UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRIGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS

FACULTAD DE INGENIERIA

ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE

INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

TESIS

Para obtener el Título Profesional de:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

"Optimización de los parámetros de concentración de inóculo de la cepa MIT-L51 *(Saccharomyces cereviseae)*, cantidad de sacarosa y tiempo de fermentación, en la obtención de una bebida alcohólica a partir de zumo de limón dulce *(Citrus limettioides)*, proveniente del distrito de la Peca, provincia de Bagua, región Amazonas"

AUTORES: **Br. Joel Jesús Mendoza Rojas**

Br. José Elferes Sánchez Torres

ASESOR: **Ms. C. Julio Mariano Chávez Milla**

Amazonas – Perú

2010

DEDICO ESTA TESIS

Con mucho cariño principalmente a mis padres:

ALFONSO MENDOZA LINGAN y **LIDUVINA ROJAS TAFUR**, que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento al encontrarse siempre cuando más los necesité; gracias por todo por darme una carrera para mi futuro, por creer en mí y permitirme hoy ser un **Ingeniero**.

En especial para mis hermanos:

WALTER MENDOZA ROJAS, pronto a finalizar la facultad de Derecho y Ciencias Políticas y así obtener el Título de Abogado, por ser la fuente de ahínco y motivación para superarme cada día más quien ha sido sostén y apoyo siempre y así poder luchar para que la vida nos conceda un futuro mejor y;

Dedico también este éxito académico a mi hermanita:

JOCELYN JAZMIN MENDOZA ROJAS, a mantener una visión de éxito mediante el estudio continuo.

Finalmente a todos mis:

Familiares, amigos, compañeros y a todas aquellas personas, quien con su amor y apoyo me brindaron fortaleza necesaria para alcanzar el sueño y una meta mas en mi vida.

Hay libros que se han escrito para que la gente aprenda; y hay otros, como éste, que se han escrito para demostrar que su autor ha aprendido algo.

JOEL JESUS.

DEDICO ESTA INVESTIGACIÓN

A Dios por permitirme terminar esta etapa tan importante en mi vida; a mis padres: ANTONIO y DELICIA por su apoyo incondicional y por transmitirme la fuerza para seguir adelante. A mis hermanos por su apoyo y permitir que me supere en la vida. También a mis demás familiares y amigos por su aliento emocional hacia el logro de esta meta.

JOSE ELFERES.

AGRADECIMIENTOS

Se hace referencia el agradecimiento especial al Ms. C Julio Mariano Chávez Milla, asesor de la presente tesis por la dirección y el apoyo desinteresado en la dirección de la ejecución de la tesis y le revisión de los borradores y revisión final del presente informe.

Se hace también agradecimiento a los demás docentes de la Universidad por permitir aplicar dentro de esta investigación nuestros conocimientos adquiridos y facilitar la utilización de los equipos e infraestructura de nuestra universidad.

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRIGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS

VICENTE MARINO CASTAÑEDA CHAVEZ Ph. D., Dr. Hab.

Rector

Ms. C. MIGUEL ANGEL BARRENA GURBILLON

Vicerrector académico

Dra. FLOR TERESA GARCIA HUAMAN

Vicerrector administrativo

ING. GUILLERMO IDROGO VASQUEZ

Decano de la Facultad de Ingeniería

ING. MIGUEL ANGEL GARCIA TORRES

Director de la Facultad de Ingeniería

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS

El docente de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas que suscribe, hace constar que ha asesorado la realización de la tesis titulada: **Optimización de los parámetros de concentración de inóculo de la cepa MIT-L51 *(Saccharomyces cereviseae)*, cantidad de sacarosa y tiempo de fermentación, en la obtención de una bebida alcohólica a partir de zumo de limón dulce *(Citrus limettioides)*, proveniente del distrito de la Peca, provincia de Bagua, región Amazonas.** De los tesistas egresados de la escuela académico profesional de Ingeniería Agroindustrial perteneciente a la Facultad de ingeniería de esta Universidad.

Br. Joel Jesús Mendoza Rojas

Br. José Elferes Sánchez Torres

El docente que suscribe da el visto bueno al informe final de la tesis antes mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el jurado evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de las observaciones dadas para su posterior sustentación.

Chachapoyas, 26 de noviembre del 2010

Ms. C. JULIO MARIANO CHAVEZ MILLA

Profesor Asociado de la UNAT-A

JURADO EVALUADOR

ING. EFRAIN MANUELITO CASTRO ALAYO

PRESIDENTE

Ms. C. ARMSTRONG BARNARD FERNANDEZ JERI

SECRETARIO

ING. ERICK ALDO AUQUIÑIVIN SILVA

VOCAL

TABLA DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN.....01

II. MATERIALES Y MÉTODOS.....07

2.1. Obtención del material biológico.....07

2.1.1. Obtención del zumo de limón dulce.....07

- Acidez titulable.....07
- Índice de madurez.....07
- Sólidos solubles totales.....07
- Contenido de zumo.....08
- Humedad.....08
- Porcentaje de extracto seco.....08

2.1.2. Preparación del inóculo.....08

a. Siembra y cultivo de la cepa.....08

b. Producción de biomasa y obtención de inóculo.....08

c. Recuento de levaduras.....09

2.2. Optimización del proceso de fermentación.....09

2.3. Preparación del mosto.....10

2.3.1. Selección de la materia prima.....11

2.3.2. Lavado.....11

2.3.3. Pelado.....11

2.3.4. Extracción.....11

2.3.5. Filtrado I.....11

2.3.6. Pasteurización I.....11

2.3.7. Suplementación del mosto de limón dulce.....12

2.3.8. Corrección del pH.....12

2.3.9. Adición del inóculo.....12

2.3.10. Adición de nutrientes.....13

2.3.11. Sulfitado.....13

2.4. Fase pre-fermentativa.....13

2.4.1. Acondicionamiento de los biorreactores.....13

2.4.2. Adición del mosto inoculado o medio base.....13

2.5. Fase fermentativa.....14

2.5.1. Evaluación de parámetros (control diario).....14

a. Determinación de sólidos solubles totales (° Brix).....14

b. Determinación del pH.....14

c. Determinación de la densidad.....14

2.6. Fase post-fermentativa.....14

2.6.1. Pasteurización II.....15

2.6.2. Trasiego.....15

2.6.3. Clarificación.....15

2.6.4. Embotellado.....15

2.7. Análisis fisicoquímico del mosto de limón dulce.....15

2.7.1. Determinación del grado alcohólico.....15

2.7.2. Porcentaje de extracto seco.....16

2.8. Análisis estadístico.....16

III. RESULTADOS.....17

IV. DISCUSION.....29

V. CONCLUSIONES.....32

VI. RECOMENDACIONES.....33

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....34

VIII. ANEXOS.....38

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 01 Variables en estudio con sus niveles respectivos.....09
Tabla N° 02 Esquema del Diseño de Box-Benhken.....10
Tabla N° 03 Análisis bromatológico del zumo de limón dulce.....17
Tabla N° 04 Condiciones de operación en los 15 biorreactores diseñados para la presente investigación.....17
Tabla N° 05 Concentración de etanol de cada uno de los biorreactores en función de la concentración de microorganismos, azúcar y tiempo.....18
Tabla N° 06 Coeficientes de regresión obtenidos con Statgraphics Plus V. 5.1; a partir de los datos de la tabla N° 05, para la concentración de etanol (g/L).....19
Tabla N° 07 Análisis de varianza (ANOVA) para la concentración de etanol (g/L) en función de la concentración de inóculo, azúcar y tiempo.....20
Tabla N° 08: Valores óptimos de las variables independientes del proceso Fermentativo (maximizar).....20
Tabla N° 09 Valores óptimos de las variables independientes del proceso fermentativo (minimizar).....21
Tabla N° 10 Ruta ascendente para la concentración de etanol (g/L).....21
Tabla N° 11 Condiciones de operación del proceso fermentativo para la producción de vino de limón dulce con la mayor concentración de etanol (g/L).....25
Tabla N° 12 Control diario de la fermentación alcohólica en la obtención del vino de limón dulce con la mayor concentración de etanol.....25
Tabla N° 13 Resultados del Análisis sensorial obtenidos.....27
Tabla N° 14 Comparación del análisis organoléptico del vino de limón dulce.....28
Tabla N° 15 Graduación del alcohol en volumen, peso y peso específico a 20°C/20°C.....48
Tabla N° 16 Principales enfermedades de los vinos, cambio que se produce y causas que los originan. 49
Tabla N° 17 Principales defectos de los vinos, cambios que se producen y causas que los provocan.....50

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Superficie respuesta de concentración de etanol (g/L) en función de inoculo azúcar (tiempo: 6,0 días). Máximo de 151,717g/L vino de limón dulce.....22

Figura 2. Contornos de superficie de la respuesta estimada de concentración de etanol (g/L) en función de Inóculo azúcar (tiempo: 6 días). Máximo de 151,717g/L vino de limón dulce.....22

Figura 3. Superficie respuesta estimada de Concentración de etanol (g/L) en función de Azúcar - tiempo (inóculo: 150 mL/L). Máximo de 151,717g/L vino de limón dulce.....23

Figura 4. Contornos de Superficie de la respuesta estimada de Concentración de etanol (g/L) en función de Azúcar - tiempo (inóculo: 150 mL/L). Máximo de 151,717g/L vino de limón dulce.....23

Figura 5. Diagrama de bloques del proceso de obtención de la bebida alcohólica a partir del zumo de limón dulce 24

Figura 6. Variación de los grados Brix con respecto al tiempo de fermentación Alcohólica.....26

Figura 7. Variación del pH con respecto al tiempo de fermentación alcohólica.....26

Figura 8. Variación de la densidad durante el periodo de fermentación.....27

INDICE DE FOTOGRAFIAS

Fotografía 1. Materia prima que se utilizó en el proceso de obtención de la bebida fermentada.....50

Fotografía 2. Operación de pelado del limón dulce.....50

Fotografía 3. Operación de extracción del jugo de limón dulce.....51

Fotografía 4: Obtención del cultivo de la cepa de *Saccharomyces cereviseae*.....51

Fotografía 5. Obtención del inóculo de *Saccharomyces cereviseae*.....52

Fotografía 6. Instalación de los biorreactores en la incubadora.....52

Fotografía 7. Control diario de los parámetros de fermentación.....53

Fotografía 8. Medida de la acidez titulable.....53

RESUMEN

La investigación que a continuación presentamos, estudió las posibilidades de elaboración de una bebida alcohólica fermentada a partir del zumo de limón dulce (*Citrus limettioides)* y optimizar ciertos parámetros importantes en la obtención de dicha bebida.

Las variables en función de las cuales se trabajo fueron: concentración de inóculo, cantidad de sacarosa (azúcar comercial) y tiempo de fermentación. La variable respuesta fue la concentración de etanol durante la producción de la bebida alcohólica fermentada, empleando como agente fermentativo un cultivo de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* variedad ellipsoideus MIT L-51. Los niveles de las variables evaluadas fueron 50, 100, 150 mL/L de inóculo, cantidad de azúcar 150, 200 y 250 g/L y 2, 4, 6 días como tiempo de fermentación. Para el análisis de los datos fue necesario utilizar un diseño experimental fraccional de Box-Benhken, el cual nos permitió obtener superficies de respuesta para el rendimiento de etanol usando los coeficientes de regresión previamente determinados. Los cálculos y gráficos estadísticos fueron ejecutados con el Software Statgraphics Plus V.5.1

El producto de la optimización de las variables para obtener una máxima concentración alcohólica de (151,717 g de etanol/L de vino o 19,22 % vol.) fue de 150 mL/L de inóculo, 250 g/L de azúcar y 6 días de fermentación. Una vez obtenido el vino se procedió a someter a una evaluación sensorial donde se verifico que se puede obtener una bebida alcohólica con aceptables características organolépticas.

ABSTRACT

The investigation that later we sense beforehand, studied the possibilities of production of an alcoholic drink fermented from the juice of sweet lemon (*Citrus limettioides*) and to optimize certain important parameters in the obtaining of the above mentioned drink.

The variables depending on which I work were: concentration of inóculo, quantity of saccharose (commercial sugar) and time of fermentation. The variable response was the concentration of ethanol during the production of the alcoholic fermented drink, using as agent fermentativo a culture of yeasts of Saccharomyces cereviseae variety ellipsoideus MIT L-51. The levels of the evaluated variables were 50, 100, 150 mL/L of inóculo, quantity of sugar 150, 200 and 250 g/L and 2, 4, 6 days as time of fermentation. For the analysis of the information it was necessary to use an experimental design Box-Benhken's fraccional, which allowed us to obtain surfaces of response for the performance of ethanol using the before certain coefficients of regression. The calculations and statistical graphs were executed by the Software Statgraphics Plus V.5.1

The product of the optimization of the variables to obtain a maximum alcoholic concentration of (151,717 g/L) was of 150 mL/L of inóculo, 250 g/L of sugar and 6 days of fermentation. Once obtained one proceeded the wine to submit to a sensory evaluation where I check that it is possible to obtain an alcoholic drink with acceptable characteristics organolépticas.

I. INTRODUCCION

El cultivo de los cítricos en la región Amazonas se localiza casi en todas las zonas productoras que abarca el territorio regional, pues existen diferentes cítricos que se adaptan muy bien a los climas tropicales existentes en estas provincias, los cultivos que más destacan son naranja criolla (*C. sinensis* L Osbeck), además de las variedades Valencia, Huando, Washington Navel, etc. Limas (*C. limetta*), cultivos de limón (*C. aurantifolia*) con su variedad sutil y cultivos de limón dulce (*C. limettioides*).

En nuestra región la producción de cítricos es conocida, la misma que en su mayoría se desperdicia al no aprovecharlo del propio árbol y una cantidad se destina al consumo en fresco. Sin embargo razones económicas y de mercado indican la necesidad de estudiar nuevas alternativas para su industrialización, la misma que nos permita la oferta de nuevos productos e impliquen la disminución de las perdidas postcosecha que actualmente son altos. Además los costos de producción de limón dulce son altos pues los precios en los mercados locales oscilan entre los S/. 0,30 y 0,40 por kilogramo, los mismos que disminuyen los incentivos para el incremento de áreas dedicadas a este cultivo. Una posibilidad para tal fin es la transformación del zumo del limón dulce (*C. limettioides*) en una bebida alcohólica fermentada con aceptables características organolépticas llamado "Vino de Limón dulce" (ITDG-Perú. 2002)

Las partes del fruto del limón dulce se divide en: flavedo (tejido externo), albedo (debajo del flavedo) y endocarpio; este último es el más importante ya que conforma la parte comestible de los cítricos y está formado por los carpelos o gajos separados por las membranas intercarpelares, las mismas que contienen el zumo del limón dulce. Los productos industriales más importantes derivados de los cítricos son: el zumo natural envasado, zumo natural refrigerado, zumo concentrado congelado, zumo concentrado Sulfitado y bebidas de cítricos edulcorados. (Primo, E. 1998)

También es conocido en estos frutos la presencia de una sustancia amarga llamada limonina se le conoce además como limonoato D-anillo-lactona y acído limonoico di-delta-lactona el cual disminuye el uso extenso de algunos cítricos y a nivel industrial dificulta el procesamiento de los productos ya que esta sustancia está presente

en las membranas intercarpelares y en los tejidos de las cedillas, lo cual pasa al zumo al desintegrarlos y tamizarlo. (Primo, E. 1998) En un proceso fermentativo es de esperar que durante la maduración del vino obtenido tienda a desaparecer este sabor amargo y obtener un producto con aceptables características organolépticas. (Kolb, E. 2002)

La mayor parte del vino se elabora a partir de las uvas y a menos que se especifique otra fuente, la palabra vino se refiere al producto obtenido de la fermentación del jugo de la uva. La producción de vino de frutas es muy similar al caso de vino de uvas, pues solo con la diferencia que siempre se tendrá que agregar azúcar para lograr un vino acabado con 11 a 13% de alcohol, estos vinos se estabilizan con facilidad y garantizan una larga vida útil del producto. (Delanöe D, 2003)

La asociación de productores de Sidra y vinos de frutas de la Unión Europea, definen a los vino de frutas de la siguiente manera: bebida alcohólica obtenida por la fermentación parcial o completa de jugos o zumos frescos, concentrado o reconstituido de frutas comestibles distintos de la uva con adición de agua, azúcar o miel. Finalizada la fermentación se puede adicionar zumo fresco, concentrado o reconstituido, el contenido alcohólico de los vinos de frutas tiene que hallarse entre 8 a 14% (g/100 mL). Pueden ser sin carbonatar o carbonatados por la inyección de CO_2 u por fermentación secundaria. (Arthey, D. 1997)

Existen antecedentes bibliográficos que datan de muchos años acerca de la obtención de productos derivados de los cítricos, entre ellos vinos de pomelo y naranja. En el cual consideran la importancia de un cuidadoso control del proceso de elaboración de este vino. Actualmente existen trabajos en la elaboración de cítricos que provienen de Turquía y otros países Asiáticos (China, Japón y Corea), donde analizan el aislamiento e identificación de levaduras para producir vino de naranja; así como estudios sobre los componentes del flavor en vinos de cítricos y el efecto del color de las botellas sobre el amarronado de los vinos. (Ferreira, M *et al.* 2009)

La transformación de azucares en etanol es el proceso básico en la producción de vino, pero también existen otras reacciones secundarias que pueden llegar a ser muy importantes. Su importancia radica sobre todo a sus aportaciones cualitativas al vino, ya que pueden contribuir favoreciendo (producción de glicerol, esteres, alcoholes

superiores, etc.) o perjudicando (producción de acido acético, sulfhídrico o acetato de etilo) el producto final. (Torija, M, J *et al.* 2002). 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 el segundo grupo se encuentran las proteasas, las fosfatasas, oxidasas y reductasa (Ribéreau – Gayón, P *et al.* 2003)

La temperatura que se lleva a cabo la fermentación alcohólica afecta en los siguientes aspectos: Al crecimiento de las levaduras y por tanto la duración de la fermentación, a la contribución que las levaduras tienen a la fermentación y al metabolismo de las levaduras que es el que determina la composición química y organoléptica del vino. De hecho las temperaturas de fermentación pueden estar en el rango de 15 a 35°C; pero los valores extremos de temperatura afectan, de manera que a altas temperaturas se obtiene una baja producción de etanol a cambio de la obtención de productos de la fermentación gliceropiruvica. Las fermentaciones a bajas temperaturas son bastante problemáticas ya que pueden producirse paradas en el proceso fermentativo y disminuir la velocidad fermentativa así como la aparición de productos que perjudican la calidad final del vino. (Torija, M, J *et al.* 2002). Por lo tanto es recomendable considerar que la temperatura no debe exceder del rango de 20°C a 22°C, para permitir el máximo desarrollo de esteres y ácidos orgánicos en el vino y es muy importante controlar durante el proceso fermentativo ya que como la fermentación es un proceso de reacción exotérmica, fácilmente puede incrementarse la temperatura (Kolb, E. 2002).

Si bien es cierto que existen algunas investigaciones sobre la producción de vinos a partir del zumo de cítricos, la información sobre variables tecnológicas, cepas de levaduras usadas y características fisicoquímicas y sensoriales de los productos aún es muy superficial. (Ferreira, M *et al.* 2009). Más recientemente se han recopilado prácticas artesanales; así como algunos aspectos industriales sobre la producción de bebidas similares al vino a partir de otras frutas, pero concretamente a partir de zumo de limón dulce aún es desconocido, incluso sobre vino de otros cítricos como naranja, mandarina es poco lo que explica. Destaca además que al igual que el jugo de piña, los cítricos presentan cantidades considerables de acido cítrico, el cual impide una buena fermentación ya que este acido puede ser metabolizado por diversas bacterias e incrementar con ello la cantidad de acidez volátil. (Kolb, E. 2002).

El bajo contenido en azúcar en las frutas hace necesario suplementar con sacarosa (chaptalización), hasta una concentración de azucares fermentecibles del 22-25%. Si bien el uso de mostos con concentraciones cada vez mayores de azúcar permite obtener una producción de etanol por encima de 13%, tanto la presión osmótica como el alto contenido de alcohol tienden a inhibir la fermentación. La concentración de azúcar determina en primer lugar las altas presiones osmóticas producidas por soluciones azucaradas mayores al 25% en peso, pueden inhibir el crecimiento celular en las fases iniciales de la fermentación o que las células del fermento sufran plasmólisis y perecer. En segundo lugar ya que el alcohol es un desinfectante, concentraciones superiores en peso, matarían las levaduras. (Beltrán, C. Carvajal, L 1995).

Los zumos de la mayor parte de las frutas son relativamente deficientes en componentes nitrogenados, por lo que se le añaden nutrientes como fosfato diamónico, sulfato de amonio o carbonato amónico a concentraciones de 100 - 300 mg/L, aunque algunos recomiendan adición de urea, a concentraciones de 500 mg/L. También pueden añadirse hidrolizados de levadura para proporcionarles vitaminas y esteroles (Arthey, D. 1997). Además para la obtención de vino de naranja criolla se suplemento 178,8 mg/L de sulfato de amonio obteniendo una bebida alcohólica con aceptables características organolépticas (Cueva H, Huayama P, 2007).

La fermentación del zumo de frutas puede llevarse a cabo de un modo natural, mediante la acción metabólica de las levaduras y bacterias presentes en la fruta en el momento de proceder a su recolección, que luego son transferidos desde ellas hasta el zumo extraído. Pero el inconveniente sucede cuando existe la posibilidad de contaminación con otros microorganismos en las demás etapas. Por tal razón se recomienda someter el zumo a una pasteurización y adición de bisulfito de sodio a concentraciones del 30 – 150 mg/L, donde permita eliminar la presencia de todos los microorganismos existentes. Solo que luego se deberá añadir una concentración de levaduras seleccionadas (Arthey, D. 1997). La necesidad de asegurar la fermentación y la calidad del producto, ante el hecho de que existen un gran número de variables que intervienen en una fermentación, ha favorecido que el uso de inóculos comerciales se haya convertido en una práctica habitual en enología. La adición de inóculos comerciales permite un rápido inicio de la fermentación y un consumo total de azucares

fermentables, reduciendo los posibles problemas de fermentación. Además permite un mayor control biológico lo que no es posible en fermentaciones naturales o espontáneas (Torija, M, J *et al.* 2002).

Las levaduras son definidas como hongos unicelulares que se reproducen por brotación o por escisiparidad. Algunos hongos pluricelulares cuyo ciclo biológico incluye un estadio unicelular, están incorporados a las levaduras. Grupo complejo y heterogéneo, las levaduras se encuentran en tres clases de hongos, caracterizados por su modo de reproducción: los ascomicetos, basidiomicetos y los hongos imperfectos. Pero las levaduras de las uvas y del vino pertenecen solamente a los ascomicetos y hongos imperfectos (Ribéreau – Gayón, P *et al.* 2003). Las levaduras son hongos microscópicos de constitución muy sencilla. A grandes aumentos (10X, 40X, etc.) aparecen como células redondas, ovaladas o elípticas, rodeadas por una delicada envoltura elástica, su diámetro es solo 0,004 a 0,014 mm; contiene una masa incolora, frecuentemente de espacio granuloso que es el protoplasma, en cuyo interior posee unos espacios huecos llamados vacuolas (Beltrán, C. Carvajal, L 1995).

Saccharomyces cereviseae es la especie de levaduras usada por excelencia para la obtención de vinos y etanol a nivel industrial y a pequeña escala, pues ya que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azucares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior (Carballo, F. 2000)

Teóricamente se puede obtener a partir de un gramo de glucosa 0,511 g de etanol. Cuando se fermentan sustratos puros, el rendimiento es del 95% y se reduce al 91% cuando se utilizan materias primas grado industrial; 100 gramos de glucosa pura producirán 48,4 gramos de etanol, 46,6 gramos de CO_2, 3,3 gramos de glicerol y 1,2 gramos de biomasa (células de levadura). Las levaduras usualmente demuestran un rendimiento de etanol de 0,42g de etanol/g de glucosa bajo condiciones ideales a partir de xilosa (Karimi, *et al.*2006).

Al final del proceso fermentativo, el vino se separa de las heces para eliminar tanto los sólidos de frutas como las levaduras autolisadas. El vino joven no suele haber desarrollado un bouquet definitivo y requiere una maduración antes de su envasado. La maduración de los vinos de fruta se suele llevar a cabo a temperaturas de 7 – 15°C; tras uno o dos meses, se suele trasegar de nuevo. Durante la maduración, tiene lugar una fermentación malo-láctica secundaria, pero solo a las temperaturas de maduración más altas. Esta fermentación secundaria convierte los ácidos málico y cítrico en láctico y citromálico, respectivamente (Arthey, D. 1997).

Las enfermedades y defectos de los vinos, están ligados a la deficiencia en la extracción del zumo, 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 y químicos que discurren en el vino al captar sustancias extrañas que se manifiestan en variaciones indeseables de aspecto, color y sabor (Cueva H, Huayama P, 2007).

Aparte de la producción de una bebida fermentada a partir del zumo de limón dulce se puede obtener jugos en conserva, jaleas, mermeladas. Su cascara es rica en pectinas y es muy importante en la industria alimentaria. (Arthey, D. 1997)

La presente investigación tuvo como objetivo la obtención de una bebida alcohólica a partir del zumo de limón dulce *(Citrus limettioides)* empleando distintas concentraciones de inóculo de la cepa MIT-L51 *(Saccharomyces cereviseae)*, cantidades de azúcar y tiempo de fermentación alcohólica, los mismos que nos permitan obtener una bebida alcohólica con aceptables características organolépticas. Además de su cumplimiento con las normas peruanas de producción de vinos tanto en concentración como en rendimiento de etanol. Para tal fin se utilizo un diseño de Box-benhken, el cual permitió determinar las cantidades óptimas de las variables en estudio.

II. MATERIALES Y METODO

2.1. Obtención del material biológico

2.1.1. Obtención de materia prima

La materia prima se obtuvo de las zonas agrícolas pertenecientes al distrito de la Peca, en la provincia de Bagua.

2.1.2. Obtención del zumo de limón dulce

El procesamiento del limón dulce fue basado en las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), donde se seleccionó las frutas obtenidas y luego se realizó un lavado con una solución desinfectante.

Los análisis realizados se basaron en las Normas Técnicas Peruanas existentes para el tratamiento de alimentos.

- **Acidez titulable (AT)**

  La determinación de la acidez se realizó mediante el método de titulación con una solución de NaOH (previamente estandarizada) de 0.1N de concentración y usando fenolftaleína como indicador. Se expresa como porcentaje de acido cítrico. Anexo 1

- **Índice de madurez (IM)**

  El índice de madurez se obtuvo a partir de la relación existente entre la cantidad de sólidos solubles totales y el valor de la acidez titulable. Anexo 1. (Primo, E. 1998).

- **Sólidos solubles totales**

  Puesto que los sólidos solubles totales no solo es sacarosa sino también existen otros azucares, ácidos y sales, el zumo de los cítricos no equivale a una concentración de sólidos disueltos de 1 g/100 mL. Una mayor aproximación a la verdadera concentración se obtiene con los llamados Brix corregidos. Anexo 1. (Primo, E. 1998)

- **Contenido de zumo**

Para determinar el contenido de zumo, se realizó una extracción de zumo de los frutos, se midió en una probeta de vidrio de 100 mL y se peso el mismo en una balanza digital. El peso del jugo extraído se relaciono con el peso del fruto entero y el resultado obtenido se expresa en (%), anexo 1. (Rivera, J. 2006).

- **Humedad. Método gravimétrico de la estufa**

Se basó en el método gravimétrico de la estufa, se basa en la pérdida de peso que experimenta una muestra por calentamiento, hasta la obtención de un peso constante.

El procedimiento fue de la siguiente manera en un vaso de precipitación tarado, se colocó 20 g de zumo de limón dulce y se llevo en la estufa hasta 105°C por espacio de 2 horas, se deja enfriar en un desecador y se pesó. Anexo 1. (Castro W, Castro E. 2006)

- **Porcentaje de extracto seco**

Se obtuvo mediante la diferencia entre 100 y el porcentaje de humedad. Anexo 1. (Castro W, Castro E. 2006)

2.1.3. Preparación del inoculo

a. Siembra y cultivo de la cepa

Se utilizó un cultivo puro y aislado de la cepa *Saccharamyces cerevisiae* Var. Ellipsoideus MIT L-51, procedente del laboratorio de Bioquímica y microbiología. Anexo 2.

b. Producción de biomasa y obtención del inoculo

Una vez obtenido nuestro cultivo joven se procedió a inocular en nuestro medio de producción de biomasa que consta en un balón de 3 L de capacidad y luego se somete a una incubación a 35 °C ayudado por un agitador magnético para permitir la adición de oxígeno. Anexo 3.

c. **Recuento de levaduras**

Mediante una cámara de Neubauer se pudo determinar la concentración de levaduras que se aplicaron a los cultivos bases de la fermentación. Anexo 4.

2.2. Optimización del proceso de fermentación

Para la obtención de una buena fermentación existen diversas variables, sin embargo, se han considerado más importantes aquellas variables que nos permiten obtener mayor rendimiento de etanol y aquellas que son más económicas para su aplicación. Dentro de estas variables son la concentración de inoculo, cantidad de azúcar y el tiempo de fermentación, las mismas que una vez optimizadas nos permiten su aplicación a mayor escala.

Para conocer la optimización de estas variables se aplicó un diseño de box – benhken y teniendo los datos de concentración de etanol, se procede a realizar el análisis estadístico para determinar los valores óptimos de las variables.

Variables de estudio

- **Variables independientes**

Tabla N° 01. Variables en estudio con sus niveles respectivos

Código	Variables	Niveles	Código
A	Concentración de inóculo	150 mL/L 100 mL/L 50 mL/L	+ 0 -
B	Concentración de azúcar	250 g/L 200 g/L 150 g/L	+ 0 -
C	Tiempo de fermentación	6 4 2	+ 0 -

- **Variable respuesta**

Rendimiento de etanol (g/L)

Diseño experimental de Box-benhken

Este tipo de diseño está comprendido dentro de los diseños de superficie de respuesta el cual permite la utilización de 3 factores o variables utilizando menos corridas que los diseños clásicos; además existen solo 3 niveles en cada factor o variable (-1, 0, 1) ó (-, 0, +)

Cada columna representa una variable independiente (A, B, C) y cada fila un tratamiento. Los elementos +, 0, -, representan la concentración o niveles alto, medio, bajo de cada variable.

Tabla N° 02. Esquema del Diseño de Box-Benhken

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

Los caracteres +, 0, - significan: + nivel alto, 0 nivel medio y – nivel bajo de las variables independientes

2.3. Preparación del mosto

Para la optimización de las variables que influyen más en la concentración de etanol, como son: concentración del inoculo, cantidad de azúcar y tiempo de fermentación; se siguió el siguiente procedimiento.

2.3.1. Selección de la materia prima

Para la selección de la fruta se tuvo en cuenta los siguientes aspectos: daño por la acción mecánica y grado de contaminación; además se verificó el índice de madurez mediante las fórmulas detalladas en la parte 2.1.1. Esta operación se lleva a cabo en una mesa de trabajo que está cubierta de mayólica y ha sido tratada con alcohol etílico al 96 %.

De esta selección depende las demás etapas siguientes y por ende su importancia en el procesamiento de vino de limón dulce.

2.3.2. Lavado

La materia prima seleccionada se colocó en bandejas de plástico con el fin de agregar agua con detergente para eliminar las impurezas y las posibles fuentes de contaminación existentes en la parte superficial del fruto.

2.3.3. Pelado

Esta operación se realizó manualmente mediante la utilización de cuchillos de acero inoxidable, el cual permite eliminar la cascara de la fruta y así poder extraer el zumo.

2.3.4. Extracción

Esta operación se realizó aplicando una presión al fruto ya pelado y así romper con los sacos que contienen el zumo.

2.3.5. Filtrado I

Esta operación se realizó con el fin de separar las fibras que contienen el zumo del limón el mismo que dan un sabor y olor desagradable al producto.

Para eliminar estas fibras se utiliza telas filtrantes de tocuyo que antes de usarlas se esteriliza en agua hervida.

2.3.6. Pasteurización I

Es un proceso térmico que se utiliza para describir aquel proceso de calentamiento manteniendo a temperatura constante y su posterior enfriamiento que permite eliminar el riesgo de alguna fuente de

contaminación en el producto, además de la inactivación enzimática (Singh P, Helman D. 1998).

Para la presente investigación se realizo con el fin de eliminar la flora microbiana salvaje existente y permitir la inoculación de un cultivo comercial puro (cepa MIT- L51 *Saccharomyces cereviseae*). La temperatura aplicada fue de 65°C por 15 minutos en un baño maría[1]. (Cueva H, Huayama P, 2007)

2.3.7. Suplementacion del mosto de limón dulce

Una vez pasteurizado y enfriado se verificó la concentración de azucares existentes en el mosto llegando a obtener 6,7 ° Brix[2], lo cual no eran suficientes. Para conocer la cantidad adecuada a añadir de sacarosa (azúcar comercial) se agregó 250 g, 200 g y 150 g; esto según nuestro diseño estadístico, llegando a medir 25, 20 y 15 °Brix respectivamente.

2.3.8. Corrección del pH

El pH inicial fue 6,12 medidos en el potenciómetro[3], el cual no es el adecuado para una buena fermentación. Por tal razón fue necesario agregar 50 mL de limón acido (*C. aurantifolia*)/L de mosto con el fin de reducir el pH de 6,12 hasta 4,5 puesto que se recomienda un pH de 4 a 5 para permitir una adecuada fermentación exenta de microorganismos bacterianos. (Primo E. 1998).

2.3.9. Adición del inoculo

Las levaduras son los microorganismos necesarios para realizar el proceso fermentativo el cual utiliza fuentes de carbohidratos (glucosa y fructosa) para producir cantidades considerables de etanol.

Según nuestro diseño se aplicaron cantidades de 150 mL, 100 mL y 50 mL

---

[1]: Baño maría. Marca: MEMMERT

[2]:Refractómetro: marca. MRC. Intervalo de medición: 0 a 85 ºBrix

[3]: pH meter: modelo HI 8424 microcomputer. Marca: HANNA instruments. Rango: 0.00 a 14.00

de inoculo representando el 15, 10, 5 % respectivamente a una concentración de levaduras de 1,71 x 108 ufc/mL.

2.3.10. Adición de nutrientes

Se adicionó 178,8 mg/L de sulfato de amonio los cuales son necesarios para proveer de nutrientes necesarios en el incremento de población de la levadura en sus inicios del proceso fermentativo. (Cueva H, Huayama P, 2007).

2.3.11. Sulfitado

Esta operación se sustenta en la necesidad de garantizar un buen proceso fermentativo, sin la implicancia de otros microorganismos como bacterias y otros susceptibles al bisulfito de sodio, además de esta función también el bisulfito de sodio actúa como antioxidante en el proceso fermentativo. Para la presente investigación se utilizó 100 mg/L de bisulfito de sodio (Arthey, D. 1997)

2.4. Fase pre-fermentativa

2.4.1. Acondicionamiento de los biorreactores

Los biorreactores se construyeron a partir de envases plásticos de 1750 mL de capacidad todos con las mismas características y proporciones geométricas. Los envases fueron desinfectados y esterilizados con agua hervida a 95 °C. Para realizar los experimentos se emplearon 15 biorreactores.

A cada envase se coloco una manguera de salida de CO_2 en la parte superior de la botella la misma que fue conectada a una botella de agua con solución de cloruro de calcio para evitar la entrada de oxigeno.

2.4.2. Adición del mosto inoculado o medio base

A cada biorreactor se agrego 1000 mL de mosto más una cantidad de inoculo según el diseño experimental de box-benhken (Tabla N° 02), luego se homogenizó y se da un sellado hermético al biorreactor. Se dejó fermentar en una incubadora artesanal el cual está aislado con una capa de tecnopor y

madera, provisto de dos focos de 50 Watts cada uno, la temperatura de fermentación se dejó en el rango de 22 a 24°C los mismos que se necesitó solamente de un foco. El tiempo de fermentación fue según el establecido en el diseño experimental (Tabla N° 02). Los experimentos se realizo por triplicado y se reporto los promedios de los resultados.

2.5. Fase fermentativa

La fermentación se extendió como máximo un lapso de 6 días según nuestro diseño (Tabla N° 02) y se pudo observar la producción de CO_2 y la aparición de un precipitado de levadura en el fondo del biorreactor.

2.5.1. Evaluación de parámetros (Control diario)

Durante el tiempo que duro la fermentación se evaluaron algunos parámetros que fueron necesarios conocer y el cual se presenta en la parte de resultados.

a. Determinación de sólidos solubles totales (°Brix)

Este método se detalla en la apéndice 2.

b. Determinación del pH

Remitirse al apéndice 2

c. Determinación de la densidad

Para conocer este parámetro se procedió de la siguiente manera: Se peso un vaso de precipitación seco en estufa a 105 °C, luego se adicionó 10 mL de la muestra problema, seguidamente se llevo a pesar y se anoto el resultado. Para ello se utilizó una balanza digital[4]. Anexo 5

2.6. Fase post-fermentativa

Pasados el tiempo requerido para la fermentación se procedió a realizar las siguientes actividades.

---

[4]: Balanza digital. Modelo: ES – 200A. marca: Digital Precisión. Capacidad: 200 g.

2.6.1. Pasteurización II

Esta operación se realizó con el fin de terminar o cortar la actividad fermentativa. Para tal fin se sometió el biorreactor a un baño maría con 65°C por 15 minutos. Luego se deja enfriar a temperatura ambiente. (Cueva H, Huayama P, 2007).

2.6.2. Trasiego

El primer trasiego se realiza pasado una semana de terminada la fermentación, el cual se procede de la siguiente manera: se filtra en una tela tocuyo previamente esterilizada y cuidando con un mechero que no existe incidencia de algún contagio microbiano. El filtrado se coloca en otro envase previamente esterilizado. Este procedimiento se repite cada 15 días, hasta verificar una adecuada eliminación de sólidos en solución.

2.6.3. Clarificación

Para provocar una clarificación adecuada y verificando que el vino de limón dulce no tiene gran cantidad de turbidez, solamente se sometió a un proceso de refrigeración a 3°C para poder precipitar todos los sólidos existentes en suspensión.

2.6.4. Embotellado

Esta operación se realizó en botellas de vidrio, previa esterilización; la cual se llevó a cabo enjuagando las botellas en agua caliente a 85°C por un minuto, se enjuagaron con alcohol de 75 °GL durante unos instantes y finalmente se enjuaga con agua destilada. Se procede al llenado de las botellas con el vino y al final se cierra utilizando corchos, también esterilizados. El vino embotellado fue almacenado en un lugar frio con temperatura de 4°C.

2.7. Análisis físico-químico del vino de limón dulce

2.7.1. Determinación del grado alcohólico

Para la determinación del grado alcohólico se utilizó el método de destilación. El cual consiste en agregar una cantidad de vino en un balón

para luego montar un equipo de destilación simple el cual fue sometido a calentamiento obteniendo un destilado en una probeta graduada, se peso con la ayuda de un picnómetro y se determino la densidad, el mismo que nos permite conocer la concentración alcohólica. Anexo 6

2.7.2. Porcentaje de sólidos o extracto seco

Este análisis se detallo en la sección 2.1.

2.8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente para determinar los valores óptimos de las variables. El nivel óptimo de cada variable independiente fue determinado usando las Técnicas de Optimización Superficie de Respuesta.

El análisis de respuesta superficial fue practicado para tres 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 (Rendimientos).

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-Benhken (Diseño de Superficie Respuesta)

Todos los cálculos y gráficos estadísticos fueron realizados con el Programa Computarizado STATGRAPHICS PLUS V. 5.1

III. RESULTADOS

Tabla N° 03: Análisis bromatológico del zumo de limón dulce

Brix	6,7
pH	6,12
Densidad	1,016 g/mL
Acidez total	0,090%
Índice de madurez	74,4
Humedad	86,49%
Extracto seco	13,51%

Fuente: Elaboración propia

Tabla N° 04: Condiciones de operación en los 15 biorreactores diseñados para la presente investigación

Volumen de operación	1,0 L
pH inicial	4,5
Temperatura	22 - 24°C
Concentración de microorganismos	5, 10 y 15%
Cantidad de azúcar	150, 200, 250 g/L
Tiempo de fermentación	2, 4, 6 días
Sulfato de amonio	178,8 mg/L
Bisulfito de sodio	100 mg/L

Fuente: Elaboración propia

3.1. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ETANOL EN CADA UNO DE LOS ENSAYOS REALIZADOS

Para la obtención del contenido de etanol se procedió a realizar una destilación fraccionada el cual se siguió los siguientes parámetros de destilación

- ✓ Temperatura de destilación : 87°C
- ✓ Tiempo de destilación : 10 minutos

Basados en los datos obtenidos se construyó la tabla N° 05 el cual nos permite conocer las concentraciones de etanol.

Tabla N° 05: Concentración de etanol de cada uno de los biorreactores en función de la concentración de microorganismos, azúcar y tiempo.

Corrida	X1	X2	X3	Z1	Z2	Z3	Concentración de etanol (g/L)
	A	B	C	A	B	C	
1	-1	-1	0	50	150	4	62,13
2	1	-1	0	150	150	4	72,3
3	-1	1	0	50	250	4	104,75
4	1	1	0	150	250	4	115,3
5	-1	0	-1	50	200	2	67,24
6	1	0	-1	150	200	2	75,2
7	-1	0	1	50	200	6	108,21
8	1	0	1	150	200	6	123,45
9	0	-1	-1	100	150	2	70,31
10	0	1	-1	100	250	2	72,42
11	0	-1	1	100	150	6	95,32
12	0	1	1	100	250	6	132,35
13	0	0	0	100	200	4	77,84
14	0	0	0	100	200	4	80,15
15	0	0	0	100	200	4	75,98

Fuente: Elaboración propia

Los datos de la tabla N° 05 fueron procesados con el software STATGRAPHICS PLUS V. 5.1

Tabla N° 06: Coeficientes de regresión obtenidos con Statgraphics Plus V. 5.1; a partir de los datos de la tabla N° 05, para la concentración de etanol (g/L).

Variables independientes	Coeficientes de regresión
Constante	178,75
A:Inoculo	-0,4328
B:Azucar	-0,8175
C:Tiempo	-27,91
AA	0,002311
AB	0,000038
AC	0,0182
BB	0,001941
BC	0,0873
CC	2,43938

Fuente: Elaboración propia

La ecuación del modelo ajustado es:

Concentración de etanol = 178,75 – 0,4328 x Inóculo – 0,8175 x Azúcar – 27,91 x Tiempo + 0,002311 x Inóculo^2 + 0,000038 x Inóculo x Azúcar + 0,0182 x Inóculo x Tiempo + 0,001941 x Azúcar^2 + 0,0873 x Azúcar x Tiempo + 2,43938 x Tiempo^2

Tabla N° 07: Análisis de varianza (ANOVA) para la concentración de etanol (g/L) en función de la concentración de inóculo, azúcar y tiempo.

Fuente	SC	G l	CM	F-Ratio	P-Valor
A:Inoculo	241,121	1	241,121	55,25	0,0176
B:Azucar	1945,63	1	1945,63	445,83	0,0022
C:Tiempo	3791,46	1	3791,46	868,78	0,0011
AA	123,247	1	123,247	28,24	0,0336
AB	0,0361	1	0,0361	0,01	0,9358
AC	13,2496	1	13,2496	3,04	0,2236
BB	86,9419	1	86,9419	19,92	0,0467
BC	304,852	1	304,852	69,85	0,0140
CC	351,54	1	351,54	80,55	0,0122
Falta de ajuste	273,107	3	91,0358	20,86	0,0461
Error Total	8,7282	2	4,3641		
Total (corr.)	**7075,89**	**14**			

R-cuadrado = 96,017 %

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 88,8475 %

Error Estándar de Est. = 2,08904

Error absoluto de la media = 3,52933

Estadístico Durbin-Watson = 2,35783 (P=0,1134)

Autocorrelación residual Lag 1 = -0,23975

Tabla N° 08: Valores óptimos de las variables independientes del proceso fermentativo (maximizar).

Respuesta Optimizada

Meta: maximizar Concentración de etanol // Valor Optimo = 151,717 g/L

Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Inoculo	50,0	150,0	**150,0**
Azúcar	150,0	250,0	**250,0**
Tiempo	2,0	6,0	**5,99379**

Fuente: Elaboración propia

Tabla N° 09: Valores óptimos de las variables independientes del proceso fermentativo (minimizar).

Respuesta Optimizada

Meta: minimizar concentración de etanol // Valor Optimo = 62,1239 g/L

Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Inoculo	50,0	150,0	**81,6308**
Azúcar	150,0	250,0	**150**
Tiempo	2,0	6,0	**3**

Fuente: Elaboración propia

Tabla N° 10: Ruta ascendente para la concentración de etanol (g/L)

inóculo	azúcar	tiempo	concentración de etanol
100.0	200.0	4.0	77.99
101.0	202.852	4.16043	80.8597
102.0	205.733	4.32469	84.037
103.0	208.64	4.49248	87.5316
104.0	211.572	4.66355	91.3527
105.0	214.528	4.83765	95.5087

Fuente: Elaboración propia

A continuación se presentan las figuras obtenidas del procesamiento de los datos de la tabla N°05 con el software STATGRAPHICS PLUS V. 5.1. Observese que a los 6 días (figura 1) se obtiene la máxima concentración de etanol que alcanza los 151,717 g/L con un zumo de limón dulce suplementado con 250 g de azúcar/L y 150 mL de inoculo/L.

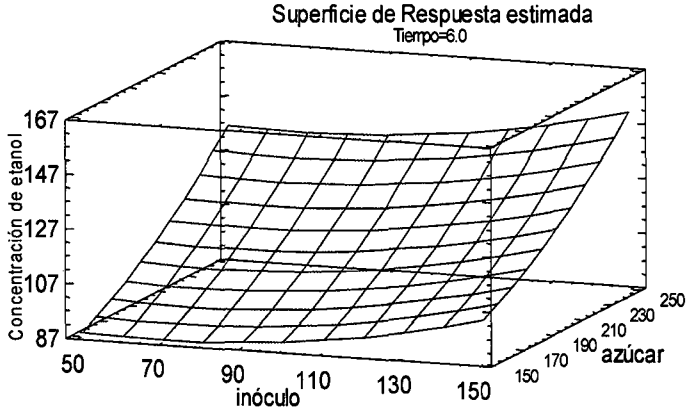


Figura 1. Superficie respuesta de concentración de etanol (g/L) en función de inoculo – azúcar (tiempo: 6,0 días). Máximo de 151,717g/L vino de limón dulce.

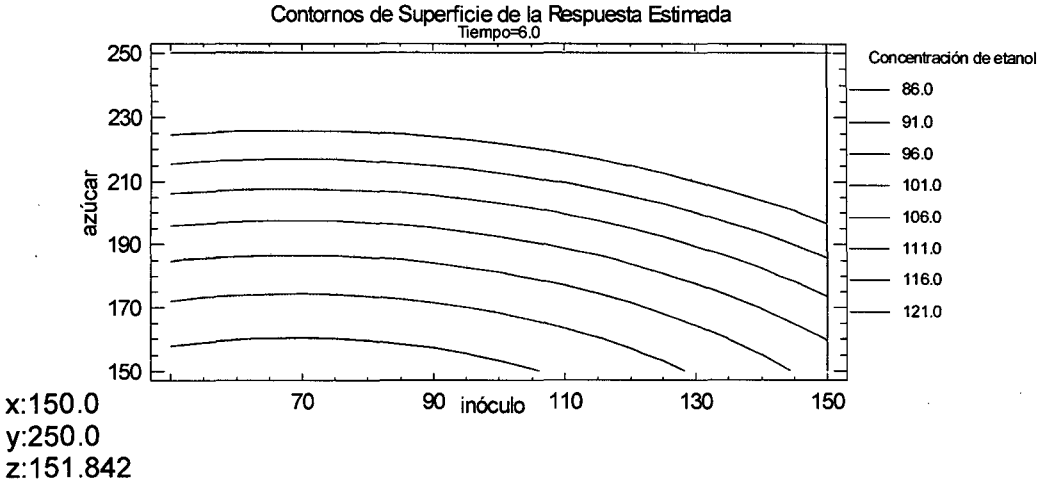


Figura 2. Contornos de superficie de la respuesta estimada de concentración de etanol (g/L) en función de Inoculo – azúcar (tiempo: 6 días). Máximo de 151,717g/L vino de limón dulce.

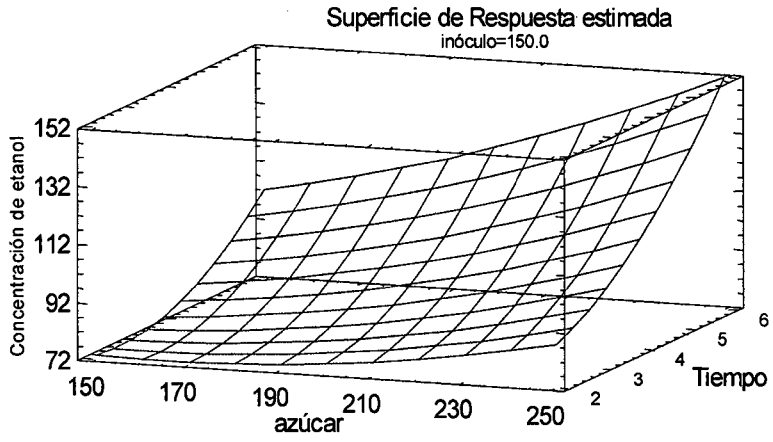


Figura 3. Superficie respuesta estimada de Concentración de etanol (g/L) en función de Azúcar - tiempo (inóculo: 150 mL/L). Máximo de 151,717g/L vino de limón dulce.

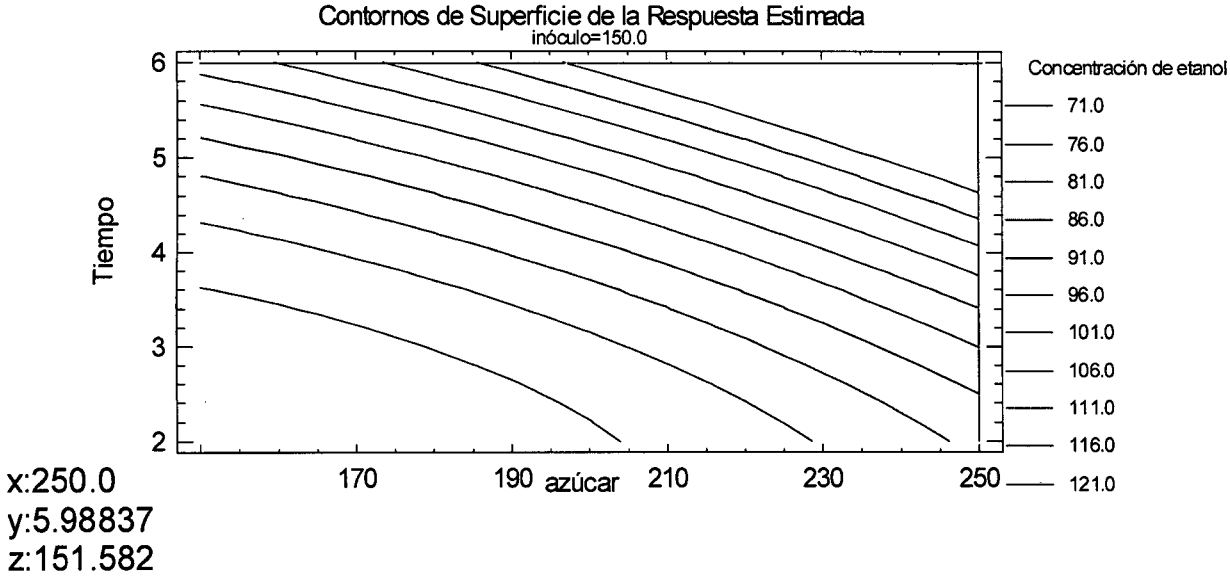


Figura 4. Contornos de Superficie de la respuesta estimada de Concentración de etanol (g/L) en función de Azúcar - tiempo (inóculo: 150 mL/L). Máximo de 151,717g/L vino de limón dulce.

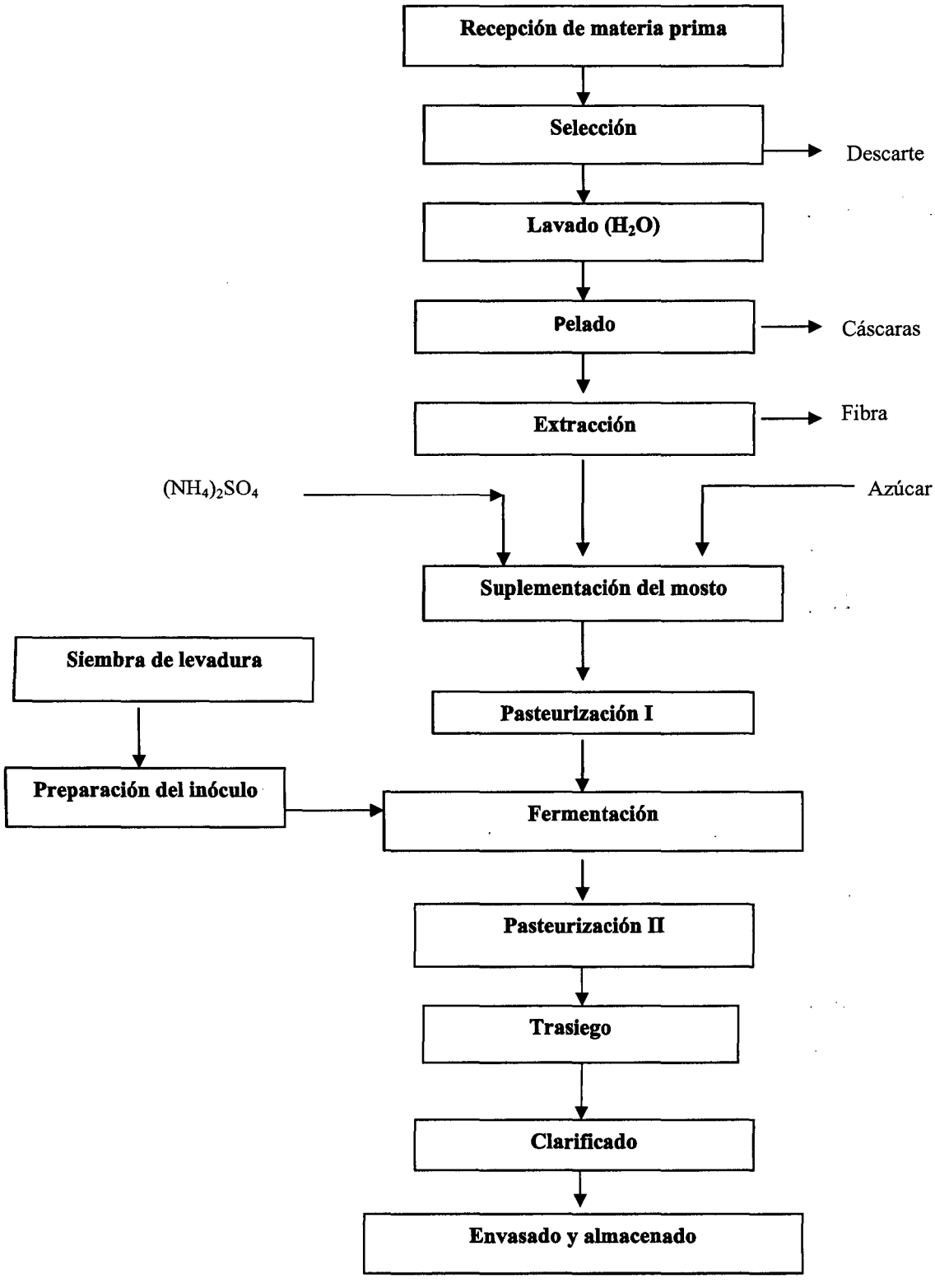


Figura 5. Diagrama de bloques del proceso de obtención de la bebida alcohólica a partir del zumo de limón dulce

Tabla N° 11. Condiciones de operación del proceso fermentativo para la producción de vino de limón dulce con la mayor concentración de etanol (g/L)

Condiciones de operación del proceso de fermentación	
Volumen del mosto inicial	1 L
pH	4,5
Temperatura	22 - 24°C
Concentración de inoculo	50 mL/L
Azúcar	250 g
Tiempo	6 días
Volumen de vino obtenido	0,924 L
Concentración de etanol	184,106 g/L vino de limón dulce

Fuente: Elaboración propia

3.2. CONTROL PERIÓDICO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN

Tabla N° 12. Control diario de la fermentación alcohólica en la obtención del vino de limón dulce con la mayor concentración de etanol.

Día	° Brix	pH	Densidad
0	25,00	4,5	1,06
1	20,9	4,47	1.053
2	18,7	4,49	1.012
3	15,6	4,54	0.989
4	14,4	4,52	0.949
5	13,1	4,52	0.956
6	12	4,52	0.979

Fuente: Elaboración propia

A continuación se muestran los resultados gráficos de las características principales de variación del proceso de fermentación alcohólica del zumo de limón dulce (°Brix, pH)

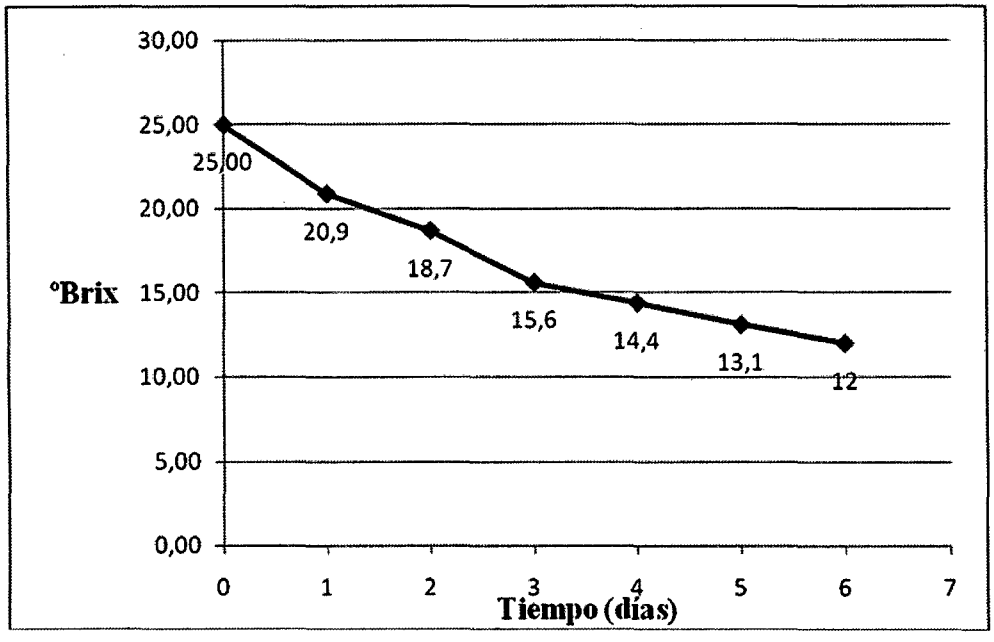


Figura 6. Variación de los grados Brix con respecto al tiempo de fermentación Alcohólica.

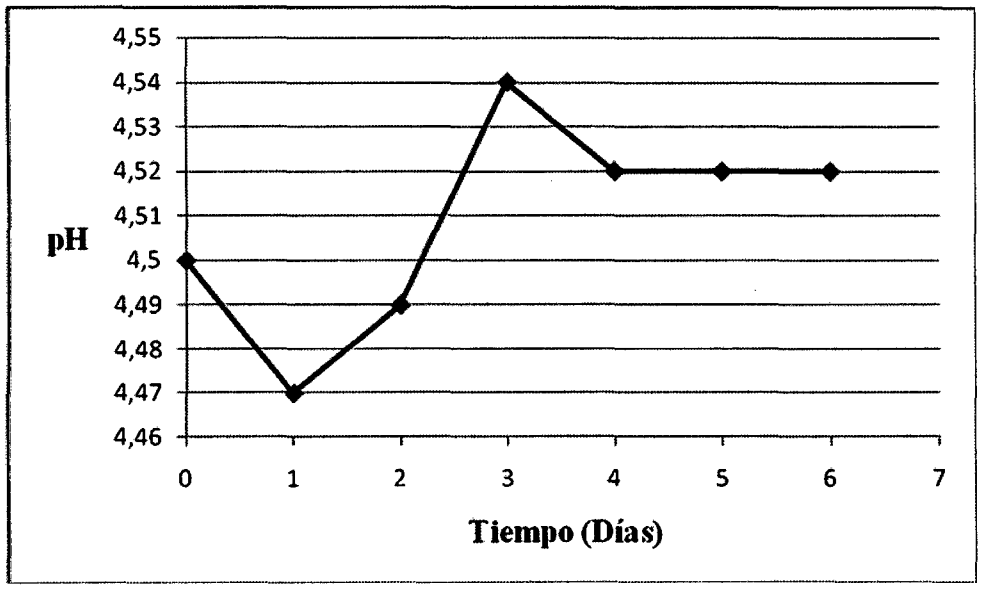


Figura 7. Variación del pH con respecto al tiempo de fermentación alcohólica.

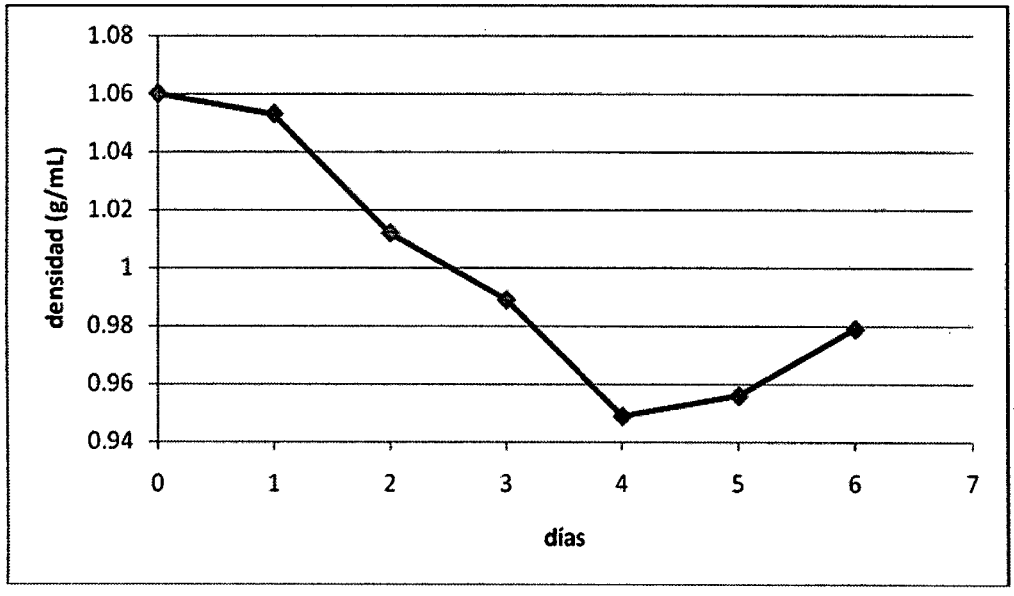


Figura 8. Variación de la densidad durante el periodo de fermentación.

3.3. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN SENSORIAL

Los presentes datos que se demuestran responden a la aplicación de una evaluación sensorial al ensayo que arrojo los rendimientos óptimos de producción alcohólica.

La evaluación fue sometida a un panel de 10 jueces, los mismos que siguiendo los valores de la escala hedónica, se obtuvo los siguientes resultados.

Tabla N° 13. Resultados de la evaluación sensorial obtenidos

Repetición	Jueces										Promedio
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	7	6	7	7	7	6	5	7	6	5	**6.3**
2	5	7	6	6	7	5	7	6	7	6	**6.2**
3	6	7	7	6	7	6	5	7	6	7	**6.4**

Fuente: Elaboración propia

3.4. COMPARACION CON LOS REQUERIMIENTOS DE INDECOPI EN LA PODUCCION DE VINOS

Tabla N° 14. Comparación del análisis organoléptico del vino de limón dulce

Caracteres evaluados	Resultados obtenidos	INDECOPI
Aspecto	Límpido	Límpido
Olor	Alcohol	Característico
Sabor	Característico	Característico
Color	Semejante al zumo de limón dulce (verde agua)	Característico del vino de procedencia

Fuente: Elab. Propia/basados en datos de INDECOPI

IV. DISCUSION

En la tabla N° 04 se muestra las condiciones de operación durante el proceso de optimización para la mayor concentración de etanol, el pH inicial del mosto fue de 4,5 encontrándose dentro del rango 4,0 – 5,0 en donde se produce un crecimiento optimo de la levadura y lo suficientemente bajo para inhibir el desarrollo de bacterias. También se puede observar que se trabajo a temperatura ambiente de 22-24°C, siendo este rango aceptable para empezar la fermentación. Si nos remitimos a la tabla N° 03, se aprecia que el pH del zumo de limón dulce es alto 6,12 aproximadamente y si trabajamos con este pH estaríamos con el riego de la contaminación por bacterias; ya que ellas se desarrollan entre 6 y 8,2 de pH. Para tal fin se corrigió con una cantidad de 50 mL/L de zumo de limón acido sutil y así obtener un pH corregido de 4,5. (Tojira Martínez, 2010).

Se procedió a evaluar como influían la concentración de microorganismos (inoculo) del 5, 10 y 15 %, ya que en otras investigaciones se determinan como la concentración necesaria entre el 10 y el 15%. Puesto que el contenido de azucares expresados en grados Brix reflejan un índice bajo, fue necesario suplementar con 150, 200, 250 g/L de azúcar comercial para llegar a obtener los grados Brix de 15, 20 y 25; además los tiempos de fermentación fueron de 2,4,6 días necesarios para alcanzar los niveles adecuados de etanol. (Karimi, K. 2006).

En la tabla N° 05 se observa la concentración de etanol (g/L) luego de la destilación para cada tratamiento. De los 15 tratamiento realizados se verifica que cuando interactúan 15% (150 mL/L) de inoculo, 25 ° Brix (250 g/L) y 6 días de fermentación se obtiene una mayor concentración de 151,717 g de etanol/L de vino, el cual también representa el nivel optimo. La concentración de inoculo está conformado por cultivos de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* var ellipsoideus MIT L51, esta cepa también es utilizada para la obtención de otros tipos de vinos de frutas en el laboratorio de Bioquímica y Microbiología de la UNTRMA. Además es muy importante considerar que se eligió al limón dulce (zumo) como sustrato fermentable, esto debido a que dicho cítrico se encuentra a bajos costos y es necesario otorgar un valor agregado a dicho producto agrícola,

el mismo que reflejará en un incentivo para el incremento de los sembríos de dicho cultivo. (Cáceda, J. 2003).

El nivel óptimo de inoculo 150 mL/L tiene una población de aproximadamente de $2.5x10^{10}$ células, lo mismo que según los resultados garantiza un comienzo adecuado y vigoroso de la fermentación, un crecimiento reducido de bacterias. A comparación de otras investigaciones que utilizaron una concentración de 10^{12} y obtuvieron similares resultados. (Santos de Jesús, 2008).

Para iniciar la fermentación es necesario la presencia de nutrientes nitrogenados, con tal fin muchos autores recomiendan una aplicación de 100 a 200 mg/ L de sulfato de amonio. En la presente investigación se aplicó una concentración de 178,8 mg/L de sulfato de amonio. (Cueva H, Huayama P, 2007).

En la tabla N° 08 se puede observar que ell valor óptimo máximo arrojado por el programa Statgraphics plus V. 5.1, llegando a una productividad de 151, 717 g/L o 19,22 % vol. en investigaciones de Cueva H, Huayama P, encontramos que el tiempo de fermentación es de 6 dias lo cual coincide con el trabajo realizado. Otros autores como Rivereau- Gayon sostienen que para llevar una adecuada fermentación la cantidad de azucares deben estar entre 22 a 30 °Brix. Autores como Arthey recomiendan que por su bajo contenido en azucares por parte de las frutas diferentes a la uva, se requiere adicionar una cantidad considerable de azúcar hasta obtener una tenor de azúcar adecuado. En la presente investigación se adicionó 250 g/L al tratamiento óptimo.

La fermentación es un proceso catabólico en el cual se utiliza como sustrato los azucares presentes en el mosto; por tal razón es de esperar como en la tabla N° 12 la reducción de los grados brix desde 25 hasta los 12 grados. También en la misma tabla se puede considerar que los valores de pH tiene una pequeña variación inclusive se incrementa de 4,5 a 4,52; lo cual contrasta con otras investigaciones donde se verifica una reducción en el valor de pH. (Ramirez Niño, 2006).

La densidad es un parámetro en la cual se reporta la cantidad de masa contenida en una unidad de volumen. En la fermentación existe por parte de las levaduras un consumo de azucares dando como resultado la producción de alcohol. Puesto que la densidad del alcohol es baja, en el presente trabajo se obtiene una reducción de la densidad de 1, 06 a 0,979 g/mL. (Buitrago Estrada, 2007).

V. CONCLUSIONES

Con una concentración de inoculo del 15% (150 mL/L) de *Saccharomyces cerevisiae* Var. Ellipsoideus MIT-L51, una cantidad de 250 g/L de azúcar y un tiempo de fermentación de 6 días, son las variables o parámetros que más afectan el rendimiento de etanol durante la producción de vino de limón dulce.

Aplicando la metodología de superficie de respuesta se obtuvo una concentración de etanol máxima de (151, 717 g de etanol/L de vino o 19,22 % vol.) para los niveles de variables óptimos.

En el proceso de fermentación alcohólica a partir del mosto de limón dulce, se encontró que las siguientes variables favorecen la producción del vino:

pH inicial	: 4,5
Temperatura	: 22- 24°C
Inoculo	: 15% (150 mL/L)
Azúcar	: 250 g/L
Tiempo	: 6 días
Sulfato de amonio	: 178,8 mg/L
Bisulfito de sodio	: 100 mg/L

VI. RECOMENDACIONES

Luego de finalizar el presente trabajo se recomienda lo siguiente:

- Los estudios realizados se utilizaron muestras de limón dulce, con una sola época de cosecha y una sola zona productora (La Peca). Se debería realizar un estudio más detallado conteniendo no solo una época de cosecha y una sola zona productora sino varias para realizar una estandarización dentro del proceso fermentativo y determinar si existen o no variaciones significativas entre cosechas para la obtención de los vinos de fruta.

- No utilizar limón dulce en estado de putrefacción, para evitar la contaminación del zumo con microorganismos que deterioren y alteren el producto el mismo que no va a representar las características fisicoquímicas y organolépticas esperadas.

- Se deben realizar pruebas con mezcla de vinos fermentados con diferentes cepas de levaduras para determinar si mejoran las características sensoriales de los mismos.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Arthey D. (1997) "Procesado de frutas". Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. 288 pp.

2. Belitz H. (1997) "Química de los Alimentos". 2da edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. 1134 pp.

3. Buitrago Estrada J, Tenjo D. (2007) "Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con las células libres de *Saccharomyces cereviseae"*. Tesis para obtener el título de Microbiólogo industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogota, D.C. Colombia.// Accesado 12/05/10.

4. Cáceda, J; Rodríguez, M. (2003). "Producción de licor a partir de sacarosa suplementado con cascara de naranja (*Citrus auriantus*), Maca (*Lepidium mellen* walp), mediante el proceso fermentativo utilizando *Saccharomyces cerevisiae L51"*. Universidad Nacional Jorge Bassadre Grohmann. Tarma, Perú.

5. Carballo, F. 2000. Microbiología Industrial: microorganismos de interés industrial. Editorial Acribia. España.

6. Carpenter R. (2002) "Análisis sensorial en el desarrollo y control de la calidad de Alimentos". Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.

7. Cheftel J y Cheftel H. (1992) "Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos". Vol. 01. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.

8. Coultate T. (1998) "Manual de Química y Bioquímica de los Alimentos". 2da edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.

9. Cueva H, Huayama P. (2007). "Elaboración de Bebida Alcohólica a partir de Naranja Criolla *(Citrus sinensis* (L.) Osbeck) Suplementado con

Panela y Sulfato de amonio Fermentado con *Saccharomyces cerevisiae* MIT L- 51". Tesis de Ingeniería Agroindustrial UNAT-A, Chachapoyas- Perú.

10. Delanoe D. (2003) "El Vino. Del análisis a la elaboración". Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.

11. Díaz M. (2008) "Determinación de la relación jugo de naranja-panela, porcentaje de pectina y pH en la viscosidad de la mermelada ecológica de naranja (*C. sinensis*)" Tesis para obtener Título de Ingeniero Agroindustrial. UNAT-A. Chachapoyas. Perú.

12. Intermediate Technology Development Group (2002). "Vino de Frutas". 2da edición. Lima, Perú

13. Karimi, K. Emtiazi, G y Taherzadeh, M. 2006. Production of ethanol and mycelia biomass from rice straw hemicelluloses hydrolyzed by *Mucor indicus*. Process Biochemistry.

14. Kimball D. (2002) "Procesado de cítricos". Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. 496 pp.

15. Kirk R. (1999) "Composición y análisis de los alimentos de Pearson", 2da edición, Editorial Continental S.A. México.

16. Kolb, E. (2002). "Vino de Frutas". 8ava Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza- España

17. Ministerio de Agricultura. (2009). "Ejecución y perspectivas de la información agraria". Departamento Amazonas. Perú.

18. Montgomery D. (2004) "Diseño y Analisis de experimentos". Editorial Iberoamericana. Mexico. 560 pp.

19. Mostacero J. (2007) "Taxonomía de las plantas medicinales". Editorial Univ. Nac. de Trujillo. Trujillo. Perú.

20. Primo E. (1998). "Química de los alimentos". Editorial Síntesis S.A, Madrid- España.

21. Rankine B. (1989) "Manual práctico de enología". Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. 394 pp.

22. Ramirez Niño, M. (2006) "Caracterización de vinos de piña *(var. Española roja)* pasteurizados y sin pasteurizar elaborados con diversas cepas de *Saccharomyces cereviseae*". Tesis para obtener el grado en Magister en ciencia y tecnología de los alimentos. Universidad de puerto Rico. Mayaguez. Puerto Rico.// accesado 12/05/10.

23. Ribereau- Gayon P. (2003) "Microbiología del vino". Editorial Mundi-prensa. Buenos Aires. Argentina.

24. Rodríguez Prado M. (2003). "factores que afectan la fermentación microbiana, y al perfil y flujo de aminoácidos de las bacterias asociadas con las fracciones líquida y sólida en un sistema de cultivo continuo". Tesis para obtener el grado de Doctor del programa de producción animal. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. España.// accesado 08/05/10

25. Santos de Jesús, S. (2008). "Análisis cuantitativo y modelización del metabolismo de la levadura *Pichia pastoris*". Tesis para optar el grado de Doctor en Biotecnología. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra. España. // accesado 07/05/10.

26. Tapia, M. (2000). "Mountain Agrobiodiversity in Perú". Mountain Research and Development.

27. Torija Martínez, J. (2002). "Ecología de las levaduras: Selección y adaptación a fermentaciones vínicas". Tesis para optar el grado de Doctora en Bioquímica. Universidad Rovira I Virgili. Tarragona. España. // accesado 07/05/10.

28. Uber Garcia G. (2006).“Modificación genética de levaduras vínicas industriales para mejorar la producción de aroma secundario”. Tesis para optar al grado de Doctor en Bioquímica. Universidad de Valencia. Valencia. España. // accesado 11/05/10.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

Análisis bromatológico del zumo de limón dulce

a. Determinación de la humedad:

Materiales

- ✓ Vaso de precipitación, 100 mL
- ✓ Pinzas
- ✓ Probeta graduada, 50 mL

Equipos

- ✓ Balanza digital
- ✓ Estufa
- ✓ Desecador

Método

- ✓ Pesar 20 g del jugo de limón dulce (W_i)
- ✓ Llevar a la estufa a 105°C.
- ✓ Controlar hasta que el peso sea constante
- ✓ Enfriar en un desecador.
- ✓ Pesar lo obtenido (W_f)

$$\%\,\text{Humedad} = 100 * \frac{Wi - Wf}{Wi}$$

Donde

W_i: Peso de la muestra humeda, g.

W_f: Peso de la muestra seca, g.

$$\%\,\text{Humedad} = 100 * \frac{20{,}0620 - 2{,}7101}{20{,}0620}$$

% Humedad = 86,49

b. Determinación del extracto seco.

% Extracto seco = 100 - % Humedad

% Extracto seco = 13,51

c. Determinación de acidez titulable (AT)

$$\% \text{ Ac. Citrico} = \frac{V1 * N}{V2} * K * 100$$

Donde:

V_1 = Volumen de NaOH consumido (mL)

V_2 = Volumen de la muestra (mL)

N = Normalidad del NaOH (≅ 0.1 meq/mL)

K = Peso equivalente del acido cítrico (≅ 0.064 g/meq)

$$\% \text{ Ac. Citrico} = \frac{7.1 * 0.1}{50} * 0.064 * 100$$

% Ac. Citrico = 0.09088

d. Determinación de los sólidos totales

S.S.T.Corr = 0.197 * A + °Brix

Donde:

A = % acido cítrico

0,197 = Factor de corrección

S.S.T.Corr = 0.197 * 0.09088+ 6.7

S.S.T.Corr = 6,8790336

e. Determinación del índice de madurez

$$\text{Indice de madurez} = \frac{°\text{Brix}}{\text{Acidez titulable}}$$

$$\text{Indice de madurez} = \frac{6{,}8790336}{0.09088}$$

Indice de madurez = 75,6935915

f. Contenido de zumo de limón dulce (Rendimiento)

$$\text{Contenido de Zumo} = \frac{\text{P zumo}}{\text{P fruto}} * 100$$

$$\text{Contenido de Zumo} = \frac{239{,}1\ \text{g}}{850\ \text{g}} * 100$$

Contenido de Zumo = 28,12941176

ANEXO 2

Preparación del inóculo: Siembra y cultivo de la cepa

- **Procedimiento**

En primer lugar se esterilizo 10 placas petri cubiertos con papel utilizado para esterilización y se colocó en la autoclave, previamente se prepara la solución de agar glucosa 4% según Saboraud (g/L) (peptona de caseína 5 g, peptona de carne 5 g, D glucosa 40 g, agar – agar 15 g), que también fue esterilizado a una presión de 15 lbf/pulg2 y temperatura de 121 °C por 15 minutos; luego de salir del autoclave se dejó enfriar y se pudo observar que los tubos ya se encuentran estériles y el agar saboraud se ha solidificado a temperatura ambiente.

En una cocina eléctrica se diluyó el agar saboraud y se procede a servir en 4 placas, haciendo uso del mechero de alcohol y desinfectando el área de trabajo. Con la ayuda del asa bacteriológica previamente esterilizada en el mechero, se procedió a tomar una muestra del frasco donde se encuentra la cepa L- 51 y se hizo la siembra por estrías en las 4 placas petri. Se trato que el número de asadas sea el mismo en cada una de las placas petri, luego se llevo a la estufa para su reproducción por 24 horas a 35 °C.

Pasados el lapso de tiempo y verificando una buena ampliación de la población de levaduras se procedió a lavar una de las 4 placas que contenía la población de levaduras con agua esteril un aproximado de 100 mL. Luego se tuvo que realizar un recuento de levaduras; el cual se ha llevado a cabo de la siguiente manera: primeramente se realiza una dilución 1: 2 con agua estéril. Seguidamente se extrae una alicota de 0.1 mL de esta dilución y se coloca en la cámara neubauer para su posterior visualización en el microscopio.

ANEXO 3

Producción de biomasa y obtención del inóculo

- **Procedimiento**

Luego de haber transcurrido las 24 horas de la activación de la cepa y haber realizado un recuento de levaduras se agregó 100 mL de este cultivo con una concentración de levaduras de 4,05 x 10^7 células/mL a 1500 mL de zumo de limón dulce corregido con azúcar comercial y adicionado 178,8 mg/L de sulfato de amonio y 100 mg/L de bisulfito de sodio. (Cueva H, Huayama P, 2007). El inóculo con la población inicial de levaduras se somete a una incubación con 35 °C por 24 horas, ayudado por un agitador magnético para permitir la adición de oxigeno.

ANEXO 4

Determinación de la concentración celular de levadura.

a. **Cultivo joven obtenido en placas petri**

Procedimiento

- Se tomo la muestra a evaluar con la ayuda de una pipeta, se procedió a cargar la cámara neubauer.
- Se coloco la cámara en la platina del microscopio y se observo la uniformidad de las células.
- Dependiendo del tamaño de las células a contabilizar, se escogió el cuadrante más adecuado.

Luego se aplica la siguiente fórmula para determinar la concentración celular de levaduras.

- Se conto en el retículo de toma en cinco cuadritos, obteniéndose un promedio de 81 células

N° celulas = 5 * 81 = 405 celulas

Volumen = 0,1 mm * 0,2 mm * 0,2 mm * 5

Volumen = 0,02 mm^3

$$\text{N° de celulas/mL} = \frac{\text{N° de celulas}}{\text{Volumen}} * \frac{1}{d}$$

$$\text{N° de celulas/mL} = \frac{405 \text{ cel.}}{0.02} * \frac{1}{1/2}$$

N° de Células/mL = $4{,}05 \times 10^7$ cel/mL

- Luego se definió la concentración de las células en los 100 mL de la suspensión joven.

N° de Células/100 mL = $4{,}05 \times 10^9$ cel/100 mL

b. Inóculo obtenido por incubación a 35°C por 24 horas.

Procedimiento

$$\text{N° de celulas/mL de inoculo} = \frac{\text{N° de celulas}}{\text{Volumen}} * \frac{1}{d}$$

$$\text{N° de celulas/mL de inoculo} = \frac{1710 \text{ cel.}}{0.02} * \frac{1}{1/2}$$

N° de células/ mL de inoculo = $1{,}71 \times 10^8$ Cel/mL de inoculo

- En 150 mL de inoculo se tendrá $2{,}565 \times 10^{10}$ células de levaduras
- En 100 mL de inoculo se tendrá $1{,}71 \times 10^{10}$ células de levaduras
- En 50 mL de inoculo se tendrá $8{,}55 \times 10^9$ células de levaduras

ANEXO 5

Control diario de la fermentación

a. Determinación de la densidad

Materiales

- Probeta, 500 mL.
- Vaso de precipitación de 50 mL, 500 mL.

Equipos

- Balanza digital.
- Hidrómetro, rango de medición: 1,0 a 1,3 g/mL.
- Termómetro, rango -20 a 100 °C.

Métodos

i. *Uso del hidrómetro*

- ✓ Llenar en una probeta de 500 mL, previamente lavada, con el mosto.
- ✓ Dejar en reposo durante unos minutos para que el material se equilibre.
- ✓ Medir la temperatura de la muestra.
- ✓ Sumergir lentamente el hidrómetro, con un movimiento rotatorio.
- ✓ Leer la gravedad específica de la muestra, en la escala del hidrómetro.
- ✓ En caso de haberse formado burbujas colocar una gota de alcohol en el vástago del hidrómetro.

ii. *Densidad relativa*

- ✓ Pesar un vaso de precipitación de 50 mL, vacio. (P1)
- ✓ Pesar el vaso de precipitación con una cantidad del mosto a medir.(P2)
- ✓ Verificar el volumen ocupado.(V1)
- ✓ Aplicar la siguiente ecuación

$$Densidad\ relativa = (P2-P1)/(V1)$$

b. Determinación del pH

Materiales

- Vaso de precipitación de 100 mL.
- Pipeta de 1 y 10 mL.
- Bagueta.

Equipos

- pH-metro microprocesador Q400MT

Métodos

Uso de pH-metro

- ✓ Realizar la calibración del pH-metro microprocesador Q400MT.
- ✓ Colocar el mosto en un vaso de precipitación.
- ✓ Lavar el electrodo y sensor de temperatura del pH-metro con agua destilada y secarlos.
- ✓ Colocar el electrodo y sensor en la muestra de mosto.
- ✓ Elegir la opción pH que aparece en la pantalla y luego ENTER.
- ✓ Dejar estabilizarse el valor del pH y temperatura en la pantalla hasta OK.

ANEXO 6

Determinación de etanol.

Para este análisis se utilizo el método volumétrico. Para tal efecto se utiliza la siguiente fórmula para tal fin.

$$SP = \frac{Pi - P}{Po - P}$$

Donde:

SP: peso especifico o gravedad especifica del destilado, 20°C/20°C

P: Peso picnómetro (25 mL) vacio y seco a 20°C, g

Pi: Peso del picnómetro con destilado hidroalcohólico a 20°C, g

Po: Peso del picnómetro con agua destilada, g

$$SP = \frac{28{,}44 - 18{,}9}{28{,}83 - 18{,}9}$$

$$SP = 0{,}9761825$$

Con este dato nos dirigimos a las tablas de contenido alcohólico en % peso y % Volumen de mezcla hidroalcohólica según su gravedad especifica a 20°C/20°C.

% Vol: 19,22

Tabla N° 15. Graduación del alcohol en volumen, peso y peso específico a 20°C/20°C

GRADUACION	ALCOHOL % VOL	ALCOHOL % PESO	ALCOHOL g/100 mL	PESO ESPECIFICO
0,0	0,00	0,000	0,00	1,00000
1,0	0,50	0,400	0,40	0,99925
2,0	1,00	0,795	0,79	0,99851
3,0	1,50	1,190	1,19	0,99777
4,0	2,00	1,593	1,59	0,99704
5,0	2,50	1,990	1,98	0,99633
6,0	3,00	2,392	2,38	0,99560
7,0	3,50	2,800	2,78	0,99490
8,0	4,00	3,194	3,18	0,99419
9,0	4,50	3,600	3,58	0,99350
10,0	5,00	3,998	3,97	0,99281
11,0	5,50	4,400	4,37	0,99214
12,0	6,00	4,804	4,76	0,99149
13,0	6,50	5,210	5,16	0,99084
14,0	7,00	5,612	5,56	0,99020
15,0	7,50	6,020	5,96	0,98956
16,0	8,00	6,442	6,35	0,98894
17,0	8,50	6,830	6,75	0,98832
18,0	9,00	7,234	7,14	0,98771
19,0	9,50	7,640	7,54	0,98771
20,0	10,00	8,047	7,93	0,98650
21,0	10,50	8,450	8,33	0,98590
22,0	11,00	8,862	8,73	0,98530
23,0	11,50	9,270	9,13	0,98471
24,0	12,00	9,679	9,52	0,98412
25,0	12,50	10,800	9,92	0,98354
26,0	13,00	10,497	10,31	0,98297
27,0	13,50	10,900	10,71	0,98239
28,0	14,00	11,317	11,11	0,98182
29,0	14,50	11,720	11,51	0,98127
30,0	15,00	12,138	11,90	0,98071
31,0	15,50	12,540	12,30	0,98015
32,0	16,00	12,961	12,69	0,97960

La concentración de etanol en el mosto fermentado será.

$$Concentración\ Etanol = \%\ Vol\ .\ \rho_{20°C\ Etanol}$$

$$\text{Concentración de etanol} = \frac{19{,}22\ \text{mL etanol}}{100\ \text{mL de vino}} \times \frac{0{,}78934\ \text{g de etanol}}{\text{mL etanol}} \times \frac{1000\text{mL vino}}{1\ \text{L de vino}}$$

Concentración de etanol: 151.717g/L

ANEXO 7

ENFERMEDADES Y DEFECTOS PRINCIPALES EN LOS VINOS

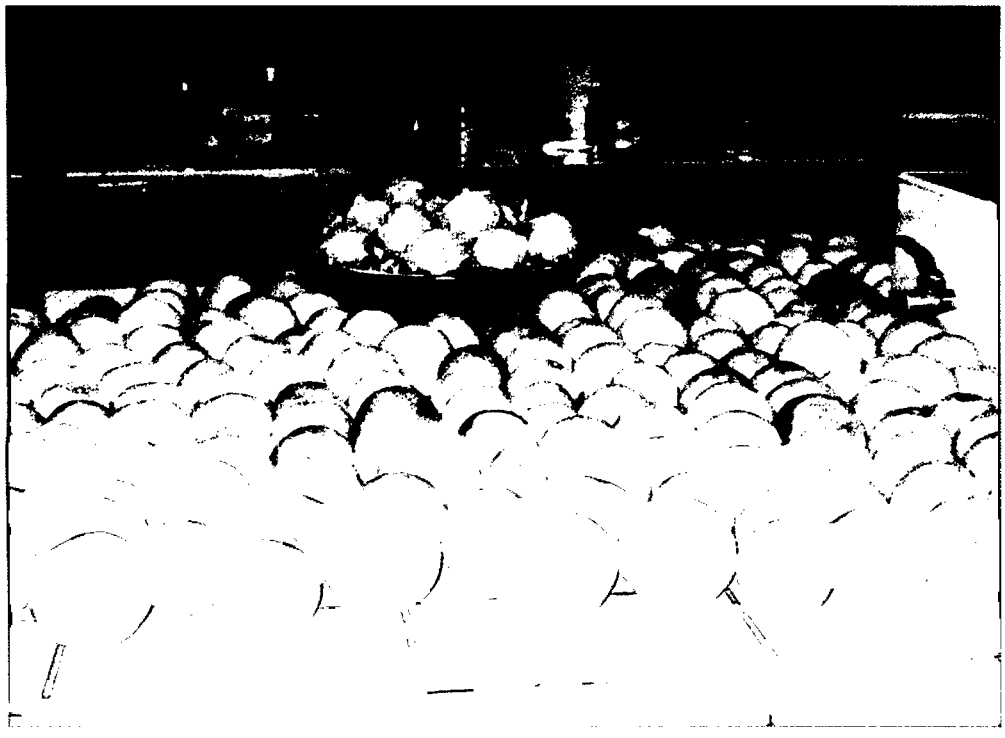
Tabla N° 16. Principales enfermedades de los vinos, cambio que se produce y causas que los originan. Cueva y Huayama. 2007

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

Tabla N° 17. Principales defectos de los vinos, cambios que se producen y causas que los provocan. Cueva y Huayama. 2007.

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 una parte 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/L.)
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 oxigeno	Exceso de hierro y presencia de oxigeno

ANEXO 8

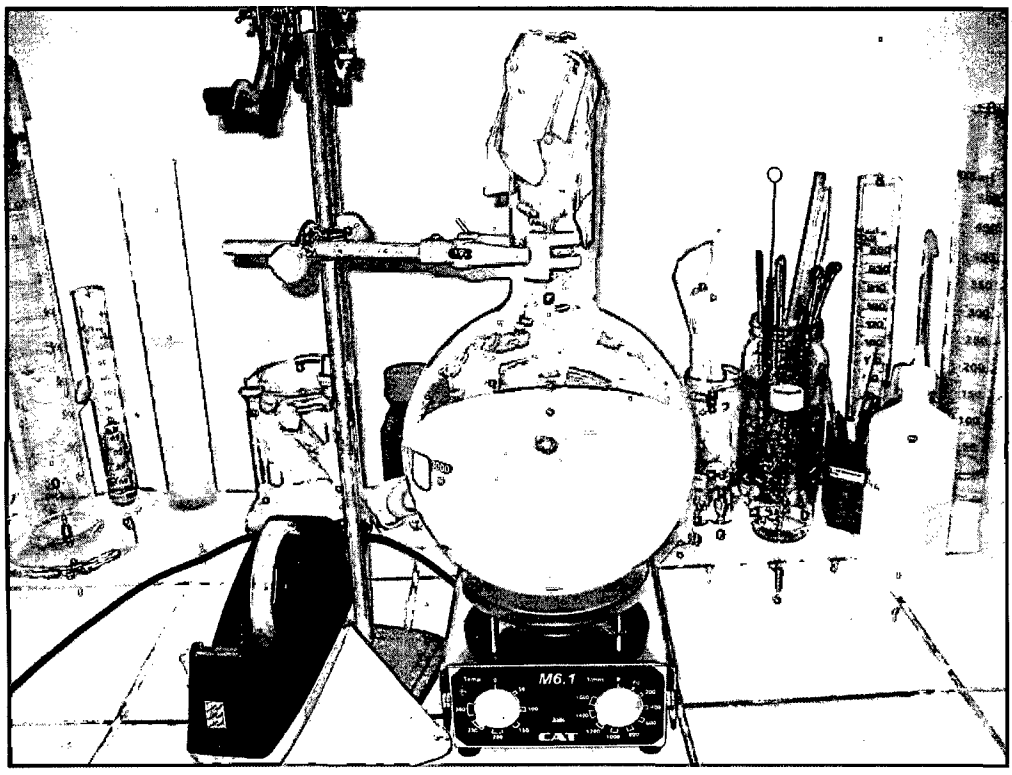


Fotografía 1. Material prima que se utilizó en el proceso de obtención de la bebida fermentada.

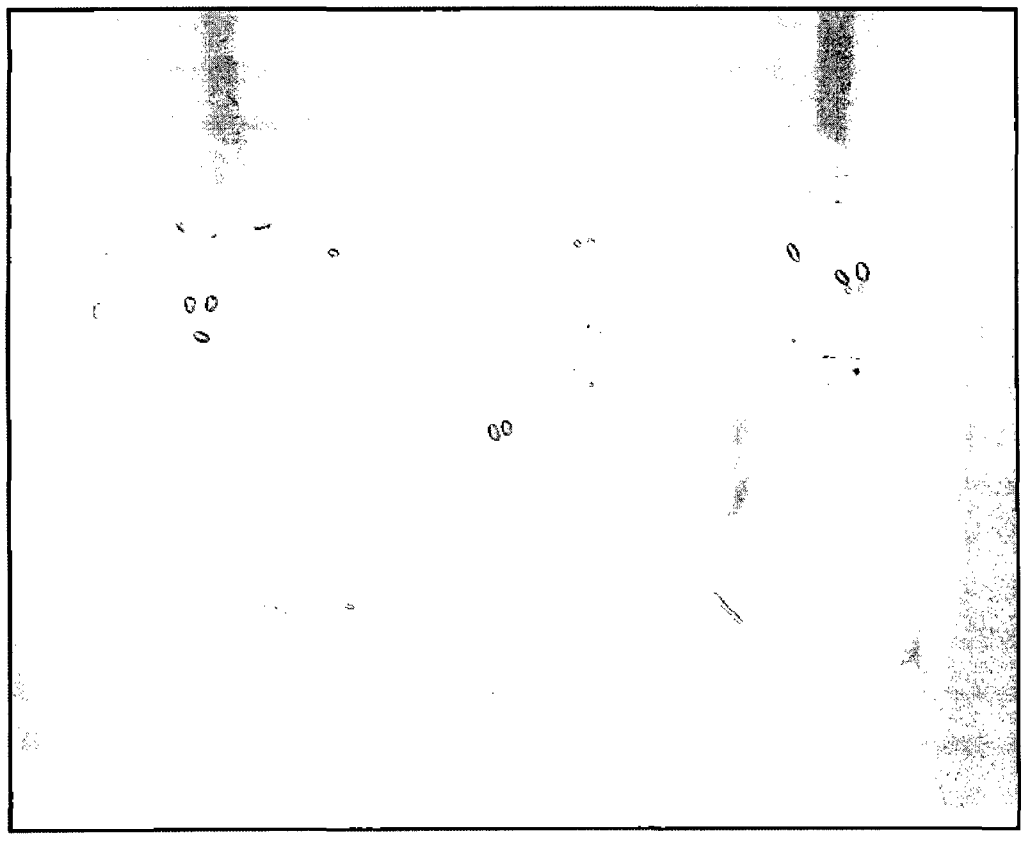
Fotografía 2. Operación de pelado del limón dulce.

Fotografía 3. Operación de extracción del jugo de limón dulce.

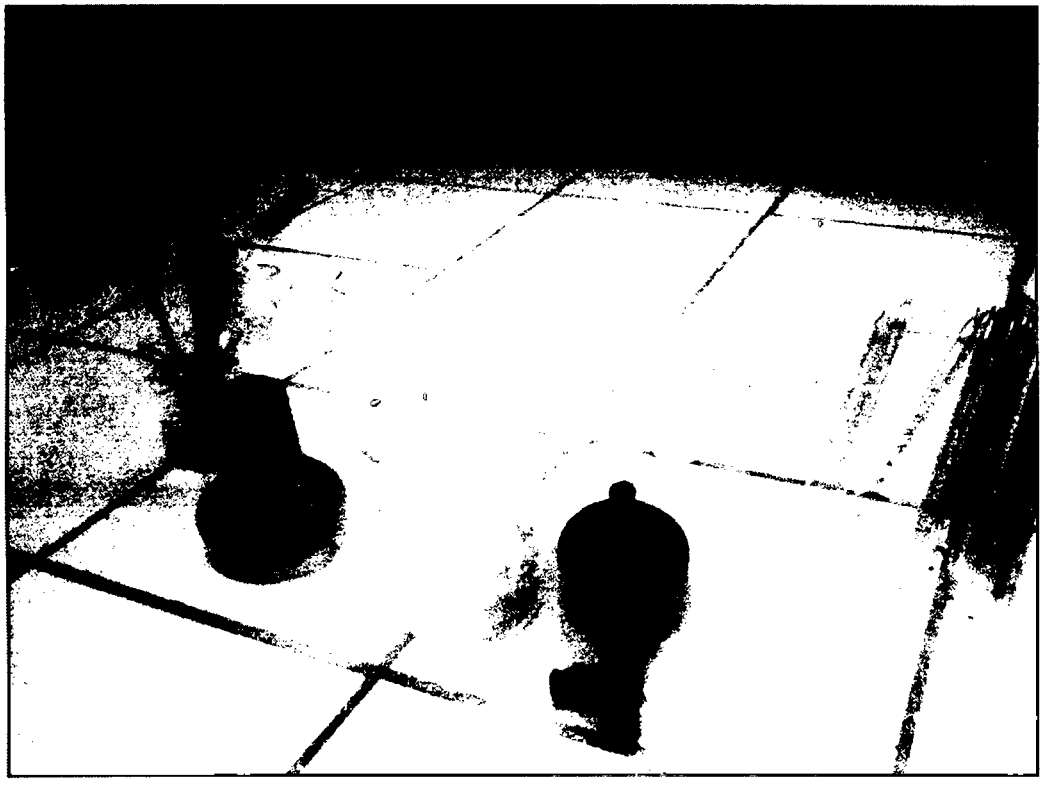
Fotografía 4: obtención del cultivo de la cepa de *Saccharomyces cereviseae*



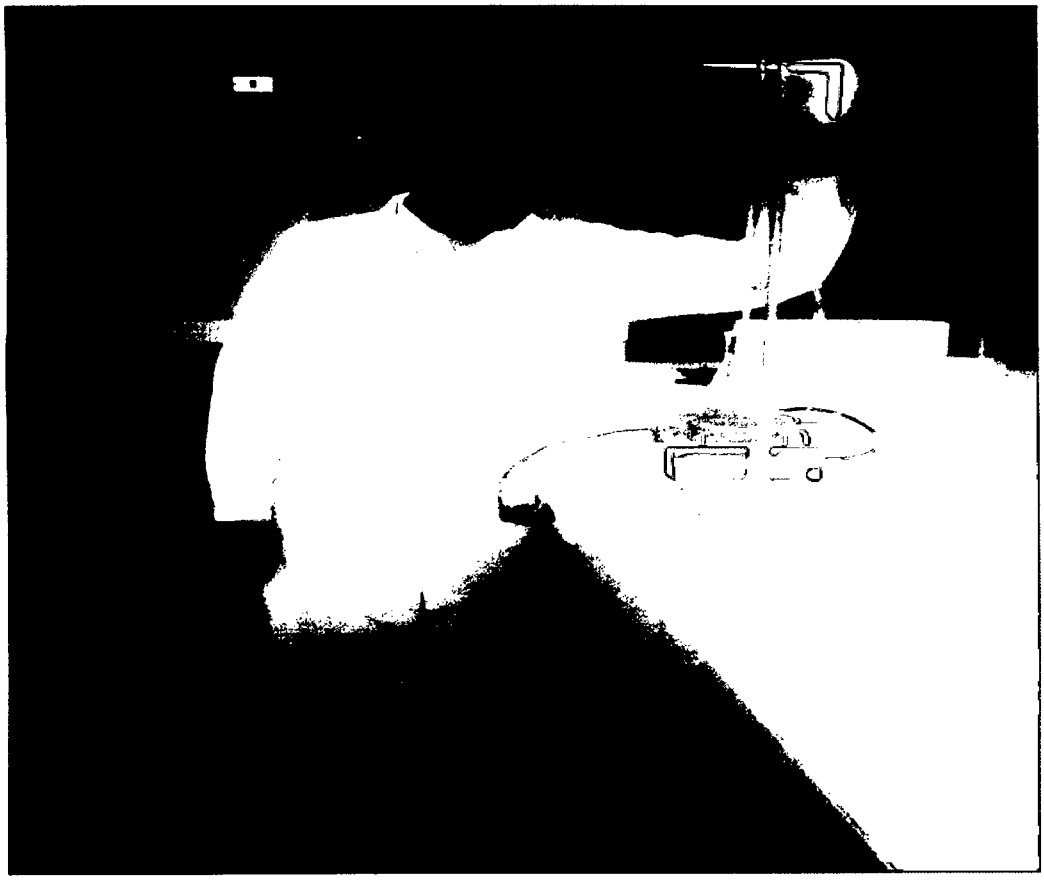
Fotografía 5. Obtención del inoculo de *Saccharomyces cereviseae*



Fotografía 6. Instalación de los biorreactores en la incubadora



Fotografía 7. Control diario de los parámetros de fermentación



Fotografía 8. Medida de la acidez titulable.

ANEXO 9

Características de los equipos

a. Refractometer: marca. Mrc. Intervalo de medición: 0 a 85 °Brix

b. pH meter: modelo HI 8424 microcomputer. Marca: HANNA instruments. Rango: 0.00 a 14.00.

c. Balanza digital. Modelo: ES – 200A. marca: digital precisión. Capacidad: 200 g.

d. Estufa. Modelo: 100-800. Marca: memmert.

e. Baño maria. Marca: memmert.

f. Refrigeradora: marca: LG. Modelo: GM-R433YQ.

g. Speedy Autoclave. Marca: HUXLEY. Modelo: HL-340. Rango de presión: 0-4 kg/cm^2.rango de temperatura: 100 – 151C. rango de tiempo: 0-70 minutos. Capacidad 50 L.