evaluaron dos de sus principales variables involucradas en el proceso fermentativo con el fin de encontrar cuales son las condiciones óptimas de mayor producción, el proceso fermentativo se realizó utilizando un desecho agrícola como lo son las cáscaras de piña **Ananas comosus** variedad Golden y como microorganismo productor se utilizó **Saccharomyces cerevisiae**, la temperatura a la que se llevó a cabo el proceso fue a $30^{\circ}\pm 5$ ya que fue la temperatura ambiente. Las variables que se evaluaron en diferentes condiciones fueron los Grados Brix a 25, 20.5, 21.0, 18.5, 14.5, 4, y el pH 3, 4, 5, 6, con esto se determinó cuales eran las condiciones óptimas de mayor producción de etanol, dando como resultado que; los Grados Brix óptimos son 20 aproximadamente y el pH es 4 con un tiempo de fermentación de 72 horas ya que con estas condiciones se obtiene el mayor rendimiento, y el grado alcohólico del etanol obtenido fue el 50%, la parte experimental se desarrollo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y la identificación del etanol fue en Laboratorios VIJOSA. Con esta investigación se demuestra que este procedimiento es sencillo, de bajo costo, de fácil implementación, y se pueden obtener buenos rendimientos de etanol, el cual es muy útil en diferentes áreas tanto farmacéutica como alimenticia, por lo tanto se recomienda implementar dicho proceso para aprovechar los desechos orgánicos ricos en carbohidratos y con esto aumentar la economía del país.

I. INTRODUCCION

La fermentación constituye un proceso de obtención de productos muy utilizado desde tiempos muy antiguos, sin embargo este descubrimiento permanece hasta hoy en día en una de las ramas más importantes en cuanto a la obtención de productos de uso industrial, el etanol es quizás el producto de obtención de fermentación más importante, sus usos principales radican en la elaboración de bebidas alcohólicas. La fermentación alcohólica es un proceso bioquímico muy complejo, en su realización hay que considerar muchos factores y variables que pueden afectar al producto de interés, tales como pH, grados Brix, temperatura, concentración del microorganismo productor que al relacionarse entre sí adecuadamente pueden llegar a producir grandes cantidades de este metabolito de interés.

Con el presente trabajo se da a conocer cuáles son las condiciones óptimas de Grados Brix y pH de mayor producción de etanol por vía fermentativa evaluados a nivel piloto de pequeña escala en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador. Usando como sustrato cáscaras de Piña (***Ananas comosus***) variedad Golden, por ser un desecho agrícola de bajo costo y rico en carbohidratos fermentables y como microorganismo productor (***Sacharomyces cereviceae***), el procedimiento se realizó con una concentración de microorganismo productor de 10^6 células por mililitro (25% de Transmitancia) y temperatura ambiente aproximada de $30^{\circ}\pm 5$ obteniendo como resultado que el mayor rendimiento de Etanol se obtiene a las 72 horas usando un pH de 4 y concentración de Grados Brix de 20 y el producto obtenido separado por destilación simple es etanol al 50%.

Este trabajo se realizó con la finalidad de proporcionar un procedimiento de fácil implementación que aumente la producción de etanol, usando un sustrato de bajo costo, y un microorganismo productor accesible, dado que en el país no se cuentan con estudios que reflejen cuales son las condiciones óptimas de

mayor producción ni procedimientos que indiquen como bajar costos y aumentar la economía del país.

II. OBJETIVOS.

2.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener etanol por vía fermentativa a partir de cáscaras de **Ananas comosus** (piña variedad golden) evaluando dos de sus principales variables (pH y grados Brix) usando como microorganismo productor **Saccharomyces cerevisiae**.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1. Identificar los grados Brix óptimos de máxima producción de etanol de manera experimental a nivel de laboratorio evaluando a los grados Brix 25, 21, 20.5, 18.5, 14.5, 4. usando como sustrato cáscaras de **Ananas comosus** (piña variedad golden) y como microorganismo productor **Saccharomyces cerevisiae**.

2.2.2. Realizar a nivel de laboratorio la variable optima de pH de máxima Producción de etanol evaluando a los pH 3, 4, 5 y 6 usando como sustrato cáscara de **Ananas comosus** (piña variedad golden) y como microorganismo productor **Saccharomyces cerevisiae**.

2.2.3. Dar a conocer los resultados obtenidos en el laboratorio de pH y grados Brix óptimos en los cuales se obtengan mayores rendimientos de etanol.

2.2.4. Determinar el tiempo de máxima producción de etanol en 0, 24, 48, 72, 96, 120 horas tomando en cuenta las variables fermentativas optimas de pH y grados Brix involucradas en el proceso.

- 2.2.5. Identificar el alcohol obtenido por espectrofotometría infrarroja, y su grado alcohólico utilizando un alcoholímetro.

III. MARCO TEORICO

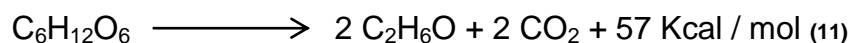
3.1. Breve historia de la fermentación alcohólica.

La palabra alcohol procede del árabe y significa “un polvo finamente desmenuzado”. Más tarde se amplió el significado de la palabra abarcando también los remedios curativos. Parece ser que en el siglo XVI, Paracelso empleó al azar el concepto alcohol para el alcohol etílico (etanol). La palabra etílico deriva de *aether*, gr.= aire, e *hyle*, gr.= madera o sustancia. (11)

La fermentación alcohólica fue determinada cuantitativamente por Lavoisier (1743 – 1794) quien, estudiando esta fermentación, enuncia el principio de conservación de la materia y expresa una “ecuación algebraica” para este fenómeno:

Mosto de fruta = Ácido carbónico + Alcohol

Posteriormente Gay- Lussac (1778 – 1850) expresa lo mismo con la ecuación que lleva su nombre:



Berzelius describe la fermentación como un fenómeno catalítico, similar a la descomposición del agua oxigenada por una esponja de platino y expresa la idea de fermentos orgánicos. (10)

Posteriormente Cagniard de la Tour y Schwan observan en el microscopio que existía una estrecha dependencia entre la multiplicación de pequeños microorganismos y la intensidad de la fermentación de mostos de vinos o de cervezas donde se desarrollaban. (11)

Sin embargo el mundo científico no aceptaba esta opinión hasta que Pasteur (1822 – 1895) demostró en 1872 que aquellos microorganismos vivían y se desarrollaban a expensas de las materias primas azucaradas,

descomponiéndolas en alcohol y CO₂, y que tales organismos vivientes constituían los “fermentos organizados”. Liebig (1803 – 1873) se declaró contrario a dicha hipótesis considerando que los fermentos orgánicos eran sustancias de naturaleza proteica que producían un desdoblamiento natural de las moléculas de azúcar. Estas opiniones de Liebig, verdaderamente eran precursoras del concepto de enzimas, pero no fueron aceptadas en su época. (10)

En 1896, Buchner (1860 – 1917) efectuó un descubrimiento importante que compatibilizaba la idea de “microorganismos fermentativos” de Pasteur y de “enzimas” de Liebig, demostrando que la acción fermentativa estaba en las células vivas de levaduras, pero que podía ser extraída de ellas destruyendo las células con acetona o triturando con arena, obteniendo un jugo que a pesar de hallarse libre de células era capaz de reproducir todas las fases de la fermentación alcohólica de la glucosa. (20)

3.2. Características principales de *Saccharomyces cerevisiae* (11)

Levadura alta cultivada. Las células de cultivo jóvenes son redondas, ovals u oviformes (figura N° 1), (3-7) x (4-14) μ. La relación entre longitud y anchura es por lo general menor de 2 μ. Con frecuencia se encuentran cadenas celulares rígidas ramificadas, sobre todo en cultivos en cámara húmeda. Los límites de temperatura para la formación de células se encuentran entre 3 °C y 40 °C.

Los carbohidratos fermentables de *Saccharomyces cerevisiae* pueden variar (ver tabla N° 1) con la excepción de lactosa y del almidón ya que no posee la enzimas adecuadas para hidrolizarlo o fermentarlos.

La formación de película varía según la temperatura a la cual se realiza. Después de 7-11 días a 20-34°C aparece una película delgada, formada por células en forma de salchicha, barrocas, y tras 15-30 días a 13 °C -15

°C se forma una película más gruesa. En el curso de un mes a temperatura ambiente se produce un sedimento y una película formada por células alargadas. Los límites de temperatura para la formación de película se encuentran entre los 6 °C y 38 °C. Las esporas, forman una cuña protoplasmática entre las ellas, de manera que éstas reciben un aspecto característico de pared doble. El óptimo de temperatura para la esporogénesis se encuentra hacia los 30 °C, y a esta temperatura las esporas se pueden desarrollar en el transcurso de 40 horas. A 12 °C- 15 °C se desarrollan en el curso de 4-6 días. Los límites de temperatura para la esporogénesis se encuentran entre los 9 °C y 37 °C. (11)

La colonia gigante que se desarrolla sobre gelatina-mosto después de 40 días a 15 °C es una roseta con una elevación en el centro; el borde está redoblado. Esta levadura licúa la gelatina después de 45 días. (19)

Tabla N° 1 Carbohidratos fermentables por ***Saccharomyces cerevisiae***

Fermentación	
Glucosa	+
Galactosa	+
Sacarosa	+
Maltosa	+
Lactosa	-
Rafinosa	1/3

El nombre ***Saccharomyces cerevisiae*** fue propuesto en un principio, en 1870, por M. Reess. (15)

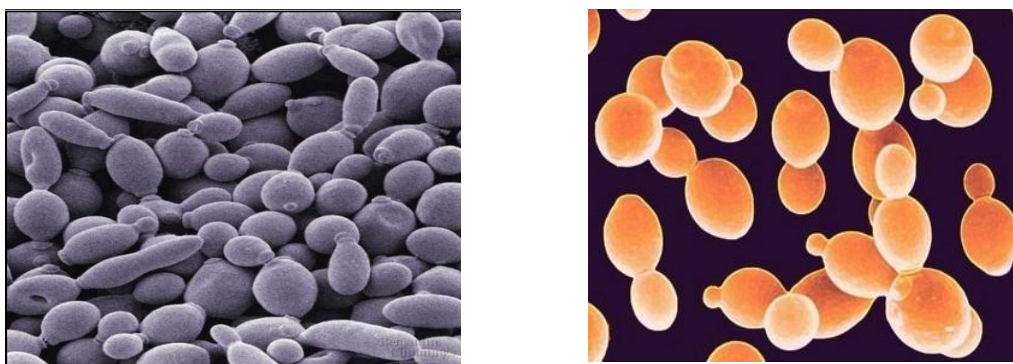


Fig. N° 1 vista microscópica de *Saccharomyces cerevisiae*

3.3. Características de la fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es una de las etapas principales que transforman el mosto o zumo azucarado, en un líquido con un determinado contenido de alcohol etílico (etanol). Dura, aproximadamente, una semana, a una temperatura de 20 °C, y se traduce por una disminución de la densidad del mosto. (10)

Hay materiales nutritivos como la glucosa que ya contienen oxígeno en su molécula, y este participa en la combustión. En el caso de la fermentación alcohólica, el oxígeno necesario para oxidar carbono y obtener dióxido de carbono junto con etanol está contenido en la propia molécula de glucosa, y esta conversión no requiere el concurso del oxígeno atmosférico. (19)

Es común a todos los procesos de la fermentación el de significar una renuncia, concretamente esta desarrolla toda la energía que es capaz de obtenerse mediante un proceso de oxidación total (combustión). Las levaduras prefieren obtener menos energía, pero bajo una forma aprovechable. Así, por ejemplo, en las fermentaciones de los

carbohidratos estos no se desdoblan hasta reducirse a CO_2 y H_2O , sino que se obtienen productos finales relativamente ricos aún en energía. (10)

En el caso concreto de la fermentación alcohólica, al descomponerse la glucosa en alcohol etílico y dióxido de carbono, se desprende solo un 7.33 % de la energía susceptible de recuperación. Desde el punto de vista energético este rendimiento es muy bajo, pero lo compensa el hecho de que estas cortas cantidades de energía representan un verdadero capital productivo. (7)

Los microorganismos que son capaces de producir fermentación alcohólica son ***Saccharomyces*** y otras especies de levaduras, ***Torulopsis***, ***Kloeckera***, ***Candida***, ciertas especies ***Mucor*** y algunas bacterias. Sin embargo, la fermentación alcohólica más importante es producida por especies de ***Saccharomyces***. Los hidratos de carbono que se pueden fermentar, por lo general son aquellos que contienen tres átomos de carbono o un múltiplo de los mismos. Los monosacáridos se pueden fermentar directamente, mientras que los di, tri y polisacáridos tienen que ser hidrolizados a hexosas antes de poder ser fermentado. (5)

Se conocen cuatro hexosas fermentescibles, a saber: glucosa, fructuosa, manosa y galactosa. Las tres primeras siempre son fermentescibles, mientras que la última solo puede ser fermentada por ciertas especies de levaduras. (11)

Los cultivos microbianos utilizados en la fermentación deben tener las siguientes características: tolerancia al etanol, a las altas temperaturas, a altas concentraciones de azúcar, rendimiento alcohólico, eficiencia en la fermentación y productividad. (26)

Tolerancia al alcohol:

La tolerancia al etanol es un elemento importante en la selección de una cepa de levadura, pues de su capacidad de mantenerse activa en condiciones crecientes de concentración alcohólica en el medio dependerá el rendimiento del proceso. (26)

Tolerancia a alta temperatura:

Muchas levaduras son sensibles a la temperatura; si ésta se eleva, la productividad puede disminuir; los sistemas de enfriamiento son caros, por lo que hay una razón económica para desarrollar cepas termotolerantes, que trabajen a temperaturas por encima de 40°C sin pérdidas en la eficiencia, y que a la vez mantengan la estabilidad genética. (3)

Tolerancia a alta concentración de azúcares:

Trabajar con altas concentraciones de azúcares produce mayor eficiencia y productividad del proceso fermentativo. (7)

La ecuación de Gay-Lussac, que indica que las hexosas son escindidas en partes ponderales aproximadamente iguales de anhídrido carbónico y alcohol, sólo indica el curso aproximado del proceso de fermentación. Y es que éste resulta extremadamente complicado, ya que consta de una larga serie de continuados procesos individuales, cada uno de los cuales se regula por separado por enzimas especiales. (5)

Aproximadamente el 96% de la fermentación del etanol se lleva a cabo mediante cepas de ***Saccharomyces cerevisiae*** o especies relacionadas, particularmente ***S. uvarum***. El etanol se produce en la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (fig. N° 2), en la que el piruvato producido durante la glicosilación se convierte en acetaldehído y etanol. (11)

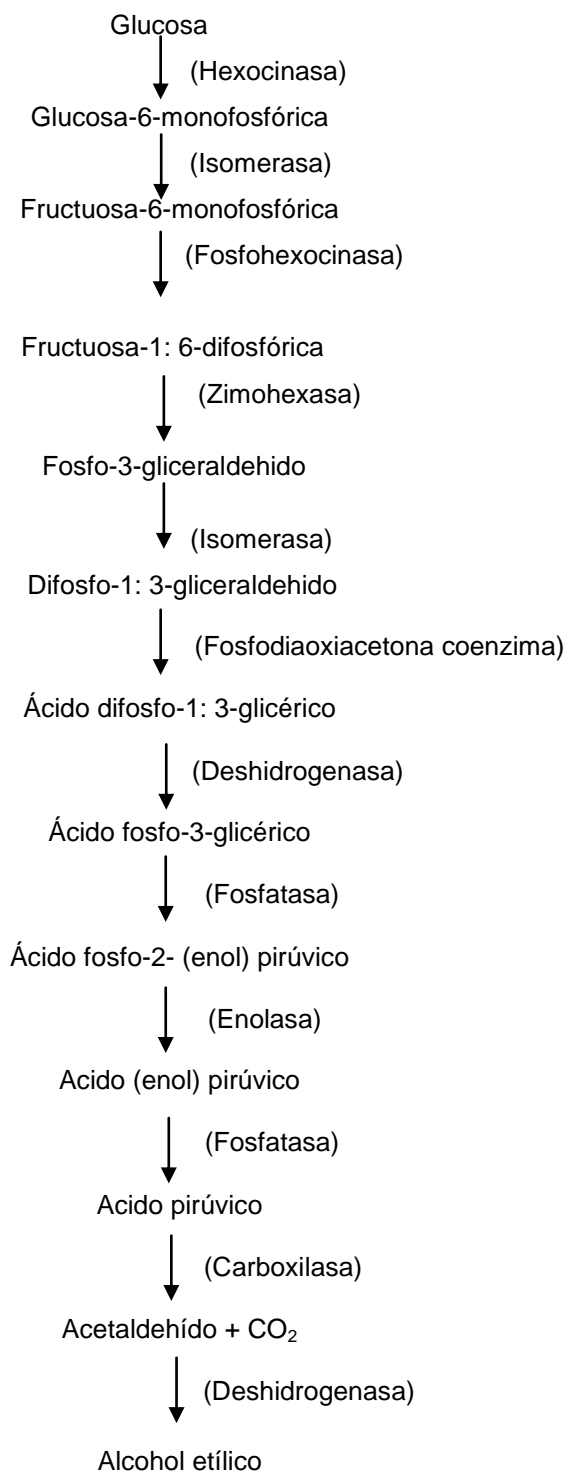
Ruta bioquímica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (11)

Fig. Nº 2 Ruta bioquímica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) de glucosa hasta obtención de etanol (Alcohol etílico)

El rendimiento teórico de 1 g. de glucosa es de 0.51 g. de etanol y 0.49 g. de CO₂. Sin embargo, en la práctica, aproximadamente el 10% de la glucosa se transforma en biomasa y el rendimiento en etanol y CO₂ alcanzan el 90% del valor teórico. El ATP formado se utiliza para las necesidades energéticas de la célula. (19)

Los principales productos de la fermentación alcohólica obedecen a la bioquímica de la fermentación de las levaduras responsables estos productos pueden ser: (18)

Alcoholes: etanol, metanol, alcoholes alifáticos con más de 2 átomos de C, y Alcoholes superiores (isobutanol, alcohol isoamílico, amílico, llamados genéricamente aceite de fusel).

Aldehídos: primordialmente acetaldehído, Ésteres: acetato de isobutilo y acetato de isoamilo.

Ácidos orgánicos: Ácidos volátiles: fórmico, acético, propiónico, butírico y láctico y trazas de otros ácidos grasos. Ácidos tartárico y málico. Dióxido de carbono. (3)

3.4. Producción de etanol vía fermentativa

La producción de etanol por la acción de levadura sobre malta o extractos de fruta ha sido llevada a cabo a gran escala por muchos años y fue el primer proceso industrial para la producción de un metabolito microbiano. Es por la vía fermentativa que se obtiene la mayor cantidad de etanol a nivel mundial. El 95% del etanol en el mundo se obtiene por fermentación a partir de materias primas que contengan carbohidratos la gran aplicabilidad del etanol en procesos tradicionales como por ejemplo solvente, alimento, bebidas y biocombustible. (19)

3.4.1. El proceso fermentativo comprende de etapas para la producción de etanol:

- Preservación del inóculo por medio de prácticas de conservación que permitan que las cepas mantengan su capacidad biosintética. Éstas son, principalmente, el almacenamiento a baja temperatura (poco útil), congelación (aunque rápida, no es viable) o liofilización (consigue un mayor número de células viables al usar agentes protectores).
- Crecimiento del inóculo, que consiste en la recuperación de las células conservadas en condiciones adecuadas para su aplicación industrial.
- Precultivo, que consiste en obtener la cantidad suficiente de células para poder usar como inóculo en la fase de producción. Si esto no se consigue, se producen menores concentraciones de producto y unos mayores tiempos de retardo de los esperados. Estas cantidades son entre 0.1 y 3% para bacterias, de 5 a 10% para hongos y actinomicetos y de 1 a 500000 esporas por litro de cultivo.
- Producción. Se coloca el inóculo en contacto con los nutrientes que le servirán de sustrato y las condiciones en las que crecerá, estando éstas en los rangos:

Temperaturas para mesófilos (de 20 a 45 °C) y para sicrofilos (de 5 a 20 °C).

Entre 0.25 y 1 ppm de O₂.

Sobrepresión (de 0.2 a 0.5 atm sobre la atmosférica), lo que evita las contaminaciones.

Agitación en función del tamaño del fermentador, ya que permite homogeneizar el medio de cultivo, pero si es demasiado alta puede inhibir el crecimiento bacteriano. (19)

Al finalizar la fermentación, el producto de interés se encuentra en el caldo de fermentación junto con numerosos compuestos que, en muchas ocasiones, presentan propiedades similares a éste, lo que complica la

purificación del compuesto final. Estas características de los fluidos biológicos son:

- Alta viscosidad y comportamiento no newtoniano del fluido, lo que dificulta la predicción de propiedades.
- Baja filtrabilidad, pobre sedimentación y alta retención de agua.
- Baja estabilidad térmica y química.
- Tendencia a formar emulsiones.

Así, los procesos de filtración constarán, generalmente, de las siguientes etapas:

- Separación y rotura de células para el caso de que el producto se genere de forma intracelular; si no es así, no es necesario.
- Aislamiento del producto. No se efectúa de un modo muy estricto, por lo que sólo consigue elevar en parte la concentración del producto. Permite facilitar la posterior purificación.
- Purificación, donde se obtienen ya altas concentraciones de producto.
- Acondicionamiento, esto es, desecación,... para comercializar o conservar el producto. (7)

3.5. Condiciones de la fermentación

Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, los mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para "fabricar" nuevos. Este proceso continúa hasta que algún nutriente del medio de cultivo se agota (sustrato limitante) y el crecimiento se detiene. También puede detenerse este por acumulación de alguna sustancia inhibidora formada por los mismos microorganismos, pero supóngase por ahora que éste no es el caso y que la primera alternativa es la válida. Luego hay dos aspectos claramente diferenciables que hacen al crecimiento microbiano: uno estequiométrico,

por el cual la concentración final de microorganismos obtenidos dependerá de la concentración y composición del medio de cultivo, y el otro cinético, el que dirá con qué velocidad se lleva a cabo el proceso. (17)

En la fermentación las levaduras utilizadas para la elaboración de etanol (*S. cerevisiae*) utilizan los azúcares, la sacarosa es hidrolizada primeramente por la invertasa localizada en el espacio periplasmático extracelular. Los azúcares son transportados a través de la membrana celular por transporte activo o pasivo, mediado por permeasas producidas constitutivamente o inducibles. La maltosa y la maltotriosa son hidrolizadas intracelularmente por la α -glucosidasa, todas las levaduras ***Saccharomyces*** son incapaces de hidrolizar el almidón y las dextrinas, y por lo consiguiente, el empleo de materiales basados en almidón para la fermentación alcohólica requieren la acción de enzimas exógenos como las α - y β -amilasas de la malta o enzimas microbianos como α -amilasa, amiloglucosidasa (glucoamilasa) y polulanasa. (18)

Aunque las fermentaciones alcohólicas son en gran medida anaerobias, las levaduras necesitan algo de oxígeno para sintetizar algunos esteroides y ácidos grasos insaturados componentes de la membrana. Muchas cepas de *S. cerevisiae* pueden producir concentraciones de etanol de hasta el 12-14%, existe un cierto interés en el empleo de levaduras tolerantes de cantidades elevadas de alcohol en los procesos de fabricación de cerveza con gravedad elevada y en la producción de alcohol para la destilación con vistas a incrementar la productividad de la planta y disminuir los costos de destilación. Existen cepas seleccionadas capaces de producir hasta un 18-20% de alcohol, aunque la velocidad de fermentación se ve fuertemente reducida cuando la concentración de etanol aumenta. (17)

La composición de fosfolípidos de la membrana plasmática es importante para la tolerancia del etanol, observándose un incremento de ésta cuando el contenido de ácido grasos insaturados aumenta. La tolerancia

alcohólica puede elevarse suplementando el medio de crecimiento con ácidos grasos insaturados, vitaminas y proteínas. Los factores fisiológicos tales como la forma de aporte del sustrato, la acumulación de etanol intracelular, la presión osmótica y la temperatura influye en la tolerancia de las levaduras al etanol. (26)

En las levaduras, los valores de pH comprendidos entre 3 y 6 son la mayoría de las veces favorables al crecimiento y actividad fermentaria; esta última es mayor cuando mayor sea el pH y se produce una caída notable a valores de pH de 3-4. Este influye en la formación de subproductos; por ejemplo, a valores elevados se incrementa la formación de glicerol. (11)

Las temperaturas óptimas de fermentación, la respiración de las levaduras y el crecimiento celular son claramente diferentes. La velocidad de fermentación aumenta generalmente con la temperatura entre los 15 y los 35°C y los niveles de glicerol, acetona, buteno-2,3-diol, acetaldehído, piruvato y 2-cetoglutarato se elevan en los caldos de fermentación. La formación de niveles elevados de alcohol también depende de la temperatura. (21)

3.6. Materias primas y su importancia en el proceso fermentativo.

Para la producción de etanol han sido utilizadas diferentes fuentes de carbono como materia prima; estas deben ser transformadas con facilidad en azúcar fermentable. Su uso práctico estará determinado por el rendimiento en etanol, por su costo y el tipo de microorganismo que se utilice. (21)

Varios autores, coinciden en definir 3 tipos de materias primas para la producción de etanol: (18)

- Materiales portadores de azúcares simples que contienen carbohidratos como fuente de azúcares. (Tales como jugo de caña de azúcar, melazas, sorgo dulce, etc.).
- Materiales amiláceos los cuales contienen almidón como fuente de azúcares. (Tales como la yuca, maíz, papa, etc.).
- Materiales celulósicos, que contienen celulosa, hemicelulosa, Tales como el bagazo, la madera, residuos agrícolas, etc.

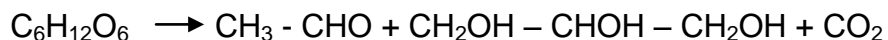
El etanol se produce por fermentación de estas materias primas con levaduras u otros microorganismos. Las de la primera clase fermentan directamente. El segundo tipo consta de hidratos de carbono complejos, como el almidón, que primero se deben convertir en azúcares fermentables mediante la acción de enzimas. Las sustancias celulósicas de la tercera clase se convierten en azúcares fermentables por hidrólisis con ácidos inorgánicos, principalmente residuos Lignocelulósicos. (15)

3.7. Tipos de fermentación alcohólicas (19)

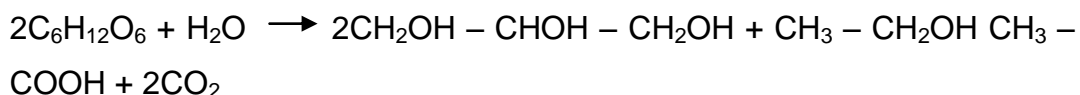
Primer tipo: Fermentación alcohólica- cuando esta transcurre libremente, sin la intervención de factores externos, los productos finales son el alcohol etílico y anhídrido carbónico lo cual se reduce en la ecuación de Gay-Lussac.

Segundo tipo: fermentación aldehído-glicérica si se añade bisulfito sódico al medio en que se desarrolla, se bloquea el aldehído acético por captación y los productos finales de la reacción son entonces el aldehído acético, la glicerina y el anhídrido carbónico, los principales pues ya hemos visto que se produce siempre una pequeña cantidad de alcohol

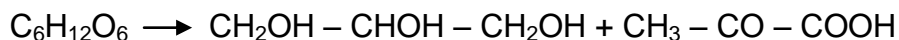
etílico de acuerdo con el primer tipo, la ecuación que rige este tipo de fermentación aldehído glicérica es:



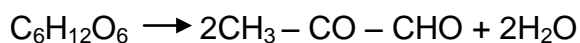
Tercer tipo: fermentación glicérico-alcohólica-acética realizandola en un medio débilmente alcalino, el aldehído experimenta una desmutación; faltando el natural receptor de Hidrógeno, nos encontramos con que, además de la glicerina y del alcohol etílico, se produce ácido acético y anhídrido carbónico, la ecuación global que resume todo es proceso es:



Cuarto tipo: fermentación glicérico-pirúvica esta es producida en un medio neutro conduce a la formación de glicerina y ácido pirúvico en cantidades equimolares.



Quinto tipo: fermentación metilglioxalica la acción sola de la apozimasa sobre los hexofosfatos conduce a la producción de metilglioxal y agua.



3.8. Procesos tecnológicos para la producción de etanol ⁽¹¹⁾ (fig. N° 3)

3.8.1. Preparación del sustrato:

Si se usa *Saccharomyces cerevisiae* y se proporciona un sustrato almidonado, hay que adicionar amilasas o hidrolizar dicho almidón (este microorganismo no puede hacerlo).

Otros materiales azucarados, como melazas, jugos azucarados, etc., son adecuados, pero se usan más para otros procesos.

Celulosa: son difícilmente hidrolizables. Se usan cultivos mixtos sobre el sustrato sólido de la levadura en cuestión con ***Clostridium thermocellum***, ***Clostridium thermosaccharalyticum*** o ***Trichoderma reesei***, capaces de efectuar dicha degradación.

Si se usan sueros lácticos, no se puede usar ***Saccharomyces***, ya que es incapaz de degradar la lactosa. Se usan entonces cepas modificadas de ***Torula cremoris*** y ***Candida pseudotropicalis***.

3.8.2 Fermentación ⁽¹⁹⁾

Se dan principalmente procesos discontinuos en tres fases:

- Desarrollo celular: se somete el cultivo a fuerte oxigenación durante 12-24 horas.
- Síntesis. Se reduce la oxigenación, lo que produce la reducción del crecimiento celular y el inicio de la producción durante 24-36 h. Como consecuencia del proceso, se libera calor, que puede elevar la temperatura hasta los 40°C.
- Se detiene la síntesis por aumento de la oxigenación, lo que vuelve a aumentar el crecimiento celular. Se puede prolongar hasta 72 horas.

3.8.3. Purificación

El alcohol se obtiene por destilación. Primero, han de extraerse las células por sedimentación (generalmente) o centrifugación y se elimina el CO₂ tras etapas de lavado. Entonces, se destila el caldo en columnas de rectificación.

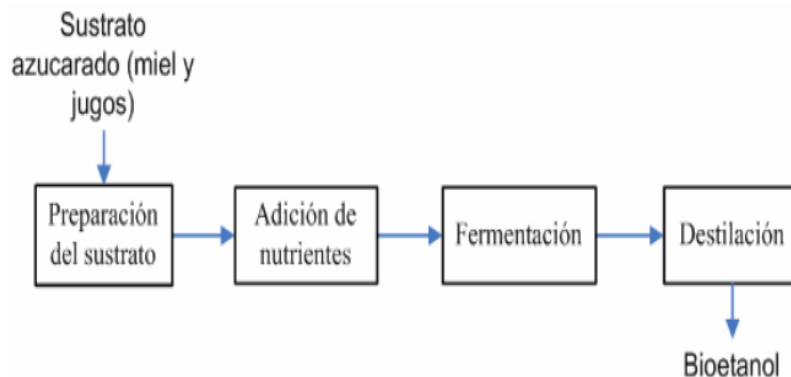


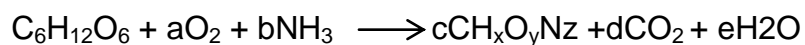
Fig. Nº 3 diagrama de flujo para la producción de etanol vía fermentativa.

3.9. Cinética de la fermentación ⁽¹⁹⁾

Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, los mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para "fabricar" nuevos microorganismos. Este proceso continúa hasta que algún nutriente del medio de cultivo se agota (sustrato limitante) y el crecimiento se detiene. También puede detenerse el crecimiento por acumulación de alguna sustancia inhibidora formada por los mismos microorganismos, pero supóngase por ahora que éste no es el caso y que la primera alternativa es la válida. Luego hay dos aspectos claramente diferenciables que hacen al crecimiento microbiano: uno estequiométrico, por el cual la concentración final de microorganismos obtenidos dependerá de la concentración y composición del medio de cultivo, y el otro cinético, el que dirá con qué velocidad se lleva a cabo el proceso.

3.9.1. Estequiometria del crecimiento. (19)

Las cantidades de los nutrientes pueden determinarse por estequiometria:



Para calcular los coeficientes estequiométricos (tabla N° 2) es necesario conocer el análisis elemental de los microorganismos.

Tabla N° 2 principales microorganismos involucrados en la fermentación, así como el nutriente esencial y formula empírica.

Microorganismo	Nutrientes limitantes	Formula empírica
<i>Aerobacter aerogenes.</i>		CH _{1,78} N _{0,24} O _{0,33}
<i>Klebsiella aerogenes.</i>	Glicerol	CH _{1,74} N _{0,22} O _{0,43}
<i>Candida utilis.</i>	Glucosa	CH _{1,84} N _{0,2} O _{0,56}
<i>Candida utilis.</i>	Etanol	CH _{1,84} N _{0,2} O _{0,55}
<i>Saccharomyces cerevisiae.</i>	Glucosa	CH _{1,70} N _{0,17} O _{0,46}

3.9.2. Estequiometria de formación de producto. (19)

Si el producto principal se genera del metabolismo primario puede escribirse una reacción química similar al caso del crecimiento microbiano.



No siempre se puede relacionar la formación de producto con el consumo de substrato, crecimiento celular, es por ello que en estos casos la aplicación de estequiometria simple no es posible.

3.9.3. Fases del crecimiento celular (19)

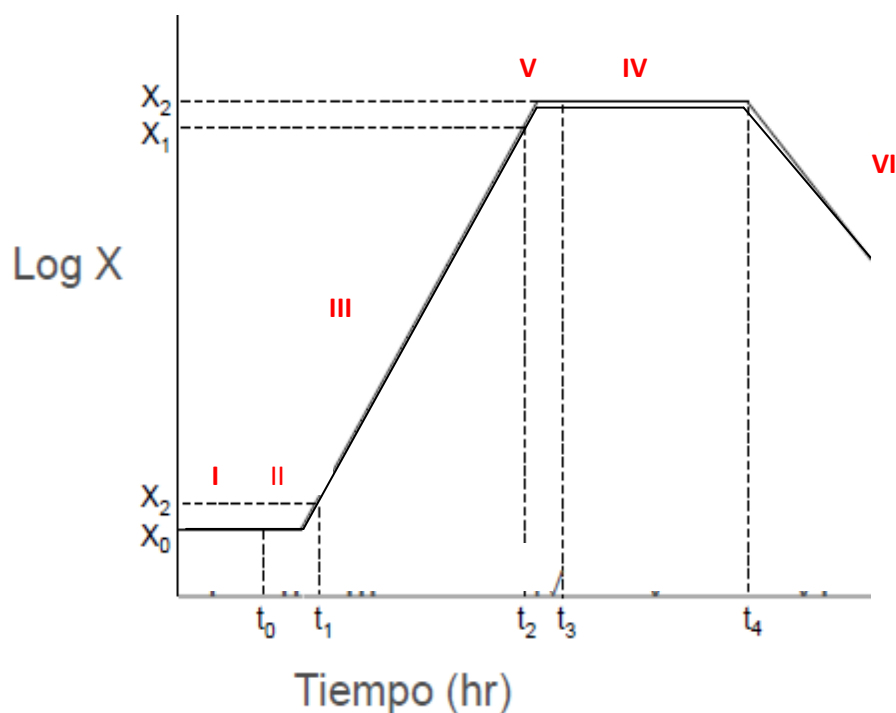


Fig. N° 4. Representaciones grafica de la cinética de crecimiento (I Lag, II Aceleración, III Exponencial, IV Desaceleración, V Estacionaria y VI Declive o Muerte.)

I fase lag. (Ver figura N° 4)

Fase lag o fase de adaptación es la expresión de un período de adaptación en el cual los microorganismos se adaptan al medio de producción en esta fase no se produce multiplicación celular.

II Fase de Aceleración. (Ver figura N° 4)

Parte de las células comienzan a dividirse generando una nueva producción elevada de células hijas que poco a poco se adaptan al medio de producción.

III Fase Exponencial. (Ver figura N° 4)

El cultivo está en estado auto catalítico, y el crecimiento celular se incrementa exponencialmente, es un período relativamente corto.

IV, V, VI Fase de declinación o retardo. (Ver figura N° 4)

Representa el fin del período exponencial está dada por:

- Agotamiento de un sustrato.
- Acumulación de un inhibidor.
- Otras causas ajenas al crecimiento.

3.10. Usos del etanol ⁽¹¹⁾

Los usos del etanol en la industria son amplios y van desde la elaboración de productos cosméticos, productos de limpieza, etc. Se ha investigado la posibilidad de emplear la fermentación etílica en el tratamiento de los vertederos de basura logrando de esta forma biocombustibles, los estudios no han arrojado aplicaciones concluyentes. No obstante el empleo de la fermentación alcohólica tiene un éxito potencial en el tratamiento de los residuos de la industria alimenticia. Un proceso

industrial muy investigado a comienzos del siglo XXI es la fermentación en estado sólido empleada en la biomedicación y en la biodegradación de productos de desecho, la transformación biológica de residuos agroindustriales, en la producción de compuestos bioactivos, de enzimas, de ácidos orgánicos, biopesticidas, biocombustibles y compuestos aromáticos, entre otros.

3.11. Caracterización de la planta de piña.

3.11.1 Generalidades. (1)

La piña se conoce científicamente con los nombres de ***Ananas comosus***, ***Ananas sativa*** y ***Bromelia ananas***.

Se cultiva con verdadero provecho en las zonas tropicales y subtropicales, en terrenos arcillosos y limosos y con buen desagüe. Necesita una altura sobre el nivel del mar no superior a los 800 metro, con temperatura media entre 25 °C y 26 °C y una mínima de 13 °C, y precipitación pluvial anual de alrededor de 1000 mm, sin largos periodos de sequia. La siembra se efectúa entre agosto y diciembre, y tarda en fructificar de 18 a 20 meses, según las condiciones ecológicas y el método de cultivo.

3.11.2. Descripción botánica de la piña. (1)

La piña es una fruta compuesta está constituida por una colección de pequeñas frutas llamadas frutillas, es una planta terrestre, herbácea, perenne y monocárpica de 0.7 metros de altura y con una cobertura de 0.9 a 1.2 metros. La conforma el tallo o pedúnculo, las hojas, las raíces, la inflorescencia o fruto y los hijos. El fruto de piña es una sorosis, es decir, un sincarpo de frutos individuales fusionados; la bráctea, el cáliz y el tejido ovárico se fusionan dentro y entre frutos individuales durante el desarrollo filogenético para formar el fruto colectivo.

Cada fruto individual aparece en el exterior en forma de escudete duro y prominente y es lo que comúnmente se llama Ojo de la piña; la mitad inferior del escudete está cubierta por la bráctea que se ha doblado hacia arriba y la mitad superior por los tres sépalos. De cada flor se desarrolla un fruto individual que aparece hacia el exterior en forma de escudete, los cuales constituyen la corteza dura y cerosa del fruto.

3.11.3. Variedades. ⁽¹⁾

Se consideran más de 100 variedades de piña, entre las que se encuentran 6 grupos principales tipo Reyna, Puerto Rico, Golden, Española, India y Cayena lisa. La que se cultiva en Centroamérica y se exporta al país es principalmente la variedad de Golden proveniente de Costa Ricas, India y Cayena lisa provenientes de la región Mexicana. La variedad Golden cuyo fruto es mediano, de color amarillo, jugoso; posee características el corazón más pequeño en relación al tamaño de la fruta. Su sabor y aroma son agradables.

3.11.4. Madurez fisiológica. ⁽²⁴⁾

Las diferentes etapas (fig. N° 5) de desarrollo de un fruto son:

- Sazonamiento.
- Maduración.
- Senescencia.

Estos nombres fueron asignados en base a una serie de cambios físicos y bioquímicos ocurridos en tiempos específicos durante el desarrollo de la fruta. El conocimiento de los cambios que normalmente ocurren en la piña es de gran importancia, ya que nos permite saber el estado de madurez adecuado en que debe ser cosechada.

En la práctica, determinar el estado de madurez en base a los cambios bioquímicos sucedidos en el fruto resulta laborioso e impráctico. Para esta

finalidad se han establecido escalas comerciales que facilitan la identificación del estado de madurez basados simplemente en la coloración de la cáscara para el aprovechamiento de los azúcares fermentables. Se considera que una piña está madura cuando el 100% de cáscara es amarilla.

Al momento de la cosecha el fruto de piña nativa variedad india presenta una coloración marrón brillante dada la desaparición de gran cantidad de tricomas; en el centro se eleva una punta que es el vestigio de la fusión entre sépalos y la bráctea de color amarillo-naranja. El borde del escudete se encuentra delineado por una tonalidad amarillo-verde. El fruto en óptimo estado de madurez debe poseer un contenido final de sólidos solubles de 13-15% (puede variar según su variedad), registrar una firmeza de 1.7-2,4 kgf/cm², una acidez total de 0.5-0.6% y una relación de madurez de 30.

3.11.5. Cambios composicionales durante el desarrollo. (1)

La mayor de los carbohidratos solubles que contiene la piña son: disacáridos (sacarosa) y monosacáridos (glucosa y fructuosa) (tabla N° 3). De la presencia de estos depende parte del sabor del fruto, que es un factor importante para su aceptación o su rechazo ya que constituyen los carbohidratos fermentables por *S. cerevisiae*. Durante el periodo de maduración de la fruta la cantidad de sacarosa presenta un máximo de concentración y posteriormente declina. Lo contrario ocurre con los azúcares reductores directos y totales, los cuales continúan su incremento durante todas las etapas de desarrollo de la fruta.

Tabla N° 3 composición del jugo de piña (*se encuentra en la cáscara)

Calorías	49.0 cal/g	Manganeso	0.6 mg
Agua	86.2 %	Hierro	0.6 mg
Sacarosa	66 %	Sodio	0.5 mg
Glucosa	17 %	Cobre	0.04 mg
Fructosa	17 %	Vitamina A	80.0 IU
Acido cítrico	0.6 %	Vitamina C	9.0 mg
Cenizas*	0.4 %	Vitamina B ₆	0.76 mg
Proteínas*	0.3 %	Vitamina B ₁	0.05 mg
Grasas*	0.1 %	Vitamina B ₂	0.02 mg
Fibra*	0.1 %	Ac. Pantoténico	0.1 mg
pH	3.7	Ac. Fólico	0.001 mg
Potasio	140.0 mg	Bromelina	41.1 mg
Calcio	15.0 mg	Oxalatos	6.3 mg
Magnesio	12.0 mg	Acido málico	0.5%
Fosforo	8.0 mg		

3.11.5.1. Ácidos. (24)

Los ácidos de mayor importancia en la piña, basado en su concentración son el cítrico y el málico. De estos, el primero aporta alrededor del 80% de la acidez total. También existe en la fruta pequeña cantidad de ácido ascórbico, pero este contribuye en muy baja proporción a su acidez. Durante la pos cosecha la acidez titulable exhibe un leve aumento, pero posteriormente tiende a bajar hasta llegar ligeramente arriba de su punto inicial.

3.11.5.2. Pigmentos. (1)

El proceso de maduración de la piña está asociado con una disminución en la concentración de clorofila en la cáscara. En la pulpa, los carotenoides pasan de una concentración mínima a los 40 días antes de la etapa conocida como maduración, a una concentración máxima en el

punto en que la fruta está completamente madura. Posteriormente el proceso continua, pero más lentamente.

3.11.5.3. Otros componentes. (1)

En la última etapa de maduración del fruto se producen esterres y compuestos volátiles como acetaldehído, acetato de etilo, acetona, etanol, propionato de etilo, etc. Los compuestos nitrogenados varían con el estado de desarrollo de la fruta; los principales constituyentes son complejos enzimáticos tales como bromelina. Sin embargo, no se considera que las sustancias peptídicas contribuyan considerablemente con la calidad de la fruta.

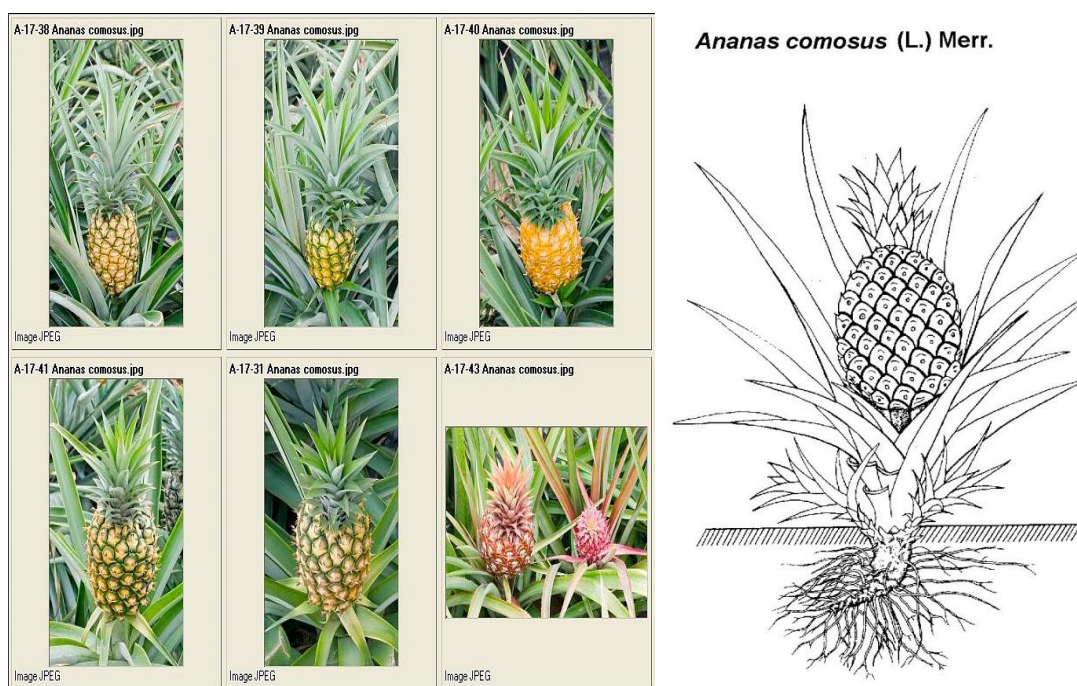


Fig. N° 5 variedad de frutos de *Ananas comosus*.

3.12. Espectrometría de absorción en el infrarrojo (23)

Aunque con algunas excepciones, se puede decir que cualquier molécula que contenga enlaces covalentes, absorbe radiación en la región infrarroja del espectro. Si consideramos una molécula diatómica sencilla, esta puede representarse como dos masas conectadas entre sí mediante un muelle (enlace) que se estira o encoge con respecto a una distancia media o de equilibrio. Si se irradia esta molécula con un haz de radiación monocromática cuya frecuencia sea la misma que la frecuencia de vibración del enlace, se producirá la absorción de la radiación. En otras palabras, la componente eléctrica de la onda transmitirá su energía al enlace si existe concordancia entre la frecuencia mecánica de vibración del enlace y la frecuencia electromagnética de la radiación (fig. N° 6). La energía absorbida servirá para incrementar la amplitud de la vibración mecánica del mismo.

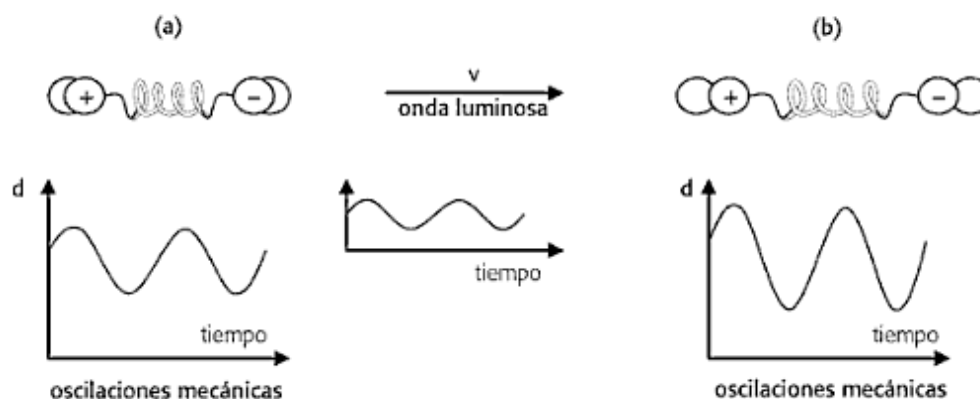


fig. N° 6 Movimientos moleculares en absorción infrarroja.

La absorción de radiación IR produce cambios de energía en el orden de 8 a 40 KJ/mol que se corresponde con frecuencias que coinciden con las frecuencias vibracionales de tensión y de reflexión de la mayoría de los

enlaces covalentes de las moléculas. Sin embargo, no todos los enlaces de una molécula son capaces de absorber radiación en el IR, incluso cuando la frecuencia de la radiación coincide exactamente con la del tipo de enlace.

Para que una molécula absorba en el infrarrojo, se debe presentar un cambio en el momento dipolar de la molécula durante la vibración, ya que solo en estas circunstancias el campo eléctrico de la radiación puede interaccionar con la molécula. El momento dipolar está determinado por la magnitud de la diferencia de cargas y por la distancia entre ambos centros de carga. Por tanto, en moléculas diatómicas en las que los átomos son iguales (O_2 , N_2), el momento dipolar no sufre un cambio neto durante la vibración o rotación y, por tanto, estos compuestos no absorben radiación en el infrarrojo.

Pueden distinguirse dos clases de vibraciones fundamentales en las moléculas, de tensión o alargamiento y de deformación o flexión (fig. N° 7).

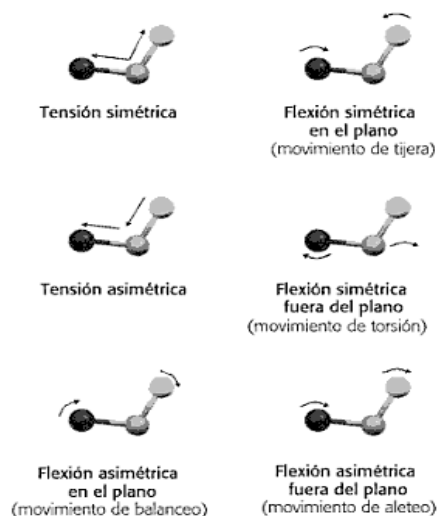


Fig. N° 7 movimientos en el plano de las moléculas en el infrarrojo.

3.12.1. Espectros de infrarrojos en el análisis cualitativo (23)

El espectro de infrarrojo va a ser característico para cada compuesto y proporciona información muy útil para su identificación. En cada espectro aparecen una serie de bandas o picos a determinada frecuencia de radiación (fig. N° 8), las cuales son el resultado de las distintas transiciones energéticas que se producen en las moléculas al pasar de unos estados vibracionales y rotacionales a otros.

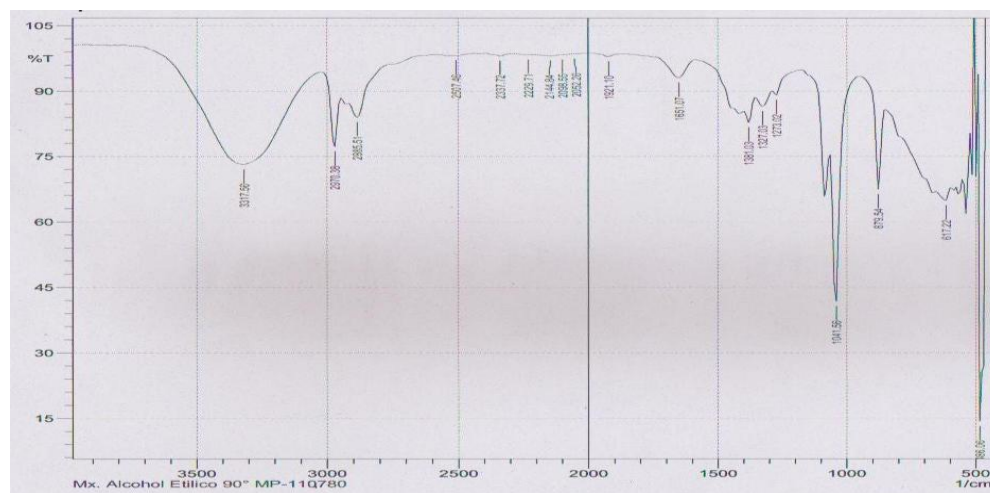


Fig. N° 8 espectro infrarrojo de análisis de etanol 90°

El modo más sencillo de identificar un compuesto a partir de su espectro de infrarrojo es comparando su espectro con el de otros compuestos puros. La mayoría de los instrumentos modernos (fig. N° 9) tienen catálogos de espectros que permiten realizar de manera más o menos rápida esta comparación. Para proceder a la identificación de un compuesto primero se determina n los grupos funcionales presentes en el mismo, observando la zona del espectro conocida como región de frecuencias de grupo (comprendida entre 3600 y 1200 cm^{-1}) para ello, se utilizan a modo de ayuda las tablas de frecuencias de grupo que recogen

el intervalo de frecuencia dentro del cual es posible encontrar una banda de absorción para un determinado grupo funcional.

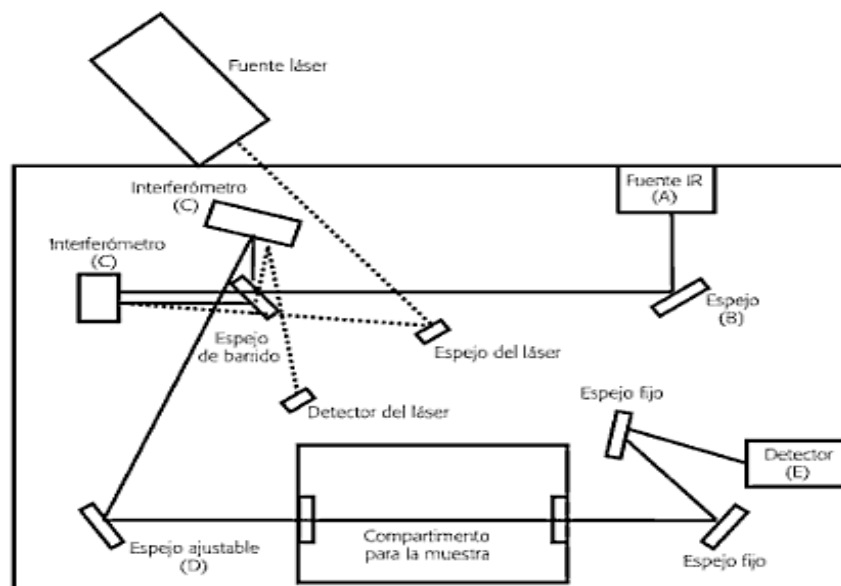


Fig. N° 9 funcionalidades internas del espectrógrafo infrarrojo

3.12.2. Manejo de las muestras (23)

Para obtener el espectro de IR de un compuesto, se debe colocar la muestra en una celda o soporte (fig. N° 10) que deba estar construido por una sustancia iónica (normalmente NaCl o KBr). Las celdas de bromuro de potasio son más caras que las de cloruro de sodio y tienen la ventaja de que son útiles en el intervalo $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Las celdas de cloruro de sodio se usan ampliamente porque son más baratas pero el rango útil se encuentra entre 4000 y 650 cm^{-1} . Sin embargo, debido a que por debajo de 650 cm^{-1} aparece pocas bandas de interés, normalmente se utilizan el NaCl en las medidas de rutina.

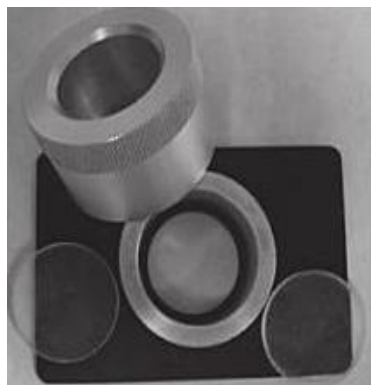


Fig. N° 10 celdas o porta muestras usados en espectrofotometría infrarroja

3.13. Potencial de iones Hidrogeno. (pH) (2)

El pH es un valor que indica el nivel de acidez del producto y se mide en una escala de 0 a 14. Un valor de 7 es neutro. Los valores menores de siete son ácidos, los mayores de siete son alcalinos. El jugo de piña presenta valores entre 3.5 y 4 y, por lo tanto, es relativamente ácida. El pH puede ser medido con diferentes dispositivos que van desde papel indicador hasta equipos portátiles (fig. N° 11) que dan un valor más preciso



Fig. N° 11 Aparato portátil para medir el pH.

3.13.1. Efectos del pH en la levadura de *Saccharomyces cerevisiae* (11)

Saccharomyces cerevisiae es una levadura catalogada como acidofila, el pH de crecimiento ronda de entre 4-7, aunque a valores de 8-9 puede fermentar metabolitos considerados por la vía metabólica glicérica. A pH de 7 aumenta la formación de biomasa y disminuye el proceso fermentativo de producción de etanol por vía de EMP (fig. N° 2). El pH del jugo piña es el ideal ya que proporciona el óptimo para llevar a cabo la fermentación alcohólica, ya que a pH ligeramente ácidos se ve favorecida la ruta metabólica EMP para fermentación alcohólica.

3.13.2. Determinación experimental del pH de una solución (2)

3.13.2.1 Papel pH

Una forma rápida y práctica, aunque no muy precisa, de determinar el pH de una solución es colocar una gota de la solución en un papel embebido en indicadores (fig. N° 12) cuyo color cambia con el pH.



Fig. N° 12 papel pH indicador con escala.

3.13.2.2. pH metro (23)

El pH metro es equipo capaz de detectar una lectura precisa del pH en una solución acuosa u oleosa. Consiste en 2 electrodos que se fundamentan en una reacción potenciométrica, los electrodos que más se usan son los de vidrio porque permiten un intercambio iónico adecuado y aísla la solución tampón del medio o la muestra. La lectura se realiza de manera directa sobre el registrador digital (fig. N° 13) las cuales pueden ser con más de 2 decimales para una mayor precisión del valor de pH.



Fig. N° 13 potenciómetro o pH metro

Grados Brix (2)

3.14. Grados Brix.

Los grados Brix proporcionan una medida objetiva de la concentración de azúcares disueltos en un producto y de la idea del nivel de dulzura del mismo. Los grados Brix se miden usando el refractómetro o brixómetro.

El refractómetro es un equipo que proporciona una lectura del índice de refracción de una muestra líquida a la vez da el valor de los grados Brix

que la muestra presenta. El refractómetro (fig. N° 14) consta de 2 prismas un primario y secundario en este colocamos la muestra, posee un ocular donde el analista observa la lectura. Además cuenta con un termómetro digital para poder tomar la lectura de la temperatura a la cual se hace el análisis, para que posteriormente podamos hacer la corrección (ecuación N° 1) del índice de refracción real con la por una diferencia de temperaturas a la cual el equipo esta calibrado.



Fig. N° 14, refractómetro de ATAGO para realizar lecturas de grados Brix.

Ecuación N° 1 para realizar corrección de índice de refracción en refractómetro de ATAGO

$$n_{Dreal} = n_{Dt} \pm F_d$$

Donde:

n_{Dreal} = índice de refracción real.

n_{Dt} = índice de refracción tomado a la temperatura a la cual registra el termómetro digital.

F_d = factor de diferencia. (Ecuación N° 2)

Ecuación N° 2 para calcular el factor de diferencia (F_d).

$$F_d = |T_c - T_a| \times 0.004$$

Donde:

T_c = temperatura de calibración del refractómetro.

T_a = temperatura a la cual se hace la lectura de la muestra en el refractómetro.

0.004 = constante refractometrica de error de incerteza.

En signo \pm de la ecuación 1 indica una suma cuando la temperatura a la cual se hace la lectura de la muestra en el refractómetro es menor a la temperatura de calibración del refractómetro.

Después de haber calculado el índice de refracción real podemos calcular también determinar los grados Brix reales de la muestra, esta determinación se lleva a cabo en el refractómetro directamente

IV. DISEÑO METODOLOGICO

A. TIPO DE ESTUDIO.

Experimental y Prospectivo ya que se demostró como intervienen las variables de pH y grados Brix en el proceso fermentativo de producción de etanol, así también este estudio servirá para dar un futuro seguimiento en la evaluación de las otras variables que intervienen en este proceso.

B. INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA.

La investigación bibliográfica se llevó a cabo en las bibliotecas de las siguientes universidades:

Universidad Centroamérica José Simeón Cañas (UCA)

Universidad Nueva San Salvador (UNSSA)

Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM)

Universidad José Matías Delgado

Así como las bibliotecas de las facultades de Ingeniería y Arquitectura, Ciencias Agronómicas y la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

C. INVESTIGACION DE CAMPO.

Universo: Todas las variables que intervienen en el proceso fermentativo (temperatura del proceso fermentativo, oxígeno disuelto en el medio de producción, pH del medio de producción, Agitación del medio de producción en el proceso fermentativo, concentración de microorganismo fermentador y la concentración de sólidos totales en grados Brix).

Muestra: Delimitada y puntual a las variables de pH y grados Brix.

Sustrato empleado: medio sustrato de cáscaras de piña de la variedad golden.

4.1. Preparación y estandarización del microorganismo productor (*Saccharomyces cerevisiae*) ⁽¹⁵⁾

- Pesar 0.1 gramos de *Saccharomyces cerevisiae* comercial liofilizada, en balanza digital. (ver Anexo 2).
- Adicionar en 10 mL de agua estéril contenidos en un tubo de ensayo de aproximadamente 20 mL de capacidad a una temperatura de 35 °C \pm 2°C y agitar hasta una completa homogenización de la levadura.
- Preparar 100 mL de extracto de malta, disolviendo 1.96 g de extracto de malta en polvo en 100 mL de agua estéril y agitar hasta una completa homogenización.
- Incorporar 10 mL de levadura diluida a los 100 mL de extracto de malta en caldo (ver Anexo 2), agitar e incubar por un tiempo de 48 horas con agitación. Y se observar en el microscopio al cabo del tiempo para identificar el crecimiento de la levadura.
- Estandarizar en un espectrofotómetro 25% de transmitancia a λ de 580 nm (ver Anexo 2) usando como blanco extracto de malta. Diluyendo cuando sea necesario.

4.2. Ensayo con modificación de la variable de grados Brix. ⁽⁷⁾

- De un fruto de piña fresco de la variedad golden, maduro y limpio cortar sus cáscaras completamente.
- Licuar las cáscaras utilizando una pequeña cantidad de agua.
- Realizar un filtrado con un equipo de filtración al vacío y recoger el filtrado en un Erlenmeyer de 1000 mL (aproximadamente 1000 mL).
- Determinar los grados Brix con el refractómetro de ATAGO (el medio de producción madre, ajustar a 25.0 Brix y colocar 100 mL del medio de producción en Erlenmeyer de 250 mL. (realizar por duplicado).

- Ajustar los Brix con agua destilada en el refractómetro de ATAGO, el medio de producción madre hasta 20.5, Brix y colocar 100 mL del medio de producción madre en un Erlenmeyer de 250 mL. (realizar por duplicado).
- Ajustar los Brix con agua destilado en el refractómetro de ATAGO, el medio de producción madre hasta 18.5, Brix y colocar 100 mL del medio de producción madre en un Erlenmeyer de 250 mL. (realizar por duplicado).
- Ajustar los Brix con agua destilada en el refractómetro de ATAGO, el medio de producción madre hasta 14.5, Brix y colocar 100 mL del medio de producción madre en un Erlenmeyer de 250 mL (realizar por duplicado).
- Ajustar los Brix con agua destilada en el refractómetro de ATAGO el medio de producción madre hasta 4, Brix y colocar 100 mL del medio de producción madre en un Erlenmeyer de 250 mL. (realizar por duplicado).
- Agregar a cada uno de los Erlenmeyer con diferentes grados Brix cada una de las siguientes sales para favorecer la fermentación: 0.1 gramo de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amonio), 0.1 gramo de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnesio heptahidratado), 0.1 gramo de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (bifosfato de amonio). Y Agitar hasta una completa disolución.
- Esterilizar el medio de producción en un autoclave a 121°C x 15 minutos.
- Inocular cada uno de los diferentes Erlenmeyer a diferentes grados Brix, 10.0 mL de microorganismo estandarizar (***Saccharomyces cerevisiae***).
- Incubar a una temperatura aproximada de $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas (2 días).

- Colocar un Erlenmeyer de 250 mL, con 100 mL de medio de producción sin inocular microorganismo. (Erlenmeyer de referencia o blanco).(Ver Figura N° 24)

-

4.3. Análisis posterior del ensayo de la variable de grados Brix. (24)

- Destilar cada uno de los filtrados utilizando un destilador simple y recibir el destilado en tubos de ensayo con tapón para evitar la evaporización de la posible muestra de etanol.
- Determinar el punto de ebullición del filtrado obtenido, tomando en cuenta la temperatura de ebullición a la cual comienza a destilar y comparar con el punto de ebullición teórico del etanol.
- Identificar la muestra filtrada por destilación con un espectrofotómetro ultravioleta visible usando como estándar alcohol etílico absoluto (90°).

4.4. Ensayos con modificación de la variable de pH. (21)

- De un fruto de piña fresco de la variedad golden, maduro y limpio cortar sus cáscaras completamente.
- Licuar las cáscaras utilizando una pequeña cantidad de agua.
- Filtrar con papel filtro poro grueso evitando la acumulación de sólidos en el filtrado, recolectar el filtrado en un Erlenmeyer de 1000 mL, para el filtrado (aproximadamente 1000mL).
- Filtrar el licuado de cascaras haciendo uso de un equipo de filtración al vacio.
- Agregar al medio de producción las siguientes sales para favorecer la fermentación: 1.0 gramos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (sulfato de amonio) 1 gramo de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnesio heptahidratado), 1 gramo de

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (bifosfato de amonio). Agitar hasta una completa disolución.

- Regular con el refractómetro de ATAGO, el medio de producción a 20° Brix regulando con agua desmineralizada cuando es mayor a este valor.
- Dividir en 3 grupos el medio de producción agregando 100 mL en Erlenmeyer de 250 mL. (realizar por duplicado).
- El primer set de Erlenmeyer (2) regular el pH a 3.0 con 1.0 mL de HCL 0.1 N, verificar el pH con tiras de papel escala pH.
- El primer set de Erlenmeyer (2), regular el pH a un valor de 4.0, y verificar el pH con tiras de papel escala pH.
- Al segundo set de Erlenmeyer (2), regular el pH a 5.0 con 1.2 mL de NaOH 0.1 N cuando sea necesario, y verificar el pH con tiras de papel escala pH.
- Al tercer set de Erlenmeyer (2), regular el pH a 6.0 con 2.1 mL NaOH 0.1 N cuando sea necesario y verificar el pH con tiras de papel escala pH.
- Esterilizar el medio de producción en un autoclave a 121 °C x 15 minutos.
- Inocular en cada uno de los Erlenmeyer de los diferentes pH con 10.0 mL de microorganismo estandarizado (***Saccharomyces cerevisiae***).
- Incubar a una temperatura aproximada de 30°C ± 2°C (temperatura ambiente) por 48 horas (2 días).
- Colocar un Erlenmeyer de 250 mL, con 100 mL de medio de producción sin inocular microorganismo. (Erlenmeyer de referencia o blanco). (Ver Figura N° 25)

4.5. Análisis posterior del ensayo de la variable de pH. (24)

- Destilar cada uno de los filtrados utilizando un destilador simple y recibir el destilado en tubos de ensayo con tapón para evitar la evaporización de la posible muestra de etanol. Determinar a qué pH se obtiene la máxima producción de etanol.
- Determinar el punto de ebullición del filtrado obtenido, tomando en cuenta la temperatura de ebullición a la cual comienza a destilar y se comparó con el punto de ebullición teórico del etanol.
- Identificar la muestra filtrada por destilación con un espectrofotómetro ultravioleta visible usando como estándar alcohol etílico absoluto (90°).

4.6. Realización de la cinética de fermentación con el ensayo del cual se hayan obtenido mayores rendimientos. (19)

- De un fruto de piña fresco de la variedad golden, maduro y limpio cortar sus cáscaras completamente.
- Licuar las cáscaras utilizando una pequeña cantidad de agua.
- Filtrar con un equipo de filtración al vacío, recoger el filtrado (aproximadamente 1500 mL) en un Beaker de 2000 mL.
- Agregar las siguientes sales para favorecer la fermentación: 1.5 gramos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amonio), 1.5 gramos de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnesio heptahidratado), 1.5 gramos de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (bifosfato de amonio). Y agitar hasta una completa disolución.
- Regular con el refractómetro de ATAGO, el medio de producción a los grados Brix de máxima producción de etanol según ensayo anterior (grados Brix = 20).

- Regular el pH de acuerdo a la máxima producción de etanol según ensayo anterior (pH = 4).
- Dividir el medio de producción madre en 14 Erlenmeyer de 250 mL (ensayo por duplicado), rotular según los tiempos de fermentación involucrados en la cinética (0 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas y blanco).
- Esterilizar cada uno de los Erlenmeyer con medio de producción en un autoclave a 121°C x 15 minutos.
- Inocular a cada uno de los Erlenmeyer 10.0 mL de microorganismo estandarizado (***Saccharomyces cerevisiae***).
- Incubar a una temperatura aproximada de 30°C ± 2°C por los tiempos de acuerdo a la cinética de fermentación. (0 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas y blanco). (Ver Figura N° 26)

4.7. Análisis posterior del ensayo con las variables óptimas de máxima producción de etanol. (24)

- Destilar cada uno de los filtrados utilizando un destilador simple y recibir el destilado en tubos de ensayo con tapón para evitar la evaporización de la posible muestra de etanol.
- Determinar el punto de ebullición del filtrado obtenido, tomando en cuenta la temperatura de ebullición a la cual comienza a destilar y se comparar con el punto de ebullición teórico del etanol.
- Identificar la muestra filtrada por destilación con un espectrofotómetro ultravioleta visible usando como estándar alcohol etílico absoluto (90°).
- Determinar el tiempo de máxima producción de etanol con los resultados obtenidos.

4.8. Determinación del índice de refracción y grados Brix de las muestras a analizar. (14)

- Encender el equipo y se dejó que se estabilice.
- Abrir los prismas del refractómetro.
- Limpiar cada uno de los primas del refractómetro con un algodón impregnado con alcohol 99°.
- Colocar con un gotero la muestra en el prisma inferior
- Cerrar los prismas del refractómetro asegurándose que estén bien fijados.
- Tomar el índice de refracción, los grados Brix y la temperatura a la que fue tomada la lectura.
- Determinar el índice de refracción y los grados Brix reales utilizando las siguientes ecuaciones:

Ecuación N° 1 para realizar corrección de índice de refracción en refractómetro de ATAGO

$$n_{Dreal} = n_{Dt} \pm F_d$$

Donde:

n_{Dreal} = índice de refracción real.

n_{Dt} = índice de refracción tomado a la temperatura a la cual registra el termómetro digital.

F_d = factor de diferencia. (Ecuación N° 2)

Ecuación N° 2 para calcular el factor de diferencia (F_d).

$$F_d = |T_c - T_a| \times 0.004$$

Donde:

T_c = temperatura de calibración del refractómetro.

T_a = temperatura a la cual se hace la lectura de la muestra en el refractómetro.

0.004 = constante refractométrica de error de incerteza.

En signo \pm de la ecuación 1 indica una suma cuando la temperatura a la cual se hace la lectura de la muestra en el refractómetro es menor a la temperatura de calibración del refractómetro y una resta cuando la temperatura a la cual se hace la lectura de la muestra en el refractómetro es mayor a la temperatura de calibración del refractómetro.

Después de haber calculado el índice de refracción real podemos calcular también determinar los grados Brix reales de la muestra, esta determinación se lleva a cabo en el refractómetro directamente.

4.9. Determinación del grado alcohólico de la muestra de etanol obtenido por destilación. (14)

- Colocar la muestra de alcohol etílico en una probeta de 100 mL, o un cilindro de volumen adecuado para poder colocar el alcoholímetro junto con la muestra de etanol.
- Sumergir el alcoholímetro verificando que esté limpio y seco dentro de la probeta que contiene la muestra.
- Verificar que el líquido muestra cubra por completo el alcoholímetro.
- Realizar la lectura y anotar el valor del grado alcohólico de la muestra.

4.10. Identificación de muestra etanólica utilizando el ESPECTROFOTOMETRO INFRARROJO SHIMADZU PRESTIGE. (14)

(Este Análisis se realizó en laboratorios VIJOSA SA de CV)

- Encender el equipo media hora antes de usar para que se estabilice.
- Encender la computadora.
- Entrar al programa del equipo (IR SOLUTION).
- Ir a medir.
- Luego al icono midiendo.
- Dar click en inicializar.
- Se encenderán en un lado de la pantalla unos cuadritos verdes que indican que las lámparas se han encendido y que la computadora se ha conectado al equipo.
- A un lado de la pantalla aparece en que escala se desea la lectura si en Transmitancia o en Absorbancia, se selecciona la deseada, también se selección el rango en que se desea se efectúe la medición por lo general se selecciona en $400-4000\text{ cm}^{-1}$
- Colocar el porta muestra.
- Ir a medir y en la casilla de identificación se escribe (blanco) y esta leyenda se copia en el icono (...) y se guarda.
- Presionar el icono BKG y empieza a dar el espectro de la lectura del blanco.
- Luego en el porta muestra colocar el estándar y en la casilla de escritura de identificación colocar estándar de Alcohol Etilíco grado reactivo (99 grados) esta leyenda de copia en el icono (...) y se guarda.
- A continuación se da click en el icono MUESTRA.
- Aparece el espectro de absorción del estándar (ver figura N° 5).

- Luego en el porta muestra se coloca la muestra y en la casilla de escritura de identificación se coloca muestra de Alcohol Etílico obtenida en la destilación, esta leyenda de copia en el icono (...) y se guarda.
- A continuación se da click en el icono MUESTRA.
- Aparece el espectro de absorción de la muestra.
- Se da click en el icono Windows y luego seleccionar John visible y aparece sobrepuesto el espectro de la muestra sobre el estándar para comparar mejor las bandas de cada uno.
- Una vez comparados los dos espectros se puede afirmar o rechazar si la muestra corresponde al estándar.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Evaluación de la variable de grados Brix

El ensayo de la variable óptima de grados Brix se determinó a las condiciones de 4.0, 14.5, 18.5, 20.5, 21.0 y 25 grados Brix, un pH de 4 y una concentración de microorganismo de 10^6 Cel/mL (25 % de Transmitancia), a partir del jugo de las cáscaras de piña haciendo las diluciones respectivas para ajustarlo a estas condiciones, cada uno de los erlenmeyer se les adicionan las sales como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amonio), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnesio heptahidratado) y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (bifosfato de amonio) las cuales favorecen al sustrato de fermentación aportando una cantidad suficiente de nitrógeno, magnesio y fosforo facilitando las reacciones bioquímicas del microorganismo (2, 13) las proporciones a las cuales se añaden las sales son de alrededor de 0.1% (13). El siguiente paso es esterilizar este medio de fermentación ya que en la cáscara de piña habitan levaduras y bacterias silvestres que pueden llegar a interferir con la capacidad fermentadora de ***Saccharomyces cerevisiae*** (12), a si mismo pueden llegar a fermentar el etanol obtenido en ácido acético debido a la levadura ***Acetobacter aceti*** que posee su habitud natural en las cáscaras de piña (15).

Cuadro N° 1: Resumen de características organolépticas y porcentaje de etanol obtenido en el ensayo de la variable optima de grados Brix.

Código de muestra	Grados Brix de la muestra	pH inicial	Porcentaje obtenido (%) de Etanol	Propiedades organolépticas después de 48 horas de fermentación
Mx ₁ =1	4	4	5	Color amarillo, olor levemente a piña, no presenta turbidez.
Mx ₂ =1	4	4	3	Color amarillo, olor levemente a piña, no presenta turbidez.
Mx ₁ =2	14.5	4	11.5	Color amarillo opaco, olor a dulce de piña, presente turbidez.
Mx ₂ =2	18.5	4	13.3	Color amarillo opaco, olor a dulce de piña, presente turbidez.
Mx ₁ =3	20.5	4	19.7	Color amarillo opaco, olor a dulce de piña, presenta turbidez.
Mx ₂ =3	21.0	4	20.0	Color amarillo opaco, olor a dulce de piña, presenta turbidez.
Mx ₁ =4	25	4	13.1	Color amarillo opaco, olor a dulce de piña, presenta turbidez.

Nota: A grados Brix 30 no se realizó ya que se comprobó que a Brix mayores de 21 los rendimientos son menores.

La turbidez presentada en el medio de fermentación es debido al aumento de biomasa producido ya que se han favorecido el crecimiento celular.

Ecuación N° 1 para realizar corrección de índice de refracción en refractómetro de ATAGO

$$n_{Dreal} = n_{Dt} \pm F_d$$

Donde:

n_{Dreal} = índice de refracción real.

n_{Dt} = índice de refracción tomado a la temperatura a la cual registra el termómetro digital.

F_d = factor de diferencia

En el cuadro N° 1 se presentan el resumen de las condiciones iniciales y finales más importantes a las cuales se llevó a cabo la fermentación, para evaluar los grados Brix; es importante mencionar que se realizó por duplicado cada una de las muestras, codificando cada uno de los set de las diferentes variaciones de grados Brix. El índice de refracción inicial práctico fue determinado en el refractómetro de ATAGO el cual nos permite calcular con la ecuación N° 1 los grados Brix reales de la muestra (ver cuadro N° 2) ya que este equipo está calibrado a una temperatura de 29 °C siendo diferente a la temperatura a la cual realizamos la lectura por lo que fue necesario realizar una corrección. Antes de inocular la semilla de fermentación es necesario tomar en cuenta las propiedades organolépticas iniciales para luego ser comparadas con las finales, después de transcurrido el tiempo de fermentación; que para este análisis fue de 48 horas (2 días) tomando como criterio el tiempo mínimo de fermentación que presenta *Saccharomyces cerevisiae*. (17, 19). El proceso de separación del alcohol etílico obtenido por fermentación se llevó a cabo en un aparato de destilación simple, que para fines prácticos permite

obtener grandes rendimientos en poco tiempo al ser comparados con los métodos de destilación fraccionada y por arrastre de vapor; y tomando en cuenta que la muestra es hidroalcohólica y no representa problemas de punto de ebullición muy cercanos uno de otro. El pH para este análisis fue de 4, esto debido a que las cáscaras de piña presentan un pH relativamente ácido por la presencia de ácidos orgánicos débiles como el málico, pantoténico y fólico. (12) El rango de temperatura de destilación representa en qué medida el alcohol etílico se separa de la muestra acuosa, ya que teóricamente el punto de ebullición del alcohol etílico es de 78.2 °C (17) donde se puede variar según las condiciones ambientales del laboratorio; mientras el valor de la temperatura se acerca a el valor de 100 °C permite deducir que la muestra destilada ya no es etanol, puesto que el agua que también se encuentra en el medio hidroalcohólico destila (se transforma en vapor) a una temperatura de 100 °C variando según las condiciones del laboratorio por lo que la temperatura de destilación fue suspendida a los 88 °C en todos los casos salvo aquellos que no presentaron separación a temperaturas menores de estas, por lo que se considera parcialmente que las muestras $Mx_1 = 1$ y $Mx_2 = 1$ no contienen alcohol etílico en el medio de fermentación, además de no presentar turbidez ya que es un indicio del aumento de biomasa (19) esto debido al consumo de azucares totales fermentable o sólidos fermentables también conocidos como grados Brix (2, 5).

La máxima producción de alcohol etílico se obtuvo con la variación de los grados Brix entre 21.0 y 20.5.

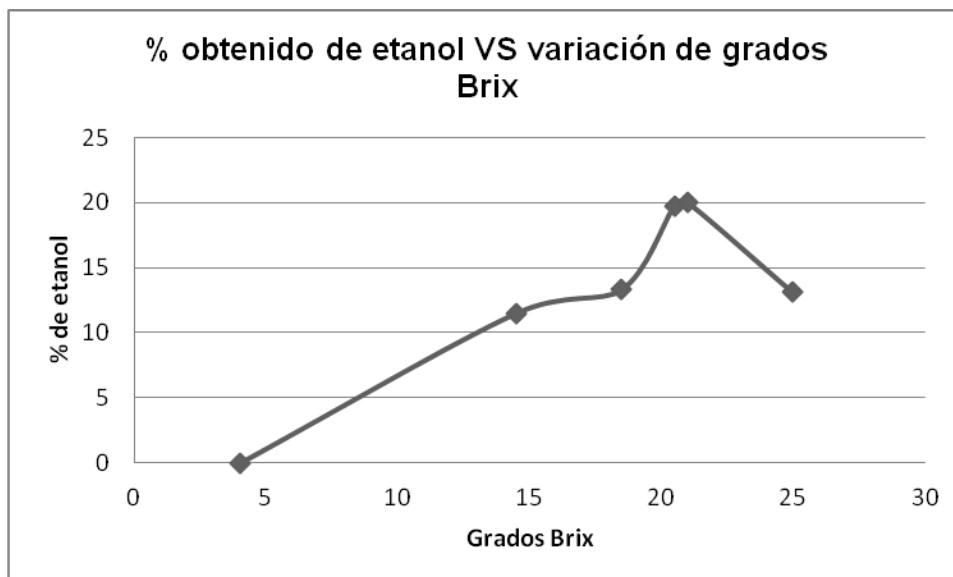


Figura N° 15: Gráfico de grados Brix con respecto al porcentaje obtenido de etanol.

Según muestra la figura N° 15 el aumento de producción de etanol comienza a partir de los grados Brix 5 (según tendencia) aumentándose significativamente hasta un valor máximo de 21.0 con un porcentaje de alcohol etílico de 20 %. Es decir que para una concentración de microorganismo de 10^6 Cel/mL. (25 % de Transmitancia) es necesario alrededor de 20 grados Brix para obtener la máxima producción de etanol, ya que con un valor menor de grados Brix el microorganismo productor no genera suficiente metabolito; esto debido a la escases de azúcares reductores, y si al contrario hay un valor mayor de 21.0 grados Brix se interfiere la presión osmótica de la célula por un aumento significativo de soluto en el medio acuoso, de tal forma que el microorganismo productor pierde su capacidad de metabolizar en gran medida los azúcares reductores del medio, es decir que es afectada en gran manera su capacidad de dividirse y por lo tanto no se da la división celular y pierde la capacidad fermentativa. (17).

5.2. Evaluación de la variable de pH.

El ensayo de la variable óptima de pH se determinó a las condiciones de 3, 4, 5, 6 con una concentración de grados Brix de 20.1, y un pH inicial de 4, a partir del jugo de las cáscaras de piña haciendo las diluciones respectivas para ajustarlo a estas condiciones, la concentración del microorganismo productor fue de 10^6 Cel/mL. (25 % Transmitancia), a cada medio se le adicionaron sales de sulfato de amonio $((NH_4)_2SO_4)$, sulfato de magnesio heptahidratado $(MgSO_4 \cdot 7H_2O)$ y bifosfato de amonio $((NH_4)_2HPO_4)$ que favorecen al medio, además de esterilizar cada medio de producción para evitar cualquier interferencia de levaduras y microorganismos salvajes que habitan en las cáscaras de piña.

Cuadro N° 2: Resumen de características organolépticas y porcentaje de etanol obtenido en el ensayo de la variable optima de pH.

Código de la muestra	pH	Grados Brix de la muestra	Porcentaje obtenido de Etanol	Propiedades organolépticas después de 48 horas
Mx ₁ =1	3	20.1	11.1	Color: amarillo pardo, Sabor: dulce, Olor: característico a piña, Consistencia: espeso turbio.
Mx ₂ =1	3	20.1	11.1	Color: amarillo pardo, Sabor: dulce, Olor: característico a piña, Consistencia: espeso turbio.
Mx ₁ =2	4	20.1	15.1	Color: amarillo, Sabor: dulce, Olor: intenso a etanol, Consistencia: espeso turbio.
Mx ₂ =2	4	20.1	15.1	Color: amarillo, Sabor: dulce, Olor: intenso a etanol, Consistencia: espeso turbio.
Mx ₁ =3	5	20.1	12.6	Color: amarillo, Sabor: dulce, Olor: característico a piña, Consistencia: espeso turbio.
Mx ₂ =3	5	20.1	12.6	Color: amarillo, Sabor: dulce, Olor: característico a piña, Consistencia: espeso turbio.
Mx ₁ =4	6	20.1	12.5	Color: amarillo, Sabor: dulce, Olor: característico a piña, Consistencia: espeso turbio.
Mx ₂ =4	6	20.1	12.5	Color: amarillo, Sabor: dulce, Olor: característico a piña, Consistencia: espeso turbio.

En el cuadro N° 2 se resumen las características y condiciones más importantes tomadas en cuenta para la evaluación de la variable de pH. El análisis se hizo por duplicado para cada uno de los diferentes pH, inicialmente solo se evaluaron los pH de 4, 5 y 6 pero debido a que dejaba una incertidumbre de cómo es el comportamiento real del microorganismo fermentador a un pH más ácido, así que se adicionó un valor de pH 3 para ver el comportamiento real de la fermentación en toda la condición de acidez. Las propiedades organolépticas a las 48 horas (2 días) variaban entre cada uno de los diferentes medios de valores de pH, es decir que los tenían pH 3 presentaban un color más oscuro en comparación de los que tenían pH 6, esto es porque a pH que se acercan al neutro y básico se favorece el crecimiento de la biomasa por una producción de glicerol por parte del microorganismo (17) es de mencionar que el microorganismo fermentador es capaz de tolerar una cierta cantidad de etanol (12-18 %) esto es cuando el pH es favorable para este tipo de fermentación, en cambio para la fermentación glicérica la biomasa se aumenta porque no hay producción significativa de etanol (10, 17). Para regular el pH fue necesario adicionarle HCl 0.1N ó NaOH 0.1 N cuando fue necesario, el sustrato presentaba un pH inicial de 4 ya que por la composición que presenta la cáscara de piña se favorece el pH ácido. Con respecto a los grados Brix, la cascara de piña variedad golden presenta un total de grados Brix iniciales de 26.1 lo que favorece en gran manera ya que al diluirlo hasta obtener los grados Brix de 20 se aumenta el volumen del sustrato y se disminuye la cantidad de materia prima (cáscaras de piña) a utilizar.

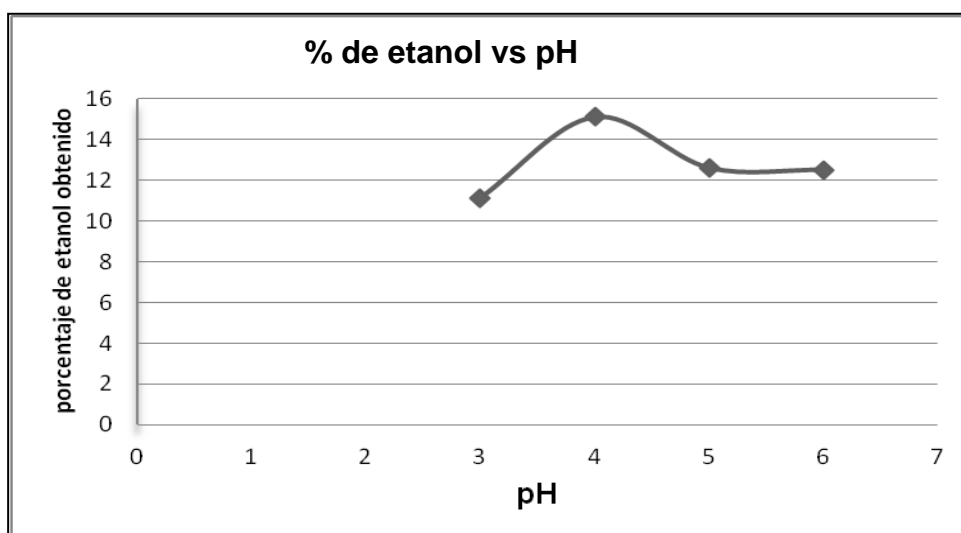


Figura N° 16: Gráfico de pH con respecto al porcentaje obtenido de etanol.

En la figura N° 16 se presenta la variación de pH y el porcentaje de etanol obtenido, la máxima producción que se obtuvo a un pH de 4 con un porcentaje de 15.1 %. La cantidad de etanol disminuye a pH más ácidos, menores de 4, En el pH que se aproxima al neutro se mantiene constante la cantidad de etanol fermentada pero mucho menor comparada con el pH de 4.

En conclusión la máxima producción de etanol es a un pH de 4.

5.3. Evaluación con las variables optimas de fermentación, tiempo de máxima producción.

Tomando en cuenta las variables optimas de fermentación demostrada en los análisis anteriores, se procede a calcular cual es el tiempo de máxima producción de etanol, para ello se rotularon en erlenmeyer de 250 mL los diferentes tiempos de fermentación que van desde 0 horas hasta 120 horas realizando cada uno de los tiempos por duplicado y dejando un erlenmeyer con sustrato como blanco de referencia (no está inoculado con *Saccharomices cerevisiae*).

Cuadro N° 3: Resultados obtenidos en la Cinética de fermentación a los diferentes tiempos.

Tiempo	Condición	Temperatura de destilación	Volumen obtenido de etanol	Biomasa	Propiedades organolépticas	Grado alcohólico
0 horas	Grados Brix 20.1, pH 4.0 temperatura de incubación 29-30 °C	98 °C	0 mL	-----	Color amarillo pardoso, fuerte olor a dulce de piña característico consistencia límpida.	0
0 horas	Grados Brix 20.1, pH 4.0 temperatura de incubación 29-30 °C	98-99 °C	0 mL	-----	Color amarillo pardoso, fuerte olor a dulce de piña característico consistencia límpida.	0
24 horas	Grados Brix 20.1, pH 4.0 temperatura de incubación 29-30 °C	80-92 °C	7.5 mL	Papel designado 1, peso real de la muestra 1.173 g.	Formación de espuma, olor característico a etanol, levemente turbio, color café	50
24 horas	Grados Brix 20.1, pH 4.0 temperatura de incubación 29-30 °C	80-92 °C	9.5 mL	Papel designado 3, peso real de la muestra 1.317 g.	Formación de espuma, olor característico a etanol, levemente turbio, color café	50

Continuación de Cuadro N° 3

Tiempo	Condición	Temperatura de destilación	Volumen obtenido de etanol	Biomasa	Propiedades organolépticas	Grado alcohólico
48 horas	Grados Brix 20.1, pH 4.0 temperatura de incubación 29-30 °C	80-92 °C	12 mL	Papel designado 4, peso real de la muestra 1.528 g.	Sin formación de espuma, alto olor a etanol característico consistencia turbia	50
48 horas	Grados Brix 20.1, pH 4.0 temperatura de incubación 29-30 °C	80-92 °C	13 mL	Papel designado 5, peso real de la muestra 1.319 g.	Sin formación de espuma, alto olor a etanol característico consistencia turbia	50
72 horas	Grados Brix 20.1, pH 4.0 temperatura de incubación 29-30 °C	80-92 °C	23 mL	Papel designado 6, peso real de la muestra 1.437 g.	Sin formación de espuma, alto olor a etanol característico consistencia turbia	50
72 horas	Grados Brix 20.1, pH 4.0 temperatura de incubación 29-30 °C	80-92 °C	25	Papel designado 7, peso real de la muestra 1.639g.	Sin formación de espuma, alto olor a etanol característico consistencia turbia	50

Continuación de Cuadro N° 3

Tiempo	Condición	Temperatura de destilación	Volumen obtenido de etanol	Biomasa	Propiedades organolépticas	Grado alcohólico
96 horas	Grados Brix 20.1, pH 4.0 temperatura de incubación 29-30 °C	80-92 °C	21.5 mL	Papel designado 10, peso real de la muestra 1.884 g.	Sin formación de espuma, alto olor a etanol característico consistencia turbia	50
96 horas	Grados Brix 20.1, pH 4.0 temperatura de incubación 29-30 °C	80-92 °C	20 mL	Papel designado 8, peso real de la muestra 1.859 g.	Sin formación de espuma, alto olor a etanol característico consistencia turbia	50
120 horas	Grados Brix 20.1, pH 4.0 temperatura de incubación 29-30 °C	80-92 °C	21 mL	Papel designado 2, peso real de la muestra 2.355 g.	Sin formación de espuma, alto olor a etanol característico consistencia turbia	50
120 horas	Grados Brix 20.1, pH 4.0 temperatura de incubación 29-30 °C	80-92 °C	20 mL	Papel designado 9, peso real de la muestra 2.466 g.	Sin formación de espuma, alto olor a etanol característico consistencia turbia	50

En el cuadro N° 3 se describen las principales condiciones y propiedades tomadas en cuenta en cada tiempo de fermentación, cabe resaltar que el sustrato o medio de producción se reguló hasta obtener grados Brix alrededor de 20 con un volumen final de aproximadamente 1500 mL, el pH se mantuvo en 4, ya que fueron a estas condiciones a las cuales se obtuvo el mayor rendimiento de etanol. El microorganismo productor (***Saccharomyces cerevisiae***) se llevó hasta una concentración de 10^6 Cel/mL. (25 % de Transmitancia) utilizando un espectrofotómetro UV-VIS (ver anexo 3) a cada medio se le adicionó sales como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amonio), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnesio heptahidratado) y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (bifosfato de amonio) que favorecen al medio, además se esterilizó cada medio de producción para evitar cualquier interferencia de levaduras y microorganismos salvajes que habitan en las cáscaras de piña.

Luego de inoculado el microorganismo productor en cada uno de los diferentes tiempo se procede a incubarlos a una temperatura aproximada de 30 °C, con la excepción de aquellos Erlenmeyer con medio de fermentación que rotulan 0 horas, a estos se procedió a destilarlos para verificar que el medio por sí solo (por acción de levaduras ó bacterias salvajes) no fermenta etanol o ácido acético (12), la biomasa no fue determinada a las 0 horas ya que lógicamente no hay crecimiento del microorganismo productor para ello se lleva un blanco de referencia que al finalizar todas las horas de fermentación (120 horas) para verificar que no hay crecimiento alguno de masa celular, la temperatura de destilación fue de 98 °C manifestando la presencia de agua del medio.

A las 24 horas se observó presencia de espuma, esto gracias a la producción de CO_2 como lo describe Gay-Lussac en su ecuación (20, 16), siendo la biomasa en menor cantidad (ver tabla N° 4) comparada con los

demás tiempos (a excepción de las 0 horas) la cantidad de etanol fermentada fue prácticamente baja con un promedio de 8.5 %.

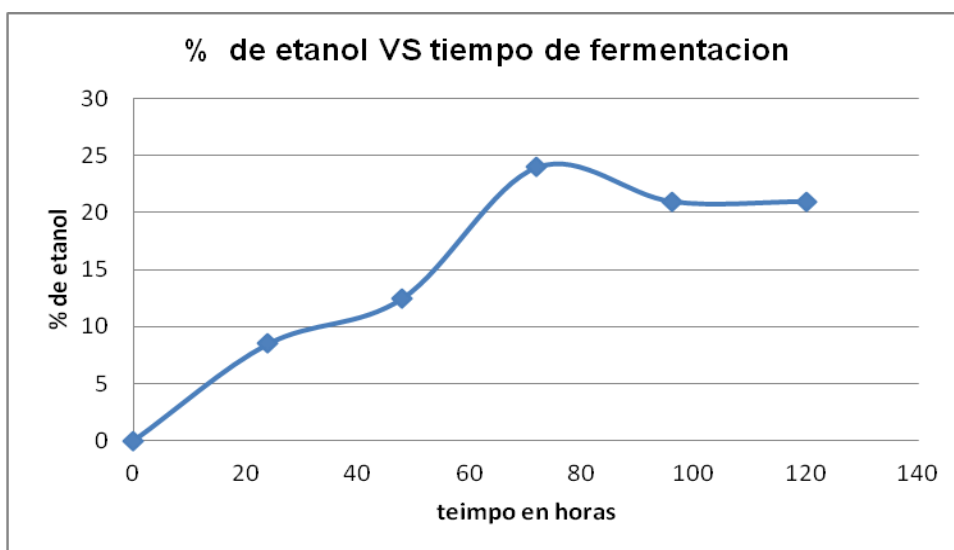


Figura N° 17: Gráfico de fermentación de etanol VS tiempo.

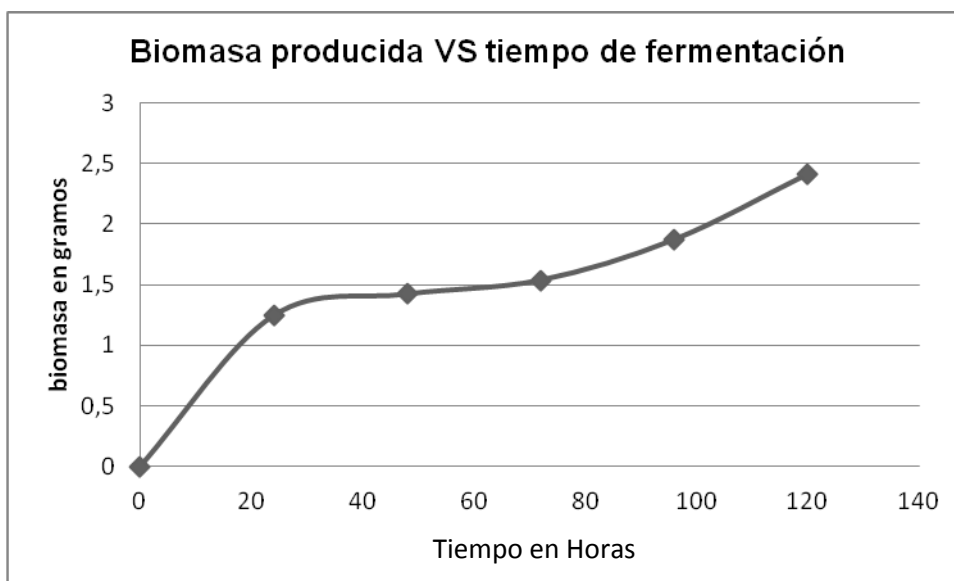


Figura N° 18: Grafico de Biomasa obtenida en la cinética de fermentación.

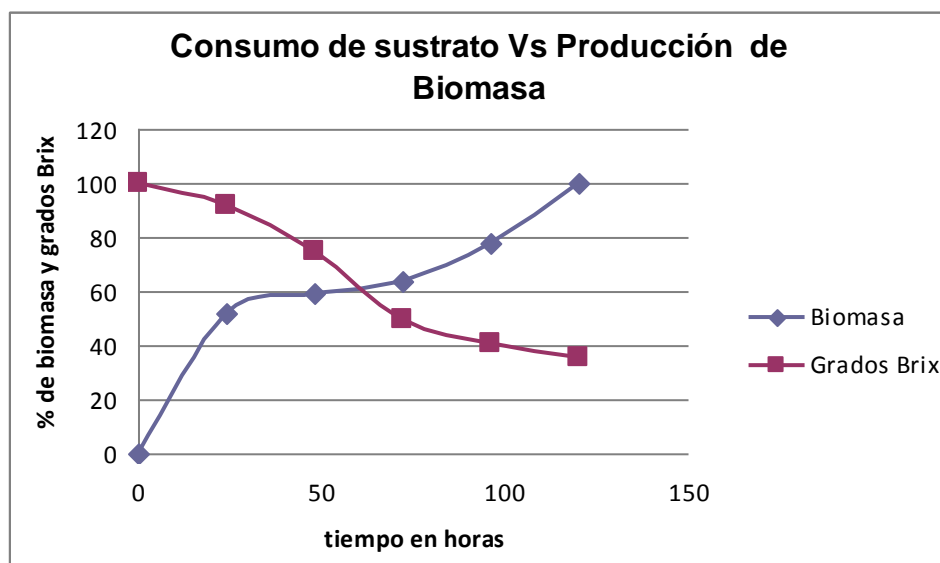


Figura N° 19: Grafico de consumo de sustrato Vrs Producción de Biomasa.

La máxima producción de etanol se encuentra en el tiempo de 72 horas con un promedio de 24 % del metabolito de interés según se muestra en la figura N° 17 con una producción constante en los tiempos de 96 y 120 horas suponiendo que el microorganismo productor pierde su capacidad fermentativa a un tiempo determinado (después de 72 horas) (17) y aumentando significativamente su biomasa. El grado alcohólico fue determinado con un alcoholímetro Gay-lussac, el grado alcohólico del destilado fue de 50 considerándose como un valor aceptable del etanol obtenido.

En la figura N° 18 se muestra la gráfica con los valores promedios obtenidos de biomasa en los diferentes tiempos de fermentación, siendo considerablemente mayor a las 120 horas considerándose como una fase estacionaria dentro de la cinética de fermentación, al transcurrir este tiempo la producción de celular microbianas disminuye rápidamente entrando en el periodo de muerte o decline del ciclo cinético fermentativo (17).

En la figura N° 19 se presenta la gráfica que demuestra que a medida se va produciendo alcohol va disminuyendo la concentración de azúcares y la mayor producción se produce cuando se han consumido el 50% de sustrato aproximadamente, así mismo se puede ver como la concentración de Biomasa va aumentando significativamente hasta 120 horas.

Tabla N° 4: Resultados obtenidos de producción de biomasa en los diferentes tiempos en la evaluación de las variables óptimas de pH y grados Brix.

Cálculos para biomasa				
Numero de Papel filtro.	Tiempo en horas	Peso de Papel filtro.	Peso de la Muestra más papel.	Peso real de muestra (Biomasa)
1	24	0.951 g	2.124 g	1.173 g
2	120	1.214 g	3.569 g	2.355 g
3	24	0.885 g	2.202 g	1.317 g
4	48	0.886 g	2.414 g	1.528 g
5	48	0.995 g	2.314 g	1.319 g
6	72	1.063 g	2.500 g	1.437 g
7	72	1.145 g	2.784 g	1.639 g

Continuación de Tabla N° 4

Cálculos para biomasa				
Cálculos para biomasa	Cálculos para biomasa	Cálculos para biomasa	Cálculos para biomasa	Cálculos para biomasa
8	96	1.153 g	3.012 g	1.859 g
9	120	1.199 g	3.665 g	2.466 g
10	96	1.221 g	3.105 g	1.884 g
11	Blanco	1.239 g	1.253 g	0.014 g

En la tabla N° 4 se presentan los valores obtenidos en cada uno de los tiempos calculándose como: Peso de la muestra más papel – Peso del papel =Biomasa, siendo mayor para el tiempo de 120 horas suponiendo el máximo de células en crecimiento en el medio de producción.

El alcohol destilado fue analizado mediante el uso de un Espectrofotómetro IR marca SHIMADZU PRESTIGE análisis efectuado en los laboratorios farmacéuticos VIJOSA, S.A del área de control de calidad en el cual se realizó la identificación dando como resultado que el producto obtenido es etanol ya que se comparó con etanol al 90 ° y se obtuvieron espectros similares en su huella digital, en la figura N° 20 se muestra el espectro infrarrojo del etanol calidad reactivo a 90° y al ser comparado con el espectro de la figura N° 21 del espectro infrarrojo de la muestra destilada y al sobreponerse los espectros infrarrojos coinciden con su huella digital así como sus grupos funcionales encerrados en círculos (OH estiramiento y de torsión) (ver figura N° 22) podemos concluir que el producto destilado es etanol.

En conclusión las variables óptimas de máxima producción de etanol para una inoculación de microorganismo en concentración de 10^6 es decir que al 25 % de Transmitancia; son de grados Brix de 20, pH de 4 y con un tiempo de máxima fermentación de 72 horas (3 días), para obtener etanol de grado 50°.

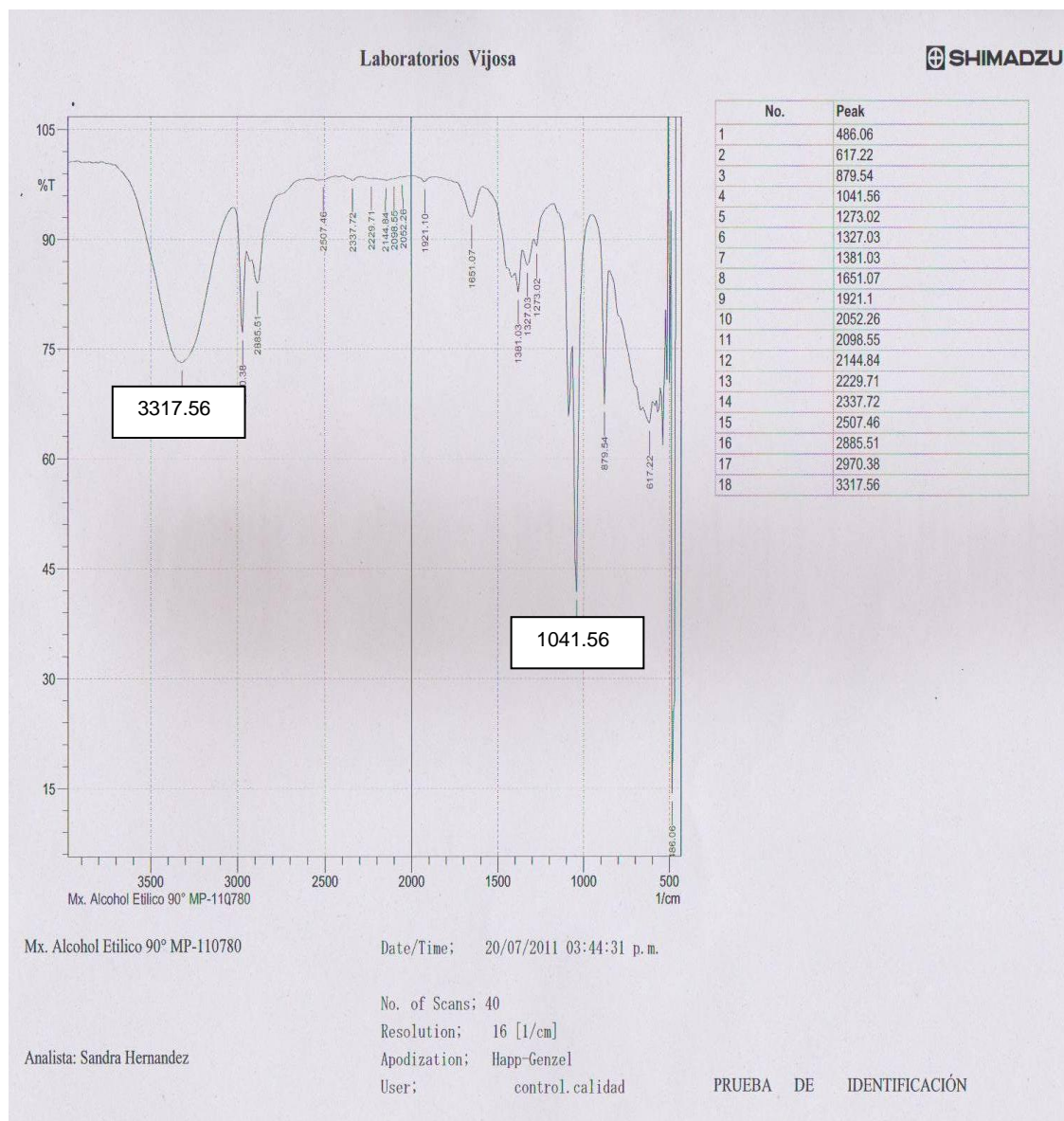


Figura N° 20: Espectro de absorción infrarroja de alcohol etílico 90°

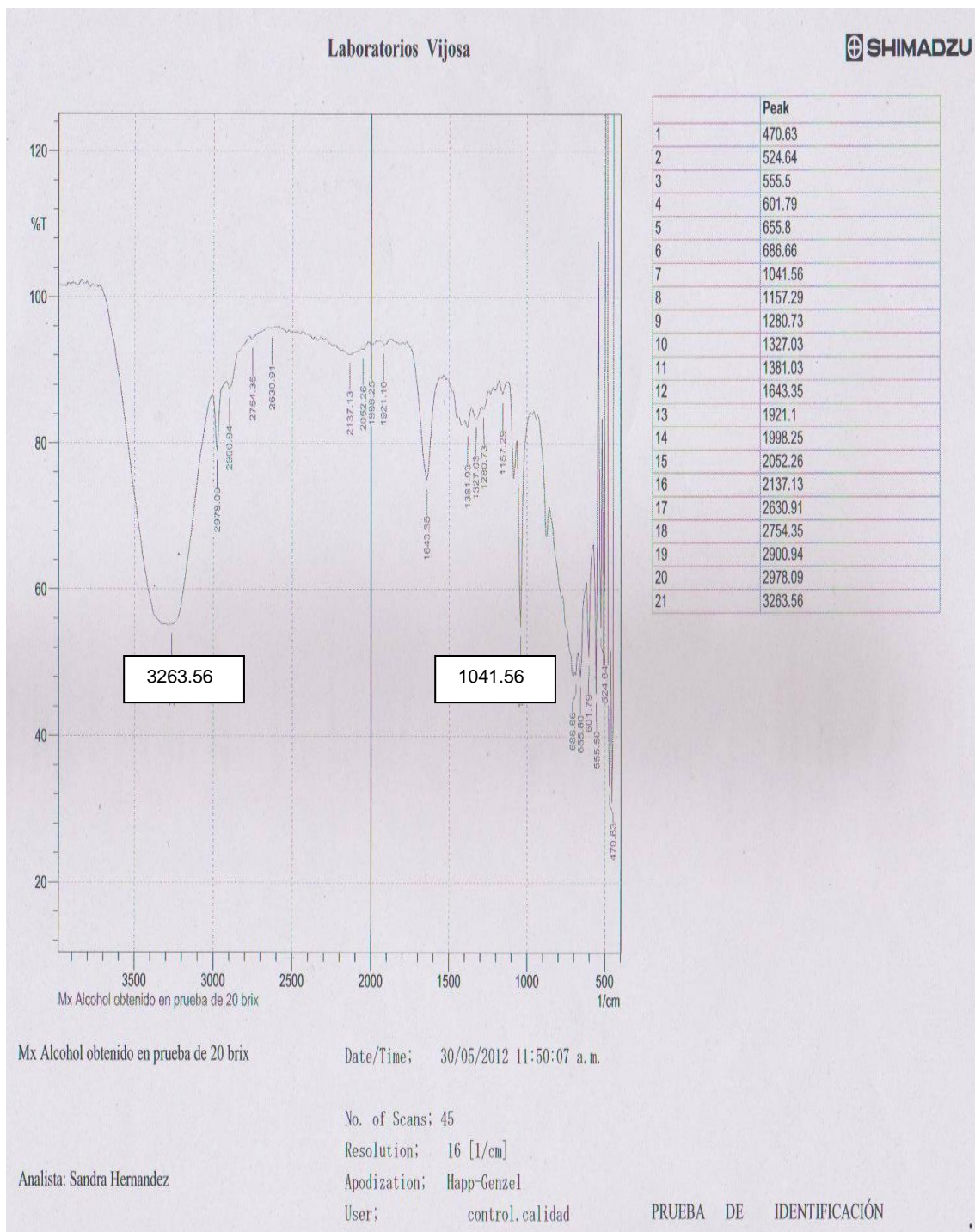


Figura N° 21: Espectro de absorción infrarroja de la muestra de alcohol destilado

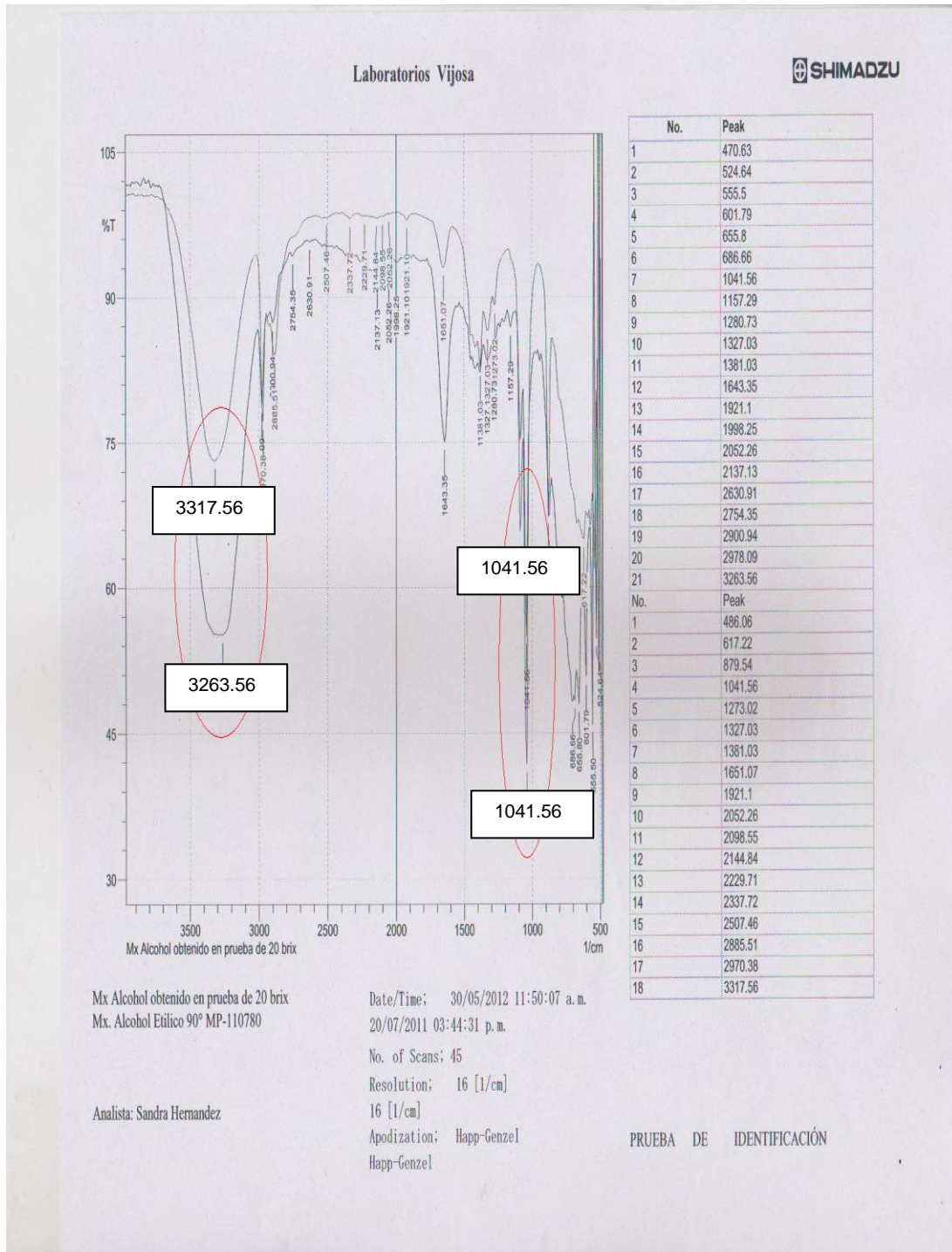


Figura N° 22: Espectros superpuestos de muestra y estándar de etanol

VI. CONCLUSIONES

1. La variable óptima de pH de mayor producción de etanol en el proceso fermentativo es de pH 4 (medio ácido) ya que a esta condición se obtiene el mayor rendimiento.
2. A pH menores de 4 disminuye considerablemente la cantidad de etanol en el proceso fermentativo, siendo ineficaz para el metabolismo del microorganismo productor.
3. Los valores de pH que se aproximan a 6 ó básico se favorece el aumento de biomasa ya que genera una turbidez en el medio de producción.
4. La condición óptima de mayor producción de etanol corresponde a los grados Brix de aproximadamente 20, ya que a esta condición el rendimiento de etanol aumenta considerablemente.
5. El tiempo de mayor producción de etanol es a las 72 horas ya que se obtiene 24% de rendimiento a un grado alcohólico de 50.
6. Los tiempos de 96 horas y 120 horas, se ve favorecido el aumento de biomasa con una cantidad constante de etanol fermentable.
7. La temperatura de ebullición del etanol es de 78.2 °C, y el rango experimental de ebullición de la muestra fue de alrededor de 80-88 °C y de 80-92 °C siendo valores cercanos al punto de ebullición teórico.
8. La fermentación óptima de máxima producción de etanol, se da al llevar el medio de fermentación hasta obtener los grados Brix 20, pH 4, microorganismo productor (***Saccharomyces cerevisiae*** comercial) hasta una concentración de células inicial de 10^6 (25% de transmitancia) y con un tiempo de fermentación de 72 horas (3 días).

9. El grado del etanol obtenido mediante el proceso fermentativo desarrollado en esta investigación es etanol al 50% el cual se comprobó usando el alcoholímetro de Gay-Lussac.
10. La muestra destilada se analizó con el espectrofotómetro infrarrojo y comparándose con el estándar de etanol al 90° dio como resultado espectros similares de acuerdo a su grupo funcional.

VII. RECOMENDACIONES

1. Investigar los grupos funcionales y la composición química de la muestra obtenida por destilación para que pueda ser empleada en el campo de fabricación de bebidas alcohólicas.
2. Realizar investigaciones futuras de las variables que intervienen en el proceso fermentativo que no están contempladas en esta investigación, como lo son: concentración de microorganismo, temperatura, cantidad de oxígeno disuelto en el medio y agitación, para favorecer a un estudio más completo que facilite la comprensión de este fenómeno biológico.
3. Utilizar biorreactores para llevar a cabo la fermentación de tipo alcohólica para que proporcionen las condiciones internas adecuadas y faciliten estos tipos de estudios.
4. Comparar la producción de etanol realizada por el microorganismo utilizado en este estudio ***Saccharomyces cerevisiae*** con microorganismos y levaduras que también son capaces de producir etanol ***Torulopsis, Kloeckera, Candida, Zimomonas, Mucor, Aspeguillus***, etc. para aumentar el estudio del comportamiento metabólico involucrado en la fermentación alcohólica.
5. Promover la utilización de desechos orgánicos (cáscaras, maderas, papel, etc.) ricos en carbohidratos para la producción de metabolitos de interés industrial como el etanol, metanol y ácido acético que poseen un gran valor para la industria farmacéutica y alimenticia.
6. Investigar equipos y nuevas metodologías para la separación del etanol en muestras hidroalcohólicas y así aumentar la pureza del etanol obtenido.

BIBLIOGRAFIA

1. Acosta R, Sierra Tobón, D. J., Zapata A., Ramírez E., Producción de goma de xantano empleando cáscaras de piña. ISSN (Bolivia). 2008; 4: Pág. 30-34.
2. Aldabe S., Aramendia P., Lacreu L.; Química 1 Fundamentos, editorial colihue. Buenos Aires, Argentina; 1996. Pág. 357-369.
3. Altamirano E., Saltos L., Barriga R., Desarrollo de un sistema scada en la etapa de segunda dilución, prefermentación y fermentación del proceso de elaboración de etanol. FIEC (Ecuador). 2002; 1: Pág. 51-57.
4. Amerine, M.A. y Ought, C.S. Análisis de Vinos y Mostos Ed. Acribia. Zaragoza. España. 1965. Pág. 138-145.
5. Brock T., D. Microbiología. 6a edición; Prentice-Hall Hispanoamericana México: 1993, Pág. 240-322.
6. Ferraro D. Evaluación exergética de la producción de etanol en base a grano de maíz: un estudio de caso en la Región Pampeana (Argentina), Ecología austral, Buenos Aires, Argentina, Diciembre 2008. 18:323-336.
7. Ferreyra M. Estudio biotecnológico para la elaboración de una bebida alcohólica a partir de jugos de naranja. [Tesis doctoral]. Valencia: CINDEFI. Universidad politécnica de Valencia, España; 2006.

8. Ferreyra, M; Schvab, María del C.; Gerard M; Roque A Fermentación alcohólica de jugo de naranja con ***S. cerevisiae*** Ciencia, Docencia y Tecnología Universidad de la Plata Argentina, N° 39, Año XX, noviembre de 2009 143-158
9. Hugo W.B, Russell A.D Pharmaceutical Microbiology, Sexta edición Oxford, Estados Unidos, 1995, pág. 339-345.
10. J.S. Hough. Biotecnología de la cerveza y la malta. Editorial ACRIBIA, Zaragoza; España 1990. Pág. 109-129.
11. Jorgensen S; tr. Klein Knappe Federico. Microbiología de las fermentaciones industriales, editorial limusa, Madrid España. Pág. 80-89, 94-103, 327-328.
12. López A., Molina M., Huguet S., Estudio comparativo de la producción de etanol vía fermentativa utilizando cuatro sustratos preparados a partir de banano maduro. ISSN (Costa Rica). 2004; (1,2): Pág. 67-77.
13. Machuca Boris, Herrera F, Peralta L. Sensor Virtual Adaptable de concentración de etanol para fermentaciones industriales. RIAI (Santa Clara, Cuba). 2009; 6(3): Pág. 61-67.
14. Manual de Control de Calidad y procedimientos estándares de operalización en el manejo de la instrumental de análisis en los laboratorios de investigación y calidad de los laboratorios VIJOSA.
15. Martínez T. J., Ecología de las levaduras, selección y adaptaciones vínicas. [Tesis doctoral]. Tarragona. 2002.

16. Madigan M., T, Martinko J. M. Parker Jach, Brock BIOLOGIA DE LOS MICROORGANISMOS Pearson Prentice Hall 10ª edición. Pág. 235-348
17. Owen P. Ward, Biotecnología de la fermentación; editorial acribia, S.A. Zaragoza España, 1991. Pág. 134-136.
18. Palacio Llamas H. Fabricación de alcohol. SALVAT EDITORES S, A. BARCELONA MADRID, 1956 Pág. 1, 90, 103, 475.
19. R. Ertola, O. Yantorno, C. Mignone. Microbiología industrial, editorial McGraw-Hill, Madrid 2003. Pág. 43-53.
20. Regodón M., J. A. Obtención y caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la elaboración estandarizada de vinos de calidad. [Tesis doctoral]. Santander: Libros y Tesis doctorales, Universidad de Extremadura; 2007.
21. Santamaría P. López R. Gutiérrez A.R. García-Escudero E. Influencia de la temperatura en la fermentación alcohólica. INIA (España). 1995; 7: Pág. 137-197.
22. Scragg A. Biotecnología para Ingenieros, Sistemas Biológicos en Procesos Tecnológicos, Editorial Limusa, México, 2000. Pág. 485-527.
23. Sierra A., I., Pérez Quintanilla D., Gómez Ruiz S; análisis instrumental para educación superior, editorial NETBIBLO, S.L. Oleiros la Coruña España, 2010. Pág. 67- 89.

24. Tejada L. P., Tejada C, Villabona Á, Alvear M. R., Castillo C. R., Henao D. L., Marimón Wilfredo, Madariaga Natali, Tarón Arnulfo. Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña. ISSN. (Colombia). 2010; 10: Pág. 120-125.
25. Vázquez H.J. y Da costa O., Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. INGENIERÍA Investigación y Tecnología México Distrito Federal 2007, VIII. 4. 249-259,
26. Zuzuarregui Miró A. Caracterización fisiológicas y moleculares de cepas vínicas de **Saccharomyces sp.** Influencia entre su comportamiento de vinificación. [Tesis doctoral]. Valencia: *Servei de Publicacions*, Universidad de Valencia; 2005.

GLOSARIO.

Aeróbico: Organismo capaz de desarrollarse en la presencia de oxígeno para favorecer sus necesidades metabólicas así como su crecimiento. (4)

Anaeróbico: Organismo que funciona sin la intervención de oxígeno es decir no usa el oxígeno en la respiración y cuyo crecimiento puede ser inhibido por este, es primordial para la síntesis de metabolitos generalmente secundarios. (11)

Autoclave: Un esterilizador que destruye los microorganismos con temperatura y vapor de agua bajo presión. (11)

Biomasa: Cantidad de células producidas (unidad de masa) por unidad de volumen que se lleva a cabo en un proceso biotecnológico. (14)

Biotecnología: uso de organismos vivos para llevar a cabo procesos químicos concretos destinados a la aplicación industrial. (11)

Esterilización: es la muerte o eliminación de todos los organismos vivos y sus virus en un medio de crecimiento. (11)

Fermentación: catabolismo anaeróbico en el que un compuesto orgánico sirve al mismo tiempo como donador y como aceptor de electrones y en el que el ATP se produce por fosforilación a nivel de sustrato. (11)

Fermentador: el tanque en el que realiza una fermentación industrial. (11)

Grados Brix: medida objetiva de la concentración de azúcares disueltos en un producto y de la idea del nivel de dulzura del mismo. (2)

pH: Valor negativo del logaritmo de la concentración de iones Hidrogeno (H^+) en una solución. (11)

Sustrato: medio o sustancia que contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo de un microorganismo con el fin de favorecer la formación de metabolitos de interés industrial. (14)

ANEXOS

ANEXO N° 1.

Materiales y equipos utilizados durante la parte experimental

- Tubos de ensayo
- Erlenmeyer de 250mL
- Erlenmeyer de 1000mL
- Pipetas volumétricas
- Probetas
- Balanzas analítica y semianalítica
- Licuadora
- Equipo de destilación simple
- Refractómetro
- Alcoholímetro
- Microscopio
- Aparato de filtración al vacío.

ANEXO 2

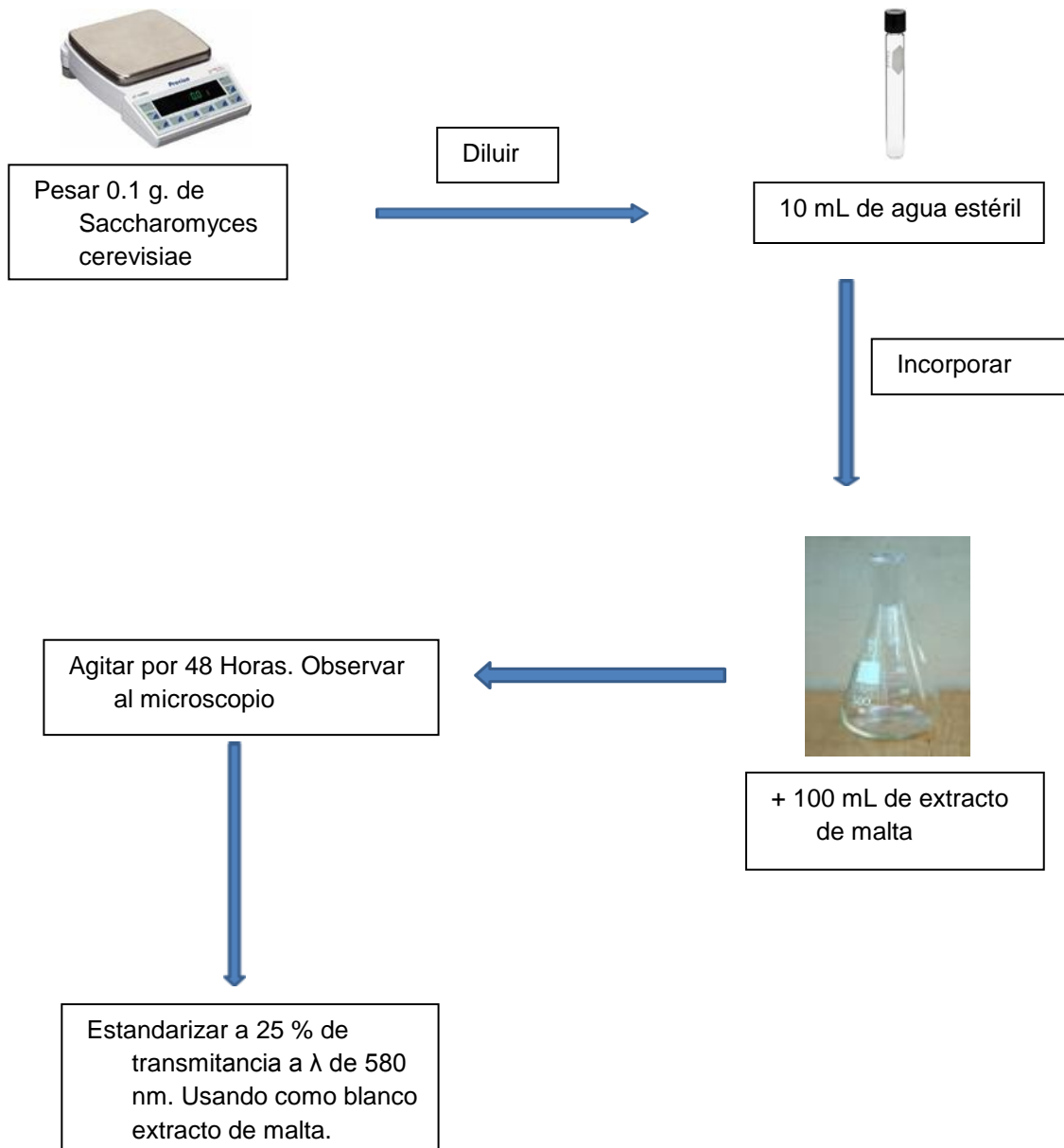


Figura N° 23: Esquema de preparación y estandarización del microorganismo productor.

ANEXO 3



Cáscaras



Licuar las cáscaras de piña,
observar los grados Brix
iniciales con el fin de
ajustarlos en este paso.

Filtrar



Aproximadamente
500 mL



Regular los Grados Brix
con agua desmineralizada
cuando sea necesario



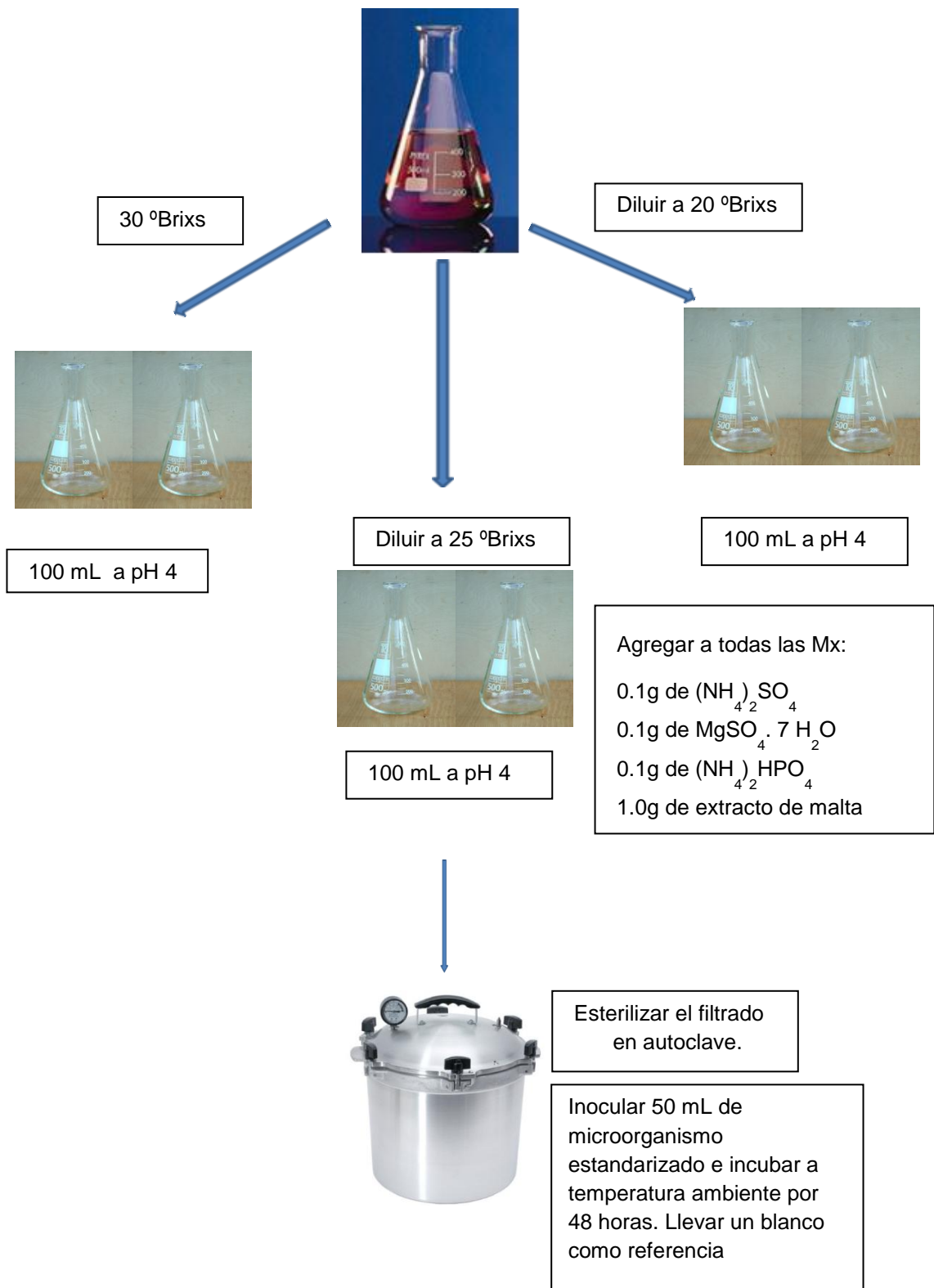


Figura N° 24 Esquema de ensayo con modificación de grados Brix

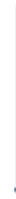
ANEXO 4



Licuar las cáscaras



Filtrar



1g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
1g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
10g de extracto de malta



Precios
€

Regular el filtrado a 25
°Brix con agua estéril.



Regular el pH con NaOH
o HCl cuando sea
necesario

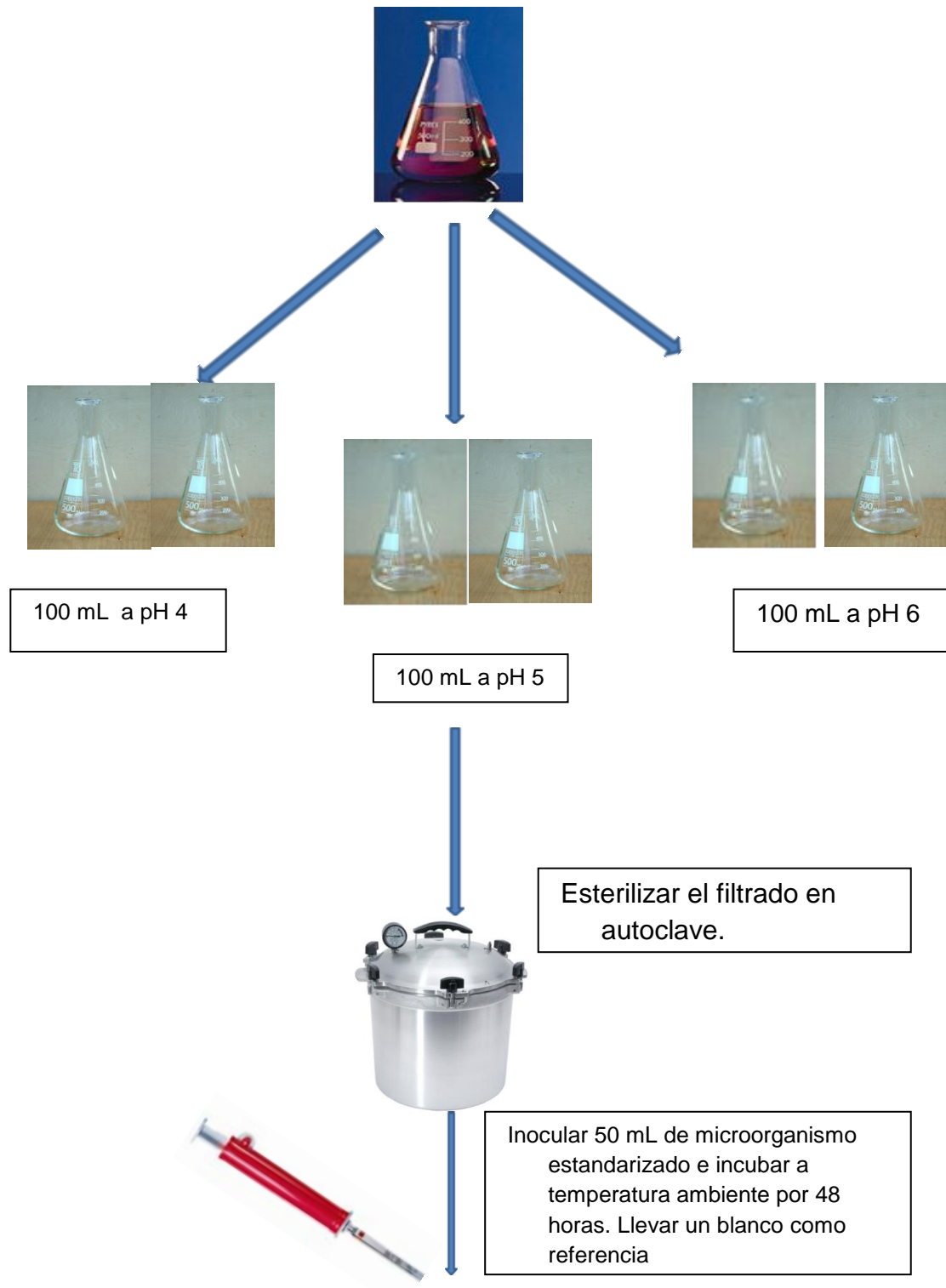


Figura N° 25 esquema de ensayo con modificación de pH

ANEXO 5



Cáscaras

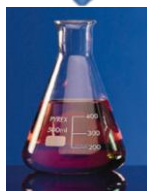


Licuar las cascaras de piña, observar los °Brixs iniciales con el fin de ajustarlos.



Regular el filtrado a los °Brixs óptimos según el ensayo anterior.

Filtrar



Adicionar las sales: 0.1g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
1g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
Regular el pH a la máxima producción experimental.



Esterilizar el filtrado en autoclave.



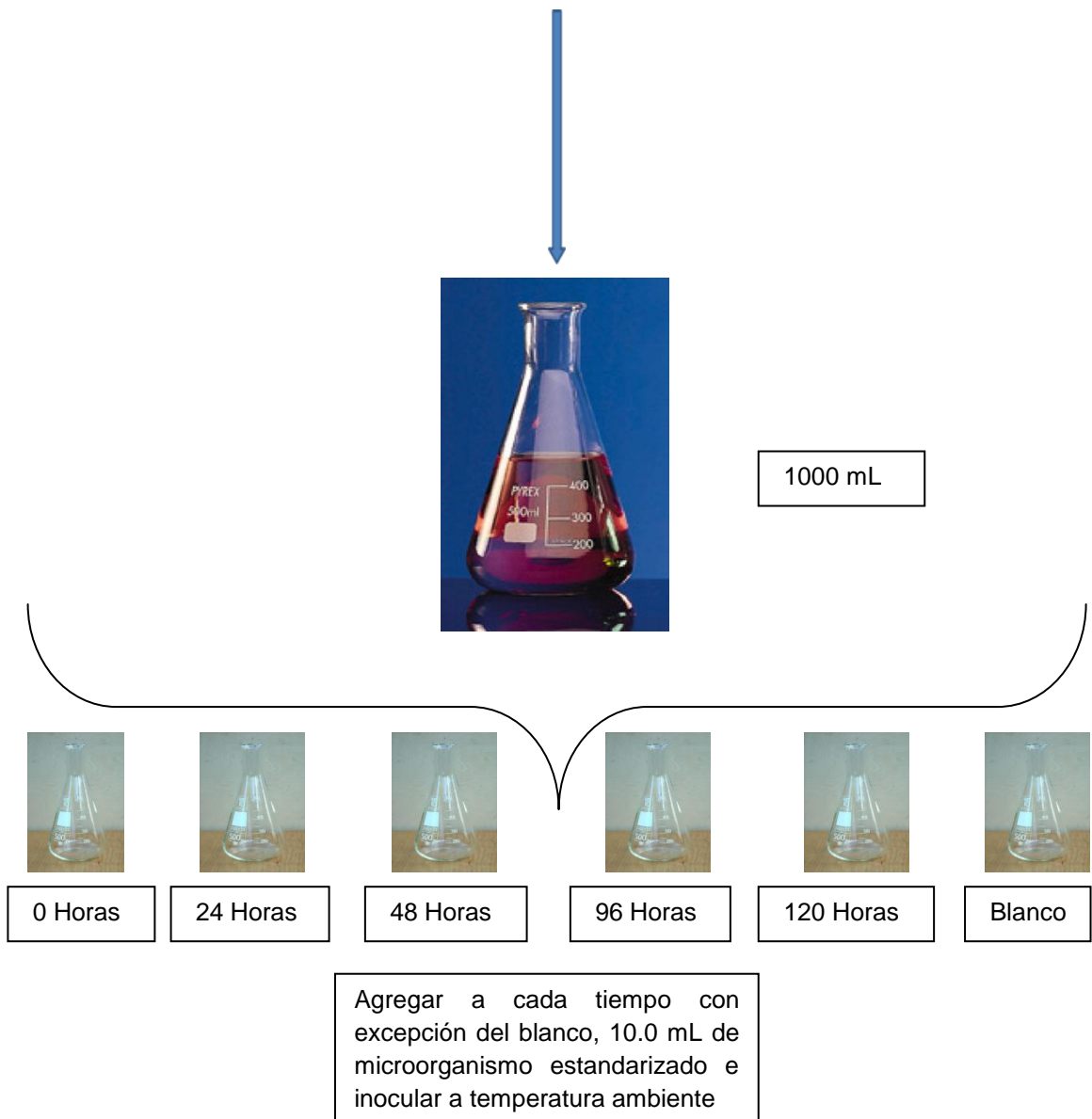


Figura N° 26 Esquema de realización de la cinética de formación de producto

ANEXO 6

Equipos utilizados en la identificación de etanol y *Saccharomyces cerevisiae*

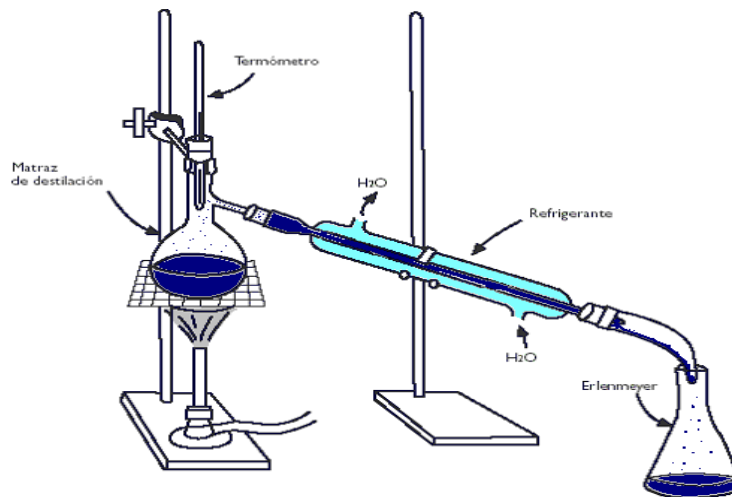


Figura N° 27 Aparato de destilación simple para separar el etanol del medio de fermentación.

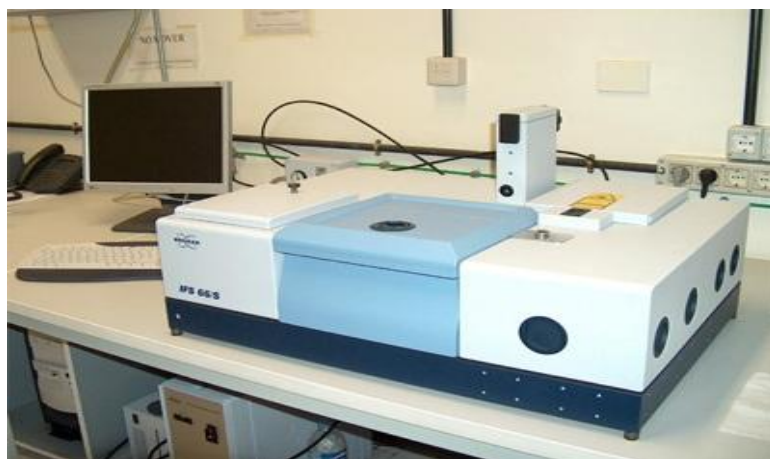


Figura N° 28 espectrofotómetro infrarrojo para identificar la muestra de etanol.



Figura N° 29 Microscopio para identificar la levadura de ***Saccharomyces cerevisiae***

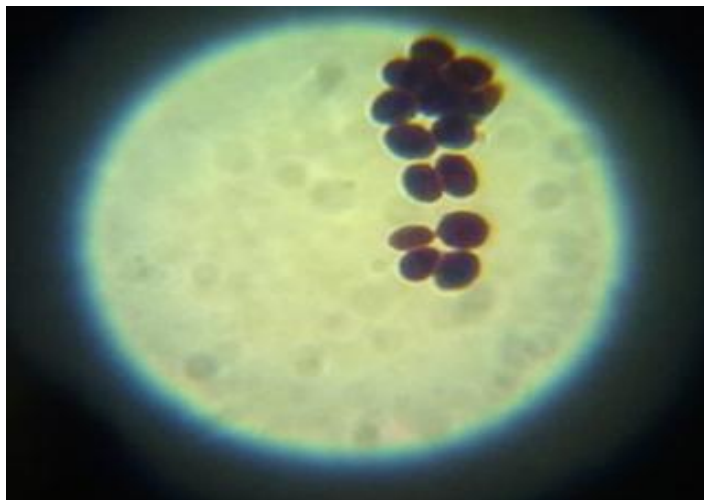


Figura N° 30 Vista microscópica de la levadura ***Saccharomyces cerevisiae***



Figura N° 31 Aparato de Filtración al vacío utilizado durante la práctica.