



UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS

CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



“ELABORACIÓN DE BEBIDA ALCOHÓLICA A PARTIR DE JUGO DE
NARANJA CRIOLLA (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) SUPLEMENTADO CON
PANELA Y SULFATO DE AMONIO, FERMENTADO CON
Saccharomyces cerevisiae MIT L-51”

TESIS

Para obtener el Título Profesional de
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

AUTORES: Br. HERNÁN CUEVA POMPA
Br. POLITO MICHAEL HUAYAMA SOPLA

ASESOR: Ms.C. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN

CHACHAPOYAS - AMAZONAS - PERÚ

2007

10 4 1568 2008

UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS



CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



“ELABORACIÓN DE BEBIDA ALCOHÓLICA A PARTIR DE JUGO DE
NARANJA CRIOLLA (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) SUPLEMENTADO CON
PANELA Y SULFATO DE AMONIO, FERMENTADO CON
Saccharomyces cerevisiae MIT L-51”

TESIS

Para obtener el Título Profesional de
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

AUTORES: Br. HERNÁN CUEVA POMPA
Br. POLITO MICHAEL HUAYAMA SOPLA

ASESOR: Ms.C. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN

CHACHAPOYAS - AMAZONAS - PERÚ

2007

Nº de Registro.....

UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS

CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**“ELABORACIÓN DE BEBIDA ALCOHÓLICA A PARTIR DE JUGO DE
NARANJA CRIOLLA (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) SUPLEMENTADO CON
PANELA Y SULFATO DE AMONIO, FERMENTADO CON
Saccharomyces cerevisiae MIT L-51”**

TESIS

Para obtener el Título Profesional de
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

AUTORES: Bach. HERNÁN CUEVA POMPA
Bach. POLITO MICHAEL HUAYAMA SOPLA

ASESOR: Ms.C. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN

CHACHAPOYAS - AMAZONAS - PERÚ

2007

Nº de Registro.....

DEDICATORIAS

A mis padres: JAVIER y JULIA

Por su perseverancia, paciencia y amor,

que hicieron posible la realización

de mi carrera.

A mis hermanos por su apoyo,
cariño y anhelo por verme realizado.

Como estímulo para mi hermano

DELMER y mis familiares, a

seguir el camino de la superación

HERNÁN C.

Gracias a Dios por la vida que me ha
dado tanto!... Una madre ejemplar,
Abelinda y un hermano, Willi.

Con todo mi amor y gratitud a mis abuelitos

Ramón y Josefina

quienes representan el principal motivo

de mi constante superación.

Con amor y admiración a:

MAGALI.

Por compartir conmigo penas,
alegrías, sueños y los mismos deseos
de superación personal y profesional

POLITO MICHAEL H.

AGRADECIMIENTOS

Con mucha consideración, los autores expresan el agradecimiento infinito al Ing. Ms.C. Miguel Ángel Barrena Gurbillón; asesor de la presente Tesis, por la dirección, revisión de los borradores y revisión final del presente trabajo.

Nuestro agradecimiento especial al Ing. Juan Manuel Garay Román, Responsable del Laboratorio de Química de la UNAT – A, por facilitar la infraestructura, equipos y reactivos, para realizar los experimentos. A los siguientes docentes de la UNAT – A: Blga. Luz Azucena Torres García, quien tuvo la generosidad de donar las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* MIT L – 51; Ms.C. Julio Mariano Chávez Milla, por su apoyo en la reactivación y conservación de las cepas; Lic. Elías Alberto Torres Armas por su apoyo en el procesamiento de los resultados con el software Statgraphics 5.1. A todas las demás personas que hicieron posible la realización de la presente Tesis.

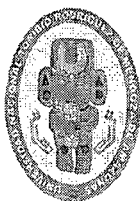
**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Dr. Juan Bautista Astorga Neira
Presidente de la Comisión Organizadora

Ing. Víctor Augusto Delgado Vélez:
Vicepresidente Académico de la Comisión Organizadora

Dr. Jesús Jorge López Vergara
Vicepresidente Administrativo de la Comisión Organizadora

Ms.C. Miguel Ángel Barrena Gurbillón
Responsable (e) de la Carrera Profesional de Ingeniería Agroindustrial



VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS

El Docente de la UNAT-A que suscribe, hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada **“ELABORACIÓN DE BEBIDA ALCOHÓLICA A PARTIR DE JUGO DE NARANJA CRIOLLA (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) SUPLEMENTADO CON PANELA Y SULFATO DE AMONIO, FERMENTADO CON *Saccharomyces cerevisiae* MIT L - 51”** de los Tesistas egresados de la Carrera Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la UNAT-A:

- Bach. Hernán Cueva Pompa
- Bach. Polito Michael Huayama Sopla

El Docente de la UNAT – A que suscribe, da el Visto Bueno al Informe Final de la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones dadas por el Jurado Evaluador, para su posterior Sustentación.

Chachapoyas, 26 de octubre de 2007

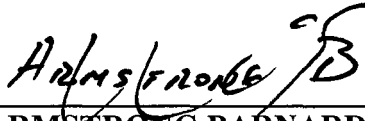
Ms. C. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN
Profesor Principal DE UNAT-Amazonas

JURADO EVALUADOR



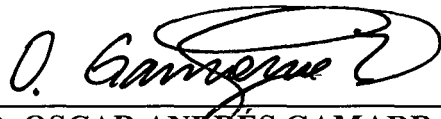
ING. JUAN MANUEL GARAY ROMÁN

PRESIDENTE



Ms. C. ARMSTRONG BARNARD FERNANDEZ JERI

SECRETARIO



BLGO. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES

VOCAL

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTO.....	III
AUTORIDADES DE LA UNAT-A.....	IV
Vº Bº DEL ASESOR.....	V
JURADO EVALUADOR.....	VI
TABLA DE CONTENIDOS.....	VII
RESUMEN.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MATERIAL Y MÉTODO.....	7
2.1. Material biológico.....	7
2.2. Reactivación de la cepa.....	7
2.3. Desarrollo del inóculo.....	7
2.3.1. Preparación del medio.....	7
2.3.2. Siembra de la cepa.....	8
2.3.3. Preparación del inóculo.....	8
2.4. Preparación del medio base.....	9
2.5. Fase pre – fermentativa: Acondicionamiento de los biorreactores.....	10
2.6. Fase Fermentativa: Proceso de producción de etanol.....	12
2.7. Fase Post – fermentativa.....	12

2.8. Optimización del proceso de fermentación	12
2.8.1. Análisis estadístico.....	13
2.9. Producción de bebida alcohólica de naranja de mayor rendimiento en etanol.....	14
2.10. Análisis físicos y químicos del vino de naranja.....	15
III. RESULTADOS.....	16
IV. DISCUSIÓN.....	31
V. CONCLUSIONES.....	34
VI. RECOMENDACIONES.....	35
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
ANEXO.....	38
APÉNDICE.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Valor de las variables a evaluar con el diseño estadístico de Box – Behnken.	10
Tabla 2: Diseño estadístico de Box – Behnken para evaluar las tres variables independientes.	11
Tabla 3: Rendimientos promedio de etanol de cada medio de diferente concentración de componentes, aplicando el diseño de Box – Behnken.	16
Tabla 4: Medición del pH durante los días de fermentación de cada experimento.	17
Tabla 5: Contenido de azúcares reductores (g/L) durante los días de fermentación de cada experimento.	17
Tabla 6: Medición de °Brix durante los días de fermentación de cada experimento.	18
Tabla 7: Coeficientes de regresión obtenidos con Statgraphics V.5.1; a partir de los datos de la Tabla 3, para concentración de etanol en (g/L).	19
Tabla 8: Análisis de la varianza para concentración de etanol (g/L) en función de sulfato de amonio, panela y tiempo.	20
Tabla 9: Coeficientes de regresión para el rendimiento de etanol (% vol.) en función de sulfato de amonio, panela y tiempo.	20

Tabla 10: Análisis de la varianza para rendimiento de etanol (% vol.) en función de sulfato de amonio, panela y tiempo.	21
Tabla 11: Ruta ascendente para el rendimiento de etanol (% vol.) en función de sulfato de amonio, panela y tiempo pronosticado.	22
Tabla 12: Valores óptimos de las variables independientes.	22
Tabla 13: Condiciones de operación del proceso de fermentación para producción de vino de naranja con el mayor % en volumen de etanol.	27
Tabla 14: Control periódico de la fermentación alcohólica en la obtención del vino de naranja con el mayor % en volumen de etanol.	27
Tabla 15: Análisis organoléptico del vino de naranja elaborado.	28
Tabla 16: Resultados obtenidos y los datos de INDECOPI para el vino de naranja elaborado.	28
Tabla 17: Control periódico de la producción de etanol y del consumo de azúcares reductores (AR) durante la fermentación alcohólico con los valores óptimos de las variables.	29
Tabla 18: Principales enfermedades de los vinos, cambios que se produce y causas que los originan. Calwana, (1991).	41
Tabla 19: Principales defectos de los vinos, cambios que se producen y causas que los originan. Calwana, (1991).	42
Tabla 20: Graduación de alcohol en % volumen, % peso y peso específico a 20 °C.	47

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

	Pág.
Fotografía 1: Biorreactores para obtener etanol a partir de jugo de naranja.	38
Fotografía 2: Recuento de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en microscopio con cámara Neubauer a 40 X.	38
Fotografía 3: Acondicionamiento de los biorreactores con el medio base.	39
Fotografía 4: Caja con aislamiento térmico para mantener la temperatura de fermentación.	39
Fotografía 5: Equipo de laboratorio para destilación simple.	40
Fotografía 6: Equipo de laboratorio para destilación fraccionada.	40

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1: Superficie respuesta de etanol (% vol.) en función sulfato de amonio – panela (tiempo: 6 días). Máximo 14,7 % vol. de etanol.	23
Gráfica 2: Superficie respuesta de etanol (% vol.) en función sulfato de amonio – tiempo (panela 165 g/L). Máximo 14,7 % vol. de etanol.	24
Gráfica 3: Superficie respuesta de etanol (% vol.) en función Panela – tiempo (sulfato de amonio 175 mg/L). Máximo 14,7 % vol. de etanol.	25
Gráfica 4: Diagrama de bloques del proceso de obtención de bebida alcohólica.	26
Gráfica 5: Variación de los grados °Brix con respecto al tiempo durante la fermentación alcohólica.	29
Gráfica 6: Variación del pH con respecto al tiempo durante la fermentación.	30
Gráfica 7: Variación de la concentración de etanol y azúcar reductor con respecto al tiempo durante la fermentación alcohólica.	30

RESUMEN

Se estudió la elaboración de bebida alcohólica fermentada tipo “vino” a partir de jugo de naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) en función de las variables: Concentración de panela, concentración de sulfato de amonio y tiempo de fermentación. La variable respuesta fue el mayor rendimiento de etanol durante la producción de bebida alcohólica de naranja, empleando un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* variedad *ellipsoideus* MIT L – 51, como agente fermentativo. Los valores de las variables evaluadas fueron 15, 90 y 165 g de panela/L; 150, 175 y 200 mg de sulfato de amonio/L y 2, 4 y 6 días de fermentación. Se empleó el diseño experimental de Box – Behnken y se obtuvo una concentración máxima de etanol de 92,17 g/L de medio (14 % vol. etanol), cuando los valores de las variables fueron: 165 g de panela/L de medio, 200 mg de sulfato de amonio/L de medio y 6 días de fermentación. A los resultados de aplicar el diseño de Box – Behnken se les aplicó el análisis de regresión múltiple para determinar los coeficientes de las ecuaciones polinomiales, los máximos y mínimos de cada ecuación y seleccionar la ecuación que tenga el mínimo y el máximo, para con ella obtener líneas de superficie de respuesta para la concentración de etanol (g/L) todos estos cálculos y gráficos estadísticos fueron realizados en el software Statgraphics V. 5.1; con el que se predijo una concentración máxima de 14,74 % vol. de etanol si se trabaja con un medio que contiene 178,8 g panela/L, 164,9 mg sulfato de amonio/L y se fermenta durante 6 días. Con estos valores óptimos se elaboró bebida alcohólica de naranja, la que fue sometida a evaluación organoléptica y análisis fisicoquímicos, de acuerdo a las normas establecidas por INDECOPI, las pruebas dieron resultados satisfactorios para esta bebida, habiéndose obtenido 14 % vol. de etanol.

ABSTRACT

We studied the production of alcoholic beverage fermented type "wine" juice from orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) depending on the variables: Concentration of panela, concentration of ammonium sulphate and fermentation time. The variable response was the largest yield of ethanol during the production of alcoholic drink orange, using a crop of *Saccharomyces cerevisiae* variety *ellipsoideus* MIT L – 51, as an agent fermentative. The values of the variables evaluated were 15, 90 and 165 g of sugar cane / L, 150, 175 and 200 mg of ammonium sulphate / L 2, 4 and 6 days of fermentation. The experimental design was used for Box – Behnken and obtained a maximum concentration of ethanol from 92.17 g/L medium (14 % vol. ethanol), When the values of the variables were: 165 g of sugar cane/L medium, 200 mg of ammonium sulphate/L medium and 6 days of fermentation. The results of applying the design of Box – Behnken was applied multiple regression analysis to determine the coefficients of polynomial equations, the peaks and troughs of each equation and the equation that takes select the minimum and maximum to get her lines for response surface concentration of ethanol (g/L) all these calculations and statistical graphs were made to the software Statgraphics V. 5.1; with that predicted a maximum concentration of 14.74 % vol. ethanol when working with a medium containing 178.8 g panela/L, 164.9 mg ammonium sulphate/L and are fermented for 6 days, these values are best developed alcoholic drink orange, which was subjected to physicochemical analysis and organoleptic evaluation, according to the standards set by INDECOPI tests showed satisfactory results for this drink, having gained 14 % vol. ethanol.

I. INTRODUCCIÓN

El futuro del país depende en gran parte del desarrollo de la agroindustria, pues posee una gran diversidad de recursos agrícolas. En la Región Amazonas destacan las frutas cítricas, que en la actualidad están siendo aprovechadas en forma deficiente, y en algunos casos no se les está dando la debida importancia.

Dentro de las líneas de procesamiento tradicional se tiene la posibilidad de emplear la naranja criolla (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) para la elaboración de una bebida alcohólica por fermentación de su jugo; dicho producto podrá competir con otros similares. Debido a que esta fruta es bastante lábil a la manipulación post – cosecha y son altamente perecibles, hace difícil su transporte y comercialización. Estas desventajas han motivado en los últimos años un abandono en el cultivo de la naranja por parte de los agricultores.

Las bebidas alcohólicas se elaboran a partir de líquidos azucarados sometidos a fermentación alcohólica por adición de levaduras que, en condiciones de anaerobiosis, van a metabolizar los azúcares reductores a CO₂ y etanol. Su producción y consumo es una de las actividades más antiguas desarrolladas por el hombre y a lo largo de los años han dado lugar a una gran diversidad de bebidas alcohólicas (Asticiarán y Martínez, 2005).

En la obtención de bebidas alcohólicas, se produce una fermentación que es extremadamente compleja, no solo se modifican los azúcares fermentables (glucosa y fructosa), sino una serie de compuestos presentes en el mosto. Además, de los productos principales de la fermentación que son alcohol y dióxido de carbono, se forman glicerina,

ácido succínico, ácidos volátiles, butilenglicol, alcoholes superiores (esencia fusel), acetaldehído, ácido láctico y ésteres. Para llevar a cabo la fermentación, las levaduras segregan enzimas y diastasas; siendo las principales del primer grupo la sucrasa o invertasa y la zimasa; mientras que en el segundo grupo se encuentran las proteasas, las fosfatasas, la oxidasa y la reductasa (Calwana, 1991).

Nuestros sentidos pueden apreciar fácilmente la fermentación en la forma siguiente (Beltrán y Carvajal, 1995):

- Una semejanza con el agua que hierve debida al desprendimiento de dióxido de carbono (CO₂).
- Un aumento de temperatura en el seno del mosto que fermenta.
- Un cambio de sabor en el líquido.
- Una disminución de su densidad.

La producción de vino de fruta es similar a la de vino de uva, con la diferencia que siempre se ha de emplear azúcar para hacer un vino acabado con 11 a 13 % de alcohol; estos vinos se estabilizan con facilidad, no existe en ellos el problema de la precipitación del tartrato y pueden ponerse en el mercado con gran seguridad inmediatamente después de producirse.

El vino de frutas todavía no está contemplado dentro de las normas legales en nuestro país. La Administración Federal de Alcohol de la EUA ha establecido las normas de identidad del vino cuyo texto es el siguiente (Beltrán y Carvajal, 1995):

Artículo 2, sección 21.

CLASE I : vino de uvas

CLASE II : vino espumoso de uvas

CLASE III : vino de uvas carbonatado

CLASE IV : vino de frutas cítricas

CLASE V : vino de frutas.

La temperatura de fermentación, para que la levadura se desarrolle y trabaje en buenas condiciones deberá estar comprendida entre 18 y 22 °C, y no debe exceder los 35 °C, ya que por encima de esta temperatura, además de hacerse perezosas las levaduras, se permite el desarrollo de contaminantes que desfavorecen el producto. Es recomendable que la temperatura del mosto no deba ser superior a 20 °C, para permitir el máximo desarrollo de ésteres en el vino pues debido a que la fermentación es un proceso exotérmico, fácilmente podría incrementarse la temperatura y detener la fermentación (Kolb, 2002).

Las enfermedades y defectos de los vinos, están ligados a la deficiente condición del prensado, pero también puede estribar en una errónea fermentación, azufrado insuficiente, descuido en las atenciones de las cubas y en la vigilancia del vino. Por lo común aparecen enturbiamientos, olores desagradables o sabores extraños. El vino puede alterarse por acción microbiana, química y fisiológica, conociéndose como “enfermedades” a aquellos cambios perjudiciales provocados por microorganismos y como “defectos” a aquellos cambios originados por procesos físicos o químicos que discurren en

el vino al captar sustancias extrañas que se manifiestan en variaciones indeseables de aspecto, olor y sabor (Calwana, 1991).

El trasiego de las bebidas alcohólicas fermentadas tiene por objeto separar el líquido transparente de todos los restos sólidos que se han ido acumulando en el fondo de los envases. Las cubas de fermentación del vino contienen en suspensión materias tenues que no han podido precipitar a consecuencia del desprendimiento continuo de gas carbónico debido a la fermentación, y en particular, levaduras y gérmenes de enfermedades. Estas sustancias y fermentos se depositan rápidamente en el fondo del recipiente, contribuyendo a la formación de las heces, siendo indispensable separarlos mediante trasiegos ya que el contacto prolongado del vino con la levadura no es ventajoso en ningún caso, sino que más bien puede ser causa de modificaciones perjudiciales del aroma y sabor, debido a que después de un cierto tiempo las levaduras se destruyen y entran en putrefacción. En vinos de frutas, el trasiego debe realizarse de manera que no penetre aire en el vino (Asticiarán y Martínez, 2005).

La conservación de los vinos de fruta, aún cuando estén bien constituidos, requieren un mínimo de cuidados para evitar su alteración. Suficientemente atendido, estará sujeto a modificaciones que le harán “envejecer”; la intensidad y calidad del añejamiento dependen, a la vez de la constitución inicial del líquido y de los cuidados más o menos bien entendidos, esenciales y complementarios, que se les den durante su conservación (Bremond, 1966).

Las levaduras son hongos microscópicos unicelulares de constitución muy sencilla. A grandes aumentos aparecen como células redondas, ovaladas o elípticas, rodeadas por una delicada envoltura elástica, su diámetro es solo de 0,004 a 0,014 mm. Éstas levaduras se multiplican por gemación y por esporas; la reproducción por gemación es una forma de multiplicación rápida (vida activa de las levaduras que se produce durante y sobre todo, al principio de la fermentación), la reproducción por esporas es el proceso normal de conservación de la especie, en esta forma se encuentran las levaduras en el aire, y bajo esta forma también pasan el invierno, esperando mejores condiciones para multiplicarse (Kretzschmar, 1961).

A las levaduras *Saccharomyces sp.* Meyer las denominó “hongos azucarados”, microorganismos unicelulares que se reproducen por gemación que son capaces de producir la fermentación alcohólica. Ahora se conoce bien su clasificación diferenciándose en levaduras que pueden formar ascosporas (sacos de esporas) y levaduras que no tienen esta facultad. Existen diferentes especies de *Saccharomyces* siendo una de ellas la *Saccharomyces cerevisiae* (Prescott y Duna, 1962).

Como no todo el nitrógeno presente en la fruta es aprovechable por las levaduras y para permitir la rápida fermentación de frutas, el nitrógeno puede ser adicionado al empezar la fermentación como sulfato de amonio, conteniendo no menos de 21 % de nitrógeno y no menos de 24 % de azufre. Es una sal inorgánica de gránulos blancos e inodora que debido a sus enlaces iónicos se disocia fácilmente en agua, formando de esta manera amoníaco, el cual es fácilmente asimilado por la levadura (Bailón, 2001).

Debido al bajo contenido de azúcar en la naranja habrá que suplementar su jugo con panela, conocida también en nuestro medio como chancaca granulada. La panela es un producto obtenido por la evaporación del jugo de la caña de azúcar en cocción y la consiguiente cristalización de la sacarosa y los demás componentes solubles en el jugo, quedando en forma granulada, con coloración de tonos amarillos a pardo oscuro, de sabor y olor característico. Se puede utilizar como edulcorante y aromatizante de bebidas frías y calientes; tanto para consumo familiar como industrial. Los parámetros técnicos indican que debe tener de 96 – 98 °Brix, 5,5 – 11 % azúcares reductores, pH 5,8 – 6,2 y humedad de 1,6 – 5 %. La composición química nutricional aproximada es carbohidratos 82 – 85 %, nitrógeno 0,2 %, calcio 80 – 250 mg/100 g, fósforo 40 – 120 mg/100 g, hierro 2,4 mg/100 g, sodio 20 – 80 mg/100 g, fibra 0 %, cenizas 1,5 – 2,0 %, y un poder energético de 351 cal/100 g (Mestanza, 2004).

El contenido de alcohol en el caso de las bebidas no destiladas fluctúa por lo general entre 3,5 y 14 % (v/v), con algunas excepciones en las que se llega a obtener contenidos de hasta 20 %, como el sake (a base de arroz) y algunos vinos de mesa como los trockenbernauslese alemanes, mientras que en el caso de las bebidas destiladas se encuentra entre 35 y 55 % (García y López – Murguía, 1993).

En la presente investigación se optimizó los valores de las variables: mg de sulfato de amonio por litro de jugo, g de panela por litro de jugo y tiempo de fermentación; empleando el diseño experimental de Box – Behnken, para elaborar una bebida alcohólica a partir de jugo de naranja criolla fermentado por *Saccharomyces cerevisiae* MIT L – 51.

II. MATERIAL Y MÉTODO

2.1. Material biológico

- Naranja criolla (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), proveniente del distrito de Huambo, provincia de Rodríguez de Mendoza, Región Amazonas.
- *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* MIT L – 51 procedente del Laboratorio de Microbiología Industrial de la Universidad Nacional de Trujillo.
- Panela, proveniente del Caserío de Zubiata Puquio del Distrito de Huambo, Provincia de Rodríguez de Mendoza, Región Amazonas.

2.2. Reactivación de la cepa

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* estuvo contenida en un tubo de ensayo con papa agar dextrosa (PDA) inclinado, se tomó con el asa bacteriológica una pequeña porción de la misma, se sembró en otros tubos de ensayo con el mismo medio, luego se incubó a 30 °C hasta obtener biomasa y posteriormente se conservaron en refrigeración como cultivo stock, a partir de los cuales se realizó el desarrollo del inóculo.

2.3. Desarrollo del inóculo

2.3.1. Preparación del medio

Se preparó el medio PDA constituido por agar, infusión de papa blanca y dextrosa. Para ello se disolvió el agar en la infusión de papa por calentamiento en una cocina eléctrica, luego se enfrió hasta una

temperatura de 50 °C y se procedió a servir en 6 botellas planas de 200 mL a las que se colocó tapones de algodón y se las esterilizó en autoclave a una presión de 15 lb/pulg² y 121 °C por 15 minutos; luego de salir del autoclave se inclinaron las botellas para generar una mayor área de medio de cultivo para el crecimiento de la levadura, al solidificarse el PDA a temperatura ambiente.

2.3.2. Siembra de la cepa

Del cultivo stock de *Saccharomyces cerevisiae* MIT L – 51, se produjo biomasa viable para inocular el jugo de naranja suplementado con sulfato de amonio y panela.

Una vez desinfectada la mesa de trabajo y con tres mecheros encendidos, se utilizó una asa bacteriológica previamente esterilizada en la llama de un mechero, para tomar una muestra del tubo de ensayo donde se encontraba la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* MIT L – 51 y se procedió a sembrar en las botellas planas por extensión. Luego se las llevó a incubación a 35 °C por 24 horas para el desarrollo de la levadura.

2.3.3. Preparación del inóculo

Una vez que se obtuvo el desarrollo de levaduras en las 6 botellas después de las 24 horas de incubación, se las suspendió con solución mineral estéril constituida por: NaNO₃ (0,3 g/100 mL), K₂HPO₄ (0,1 g/100 mL), MgSO₄ (0,05 g/100 mL), FeSO₄ (0,001 g/100 mL) y

KCl (0,05 g/100 mL) (Cornejo 2003); para ello, se encendió 3 mecheros para que desinfecten el área de trabajo, se retiró el tapón de algodón de cada botella y con la ayuda de la pipeta esterilizada se procedió a adicionarle 5 mL de solución mineral; luego se agitó para suspender la levadura de la botella, y se trasvasó a un matraz estéril. Esto se hizo con las 6 botellas, enseguida se homogenizó la suspensión en el matraz y se realizó el conteo de las levaduras con la cámara de Neubauer en el microscopio a 40 aumentos (40 X).

2.4. Preparación del medio base

Se clasificó y seleccionó las naranjas en base a su característica física (tamaño, forma y color), seguidamente se las lavó y peló manualmente con cuchillo. Se cortó las naranjas peladas por la mitad y se extrajo el jugo con un exprimidor manual, luego se lo filtró sobre telas de tocuyo, separando el filtrado de los restos sólidos.

El jugo de naranja filtrado viene a ser el medio base o mosto, con un pH de 3,45; luego, se realizó el pasteurizado del jugo a 60 °C por 30 minutos, inmediatamente después se suplementó con panela y sulfato de amonio, según los valores dados en la Tabla 1, de acuerdo a lo necesario para cada experimento indicado en la Tabla 2. Se bajó la temperatura a 35 °C y se procedió a la inoculación de 2×10^8 cél/mL de *Saccharomyces cerevisiae* MIT L – 51 (Scragg, 1996), para el proceso de fermentación de acuerdo al diseño experimental de Box – Behnken (Tabla 2).

Tabla 1: Valor de las variables a evaluar con el diseño estadístico de Box – Behnken.

Concentración		(NH ₄) ₂ SO ₄ (mg/L)	Panela (g/L)	Fermentación (días)
		A	B	C
Alta	(+)	200	165	6
Media	(0)	175	90	4
Baja	(-)	150	15	2

2.5. Fase pre – fermentativa: Acondicionamiento de los biorreactores

Los biorreactores se hicieron de botellas descartables de plástico de 1500 mL de capacidad, con las mismas características y proporciones geométricas (Anexo, Fotografía 1). Para realizar los experimentos, se emplearon 15 biorreactores.

A cada biorreactor se le incorporó un dispositivo para la salida del CO₂, consistente en una manguera la cual fue conectada a una botella que contenía una solución de cloruro de calcio para evitar la entrada de oxígeno.

Tabla 2: Diseño estadístico de Box – Behnken para evaluar las tres variables independientes.

Número experimento	Variables		
	A	B	C
1	+	+	0
2	-	+	+
3	0	-	0
4	+	-	-
5	0	+	0
6	0	+	-
7	-	-	+
8	0	-	-
9	+	0	+
10	+	0	0
11	-	0	+
12	-	0	-
13	0	0	0
14	+	+	+
15	-	-	-

2.6. Fase fermentativa: Proceso de producción de etanol

A cada biorreactor se colocó 1000 mL de medio base, se suplementó con panela y sulfato de amonio, de acuerdo a lo establecido en el diseño de Box – Behnken (Tabla 2). Luego se homogenizó y se selló herméticamente el biorreactor, dejando un respiradero de purga para eliminar el CO₂ producto de la reacción. Se incubó en el rango de 18 a 22 °C en una caja aislada con tecnopor (poliestireno) y calentada por un foco de 50 W, por el tiempo establecido para cada experimento (Tabla 2). Los experimentos se realizaron por triplicado y se reportó el promedio de los resultados.

2.7. Fase post – fermentativa

Después de cada período fermentativo fueron tomadas muestras de los mostos para determinar la concentración de etanol (g/L). Luego se trasvasó a envases de vidrio para la pasteurización a una temperatura de 65 °C durante 30 minutos para detener la fermentación. Se dejó enfriar y se esperó 7 a 8 días para que sedimente el vino y se clarifique para realizar el trasiego.

2.8. Optimización del proceso de fermentación

Existen diversas variables de las cuales depende el proceso de fermentación; para esta investigación se han considerado como las más importantes a las variables concentración de panela, concentración de sulfato de amonio y tiempo de fermentación. Los valores de estas variables han sido evaluados siguiendo el diseño de Box – Behnken, los resultados se emplearán para dar valor agregado a la naranja de la Región Amazonas. Luego de haber

realizado todos los ensayos experimentales, y teniendo los datos de concentración de etanol, que es la variable respuesta; se procedió a realizar el análisis estadístico para determinar los valores óptimos de las variables.

2.8.1. Análisis estadístico

El nivel óptimo de cada variable independiente fue determinado usando las técnicas de Optimización de Respuesta Superficial (Daniel, 1976), el cual fue aplicado a las 3 variables independientes y sus relaciones se ajustaron al siguiente modelo polinomial cuadrático.

$$Z = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_4AB + b_5AC + b_6BC + b_7A^2 + b_8B^2 + b_9C^2$$

Donde:

Z = Variable dependiente (concentración de etanol en g/L)

A, B, C = Variables independientes

b_0 = Coeficiente de regresión en el punto central

b_1, b_2, b_3 = Coeficientes lineales

b_4, b_5, b_6 = Coeficientes de interacción de segundo orden

b_7, b_8, b_9 = Coeficientes cuadráticos.

Para la identificación de un valor óptimo fue necesario estimar la curvatura, para lo cual cada variable fue ensayada en 15 niveles mediante el diseño de Box – Behnken que es un diseño factorial fraccional (Daniel, 1976). Los coeficientes del modelo polinomial fueron calculados usando las técnicas de regresión múltiple y luego se escribió las

ecuaciones XY polinomiales, las que fueron usadas para generar respuestas y líneas de contorno para las diferentes combinaciones de los niveles de las variables. Todos los cálculos y gráficos estadísticos fueron realizados con el software Statgraphics V. 5.1.

2.9. Producción de bebida alcohólica de naranja de mayor rendimiento en etanol

Después de haber optimizado los valores de las variables que influyen en el mayor rendimiento en etanol, durante la producción de la bebida alcohólica de naranja, se aplicó nuevamente el método de elaboración para la obtención de la bebida y poder comprobar el valor de concentración de etanol (g/L) predicho en la optimización de variables, empleando sus valores que permitirán obtener el máximo predicho.

Desde el inicio hasta el final se realizaron controles diarios de:

- pH, utilizando el pH – metro.
- Concentración de azúcares reductores mediante el método de Fehling.
- °Brix, realizando la lectura con el refractómetro portátil
- Densidad, método del picnómetro.

Al final del proceso fermentativo se determinó el rendimiento en etanol expresado en % en volumen y en g/L de mosto; para ello, se pasteurizó la bebida para terminar la fermentación e inhibir la levadura, a una temperatura de 65 °C durante 30 minutos. La pasteurización se realizó colocando el jugo fermentado en recipientes de vidrio los que se pusieron en bañomaría a la temperatura y

tiempo indicados. Una vez pasteurizado, se enfrió y se guardó durante 7 a 8 días para que sedimente y clarifique, para luego hacer el trasiego. Se embotelló la bebida en botellas de vidrio ámbar, debidamente higienizada en agua caliente a 85 °C por 1 minuto, enjuagadas con alcohol de 96° durante unos instantes, y finalmente enjuagadas con agua destilada. Se llenó las botellas con el vino y se cerraron con corchos. Se procedió a la catación del vino por un panel utilizando la escala hedónica (Anexo), determinándose los siguientes caracteres organolépticos.

- Color : característico de la procedencia del vino.
- Sabor : característico de la procedencia del vino.
- Olor : a alcohol
- Aspecto: límpido

2.10. Análisis físicos y químicos del vino de naranja

Para determinar el grado alcohólico se utilizó la destilación simple y en seguida la destilación fraccionada. Se realizó la destilación simple, de 600 mL de bebida alcohólica obtenida en cada biorreactor, de los cuales se obtuvo 100 mL de destilado. Luego, se procedió a la destilación fraccionada de lo obtenido en la destilación simple, para después determinar los grados Gay – Lussac de concentración de etanol (°G.L.) con el alcoholímetro. A demás, se determinó la acidez total, el contenido de cloruros y la acidez acética; cuyo procedimiento está en el apéndice.

III. RESULTADOS

De los resultados mostrados en la Tabla 3, los valores de las variables independientes del ensayo 14 son lo que permitieron obtener la mayor concentración de etanol en g/L.

Tabla 3: Rendimientos promedio de etanol de cada medio de diferente concentración de componentes, aplicando el diseño estadístico de Box – Behnken.

Número Experi_ mento	Variables			Rendimiento	
	Sulfato de amonio (mg/L)	Panela (g/L)	Tiempo (días)	Etanol (%vol.)	Concentración de etanol (g/L)
	A	B	C	Y1	Y2
1	200	165	4	13	87,60
2	150	165	6	13,5	91,56
3	175	15	4	7,3	71,03
4	200	15	2	6	69,82
5	175	165	4	11,5	83,07
6	175	165	2	9,8	76,01
7	150	15	6	7,5	72,35
8	175	15	2	5,7	68,45
9	200	90	6	11,3	82,18
10	200	90	4	9,8	76,48
11	150	90	6	13,2	90,02
12	150	90	2	6,8	70,67
13	175	90	4	10,7	78,09
14	200	165	6	14	92,17
15	150	15	2	4,8	65,56

Tabla 4: Medición del pH durante los días de fermentación de cada experimento.

Número Experimento	Días						
	0	1	2	3	4	5	6
1	3,45	3,44	3,40	3,39	3,38		
2	3,45	3,45	3,41	3,40	3,38	3,35	3,35
3	3,45	3,45	3,43	3,42	3,40		
4	3,45	3,45	3,44				
5	3,45	3,45	3,43	3,40	3,39		
6	3,45	3,45	3,42				
7	3,45	3,45	3,43	3,42	3,40	3,38	3,38
8	3,45	3,45	3,43				
9	3,45	3,44	3,43	3,40	3,39	3,37	3,36
10	3,45	3,44	3,42	3,40	3,38		
11	3,45	3,45	3,42	3,41	3,39	3,37	3,36
12	3,45	3,45	3,41				
13	3,45	3,45	3,42	3,40	3,38		
14	3,45	3,44	3,40	3,39	3,37	3,36	3,35
15	3,45	3,45	3,43				

Tabla 5: Contenido de azúcares reductores (g/L) durante los días de fermentación de cada experimento.

Número experimento	Días						
	0	1	2	3	4	5	6
1	55	49	22	9	5		
2	55	48	20	11	6	4	3,5
3	35	28	19	12	7		
4	35	21	10				
5	55	43	31	10	4		
6	55	22	15				
7	35	20	14	9	6	4	2,2
8	35	20	11				
9	45	34	26	17	13	7	4,2
10	45	30	21	16	11		
11	45	31	24	18	13	9	5
12	45	24	11				
13	45	28	21	16	10		
14	55	41	34	25	14	10	6,2
15	35	19	8				

Tabla 6: Medición de °Brix durante los días de fermentación de cada experimento.

Número experimento	Días						
	0	1	2	3	4	5	6
1	21	18,7	8,4	3,4	2		
2	21	18,3	7,6	4,2	2,3	1,5	1,3
3	11,6	9,3	6,3	4	2,3		
4	11,6	7	3,3				
5	21	16	12	3,9	1,5		
6	21	8	6				
7	11,6	6,6	5	3	2	1,3	0,8
8	11,6	6,6	4				
9	17,6	13,3	10	6,6	5,1	2,7	1,6
10	17,6	12	8	6,3	4,3		
11	17,6	12,1	9,4	7	5,1	3,5	2
12	17,6	9,4	4,3				
13	17,6	11	8	6,3	3,9		
14	21	15,6	13	9,5	5,3	3,8	2,4
15	11,6	6,3	3				

Los datos de la Tabla 3 fueron procesados en el software Statgraphics V. 5.1; para obtener los coeficientes de regresión mostrados en las Tablas 7 y 9, que se emplean para escribir las ecuaciones polinomiales respectivas.

Tabla 7: Coeficientes de regresión obtenidos con Statgraphics V. 5.1; a partir de los datos de la Tabla 3, para concentración de etanol en (g/L).

Variables independientes	Coeficientes de regresión
Constante	$b_0 = -31,5537$
A: Sulfato de amonio	$b_1 = 0,980859$
B: Panela	$b_2 = -0,137321$
C: Tiempo	$b_3 = 9,52057$
AB: A x B	$b_4 = 0,00136677$
AC: A x C	$b_5 = -0,0698499$
BC: B x C	$b_6 = 0,0275612$
AA: A x A	$b_7 = -0,00225895$
BB: B x B	$b_8 = -0,000617182$
CC: C x C	$b_9 = 0,333832$

La ecuación del modelo ajustado es:

$$Y_2 = -31,5537 + 0,980859 \times A - 0,137321 \times B + 9,52057 \times C - 0,00225895 \times A^2 + 0,00136677 \times A \times B - 0,0698499 \times A \times C - 0,000617182 \times B^2 + 0,0275612 \times B \times C + 0,333832 \times C^2 \text{ (reporte de Statgraphics V. 5.1.)}$$

Tabla 8: Análisis de la varianza para concentración de etanol (g/L) en función de sulfato de amonio, panela y tiempo.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado medio	F - Ratio	P - Valor
A:A	5,04413	1	5,04413	0,73	0,4320
B:B	5,57155	1	5,57155	0,81	0,4105
C:C	24,6777	1	24,6777	3,57	0,1175
AA	3,37307	1	3,37307	0,49	0,5160
AB	14,0966	1	14,0966	2,04	0,2127
AC	35,9862	1	35,9862	5,21	0,0714
BB	19,4723	1	19,4723	2,82	0,1541
BC	60,9239	1	60,9239	8,81	0,0312
CC	3,39158	1	3,39158	0,49	0,5149
Error Total	34,5643	5	6,91285		
Total	1115,76	14			

Tabla 9: Coeficientes de regresión para el rendimiento de etanol (% vol.) en función de sulfato de amonio, panela y tiempo.

Coef. de regresión para etanol (% vol.)	
Constante	$b_0 = -46,7284$
A:A	$b_1 = 0,528907$
B:B	$b_2 = -0,0242846$
C:C	$b_3 = 3,77334$
AA	$b_4 = -0,00133058$
AB	$b_5 = 0,000479716$
AC	$b_6 = -0,0221074$
BB	$b_7 = -0,000274675$
BC	$b_8 = 0,00642783$
CC	$b_9 = 0,0414113$

La ecuación del modelo ajustado es:

$$Y1 = - 46,7284 + 0,528907 \times A - 0,0242846 \times B + 3,77334 \times C - 0,00133058 \times A^2 + 0,000479716 \times A \times B - 0,0221074 \times A \times C - 0,000274675 \times B^2 + 0,00642783 \times B \times C + 0,0414113 \times C^2 \text{ (reporte de Statgraphics V.5.1.)}$$

Tabla 10: Análisis de la varianza para rendimiento de etanol (% vol.) en función de sulfato de amonio, panela y tiempo.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F – Ratio	P – Valor
A:A	1,46667	1	1,46667	2,65	0,1647
B:B	0,174247	1	0,174247	0,31	0,5991
C:C	3,87641	1	3,87641	7,00	0,0457
AA	1,17029	1	1,17029	2,11	0,2058
AB	1,73657	1	1,73657	3,13	0,1369
AC	3,6048	1	3,6048	6,51	0,0512
BB	3,85682	1	3,85682	6,96	0,0461
BC	3,31375	1	3,31375	5,98	0,0582
CC	0,0521897	1	0,0521897	0,09	0,7713
Error Total	2,77006	5	0,554012		
Total	135,576	14			

R - cuadrado = 97,9568 %

R - cuadrado (ajustado para g.l.) = 94,2791 %

Error Estándar de Est. = 0,74432

Error absoluto de la media = 0,362372

Estadístico Durban – Watson = 2,60576 (P = 0,0837)

Autocorrelación residual Lag. 1 = - 0,357719

Tabla 11: Ruta ascendente para el rendimiento de etanol (% vol.) en función de sulfato de amonio, panela y tiempo pronosticado.

A	B	C	% vol.
0,0	0,0	0,0	-46,7284
1,0	0,0099566	19,60151	-6,36535
2,0	3,0181	151,738	1476,51
3,0	2,68128	145,933	1380,19
4,0	2,34233	140,043	1285,63
5,0	2,00097	134,058	1192,81

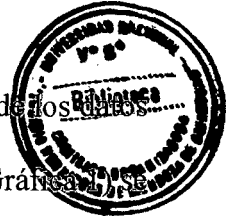
Respuesta Optimizada

Meta: maximizar % Vol.

Valor óptimo = 14,7474

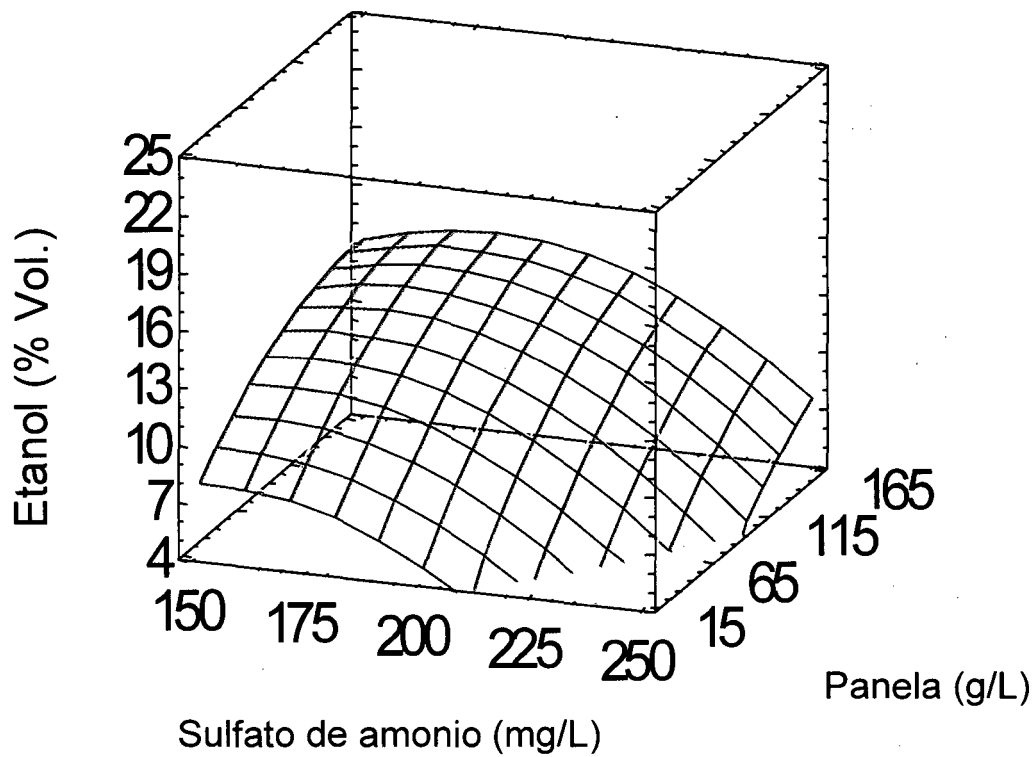
Tabla 12: Valores óptimos de las variables independientes.

Variable independiente	Inferior	Mayor	Óptimo
Sulfato de amonio (mg/L)	150,0	200,0	178,814
Panela (g/L)	15,0	165,0	164,984
Tiempo (días)	2,0	6,0	6,0



A continuación se presentan las gráficas obtenidas del procesamiento de los datos de la Tabla 3 con el software Statgraphics V.5.1. Obsérvese que a los 6 días (Gráfica 1) se obtiene la máxima concentración de etanol que alcanza a 14,7 % vol. con un jugo de naranja suplementado con 165 g de panela/L y 178,8 mg de sulfato de amonio/L.

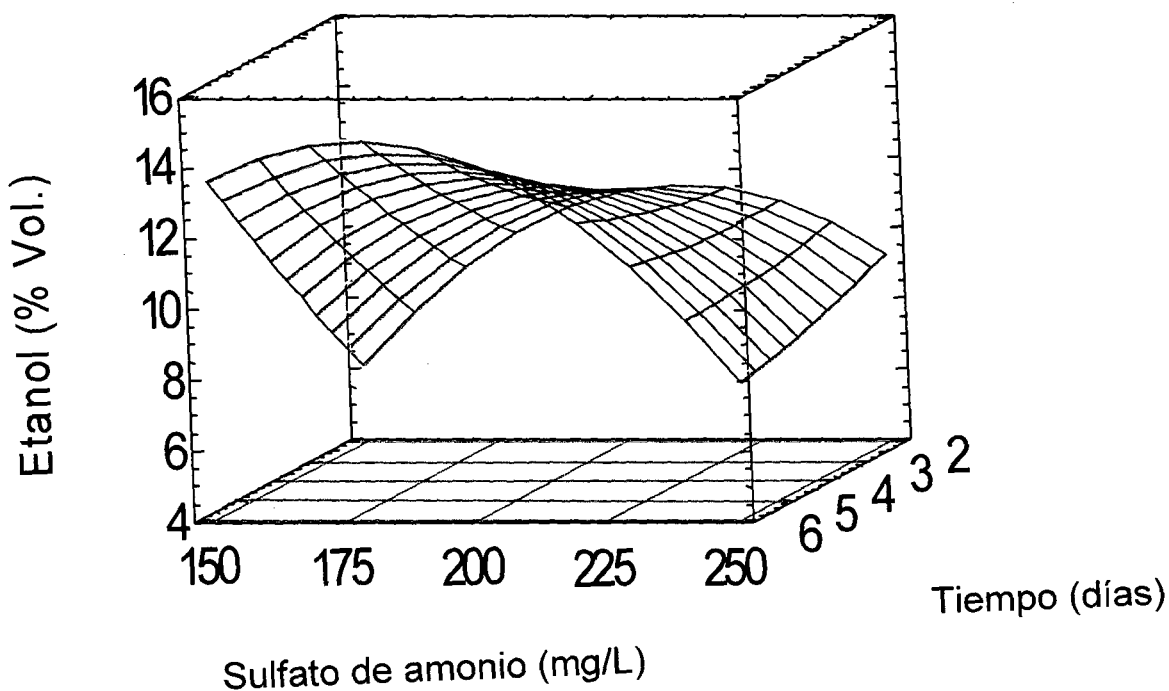
Superficie de respuesta estimada de etanol (% vol.)
Tiempo (días) C = 6



Gráfica 1: Superficie respuesta de etanol (% vol.) en función sulfato de amonio – panela (tiempo: 6 días). Máximo 14,7 % vol. de etanol.

La Gráfica 2 confirma los valores de la Gráfica 1.

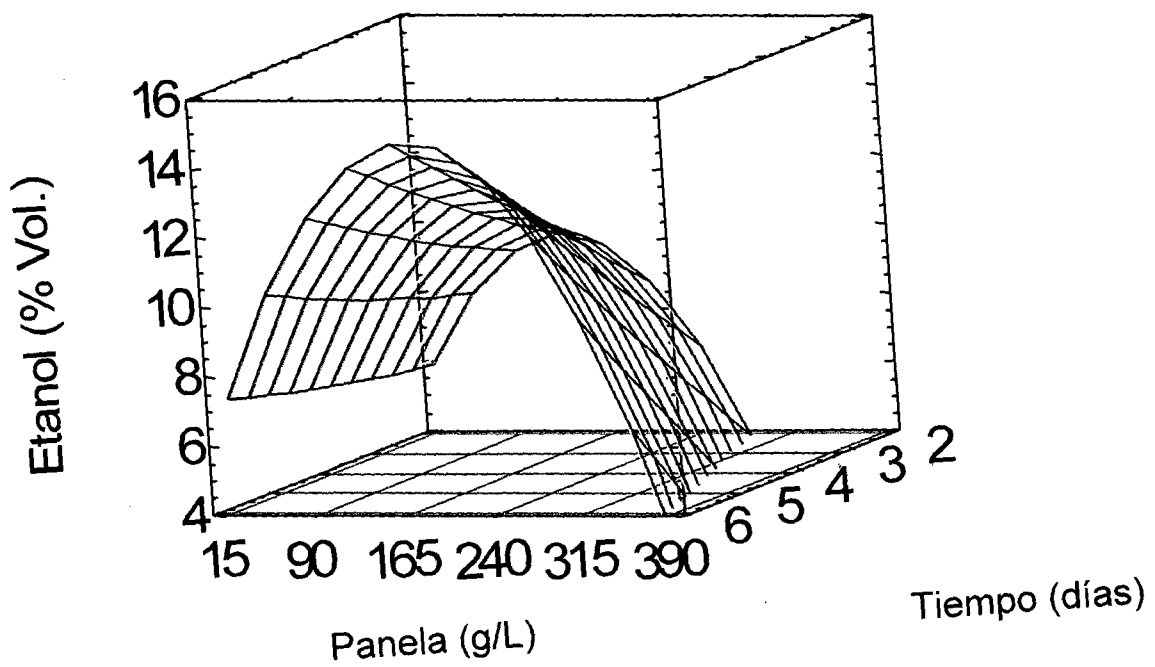
Superficie de respuesta estimada de etanol (% vol.)
Panela (g/L) B = 165



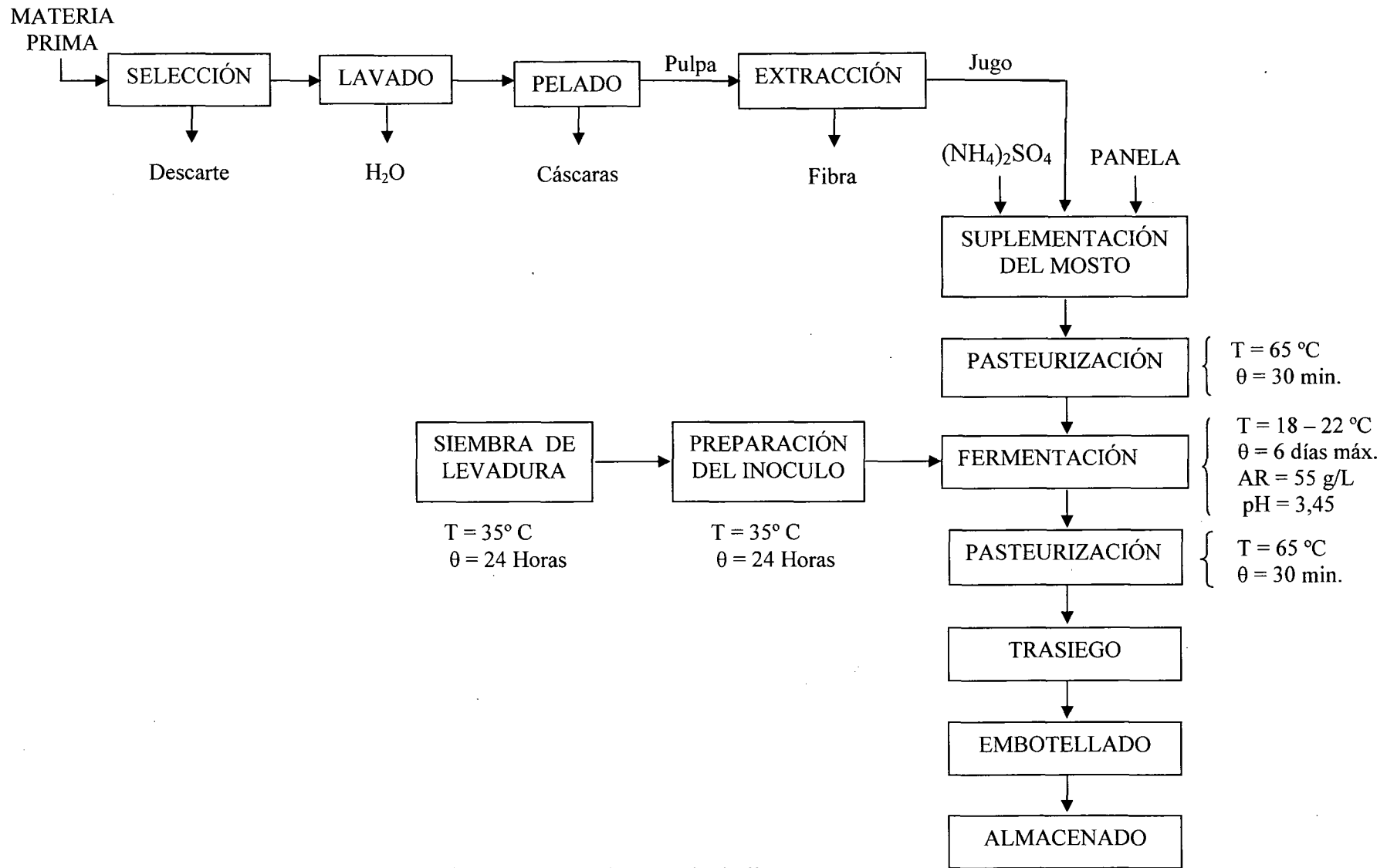
Gráfica 2: Superficie respuesta de etanol (% vol.) en función sulfato de amonio – tiempo (panela 165 g/L). Máximo 14,7 % vol. de etanol.

La Gráfica 3 confirma los resultados de la Gráfica 1.

Superficie de respuesta estimada de etanol (% vol.)
Sulfato de amonio (mg/L) A = 175



Gráfica 3: Superficie respuesta de etanol (% vol.) en función panela - tiempo (sulfato de amonio 175 mg/L). Máximo 14,7 % vol. de etanol.



Gráfica 4: Diagrama de bloques del proceso de obtención de bebida alcohólica.

Tabla 13: Condiciones de operación del proceso de fermentación para producción de vino de naranja con el mayor % en volumen de etanol.

Condiciones de operación del proceso de fermentación	
Volumen del mosto inicial	1 L
pH	3,45
Temperatura (ambiente)	18 – 25 °C
Sulfato de amonio	178,8 mg/L
Panela	165 g/L
Tiempo	6 días
Volumen de vino obtenido	0,890 L
Rendimiento de etanol	14 % vol.

Tabla 14: Control periódico de la fermentación alcohólica en la obtención del vino de naranja con el mayor % en volumen de etanol.

Día	°Brix	pH	Densidad (g/L)
0	28,0	3,45	1,1165
1	19,4	3,44	1,0776
2	16,7	3,40	1,0628
3	14,0	3,39	1,0539
4	12,3	3,37	1,0457
5	9,3	3,35	1,0037
6	9,0	3,35	0,9818

Tabla 15: Análisis organoléptico del vino de naranja elaborado.

Caracteres evaluados	Resultados	INDECOPI
Aspecto	Limpio	Limpio
Olor	Alcohol	Característico
Sabor	Alcohol	Característico
Color	Semejante al jugo de naranja (anaranjado claro)	Característico de la procedencia del vino

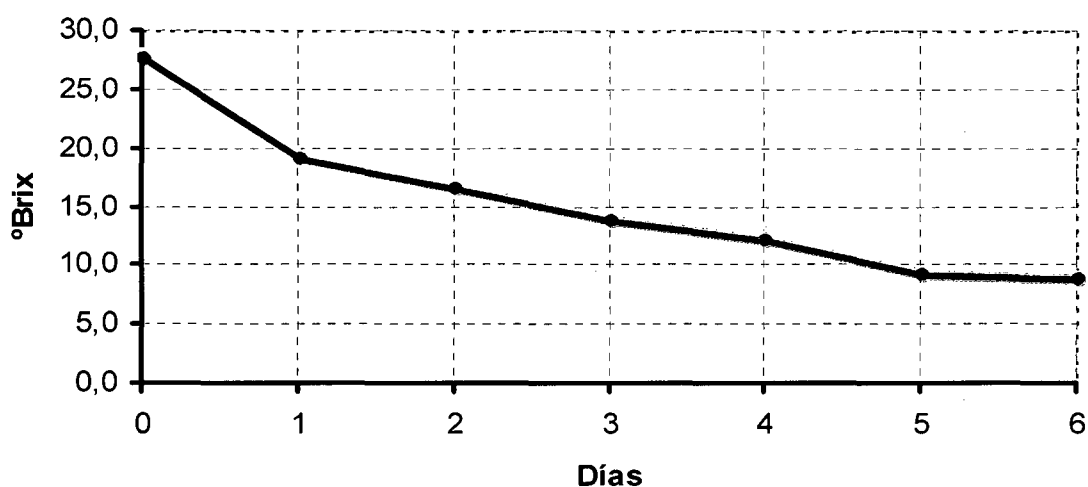
Tabla 16: Resultados obtenidos y los datos de INDECOPI para el vino de naranja elaborado.

Análisis fisicoquímico	Resultados	INDECOPI
Acidez total del vino % máx.	0,6628	1,0
Titulo alcohólico mínimo en % vol. de 15 – 2 °C	14	10,13
Acidez acética volátil expresada como ácido acético, g/L máx.	0,672	1,8
Cloruros expresado como cloruro de sodio, g/L máx.	0,24	1,0

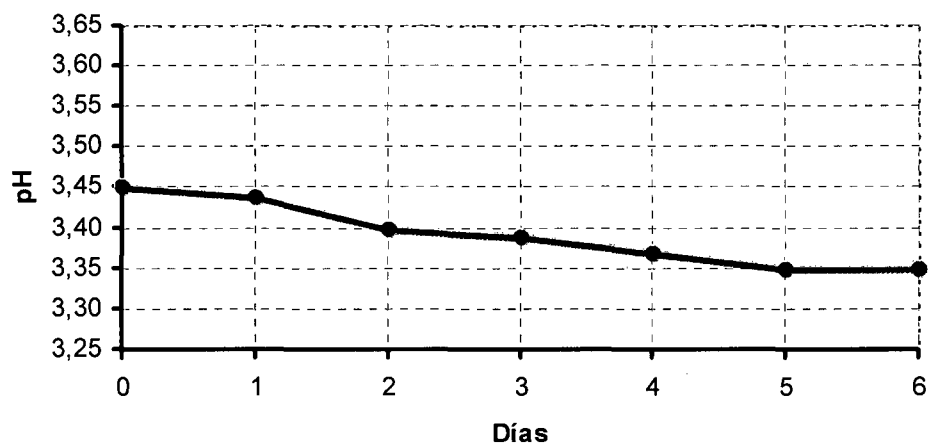
Tabla 17: Control periódico de la producción de etanol y del consumo de azúcares reductores (AR) durante la fermentación alcohólica, con los valores óptimos de las variables.

Día	Etanol (% vol.)	Concentración de etanol (g/L)	Azúcares reductores (g/L)
0	0	0	55,00
1	6,28	49,57	48,30
2	8,25	65,12	41,30
3	10,68	70,05	32,50
4	12,30	79,15	20,60
5	13,20	89,45	11,20
6	14	92,17	7,5

Con los datos de la Tabla 14, se hicieron las gráficas 5 y 6, donde se aprecia la disminución de los °Brix y del pH, conforme transcurren los días de fermentación, hasta mantenerse casi constantes al final de la fermentación.

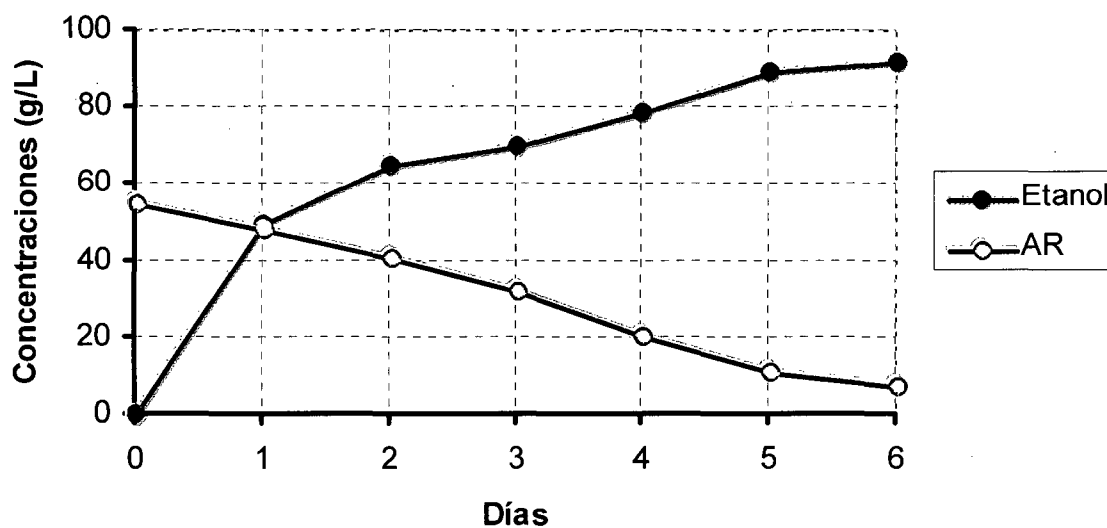


Gráfica 5: Variación de los °Brix con respecto al tiempo, durante la fermentación alcohólica.



Gráfica 6: Variación del pH con respecto al tiempo durante la fermentación.

Con los datos de la Tabla 17 se hizo la gráfica 7, donde se aprecia el incremento de la concentración de etanol (g/L) y la disminución de los azúcares reductores, conforme transcurren los días de fermentación, hasta mantenerse casi constantes al final de la fermentación.



Gráfica 7: Variación de la concentración de etanol y azúcares reductores (AR) con respecto al tiempo, durante la fermentación alcohólica.

IV. DISCUSIÓN

En la elaboración de bebida alcohólica a partir de sauco *Sambucus peruviana HBK*, se suplementó el mosto con 323,5 g de azúcar/L y 175 mg de fosfato de amonio/L de mosto a pH 3,5 habiéndose obtenido una concentración de etanol de 14,17 °G.L. y los azúcares reductores disminuyeron de 26 a 9,9 ° Brix (Columna, 1991). En el presente trabajo de investigación se suplementó el jugo de naranja con 165 g de panela/L, que viene a ser prácticamente la mitad de la empleada para el mosto de sauco. En cuanto a la fuente de nitrógeno, empleamos sulfato de amonio (21,21 % N) que en la cantidad usada aportó 37,9 g N, mientras que para el mosto de sauco se tuvo 49,3 g N. El pH al que trabajamos fue de 3,45 y los °Brix bajaron de 28 a 9, siendo esto muy similar al empleado para el mosto de sauco. Sin embargo, a pesar de haber empleado casi la mitad de azúcares se obtuvo prácticamente la misma concentración final de etanol: 14 °G.L. Podemos decir que la levadura convirtió más eficientemente los azúcares reductores de jugo de naranja y los aportados por la panela, que los azúcares reductores del sauco y del azúcar adicionado.

La cantidad de azúcares reductores en el jugo de naranja en promedio fue de 33 g/L. Para la obtención de bebida alcohólica fermentada se suplementó el jugo con panela para aumentar los azúcares reductores, adicionándole lo necesario para cada experimento (15, 90 y 165 g de panela/L) de acuerdo a lo indicado en la Tabla 1, lo que equivale a 35, 45 y 55 g/L de azúcares reductores. En la Tabla 3 se muestran los rendimientos de etanol en % en volumen y en g/L, para cada experimento. De los 15 experimentos realizados se puede observar que en el número 14 se obtuvo la concentración más alta 92,17 g de

etanol/L de mosto empleando 200 mg/L de sulfato de amonio, 165 g/L de panela y 6 días de fermentación, siendo la concentración más alta obtenida.

El análisis de las gráficas de superficie de respuesta obtenidas con la ecuación polinomial, cuyos coeficientes se muestran en la Tabla 9, para % en volumen de etanol, permite predecir que se puede obtener un máximo de 14,7 % en volumen de etanol, suplementando el jugo de naranja con 165 g de panela/L y 178,8 mg de sulfato de amonio/L, dejándolo fermentar durante 6 días con *Saccharomyces cerevisiae*. Esto se respalda en las Gráficas 1, 2 y 3; de las que se obtiene los mismos valores para % en volumen de etanol y para las variables independientes, lo cual también ha sido reportado por el software Statgraphics V. 5.1. (Tabla 12).

Los otros dos resultados altos de concentración de etanol de 91,56 g/L y 90,02 g/L (Tabla 3, ensayos 2 y 11) bastante cercanos al máximo obtenido de 92,17 g/L (Tabla 3, ensayo 14), permiten deducir que un valor para sulfato de amonio entre 150 y 200 mg/L puede inducir a la levadura a bioconvertir más azúcares reductores en etanol, en un tiempo de fermentación de 6 días. Esta deducción se corrobora con los resultados de los ensayos 4, 8 y 15 (Tabla 3) donde se observa que, manteniendo constante la cantidad de azúcares reductores (15 g/L) y el tiempo de fermentación (2 días), si incrementamos el sulfato de amonio de 150 a 175 mg/L se obtiene un incremento de etanol de 2,91 g/L; sin embargo, al incrementar de 175 a 200 mg/L el sulfato de amonio, solo se obtiene un incremento de 1,35 g/L de etanol. En consecuencia, el valor adecuado para el sulfato de amonio debe estar cercano a 175 mg/L; este valor concuerda con el valor óptimo obtenido con el software Statgraphics de 178,8 mg/L. Un apoyo a esto se tiene en los ensayos 9 y 11 (Tabla 3)

donde con 200 mg/L de sulfato de amonio se obtiene menos etanol que con 150 mg/L, manteniendo constante las otras condiciones.

En la Tabla 13 se muestran las condiciones de operación para elaborar un vino de naranja, donde se incluyen los valores óptimos de las variables independientes para obtener el mayor rendimiento en etanol (Tabla 12). El pH inicial del mosto fue de 3,45, encontrándose en el rango de 3,4 – 5,0 que favorece el crecimiento óptimo de la levadura, inhibiendo el desarrollo de bacterias. Con estas condiciones, se ha obtenido vino de naranja con 14 % en volumen de etanol, valor que está dentro del rango para bebidas no destiladas; además, la evaluación organoléptica del vino de naranja dio resultados satisfactorios (Tabla 15), convirtiendo este proceso en una alternativa adecuada para dar valor agregado a la naranja de la Región Amazonas.

Al hacer el seguimiento a la fermentación durante los 6 días, se midió °Brix, pH y densidad del mosto encontrándose que sus valores descienden casi linealmente lo cual es característico en las fermentaciones (Gráfica 5 y 6). Simultáneamente, en cada día se determinó el % volumen de etanol, concentración de etanol (g/L) y azúcares reductores en g/L; observándose que conforme disminuyen los azúcares reductores, aumenta la concentración de etanol en el mosto. Debe tenerse en cuenta que una parte de los azúcares reductores fue empleada para el desarrollo de la levadura y otra parte fue convertida por la levadura en etanol y CO₂; como se realizó la fermentación en condiciones anaeróbicas, se puede asegurar que el desarrollo de biomasa fue mínimo y por tanto, la levadura prioritariamente convirtió los azúcares reductores en etanol y CO₂.

V. CONCLUSIONES

- Se ha elaborado una bebida alcohólica a partir de jugo de naranja, con resultados satisfactorios en la evaluación fisicoquímica y organoléptica.

- Los valores óptimos de las variables independientes son:

Sulfato de amonio	=	178,8 mg/L
Panela	=	165 mg/L
Tiempo de fermentación	=	6 días

- Las condiciones de operación finales para elaborar la bebida alcohólica de naranja fueron; jugo de naranja madura de pH 3,45, suplementado con sulfato de amonio (178,8 mg/L) y panela (165 g/L), fermentado por *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* MIT L – 51 durante 6 días a 18 – 25 °C. Este vino alcanzó un contenido de 14 % en volumen de etanol.

- La bebida alcohólica de naranja, por sus características fisicoquímicas, cumple con la Norma Técnica para vinos de uva, las estipuladas por INDECOPI, lo que demuestra que la bebida es aceptable.

- Este proceso biotecnológico es adecuado para dar valor agregado a la naranja que se produce en la Región Amazonas.

VI. RECOMENDACIONES

- Emplear naranjas con un óptimo estado de madurez y sanidad, que se tiene cuando su contenido de azúcares reductores es de 33 g/L de jugo.
- Realizar trabajos de investigación concernientes al clarificado de la bebida alcohólica de naranja.
- Realizar un estudio de mercado y de costos de producción para la creación de una industria de elaboración de una bebida alcohólica de naranja, empleando los valores óptimos de sulfato de amonio, panela y tiempo de fermentación.
- Emplear la cáscara de naranja para extraer su aceite esencial por arrastre con vapor, de esta manera se empleará un subproducto del proceso de elaboración de bebida alcohólica de naranja.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agustín, M. (2000). Citricultura. Editorial Mundi – Prensa, España.
- Amerine, M. A. y Ough, C. S. (1924). Análisis de Vinos y Mostos, página 23.
- Asticiarán I. y Martínez A. (2005). Alimentos Composición y Propiedades. 2^{da} Edición. Editorial. Mc. Graw Hill Interamericana. Madrid, España.
- Bailón, S. (2001). Influencia del sulfato de amonio, nitrato de potasio y úrea en la producción de proteína unicelular de *Candida utilis*. Var. *major*. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias. Mención Microbiología Industrial y Biotecnología, Universidad Nacional de Trujillo – Perú.
- Bedoya, D. Gómez, E. Lujan, D. y Salcedo J. (2005). “Elaboración de Vino de Naranja”. Revista Científica. Departamento de Ingeniería de Alimentos Universidad de Córdoba. Argentina.
- Beltrán, C. y Carvajal, L. (1995). Elaboración de vino a partir de piña (*Smooth cayene*). Tesis Ing. Química. UNT, Trujillo – Perú.
- Bremond E. (1966). Técnicas modernas de vinificación y de conservación de vinos. 1^{ra} Edición. Editorial Sintet. Barcelona, España.
- Calwana, J. N. (1991). Elaboración de una bebida alcohólica a partir de sauco (*Sambucus peruviana* HBK). Tesis Ingeniería de Industrias Alimentarias UNALM – Lima. 171 pp.
- Cornejo, R. (2003). VI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CONACYTA). Arequipa.
- Daniel, L. E. (1976). Application of response surface optimization techniques to polyene macrolide fermentation studies in shake flask. Dev. Ind. Microbiology.

- Davies, F. S. y Albrigo L. G. (1996). Enfermedades de los Cítricos. Editorial Acribia, España.
- García G., M. y López – Murguía C. A. (1993). Bebidas Alcohólicas no Destiladas, en: Biotecnología Alimentaria, Editores M. García, R. Quintero y A. López Murguía; Limusa Noriega Editores, México, pp. 263-311
- Kolb, E. (2002). Vino de Frutas. 8^{va}. Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España.
- Kretzschmar, H., (1961). Levaduras y Alcoholes. 1^{ra} Edición. Editorial Reverté S.A. Barcelona.
- Mestanza, C. (2004). Proyecto “Mejoramiento de la calidad e incremento de la producción de la panela en el caserío de Zubiato Puquio del distrito de Huambo”. Financiado por el Gobierno Regional de Amazonas.
- Prescott, S.C. y Duna, C.G. (1962). Microbiología Industrial. 3^{ra} Edición. Edit. Aguilar S.A. Madrid, España.
- Scragg, A., (1996), Biotecnología para Ingenieros, 1^{ra} Edición, Edit. Limusa S.A., México.

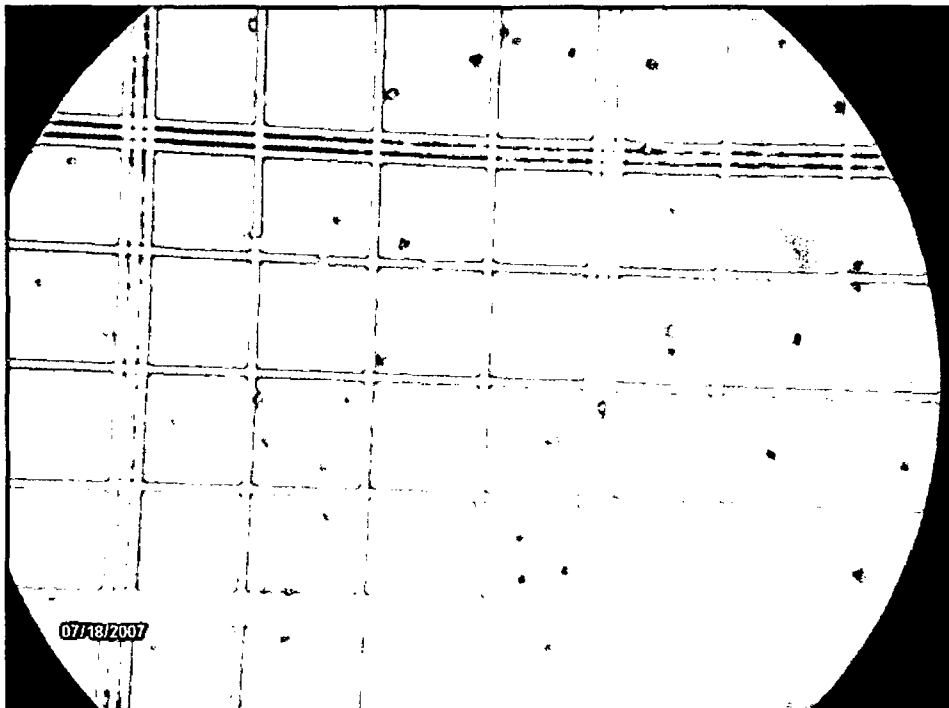
ANEXOS

ANEXO

Fotografía 1: Biorreactores para obtener etanol a partir de jugo de naranja.



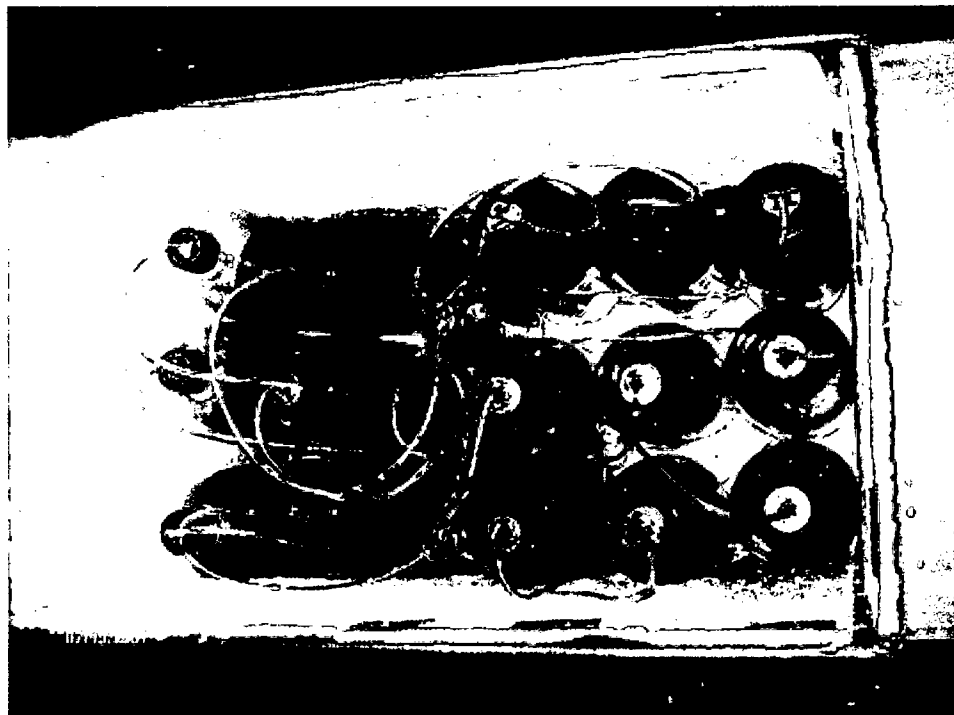
Fotografía 2: Recuento de células de *Saccharomyces cerevisiae* en microscopio con cámara de Neubauer a 40 X.



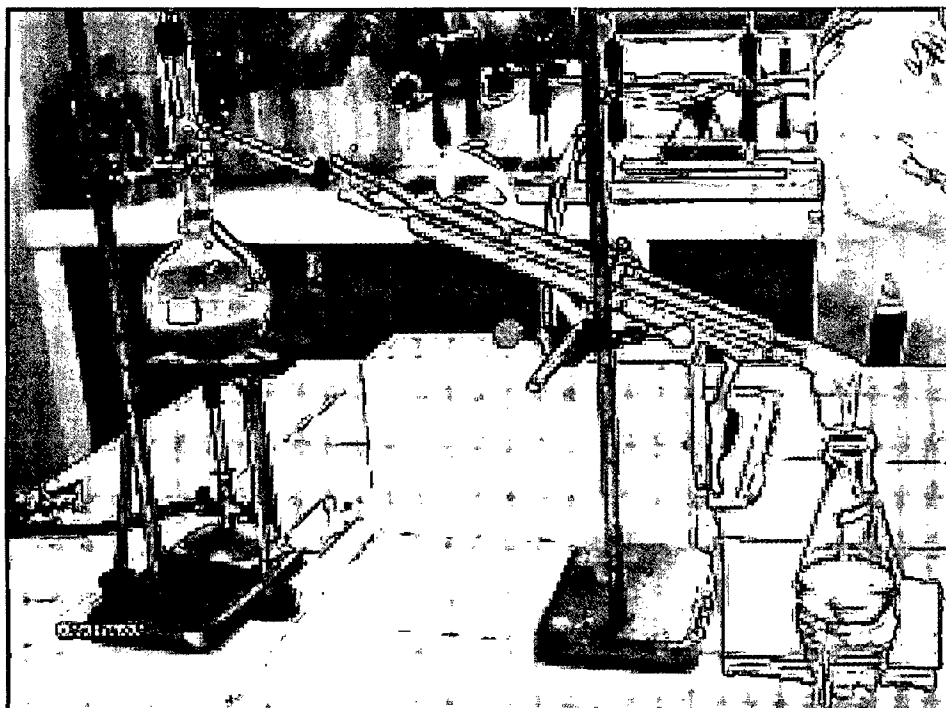
Fotografía 3: Acondicionamiento de los biorreactores con el medio base.



Fotografía 4: Caja con aislamiento térmico para mantener la temperatura de fermentación.



Fotografía 5: Equipo de laboratorio para destilación simple.



Fotografía 6: Equipo de laboratorio para destilación fraccionada.

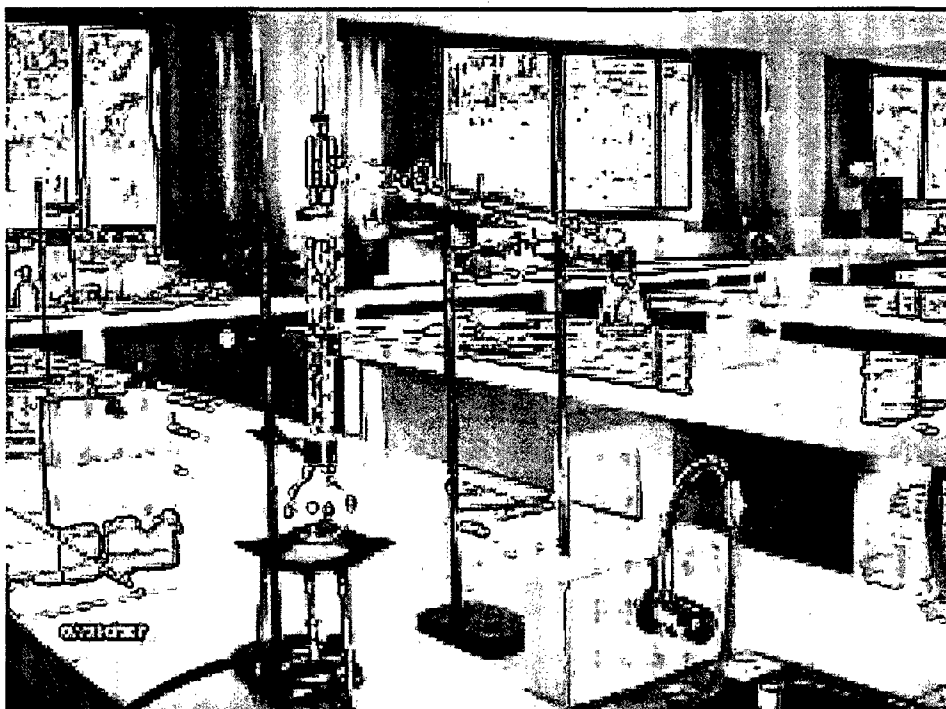


Tabla 18: Principales enfermedades de los vinos, cambios que se produce y causas que los originan. Calwana, (1991).

Enfermedades	Cambios observados	Causas
De la flor	<p>Desarrollo de telillas rugosas de color blanco grisáceo, crema o rosado en la superficie del vino.</p> <p>Oxidación del etanol con producción de anhídrido carbónico y agua.</p>	<p>Presencia de <i>Mycoderma vini</i>.</p> <p>Se presenta en vinos insuficientemente sulfatados, con baja graduación alcohólica y abundante sustancia nitrogenada.</p>
Picado o acetificación	<p>Desarrollo de una nata blanca gris con olor y sabor a vinagre.</p> <p>Oxidación parcial del etanol, con producción de ácido acético y agua.</p>	<p>Presencia de <i>Mycoderma aceti</i>.</p> <p>Se presenta en vinos insuficientemente sulfatados.</p>
De la vuelta o ribote	<p>El vino es blando, con gas, color desvaído, olor muy desagradable y pierde acidez fija.</p>	<p>Presencia de bacterias lácticas mutantes.</p> <p>Se presenta en vinos de baja acidez (especialmente en vinos de bayas y frutas diversas) almacenados a temperatura elevada.</p>
De la manita	<p>Transformación de los azúcares residuales: la levulosa a manita y la glucosa a ácido láctico y acético.</p>	<p>Presencia de bacilos lácticos <i>Bacterium gayonii</i>.</p> <p><i>Bacterium mannipoeum</i>.</p>
Picado láctico	<p>El vino se torna turbio, presenta olores desagradables y sabor ácido.</p> <p>Perdida de suavidad y calidad del vino.</p>	<p>Presencia de bacterias gráciles.</p> <p>Presencia de bacterias lácticas resistentes.</p>
Amargor del vino	<p>El vino adquiere un sabor amargo, olor butírico y pútrido.</p>	<p>Presencia de <i>Bacillus amaracrylus</i>.</p>

Tabla 19: Principales defectos de los vinos, cambios que se producen y causas que los originan. Calwana, (1991).

Defectos	Cambios observados	Causas
Quiebra oxidásica o quiebra parda	Se produce turbidez con una coloración parda en contacto con el aire, debido a la insolubilización de un aparte del tanino y la materia colorante.	Presencia de “enoxidasas”, pertenecientes a las polifenoloxidasas. Se presenta en vinos provenientes de uvas sobre maduras y podridas, en los que el azufrado ha sido insuficiente e inoportuno.
Quiebra férrica o quiebra blanca o gris	Formación de velo blanco o gris blanquecino o decoloración con enturbiamiento entre gris blanquecino y gris genuino. Formación de fosfato férrico, debido a la reacción entre el hierro en estado férrico con los fosfatos y la materia colorante.	Exceso de hierro en el mosto Contenido de hierro mayor o igual a 12 mg/L. Se presentan en vinos que permanecieron en contacto con utensilios de hierro durante las operaciones de elaboración.
Quiebra cúprica	Se produce turbidez. Produce turbidez acompañado de un sabor amargo intenso.	Ligero exceso de cobre (3 mg/hL).
Quiebra negra	Coloración verde azulado o negro azulado, debido a la formación de tanato férrico originado por la reacción del hierro en estado “ferro” con los tanatos en presencia de oxígeno	Exceso de hierro y presencia de oxígeno

APÉNDICE

1. Determinación de azúcares reductores en el jugo de naranja

Factor glucosa

En 10 mL de Fehling se gastó 12 mL de glucosa al 0,5 % p/v

$$\frac{0,5 \text{ g glucosa}}{100 \text{ mL solución de glucosa}} \times \frac{12 \text{ mL de solución de glucosa}}{10 \text{ mL Fehling}} = \frac{0,06 \text{ g glucosa}}{10 \text{ mL Fehling}}$$

Jugo de naranja

Vgastado = 1,8 ml jugo de naranja

$$\frac{10 \text{ mL Fehling}}{1,8 \text{ mL jugo naranja}} \times \frac{0,06 \text{ g glucosa}}{10 \text{ mL Fehling}} = \frac{0,033 \text{ g glucosa}}{\text{mL jugo naranja}}$$

$$\frac{0,033 \text{ g glucosa}}{\text{mL jugo naranja}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = \frac{33 \text{ g glucosa}}{\text{L jugo naranja}}$$

2. Determinación de azúcares reductores en la panela

V gastado = 45 mL de panela 1 % (p/v)

$$\frac{10 \text{ mL Fehling}}{45 \text{ mL panela}} \times \frac{0,06 \text{ g glucosa}}{10 \text{ mL Fehling}} = \frac{1,33 \times 10^{-3} \text{ g glucosa}}{\text{mL panela}} = \frac{1,33 \text{ g glucosa}}{\text{L panela}}$$

$$\frac{1,33 \text{ g glucosa}}{\text{L panela}} \times \frac{0,1 \text{ L panela}}{1 \text{ g panela}} \times \frac{1000 \text{ g panela}}{1 \text{ Kg panela}} = \frac{133,3 \text{ g glucosa}}{\text{kg panela}}$$

3. Concentraciones de azúcares reductores (35, 45 y 55)

Para 35 g/L de azúcares reductores

La naranja tiene 33 g/L de AR

35 g – 33 g = 2g de AR que debe aportar la panela

Sí 1000 g de panela ----- 133,3 g glucosa

X----- 2 g glucosa

X = 15 g de panela

Para 45 g/L de azúcares reductores

45 g – 33 g = 12g de AR que debe aportar la panela

Sí 1000 g de panela ----- 133,3 g glucosa

X----- 12 g glucosa

X = 90 g de panela

Para 55 g/L azúcares reductores

55 g – 33 g = 22g de AR que debe aportar la panela

Sí 1000 g de panela ----- 133,3 g glucosa

X----- 22 g glucosa

X = 165 g de panela

4. Determinación de biomasa

Técnica de empleo

- Se tomó la muestra a evaluar (dilución 10^{-2}) con la ayuda de una pipeta, se procedió a cargar la cámara neubauer.
- Se coló la cámara en la platina del microcopio y se observó la uniformidad de las células.
- Dependiendo del tamaño de las células a contabilizar, se escogió el cuadrante más adecuado.

Cámara neubauer

Se contó en el retículo de toma en 5 cuadraditos, obteniendo un promedio de 137 células

$$5 \times 137 = 685 \text{ células}$$

$$\text{Volumen} = 0,1 \text{ mm} \times 0,025 \text{ mm}^2$$

$$\text{Volumen} = 0,0025 \text{ mm}^3 = 2,5 \times 10^{-6} \text{ mL}$$

$$X = \frac{685 \text{ cél.}}{2,5 \times 10^{-6} \text{ mL}} \times \frac{1}{d} = \frac{685 \text{ cél.}}{2,5 \times 10^{-6} \text{ mL}} \times \frac{1}{10^{-2}} = 2,8 \times 10^8 \text{ cél./mL}$$

$$X = 2,8 \times 10^8 \text{ cél./mL}$$

5. Análisis físico – químico de bebida alcohólica de naranja

Determinación del grado alcohólico

Se determinó el peso específico del destilado usando el método del picnómetro. Se utilizó un picnómetro de 10 mL, se pesó el picnómetro en una balanza analítica; luego se pesó el picnómetro lleno con agua destilada y en seguida con la bebida alcohólica en examen. Al peso obtenido del picnómetro con agua y con el vino se le restó el peso del picnómetro vacío obteniéndose así el peso del agua y el peso del vino, respectivamente.

Se determinó la gravedad específica del vino de la manera siguiente:

$$SP = \frac{P'' - P}{P' - P}$$

Luego se determinó la densidad del vino de la manera siguiente:

$$D = SP \times D'$$

Donde:

SP = gravedad específica, 20 °C

P = peso del picnómetro vacío, g

P' = peso del picnómetro con agua, 20 °C

P'' = peso del picnómetro con vino, 20 °C

D = densidad del vino

D' = densidad del agua, 20 °C, 0,9982 g/mL.

$$SP = \frac{32,5518 - 23,0016}{32,7286 - 23,0016}$$

$$SP = 0,98182$$

$$D = 0,98412 \times 0,9982 \text{ g/mL}$$

$$D = 0,9823 \text{ g/mL}$$

El grado alcohólico se determinó usando la Tabla 20, expresado en % en volumen o en g/100 mL. Con el dato obtenido de gravedad específica de 0,98182, se usó la Tabla 20 y se obtuvo la lectura de la graduación alcohólica del vino de 14 % en volumen de etanol.

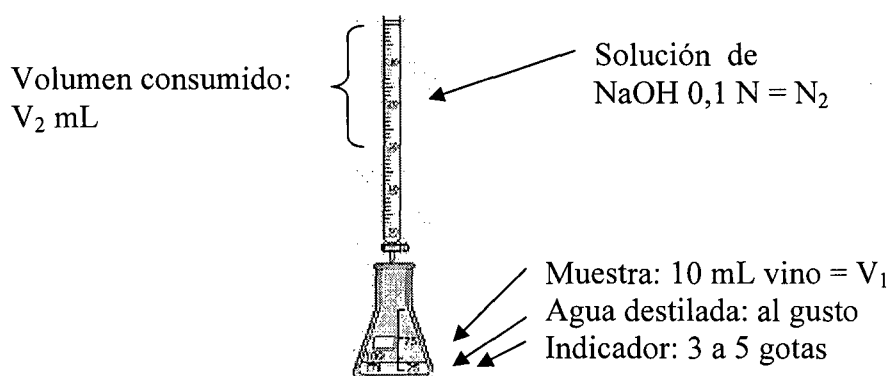
Tabla 20: Graduación de alcohol en % volumen, % peso y peso específico a 20 °C.

GRADUACIÓN	ALCOHOL % VOL	ALCOHOL % PESO	ALCOHOL g/100 mL	PESO ESPECÍFICO
0.0	0.00	0.00	0.00	1.00000
1.0	0.50	0.40	0.40	0.99925
2.0	1.00	0.79	0.79	0.99851
3.0	1.50	1.19	1.19	0.99777
4.0	2.00	1.59	1.59	0.99704
5.0	2.50	1.99	1.98	0.93330
6.0	3.00	2.39	2.38	0.99560
7.0	3.50	2.80	2.78	0.99490
8.0	4.00	3.19	3.18	0.99419
9.0	4.50	3.60	3.58	0.99350
10.0	5.00	3.99	3.97	0.99281
11.0	5.50	4.40	4.37	0.99214
12.0	6.00	4.80	4.76	0.99149
13.0	6.50	5.21	5.16	0.99084
14.0	7.00	5.61	5.56	0.99020
15.0	7.50	6.02	5.96	0.98956
16.0	8.00	6.42	6.35	0.98894
17.0	8.50	6.83	6.75	0.98832
18.0	9.00	7.23	7.14	0.98771
19.0	9.50	7.64	7.54	0.98771
20.0	10.00	8.04	7.93	0.98650
21.0	10.50	8.45	8.33	0.98590
22.0	11.00	8.86	8.73	0.98530
23.0	11.50	9.27	9.13	0.98471
24.0	12.00	9.67	9.52	0.98412
25.0	12.50	10.80	9.92	0.98354
26.0	13.00	10.49	10.31	0.98297
27.0	13.50	10.90	10.71	0.98239
28.0	14.00	11.31	11.11	0.98182
29.0	14.50	11.72	11.51	0.98127
30.0	15.00	12.13	11.90	0.98071
31.0	15.50	12.54	12.30	0.98015
32.0	16.00	12.96	12.69	0.97960

Fuente: (Amerine y Ough, 1924).

6. Determinación de la acidez total

- Pipetear 10 mL de vino a un matraz Erlenmeyer de 250 mL: V_1 mL
- Adicionar al matraz: 5 gotas del indicador fenolftaleína y aproximadamente 20 mL de agua destilada.
- Llenar la bureta de 50 mL con solución de NaOH 0,1 N
- Titular la muestra hasta aparición de color grosella.
- Leer y anotar el consumo de NaOH: V_2 mL



Resultados

- Volumen de muestra: $V_1 = 10$ mL
- Volumen de NaOH consumido: $V_2 = 11,9$ mL
- Concentración de NaOH (leer normalidad de etiqueta del frasco): $N_2 = 0,085$ N
- Normalidad de la muestra: N_1 (incógnita)
- Ecuación: $N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$
- $N_1 = N_2 \cdot V_2 / V_1$: equiv. ácido cítrico/L vino
 $N_1 = (0,085 \text{ N})(11,9 \text{ mL}) / 10 \text{ mL}$
 $N_1 = 0,1012$ equiv. ácido cítrico/L vino
- Para convertir a gramos de ácido cítrico/L vino:

$$N_1 \text{ (equiv./L)} \times \frac{\text{Peso molecular ácido cítrico (g)}}{\text{Factor del ácido cítrico (equiv.)}} = C \frac{\text{g ácido cítrico}}{\text{L vino}}$$

$$0,1012 \text{ equiv./L} \times \frac{193 \text{ g}}{3 \text{ equiv.}} = 6,5105 \frac{\text{g ácido cítrico}}{\text{L vino}}$$

h. Densidad del vino = 0,9823 g/mL = 982,3 g/L

i. % de acidez total:

$$\% \text{ acidez total} = \frac{\text{g ácido cítrico/L vino}}{\text{Densidad del vino en g/L}} \times 100$$

$$\% \text{ acidez total} = \frac{6,5105 \text{ g ácido cítrico/L vino}}{982,3 \text{ g vino/L vino}} \times 100$$

$$\% \text{ acidez total del vino} = 0,6628$$

7. Determinación de cloruros

- Medir 10 mL de vino (V_1) y depositarlo en un matraz de 250 mL.
- Agregar 5 gotas de K_2CrO_4 al 5 % (sirve como indicador), la muestra se torna amarilla transparente.
- Titular la muestra con solución acuosa de $AgNO_3$ 0,0171N (N_2).
- Tan luego cae la primera gota del agente titulante a la muestra, se forma un precipitado blanco, pero debido al indicador se ve amarillo.
- Se continúa la titulación hasta la aparición de un precipitado rojo ladrillo. Anotar el volumen consumido (V_2).

Resultados

a. $N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$

$$N_1 = (0,0171 \text{ N})(2,4 \text{ mL})/10 \text{ mL}$$

$$N_1 = 4,104 \times 10^{-3} \text{ equiv. NaCl/L vino}$$

b. Conversión a g/L:

$$4,104 \times 10^{-3} \frac{\text{equiv. NaCl}}{\text{L vino}} \times \frac{58,5 \text{ g NaCl}}{1 \text{ equiv. NaCl}} = 0,24 \text{ g NaCl/L vino}$$

8. Determinación de la acidez acética

Se procede de manera similar a la determinación de la acidez total, pero el resultado se expresa en función del ácido acético (CH_3COOH)

Resultados

a. Volumen de vino: $V_1 = 50 \text{ mL}$

b. Volumen de NaOH consumido: $V_2 = 28 \text{ mL}$

c. Concentración de NaOH (leer normalidad de etiqueta del frasco): $N_2 = 0,02 \text{ N}$

d. Normalidad de la muestra: N_1 (incógnita)

e. Ecuación: $N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$

f. $N_1 = N_2 \cdot V_2/V_1$: equiv. ácido acético/L vino

$$N_1 = (0,02 \text{ N})(28 \text{ mL})/50 \text{ mL}$$

$$N_1 = 0,0112 \text{ equiv. ácido acético/L vino}$$

g. Para convertir a gramos de ácido acético/L vino:

$$N_1 \text{ (equiv./L)} \times \frac{\text{peso molecular ácido acético (g)}}{\text{factor del ácido acético (equiv.)}} = C \frac{\text{g ácido acético}}{\text{L vino}}$$

$$0,0112 \text{ equiv./L} \times \frac{60 \text{ g}}{1 \text{ equiv.}} = 0,672 \frac{\text{g ácido acético}}{\text{L vino}}$$

FORMATO TEST ESCALA HEDÓNICA

Nombre:.....Fecha:.....Hora:.....

Producto: Bebida alcohólica de naranja (tipo vino)

Por favor pruebe cada una de las muestras y califique usted el Color, Sabor, Olor y

Aspecto de acuerdo a la siguiente escala:

- Me gusta muchísimo = 9
- Me gusta mucho = 8
- Me gusta moderadamente = 7
- Me gusta ligeramente = 6
- No me gusta ni me disgusta = 5
- Me disgusta ligeramente = 4
- Me disgusta moderadamente = 3
- Me disgusta mucho = 2
- Me disgusta muchísimo = 1

Muestra	Color	Sabor	Olor	Aspecto
1
2
3

Comentarios:.....

.....