

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



OBTENCION DE ALCOHOL ETILICO POR MEDIO DE FERMENTACION  
ALCOHOLICA DE LAS CASCARAS DE *Musa paradisiaca* (PLATANO)  
UTILIZANDO COMO MICROORGANISMO PRODUCTOR *Saccharomyces*  
*cerevisiae* (LEVADURA).

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:**

GRISELDA MARGARITA GIRON MONTERROSA.

LAURA JACQUELINE FUNES FLORES.

**PARA OPTAR AL GRADO DE**

LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA.

SEPTIEMBRE, 2013

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

**SECRETARIA GENERAL**

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA 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

### **ASESORAS DE AREA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO:**

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz.

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

### **DOCENTE DIRECTORA**

MAE. Norma Elisabeth Zelaya Portillo

## DEDICATORIA

Agradecemos de manera especial a:

Nuestro padre celestial por ser fiel y ayudarnos a lo largo de nuestra carrera y trabajo de graduación.

*“Ama al señor con ternura y él cumplirá los anhelos más profundos de tu corazón” (Salmos 37:4)*

MAE. Norma Zelaya, por transmitir sus valiosos conocimientos para la realización de este trabajo, por su paciencia y apoyo incondicional en todo momento.

Licda. Odette Rauda, coordinadora general de trabajos de graduación, por sus consejos y correcciones para realizar un buen trabajo de graduación.

Msc. Amy Moran y MSc. Coralia de Díaz, nuestras queridas asesoras de área por sus consejos, correcciones y tiempo dedicado a lo largo de nuestro trabajo de graduación.

Y a todas las personas que nos motivaron y apoyaron en nuestro trabajo de graduación.

Griselda y Laura

## DEDICATORIA

Agradezco a DIOS todopoderoso, por haberme dado la vida, la salud y la fortaleza y guiarme por el camino correcto para poder cumplir con los diferentes retos que en la vida se me han presentado.

Dedico y agradezco muy especialmente este triunfo a mi papá **Ernesto Napoleón Monterrosa Ruiz**, por creer en mí y darme su incondicional amor, apoyo, cariño y comprensión. A mi mamá **María Teresa Hernández**, quien siempre ha velado por mi bienestar y educación siendo un gran apoyo en mi vida. **LOS QUIERO MUCHO.**

A mi esposo José Cruz Menjivar, y a mis hijos Johan y Alexander por su amor, comprensión, cariño, paciencia y apoyo en todo momento e impulsarme con palabras y con hechos ustedes han sido mi fuente inspiración. Al igual que a mis hermanos Gonzalo y Napoleón, a los que quiero por ser parte importante en mi vida.

A mis abuelos, Gonzalo López Ruiz (Q.E.P.D) y Margarita Monterrosa (Q.E.P.D) por ser un ejemplo de vida y quererme tanto, por sus enseñanzas y consejos.

A mi compañera de Tesis y amiga, Laura de Bustillo y a su esposo Carlos Bustillo, por ser personas muy especiales y brindarme su amistad, incondicional apoyo y ayuda, por lo cual merecen una mención muy especial.

Gracias a mi amiga Sindi Gonzales y a todas y cada una de aquellas personas que DIOS ha puesto en mi vida para bendecirme e impulsarme, de diferentes maneras y así poder terminar este proyecto.

Griselda Monterrosa

## DEDICATORIA

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 abandonas y siempre me sacas adelante sobre todas las adversidades, este triunfo y todos te los debo a ti. GRACIAS DIOS

A mis padres Estela Guadalupe de Funes y Germán Mauricio Funes por su apoyo incondicional, 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, este triunfo es suyo. LOS AMO.

A mis hermanos Germán y Claudia mi éxito también es de ustedes, gracias por cada momento que hemos compartido en la vida, por sus palabras de apoyo y por creer en mí.

A mi esposo gracias por ser mi soporte, mi amigo, mi colega y el amor de mi vida, que más que con palabras con hechos has demostrado el gran amor que me tienes, gracias por el apoyo, comprensión y paciencia que has tenido para conmigo. TE AMO. A mis ángeles Carlos y Ximena Bustillo Funes, este éxito se los dedico a ustedes son mi mayor bendición, LOS AMO.

A mi familia: Tía Alba, Tío Harold por brindarme su apoyo porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, gracias. A mis abuelos Mamá Lina (Q.E.D.G), Papá Milo (Q.E.D.G), sé que están compartiendo esta felicidad conmigo desde el cielo. A mis abuelitas Mamá Nena y Mamá Mila por brindarme su apoyo a lo largo de mi formación, su cariño y por creer en mí que Dios las bendiga siempre.

A mi compañera de tesis la cual se merece una mención especial gracias por todos los momentos compartidos a lo largo de nuestra carrera, por tu entrega y sacrificio en esta aventura, gracias por tu amistad y tu confianza te quiero mucho A la familia de mi compañera, gracias por todo su apoyo y paciencia brindada este éxito también se los dedico muy especialmente.

A todas la personas que no he mencionado pero que de alguna forma contribuyeron para alcanzar este éxito en mi vida, MUCHAS GRACIAS.

Laura Funes de Bustillo

## ÍNDICE

CONTENIDO	PAGINA N°
<b>RESUMEN.</b>	<b>XVII</b>
<b>1.0 INTRODUCCIÓN.</b>	<b>XX</b>
<b>2.0 OBJETIVOS.</b>	<b>I</b>
2.1 Objetivo General:	i
2.2 Objetivos Específicos:	i
<b>3.0 MARCO TEORICO.</b>	<b>23</b>
3.1 Las frutas:	23
3.2 Generalidades de las musáceas.	23
3.3 El plátano	24
3.4 Levaduras	29
3.4.1 Estructura química de la levadura	31
3.5 <i>Saccharomyces cerevisiae.</i>	32
3.6 Fermentación.	34
3.6.1 Tipos de fermentación alcohólica	39
3.6.2 Factores ambientales que afectan el proceso de fermentación	40
3.7 Materias primas y su importancia para el proceso fermentativo.	42
3.8 Potencial de iones Hidrógeno (pH)	43
3.9 Grados Brix	43



<b>3.10</b>	<b>Determinación de biomasa por el método peso seco.</b>	<b>43</b>
<b>3.11</b>	<b>Grado alcohólico</b>	<b>44</b>
<b>3.12</b>	<b>Destilación.</b>	<b>44</b>
	3.12.1 Destilación simple	44
	3.12.2 Destilación fraccionada	44
<b>3.13</b>	<b>Alcoholes</b>	<b>45</b>
<b>3.14</b>	<b>Etanol</b>	<b>45</b>
	3.14.1 Propiedades físico químicas del etanol	46
<b>3.15</b>	<b>Pruebas generales de alcoholes</b>	<b>46</b>
	3.15.1 Prueba de Lucas ( $ZnCl_2/HCl$ )	46
	3.15.2 Oxidación con dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7/H_2SO_4$ )	46
	3.15.3 Oxidación con permanganato de potasio	47
<b>3.16</b>	<b>Espectrometría de absorción en el infrarrojo.</b>	<b>47</b>
	3.16.1 Espectros de infrarrojos en el análisis cualitativo	49
<b>3.17</b>	<b>Porcentaje de rendimiento</b>	<b>49</b>
<b>4.0</b>	<b>DISEÑO METODOLÓGICO</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Tipo de estudio: Experimental, prospectivo.</b>	<b>50</b>
<b>4.2</b>	<b>Investigación bibliográfica</b>	<b>50</b>
<b>4.3</b>	<b>Investigación de campo.</b>	<b>50</b>
<b>4.4</b>	<b>Parte experimental</b>	<b>52</b>
<b>4.5</b>	<b>Determinación de la concentración del inóculo.</b>	<b>52</b>
<b>4.6</b>	<b>Recolección de la muestra.</b>	<b>53</b>
<b>4.7</b>	<b>Preparación del sustrato.</b>	<b>53</b>

<b>4.8</b>	<b>Determinación de pH del fermento.</b>	<b>54</b>
<b>4.9</b>	<b>Determinación de grados Brix del fermento:</b>	<b>54</b>
<b>4.10</b>	<b>Determinación de biomasa del fermento por el método peso seco.<sup>(5)</sup></b>	<b>54</b>
<b>4.11</b>	<b>Determinación del grado alcohólico del fermento.</b>	<b>55</b>
<b>4.12</b>	<b>Destilación simple.</b>	<b>55</b>
<b>4.13</b>	<b>Destilación fraccionada.</b>	<b>56</b>
<b>4.14</b>	<b>Pruebas generales de alcoholes</b>	<b>57</b>
	<b>4.14.1 Prueba de Lucas</b>	<b>57</b>
	<b>4.14.2 Oxidación con dicromato de potasio</b>	<b>57</b>
	<b>4.14.3 Oxidación con permanganato de potasio.</b>	<b>57</b>
<b>4.15</b>	<b>Identificación de la muestra por el método por absorción infrarrojo Espectrofotómetro infrarrojo SHIMADZU</b>	<b>58</b>
<b>4.16</b>	<b>Determinación del rendimiento obtenido del proceso de fermentación.</b>	<b>59</b>
<b>5.0</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.</b>	<b>60</b>
<b>5.1</b>	<b>Clasificación de plátano utilizado en la práctica para la fermentación alcohólica.</b>	<b>60</b>
<b>5.2</b>	<b>Verificación de los factores del proceso fermentativo.</b>	<b>60</b>
	<b>5.2.1 Resultado de la determinación de la concentración del inóculo.</b>	<b>60</b>
	<b>5.2.2 Resultados de pH.</b>	<b>61</b>
	<b>5.2.3 Resultados de grados Brix.</b>	<b>63</b>
	<b>5.2.4 Resultados de biomasa</b>	<b>64</b>
	<b>5.2.5 Determinación del grado alcohólico del fermento.</b>	<b>66</b>
<b>5.3</b>	<b>Resultado de la destilación.</b>	<b>67</b>
<b>5.4</b>	<b>Resultados de las pruebas químicas realizadas para determinar alcoholes.</b>	<b>67</b>
	<b>5.4.1 Prueba de Lucas</b>	<b>67</b>

5.4.2	Prueba de dicromato de potasio.	68
5.4.3	Prueba con reactivo de permanganato de potasio	70
5.5	Identificación por espectrofotometría infrarroja	71
5.6	Calculo del rendimiento obtenido de alcohol.	73
6.0	CONCLUSIONES.	75
7.0	RECOMENDACIONES	76
	BIBLIOGRAFIA.	78
	GLOSARIO.	81

## **INDICE DE ANEXOS**

### **ANEXO N°**

1. Materiales utilizados durante la parte experimental
2. Equipos utilizados durante la parte experimental
3. Reactivos utilizados durante la parte experimental
4. Esquema de determinación de la Concentración del inóculo
5. Recolección de la Muestra
6. Preparación del Sustrato

## INDICE DE CUADROS

<b>CUADRO N°</b>	<b>Pág. N°</b>	
Cuadro N° 1	Clasificación botánica del plátano.	25
Cuadro N° 2	Composición química del plátano maduro (%).	25
Cuadro N° 3	Composición química de la cáscara de plátano maduro.	26
Cuadro N° 4	Constituyentes normales referidas a la materia seca de levadura.	31
Cuadro N° 5	Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	33

## INDICE DE FIGURAS

FIGURAS N°	Pág. N°
1. Etapas del periodo de vida del plátano	26
2. Levadura <b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	32
3. Reacción bioquímica de la fermentación	36
4. Movimientos moleculares en absorción infrarroja	47
5. Movimientos en el plano de las moléculas en el infrarrojo	48
6. <b><i>Musa paradisíaca</i></b>	51
7. Equipo utilizado para la destilación simple	55
8. Equipo utilizado para la destilación fraccionada	56
9. Concentración $3.0 \times 10^8$ UFC/g de <b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> (Levadura)	60
10. Tendencia de pH	62
11. Resultados de grados Brix	64
12. Resultados de la biomasa	65
13. Resultado del grado alcohólico del fermento	66
14. Reacción de oxidación con reactivo de dicromato de potasio	69
15. Espectro de absorción infrarroja estándar de alcohol etílico 91°	71
16. Espectro absorción infrarroja del alcohol obtenido	72
17. Esquema de determinación de la concentración del inóculo	85
18. Recolección de la muestra	88
19. Preparación del sustrato	90

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA N°</b>	<b>Pág. N°</b>
1. Resultados de pH.	62
2. Resultado de grados Brix.	63
3. Resultado de biomasa en ensayos 1 y 2.	64
4. Resultados de la prueba de Lucas	68
5. Resultado de prueba de oxidación.	69
6. Resultados con reactivo de permanganato de potasio	70

## ABREVIATURAS

**°C:** Grados Celsius.

**AGAR CASOY:** Trypticasa Soya.

**AGAR SABOURAUD:** Agar Dextrosa Sabouraud.

**ATP:** Adenosín Trifosfato.

**EMP:** son las siglas de EmbdenMeyerhoffParnas de la ruta metabólica de la fermentación alcohólica.

**G/L:** Gramo/Litro.

**IR:** Infrarrojo.

**Kg:** Kilogramo.

**mL:** Mililitros.

**MNPC:** Muy numerosas para contar.

**°Bx:** Grados Brix.

**P/V:** Peso/Volumen.

**pH:** Potencial de iones hidrógeno.

**Psi:** Es una unidad de presión en el sistema anglosajón de unidades (Libras por pulgada cuadrada).

**St:** Estándar.

**T:** Temperatura. (°C).



**UFC:** Unidades formadoras de colonias.

**V/V:** Volumen /Volumen.

## RESUMEN.

El presente trabajo consiste en la obtención de alcohol etílico, por medio de fermentación alcohólica para lo cual se realizarón dos ensayos cada uno con la misma cantidad de muestra y condiciones experimentales de fermentación, esto con el fin de tener una muestra constante de la producción de alcohol etílico, dicho proceso se realizó utilizando un desecho orgánico como lo son las cáscaras de ***Musa paradisiaca*** (plátano), y como microorganismo productor se utilizó ***Saccharomyces cerevisiae*** (levadura), marca comercial con una concentración de  $3.0 \times 10^8$  UFC/g .

La práctica experimental se desarrolló en los laboratorios de: Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), Química Orgánica y Análisis Físicoquímico de Aguas, de la Facultad de Química y Farmacia, todos de la Universidad de El Salvador.

A cada uno de los ensayos se le determinó: pH, grados Brix, Biomasa (peso seco), en los diferentes tiempos de fermentación 24,48 y 72 horas, además se midió el grado alcohólico del fermento a las 24 horas obteniéndose una lectura de 10° Gay Lussac. También se realizarón pruebas químicas de identificación de alcoholes a las muestras obtenidas de la destilación de los ensayos de fermentación, las cuales fueron: oxidación con dicromato de potasio y permanganato de potasio, prueba de reactivo de Lucas y espectrofotometría infrarrojo, las cuales dieron como resultado la presencia de alcohol etílico. Se determinó además el porcentaje de rendimiento de la muestra obtenida de la destilación transcurridas 24 horas el cual fue de 3.46 %.

Se concluye que las cáscaras de ***Musa paradisiaca*** (plátano), bajo condiciones de fermentación de: Temperatura ambiente, pH de 4.5 y una concentración del inoculó  $3.0 \times 10^8$  UFC/g, produce etanol a las 24 horas.

Con esta investigación se demuestra que se puede obtener etanol aplicando un procedimiento: Sencillo, de bajo costo, fácil implementación pero de bajo rendimiento, por lo tanto se recomienda validar el proceso e implementarlo para aprovechar los desechos orgánicos ricos en carbohidratos, realizando investigaciones futuras de las variables que intervienen en el proceso fermentativo como son: concentración de microorganismos, grados Brix, temperatura, cantidad de oxígeno, agitación, para producir un mayor rendimiento.

## 1.0 INTRODUCCIÓN.

Los usos del etanol en la industria son amplios, por lo que se investigan nuevas alternativas de obtención de alcohol etílico, que den pasó al aprovechamiento de los recursos disponibles. El plátano es uno de los frutos tropicales más conocidos y consumidos en todas las partes del mundo.<sup>(18)</sup>

En El Salvador se consumen plátanos de la línea o clon **Curaré enano**, conocido también como cuerno enano; y este se produce y consume desde el Ecuador hasta México. La clasificación de los plátanos, guineos, guineos majonchos y más, es un poco confusa y contradictoria, son triploides espontáneos desde hace miles de años a partir de: **Musa acuminataAA** (Identificación genética) y **Musa balbisiana BB** (Identificación Genética), en El Salvador los plátanos son **AAB**, dos tercios **Musa acuminata**, y un tercio **Musa balbisiana**; así se clasifica de forma general al plátano como **Musa paradisíaca** o **Musa spp**, clon **Curaré enano AAB**. Por tanto denominaremos el plátano a utilizar como **Musa paradisíaca**.<sup>1</sup>

Las cáscaras de **Musa paradisíaca** (plátano) en estado maduro poseen un 31.6% de azúcares solubles, por lo cual se considera una alternativa para la producción de etanol.<sup>(22)</sup> En esta investigación se realizaron ensayos para la obtención de alcohol etílico mediante la fermentación alcohólica, utilizando como sustrato cáscaras de **Musa paradisíaca** (plátano) en estado maduro, adicionando un microorganismo productor **Sacharomyces cerevisiae**, evaluados a nivel piloto de pequeña escala en los laboratorios de: Microbiología en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), Química Orgánica y laboratorio

---

<sup>1</sup>Entrevista con Dr. Cuellar JM, Investigación Genética del Plátano, Genética Salvadoreña S.A de C.V., Santa Ana, El Salvador

Fisicoquímico de Análisis de Aguas, de la Facultad de Química y Farmacia todos de la Universidad de El Salvador.

El procedimiento se realizó con una concentración de microorganismo productor de  $3.0 \times 10^8$  UFC/g, temperatura ambiente, pH promedio obtenido de ambos ensayos de 4.52, y el valor de grados Brix igual a  $15^\circ$ , obteniéndose a las 24 horas un rendimiento del producto separado por destilación fraccionada de 3.46%, así mismo se le realizaron pruebas químicas y la identificación por el método espectrofotométrico infrarrojo las cuales comprobaron la obtención de alcohol etílico.

La investigación se realizó entre el año 2010 y 2013, con la finalidad de proporcionar una alternativa para la obtención de un producto muy útil y de gran importancia para la industria en general como es el alcohol etílico, proponiendo un método de fácil implementación, utilizando un desecho orgánico como sustrato y un microorganismo comercial productor accesible.

En base a los resultados se obtuvo un bajo rendimiento, por lo tanto se recomienda validar el proceso e implementarlo, realizando investigaciones futuras de las variables que intervienen en la fermentación para aprovechar los desechos orgánicos ricos en carbohidratos.

## 2.0 OBJETIVOS.

### 2.1 Objetivo General:

2.1.1 Obtener alcohol etílico por medio de fermentación alcohólica de las cáscaras de **Musa paradisiaca** (plátano) utilizando como microorganismo reproductor **Sacharomyces cerevisiae**(levadura).

### 2.2 Objetivos Específicos:

2.2.1 Identificar la especie del plátano recolectado, para la obtención de las cáscaras a utilizar en la fermentación alcohólica.

2.2.2 Identificar el alcohol etílico obtenido apartir de las cáscaras de **Musa paradisiaca**(plátano) por medio de los siguientes pruebas químicas para alcoholes :reactivo de Lucas, pruebas de oxidación con permanganato de potasio y dicromato de potasio e identificación por el métodoespectrofotométrico Infrarrojo.

2.2.3 Determinar los grados Brix y el grado alcohólico del fermento.

2.2.4 Cuantificar por medio del porcentaje de rendimiento el producto obtenido del proceso de la fermentación alcohólica de las cáscaras de **Musa paradisiaca** (plátano).

### 3.0 MARCO TEORICO.

#### 3.1 Las frutas:

Las frutas forman parte importante de la dieta alimenticia, ya que suministra al organismo apreciables cantidades de proteínas, carbohidratos, minerales y vitaminas. Cuando las frutas se encuentran frescas poseen en su composición abundante agua, lo que disminuye su valor alimenticio, lo contrario sucede cuando estas están en estado seco, ya que el bajo contenido de agua hace que se concentren todos los demás componentes, esto relacionado por unidad de peso, además las frutas en estado seco se conservan mejor que en estado fresco.<sup>(5)</sup>

Algunas frutas, como el plátano poseen un valor energético definido, que además de azúcar, tiene la particularidad de poseer almidón, que se digiere con gran facilidad, y que en el proceso de maduración un gran porcentaje del almidón se convierte en azúcar.<sup>(5)</sup>

#### 3.2 Generalidades de las musáceas.

Hoy en día debido a la gran cantidad de híbridos de las familias de las musáceas que las industrias han desarrollado con el fin de optimizar la producción, e incrementar ganancias, en el mercado resulta bastante complicado y hasta casi imposible poder establecer, el tipo de híbrido que se cultiva, de ahí que se ha optado por dar una clasificación general en cuanto al plátano se refiere, clasificándolo como ***Musa paradisiaca***.<sup>(2)</sup>

El plátano, guineo de seda y guineo majoncho, pertenecen a la familia de las musáceas y al género *Musa*. Estos no son verdaderos árboles si no hierbas gigantes, provistas de un rizoma del que salen de 10 a 30 hojas, cuyas vainas al superponerse forman un falso tallo. Las nuevas hojas se desarrollan encima del cilindro formado por las vainas de las hojas viejas. Luego de formada la última hoja, se desarrolla una inflorescencia en forma

de racimo en el que se encuentra tres tipos diferentes de flores : femeninas, hermafroditas y masculinas. El numero de gajos es diferentes para cada variedad al igual que el numero de frutos, estos carecen de semillas y se reproducen vegetativamente en forma de brotes que crecen en la base de una planta madre.(2)

### 3.3 El plátano

El plátano es originario de Asia, llegó a las costas mediterráneas en el año de 650, y a las islas canarias en el siglo XV. Desde las canarias llegó a América en el año de 1516, donde adoptó el nombre de banana. (2)

El plátano es una baya carnosa que se encuentra en racimos, posee una cáscara gruesa con aristas en la superficie, lo cual lo protege, cuando madura es de color amarillo y las aristas desaparecen quedando casi liso; el fruto tiene un tamaño promedio de 20-25 centímetros, con diámetro aproximado de 4 centímetros. Es de sabor dulce en su estado maduro por lo cual se come crudo, asado, frito, etc. Cuando esta verde no es dulce. (6)

Las principales Variedades de plátano recomendadas en el país son:

**Plátano hembra:** Es una variedad de media altura, pero produce los racimos más grandes.

**Plátano enano:** Es la variedad de menor altura y presenta la característica de ser resistente al volcamiento causado por el viento.

**Plátano Usulután:** Esta variedad es de origen nacional, y se caracteriza por alcanzar hasta 4 metros de altura. (6)



Cuadro N° 1 Clasificación botánica del plátano.

<b>ESPECIFICACION</b>	<b>CLASIFICACION</b>
Tipo	Fanerógama
Sub-tipo	Angiosperma
Clase	Monocotiledóneas
Sub-clase	Inferogamas
Familia	Musáceas
Orden	Musa
Género	Musa
Sección	Eumusa
Especie	Paradisíaca

Cuadro N° 2 Composición química del plátano maduro (%).

<b>COMPONENTE</b>	<b>PORCENTAJE (%)</b>
Agua	75,12
Almidón	4,21
Celulosa	0,92
Sacarosa	9,36
Glucosa	5,19
Dextrosa	1,76
Gomas	1,60
Tanino	0,01
Proteínas	2,10
Cenizas	0,76

Cuadro N° 3 Composición química de la cáscara de plátano maduro.

COMPONENTE	PORCENTAJE (%)
Almidón	35
Azúcares solubles (Glucosa, fructosa y sacarosa)	31.6
Celulosa	10.5
Hemicelulosa	14.0

El plátano es una fruta a la que no se le permite madurar en el árbol (fruta climatérica), ya que al hacerlo, estaría sujeta a daños causados por los insectos, roedores y otros animales; además la cantidad de componentes sería disminuido por lo que la calidad de la fruta sería inferior que la madurada en la planta. (6)

El desarrollo óptimo del plátano se ve afectado por: cambios físicos y químicos perceptibles que este sufre, por el período de corta, transporte, almacenaje, y tipo de venta del mismo. En la Figura N° 1 se muestran el período de vida del plátano en sus diferentes etapas. (5)

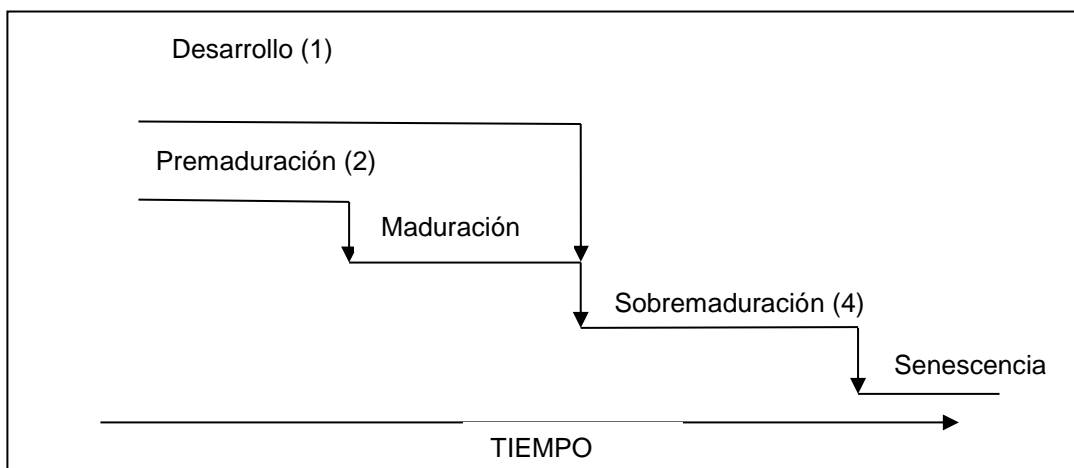


Figura N° 1 Etapas del periodo de vida del plátano.

– **Etapa de desarrollo:**

Esta etapa inicia con la formación de la parte comestible, es decir, el engrandecimiento del fruto y cesa con la terminación del crecimiento natural, incluye las etapas de pre maduración y maduración.(5)

– **Etapa de pre maduración:**

Es el periodo de máximo engrosamiento y tamaño de la fruta. El plátano no maduro es verde oscuro y las primeras señales visibles del cambio se aprecian en el color de la cáscara (verde claro) y en la consistencia del corazón se ablanda y cambia de un color blanco total a un color blanco ligeramente alterado. El ablandamiento de la pulpa avanza hacia fuera, desde el corazón, y desde la punta hasta el pedúnculo, y se puede percibir al tacto. El verde claro de la cáscara pasa a un verde amarillento pálido, y en este estado toda la pulpa se ha ablandado perceptiblemente. En este periodo el plátano se usa para consumo humano. (5)

– **Etapa de maduración:**

Es la etapa de máxima utilidad para el consumo. Aquí, la fruta es de color amarillo intenso, habiendo desaparecido ya toda traza de verde, excepto en el ápice y en el pedúnculo. El ápice verde persiste incluso cuando el fruto ha amarilleado totalmente; a medida que se desaparece el color verde de las puntas, diciéndose de la fruta que está madura para comer, la pulpa en ese estado, es de textura suave y color amarillento.(5)

– **Etapa de sobre maduración:**

Esta etapa se define como la secuencia de cambio de color, sabor y textura, que conlleva al estado en el cual la fruta es aun aceptable para comer a pesar de que se hayan suscitado dichos cambios. En el caso del plátano, la pulpa pierde el jugo natural y sales del fruto por estar muy impregnadas de agua, y en las cáscaras ocurren alteraciones degenerativas, en su mayor parte causadas por infecciones fúngicas. (5)

**Etapas de senescencia:**

En esta etapa el plátano pierde calidad, presenta desordenes fisiológicos y enfermedades inducidas por hongos. En el plátano, las primeras señales de esos cambios consisten en manchas pardas, que finalmente coalescen hasta que la cáscara se torna parda, estado en el cual la pulpa todavía se puede comer. Por último la cáscara adquiere un color pardo. (5)

**– Requerimientos de clima, suelo, y siembra**

El plátano se adapta a climas tropicales y sub tropicales húmedos, desde el nivel del mar hasta 1,200 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura óptima de crecimiento entre 18.5 y 35°C, a temperaturas menores se retarda el desarrollo fisiológico de la planta, retrasando así la cosecha; existen otros factores climáticos como la luz y el viento, que influyen en el cultivo del plátano. Los suelos ideales para el cultivo del plátano son los francos (franco arenoso, franco arcilloso-limoso), profundos, fértiles, bien drenados y de topografía plana o casi plana. El plátano se puede sembrar durante todo el año, siempre y cuando se tenga un adecuado suministro de agua, especialmente en la época seca. (6)

La cosecha inicia entre los 11 y 13 meses después de la siembra, dependiendo de las zonas climáticas y edáficas, tomando como indicadores principales la apariencia del fruto y la fecha de floración. (6)

Al momento de la cosecha, el racimo y los frutos deben presentar un tamaño normal de variedad; la superficie del plátano maduro debe estar casi completamente redondeada, desapareciendo la arista. (6)

En buenas condiciones de vegetación y clima, el intervalo de tiempo que separa la emisión de inflorescencia y el estado normal medio de recolección para el comercio de exportación es de 80 a 95 días. (6)

### 3.4 Levaduras

Las levaduras al igual que los mohos, son hongos, pero se distinguen de ellos porque su forma dominante es unicelular generalmente su reproducción es por esporulación, gemación o fisión. El método más común es por gemación.

La gemación se produce cuando disponen de suficientes nutrientes para su alimentación.<sup>(5)</sup>

Se diferencia de las algas porque no realizan fotosíntesis, tampoco son protozoos puesto que tienen una pared celular rígida, son más grandes que las bacterias, hay aproximadamente 350 especies de levaduras, separadas en 39 géneros.<sup>(5)</sup>

Las levaduras aparecen casi incoloras en las suspensiones, en grandes concentraciones o prensadas, muestran una coloración blanca o amarilla pardusca. Esto también es aplicado a las levaduras de la industria, además hay algunas tipos de levaduras rojas y negras, de importancia secundaria.<sup>(5)</sup>

Las levaduras no poseen movimiento propio pues carecen de órganos motores (cilios), se multiplican con una velocidad bastante grande. Para un buen crecimiento tienen importancia unas condiciones óptimas de vida, es decir, una temperatura y una alimentación adecuada.<sup>(5)</sup>

Las levaduras han servido al hombre durante muchos siglos para fermentar jugos de fruta, para elaborar muchos y nutritivos alimentos.<sup>(5)</sup>

Su importancia es mayor en la actualidad porque se ha utilizado en muchos procesos fermentativos síntesis de muchos materiales, grasas y proteínas a partir de azúcares simples y amoníaco.<sup>(5)</sup>

Se consideran tres principales subdivisiones reconocidas:

- Las levaduras ascosporógenas y ascomicéticas
- Las levaduras basidiomicéticas
- Las levaduras que no tienen estadios perfectos (hongos imperfectos) son deuteromicetes.

Las levaduras se encuentran muy difundidas en la naturaleza y son diseminadas por los insectos y el viento. Varían considerablemente de tamaño entre 1-5 micrómetros de ancho y de 5 a 30 micrómetros o más de largo, generalmente son ovoides si bien algunos son esféricos y otros alargados, cada especie tiene su aspecto característico. Las levaduras no tienen flagelos u otros organélos de locomoción.(5)

Las células viejas de las levaduras con paredes engrosadas, especialmente son resistentes a condiciones poco favorables de calor, luz, desecación y sustancias químicas.(5)

Algunas especies de levaduras almacenan grandes cantidades de grasas, carbohidratos o proteínas; otras especies son fuente de glicógeno, enzimas y vitaminas, para los microorganismos y suplementos alimenticios de humanos y otros animales.(5)

Cuando se desarrollan en medio de cultivos adecuados las colonias de levaduras varían en aspecto, textura y margen. Así algunas son lisas, otras rugosas, aplanadas, otras elevadas; tienen bordes bien definidos o irregulares. Las colonias jóvenes tienen consistencia comparable a la de una pasta; la cual con el tiempo se vuelve más espesa y seca.(5)

Como las levaduras son muy importantes en la industria por su capacidad para fermentar u oxidar sustratos y producir sustancias útiles, es conveniente usar la cepa de microorganismos que proporcionan la mayor cosecha.(5)

Las levaduras también son capaces de crecer en un amplio margen de temperatura desde 0° a 47 °C, algunos no se desarrollan a más de 15 °C, aunque otros pueden hacerlo a mucho menos temperatura. La óptima para la mayor parte está entre 20 y 30 °C. En general se sostiene que las levaduras se desarrollan mejor en medios con acción ácida.(5)

La levadura se propaga bien en presencia del aire y en ausencia de el, pero fermenta los azúcares más rápidamente cuando está ausente el aire; puesto

que la asimilación es entonces más lenta y la mayor parte del azúcar es convertida en alcohol.<sup>(5)</sup>

En presencia de aire en exceso, es inhibida la fermentación y se estimula la asimilación; por esta razón se airea fuertemente la solución fermentada.

En escala de laboratorio, es conveniente airear gran número de matraces que contengan pequeñas cantidades de líquidos, agitándolos constantemente por medio de una máquina. De esta manera se consigue una aireación uniforme en cada matraz. El método de aireación más empleado es hacer burbujear aire a través del sustrato líquido.<sup>(5)</sup>

Los constituyentes normales de las células referidas a la materia seca de levadura en cantidades porcentuales son las siguientes:<sup>(5)</sup>

Cuadro N° 4 Constituyentes normales referidas a la materia seca de levadura.

<b>COMPONENTES</b>	<b>PORCENTAJE EN PESO SECO (%)</b>
Grasas	2.0
Elementos Inorgánicos	9.0
Hidratos de Carbono	37.0
Sustancias Nitrogenadas	50.0

### **3.4.1 Estructura química de la levadura**

Básicamente la célula de la levadura consiste de una pared celular formada por tres capas en las células sanas. Esta pared rodea al plasmalema (membrana del citoplasma) y el citoplasma, dentro del cual existen varios orgánulos, incluyendo vacuolas, mitocondrias, poli-ribosoma y gránulos.<sup>(5)</sup>

Existe también un núcleo en dos diferentes dimensiones ópticas; la región que es más densa óptimamente se conoce con el nombre de nucléolo y la región menos densa se llama núcleo plasma.<sup>(5)</sup>

### 3.5 *Saccharomyces cerevisiae*.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiende a formar colonias de color crema, blancas y húmedas en mosto agar. En cultivos jóvenes las células presentan forma redonda, ovalada o poliforme y un tamaño de 4 a 14 micras de longitud por 3-7 micras de grueso. (Ver Figura N°2) Forma ascosporas redondas y lisas. Fermentan glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa. No utiliza nitratos, y tolera pH: 3.5-4.0. (5)

En condiciones normales de observación en el microscopio el núcleo será invisible, el protoplasma en las células jóvenes será de apariencia suave y poco granuloso, aumentando su granulación y el tamaño de las vacuolas en las células viejas. Las células muertas presentan generalmente una apariencia más irregular, con el protoplasma rugoso y paredes celulares más gruesas. (5)

*Saccharomyces cerevisiae* esporula en forma muy difícil y para inducir la esporulación es necesario mantener la levadura en medio húmedo, con aire y sin nutrientes, excepto solo minerales, cuando se forman esporas, estas generalmente serán 2 a 4, conociéndose con el nombre de ascosporas y llamándose a la bolsa que la contiene asca. (5)



Figura N° 2 Levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

(En una imagen de microscopio)

La estructura de la pared celular previene físicamente la difusión dentro o fuera de la célula de compuestos con pesos moleculares mayores de 4,500. Como se



mencionó anteriormente, debajo de la pared celular se encuentra la membrana citoplasmática o plasmalema, la cual consiste de manan, proteína y lípidos. (5)

Esta membrana controla el paso de iones inorgánicos, aminoácidos y azúcares; así como el paso hacia el exterior de los productos del metabolismo (alcohol, enzima, material proteico, etc.)<sup>(5)</sup>

En el citoplasma existen mitocondrias los cuales están directamente involucrados con la síntesis de proteínas y ácido ribonucleico (RNA) y también en las reacciones del ciclo de Krebs y en los sistemas para transporte de electrones. En las levaduras que se encuentran en condiciones aeróbicas la mitocondria puede tener forma esférica o de bastón, en tanto que en las levaduras que se encuentran en condiciones anaeróbicas o en un medio que tenga un alto contenido de glucosa se formarán mitocondrias más simples. (5)

La pared celular exterior de ***Saccharomyces cerevisiae*** consiste principalmente en un complejo que fosfomanan, en tanto que las zonas exteriores de las mismas, estarán formadas por manana y glucana.

Cuadro N° 5 Clasificación taxonómica de ***Saccharomyces cerevisiae***.

ESPECIFICACION	CLASIFICACION
Clase	<b><i>Ascomycetas.</i></b>
Sub-clase	<b><i>Hemiascomycetidae.</i></b>
Orden	<b><i>Hendomicetales.</i></b>
Familia	<b><i>Sacharomycetaceae.</i></b>
Sub-familia	<b><i>Sacharomycoideae.</i></b>
Genero	<b><i>Saccharomyces.</i></b>

### 3.6 Fermentación.

La fermentación alcohólica se puede considerar desde una perspectiva humana como un proceso bioquímico para la obtención de etanol, que por otras vías se ha obtenido gracias a procedimientos químicos industriales, como por ejemplo mediante la hidratación de etileno. (13)

La fermentación alcohólica denominada también como fermentación del etanol o incluso fermentación etílica es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire oxígeno, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono por regla general azúcares: como pueden ser por ejemplo la glucosa, la fructosa, la sacarosa y el almidón. para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) en forma de gas y unas moléculas de adenosintrifosfato (ATP) que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico . El etanol resultante se emplea en la elaboración de algunas bebidas alcohólicas, tales como el vino, la cerveza, la sidra, el cava, etc. Aunque en la actualidad se empieza a sintetizar también etanol mediante la fermentación a nivel industrial a gran escala para ser empleado como biocombustible. (13)

La fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta, siendo el producto final un compuesto orgánico. Estos productos finales son los que caracterizan los diversos tipos de fermentaciones. Fue descubierta por Pasteur, que la describió como la vida sin el aire. para el caso Otto Heinrich Warburg define la fermentación alcohólica como un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono , para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono  $\text{CO}_2$  en forma de gas y unas moléculas de ATP .(13)

La fermentación alcohólica tiene como finalidad biológica proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos unicelulares, para ello disocian las moléculas de glucosa y obtienen la energía necesaria para sobrevivir, produciendo el alcohol y  $\text{CO}_2$  como desechos a consecuencia de la fermentación. Las levaduras y bacterias causantes de este fenómeno son microorganismos muy habituales en las frutas y cereales y contribuyen en gran medida al sabor de los productos fermentados. Una de las principales características de estos microorganismos es que viven en ambientes completamente carentes de oxígeno, máxime durante la reacción química, por esta razón se dice que la fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico. (13)

La fermentación en términos generales es la descomposición de las sustancias orgánicas de origen vegetal exentas de nitrógeno, preferentemente los hidratos de carbono o sus derivados por medio de bacterias, levaduras y mohos con producción de energía. Hay fermentaciones aeróbicas, oxidantes y anaeróbicas. Tanto la fermentación anaeróbica y aeróbicas tienen ambas el mismo fin, la provisión de energía de los microorganismos causantes del fenómeno. (15)

La fermentación es un proceso conocido desde la antigüedad y algunas de ellas constituyen hoy en día una de las ramas de producción más importantes en la industria. Existen dos tipos de fermentación: fermentación anoxidativa en la cual no hay intervención del oxígeno en el proceso y fermentación oxidatoria en la cual el oxígeno está presente. (13)

Todos los procesos fermentativos dependen de las condiciones ambientales a que se somete el microorganismo en presencia del sustrato, entre estas condiciones están: Concentración del azúcar, aeración, control de temperatura, formación de espuma. (13)

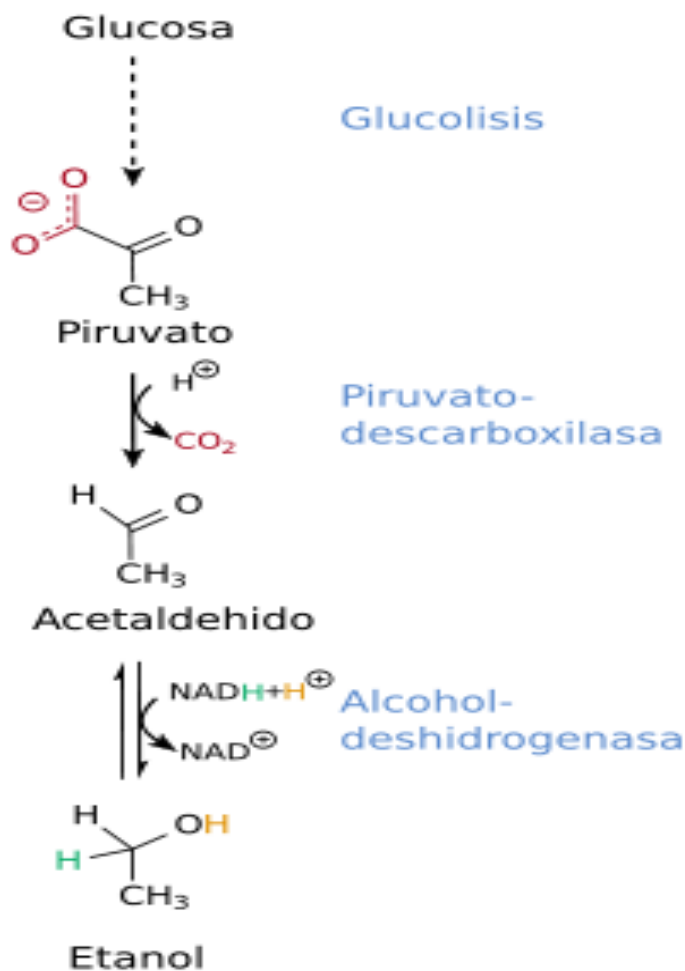
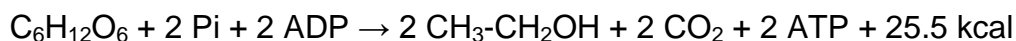


Figura N° 3 Reacción bioquímica de la fermentación

La glucólisis es la primera etapa de la fermentación, lo mismo que en la respiración celular, y al igual que ésta necesita de enzimas para su completo funcionamiento; a pesar de la complejidad de los procesos bioquímicos una forma esquemática de la reacción química de la fermentación alcohólica puede describirse como una glicólisis denominada vía Embden-Meyerhof-Parnes. (Figura N° 3) de tal forma que puede verse como participa inicialmente una molécula de hexosa:



Se puede ver que la fermentación alcohólica, desde el punto de vista energético es una reacción exotérmica, se libera una cierta cantidad de energía. La fermentación alcohólica produce gran cantidad de CO<sub>2</sub>, que es la que provoca que el cava (al igual que el Champagne y algunos vinos) tengan burbujas. Este CO<sub>2</sub> (denominado en la edad media como gas vinorum) pesa más que el aire, y puede llegar a crear bolsas que desplazan el oxígeno de los recipientes donde se produce la fermentación. (13)

Un cálculo realizado sobre la reacción química muestra que el etanol resultante es casi un 51% del peso, los rendimientos obtenidos en la industria alcanzan el 7%. Se puede ver igualmente que la presencia de fósforo (en forma de fosfatos), es importante para la evolución del proceso de fermentación. (18)

La fermentación alcohólica se produce por regla general antes que la fermentación maloláctica, aunque existen procesos de fermentación específicos en los que ambas fermentaciones tienen lugar al mismo tiempo. La presencia de azúcares asimilables superiores a una concentración sobre los 0.16 g/L produce invariablemente la formación de alcohol etílico en proceso de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura), incluso en presencia de exceso de oxígeno (aeróbico), este es el denominado efecto Crabtree, este efecto es tenido en cuenta a la hora de estudiar y tratar de modificar la producción de etanol durante la fermentación. (13)

Si bien el proceso completo (vía *Embden-Meyerhof-Parnes*) descrito simplificado anteriormente explica los productos resultantes de la fermentación etílica de un hexano, cabe destacar que el proceso se puede detallar en una glicólisis previa gobernada por un conjunto de enzimas en la que se obtiene un piruvato tal y como se describe a continuación:



La reacción química se describe como la reducción de dos moléculas de Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) de NADH (forma reducida del NAD<sup>+</sup>) con un balance final de dos moléculas de ADP que finalmente por la reacción

general mostrada anteriormente se convierten en ATP (Adenosín Trifosfato). Otros compuestos trazados en menores proporciones que se encuentran presentes tras la fermentación son: el ácido succínico, el glicerol, el ácido fumárico. (13)

En más detalle durante la fermentación etílica en el interior de las levaduras, la vía de la glucólisis es idéntica a la producida en el eritrocito (con la excepción del piruvato que se convierte finalmente en etanol). En primer lugar el piruvato se descarboxila mediante la acción de la piruvato descarboxilasa para dar como producto final acetaldehído liberando por ello dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) a partir de iones del hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) y electrones del Dinucleótido de Nicotinamida y Adenosina (reducido)(NADH). Tras esta operación el NADH(Dinucleótido de Nicotinamida y Adenosina (reducido) sintetizado en la reacción bioquímica catalizada por el Gliceraldehido 3-Fosfato Deshidrogenasa (GADHP) se vuelve a oxidar por el alcohol deshidrogenasa, regenerando  $\text{NAD}^+$  Nicotinamida Adenina dinucleótido para la continuación de la glucólisis y sintetizando al mismo tiempo etanol.(13)

Se debe considerar que el etanol va aumentando de concentración durante el proceso de fermentación y debido a que es un compuesto tóxico, cuando su concentración alcanza aproximadamente un 12% de volumen las levaduras tienden a morir. Esta es una de las razones fundamentales por las que las bebidas alcohólicas (no destiladas) no alcanzan valores superiores a los 20% de concentración de etanol. (13)

La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico exotérmico (libera energía) y moléculas de ATP necesarias para el funcionamiento metabólico de las levaduras (seres unicelulares). Debido a las condiciones de ausencia de oxígeno durante el bioprocesos, la respiración celular de la cadena del ADP en ATP queda completamente bloqueada, siendo la única fuente de energía para las levaduras la glicólisis de la glucosa con la formación de moléculas de ATP mediante la fosforilación a nivel de sustrato. El balance a nivel molecular del

proceso se puede decir que genera dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. (13)

### **3.6.1 Tipos de fermentación alcohólica**

#### **Fermentación industrial**

La fermentación etílica ha sufrido algunas transformaciones con el objeto de aumentar la eficiencia química del proceso, una de las mejoras más estudiadas en la industria es la posibilidad de realizar la fermentación alcohólica continua con el objeto de obtener mayores cantidades de etanol. Hoy en día el procesamiento industrial de algunas bebidas alcohólicas como puede ser el vino o la cerveza se realizan en ambientes controlados capaces de ofrecer a un ritmo apropiado de estos productos de consumo al mercado. Esta vía ofrece una amplia materia de investigación en temas de eficiencia de bioreactores , empleando para ello teoría de sistemas de control (el problema desde el punto de vista de ingeniería de sistemas es altamente no lineal y oscilatorio). Otra vía de investigación acerca de la mejora de los procesos industriales es la mejora de las cepas de levaduras (como puede ser la *Zymomonasmobilis* que ofrece ventajas en los procesos continuos de fermentación), permitiendo la convivencia de una mayor densidad de las mismas durante la producción. Una de las características de la fermentación etílica industrial es la selección adecuada de las levaduras a inocular en el proceso de fermentación con el objeto de aumentar el rendimiento de la producción. (15)

#### **Fermentación industrial típica**

Es esencialmente un proceso que se produce en un recipiente llamado fermentador o en general, biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo (levaduras) son transformadas mediante la reacción microbiana en metabolitos y biomasa. Durante el proceso los microorganismos van aumentando de concentración en el transcurso de la

reacción al mismo tiempo que el medio va modificando sus propiedades químicas y se forman productos nuevos como consecuencia de las reacciones anabólicas.(15)

### **Fermentaciones naturales**

La fermentación alcohólica con la emisión de ciertas cantidades de etanol se produce de forma espontánea en la naturaleza siempre que se encuentre un azúcar y una atmósfera pobre de oxígeno, es por esta razón que ocurre espontáneamente en el interior de algunas frutas que se puede decir sufren un proceso de maduración anaeróbica.(15)

### **Fermentaciones específicas**

Las fermentaciones específicas son manipuladas por el hombre con el objeto de obtener el etanol en ciertas bebidas. Para ello se emplean principalmente los azúcares de las frutas, cereales y leche. La producción de estas bebidas es en la mayoría de los casos local debido a la disponibilidad de los sustratos. (15)

#### **3.6.2 Factores ambientales que afectan el proceso de fermentación**

Todos los procesos fermentativos dependen de las condiciones ambientales a que se somete el microorganismo en presencia del sustrato, entre estas condiciones están:(5)

- Concentración del azúcar.
- Control del pH del medio.
- Aeración.
- Control de temperatura.
- Formación de espuma.
- Contaminación.

**Concentración del azúcar:** Sistema típico donde la concentración de la sustancia convertible se reduce gradualmente desde un valor inicial alto hasta



un mínimo. La mitad de los azúcares totales fermenta en 8 - 10 horas durante el período principal de fermentación de un proceso que dura de 60 a 70 horas.<sup>(5)</sup>

**Control de pH del medio:** El ajuste del pH del sustrato a un valor óptimo inicial antes de la inoculación de los microorganismos es una parte de la preparación del sustrato. El pH inicial óptimo depende de la especie de organismo usado, de la reacción deseada y de las condiciones del proceso.<sup>(5)</sup>

**Aeración:** En muchos procesos y si es aeróbico es conveniente la presencia del aire, en especial durante la fase de incubación, cuando el organismo prolifera rápidamente. Las levaduras crecen bien bajo condiciones aeróbicas.<sup>(5)</sup>

**Control de temperatura:** La temperatura inicial óptima depende de factores análogos a los que controlan el pH. Aunque la mayoría de microorganismos toleran intervalos amplios de temperatura. Las levaduras no toleran temperaturas mayores de 470 °C y la *Saccharomyces cerevisiae* crece a 200°C.<sup>(5)</sup>

**Formación de espuma:** Durante el proceso fermentativo el caldo de cultivo tiende a formar espuma, debido al movimiento acelerado de agitación y al exceso de aire propagado en el sustrato, forma espuma compuesta de caldo y levadura, quedando adherida en las paredes del fermentador.<sup>(5)</sup>

**Contaminación:** algunos procesos microbianos fermentativos no pueden realizarse con éxito, debido a contaminación causada por la presencia de microorganismos como bacterias, degeneración de los microorganismos y las diferencias en los valores óptimos del pH.<sup>(5)</sup>

### 3.7 Materias primas y su importancia para el proceso fermentativo.

El etanol se puede producir a partir de 3 principales tipos de materias primas:

- Materias ricas en sacarosa como la caña de azúcar, plátano, la melaza y el sorgo dulce.
- Materias ricas en almidón como los cereales (maíz, trigo, cebada, etc.) y los tubérculos (yuca, camote, papa, malanga, etc.).
- Materias ricas en celulosa como la madera y los residuos agrícolas. (15)

Desde el punto de vista técnico, la caña de azúcar es una de las materias primas más atractivas de biomasa. Lo anterior se debe a que los azúcares que contiene se encuentran en una forma simple de carbohidratos fermentables y además durante su procesamiento se genera el bagazo, que se usa como combustible en la producción de etanol. El principal inconveniente de la caña de azúcar son los costos de producción. Además, se requieren tierras fértiles para su cultivo las cuales podrían ser destinadas a la producción de alimentos. (15)

Por su parte, las materias ricas en almidón contienen carbohidratos de mayor complejidad molecular que necesitan ser transformados en azúcares más simples por un proceso de conversión (sacarificación), lo que introduce un paso más en la producción con el consiguiente aumento en los costos de capital y de operación. No obstante lo anterior, existen ciertos cultivos amiláceos como es el caso de la yuca, los cuales se pueden establecer con un mínimo de insumos y en tierras marginales en donde generalmente otras especies más exigentes no se desarrollan. (15)

Finalmente, las materias primas ricas en celulosa son las más abundantes, sin embargo la complejidad de sus azúcares hacen que la conversión de estos en carbohidratos fermentables sea una tarea difícil y poco rentable en la

actualidad. Los procesos de hidrólisis ácida y enzimática de sustratos celulósicos se encuentran poco desarrollados a nivel industrial, sin embargo se esperan avances importantes en los próximos años. (15)

### **3.8 Potencial de iones Hidrógeno (pH)**

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 pH puede ser medido con diferentes dispositivos que van desde papel indicador hasta equipos portátiles.(1)

### **3.9 Grados Brix**

Los grados Brix (°Bx) indican la cantidad de sólidos solubles, es decir, la consistencia del producto. Se determina mediante el índice de refracción el cual se basa en la dirección que toma un rayo de luz cuando incide en un medio de diferente densidad que el aire.(14)

### **3.10 Determinación de biomasa por el método peso seco.**

#### **Determinación por peso seco.**

El método más usado para medir el crecimiento microbiano es una estimación directa de la masa celular denominado: peso seco celular, según Humphrey (1984).

El método para medir el crecimiento microbiano consiste en secar lentamente volúmenes conocidos de cultivo celular hasta obtener un peso constante. Cuando se trata de levaduras, estas sedimentan rápidamente. (5)

### **3.11 Grado alcohólico**

El grado alcohólico es determinado en la práctica mediante un aerómetro expresamente graduado, llamado alcoholímetro, alcoholómetro o aerómetro. El más utilizado es el alcoholímetro de Gay Lussac, el cual se encuentra graduado a 15°C, y expresa el grado alcohólico en volúmenes (centímetros cúbicos de alcohol etílico en 100 centímetros cúbicos de líquido a 15°C).<sup>(14)</sup>

### **3.12 Destilación.**

Existen sustancias líquidas que se encuentran contaminadas con impurezas en pequeña cantidad, éstas pueden ser eliminadas por algún tipo de destilación. Se dice entonces que se efectúa una purificación. <sup>(14)</sup>

La destilación es una de las principales técnicas para separar mezclas de líquidos. La separación se fundamenta en la diferencia de la presión de vapor de los diferentes componentes de la mezcla. Al calentar la mezcla los componentes se evaporan para condensarse posteriormente y durante el proceso el vapor se enriquece con los componentes más volátiles. <sup>(14)</sup>

#### **3.12.1 Destilación simple**

Se usa cuando la diferencia entre los puntos de ebullición de los componentes es grande, mayor de 80° C, o cuando las impurezas son sólidos disueltos en el líquido a purificar. <sup>(14)</sup>

#### **3.12.2 Destilación fraccionada**

La destilación fraccionada es un proceso físico utilizado en química para separar mezclas (generalmente homogéneas) de líquidos mediante el calor, y con un amplio intercambio calórico y masóico entre vapores y líquidos. Se emplea cuando es necesario separar soluciones de sustancias con puntos de ebullición distintos pero cercanos. Algunos de los ejemplos más comunes son el petróleo, y la producción de etanol.<sup>(14)</sup>

### 3.13 Alcoholes

Los alcoholes son derivados de hidrocarburos (moléculas formadas por carbono e hidrógeno) y se caracterizan por tener un grupo oxidrilo (OH) unido a uno de los átomos de carbono en sus moléculas. (15)

La mayoría de los alcoholes de bajo peso molecular son los de mayor importancia comercial. Son usados como solventes en la preparación de pinturas, anticongelantes, productos farmacéuticos y otros compuestos. (15).

En la gran familia de los alcoholes se encuentran el "etanol" y el "metanol" dos compuestos que mezclados con nafta se están implementando como combustible. En América del Sur más de 4 millones de automóviles funcionan con etanol como resultado de un programa gubernamental que tiene por objetivo obtener un combustible alternativo derivado de la caña de azúcar. Además es usado como un aditivo que se le añade a la gasolina para oxigenarla, llamado EthylTertiaryButylEther, ETBE, el cual ayuda a que se produzca una mejor y limpia combustión. (15)

### 3.14 Etanol

Fórmula química del etanol:  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  PM 46.07. Los alcoholes simples de bajo peso molecular como el etanol son incoloros, volátiles, líquidos, inflamables y solubles en agua. Cuando el peso molecular crece, el punto de ebullición, el punto de fusión y la viscosidad crecen y la solubilidad en agua decrece. Estas propiedades físicas pueden ser alteradas por la presencia de otro grupo funcional (es un átomo o grupo de átomos unidos entre sí y al resto de las moléculas de una determinada manera estructural). (15)

### 3.14.1 Propiedades físico químicas del etanol

Es un líquido volátil, inflamable, incoloro, móvil, posee un olor característico, produce una sensación de quemadura en la lengua, y es el alcohol de menor toxicidad. Usos generales del etanol:

- Es usado en bebidas alcohólicas.
- Se utiliza como desinfectante.
- Solvente en numerosas sustancias.
- Actualmente su uso como combustible por su alto octanaje. (15)

### 3.15 Pruebas generales de alcoholes

#### 3.15.1 Prueba de Lucas ( $\text{ZnCl}_2/\text{HCl}$ )

Se basa en la diferencia de reactividad que presentan los alcoholes con los halogenuros de hidrogeno, para formar el halogenuro de alquilo correspondiente. La reacción es catalizada con cloruro de zinc anhidro.

Los alcoholes terciarios reaccionan tan rápido que se puede observar la separación de una capa de cloruro de alquilo terciario insoluble. Con los alcoholes secundarios la solución es turbia a los 5 minutos, con la formación de cloruro de alquilo secundario. Con los alcoholes primarios saturados, la solución permanece clara y, en algunos casos, se presentan con alguna turbidez, debido a la extrema lentitud de la formación de halogenuro de alquilo primario. (8)

#### 3.15.2 Oxidación con dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7/\text{H}_2\text{SO}_4$ )

Los alcoholes primarios y secundarios reaccionan rápidamente con ácido crómico para dar una suspensión verdosa debido a la formación de  $\text{Cr}^{+3}$ , mientras que los alcoholes terciarios no reaccionan a dicha prueba. (9)

### 3.15.3 Oxidación con permanganato de potasio

En esta prueba el permanganato de color violeta, se reduce a  $\text{MnO}_2$ , produciendo un precipitado de color marón, en el cual el manganeso se encuentra en estado de oxidación +4, esta reacción es característica para alcoholes primarios los cuales se oxidan a ácidos carboxílicos.(9)

### 3.16 Espectrometría de absorción en el infrarrojo.

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° 4). La energía absorbida servirá para incrementar la amplitud de la vibración mecánica del mismo. (17)

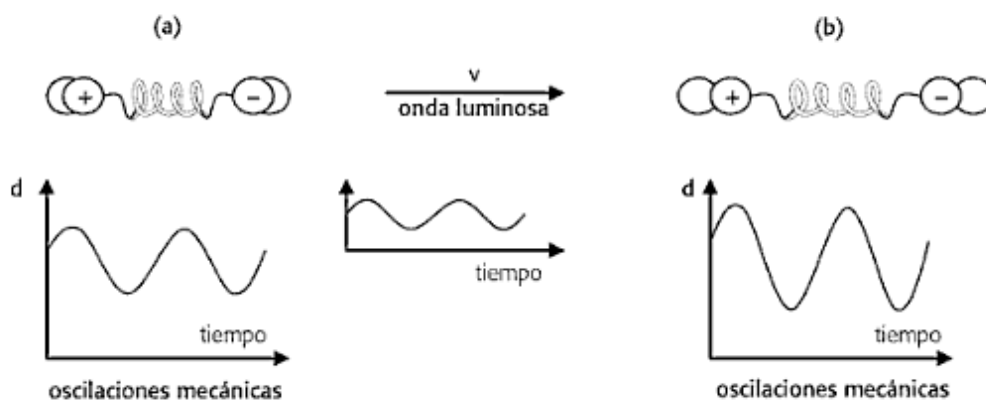


Figura N° 4 Movimientos moleculares en absorción infrarroja.

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 flexión de la mayoría de los 44 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 interactuar 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° 5).

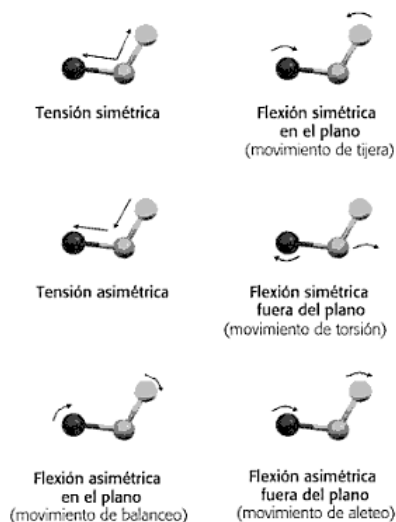


Figura N° 5 Movimientos en el plano de las moléculas en el infrarrojo.



### 3.16.1 Espectros de infrarrojos en el análisis cualitativo

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, 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. (17)

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 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 en los grupos funcionales presentes en el mismo, observando la zona del espectro conocida como región de frecuencias de grupo (comprendida entre  $3600$  y  $1200\text{ cm}^{-1}$ ) 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.

### 3.17 Porcentaje de rendimiento

Rendimiento: Es la relación entre el alcohol producido y el azúcar puesto a disposición de la levadura. Teóricamente por 100 Kg de muestra fermentada se obtienen 33 litros de alcohol.

## 4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

### 4.1 Tipo de estudio: Experimental, prospectivo.

El estudio es de tipo experimental, ya que se desarrolló la práctica de laboratorio para recolectar información y datos necesarios a cerca de la investigación, a si mismo se clasifica como estudio prospectivo, debido a que se demostró a través de un lapso de tiempo y en una población determinada, la obtención de alcohol etílico utilizando como medio de producción cáscaras de *Musa paradisiaca* (plátano) en estado maduro y un microorganismo productor *Saccharomyces cerevisiae*.

### 4.2 Investigación bibliográfica

Se realizó una búsqueda bibliográfica en las siguientes universidades del país:

- Universidad Centroamericana José Simeón Cañas (UCA)
- Universidad Nueva San Salvador (UNSSA)
- Universidad Alberto Masferrer (USAM)
- Biblioteca de la Facultad de Ciencias Agronómicas
- Biblioteca Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Bibliotecas de la Escuela Nacional de Agricultura (ENA), Centro de tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) y Jardín Botánico La Laguna.
- Diferentes sitios web relacionados con la investigación.

### 4.3 Investigación de campo.

Se realizó una visita al Jardín Botánico La Laguna, Centro de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) y Escuela Nacional de Agricultura (ENA) con el fin de identificar la especie según las características propias de la muestra que se utilizó.

**Universo:**

Cafeterías ubicadas dentro de la Universidad de El Salvador que desechan cáscaras de plátano.

**Población:**

Cáscaras de *Musa paradisiaca* (plátano).

**Muestra:**

100 cáscaras completas de *Musa paradisiaca* (plátano), recolectadas de las cafeterías ubicadas dentro de la Universidad de El Salvador.

**Tipo de muestreo:**

Se realizó un muestreo no probabilístico.

La selección de la muestra se hizo de acuerdo a las características definidas con los siguientes criterios.

**Características de la muestra a recolectar:** <sup>(3)</sup>(Ver Figura N° 6)

Clase:	<i>Musa paradisiaca</i>
Tamaño:	Grande (20-25cm)
Forma:	Lisa
Color:	Amarillo
Estado:	Maduro



Figura N° 6 *Musa paradisiaca*

#### 4.4 Parte experimental

La práctica de laboratorio se realizó en un período aproximado de un mes, en el laboratorio de Microbiología en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), en los laboratorios de Química Orgánica, y en el Laboratorio de Análisis de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

#### 4.5 Determinación de la concentración del inóculo.

La determinación de la concentración del inóculo, se realizó partiendo de diluciones, determinando la cantidad de UFC por el método de recuento total de levaduras, hasta determinar la concentración de la levadura comercial utilizada, para la fermentación. (18)

Procedimiento.

- Pesar 1.00 gramos de levadura comercial (Federal), y colocarlos en 100 mL de peptona sin tween.
- Rotular con lápiz graso hasta la dilución  $1 \times 10^{-9}$ , 9 tubos de ensayo que contienen 9 mL de caldo Casoy,.
- Tomar 1.00 mL del inóculo que contiene levadura y peptona, y colocarlo en el tubo de ensayo, que contiene 9.00 mL de caldo Casoy que rotula  $1 \times 10^{-1}$ , luego tomar 1 mL de este y colocarlo en la dilución  $1 \times 10^{-2}$ ; y así sucesivamente hasta la dilución  $1 \times 10^{-9}$ .
- Luego colocar en placas de petri por duplicado 1 mL de inóculo de cada dilución.
- Verter aproximadamente 15 mL de agar Sabouraud a cada placa, y homogenizar rotando las placas en forma de ocho.
- Incubar las placas durante 24 horas a  $37^{\circ} \pm 5$ , para eliminar el agua de condensación.
- Retirar las placas de la incubadora y continuar el proceso de incubación, durante siete días, finalmente realizar la lectura de placas. (Ver Figura 17).

#### 4.6 Recolección de la muestra.

Se realizó la recolección de las cáscaras en las cafeterías mencionadas en el universo.

- El período de recolección de la muestra se realizó el mismo día que las cáscaras fueron desechadas.
- Se transportaron en un recipiente plástico para procesarlas el mismo día.
- Limpieza de la muestra:
  - La limpieza de la cáscara tiene como finalidad eliminar la suciedad y residuos de plaguicidas que ésta puede tener. Para ello se sumerge la cáscara en una solución de agua con detergente comercial en polvo al 2%, frotándolo con un mascón lavaplatos, y luego eliminar los residuos con agua destilada. Posteriormente escurrir las cáscaras (3).
- Fraccionamiento de la cáscara:
  - Fraccionar cuidadosamente las cáscaras en trozos, de aproximadamente  $2\text{cm}^2$ . (3)(Ver Figura N° 18)

#### 4.7 Preparación del sustrato.

Se utilizó como sustrato las cáscaras del plátano fraccionadas, en cantidad suficiente para obtener 800 gramos de muestra.

Se colocaron 800 gramos de muestra utilizando como reactor un erlenmeyer de 2 Litros. Posteriormente se agregó agua desmineralizada a volumen de 2 litros, se ajustó a pH de 1.5 con solución acuosa de ácido sulfúrico al 10% v/v, se llevó al autoclave a 15 psi y  $121^{\circ}\text{C}$  por quince minutos, posteriormente se ajustó el pH a 4.5 con solución de NaOH al 10% p/v. (12)

Se adicionó al sustrato 1.0 gramo del inóculo de levadura en concentración de  $3.0 \times 10^8 \text{UFC/g}$ .

Colocar el sustrato inoculado en un beaker de 5 Litros

Tomar la lectura inicial de los grados Brix y fermentar por 72 horas. (Ver Figura N° 19)

#### **4.8 Determinación de pH del fermento.**

Tomar una muestra del fermento de 30mL, filtrar con gasa y luego filtrar con papel filtro poro grueso por gravedad, y determinar el pH del filtrado final.<sup>(14)</sup>

- Calibrar previamente el pH metro, utilizando soluciones buffer de pH 4 y 7.
- Pipetear 6 mL del filtrado.
- Colocar en beaker de 10 mL.
- Introducir el electrodo del pH metro en la muestra.
- Dejar reposar durante un minuto.
- Leer directamente el valor del pH del fermento.

#### **4.9 Determinación de grados Brix del fermento:**

- Limpiar el prisma del brixómetro con un algodón impregnado con alcohol isopropílico, secar con kleenex.
- Calibrar el brixómetro con una gota de agua destilada y llevar a cero en la escala.
- Del filtrado obtenido del cultivo de fermentación, depositar una gota de fermento sobre el prisma del brixómetro.
- Tomar la lectura orientando el brixómetro hacia la luz para observar la escala en el instrumento.
- Realizar tres lecturas y obtener un promedio. <sup>(14)</sup>

#### **4.10 Determinación de biomasa del fermento por el método peso seco.<sup>(5)</sup>**

- Lavar cinco tubos de ensayo de 15 mL rotular como: 0h, 24h, 48h, 72h pesar, secar a 105 °C por 30 minutos, enfriar en desecador.
- Pesar los tubos previamente tarados en balanza analítica, anotar peso.
- Colocar en cada tubo previamente pesado 10 mL de muestra de cada tiempo de fermentación y centrifugar a 4000 RPM por 15 minutos.
- Decantar el líquido sobrenadante.

- Secar en estufa la masa celular a una temperatura de 105°C por 10 horas hasta que el peso sea constante.
- Enfriar los tubos en desecador por treinta minutos.
- Pesarse los tubos en balanza analítica y por diferencia de peso determinar biomasa.

#### 4.11 Determinación del grado alcohólico del fermento.

- En una probeta de 100mL colocar 100 mL del fermento.
- Limpiar y secar con kleenex el alcoholímetro, y sumergirlo dentro de la probeta que contiene la muestra, asegurando que la muestra cubra por completo el alcoholímetro.
- Realizar la lectura y anotar el valor del grado alcohólico de la muestra.<sup>(14)</sup>

#### 4.12 Destilación simple.

- Engrasar las partes esmeriladas del equipo.
- Colocar 250mL del fermento obtenido en el matraz del equipo de destilación simple que esté montado como muestra la figura N° 7.



Figura N° 7 Equipo utilizado para la destilación simple.

El calentamiento de la muestra, se deberá hacer de forma cuidadosa y controlada, utilizando hotplate.

- Anotar la temperatura a la cual empieza a destilar la muestra y recibir el destilado en un erlenmeyer de 250mL, colocarlo en un baño de hielo.
- Al permanecer constante la temperatura, cambiar inmediatamente a otro erlenmeyer de 250 mL, para recibir ahora todo lo que destile a esa temperatura.<sup>(14)</sup>

#### 4.13 Destilación fraccionada.

- Engrasar las partes esmeriladas del equipo.
- Colocar el destilado obtenido en el matraz de destilación del equipo de destilación fraccionada que esté montado como muestra la figura N° 8.



Figura N° 8 Equipo utilizado para la destilación fraccionada.

- El calentamiento de la muestra, se deberá hacer de forma cuidadosa y controlada, utilizando hotplate o mechero de fisher.
- Anotar la temperatura a la cual empieza a destilar la muestra y recibir el destilado en un Balón de 250 mL, colocado en baño de hielo antes que se alcance la temperatura constante.



- Al permanecer constante la temperatura, cambiar inmediatamente a otro Balón de 250 mL, para recibir todo lo que destile a dicha temperatura. (14)
- Utilizar el destilado obtenido de la destilación fraccionada, para realizar las pruebas de alcoholes detalladas a continuación.

#### **4.14 Pruebas generales de alcoholes**

##### **4.14.1 Prueba de Lucas**

Preparación del reactivo de Lucas ( $\text{ZnCl}_2/\text{HCl}$ ):

- Mezclar 9mL de HCl concentrado con 3.5 gramos de cloruro de zinc.

Procedimiento para la identificación de alcohol con reactivo de Lucas:

- A 0.5 mL del destilado agregar 3 mL de reactivo de Lucas, tapar el tubo dejar reposar observar a los 5 minutos.

El resultado esperado es una solución incolora, después de transcurridos 10 minutos aproximadamente. (8)

##### **4.14.2 Oxidación con dicromato de potasio**

Preparación de dicromato de potasio al 10%  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7/\text{H}_2\text{SO}_4$ :

- En un beaker de 50 mL agregar 5 gramos de dicromato de potasio en 25 mL de agua destilada, agitar con un agitador de vidrio, hasta completa solución.
- Pasar la solución anterior a balón volumétrico de 50 mL, y llevar a volumen.

Procedimiento para la identificación con dicromato de potasio:

- Colocar en un tubo de ensayo 3 mL de una solución de dicromato de potasio al 10%, colocar 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado, y agregar 3 mL del destilado. Con precaución calentar la mezcla, hasta observar el cambio a color verde. (9)

##### **4.14.3 Oxidación con permanganato de potasio.**

Preparación de permanganato de potasio:

- En un beaker de 150 mL pesar 3.0 gramos de permanganato de potasio, agregar 75.0 mL de agua destilada, agitar con un agitador de vidrio, hasta completa solución.

Procedimiento para la identificación con permanganato de potasio:

- Pasar la solución anterior a balón volumétrico de 100 mL, y llevar a volumen.
- Colocar en un tubo de ensayo 3 mL de una solución de permanganato de potasio, y agregar 3mL del destilado. Con precaución calentar la mezcla si es necesario, hasta observar un precipitado café. (9)

#### **4.15 Identificación de la muestra por el método por absorción infrarrojo** **Espectrofotómetro infrarrojo SHIMADZU**

(Este análisis se realizó en laboratorio fisicoquímico de análisis de aguas de la Facultad de Química y Farmacia).

- Encender el espectrofotómetro IR y el computador.
- Inicializar el programa IR-Solution.
- Conectar el computador por medio del programa con el espectrofotómetro IR utilizando el comando "**Measure**", comando "**Admin**", Inicializar. Dejar un tiempo de equilibrio de 15 minutos.
- Permitir que el programa registre las condiciones del equipo y que reconozca automáticamente el accesorio ATR.
- Dejar correr un barrido de las condiciones iniciales del equipo con la unidad ATR armada sin muestra como sigue: utilizar el comando "**Measure**", y presionar "**BKG**" para obtener el espectro blanco (Background).
- Tomar 3mL de la muestra de alcohol a analizar.
- Analizar la muestra presionando el comando "**Measure**", coleccionar la información de la muestra en el espacio "**coment**" y presionar en "**Sample**" para obtener el espectro correspondiente.
- Limpiar la celda con un pañuelo suave y luego con un algodón impregnado de alcohol.
- Comparar el espectro obtenido de la muestra con el estándar (proceder de la misma forma descrita para la lectura del estándar).(17)

#### 4.16 Determinación del rendimiento obtenido del proceso de fermentación.

**Rendimiento:** Teóricamente por 100 Kgde muestra fermentada se obtienen 33 litros de alcohol. (11)

Se obtiene por medio del siguiente planteamiento:

$$\begin{array}{l} 100 \text{ Kg de} \\ \text{muestra} \\ \text{fermentada} \end{array} \quad \frac{\quad}{\quad} \quad \begin{array}{l} 33 \text{ Litros} \\ \\ \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{Cantidad de} \\ \text{muestra puesta} \\ \text{a fermentar} \end{array} \quad \frac{\quad}{\quad} \quad \begin{array}{l} X \\ \\ \end{array}$$

**X = Rendimiento teórico**

El rendimiento obtenido del proceso de fermentación se puede expresar como:

$$R_{\text{teórico}} \quad \frac{\quad}{\quad} \quad \frac{100\%}{\quad}$$

$$R_{\text{práctico}} \quad \frac{\quad}{\quad} \quad \frac{X}{\quad}$$

**X = Rendimiento del alcohol obtenido**

Donde:

$R_{\text{práctico}}$  = Volumen de muestra obtenida de la destilación fraccionada.

## 5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

### 5.1 Clasificación de plátano utilizado en la práctica para la fermentación alcohólica.

Para la identificación de la especie del plátano utilizado, se realizó una investigación bibliográfica en el CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestales), y una entrevista al Dr. José Miguel Cuellar la cual explica que hoy en día debido a la gran cantidad de híbridos de las familias de las musáceas que las industrias han desarrollado con el fin de optimizar la producción, e incrementar ganancias, en el mercado resulta bastante complicado y hasta casi imposible poder establecer, el tipo de híbrido que se cultiva, de ahí que se ha optado por dar una clasificación general, clasificándolo como *Musa paradisiaca*. (6)

### 5.2 Verificación de los factores del proceso fermentativo.

#### 5.2.1 Resultado de la determinación de la concentración del inóculo.



Figura N° 9 Concentración  $3.0 \times 10^8$  UFC/g de *Saccharomyces cerevisiae* (Levadura)

Las levaduras crecen en un amplio margen de temperatura desde 0 °C – 47°C, para el desarrollo de la ***Saccharomyces cerevisiae*** (Levadura), la temperatura de incubación se mantuvo a 37°C ± 5, de igual manera el medio de cultivo utilizado agar sabouraud favoreció el desarrollo de las colonias, las diluciones realizadas fueron desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-9</sup>, observándose en la última dilución que el crecimiento del microorganismo se detuvo, en la dilución 10<sup>-8</sup>, el conteo de la UFC de la ***Saccharomyces cerevisiae*** (Levadura comercial, marca FEDERAL) fue de 3.0 x 10<sup>8</sup> UFC/g. (ve figura N°9).

### 5.2.2 Resultados de pH.

El pH es un factor importante en la fermentación, debido a que este contribuye en el control de la contaminación bacteriana, efecto del crecimiento de las levaduras, velocidad de fermentación y formación de alcohol. Según estudios se determinó que el pH favorable para el crecimiento de la ***Saccharomyces cerevisiae*** se encuentra entre 4.4 - 5.0, con un pH de 4.5 para su crecimiento óptimo. Por lo que fue importante controlar esta variable durante la fermentación con el fin que permanezca en el límite óptimo para el desarrollo de la levadura, obteniéndose un pH promedio 4.52 en ambos ensayos asegurándonos que este factor no interfiera en el proceso de fermentación para la formación del producto esperado.

En la tabla N°1 se observa que en los diferentes tiempos todos los valores se mantuvieron dentro del pH óptimo de la ***Saccharomyces cerevisiae***. Alguna variante en estos datos se debe a factores tales como: humedad relativa, temperatura, error instrumental, error humano en el momento de la medición.

Tabla N° 1 Resultados de pH.

N° de Muestra	Tiempo de fermentación (Horas)	Ensayo N° 1	Ensayo N° 2	pH promedio
1	0	4.52	4.51	4.52
2	24	4.50	4.54	4.52
3	48	4.51	4.49	4.50
4	72	4.50	4.53	4.52
				$\bar{x} = 4.52$

La leve fluctuación del pH durante el proceso fermentativo observado se debe a que los metabolitos celulares del microorganismo son liberados al medio, esto se puede observar en los resultados de los ensayos 1 y 2, como muestra la figura N°10 en los cuales el pH oscilan entre 4.51 y 4.54, dando como resultado un promedio de pH de ambos ensayos de 4.52.

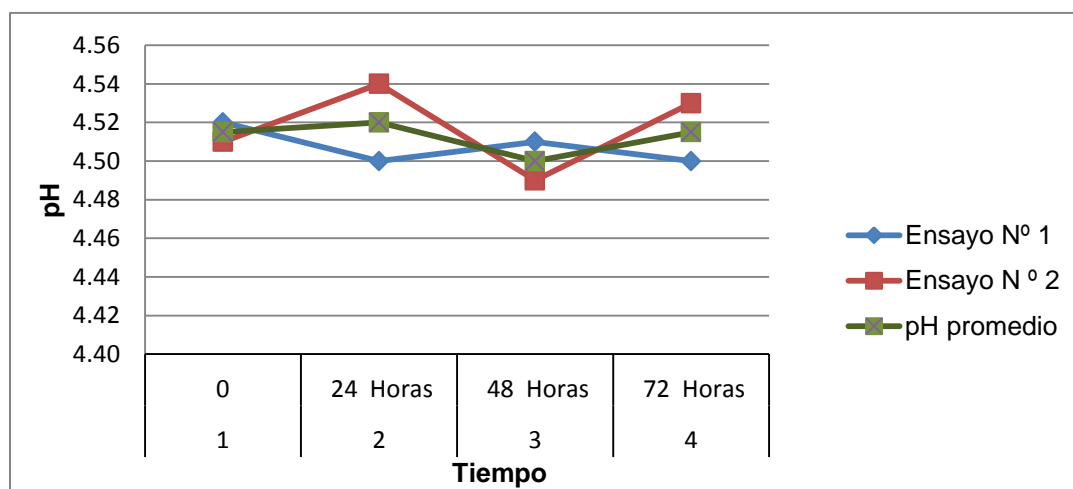


Figura N° 10 Tendencia de pH.

### 5.2.3 Resultados de grados Brix.

Los grados brix muestran la cantidad de azúcares disponibles en el medio de fermentación, la tabla N°2 Muestra el comportamiento de los grados brix en los ensayos realizados, durante este proceso el carbono es suministrado por los azúcares contenidos en la materia prima, siendo la concentración de azúcar un valor que se debe considerar ya que afecta la velocidad de la fermentación, el comportamiento y el desarrollo de las células de la levadura.

La velocidad de reacción enzimática se ve afectada por diferentes factores tales como el pH, la temperatura, el sustrato y la concentración de la enzima.

Tabla N° 2 Resultado de grados Brix.

N° de Muestra	Tiempo de fermentación (Horas)	Ensayo N° 1	Ensayo N ° 2	Promedio Grados Brix
1	0	28	28	28
2	24	15	15	15
3	48	15	15	15
4	72	15	14	14.5

Inicialmente a tiempo cero se obtuvieron 28 grados brix, cuando se trabaja con concentraciones de azúcares mayores a 21°brix se observa una deficiencia respiratoria en la levadura, por lo que se interfiere la presión osmótica de la célula por un aumento significativo de soluto en el medio acuoso. Transcurridas 24 horas del tiempo de fermentación hubo una disminución hasta 15 grados brix, como muestra la figura N° 11 obteniéndose en el fermento un valor de 10° Gay Lussac de alcohol, ya que a valores de grados brix entre 10 y 18 suele ser satisfactoria la producción de alcohol.

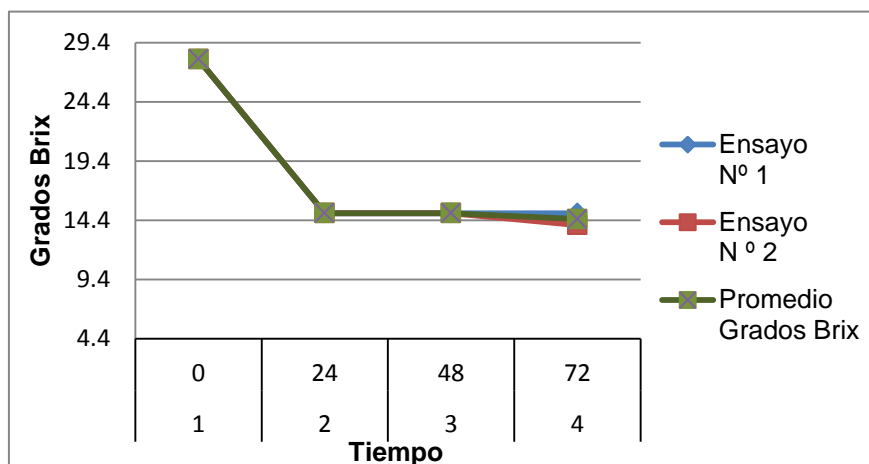


Figura N° 11 Resultados de grados Brix.

#### 5.2.4 Resultados de biomasa

La biomasa indica la presencia de microorganismos disponibles para metabolizar los carbohidratos presentes en el medio de fermentación, en la tabla N° 3 se observa el comportamiento de la biomasa en la fermentación alcohólica de cáscaras de plátano.

Tabla N° 3 Resultado de biomasa en ensayos 1 y 2.

N° de Muestra	Tiempo de fermentación (Horas)	Ensayo N° 1	Ensayo N° 2	Promedio Biomasa g/L
1	0	144	144	144
2	24	132	136	134
3	48	124	130	127
4	72	119	122	121

El proceso de fermentación de cáscaras de *Musa paradisiaca* (plátano), se realizó en condiciones anaerobias, lo que favorece a que la cantidad de



microorganismos presentes disminuya levemente a medida transcurre los diferentes tiempos de fermentacion como muestra la figura N° 12. La obtención de etanol inicia en el tiempo de fermentación de 24 horas verificandose una cantidad de biomasa de 144 g/l.

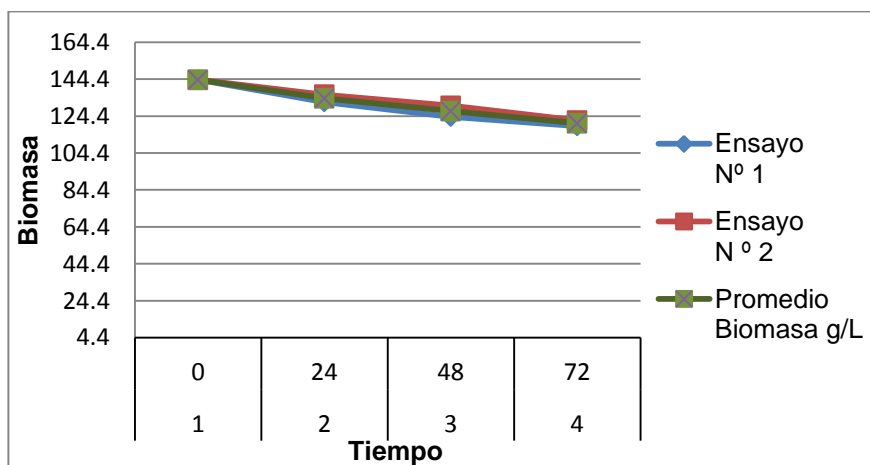


Figura N° 12 Resultados de la biomasa.

### 5.2.5 Determinación del grado alcohólico del fermento.



Figura N° 13 Resultado del grado alcohólico del fermento.

El grado alcohólico es la expresión en grados del número de volúmenes de alcohol contenidos en cien volúmenes de producto, en la figura N° 13, se observa el grado alcohólico obtenido en el fermento a las 24 horas, el cual fue medido con un alcoholímetro de Gay-Lussac, verificándose en la escala un grado alcohólico de 10° GL, que equivale al 10% de alcohol presente en el fermento, al alcohol destilado no se le realizó el grado alcohólico ya que la muestra obtenida no fue representativa para la medida de dicho parámetro.

### **5.3 Resultado de la destilación.**

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 (13) donde este puede variar según las condiciones ambientales ; 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, se realizó posteriormente al producto obtenido de la destilación simple una destilación fraccionada para evitar interferencias por trazas de agua y eliminar impurezas presentes en la muestra para una óptima identificación del alcohol obtenido.

### **5.4 Resultados de las pruebas químicas realizadas para determinar alcoholes.**

A continuación se presentan las diferentes pruebas de identificación de alcoholes las cuales se realizaron al producto destilado obtenido en los diferentes tiempos de fermentación (24h, 48h, 72h).

#### **5.4.1 Prueba de Lucas**

El reactivo de Lucas es una solución de cloruro de zinc en ácido clorhídrico concentrado, usado para clasificar alcoholes de baja masa molar. La reacción es una sustitución en la que el cloro reemplaza al grupo hidroxilo, la prueba de Lucas, en los alcoholes es un ensayo químico para diferenciar entre alcoholes primarios, secundarios y terciarios. El reactivo disuelve al alcohol, eliminando al grupo OH, formando un carbocation, con el reactivo de Lucas se obtiene como resultado la separación de dos fases, los alcoholes terciarios reaccionan casi instantáneamente, porque forman carbocationes terciarios relativamente estables, los alcoholes secundarios tardan más tiempo, entre 5 y 20 minutos, formando una turbidez en la solución porque los carbocationes secundarios

son menos estables que el terciario.<sup>(8)</sup> Los alcoholes primarios reaccionan muy lentamente ya que no pueden formar carbocationes, el alcohol primario activado permanece en solución hasta que es atacado por el ión cloruro, con un alcohol primario, la reacción puede tomar desde treinta minutos hasta varios días, por lo que la solución obtenida tanto del tubo estándar como de la muestra permaneció incolora, como muestra la Tabla N°4.

Tabla N° 4 Resultados de la prueba de Lucas

N° de Muestra	Tiempo de fermentación (Horas)	Ensayo N° 1	Ensayo N ° 2	Tubo Estándar
1	24	Solución Incolora	Solución Incolora	Solución Incolora
2	48	Solución Incolora	Solución Incolora	Solución Incolora
3	72	Solución Incolora	Solución Incolora	Solución Incolora

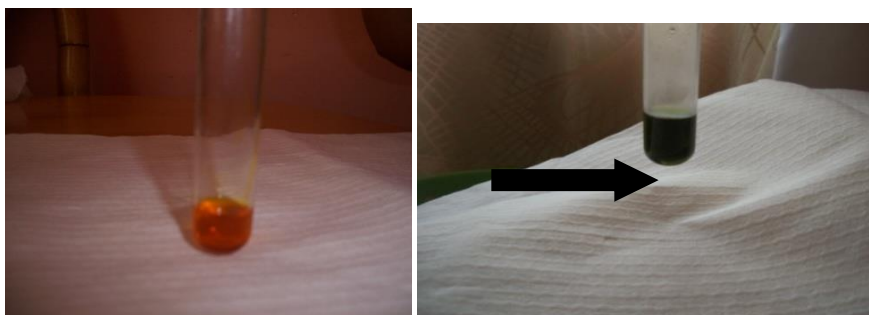
#### 5.4.2 Prueba de dicromato de potasio.

La Tabla N°5, muestra los resultados al realizar la prueba de oxidación con el reactivo de dicromato de potasio en el alcohol obtenido de manera inmediata se observa una coloración que de naranja pasa a verde claro como resultado de la formación de cromo III, debido a que los alcoholes primarios reaccionan rápidamente con ácido crómico y se oxidan a ácidos carboxílicos, ya que esta es una reacción característica de la presencia de alcohol.

Tabla N° 5 . Resultado de prueba de oxidación.

N° de Muestra	Tiempo de fermentación (Horas)	Ensayo N° 1	Ensayo N ° 2	Tube Estándar
1	24	Solución Color verde claro	Solución Color verde claro	Solución Color verde claro
2	48	Solución Color verde claro	Solución Color verde claro	Solución Color verde claro
3	72	Solución Color verde claro	Solución Color verde claro	Solución Color verde claro

En la Figura N°14, se observa una reacción colorimétrica que de naranja pasa a verde claro la cual muestra el resultado positivo de la reacción de oxidación.



Muestra con acidocrómico    Reacción de oxidación

(Coloración naranja)

(Coloración verde)

Figura N° 14 Reacción de oxidación con reactivo de dicromato de potasio.

### 5.4.3 Prueba con reactivo de permanganato de potasio

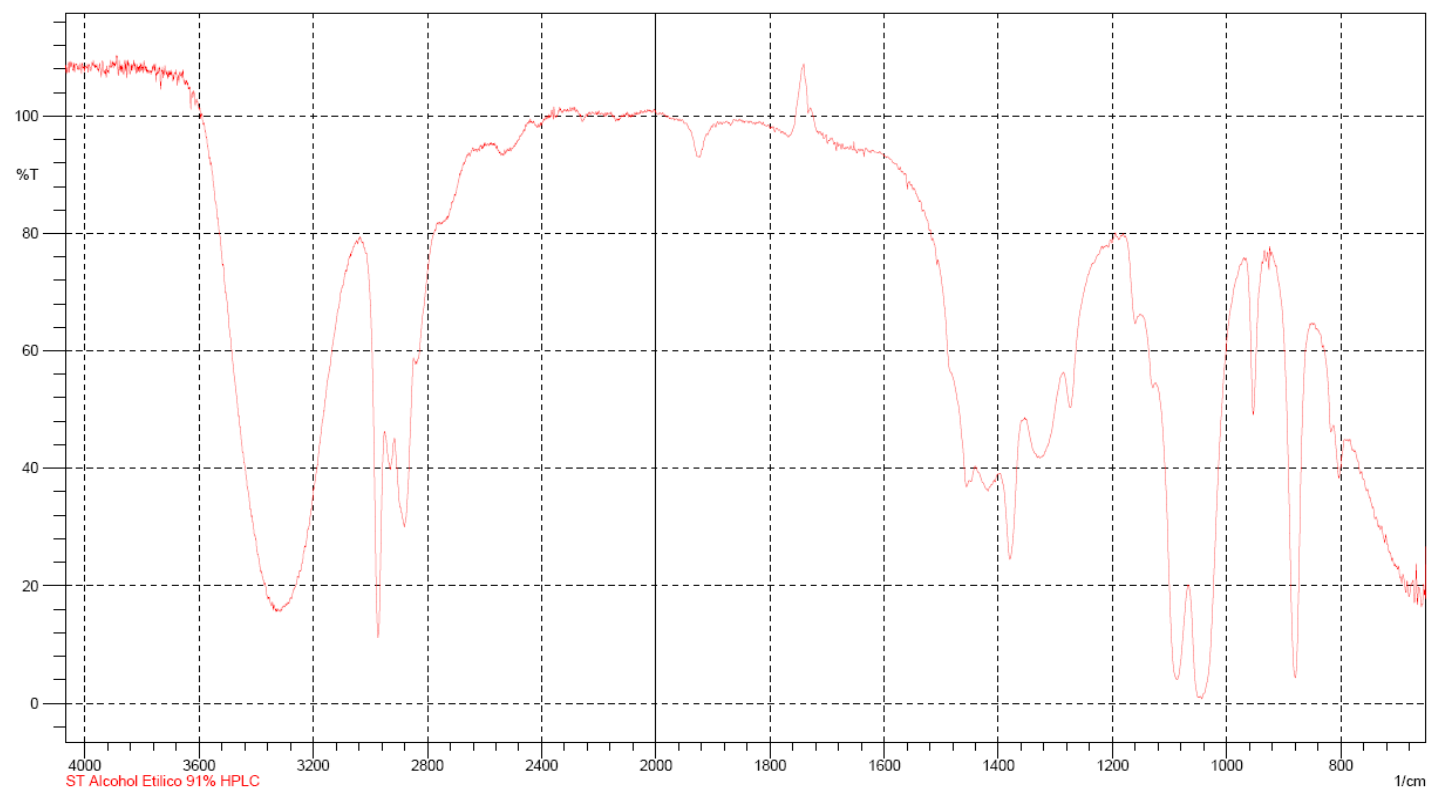
Tabla N° 6 Resultados con reactivo de permanganato de potasio

N° de Muestra	Tiempo de fermentación (Horas)	Ensayo N° 1	Ensayo N ° 2	Tubo Estándar
1	24	Precipitado marrón	Precipitado marrón	Precipitado marrón
2	48	Precipitado marrón	Precipitado marrón	Precipitado marrón
3	72	Precipitado marrón	Precipitado marrón	Precipitado marrón

La magnitud en la que un alcohol se oxida, depende de varios factores que son la naturaleza y concentración del agente oxidante, así como la temperatura, acidez y alcalinidad de la solución. El permanganato de potasio es un agente oxidante excelente, para comprobar la actividad reductora de los alcoholes primarios, ya que los cambios de color que acompañan a la reducción del permanganato son fácilmente observados, el permanganato se reduce a  $MnO_2$ , como resultado de esta oxidación se forma un precipitado marrón en el cual el manganeso tiene su estado de oxidación +4. En la Tabla N° 6 se colocaron los resultados obtenidos en los diferentes tiempos de fermentación los cuales al ser comparados con el tubo estándar fueron un precipitado marrón lo que confirma la actividad reductora del alcohol primario.

## 5.5 Identificación por espectrofotometría infrarroja

SHIMADZU



Comment:  
ST Alcohol Etílico 91% HPLC

No. of Scans: 10  
Resolution: 2 [1/cm]  
Apodization: Happ-Genzel

Date/Time: 08/08/2012 10:27:26  
User: Admin

Figura N° 15 Espectro de absorción infrarroja estándar de alcohol etílico 91°

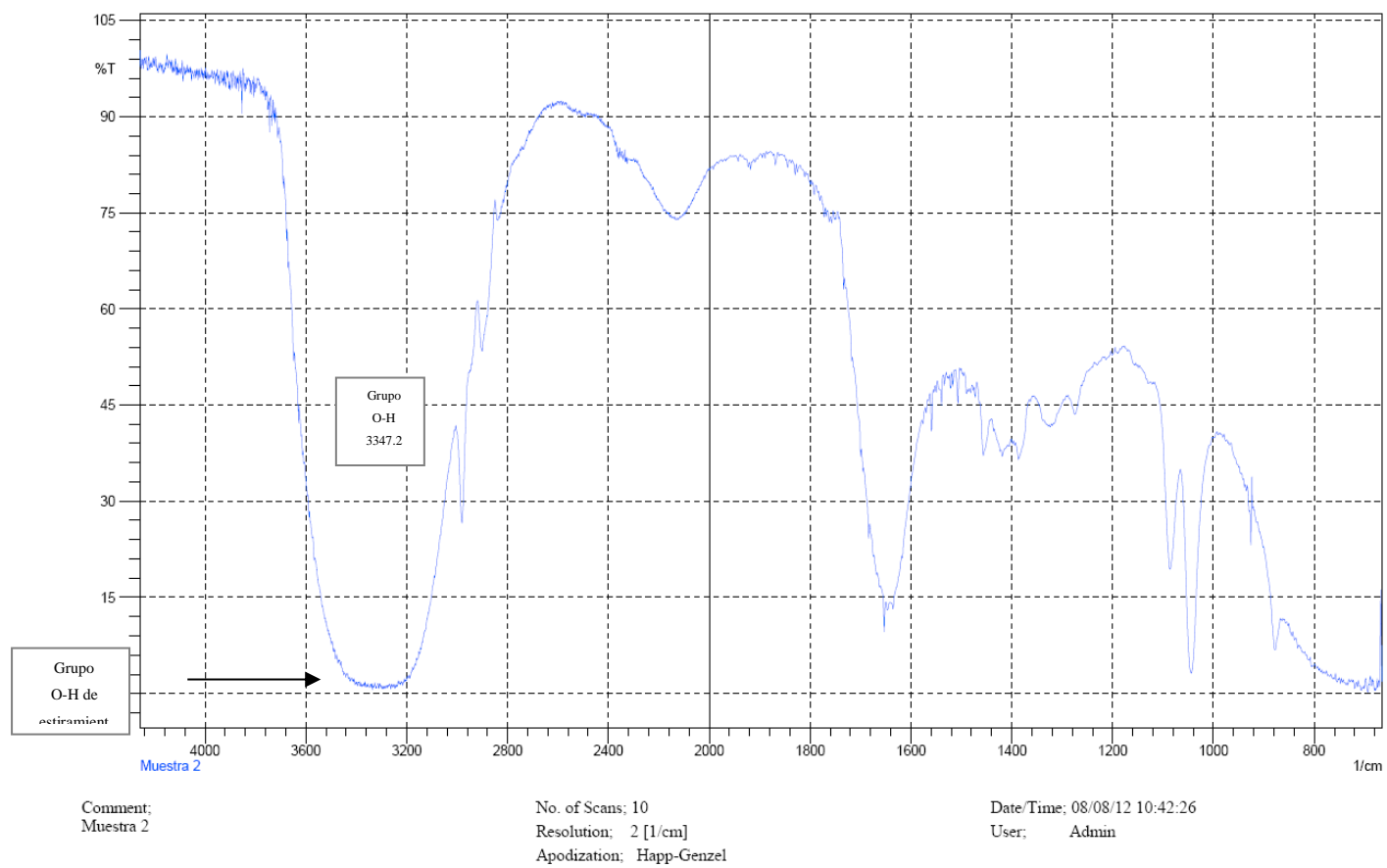


Figura N° 16 Espectro absorción infrarroja del alcohol obtenido



El alcohol destilado obtenido fue identificado mediante un espectrofotómetro IR marca SHIMADZU PRESTIGE, el espectro obtenido se comparó con el estándar de etanol como lo muestra la Figura N° 15 y se obtuvo espectros similares mostrando en la muestra obtenida de la destilación una banda de su grupo funcional característica O-H de estiramiento de  $3,647.26 \text{ cm}^{-1}$ , el cual se encuentra en la región de  $3,500-3,200 \text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a la banda característica de los alcoholes por lo cual se deduce que el producto destilado a las 24 horas es etanol, como muestra la Figura N°16.(17)

### 5.6 Calculo del rendimiento obtenido de alcohol.

**Rendimiento:** Teóricamente por 100 Kgde muestra fermentada se obtienen 33 litros de alcohol. (11)

$$100 \text{ kg} \quad \text{—————} \quad 33.0 \text{ Litros}$$

$$0.800 \text{ kg} \quad \text{—————} \quad X$$

$$X = 0.26 \text{ Litros}$$

El rendimiento se puede expresar como:

$$R_{\text{teórico}} \quad \text{—————} \quad 100\%$$

$$R_{\text{práctico}} \quad \text{—————} \quad X$$

$$0.26 \text{ Litros} \quad \text{—————} \quad 100\%$$

$$0.009 \text{ Litros}$$

$$\text{—————} \quad X \quad \text{—————}$$

$$X = 3.46\%.$$

De acuerdo al cálculo planteado para esta investigación el porcentaje de rendimiento del alcohol obtenido fue de: 3.46%, el cual se vio afectado por diferentes factores entre los cuales están: La cantidad de sustrato, la concentración de azúcares, la acidez del sustrato, el contacto con el aire, la temperatura y la velocidad de crecimiento de la cepa comprobando que el método es de fácil implementación pero de bajo rendimiento, por lo que se deben controlar las variables que afectan la fermentación.

## 6.0 CONCLUSIONES.

1. Se logró obtener alcohol a partir de la fermentación de las cáscaras de ***Musa paradisiaca*** (plátano) cuyo contenido de azúcar es de 31.6% y utilizando como catalizador la ***Saccharomyces cerevisiae*** (Levadura) en un medio anaeróbico.
2. La ***Saccharomyces cerevisiae*** es un microorganismo productor de etanol que bajo condiciones de fermentación como: temperatura ambiente, pH de 4.52, 15° Brix y una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/g, se obtuvo etanol a las 24 horas.
3. Se identificó el alcohol obtenido a través de las siguientes pruebas químicas de alcoholes: Lucas, dicromato de potasio, permanganato de potasio y espectrofotometría infrarrojo.
4. Los grados brix tomados al fermento de las cáscaras de ***Musa paradisiaca*** (plátano), se mantuvieron constantes a 15° entre las 24-72 horas, comprobando la capacidad de la ***Saccharomyces cerevisiae*** (Levadura) de metabolizar los azúcares reductores, lo que favoreció la fermentación y la obtención de alcohol.
5. Este método bajo las condiciones de experimentación planteadas, es de fácil implementación pero de bajo rendimiento, ya que en la práctica se obtuvo 3.46%, el cual es menor en relación al teórico planteado.

## 7.0 RECOMENDACIONES

1. Controlar de manera rigurosa los factores que intervienen en el proceso fermentativo tales como: concentración de microorganismos, grados brix, temperatura, cantidad de oxígeno y agitación, para mejorar el rendimiento.
2. Utilizar bioreactores que proporcionen las condiciones internas adecuadas para llevar a cabo la fermentación de tipo alcohólica de manera industrial.
3. Promover investigaciones comparativas con diferentes microorganismos para la producción de etanol tales como; **Zimomonas**, **Asperguillus**, **Cándida**, y otros.
4. Que se implementen estudios comparativos de la utilización de diferentes desechos orgánicos ricos en carbohidratos para la producción de etanol el cual posee un gran valor para la industria farmacéutica, alimenticia, cosmética y como biocombustible.
5. Dar seguimiento al método propuesto para la implementación de prácticas a nivel de laboratorio en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
6. Investigar la producción del etanol a partir de las cáscaras **Musa paradisiaca** (plátano), utilizando como microorganismo productor diferentes levaduras comerciales.
7. En futuras investigaciones establecer el grado de pureza de la muestra de alcohol obtenido.

8. Realizar futuras investigaciones con la finalidad de estandarizar y validar el método propuesto para la obtención de alcohol etílico.

## BIBLIOGRAFIA.

1. Aldabe S., Aramendia P., Lacreu L.; Química 1 fundamentos, editorial colihue. Buenos Aires, Argentina; 1996. Pág. 357 – 369.
2. Asociación Jardín Botánico La Laguna, “PANKIA”, Boletín informativo JBLL,1998.Pág.3 - 4
3. Ayala Torres A. “Estudio proximal comparativo de la cáscara y pulpa del plátano (*Musa paradisiaca*) para su aprovechamiento completo en la alimentación humana y animal”. (Tesis) Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador.C.A., Marzo 2003.
4. Brock T., D. Microbiología. 6ª edición; Prentice-Hall Hispanoamérica México: 1993, Pág. 240 – 322.
5. Bustillo Mejia C.A. “Obtención de riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>).Por proceso de fermentación sumergida en medio de producción de agua de cocimiento de maíz y aceite de soya utilizando como microorganismo productor *Saccharomyces cerevisiae*”. (Tesis) Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador.C.A., Septiembre 2008.
6. CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal.es), Manejo agronómico del plátano *Musa paradisiaca*, 1992.Pag.7-9.  
  
Fermentación de plátano con levaduras autóctonas:[Consultado: 15 de Mayo 2013].Disponible en: <http://www.slideshare.net/seiton/fermentacion-de-platano-con-levaduras-autoctonas>.
7. Disponible en: Prueba de Lucas [Consultado: 15 de Mayo 2013].  
<http://es.scribd.com/doc/52205010/Reactivo-de-Lucas.Prueba-de-Lucas>.

8. Oxidación de alcoholes [Consultado : 15 de Mayo 2013]. Disponible en : <http://www.quimicaorganica.org/alcoholes/418-oxidacion-de-alcoholes.html>.
9. J. Ly. Bananas y plátanos para alimentar cerdos: Aspectos de la composición química de las frutas y de su palatabilidad.[Revista computarizada].Cuba. 2004.  
[Consultada 23 Mayo 2013].  
Disponible en: [www.cipav.org.co/RevCubana/1103/110301.html](http://www.cipav.org.co/RevCubana/1103/110301.html).
10. López A., Molina M., Huguet S., Estudio comparativo de la producción de etanol vía fermentativa utilizando cuatro sustratos preparadores a partir de banano maduro. ISSN (Costa Rica).2004;(1,2):Pág.67 – 77.
11. Oviedo Zumaque, L. Lara Montillo C., Mizger Pantoja, M., Levaduras autóctonas con capacidad fermentativa en la producción de etanol a partir de la pulpa de excedentes de plátano Musa (AAB Simmonds) en el departamento de Córdoba, Colombia. 2009[Consultado el 17 Septiembre 2012].Disponible en: <http://www.slideshare.net/seiton/fermentacin-de-pltano-con-levadurasautctonas>.
12. Murray, R. K, Mayes A., Granner K., Rodwell Victor W.,“Bioquímica de Harper”.14<sup>a</sup> Edición editorial el manual moderno S.A. de C.V.Pág.14, 139,192, 213-222.
13. Rodríguez Castaneda, A. “Obtención de alcohol etílico a partir del jugo de maíz” (Tesis) Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador.C.A., Septiembre 1986.

14. Sarmiento, D. "Producción de alcohol apartir de melasa". [Consultado 09 Marzo 2013]. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc//Producción-de-BioEtanol>
15. Scragg, A., Biotecnología para ingenieros sistemas biológicos en procesos tecnológicos. 1ª Edición, editorial Limusa, México, 1996. Pág.191 – 224.
16. 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.
17. Solano Goñi, C."Prácticas de microbiología de alimentos".[Consultado 09 de Junio 2013].  
Disponible:  
<http://www.unavarra.es/genmic/micalm/manual%20practicass%20micalimentos.pdf>.
18. THORPE, W. "Bioquímica".1ª edición, editorial continental, España, 1975.Pág.498, 499.



## GLOSARIO.

**Aeróbico:** Organismo capaz de desarrollarse en la presencia de oxígeno para favorecer sus necesidades metabólicas así como su crecimiento. (1)

**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. (13)

**Autoclave:** Un esterilizador que destruye los microorganismos con temperatura y vapor de agua bajo presión. (13)

**Biomasa:** Cantidad de células producidas (unidad de masa) por unidad de volumen que se lleva a cabo en un proceso biotecnológico. (13)

**Biotecnología:** uso de organismos vivos para llevar a cabo procesos químicos concretos destinados a la aplicación industrial. (13)

**Esterilización:** es la muerte o eliminación de todos los organismos vivos y sus virus en un medio de crecimiento. (13)

**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. (13)

**Fermentador:** el tanque en el que realiza una fermentación industrial. (13)

**Grados Brix:** medida objetiva de la concentración de azúcares disueltos en un producto y de la idea del nivel de dulzura del mismo. (13)

**pH:** Valor negativo del logaritmo de la concentración de iones Hidrogeno ( $H^+$ ) en una solución. (13)

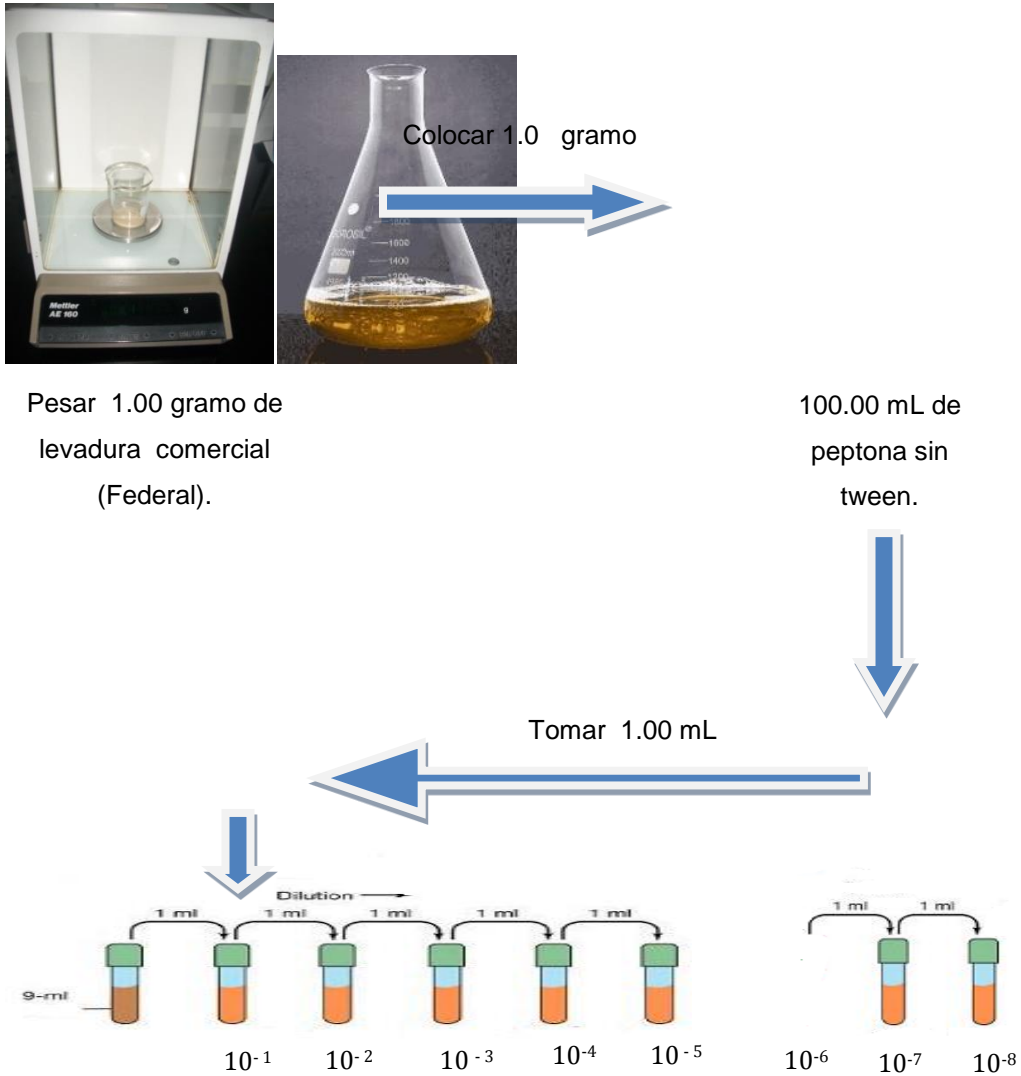
**Sustrato:** medio o sustancia que contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo de un microorganismo con el fin de favorecer la formación de metabolitosde interés industrial. (13)

**IR:** Infrarrojo.

## **ANEXOS**

**ANEXO N° 1**

## ANEXO N° 1



Pesar 1.00 gramo de levadura comercial (Federal).

100.00 mL de peptona sin tween.

Colocar 9ml de caldo Casoy en cada uno de 8 tubos de ensayo, y agregar 1.0 mL del inóculo que contiene la levadura.

Figura N° 17 Esquema de determinación de la concentración del inóculo



Incubar las placas durante 24 horas a  $37^{\circ} \pm 5$

Realizar la siembra de cada tubo por duplicado, utilizando agar Sabouraud.

Continuar el proceso de incubación, durante siete días, a temperatura ambiente.

Finalmente realizar la lectura de las placas.



$10^{-3}$  UFC  
MNPC

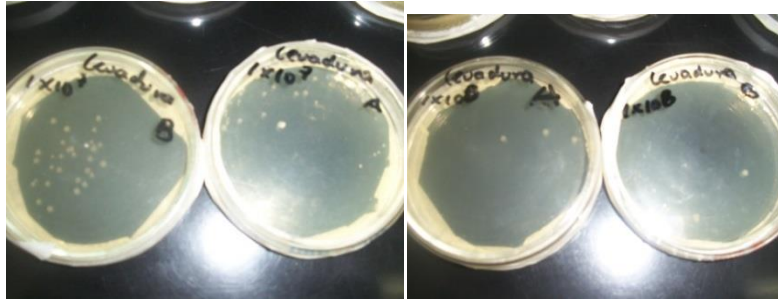
$10^{-4}$  UFC  
MNPC



$10^{-5}$  UFC  
MNPC

$10^{-6}$  UFC  
MNPC

Figura N° 17 Continuación



$10^{-7}$  UFC  
MNPC

$3.0 \times 10^8$   
UFC/g



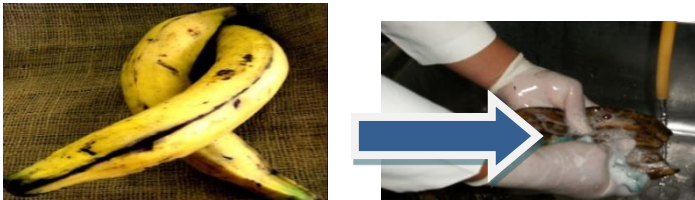
$10^{-9}$  UFC

Se verifica en la dilución  $10^{-8}$  que la concentración obtenida de la levadura comercial utilizada en el proceso de fermentación es de  $3.0 \times 10^8$  UFC/g.

Figura N° 18 Continuación

## ANEXO N° 2

### Recolección de la muestra



Recolectar la muestra el mismo día de su utilización en un recipiente plástico.

Eliminar los residuos de plaguicidas que las cáscaras pueden tener, sumergir las cáscaras en una solución de detergente comercial al 2%, frotar las con un mascón lavaplatos.



Fraccionar las cáscaras en trozos de aproximadamente  $2\text{cm}^2$ .

Eliminar los residuos con agua destilada, posteriormente escurrir las cáscaras.

Figura N° 19 Recolección de la muestra



**ANEXO N° 3**

### ANEXO N° 3



Pesar 800 gramos de muestra .

Utilizar como reactor un Erlenmeyer de 2,000mL, agregar agua desmineralizada a volumen, ajustar el pH a 1.5 con solución acuosa de ácido



Posteriormente ajustar a pH de 4.5 con solución de Hidróxido de Sodio al 10%p/v

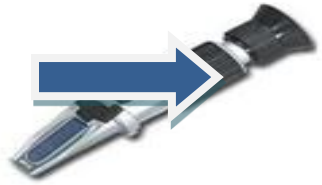


Autoclavar a 15 psi y 121°C por quince minutos.

Figura N° 20 Preparación del sustrato



Adicionar al sustrato 1.0g del inculo de **Saccharomyces cerevisiae**(Levadura), con una concentración de  $3.0 \times 10^{-8}$  UFC.



Tomar la lectura de los grados Brix iniciales.



Fermentar el sustrato EN UN BEAKER DE 5,000mL, por 72 horas a temperatura ambiente.

Figura N° 19 Continuación.

## **ANEXO N° 4**

### **Materiales utilizados durante la parte experimental**

- Beaker de 10, 50, 100, 250 y 1000mL
- Probeta de 100 mL
- Erlenmeyer: 100, 250 y 2,000mL
- Tubos de ensayo: 10 mL
- Tubos de ensayo con tapón de rosca: 10 mL
- Balón volumétrico de 100mL
- Embudo mediano
- Agitadores de vidrio
- Vidrio de reloj
- Espátulas
- Mechero Fisher
- Frasco lavador
- Gradilla plástica
- Papel filtro micropore
- Mangueras de PVC
- Papel aluminio
- Placas petri
- Jeringas de 10mL,5mL

## **ANEXO N° 5**

### **Equipos utilizados durante la parte experimental**

- Autoclave
- Stirrer / Hot plate CORNING PC 420
- Refrigeradora
- Balanza semianalítica Mettler PN 1210
- Balanza analítica Mettler
- Centrifugadora
- Espectrofotómetro infrarrojo Shimadzu Prestige
- pHmetro
- Estufa Fisher
- Desecador.
- Equipo de destilación fraccionada.
- Equipo de destilación simple
- Alcoholímetro
- Brixómetro
- Incubadora

## ANEXO N° 6

- Ácido sulfúrico 10% v/v
- Hidróxido de sodio 10% p/v
- Agua destilada
- Agua desmineralizada
- ***Saccharomyces cerevisiae*** (Levadura comercial ,marca FEDERAL)
- Reactivo de Lucas ( $ZnCl_2/HCl$  conc.)
- Reactivo de Dicromato de Potasio ( $K_2Cr_2O_7/H_2SO_4$ )
- Reactivo de Permanganato de Potasio( $KMnO_4$ )
- Alcohol 90° grado reactivo
- Agar Dextrosa Sabouraud
- Agar Trypticasa Soya
- Caldo peptonado