

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**



**“APLICACIÓN DEL MODELO CINÉTICO DE MICHAELIS –  
MENTEN EN LA FERMENTACIÓN DE ZUMO DE PIÑA (*Ananas  
comosus*)”**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**CAROLINA COILLO VALERO**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**PROMOCIÓN: 2013 – II**

**PUNO – PERÚ**

**2017**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

“APLICACIÓN DEL MODELO CINÉTICO DE MICHAELIS – MENTEN EN LA  
FERMENTACIÓN DE ZUMO DE PIÑA (*Ananas comosus*)”

TESIS PRESENTADA POR:

CAROLINA COILLO VALERO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 17 DE JULIO DE 2017

APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:



PRESIDENTE

.....  
Ing. M.Sc. Pablo PARI HUARCAYA

PRIMER MIEMBRO

.....  
Ing.M.Sc. Edgar GALLEGOS ROJAS

SEGUNDO MIEMBRO

.....  
Dr. Ronald ASTETE TEBES

DIRECTOR

.....  
Ing.M.Sc. Victor CHOQUEHUANCA CÁCERES

ASESOR

.....  
D.Sc. Teófilo DONAIRES FLORES

ASESOR

.....  
D.Sc Rosario I. ORTEGA BARRIGA

PUNO – PERU  
2017

Área: Ingeniería y tecnología

Tema: Desarrollo de procesos y productos agroindustriales sostenibles y eficientes

## DEDICATORIA

### A DIOS.

*Nuestro señor ya que me diste la vida, la salud, por darme fuerza y sobre todo la dirección de mi vida, porque nunca me abandonaste y siempre me sacaste adelante sobre todas las adversidades, y por guiar mis pasos en todo momento.*

*Con cariño para mis padres Juan y Nicolasa,  
a mis hermanos Germán, Hercilia, Armando,  
Hermelinda y Elisis, a ellos mi eterna gratitud.*

*Carolina Coillo Valero*

## AGRADECIMIENTO

Mi más profundo agradecimiento a la Universidad Nacional del Altiplano y a la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, por haberme brindado mi formación profesional.

A mis docentes que con su experiencia y conocimiento fueron los maestros formadores en cada etapa de mi formación profesional.

Al director de tesis Ing. M.Sc. Florentino V. CHOQUEHUANCA CÁCERES, por su imprescindible asesoramiento y colaboración para la elaboración de proyecto de investigación.

A la D. Sc. Rosario Edely ORTEGA BARRIGA y el D.Sc. Teófilo DONAIRES FLORES, por sus conocimientos, paciencia y tiempo para el desarrollo y culminación de este proyecto de investigación.

Al señor Pablo Silva Condori, Laboratorista de Microbiología de los Alimentos de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ciencias Agrarias; y al Señor Félix Cahuana Nina, Laboratorista de la Facultad de Ingeniería Química.

A mis amigos y amigas que siempre confiaron en mí.

*Carolina Coello Valero*

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE TABLAS	
RESUMEN .....	9
ABSTRACT .....	10
I. INTRODUCCIÓN .....	11
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. Piña .....	13
2.1.1. Composición .....	13
2.1.2. La maduración de las frutas .....	14
2.2. Cambios físicos .....	15
2.2.1. Aumento de tamaño .....	15
2.2.2. Ablandamiento de la pulpa .....	15
2.3. Cambios químicos .....	15
2.4. Cambios de azúcares.....	18
2.5. Formación de alcoholes, aldehídos y ésteres .....	18
2.6. Frutas sobremaduras.....	19
2.6.1. Piña sobremadura .....	19
2.7. Fermentación.....	20
2.7.1. Condiciones de fermentación .....	21
2.7.2. Fermentación alcohólica.....	22
2.7.3. Fermentación con levaduras .....	24
2.8. Modelamiento cinético.....	25
2.8.1. Cinética de Michaelis – Menten .....	27
III. MATERIALES Y METODOS .....	30
3.1. Lugar de ejecución.....	30
3.2. Materia prima .....	30
3.3. Equipos, materiales e insumos .....	30
3.3.1. Equipos e instrumentos .....	30
3.3.2. Materiales de laboratorio .....	31
3.3.3. Insumos .....	31

3.4. Metodología experimental .....	32
3.4.1. Obtencion de alcohol apartir de zumo de piñacon la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	32
3.4.2. Obtención de alcohol a partir de zumo de piña con la levadura silvestre.....	35
3.5. Métodos de análisis.....	38
3.5.1. Ajustar el modelo cinético de Michaelis – Menten en función al parámetro de CO <sub>2</sub> en la fermentación de zumo de piña sobremadurada .....	38
3.5.2. Evaluar dos tipos de levadura ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y levadura silvestre de fruta) en la cinética de la fermentación de zumo de piña sobremadurada y obtención de etanol .....	38
3.6. Diseño de investigación .....	40
3.6.1. En la primera etapa: efecto de las cantidades de levadura, °Brix y pH en la fermentación de zumo de piña utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . .	41
3.6.2. En la segunda etapa: efecto de las cantidades de levadura, °Brix y pH en la fermentación de zumo de piña utilizando levadura silvestre. ....	44
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	47
4.1. Ajuste del modelo cinético de Michaelis – Menten en función al parámetro de CO <sub>2</sub> con dos tipos de levaduras <i>Saccharomyces c.</i> y levadura silvestre.....	47
4.1.1. Concentración de CO <sub>2</sub> durante el proceso de fermentación con la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	47
4.1.2. Concentración de CO <sub>2</sub> durante el proceso de fermentación con la levadura silvestre.....	52
4.2. Evaluación de dos tipos de levadura ( <i>saccharomyces cerevisiae</i> y silvestre) en la producción de alcohol durante la fermentación de zumo de piña .....	57
4.2.1. Efectos de las variables de pH, °Brix y Cantidad de levadura. En la obtención de alcohol utilizando la levadura <i>Saccharomyces c</i> .....	57
4.2.2. Efectos de las variables de pH, °Brix y Cantidad de levadura. En la obtención de alcohol utilizando la levadura silvestre.....	57
CONCLUSIONES .....	70
RECOMENDACIONES .....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	72
ANEXOS .....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura de la glucosa .....	16
Figura 2. Estructura de fructosa.....	17
Figura 3. Estructura de la sacarosa. ....	17
Figura 4. Curva de crecimiento de los Microorganismos. ....	22
Figura 5. Cinética de Fermentación alcohólica. ....	23
Figura 6. Velocidad de reacción y constante de Michaelis - Menten.....	27
Figura 7. Velocidad inicial en función de la [S].....	29
Figura 8. Diagrama de flujo para la fermentación de zumo de piña con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	32
Figura 9. Diagrama de flujo para la fermentación de zumo de piña con levadura silvestre de la fruta.....	35
Figura 10. Transformación lineal de Michaelis-Menten.....	39
Figura 11. CO <sub>2</sub> en función al tiempo .....	47
Figura 12. Ajuste de la curva de CO <sub>2</sub> y Presión con el software de Multilab...48	48
Figura 13. Cinética de la reacción del primer orden de 1/ $\mu$ vs 1/CO <sub>2</sub> .....	50
Figura 14. CO <sub>2</sub> en función al tiempo .....	52
Figura 15. Ajuste de la curva del CO <sub>2</sub> y presión con el software de Multilab. .53	53
Figura 16. Cinética de la reacción del primer orden de 1/ $\mu$ vs 1/CO <sub>2</sub> .....	55
Figura 17. Diagrama de Pareto para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	58
Figura 18. Efectos principales para el porcentaje de la concentración de alcohol con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	59
Figura 19. Superficie de respuesta estimación con la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	62
Figura 20. Contornos de la superficie de respuesta estimada con la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	62
Figura 21. Diagrama de Pareto para levadura silvestre. ....	64
Figura 22. Efectos principales para la concentración de alcohol con la levadura silvestre. ....	65
Figura 23. Superficie de respuesta estimada con la levadura silvestre.....	68
Figura 24. Contornos de la superficie de respuestas estimada. ....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición por 100 gramos de porción comestible de la piña. ....	14
Tabla 2. Cinco niveles de Diseño Central Compuesto (DCC) para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	41
Tabla 3. Factores y niveles para la fermentación de zumo de piña con la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	42
Tabla 4. Valores extremos de los factores en estudio .....	42
Tabla 5. Número de tratamientos para tres factores en un DCC para la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	43
Tabla 6. Cinco niveles de Diseño superficie de respuestas para levadura silvestre. ....	44
Tabla 7. Factores y niveles para la fermentación de zumo de piña sobremadurada con la levadura silvestre.....	45
Tabla 8. Valores extremos de los factores en estudio .....	45
Tabla 9. Numero de tratamientos para tres factores en un DCC para levadura silvestre. ....	46
Tabla 10. Cinética de reacción de fermentación de zumo de piña con la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	50
Tabla 11. Cinética de reacción de fermentación de zumo de piña con la levadura silvestre.....	54
Tabla 12. Optimización de las variables para la concentración de alcohol con la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	60
Tabla 13. Concentración de alcohol en el mosto fermentado. ....	63
Tabla 14. Optimización de las variables para la concentración de alcohol con la levadura silvestre.....	66



## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo, aplicar el modelo cinético de Michaelis – Menten en función al parámetro de CO<sub>2</sub> en la fermentación de zumo de piña sobremadurada y evaluar dos tipos de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y levadura silvestre). El proceso fermentativo se realizó aislando la levadura silvestre de las cascaras de piña (*Ananas comosus*), de la variedad Golden y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó como microorganismo productor para la fermentación de zumo de piña. Las variables que se evaluaron a diferentes condiciones fueron el ° Brix, pH y Cantidad de levaduras. Con este propósito, se utilizó el diseño central compuesto rotatable (DCCR), a 95% de nivel de confianza. Los parámetros pH (5) y °Brix (16.5) presentaron los mejores resultados con un tiempo de fermentación de 72 horas. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* mostro mayor concentración de alcohol que fue del 1°GL. Mientras la levadura silvestre obtuvo 0.1°GLde alcohol. Asimismo se ajustó la cinética de fermentación de zumo de piña al modelo cinético de Michaelis – Menten, obteniéndose los parámetros cinéticos del modelo: las constantes  $\mu_{\max}$  0.00297s<sup>-1</sup> y K<sub>m</sub> 5.940g/L para *Saccharomyces cerevisiae* y  $\mu_{\max}$  0.0468s<sup>-1</sup> y K<sub>m</sub> 140.400g/L para la levadura silvestre. Finalmente la levadura *Saccharomyces cerevisiae* evidencio mejores resultados en cuanto a la velocidad máxima y porcentaje de alcohol.

**Palabras claves:** Fermentación, modelo cinético, zumo y levadura.

## ABSTRACT

The objective of this research was to apply the kinetic model of Michaelis - Menten in function of the CO<sub>2</sub> parameter in the fermentation of overripe pineapple juice and to evaluate two types of yeast (*Saccharomyces cerevisiae* and wild yeast). The fermentative process was carried out isolating the wild yeast from the pineapple peel (*Ananas comosus*), of the Golden variety and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was used as a producer microorganism for the fermentation of pineapple juice. The variables that were evaluated at different conditions were the ° Brix, pH and Amount of yeasts. For this purpose, the rotatable composite central design (DCCR) was used, at a 95% confidence level. The parameters pH (5) and ° Brix (16.5) showed the best results with a fermentation time of 72 hours. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* showed a higher concentration of alcohol that was 1 °GL. While the wild yeast obtained 0.1 °GL de alcohol. Likewise, the kinetics of fermentation of pineapple juice was adjusted to the kinetic model of Michaelis-Menten, obtaining the kinetic parameters of the model: the constants  $\mu_{\max}$  0.00297 s<sup>-1</sup> and K<sub>m</sub> 5.940 g/L for *Saccharomyces cerevisiae* and  $\mu_{\max}$  0.0468 s<sup>-1</sup> and K<sub>m</sub> 140,400 g/L for wild yeast. Finally, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* showed better results in terms of maximum speed and alcohol percentage.

**Keywords:** Fermentation, kinetic model, juice and yeast.

## I. INTRODUCCIÓN

La producción de piña en la región de puno se viene incrementando, paralelamente a esto se están formando asociaciones de productores agropecuarios que por la falta de organización en los canales de comercialización de piña hacen que el manejo no sea adecuado en los aspectos económicos, sociales y culturales. La falta de información sobre la innovación y tratamientos tecnológicos de estos frutos hacen que no se aprovechan, generando así problemas como la pérdida económica y la contaminación que genera la pudrición de estas. Así mismo la falta de capacitación a los productores agropecuarios que se le debe brindar para el manejo de postcosecha de la piña con el fin de disminuir las pérdidas.

Por otro lado la fermentación alcohólica constituye un proceso para la obtención de productos muy utilizados desde tiempos muy antiguos, sin embargo este descubrimiento permanece hasta hoy en día en una de las ramas más importantes en cuanto a la obtención de productos de uso industrial, el alcohol es quizás el producto de obtención por fermentación más conocido por sus usos principales que radican en la elaboración de bebidas alcohólicas. Por otra parte este es un proceso bioquímico muy complejo, en su realización y se debe considerarse muchos factores y variables que pueden afectar al producto de interés, tales como pH, °Brix, Temperatura, concentración del microorganismo productor que al relacionarse entre sí adecuadamente pueden llegar a producir grandes cantidades de este metabolito de interés.

Por ello con este trabajo de investigación se pretende aprovechar este valioso recurso, inoculando levadura *Saccharomyces cerevisiae* y silvestre de las cascara de piña, dado que en la región no se cuenta con estudios que reflejen cuales son las

condiciones óptimas de producción y/o procedimientos que indiquen como bajar costos y aumentar la economía de la región.

Visto las necesidades y oportunidades mencionadas este trabajo tuvo los siguientes objetivos:

### **OBJETIVO GENERAL**

- **Aplicar** el modelo cinético de Michaelis – Menten en la fermentación de zumo de piña (*Ananas comosus*) sobremadurada.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Ajustar el modelo cinético de Michaelis – Menten en función al parámetro de CO<sub>2</sub> en la fermentación de zumo de piña sobremadurada.
- Evaluar dos tipos de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y levadura silvestre de la cascara de piña en la cinética de la fermentación de zumo de piña sobremadurada y obtención de alcohol.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Piña

(Somogyi, Ramaswamy, & Will, 2004), La piña (*Ananas comosus*) pertenece a la familia de las Bromeliáceas, genero Anna y especie Sativa siendo no climatérica que producen pequeñas cantidades de etileno.

La piña es una fruta que está constituida por una colección de pequeñas frutas llamadas frutillas, es una planta terrestre, herbácea, perenne y monocárpica de 0.7 metros de altura y con una cobertura de 0.9 a 1.2 metros. La conforma el tallo o pedúnculo, las hojas, las raíces, la inflorescencia o fruto y los hijos. El fruto de piña es una sorosis, es decir, un sincarpo de frutos individuales fusionados; la bráctea, el cáliz y el tejido ovárico se fusionan dentro y entre frutos individuales durante el desarrollo filogenético para formar el fruto colectivo (Sierra, Zapata, & Enid, 2008).

#### 2.1.1. Composición

La piña es rica en carotenos y azúcares. El contenido de azúcares permanece constante después de la cosecha, la acidez y el contenido de carotenos se incrementan moderadamente y la concentración de esteres y el color aumentan considerablemente. Normalmente la piña con un peso superior a los 2.5 kg. Es considerada piña de primera; entre 1.5 o 2.5 kg de segunda y el resto de tercera. De la piña el 13.5% lo conforma la corona, 12% es material aprovechable para jugo, el 54.5% es pulpa y el 20% restante lo forma el cilindro de piña empleando en rebanadas y trozos (10%) y molida (10%) (Rizzo, Davidson, Garbelotto, Slaughter, & Steven, 2002).

**Tabla 1.** Composición por 100 gramos de porción comestible de la piña.

<b>Nutrientes</b>	<b>Cantidad</b>
Agua (g)	86
Proteínas (g)	1
Lípidos (g)	0.1
Carbohidratos (g)	8
Fibra dietaría (g)	2
Sodio (mg)	2
Potasio (mg)	180
Calcio (mg)	27
Magnesio (mg)	11
Hierro (mg)	0.3
Zinc (mg)	0.2
Beta-caroteno ( $\mu$ g)	25
Vitamina C (mg)	21
Tiamina ( $\mu$ g)	40
Riboflavina ( $\mu$ g)	30
Acido nicotínico (mg)	0.1

Fuente: (Macrae, Robinson, & Sadler, 2006).

### 2.1.2. La maduración de las frutas

La madurez es un proceso fisiológico y bioquímico, que está bajo control genético y hormonal, es un proceso que está acompañado por múltiples cambios a nivel celular, más que por un aumento de tamaño (Wills, McGlasson, Grahm, & Joyce, 1998). La etapa de maduración requiere de la síntesis de nuevas proteínas y ARNm, así como

de nuevos pigmentos y componentes de sabor; procesos que requieren de energía y esqueletos arbonados, los cuales son proporcionados mediante el proceso de la respiración (Seymour, Taylor, & Tucker, 2002).

## **2.2. Cambios físicos**

Durante el proceso de maduración de la fruta ocurre una serie de cambios físicos:

### **2.2.1. Aumento de tamaño**

El fruto en el proceso de maduración pasa por cambios de color, textura y sabor. Es importante que estos cambios se completen para que el fruto llegue al máximo de su calidad. (Britton, Pfander, & Liaaen-Jensen, 2003).

### **2.2.2. Ablandamiento de la pulpa**

El ablandamiento de la pulpa se lleva a efecto para inactivar los microorganismos y los enzimas endógenos responsables de reacciones oxidativas e hidrolíticas durante el almacenamiento y para transformar una mezcla poco apetecible de ingredientes alimenticios crudos en un alimento sano y organolépticamente atractivo. Además estos cambios ocurren cuando las células de los frutos son cada vez más permeables durante la maduración, porque la integridad de los compuestos de las paredes celulares se pierde (Fennema, 2000). Por acción del etileno se activan una serie de enzimas hidrolíticas (poligalacturonasa y celulosa), que rompen los enlaces entre los polisacáridos de la pared (Asenjo, Morales de los rios, Sainz, & Tapia, 2016).

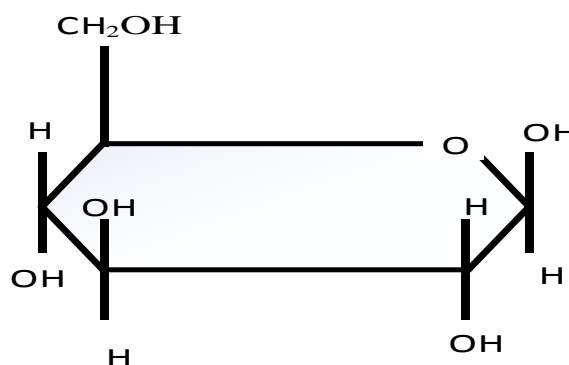
## **2.3. Cambios químicos**

A medida que la maduración avanza, aumenta la proporción de azúcares pequeños, sacarosa, que procede de la hidrólisis del almidón, resultando el producto más dulce hasta llegar a un límite. Las pectinas tienen una gran importancia en la maduración

provocando los cambios de textura en las frutas (Solarte, Hernandez, Morales, Fernandez, & Melgarejo, 2009).

Los cambios químicos se debe a la acción de las amilasas que lo desdoblan en azúcares solubles como:

**GLUCOSA**, es el único tipo de carbohidrato (azúcar o almidón) que el músculo esquelético puede metabolizar fácilmente para energía y almacenarlo como glucógeno. Tal como se muestra en la figura 1. (Daoudi, y otros, 2010).

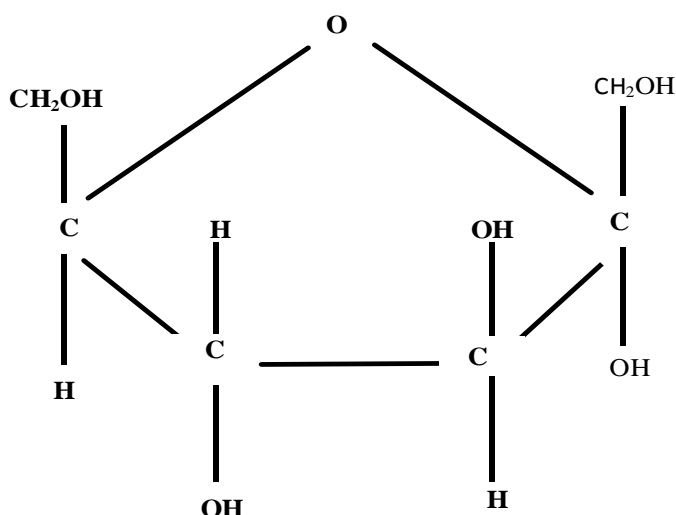


**Figura 1.** Estructura de la glucosa

Fuente: (Daoudi, y otros, 2010).

**FRUCTOSA**, Es una cetohexosa que se encuentra en las frutas. Forma parte junto con la glucosa del disacárido sacarosa. En el hígado se transforma en glucosa, por lo que posee para nuestro organismo el mismo valor energético que ésta, como se aprecia en la figura 2. (Fennema, 2000).

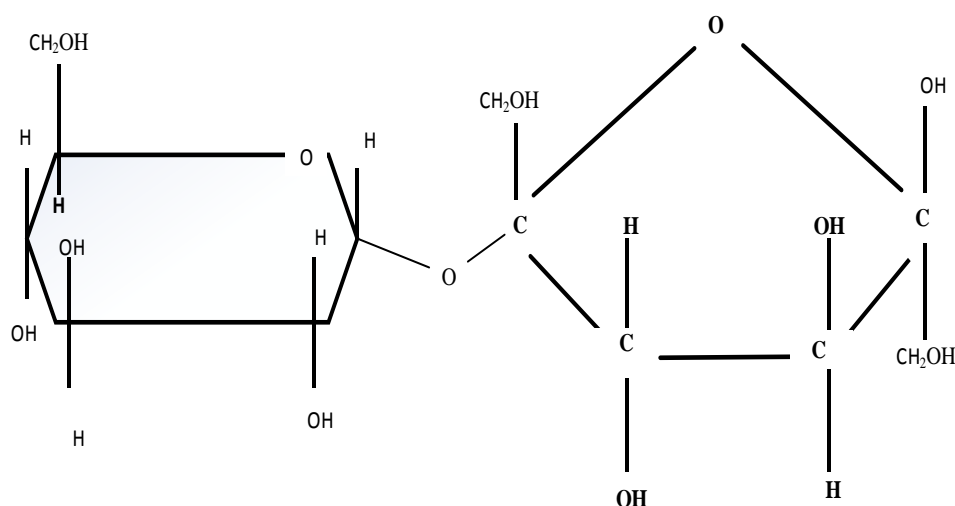




**Figura 2.** Estructura de fructosa.

Fuente: (Fennema, 2000).

**SACAROSA**, es un compuesto químico del grupo de los hidratos de carbono que se disuelven en agua con facilidad y es incoloro. En la figura 3 se puede ver la estructura de la sacarosa, es decir está formado por dos azúcares simples que conforman como son la glucosa y la fructosa (Pelayo & Cantwell, 2007).



**Figura 3.** Estructura de la sacarosa.

Fuente: (Pelayo & Cantwell, 2007).

## 2.4. Cambios de azúcares

A medida que el almidón va siendo hidrolizado aumenta el contenido en azúcares, y en mayor contenido es de sacarosa (azúcar de mesa), en tanto la evolución de los ácidos son formados por síntesis en el protoplasma (conjunto de elementos que constituyen la célula) y su contenido en el fruto aumenta durante su crecimiento, pero a medida que aumenta la maduración su contenido va disminuyendo. A medida que va desarrollando los cambios evolución de azúcares los compuestos del tanino provocan una fuerte astringencia al fruto maduro. Lo mismo que en los ácidos, su contenido aumenta al principio pero decae a medida que avanza la maduración (Britton, Pfander, & Liaaen-Jensen, 2003).

La estructura primaria de las proteínas contiene varias cadenas laterales reactivas. En donde se pueden alterar las propiedades fisicoquímicas de las proteínas y mejorar sus propiedades funcionales modificando químicamente las cadenas laterales. Sin embargo, debe advertirse que aunque la destrucción química de los aminoácidos pueda mejorar las propiedades funcionales, también puede perjudicar a su valor nutritivo, para dar origen a algunos derivados aminoácidos tóxicos y causar problemas legales (Fennema, 2000).

## 2.5. Formación de alcoholes, aldehídos y ésteres

Los grupos hidroxilo de los carbohidratos, al igual que los grupos hidroxilo de los alcoholes simples, forman ésteres con ácidos orgánicos e inorgánicos en la naturaleza, existen acetatos, semiesteres de succinato y otros esterres de ácidos carboxílicos. Que se encuentran especialmente formando parte de polisacáridos (Tungland & Meyer, 2002).

El aldehído responsable en los cambio de aroma en las frutas es el acetaldehído y que este aldehído en exceso produce una aroma desagradable en los frutos. Por otro

lado los esteres son sustancias aromáticas que le confieren a la fruta su aroma característico. Entre los principales encontramos: esteres amínicos de los ácidos: acético, fórnico, caproico y caprílico (Mathews, Ahern, & Van Holde, 2002).

## **2.6. Frutas sobremaduras**

Los cambios más palpables durante el proceso de maduración son el color, sabor, textura, tamaño, aroma, apariencia, color de pulpa, brillantez, etc. Estos cambios son el resultado de la profunda reestructuración metabólica y química que se desencadena dentro del fruto. En los frutos climatéricos, este proceso es controlado, fundamentalmente por el etileno y su actividad respiratoria (Berger, 2004).

Los frutos dañados, sobremaduros o con fisuras en la corteza se presentan procesos de fermentación en la pulpa, resultado del desarrollo de levaduras y bacterias (Paull & Chen, 2000).

En la práctica, determinar el estado de madurez en base a los cambios bioquímicos sucedidos en el fruto resulta laborioso e impráctico. Para esta finalidad se han establecido escalas comerciales que facilitan la identificación del estado de madurez basados simplemente en la coloración de la cáscara para el aprovechamiento de los azúcares fermentables. Se considera que una piña está madura cuando el 100% de cáscara es amarilla (Berger, 2004).

### **2.6.1. Piña sobremadura**

Las diferentes etapas de desarrollo de un fruto son: Sazonamiento, Maduración y Senescencia. Estos nombres fueron asignados en base a una serie de cambios físicos y bioquímicos ocurridos en tiempos específicos durante el desarrollo de la fruta. El conocimiento de los cambios que normalmente ocurren en la piña es de gran importancia,

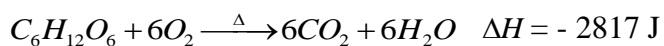
ya que nos permite saber el estado de madurez adecuado en que debe ser cosechada (Tejeda, y otros, 2010).

En poscosecha de La piña es posible encontrar escamas sobre la corteza de la zona basal del fruto. Igualmente, se manifiesta el daño denominado pudrición del fruto o pudrición negra, causado por *Thielaviopsis paradoxa* De Seynes, este daño se desarrolla de la base del fruto hacia la corona y se caracteriza por ser una pudrición negra acuosa que invade el corazón del fruto y se extiende hacia el mesocarpio (Morales, 2001). El pardeamiento del mesocarpio de la piña suele empezar en torno de los haces vasculares, posiblemente a causa de la oxidación de fenoles en los tejidos por acción de la polifenoloxidasas (Das, Bhat, & Gowda, 1997)

## 2.7. Fermentación

La fermentación es un proceso metabólico en las cuales que una sustancia orgánica se convierte en producto por la acción de microorganismos o de enzimas. Así mismo la participación de los microorganismos puede requerir  $O_2$  (fermentación aeróbica). La fermentación aeróbica puede llevar a la descomposición de los carbohidratos u otra sustancia fermentable hasta la oxidación completa o sea hasta obtener dióxido de carbono y agua (Levenspiel, 2004).

El proceso tiene la siguiente estequiometria.



*Glucosa*

(Vasquez & Dacosta, 2007), mencionan que la fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico exotérmico, que se caracteriza por la degradación incompleta de azúcar. El proceso tiene la siguiente estequiometría.



### 2.7.1. Condiciones de fermentación

Las condiciones para el crecimiento microbiano, desde el punto de vista de la fermentación, requieren encontrarse en un medio adecuado, tanto de temperatura, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, presión, agua, nutrientes y pH. Como de sustancias alimenticias que ella puede asimilar con facilidad, en la mayoría de las industrias la fuente de energía y de materia son los azúcares (Leveau & Bouix, 2000).

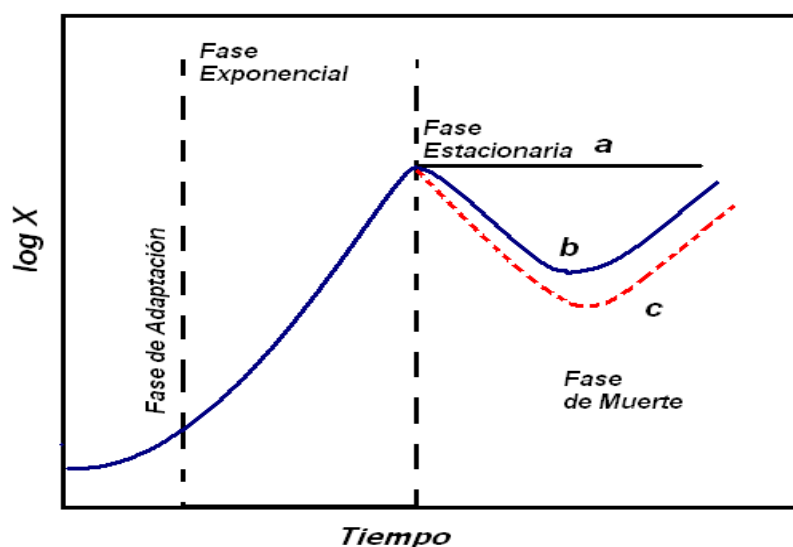
Los microorganismos necesitan carbono, nitrógeno, minerales a veces factores de crecimiento, agua y oxígeno (son aerobios) para formar su biomasa y como fuente de energía para biosíntesis y mantenimiento celular (Smith, 2006)

Los constituyentes del medio pueden influir profundamente en la fisiología de los microorganismos y con frecuencia la optimización del proceso de fermentación de producto va asociada con formas fisiológicas particulares y condiciones como la temperatura, el tiempo, pH requiere una temperatura adecuada y pH para su desarrollo, la cual se muestra particularmente activa y en perfecto equilibrio, pero es necesario que los nutrientes (fuente de materia) contengan todos los elementos constitutivos de la masa celular en las proporciones requeridas para la composición interna del organismo (Montoya , 2005).

### 2.7.2. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es un proceso metabólico que se caracteriza por la degradación incompleta del azúcar, anhídrido carbónico y etanol a través de enzimas de ciertos microorganismos, levaduras básicamente; llevada a cabo por levaduras del género *Saccharomyces cerevisinas* que actúa como complejo enzimático para la degradación de los azúcares tales como sacarosa y maltosa (Vasquez & Dacosta, 2007).

En la figura 4. Se muestra la curva de crecimiento de los Microorganismos en sus distintas fases durante la fermentación.



**Figura 4.** Curva de crecimiento de los Microorganismos.

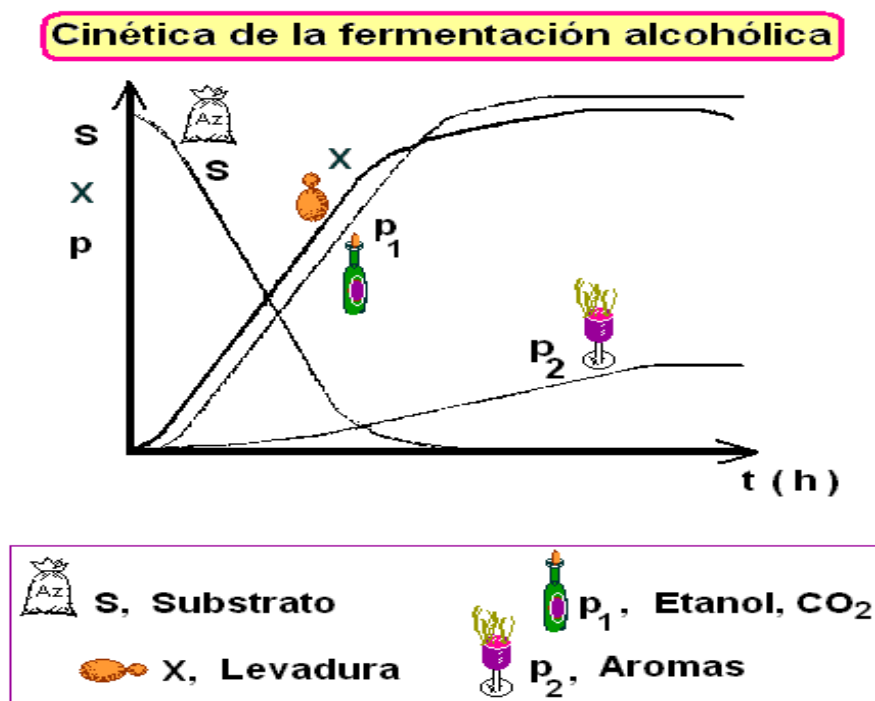
Fuente: (Levenspiel, 2004).

La curva de crecimiento de microorganismos se observa 4 fases distintas; una fase de adaptación, crecimiento exponencial, otra estacionaria y una de muerte. Cada fase es de importancia potencial en procesos microbiológicos (Wang, y otros, 1979).

En cuanto a las velocidades de formación de etanol y CO<sub>2</sub> estas están ligadas directamente al crecimiento de la levadura así como se observa en la figura 5. Asimismo

la cinética de formación de cada producto puede representarse en un cultivo discontinuo (Levenspiel, 2004).

En la figura 5. Se muestra la curva de la cinética de Fermentación alcohólica con sus 4 fases distintas que intervienen en la fermentación.



**Figura 5.** Cinética de Fermentación alcohólica.

Fuente: (Muller, 2010).

Los rangos de pH y temperatura óptimos para obtener mayores rendimientos y velocidades de producción de etanol y CO<sub>2</sub> en los cultivos sumergidos son a pH de 4 a 5.5 y temperatura de 28 a 35°C, respectivamente. Estas condiciones se prefieren para fermentar mostos destinados a la destilación, y duran entre 18 y 72 h. Sin embargo, cuando se elaboran productos que no van ser destilados, se seleccionan temperaturas bajas para favorecer la formación equilibrada de aromas y sabores (Vasquez & Dacosta, 2007).

La ingeniería bioquímica en la evaluación de datos en la concentración celular, viabilidad y observación microscópica de la distribución de células *Saccharomyces cerevisiae* en esferas de carraginita, llevados a cabo en un reactor de lecho empacado obteniendo mejores resultados de fermentación en el contorno del reactor, esto debido a la transferencia adecuada de calor de 30- 35 °C (Ward, 1991).

También existen algunos factores que afectan de forma importante el desarrollo de la fermentación y con ello el rendimiento como son el tipo de levadura, la concentración del sustrato, la temperatura, el pH y entre otros (Hansen, Niccen, Summer, Nielsen, & Arneborg, 2001).

### 2.7.3. Fermentación con levaduras

Aproximadamente el 96% de la fermentación del etanol se lleva a cabo mediante cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se produce durante la glicolización etanol, la reacción global es la siguiente:



El rendimiento teórico de un gramo de glucosa es de 0.51g de etanol y 0.49g de CO<sub>2</sub> sin embargo en la práctica aproximadamente el 10% de la glucosa se transforma en biomasa y el rendimiento de etanol y CO<sub>2</sub> alcanzan el 90% del valor teórico (Ho, Da Conceicao, Silva, & Hogg, 2003).

La *Saccharomyces cerevisiae* es anaerobia facultativa, por lo que se obtiene un mayor rendimiento de biomasa en aeróbiosis que en anaerobiosis. El cultivo aerobio es importante durante la propagación del inóculo, llamado también cultivo semilla, siendo su objetivo la acumulación del mayor número de células sanas en el menor tiempo posible.



(Chanprasartsuk , Prakitchaiwattana, Sanguandeeikul, & Fleet, 2010), menciona que los demás levaduras de vino y en particular las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* no se cualquiera de los sistemas de fermentación muestreados que aparentemente es diferentes de los otros jugos de frutas. Estos hallazgos sugieren que el jugo de piña recién triturado puede tener algunos efectos en las otras levaduras autóctonas que tienen un papel importante en la fermentación alcohólica.

En un cultivo sumergido (cinética), la velocidad específica de crecimiento de la levadura se puede representar con la ecuación cinética general para los microorganismos unicelulares: (Levenspiel, 2004).

$$\mu = \frac{\ln(X_2 / X_1)}{\Delta t}$$

**Dónde:**

ln: Logaritmo natural, adimensional.

$\mu$ : Velocidad específica de crecimiento de la levadura,  $h^{-1}$ .

$X_1$ : Concentración de biomasa de levadura al tiempo  $t_1$ ,  $g_x L^{-1}$ .

$X_2$ : Concentración de biomasa de levadura al tiempo  $t_2$ ,  $g_x L^{-1}$ .

$\Delta t$ : Intervalo de tiempo  $t_2 - t_1$ , h.

## 2.8. Modelamiento cinético.

Como una introducción, debemos mencionar que la vida microbial es esencialmente química en la naturaleza. En una célula viviente, cientos de reacciones químicas tienen lugar usualmente en forma bien balanceada. La velocidad de la reacción química es descrita con un grupo de modelos matemáticos llamados ecuaciones cinéticas, esta velocidad es una función de la concentración y de los reactantes (Erazo & Palomino, 1999).

Para entender el comportamiento de cualquier fermentación, es necesario el estudio cinético que consiste en la medición o estimación de las velocidades de síntesis celular, formación de productos y de los efectos del medio ambiente sobre estas velocidades la fig. 6. Los modelos a nivel celular abarcan mayormente proceso de lote o batch, que son los de mayor importancia comercial (Quintero, 1993).

(Erazo & Palomino, 1999), menciona que en los modelos cinéticos, es esencial la distinción entre modelos estructurados y no estructurados. De manera que los modelos matemáticos de una reacción bioquímica están basados en los modelos cinéticos para el crecimiento de una población de microorganismos. La descripción matemática varía en complejidad dependiendo del número y tipo de asunciones realizadas.

Los modelos cinéticos para el crecimiento de una población de microorganismos constituyen la base para un modelo matemático global en un reactor bioquímico (Erazo & Palomino, 1999).

(Erazo & Palomino, 1999), en su artículo de cinética de reacciones bioquímicas presenta el modelo cinético de Michaelis - Menten para la determinación de la velocidad de crecimiento celular, el cual se define como:

Modelo de Michaelis - Menten:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Dónde:

$\mu$ : velocidad de la reacción del sustrato.

S: constante de saturación.

$\mu_{\max}$ : velocidad máxima

$k_m$ : constante de Michaelis Menten.

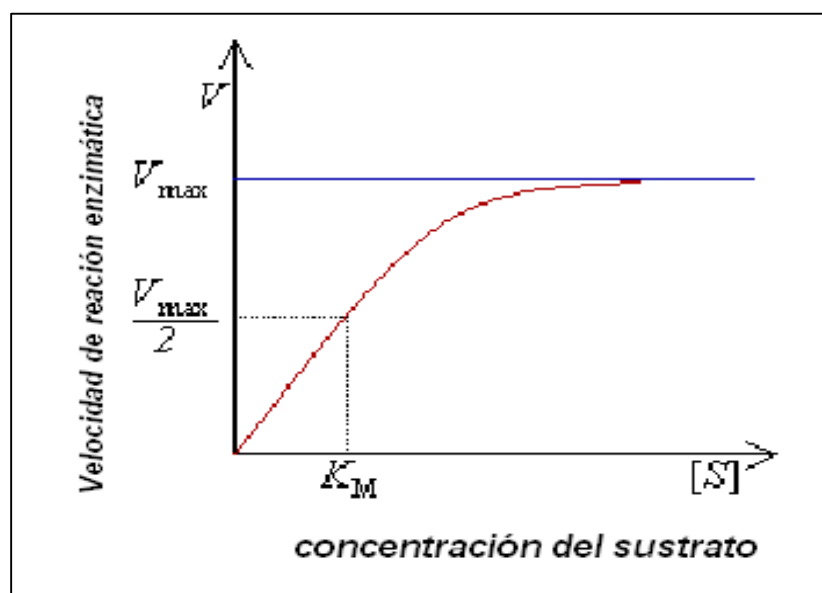
### 2.8.1. Cinética de Michaelis – Menten

La cinética de Michaelis - Menten describe la velocidad de reacción de muchas reacciones enzimáticas. Su nombre es en honor a Leonor Michaelis y Maud Menten. Este modelo sólo es válido cuando la concentración del sustrato es mayor que la concentración de la enzima, y para condiciones de estado estacionario, o sea que la concentración del complejo enzima-sustrato es constante.

#### a). Determinación de Constantes

Para determinar la velocidad máxima de una reacción enzimática, la concentración de sustrato ( $[S]$ ) se aumenta hasta alcanzar una velocidad constante de formación de producto.

Fig. 6. Esa es la velocidad máxima ( $\mu_{max}$ ) de la enzima. En este caso, los sitios activos de la enzima están saturados con sustrato. En la figura 6. Se muestra el grafico de velocidad de reacción y constante de Michaelis – Menten durante la fermentación.



**Figura 6.** Velocidad de reacción y constante de Michaelis - Menten

Fuente: (Connor , 2000)

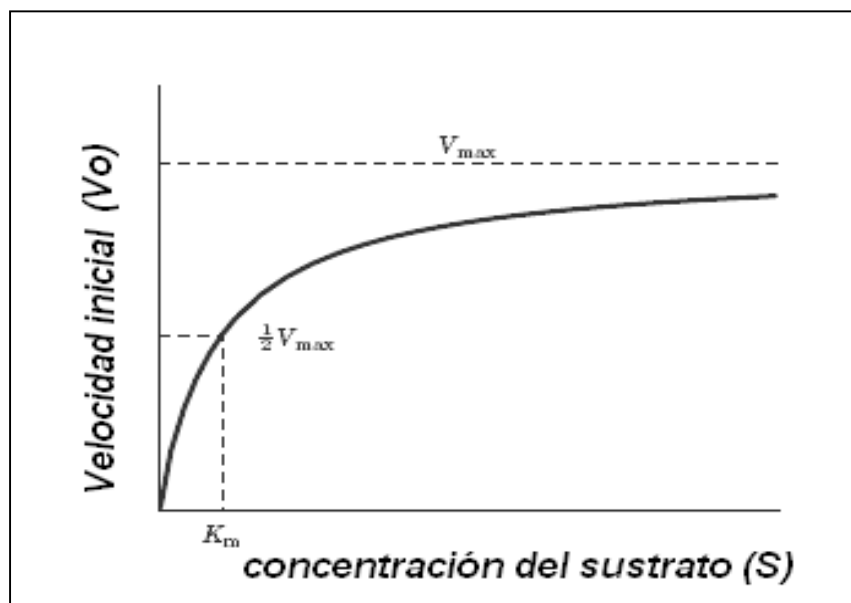
**b). Velocidad de reacción/velocidad ' $\mu$ '**

La velocidad ( $\mu$ ) indica el número de reacciones por segundo que son catalizadas por una enzima. Con concentraciones crecientes de sustrato [S], la enzima va acercándose asintóticamente su velocidad máxima ( $\mu_{\max}$ ), pero nunca la alcanza. Por esta razón, no hay un [S] determinado para la  $\mu_{\max}$ . De todas formas, el parámetro característico de la enzima está definido por la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima ( $\mu_{\max}/2$ ).

**c). Constante de Michaelis - Menten ( $K_m$ )**

Entonces, aunque la concentración de sustrato a  $V_{\max}$  no puede ser medida exactamente, las enzimas pueden ser caracterizadas por la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. Esta concentración de sustrato se conoce como constante de Michaelis - Menten ( $K_m$ ), tal como se muestra en la figura 7.

Esta constante representa para enzimas que exhiben una cinética de Michaelis - Menten simple, la constante de disociación (la afinidad del complejo enzima - sustrato (ES) por el sustrato). Valores bajos indican que el complejo (ES) está unido muy fuertemente y raramente se disocia sin que el sustrato reaccione para dar producto.



**Figura 7.** Velocidad inicial en función de la [S].

Fuente: (Connor , 2000).

#### **d). Parámetros derivados de análisis de Michaelis – Menten.**

**$K_m$ :** indica la concentración de sustrato intracelular es una constante para una enzima determinada  $K_m = (k_2 + k_{-1}) / k_1$  está relacionada con la “afinidad” de la enzima por su sustrato.

**$\mu_{max}$ :** es un parámetro directamente proporcional a la concentración de enzima total  $\mu_{max} = k_{cat} [Et]$  no es una constante ya que depende de [Et].

**Número de recambio:** Número de moléculas de sustrato transformados por minuto por mol de enzima  $K_{cat}$  [1/s] mide la eficiencia de la enzima “turnover number” sirve para comparar enzimas  $1/k_{cat}$  [seg] tiempo de un ciclo catalítico.

**Constante de especificidad:** sirve para comparar la eficiencia de una enzima dada para distintos sustratos  $K_{cat}/K_m$ .

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Lugar de ejecución

Este trabajo de investigación experimental se realizó en la ciudad de Puno dentro de campos universitario de la Universidad Nacional del Altiplano - PUNO.

- Laboratorio de microbiología de los alimentos y laboratorio de pos cosecha de la EPIAI de la FCA – UNA - PUNO.
- Laboratorio de Operaciones Unitarias de la FIQ – UNA - PUNO.

#### 3.2. Materia prima

**Piña:** materia prima que se utilizó fue de la variedad Golden. Con pesos de 1.5kg a 2kg, procedente de la provincia de Sandía, distritos de San Juan de Oro y Yanahuaya.

La levadura comercial: que se utilizó para este trabajo de investigación fue *Saccharomyces cerevisiae* (comercial) y levadura silvestre (Cascaras de la piña).

#### 3.3. Equipos, materiales e insumos

##### 3.3.1. Equipos e instrumentos

- Equipos de control para múltiples aplicaciones, modelo MULTILOG - PRO, marca ITP (Israel), recolector de datos, con sensor de temperatura, presión, CO<sub>2</sub> y pH.
- Reactor de vidrio para la fermentación de 650 ML Y 2L DE CAPACIDAD (C-246) con tapas metálicas.
- Potenciómetro digital: CRISON, PH METER DIGIT 505.
- Balanza analítica digital: METTLER, CAP.160G EXACTITED 0.001G.
- Refractómetro digital: ABBE, BLEEKER, 0-100% DE SACAROSA, HOLANDA.

- Sistema baño María: CAPACIDAD DE 3 A 4 LITROS.
- Licuadora: 4093 - 0085 - CUP GLASS JAR 2 - SPEED BEEHIVE BLENDER, BRUSHED STAINLESS.
- Extractor de jugo: Modelo. 3169.
- Alcoholímetro digital: PROFESIONAL CON SENSOR ÚLTIMA GENERACIÓN 309.
- Termómetro, IR FLUKE MINI 62
- Estufa, MARCA MEMMET

### 3.3.2. Materiales de laboratorio

- Vaso de precipitados (100ml. de capacidad, de vidrio pirex).
- Probeta de 100ml.
- Pipeta (5ml. de capacidad, de vidrio pirex).
- Picetas
- Cronometro
- Tubos de ensayo (vidrio pirex)
- Cuchillo de acero inoxidable
- Cuchara de acero inoxidable
- Hisopos estéril

### 3.3.3. Insumos

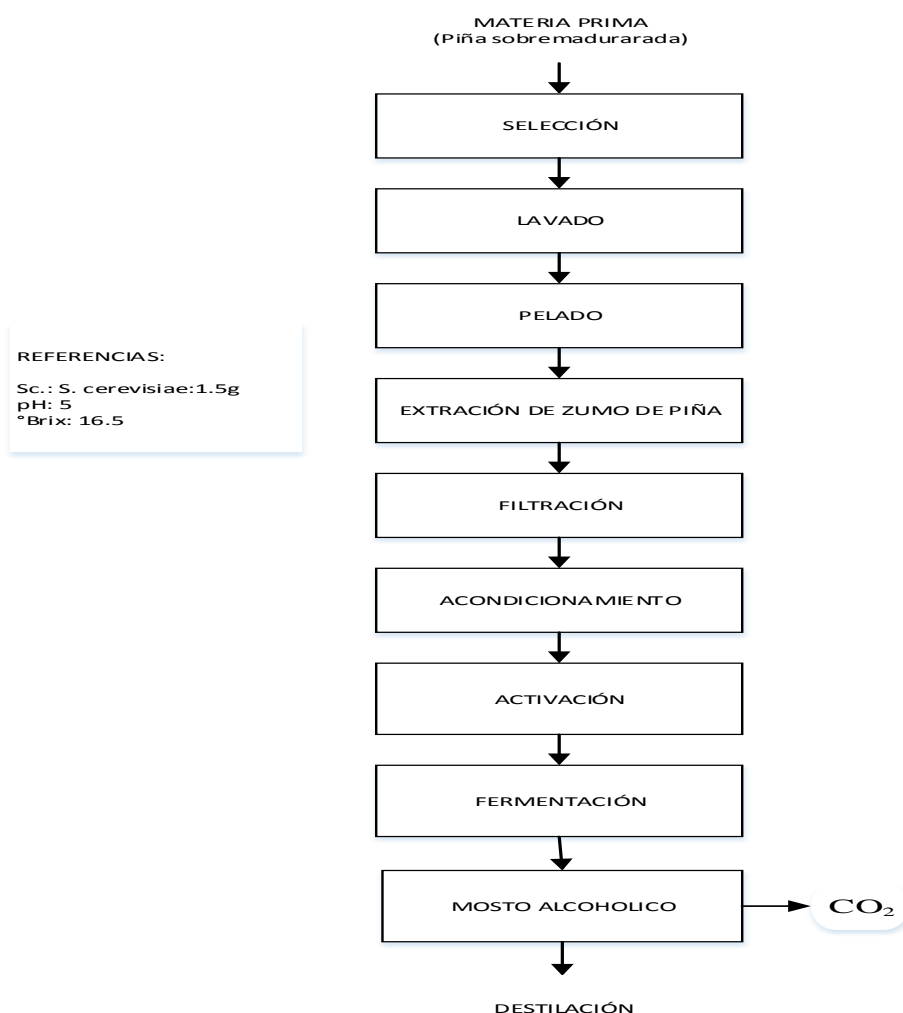
- Azúcar blanca refinada.
- Agua de destilada
- Ácido cítrico de grado alimentario con 99.5% de pureza.
- Alcohol medicinal 70°.

### 3.4. Metodología experimental

El trabajo de investigación se realizó de acuerdo a las siguientes etapas:

#### 3.4.1. Obtención de alcohol a partir de zumo de piña con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Para la fermentación alcohólica zumo de piña sobremadurada se realizó las siguientes etapas la cual se muestra en la figura 8, el diagrama de flujo para la obtención de alcohol a partir de zumo de piña (*Ananas comosus*) con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.



**Figura 8.** Diagrama de flujo para la fermentación de zumo de piña con *Saccharomyces cerevisiae*.



**Materia prima:** Para realizar el presente trabajo de investigación se utilizó piña sobremadurada como materia prima de la variedad Golden, proveniente de los distritos de San Juan de Oro y Yanahuaya.

**Selección:** Antes del lavado, las piñas fueron seleccionadas mediante inspección visual, eliminando aquellos frutos que presentan un alto grado de deterioro para así disminuir los efectos de contaminación que dichos residuos generan.

**Lavado:** El lavado se realizó con agua potable para eliminar las impurezas que están adheridas en el fruto, como pueden ser la suciedad, tierra, bacterias superficiales, mohos y otros contaminantes como insecticidas y fertilizantes.

**Pelado:** El pelado se realizó manualmente, con la ayuda de un cuchillo de acero inoxidable, en esta operación se eliminó la cáscara de la piña y se colocó los pedazos de la piña en un recipiente que luego se sometió a un proceso de extracción del líquido.

**Extracción de zumo de piña:** La extracción de zumo de piña se realizó con una extractora de jugos.

**Filtración:** Se filtró el zumo de piña para separar las partículas mayores y fibras con un tamiz.

**Acondicionamiento:** Se mezcló la muestra y los insumos en un recipiente. Agregándose 500 ml de zumo de piña, 20 gramos de azúcar, 0.02 de ácido cítrico y levadura 1,5 gramos. Este proceso se realizó con el fin de obtener resultados óptimos en la fermentación de zumo de piña.

**Activación:** La activación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se realizó con la adición de agua hervida tibia a 30°C en un tubo de ensayo de 50ml al cual se añade 30ml de zumo de piña, levadura de 1.5g. Luego es cubierto y dejado en reposo en una

incubadora a una temperatura de 27°C por un espacio de 5 a 10 minutos hasta que se note las burbujas en la superficie del tubo de ensayo, una vez activada la levadura se inocula en un reactor que contiene el mosto corregido. Finalmente para iniciar la fermentación alcohólica es necesario realizar una agitación para homogenizar la muestra.

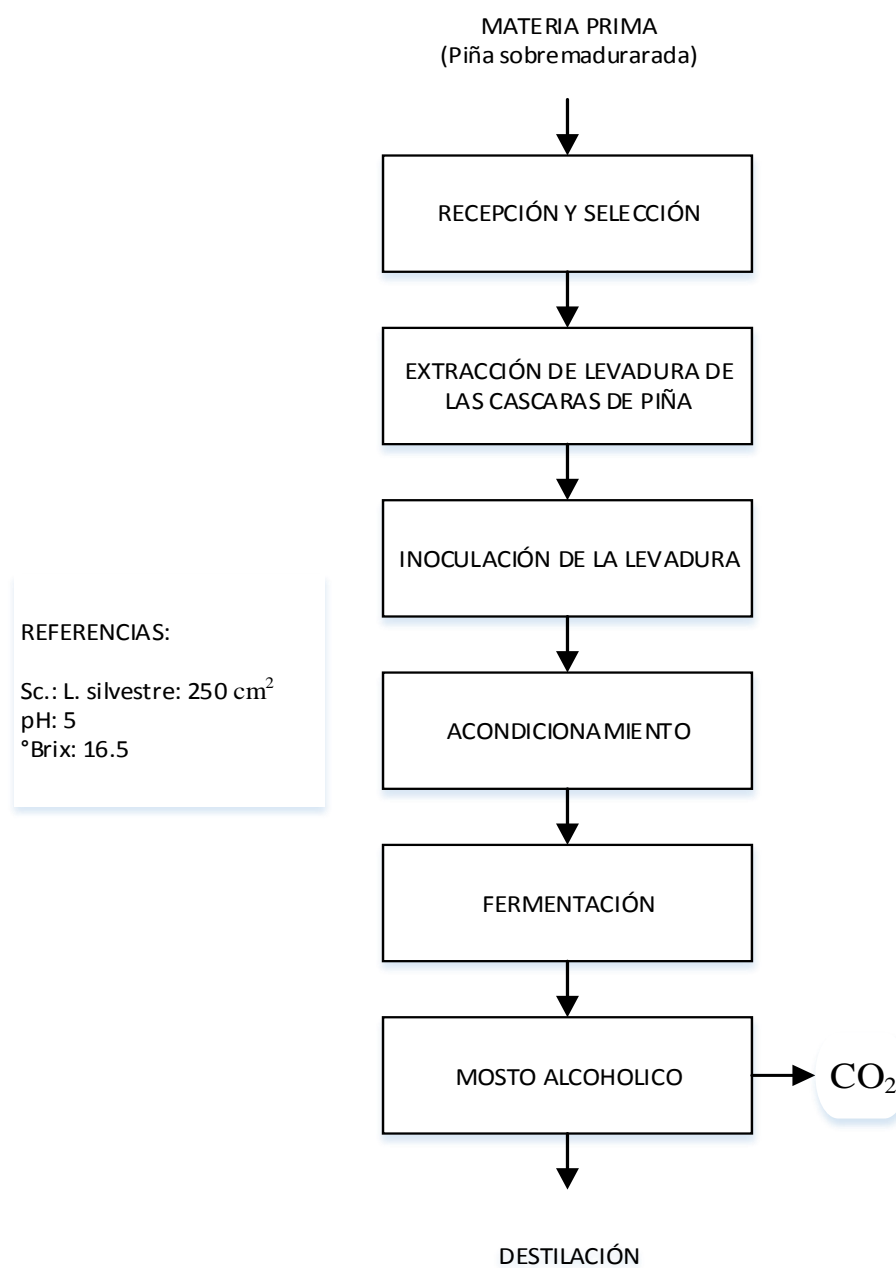
**Fermentación:** Para la fermentación alcohólica se utilizó levadura seca liofilizada, se preparó 500 ml de la muestra de zumo de piña en un reactor de vidrio de capacidad de 1 litro con una concentración de °Brix 16.5 y su pH se ajustó a 5. Luego el reactor de vidrio fue cubierto y dejado en reposo en baño maria a una temperatura de 35°C. Por un tiempo de fermentación de 72 horas.

**Mosto alcohólico:** Una vez que se inicie la fermentación se controló el CO<sub>2</sub>. Así mismo se procedió a tomar de datos con el equipo Multilog- Pro. Después se realizó el modelamiento cinético de fermentación de zumo en los datos obtenidos.

**Destilación:** Esta operación se realizó para separar el alcohol producido por fermentación, por un tiempo de 59 minutos.

### 3.4.2. Obtención de alcohol a partir de zumo de piña con la levadura silvestre

En la Figura 9. Se muestra el diagrama de flujo para la obtención de alcohol con levadura silvestre aislado de las cáscaras de piña.



**Figura 9.** Diagrama de flujo para la fermentación de zumo de piña con levadura silvestre de la fruta.

**Materia prima:** Se utilizó piñas sobremaduradas de la variedad Golden, proveniente de los distritos de San Juan de Oro y Yanahuaya.

**Recepción y selección:** Al momento de recepción se verificó a que las piñas se encuentren bien en su apariencia senescente, que no presenten daño físico en la superficie de la fruta. Ya que esto podría alterar algunos cambios fisicoquímicos en la fermentación alcohólica. Después se procedió inmediatamente al pesado.

**Extracción de levadura de las cascaras de piña:** Para este proceso se midió 250cm<sup>2</sup> de la cáscara de piña y con la ayuda de un hisopo se muestreo la levadura silvestre de la superficie de piña, Por otro lado el medio cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C/15 min. También se utilizó como medio de cultivo YPDA (1% extracto de levadura, 2% peptona micológica, 2% de glucosa, 2% agar) suplementado con 25 mg/L de penicilina y cloranfenicol. Así mismo para la siembra de la levadura silvestre se realizaron 3 preparaciones a diferentes diluciones (10<sup>1</sup> y 10<sup>3</sup>). Después las placas se incubaron en una incubadora a 27°C de temperatura por un tiempo de 3 días y posteriormente se hizo el recuento de levadura silvestre dando como resultado 2x10<sup>5</sup> CFU/g.

**Inoculación de la levadura:** La inoculación de la levadura silvestre se realizó con la adición de agua tibia a 30°C, en un tubo de ensayo de 50ml en el cual se añade 30ml de zumo de piña y cáscaras de piña (250cm<sup>2</sup>) como levadura silvestre, luego fue cubierto y dejado en reposo en una incubadora a una temperatura de 27°C por un espacio de 5 a 10 minutos, con un pH óptimo de 5.

La activación de la levadura se nota por la formación de burbujas en la superficie del reactor así mismo para iniciar la fermentación alcohólica es necesario realizar una agitación con el fin de homogenizar, y finalmente dejar en reposo.

**Acondicionamiento:** En este proceso se mezcló la muestra y los insumos en un recipiente. Agregándose 500 ml de zumo de piña, 18gramos de azúcar, 0.02 gramos de ácido cítrico y cascaras de piña (250cm<sup>2</sup>). La cual se realizó con el fin de obtener resultados óptimos en la fermentación de zumo de piña.

**Fermentación:** Para la fermentación se preparó 500ml de zumo de piña con pH de 5 y °Brix de 16.5. Después se procedió a la incubación en baño maria a 35°C de temperatura, por un tiempo de 72 horas.

**Mosto alcohólico:** Una vez que se inicie la fermentación se controló el CO<sub>2</sub>. Después se procedió a tomar de datos con el equipo Multilog- Pro. Esto con la finalidad de realizar el modelamiento cinético de fermentación de zumo de piña.

**Destilación:** Esta operación se realizó para separar el alcohol producido por fermentación, por un tiempo de 59 minutos.

### 3.5. Métodos de análisis

#### 3.5.1. Ajustar el modelo cinético de Michaelis – Menten en función al parámetro de

##### CO<sub>2</sub> en la fermentación de zumo de piña sobremadurada

###### Variables Dependiente:

Cinética de fermentación:

- CO<sub>2</sub> (ppm).

###### Variables Independientes:

Parámetros de operación:

- °Brix. de la mezcla. 15 y 18.
- Cantidad de levadura.

**L. Comercial:** 1g - 2g

**L. Silvestre:** 100cm<sup>2</sup> - 400cm<sup>2</sup>

- pH: 4 - 6

**NOTA:** En este caso los valores son obtenidos del diseño central compuesto (DCC).

#### 3.5.2. Evaluar dos tipos de levadura (*Saccharomyces cerevisiae* y levadura silvestre

##### de fruta) en la cinética de la fermentación de zumo de piña sobremadurada y obtención de etanol

###### Variables Dependiente:

Fermentación:

- Concentración de alcohol en zumo fermentado                      °GL

###### Variables Independientes:

- Parámetros de operación:

En esta fase se adecuó la cinética de fermentación de zumo de piña a la ecuación de Michaelis - Menten mediante la lineación de Lineawearer – Burk que es una ecuación de tipo:  $Y = mx + b$ , que gráfica los recíprocos de ambos lados de la expresión. Tal como se muestra en la figura 10.

Ecuación de Lineweaver-Burk o doble recíproca

$$\text{Lineweaver-Burk} \quad \frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$\text{Eadie-Hofstee} \quad V = -\frac{K_m \cdot V}{[S]} + V_{\max}$$

$$\text{Eadie-Scatchard} \quad \frac{V}{[S]} = -\frac{1}{K_m \cdot V} + \frac{V_{\max}}{K_m}$$

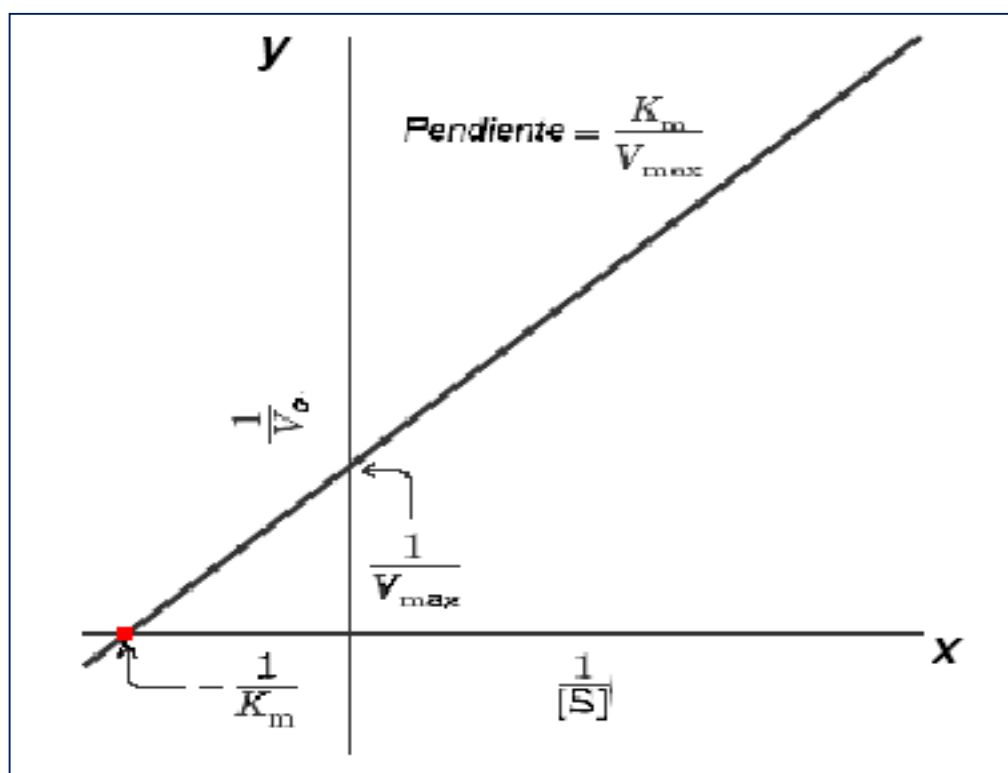


Figura 10. Transformación lineal de Michaelis-Menten

Modelo de Michaelis - Menten:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Dónde:

$\mu$ : velocidad de la reacción del sustrato ( $\text{h}^{-1}$ )

S: concentración de sustrato limitante ( $\text{g/L}$ )

$\mu_{\max}$ : velocidad máxima ( $\text{h}^{-1}$ )

$k_m$ : constante de Michaelis - Menten ( $\text{g/L}$ ).

### 3.6. Diseño de investigación

En el presente trabajo de investigación tiene como variable estudiada a  $\text{CO}_2$ , de tal manera se utilizó el Diseño de superficie de respuestas, Ya que permite evaluar directamente la curvatura de un modelo y encontrar condiciones de operación optima de un proceso (Gutiérrez & De la Vara, 2012).

Además este diseño nos facilita evaluar con cinco niveles de cada factor tal como se muestra en el tabla 2, así mismo en la tabla 3 nos muestra los factores y niveles de estudio, por otra lado en las tablas 4 y 5 se muestran valores extremos de los factores y el número de tratamientos con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.



### 3.6.1. En la primera etapa: efecto de las cantidades de levadura, °Brix y pH en la fermentación de zumo de piña utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

**Tabla 2.** Cinco niveles de Diseño Central Compuesto (DCC) para *Saccharomyces cerevisiae*.

Nivel codificado (Xi)	Denominación
$-\alpha$	Nivel mínimo
-1	Nivel bajo
0	Nivel medio
1	Nivel alto
$+\alpha$	Nivel máximo

Fuente: (Ibañez, 2012).

Para  $k=3$ , y  $\alpha=1.682$

El número de tratamientos es igual:  $N = 2^P + 2P + C$      $\alpha = (2^P)^{1/4}$

Donde:

$N$  : Es el número total de tratamientos.

$2^P$  : Es el número de tratamientos básicos de la parte axial o estrella de combinaciones de tratamientos.

$2P$  : Corresponde a los tratamientos de la parte axial o estrella o combinaciones de tratamientos en los puntos axiliales del diseño.

$C$  : Constituyen en tratamiento central que se repite un número determinado de veces dependiendo del número de factores o replicas en el centro del diseño.

$P$  : Numero de factores de estudio o variables.

**Factores en estudio de levadura *Saccharomyces cerevisiae***

Tabla 3. Factores y niveles para la fermentación de zumo de piña con la levadura

*Saccharomyces cerevisiae*.

FACTOR	NIVEL BAJO	NIVEL ALTO
°Brix. de la mezcla	15	18
Cantidad de levadura (g)	1	2
pH	4	6

**Variables de respuesta**

- Concentración de CO<sub>2</sub> (ppm)

**Tabla 4.** Valores extremos de los factores en estudio

factores de estudio				
Nivel codificado (Xi)	Denominación	°Brix. de la mezcla	Cantidad de levadura (g)	pH
-α	Nivel mínimo	13.977	0.61	3,236
-1	Nivel bajo	15	1	4
0	Nivel medio	16.5	1.5	5
1	Nivel alto	18	2	6
+α	Nivel máximo	19.023	2.38	6,763

Tabla 5. Numero de tratamientos para tres factores en un DCC para la levadura

*Saccharomyces cerevisiae.*

Tratamientos	pH	°Brix de la mezcla (°Brix)	Cantidad de levadura (g)
1	4	15	1
2	6	15	1
3	4	18	1
4	6	18	1
5	4	15	2
6	6	15	2
7	4	18	2
8	6	18	2
9	5	16.5	1.5
10	3.23617	16.5	1.5
11	6.76383	16.5	1.5
12	5	13.8542	1.5
13	5	19.1458	1.5
14	5	16.5	0.618083
15	5	16.5	2.38192
16	5	16.5	1.5

### 3.6.2. En la segunda etapa: efecto de las cantidades de levadura, °Brix y pH en la fermentación de zumo de piña utilizando levadura silvestre.

El diseño estadístico de DCC nos facilita evaluar con cinco niveles de cada factor tal como se muestra en el tabla 6, así mismo en la tabla 7 nos muestra los factores y niveles de estudio, finalmente en las tablas 8 y 9 se muestran valores extremos de los factores y el número de tratamientos con la levadura silvestre.

**Tabla 6.** Cinco niveles de Diseño superficie de respuestas para levadura silvestre.

Nivel codificado (Xi)	Denominación
$-\alpha$	Nivel mínimo
-1	Nivel bajo
0	Nivel medio
1	Nivel alto
$+\alpha$	Nivel máximo

Fuente: (Ibañez, 2012).

Para  $k=3$ , y  $\alpha= 1.682$

El número de tratamientos es igual:  $N = 2^P + 2P + C$      $\alpha = (2^P)^{1/4}$

Dónde:

$N$  : Es el número total de tratamientos

$2^P$  : Es el número de tratamientos básicos de la parte axial o estrella de combinaciones de tratamientos

$2P$  : Corresponde a los tratamientos de la parte axial o estrella combinaciones de tratamientos en los puntos axiliales del diseño

$C$  : Constituyen en tratamiento central que se repite un número determinado de veces dependiendo del número de factores o replicas en el centro del diseño

$P$  : Numero de factores de estudio o variables

### Factores en estudio de levadura silvestre

**Tabla 7.** Factores y niveles para la fermentación de zumo de piña sobremadurada con la levadura silvestre.

FACTOR	NIVEL BAJO	NIVEL ALTO
°Brix. de la mezcla	15	18
Cantidad de levadura (cm <sup>2</sup> )	100	400
pH	4	6

### Variables de respuesta

CO<sub>2</sub> (ppm)

**Tabla 8.** Valores extremos de los factores en estudio

factores de estudio				
Nivel codificado (Xi)	Denominación	°Brix de la mezcla	Cantidad de levadura (g)	pH
- $\alpha$	Nivel mínimo	13.977	65.9	3,318
-1	Nivel bajo	15	100	4
0	Nivel medio	16.5	250	5
1	Nivel alto	18	400	6
+ $\alpha$	Nivel máximo	19.023	468.2	6,682

**Tabla 9.** Número de tratamientos para tres factores en un DCC para levadura silvestre.

Tratamientos	pH	°Brix de la mezcla (°Brix)	Cantidad de levadura (cm <sup>2</sup> )
1	4	15	100
2	6	15	100
3	4	18	100
4	6	18	100
5	4	15	400
6	6	15	400
7	4	18	400
8	6	18	400
9	5	16.5	250
10	3.23617	16.5	250
11	6.76383	16.5	250
12	5	13.8542	250
13	5	19.1458	250
14	5	16.5	65.9
15	5	16.5	468.2
16	5	16.5	250

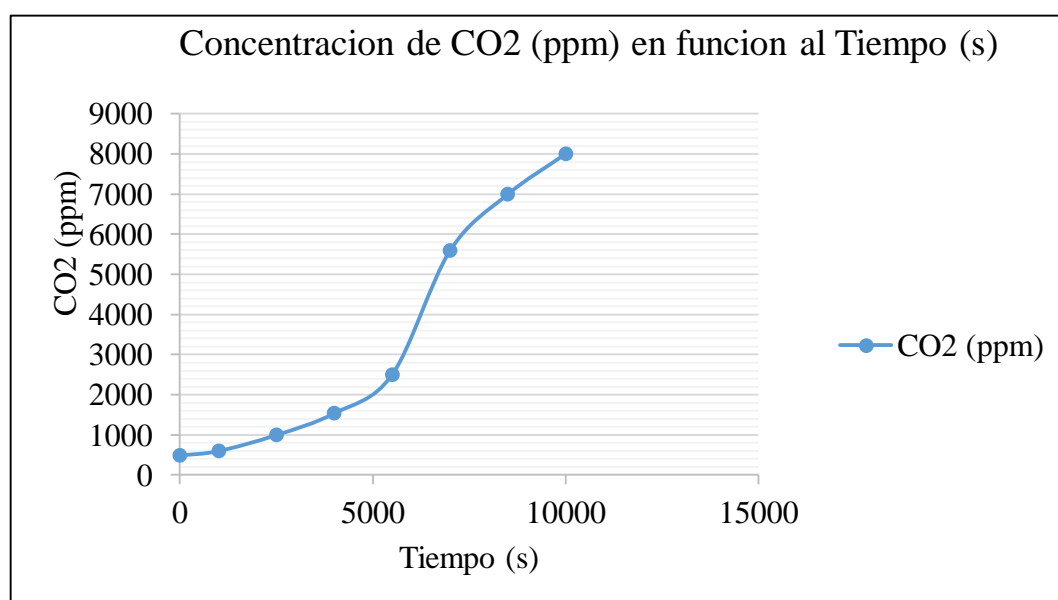
**NOTA:** En esta tabla los valores de número de tratamientos para la cantidad de levadura silvestre (cm<sup>2</sup>) son expresados en 10<sup>5</sup> CFU/g ya que eso fue el resultado del recuento de la levadura silvestre.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1. Ajuste del modelo cinético de Michaelis – Menten en función al parámetro de $\text{CO}_2$ con dos tipos de levaduras *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* y levadura silvestre.

Para el ajuste del modelo cinético de Michaelis – Menten se estudió dos tipos de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y silvestre.

#### 4.1.1. Concentración de $\text{CO}_2$ durante el proceso de fermentación con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

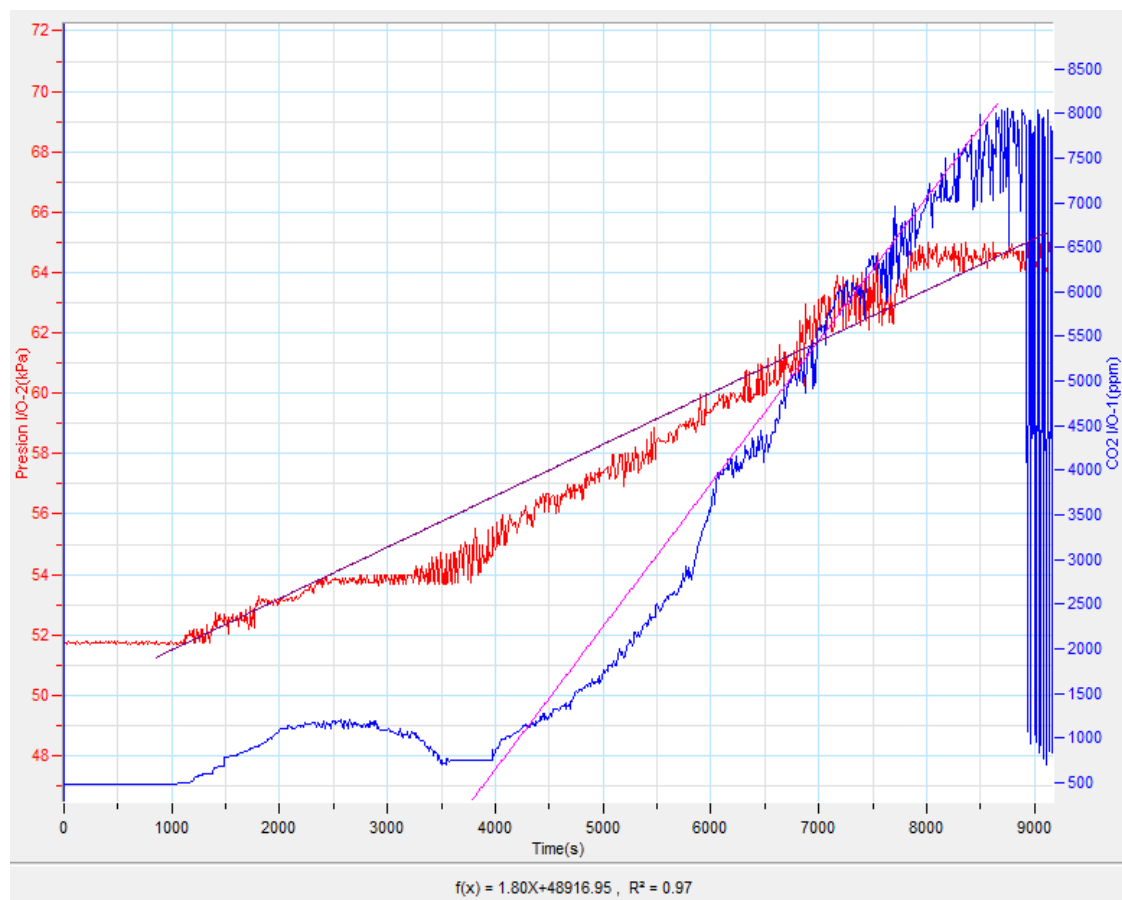


**Figura 11.**  $\text{CO}_2$  en función al tiempo

En la figura 11, se puede observar que durante el periodo de la fermentación del mosto hay un crecimiento en la concentración de  $\text{CO}_2$  en función al tiempo. En 8989.25 segundos comienza a estabilizarse la concentración de  $\text{CO}_2$  hasta 8096.45 ppm. Debido a que el sustrato alcanza su mayor desarrollo poblacional en microorganismos, siendo consumidas en mayor cantidad de azúcar; posteriormente disminuye hasta un valor despreciable. Al respecto (Levenspiel, 2004), menciona que en cuanto a las velocidades

de formación de etanol y  $\text{CO}_2$  están ligadas directamente al crecimiento de la levadura de este modo, la cinética de formación de cada producto puede representarse en un cultivo discontinuo. Asimismo (Coillo & Copa , 2010), indican que las primeras 24 horas con 5320 seg existe alta producción de  $\text{CO}_2$  llegando hasta máximo de 9081.573 ppm. Esto es debido a que el sustrato contiene carbohidratos suficientes para su mayor desarrollo poblacional de levaduras. Asimismo durante la fermentación del zumo de piña se observa que la presión producida es proporcional al  $\text{CO}_2$ . Por su parte (Leveau & Bouix, 2000), precisan que las condiciones adecuadas para la fermentación alcohólica son la temperatura,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ , presión, agua, nutrientes y pH. Así como de sustancias alimenticias que ella puede asimilar con facilidad. Asimismo para que la fermentación sea efectiva se tomó en cuenta estas condiciones adecuadas.

**Figura 12.** Ajuste de la curva de  $\text{CO}_2$  y Presión con el software de Multilab.





En la Figura 12, se muestra el ajuste de la curva de presión y CO<sub>2</sub>, para este proceso se tomó una muestra de 500 ml de zumo de piña, pH de 5, 16.5°Brix, 1.5g de levadura a una temperatura de 35°C. La finalidad de este ajuste es ver el comportamiento cinético de la fermentación de zumo de piña en donde la concentración se inicia de 485.79 ppm alcanzando hasta 8096.45ppm de CO<sub>2</sub>, respectivamente por un tiempo de 5 horas hasta que la curva sea constante asimismo los datos se tomó cada 1500 segundos, Para su respectivo ajuste al modelo cinético de Michaelis – Menten en donde la función para CO<sub>2</sub> es  $f(x) = 1.6X - 5995.73$ , teniendo un  $R^2 = 0.98\%$  de confianza respecto al tiempo de proceso de fermentación. Mientras la función para la presión es  $f(x) = 1.8X - 48916.95$ , teniendo una confianza de  $R^2 = 0.97$ . Iniciándose de 51.73 Kpa hasta 64.95 Kpa, durante la fermentación alcohólica del zumo de piña se puede observar que la presión producida es proporcional al CO<sub>2</sub>. Como se puede ver en el anexo 1, comparando con (Ho, Da Conceicao, Silva, & Hogg, 2003). Quienes mencionan que el rendimiento teórico de un gramo de glucosa es 0.49g de CO<sub>2</sub> sin embargo en la práctica aproximadamente el 10% de la glucosa se transforma en biomasa y la producción de CO<sub>2</sub> alcanza al 90% del valor teórico. Mientras (Erazo & Palomino, 1999), indica que la velocidad de la reacción química es descrita con un grupo de modelos matemáticos llamados ecuaciones cinéticas, esta velocidad es una función de la concentración y de los reactantes.

Tabla 10. Cinética de reacción de fermentación de zumo de piña con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

T (s)	CO <sub>2</sub> (ppm)	$\mu$ (s <sup>-1</sup> )	1/CO <sub>2</sub>	1/ $\mu$
0	485.79	0.00022644	0.0020585	4416.180887
1000	595.79	0.00027652	0.00167844	3616.374946
2500	994.03	0.00045360	0.00100601	2204.585538
4000	1534.98	0.00070924	0.00065147	1409.959957
5500	2496.29	0.00094084	0.00040059	1062.87998
7000	5586.53	0.0012312	0.000179	812.2157245
8500	6993.77	0.0014425	0.00014298	693.2409012
10000	8002.45	0.0016473	0.00012496	607.0539671

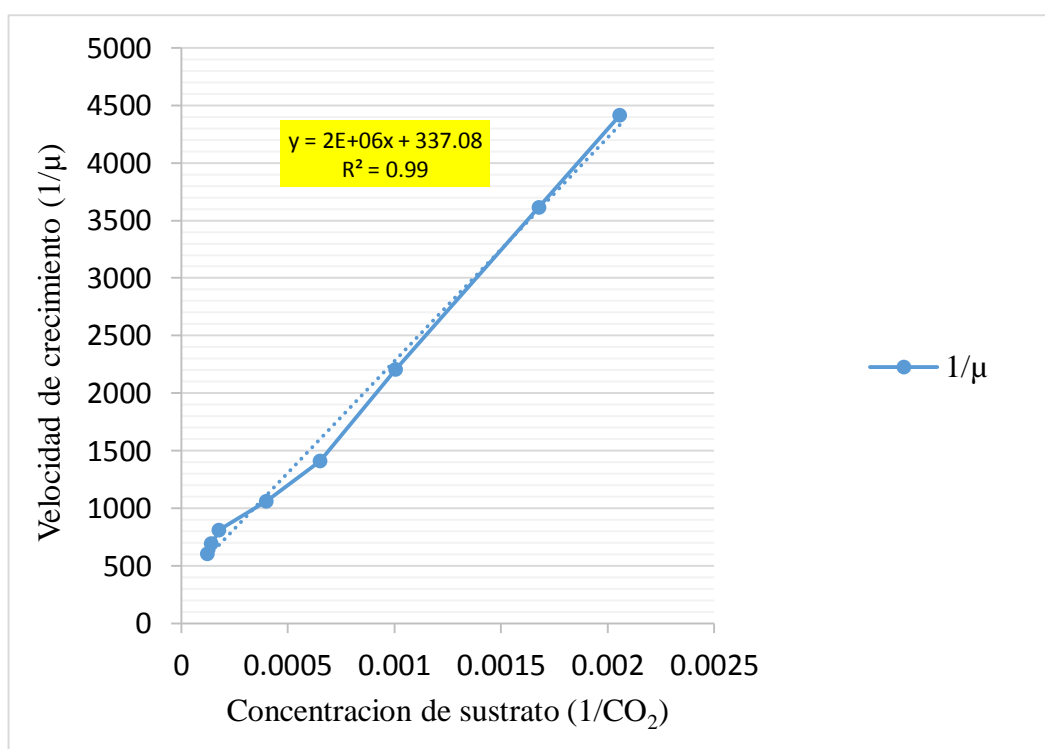


Figura 13. Cinética de la reacción del primer orden de  $1/\mu$  vs  $1/CO_2$ .

### Prueba para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Del gráfico se tiene:

$$\text{Pendiente} = m = 2E+06$$

$$\text{Intercepto} = b = 337.08$$

$$\mu_{\max} = \frac{1}{\text{intercepto}} \quad , \quad K_m = \text{pendiente} * \mu_{\max}$$

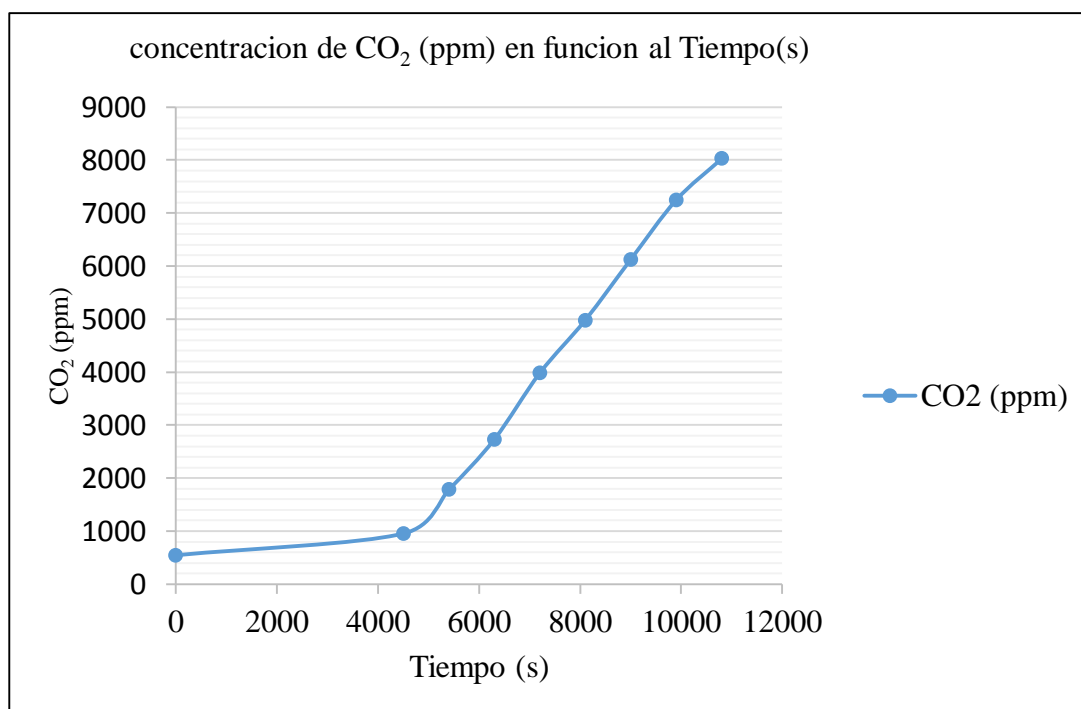
$$\mu_{\max} = 0.00297 \text{ s}^{-1} \quad , \quad K_m = 5.940 \text{ g/L}$$

En la tabla 10 y figura 13. Se muestran la cinetica de la reaccion mediante la ecuacion de Lineweaver – Burk observandose una ecuacion lineal en la cinetica de la reaccion tomando el eje de las ordenadas ( $1/\mu$ ) versus el eje de las abscisas ( $1/CO_2$ ), como se aprecia el valor de la pendiente fue  $2E+06$ , la constante de Michaelis – Menten ( $K_m$ ) es 5.940, el punto de interseccion es 337.08 y una velocidad maxima de  $0.00297s^{-1}$ . Estos valores obtenido en el gráfico son importantes para ajustar al modelo cinético de Michaelis – Menten, teniendo un grado de confianza de  $R^2=99\%$ . Al respecto (Quintero, 1993). Indica que es necesario el estudio cinético que consiste en la medicion o estimacion de las velocidades de sintesis celular, formacion de productos y de los efectos del medio ambiente sobre estas velocidades, por otro lado (Ibañez, 2012), afirma que una confianza de 95% es bueno en un ajuste al modelo. Mientras (Gutierrez & De la Vaca, 2012), indican que para fines de prediccion se recomienda el coeficiente de determinacion ajustado sea al menos de 70% para que el modelo sea aceptable y confiable.

Finalmente el ajuste al modelo de Michaelis – Menten.

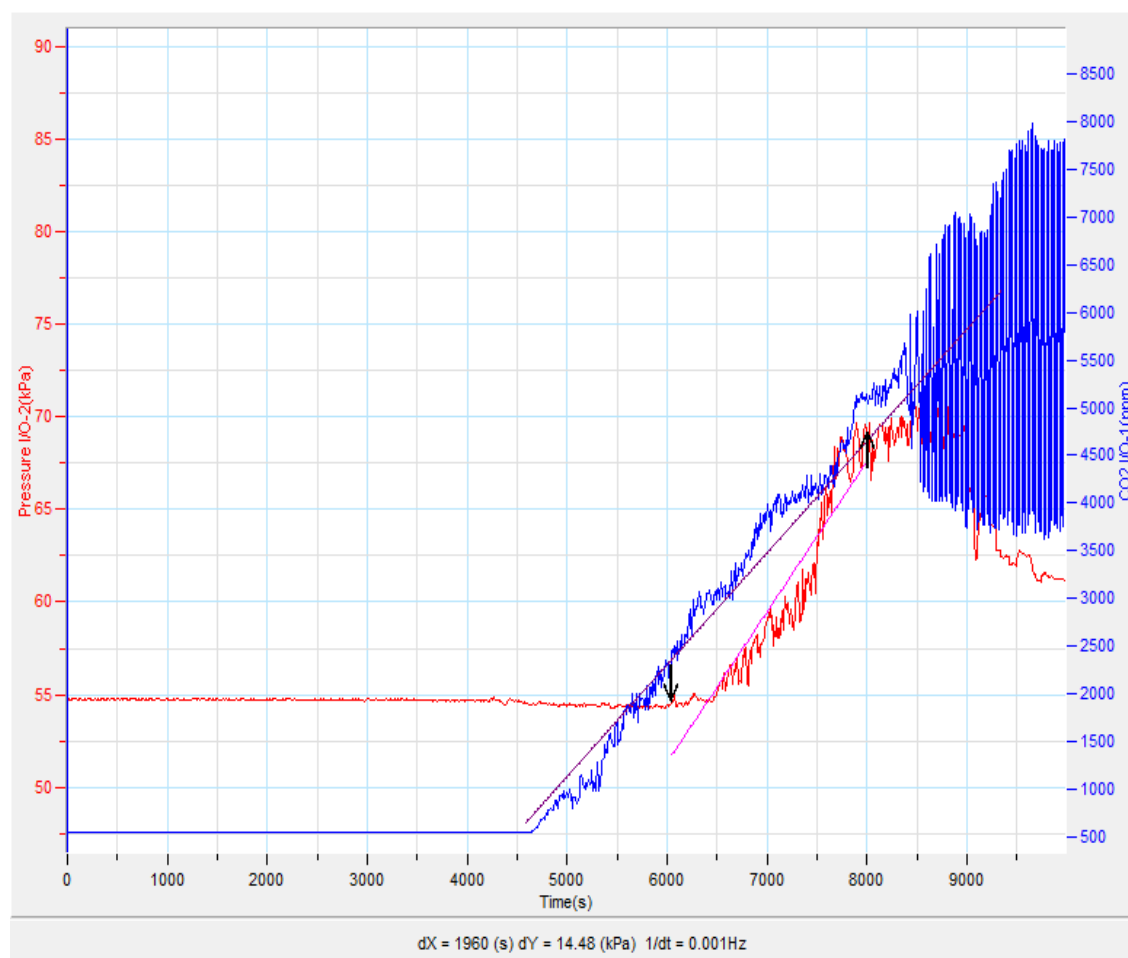
$$\mu = \frac{\mu_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad ; \quad \mu = \frac{0.00297[S]}{5.940 + [S]}$$

#### 4.1.2. Concentración de CO<sub>2</sub> durante el proceso de fermentación con la levadura silvestre



**Figura 14.** CO<sub>2</sub> en función al tiempo

Como se puede apreciar en la Figura 14. La concentración de CO<sub>2</sub> en función al tiempo. Se observa que a los 4030 segundos hasta 10800 segundos hay mayor cantidad de producción de CO<sub>2</sub> llegando hasta 8023.56ppm en donde comienza a estabilizarse la levadura. Por su parte (Montes & Arevalo, 2001), quienes mencionan que teniendo una materia entrante de glucosa se tiene una cantidad de 51.1 Kg de etanol y CO<sub>2</sub> de 48.9 Kg. Por otro lado esta actividad fermentativa se forma etanol y se desprende gas carbónico, en la medida que su concentración de CO<sub>2</sub> aumenta en el recipiente de fermentación, la presión aumenta y trae como consecuencia una disminución de la actividad celular.



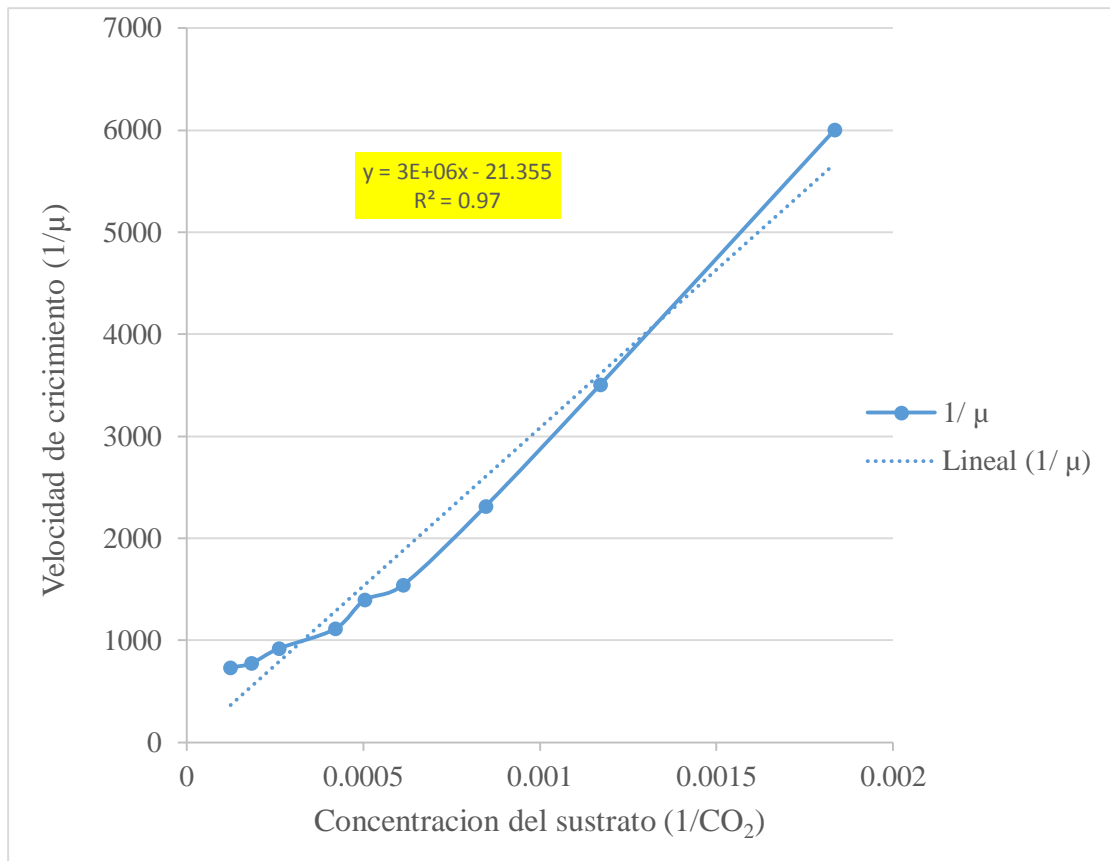
**Figura 15.** Ajuste de la curva del CO<sub>2</sub> y presión con el software de Multilab.

En el Figura 15. Para el análisis del gráfico se tomó una muestra de 500ml de zumo de piña, 250cm<sup>2</sup> de la levadura, pH de 5 y 16.5°Brix. La finalidad de este ajuste es ver el comportamiento cinético de la fermentación de zumo de piña, además el análisis estadístico de r-cuadrado indica el 95% de confianza de los datos obtenidos. Para este análisis de ajuste del modelo cinético se evaluó con una concentración de CO<sub>2</sub> de 554.35 ppm hasta 8023.56 ppm en un tiempo de 5 horas, también se tomó los datos cada 10 segundos datos que son mostrados en el **anexo 2**. Para determinar la cinética de fermentación de zumo de piña para su respectivo ajuste al modelo de Michaelis- Menten.

Asimismo el resultado obtenido en la fermentación de zumo de piña fue  $F(x) = +1.17x - 4717.69$  de una función lineal de primer grado, teniendo un  $R^2 = 0.95$  de confianza respecto al tiempo de fermentación, mientras para la presión se inició a los 5980 segundos mostrando una gráfica similar al  $CO_2$  en donde se puede observar que a medida que aumenta el  $CO_2$  también hay mayor producción de presión en la fermentación alcohólica.

**Tabla 11.** Cinética de reacción de fermentación de zumo de piña con la levadura silvestre.

T (s)	$CO_2$ (ppm)	$\mu$ ( $s^{-1}$ )	$1/CO_2$	$1/\mu$
0	545.35	0.0001667	0.0018337	6000.24
4500	854.35	0.0002854	0.0011705	3504.0998
5400	1181.56	0.0004321	0.0008463	2314.4398
6300	1629.85	0.0006473	0.0006136	1544.8071
7200	1980.12	0.0007151	0.000505	1398.4058
8100	2378.98	0.0008984	0.0004203	1113.1271
9000	3821.78	0.0010862	0.0002617	920.63229
9900	5443.89	0.0012885	0.0001837	776.08419
10800	8023.56	0.0013623	0.0001246	734.06348



**Figura 16.** Cinética de la reacción del primer orden de  $1/\mu$  vs  $1/CO_2$ .

**Prueba para la levadura silvestre:**

Del grafico se tiene:

Pendiente =  $m = 3E+06$

Intercepto =  $b = 21.355$

$$\mu_{max} = \frac{1}{intercepto} \quad , \quad K_m = pendiente * \mu_{max}$$

$$\mu_{max} = 0.0468 \text{ s}^{-1} \quad , \quad K_m = 140.400 \text{ g/L}$$

En la figura 16 y tabla 11, se muestra la cinética de la reacción mediante la ecuación de Lineweaver – Burk se observa que tiene una ecuación lineal del primer grado, asimismo para la cinética de la reacción, se tomo el eje de las ordenadas ( $1/\mu$ ) versus el

eje de la abscisas ( $1/\text{CO}_2$ ), como se aprecia el valor de la pendiente  $3\text{E}+06$ , la constante de Michaelis – Menten( $K_m$ ) es  $140.400 \text{ g/L}$ , el punto de interseccion es  $21.355$  y una velocidad máxima de  $0.0468 \text{ s}^{-1}$ . Estos valores encontrados son importantes para ajustar al modelo cinético de Michaelis – Menten, como se muestra en el análisis estadístico cuya velocidad depende de la concentración del sustrato, teniendo un grado de confianza de  $R^2=0.97$ . Al respecto (Ibañez, 2012), afirma que una confianza mayores de 95% es muy bueno en un ajuste al modelo. Mientras (Gutiérrez & De la Vara, 2012), indican que para fines de predicción se recomienda el coeficiente de determinación ajustado al menos de 70% para que el modelo sea aceptable y confiable. Según (Benitez, Chiumenti, Sepulcre, Achaerandio, & Pujola, 2012), en su revista indican que el efecto de la temperatura sobre la tasa de respiración y la degradación de textura de la piña recién cortada se estudio el consumo de  $\text{O}_2$  y la producción de  $\text{CO}_2$  de piña precisando al modelo Cinético de Michaelis - Menten.

Finalmente el ajuste al modelo de Michaelis – Menten.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} [S]}{K_m + [S]} ; \mu = \frac{0.0468[S]}{140.400 + [S]}$$

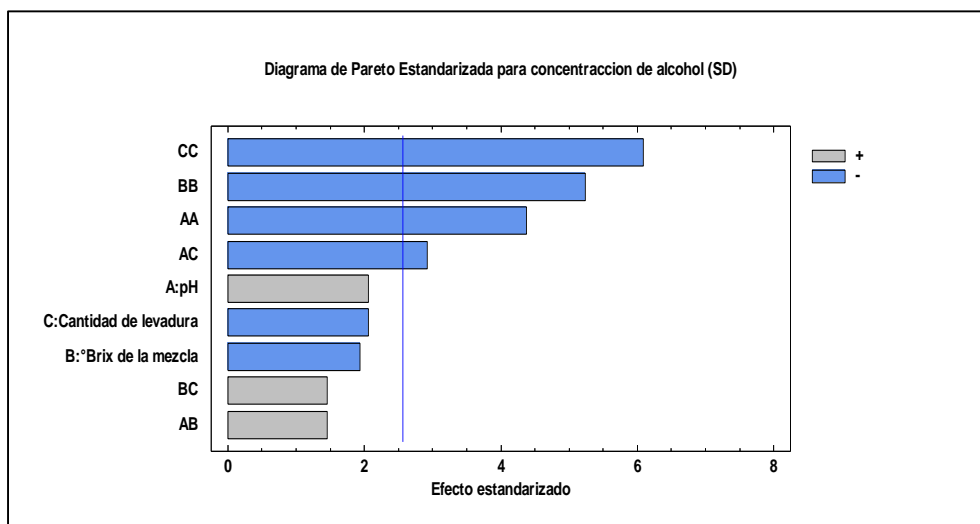


## **4.2. Evaluación de dos tipos de levadura (*Saccharomyces cerevisiae* Y silvestre) en la producción de alcohol durante la fermentación de zumo de piña**

### **4.2.1. Efectos de las variables de pH, °Brix y Cantidad de levadura. En la obtención de alcohol utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae***

Los resultados del porcentaje de concentración de alcohol con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se presenta en el anexo 3 y en el anexo 4 en donde se puede apreciar el análisis de varianza ANVA, así mismo podemos observar claramente el diagrama de pareto en la figura 17 por otro lado las variables A (pH), B (°Brix de la mezcla) y C (cantidad de levadura), resulto ser no significativo lo que quiere decir que el incremento y/o decremento de las variables no ejerce un cambio significativo en el resultado del porcentaje de la concentración de alcohol en el proceso de fermentación, mientras que los efectos cuadráticos (AA), (BB) y (CC), se muestran significativos al resultado de la concentración de alcohol.

Por otro lado las interacciones (AB) y (BC), resultaron ser no significativos para el proceso de fermentación mientras la interacción (AC) resulto ser significativo. Entonces se puede decir que las combinaciones de los variables pH (A), ° Brix de la mezcla (B) y Cantidad de levadura (C), no afectan de manera significativa a la concentración del alcohol durante la fermentación alcoholica.



**Figura 17.** Diagrama de Pareto para *Saccharomyces cerevisiae*.

De acuerdo a la ANVA (ver anexo 3), el coeficiente de determinación  $R^2$  explica el 95.2083% de la variabilidad en la concentración de alcohol, esto quiere decir que el modelo estadístico se ajusta de manera satisfactoria con los resultados. Mientras el estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferentes números de variables independientes, es 85.625. Siendo así la ecuación del modelo ajustado es:

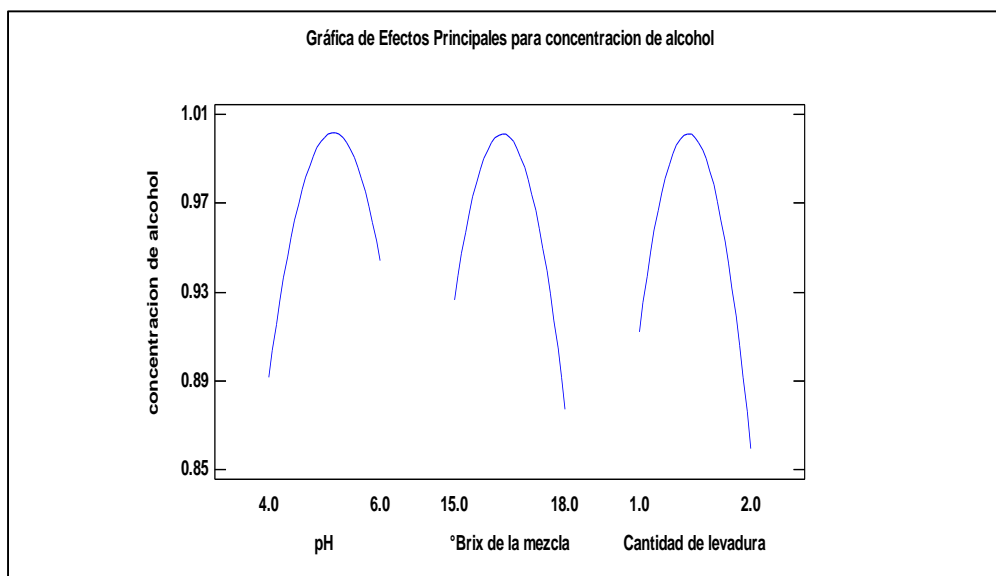
$$\begin{aligned} \text{Grado alcohólico} = & -12.2909 + 0.722578*X_1 + 1.29009*Y_1 + 1.26811*Z_1 - \\ & 0.0821114*X_1^2 + 0.0166667*X_1*Y_1 - 0.1*X_1*Z_1 - 0.043635*Y_1^2 + 0.0333333* Y_1*Z_1 \\ & - 0.457014*Z_1^2. \end{aligned}$$

Donde:

$X_1 = \text{pH}$

$Y_1 = \text{°Brix de la mezcla}$

$Z_1 = \text{Cantidad de levadura}$



**Figura 18.** Efectos principales para el porcentaje de la concentración de alcohol con *Saccharomyces cerevisiae*

En la figura 18. Se muestra la gráfica de efectos principales para el porcentaje de alcohol, en donde se aprecia el grado de relación que existe entre las variables de estudio el °Brix, pH y cantidad de levadura; respecto a la concentración de alcohol. En la variable de estudio pH se observa que conforme incrementa de su nivel bajo hasta su nivel alto, el porcentaje alcohol se incrementa mostrando así un comportamiento ascendente hasta llegar a los 5 de pH. Según (Vasquez & Dacosta, 2007), quienes mencionan que para obtener mayores rendimientos y velocidades de producción de etanol y CO<sub>2</sub> en los cultivos sumergidos las condiciones adecuadas son a pH de 4 - 5.5 y T° 28 -35°C, así también para fermentar los mostos destinados a la destilación duran 18- 72 horas. Sin embargo, cuando se elaboran productos que no van a ser destilados, se seleccionan temperaturas bajas para favorecer la formación equilibrada de aromas y sabores. Además el pH óptimo para el desarrollo de las levaduras es de 4.5 a 5 aunque pueden sobrevivir de 3 a 7.5 (Madrid, Vicente, & Cezano, 2001). (Godia & Lopez, 2005), indican que la transferencia de calor adecuada es 30- 35 °C. Asimismo realizando una comparación de

los resultados, podemos concluir que el pH óptimo de tratamiento es 5, también se puede decir que a mayor temperatura la fermentación acelera y genera la activación rápida de la levadura en la fermentación de licores este resultado es corroborado con los autores mencionados.

Respecto a la variable de °Brix, se aprecia que a valores menores el porcentaje de alcohol es mayor, cuando se incrementa los valores de °Brix mayores a 16 el porcentaje de alcohol disminuye. Al respecto (Leveau & Bouix, 2000), indican que el rango de concentración de azúcar es de 10 hasta 18°Brix, el valor óptimo es 15°Brix; cuando se trabaja a concentraciones de azúcar muy altas del orden de 22°Brix se observa una deficiencia respiratoria en la levadura y un descenso de la velocidad de la fermentación. Mientras (Fajardo & Sarmiento, 2008), quienes mencionan que se debe ajustar el mosto en 18 y 20 °Brix, en las cuales se puede obtener mejor rendimiento y eficiencia fermentativa. Sin embargo realizando una comparación de los resultados podemos decir el °Brix óptimo es de 16.5°Brix que se encuentra en los rangos establecidos por los autores.

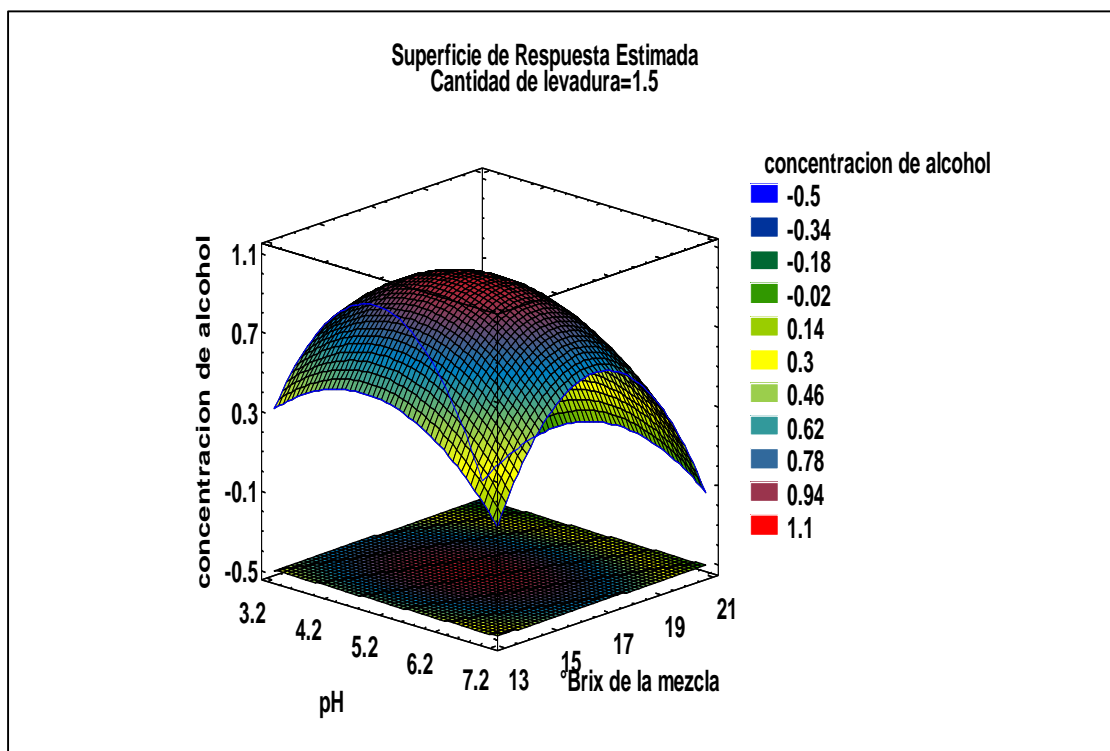
**Tabla 12.** Optimización de las variables para la concentración de alcohol con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Valor óptimo = 1.0063

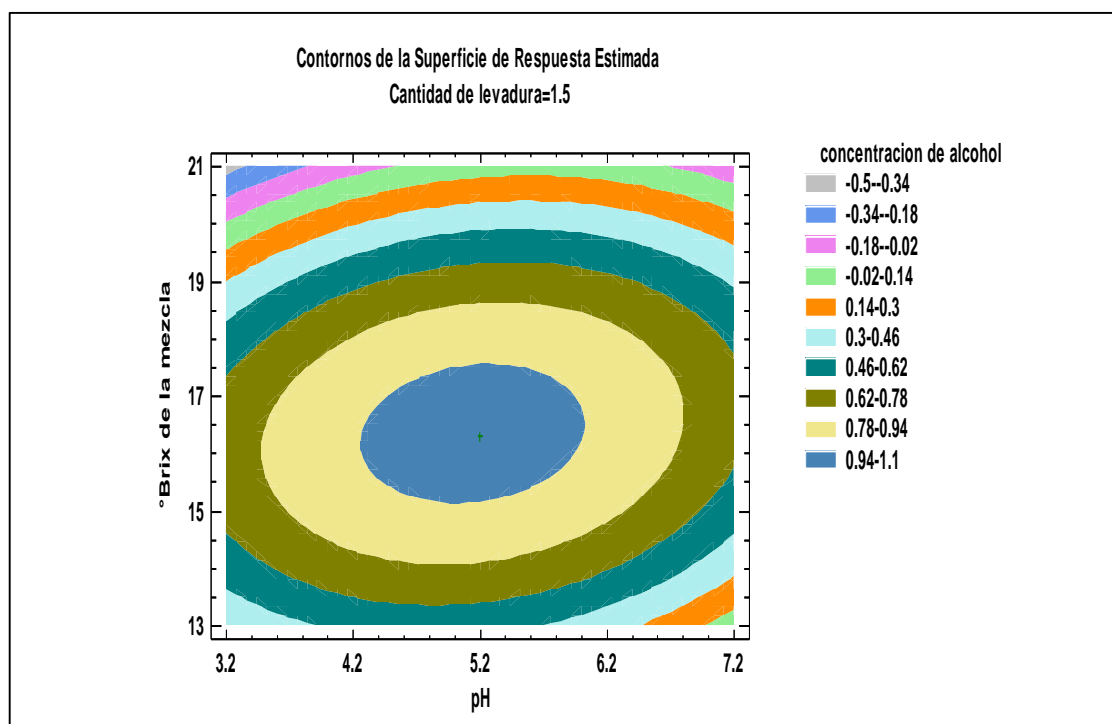
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
pH	3.23617	6.76383	5.19459
°Brix de la mezcla	13.8542	19.1458	16.315
Cantidad de levadura	0.618083	2.38192	1.41412

En la tabla 12 se observan los valores óptimos para la fermentación de zumo de piña utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Que se obtuvieron mediante el programa de statgraphics centurión XVI, los cuales indican que a 5,2 pH, 16.3°Brix y 1.4 de levadura son óptimas. Se tuvo mayor concentración de alcohol de 1.0063 por ciento de los 16 tratamientos estudiados las cuales se asemejan al tratamiento 9 con los parámetros de 5 pH, 16.5°Brix y 1.5 de levadura obteniéndose el mayor porcentaje de etanol de 1°GL. Asimismo se observó que el alcohol obtenido tiene las características como sabor y aroma fueron similares al de la fruta (Monsalve, Medina, & Ruiz, 2006), realizaron una comparación entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*. En donde la mayor concentración de etanol tuvo la levadura *Zymomonas mobilis* de 8%. (Garzon & Hernandez, 2009), mencionan que a una concentración de 180 y 200 g/L, requirió de 48 h para fermentar el medio produciendo un porcentaje de alcohol de 4,5 y 5,5 % (v/v), consecuentemente al final de la fermentación la concentración de azúcares ya era muy baja frenando así el proceso. También encontró que el tiempo de fermentación total para *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y 9080 es de 96 h, produciendo un porcentaje de alcohol de 8% (v/v); esto se debió a que son cepas certificadas para la producción de etanol. (Mathews, Ahern, & Van Holde, 2002), indican que el aldehído responsable en los cambio de aroma en las frutas es el acetaldehído y que este aldehído en exceso produce una aroma desagradable en los frutos. Por otro lado los esteres son sustancias aromáticas que le confieren a la fruta su aroma característico. Y los superficies de estimación y estimada se muestran en las figuras 19 y 20 lo cual nos muestran mejor los resultados de la fermentación alcohólica de zumo de piña.

**Figura 19.** Superficie de respuesta estimación con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.



**Figura 20.** Contornos de la superficie de respuesta estimada con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.



**Tabla 13.** Concentración de alcohol en el mosto fermentado.

Microorganismos	Tiempo (h)	% de Concentración de alcohol en 16.5°Brix
Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72	1.0%
Levadura Silvestre	72	0.1%

En la tabla 13. Se muestra los resultados de rendimiento de alcohol durante el proceso de fermentación de zumo de piña por un tiempo de 72 horas para ambos microorganismos en donde el mayor efecto significativo tuvo la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como se puede apreciar en la tabla 13. Al respecto (Rodriguez & Sarabia, 2012), mencionan que según los resultados en el análisis de rendimiento finales para los métodos de fermentación se obtuvo una probabilidad del modelo de 0.2481 un  $R^2$  de 0.39 y con coeficiente de variación de 5.49% que señala que no hubo diferencia estadística significativa para el método de Orleans tanto para la naranja agria como también para la piña, además se comprobó que el tratamiento de piña con 0.40 vvm de aireación tuvo el rendimiento más bajo debido a la volatilización de etanol y otros líquidos volátiles presentes en la mezcla. Según (Chanprasartsuk , Prakitchaiwattana, Sanguandeeikul, & Fleet, 2010), indican en particular que las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* actúan de diferente manera en otros jugos de frutas por lo que sugiere que el jugo de piña recién triturado puede tener algunos efectos en otras levaduras autóctonas que tienen un papel importante en la fermentación alcohólica.

#### 4.2.2. Efectos de las variables de pH, °Brix y cantidad de levadura. en la obtención de alcohol utilizando la levadura silvestre

Los resultados del porcentaje de concentración de alcohol utilizando la levadura silvestre, se presenta en los anexos 5 y en el anexo 6 en donde se puede apreciar el análisis de varianza ANVA. Para la concentración de alcohol se puede observar claramente en el diagrama de Pareto. Figura 21, además las variables A (pH) y C (cantidad de levadura), resultó ser no significativo, lo que quiere decir que el incremento y/o decremento de las variables no ejerce un cambio significativo en el resultado del porcentaje de la concentración en el proceso de fermentación, mientras el B (°Brix de la mezcla) fue significativo, al igual que sus efectos cuadráticos (AA), (BB) y (CC) estos resultaron ser significativos a la concentración de alcohol.

Las interacciones (AB), (BC) y (AC), resultaron ser no significativos para el proceso de fermentación, entonces podemos decir que las combinaciones de las variables pH (A), °Brix de la mezcla (°Brix) y Cantidad de levadura (C), no afectan de manera significativa a la concentración de alcohol.

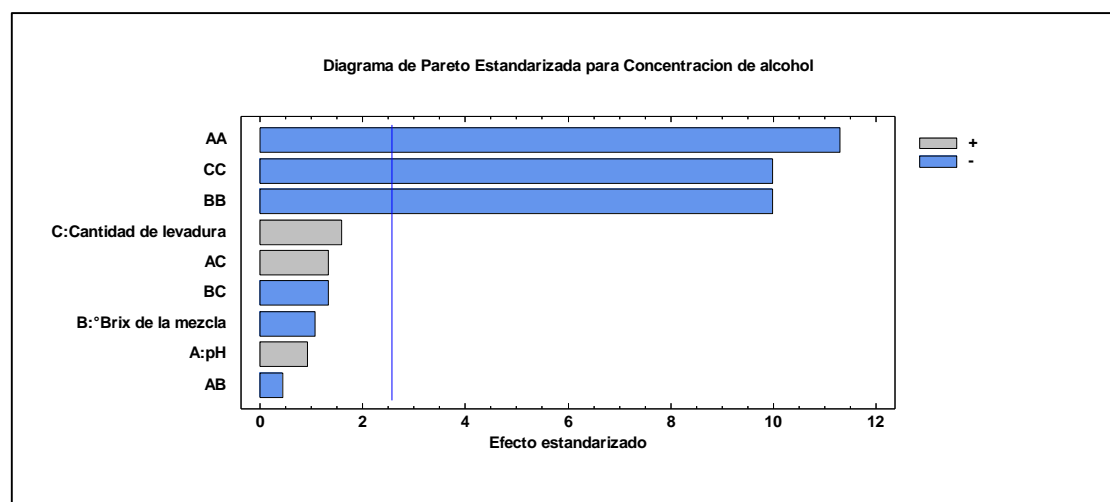


Figura 21. Diagrama de Pareto para levadura silvestre.



De acuerdo al análisis de varianza ANVA, el coeficiente de determinación  $R^2$  explica el 97.3014% de los resultados de los tratamientos, al igual que R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 91.9041 por ciento, esto quiere decir que el modelo estadístico se ajusta de manera satisfactoria con los resultados, por lo que incluye que el modelo se ajusta adecuadamente, siendo el modelo matemático:

$$\text{Concentración de alcohol (\%)} = -3.92942 + 0.28292*X_1 + 0.371424*Y_1 + 0.0347297*Z_1 - 0.0278477*X_1^2 - 0.000833333*X_1*Y_1 + 0.00075*X_1*Z_1 - 0.0109477*Y_1^2 - 0.0005*Y_1*Z_1 - 0.000985327*Z_1^2.$$

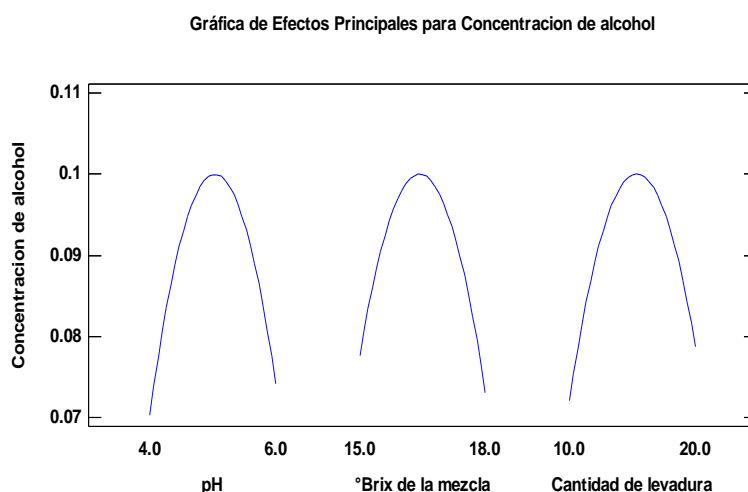
Donde:

$X_1 = \text{pH}$

$Y_1 = \text{°Brix de la mezcla}$

$Z_1 = \text{Cantidad de levadura}$

En la figura 22. Se muestra el comportamiento cinético de la variables como se puede apreciar que conforme se incrementa los °Brix, pH y cantidad de levadura.



**Figura 22.** Efectos principales para la concentración de alcohol con la levadura silvestre.

Según (Mamani, 2013), indica que los parámetros óptimos para fermentación de cascaras de naranja es de 14°Brix y pH de 5.5. Por su parte (Hernandez & Martinez, 2012), mencionan que los parámetros fisicoquímico adecuado para la fermentación son 20 de °Brix, pH de 4 y T° de 35°C. Como también ( Ferreyra, Schvab, & Gerard, 2009) reportaron que el etanol alcanzó 60-80 g/L (JN) y 80-85 g/L (JP). Por tanto la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se obtiene mayor porcentaje de etanol que la levadura silvestre de las cascaras de naranja. Por otro lado (Deza, Diaz, & Figueroa, 2007), refieren que los desechos agrícolas traen beneficios ambientales y minimización de costos. Sin embargo (Paull & Chen, 2000), afirman que los frutos dañados, sobremaduros o con fisuras en la corteza se presentan procesos de fermentación en la pulpa, resultado del desarrollo de levaduras y bacterias.

**Tabla 14.** Optimización de las variables para la concentración de alcohol con la levadura silvestre.

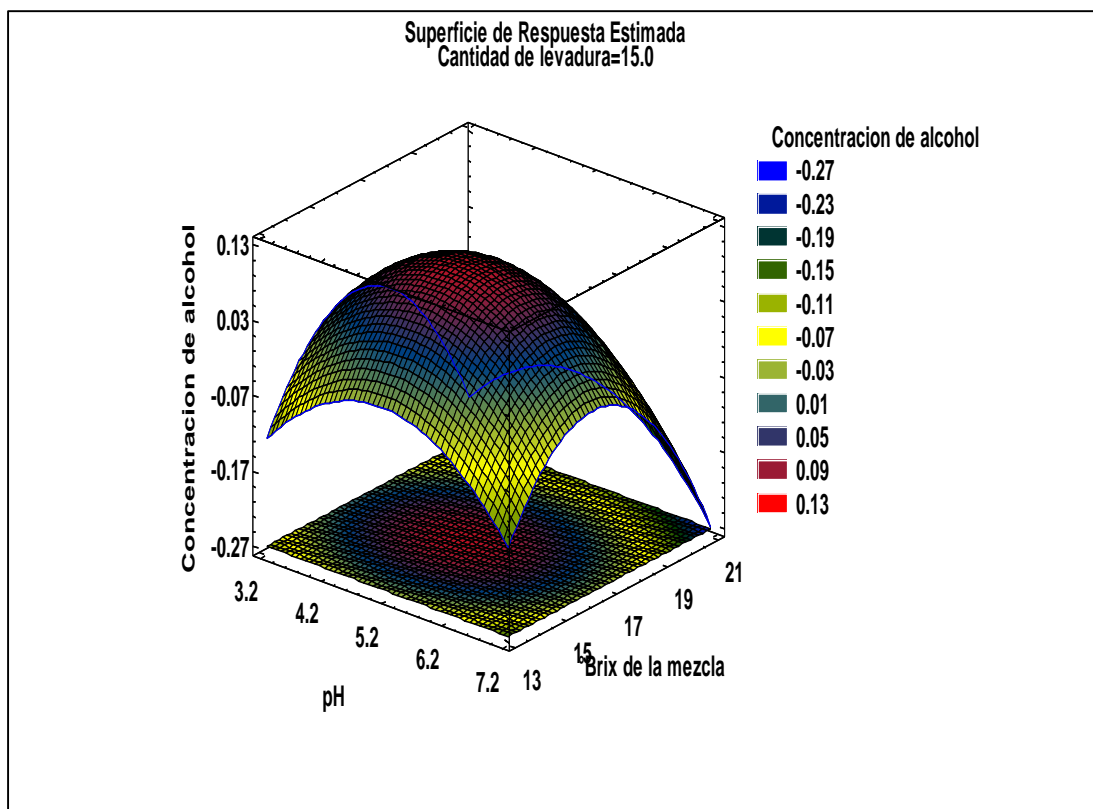
Valor óptimo = 0.100051

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
pH	3.23617	6.76383	5.03741
°Brix de la mezcla	13.8542	19.1458	16.4269
Cantidad de levadura	6.59104	23.409	15.1344

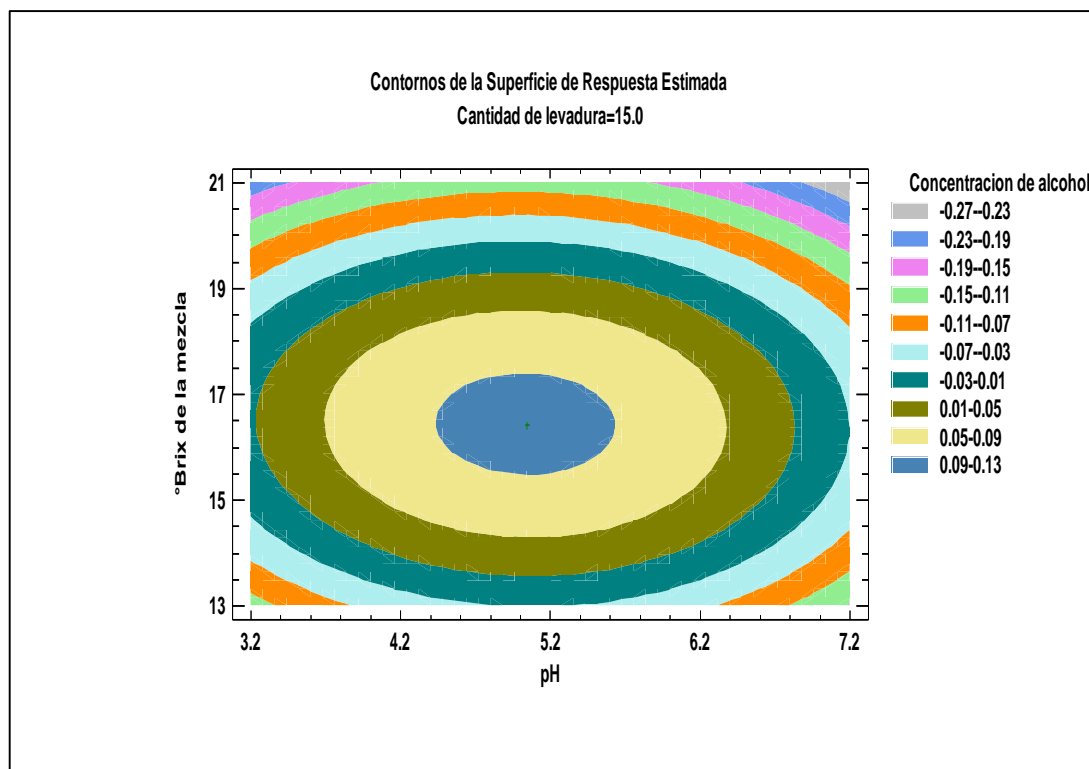
En la tabla 14. Se muestran los valores óptimos para la fermentación utilizando la levadura silvestre los números de tratamiento se obtuvieron mediante el programa de statgraphics centurión XVI, los cuales indican que a 5.04 pH, 16.543 °Brix y 15.13g de levadura. Se obtiene máximo porcentaje de alcohol de los 16 tratamientos estudiados, los cuales se asemejan al tratamiento obtenido en el laboratorio con los parámetros de 5 pH,

16.5 °Brix y 15g de levadura obteniéndose el mayor porcentaje de concentración de alcohol 0.1%. También al transcurrir el tiempo la producción de células microbianas disminuye rápidamente entrando en el periodo del ciclo cinético fermentativo. Realizando una comparación con (Hernandez & Martinez, 2012), indican que la máxima producción que se obtuvo a un pH de 4 con un porcentaje de 15.1%. En donde la cantidad de etanol disminuye a pH más ácidos menores a 4. Según (Tejeda, y otros, 2010), Determinaron el etanol por cromatografía de gases y encontraron que con las cascaras de naranja se obtuvo mayor contenido de etanol 8.4mg/g, que con las cascaras de piña 1.0mg/g. por cada gramo de las cascaras para ambos muestras. Por otro establece que la producción de etanol a partir de las cascaras de frutas es de poco rendimiento debido a que se requieren grandes pesos de estos residuos. (Ho, Da Conceicao, Silva, & Hogg, 2003) Menciona que el rendimiento teórico de un gramo de glucosa es 0.49g de etanol sin embargo en la práctica aproximadamente el 10% de la glucosa se transforma en biomasa y el rendimiento de etanol alcanza al 90% del valor teórico. Los resultados de las superficies de respuesta de estimación y estimada se muestran en las figuras 23 y 24 datos nos determinan con mayor exactitud los resultados de la fermentación alcohólica de zumo de piña.

**Figura 23.** Superficie de respuesta estimada con la levadura silvestre



**Figura 24.** Contornos de la superficie de respuestas estimada.



Así mismo en la tabla 13 se puede ver la comparación realizada para el rendimiento de alcohol durante el proceso de fermentación de zumo de piña fue por un tiempo de 72 horas para ambos microorganismos en donde la mayor efecto significativo tuvo la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Mientras que la levadura silvestre tuvo menor significancia en la concentración de alcohol. (Hansen, Niccen, Summer , Nielsen, & Arneborg, 2001), mencionan que existen algunos factores que afectan de forma importante el desarrollo de la fermentación y con ello el rendimiento, como son el tipo de levadura, la concentración de sustrato, temperatura, pH, entre otros. Esto se debe al menor % obtenido de etanol de las cascaras de piña ya que la cascara de piña no posee un mayor porcentaje de levadura en la superficie de la fruta.

## CONCLUSIONES

El modelo cinético de Michaelis- Menten se ajustó a un valor de velocidad máxima de crecimiento  $0.00297s^{-1}$  y constante de Michaelis- Menten  $5.940g/L$  para *Saccharomyces cerevisiae*. Mientras para la levadura silvestre se obtuvo una velocidad máxima de crecimiento es  $0.0468s^{-1}$  y constante de Michaelis- Menten  $140.400g/L$ .

La comparación realizada entre dos tipos de levadura utilizadas en la fermentación de zumo de piña tiene un efecto significativo en cuanto a la obtención de alcohol en el proceso de fermentación donde se obtiene  $1^{\circ}GL$  con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Con un tiempo de 72 horas.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda ampliar este trabajo de investigación con parámetros similares y/o diferentes concentraciones de microorganismos, temperatura, CO<sub>2</sub> producido, presión, pH, etc. Que intervienen en la fermentación alcohólica con el fin de favorecer a un estudio más completo que facilite la comprensión de este proceso biológico.

Se sugiere utilizar biorreactores de tipo descartable PET para llevar a cabo la fermentación alcohólica para que esta proporcione las condiciones internas adecuadas para producción de CO<sub>2</sub> y presión.

Promover la utilización de desechos agrícolas u orgánicos (cascaras, maderas, papel, etc.), rico en carbohidratos para producción de etanol o alcohol de interés industrial que poseen un gran valor para la industria farmacéutica y alimentaria.

Efectuar un estudio de factibilidad económica a fin de aumentar la rentabilidad de los agricultores de la región.

## BIBLIOGRAFÍA

- Asenjo, J., Morales de los rios, L., Sainz, R., & Tapia, L. (2016). *Produccion de alcoholes volatiles durante maduracion de los frutos*. Mexico: Umusa Reverte.
- Benitez, S., Chiumenti, M., Sepulcre, F., Achaerandio, I., & Pujola, M. (2012). Modeling the effect of storage temperature on the respiration rate and texture of fresh cut pineapple. *Journal of Food Engineering*, Vol.113, No.4, 527-533.
- Berger, H. (2004). *Cosecha, índices de madurez y manejo de frutas y hortalizas*. Santiago, Chile: Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad de Chile.
- Britton, G., Pfander, H., & Liaaen-Jensen, S. (2003). *In Carotenoids handbook*. (Basel, Ed.) Berlin, Alemania: Birkhauser Verlag.
- Chanprasartsuk, O. O., Prakitchaiwattana, C., Sanguandeeikul, R., & Fleet, G. H. (2010). Autochthonous yeasts associated with mature pineapple fruits, freshly crushed juice and their ferments; and the chemical changes during natural fermentation. *Bioresour Technology*, 101(19):7500-9.
- Coillo, H., & Copa, M. (2010). Estudio de la cinetica de fermentacion de platano (Musa cavendishi), en el equipo multilog - Pro implementado con sensores de CO<sub>2</sub>, presion, temperatura y pH. *Tesis de Ingeniero Quimica*. Puno, Peru: Universidad Nacional del altiplano.
- Connor, C. (2000). Mejora de los rendimientos de etanol a traves de la suplantacion con nitrogeno asimilable en exceso. *Journal Ind. Microbiologia*, 45-52.
- Daoudi, L., Quevedo, J., Trujillo, A., Capdivila, F., Bartra, E., & Minguez, S. (2010). Effects of High-Pressure Treatment on the Sensory Quality of White Grape Juice. *An International Journal - High Pressure Research*.
- Das, J. R., Bhat, S. G., & Gowda, L. R. (1997). Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the Kew cultivar of Indian pineapple fruit. *J. Agric. Food. Chem*, 45: 2031 - 2035.



- Deza, M., Diaz, G., & Figueroa, C. (2007). Cascaras de naranja y el etanol. *Revista de ingenieria de alimentos de la Universidad Politecnica de Valencia*.
- Erazo, E. R., & Palomino, I. A. (1999). Estudio de simulacion de un fermentador continuo usando celulas inmovilizadas. *Revista peruana de quimica e ingenieria quimica*, 164.
- Fajardo, E., & Sarmiento, S. (2008). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la produccion de *Saccharomyces cerevisiae*. *Tesis de Microbiologo Industrial*. Bogota, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana de colombia. Facultad de ciencias basicas.
- Fennema, O. R. (2000). *Quimica de los alimentos* (Vol. 2da.). Zaragoza, España: ACRIBIA S.A.
- Ferreyra, M., Schvab, M. d., & Gerard, L. (2009). Fermentación alcohólica de jugo de naranja. *Ciencias Exactas y naturales*, 16.
- Garzon, C. S., & Hernadez, L. C. (2009). Estudio comparativo para la produccion de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. *Tesis Ing. Quimica Industria*. Colombia: Universidad Tecnologica de Pereira. Facultad de Tecnologias.
- Godia, C. F., & Lopez, S. J. (2005). *Ingenieria Bioquimica*. Mexico: Sintesis.
- Gutiérrez, H. P., & De la Vara, R. S. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. Mexico: McGraw-Hill Publishing Co.
- Hansen, E. H., Niccen, P., Summer, P., Nielsen, J. C., & Arneborg, N. (2001). The Effect of oxgen on the survival of non *Saccharomyces* yeast during mixwd culture fermentation of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Apple - Microbiologia*, 91: 541 - 547.
- Hernandez, D. S., & Martinez, T. C. (2012). Obtencion de etanol por via fermentativa a partir de cascaras de Ananas comosus (piña) evaluando dos de sus principales variables( pH y grados brix) usando como microorganismo productor *Saccharomyces cerevisiae*. *Tesis de licenciatura en quimica y farmacia*. salvador, Centroamerica: Universidad san Salvador.

- Ho, P., Da Conceicao, M., Silva, M., & Hogg, T. A. (2003). Changes in the colour and phenolic composition during the early stages of maturation of port in wood, Stainless steel and Glass. S.L. *Journal of the Science of food and Agriculture*, N° 81. Págs. 1269 - 1280.
- Ibañez, V. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. Puno -Peru.
- Leveau, J. Y., & Bouix, M. (2000). *Microbiología industrial : Los microorganismos de interés industrial*. Mexico: Zaragoza - Acribia.
- Levenspiel, O. (2004). *Ingeniería de las reacciones químicas*. Mexico: Limusa Wiley.
- Macrae, R., Robinson, R., & Sadler, M. (2006). *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. (picks, Ed.) London: Academic Press.
- Madrid, A. V., Vicente, J. M., & Cezano, I. (2001). *Nuevo manual de industrias alimentarias*. España: S.A. Mundi-Prensa.
- Mamani, Y. (2013). Determinación de los parámetros cinéticos del ácido poliláctico obtenido a partir de residuos de producción de zumo de piña. *Tesis de Ingeniero Químico*. Puno, Peru: Universidad Nacional del Altiplano.
- Mathews, C. K., Ahern, K. G., & Van Holde, K. E. (2002). *Bioquímica* (Vol. II). Madrid, España: Addison-Wesley.
- Monsalve, J. F., Medina, V. I., & Ruiz, A. A. (2006). *Producción de etanol a partir de la cascara de banano y de almidón de yuca*. *EciELLO*, 7.
- Montes, J., & Arevalo, S. (2001). Determinación del calor de respiración de frutas por el método de titulación. *Revista Amazonica de investigación Alimentaria*, 11.
- Montoya, A. (2005). Licor de Mora de Castilla (Rubus Glaucus benesth) con diferentes porcentajes de pulpa. *Tesis Ing. Química*. Universidad Nacional de Colombia . Facultad de Ciencias Agropecuarias . Medellín, Colombia.
- Morales, M. (2001). Comportamiento fisiológico del fruto de piña nativa (Ananas comosus L. Merrill.) c. v. India bajo condiciones de almacenamiento durante el período de poscosecha. *Tesis (pregrado)*. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

- Muller, G. (2010). *Microbiología de los Alimentos Vegetales*. España: Acribia.
- Paull, R. E., & Chen, C. C. (2000). *Postharvest quality maintenance guidelines. Pineapple*. New York: Un published.
- Pelayo, C., & Cantwell, J. (2007). *Tecnología poscosecha de productos hortofrutícolas*. California, USA: University of California - Davis.
- Quintero, R. (1993). *Ingeniería Bioquímica, teoría y aplicaciones*. Mexico: Alambra Mexicana S.A.
- Rizzo, D., Davidson, J., Garbelotto, M., Slaughter, G., & Steeven, T. (2002). *Phytophthora ramorum and Sudden Oak Death in California. Transmission and Survival*, 9.
- Rodriguez, B. M., & Sarabia, T. I. (2012). Efecto del método de fermentación acética en las características físico-químicas y sensoriales en vinagre de naranja agria (*Citrus x aurantium*) y piña (*Ananas comosus*). *Tesis de Agroindustrial*. Zamorano, Mexico.
- Seymour, G., Taylor, J., & Tucker, G. (2002). *Biochemistry of Fruit Ripening. the journal Chaman and HALL*, 2.
- Sierra, R., Zapata, J., & Enid, M. (2008). *produccion de goma de xantano empleando cascara de piña*. Investigaciones Aplicadas, 5.
- Smith, J. (2006). *Biotecnología*. España: Acribia, S. A. - Zaragoza.
- Solarte, M., Hernandez, M., Morales, A., Fernandez, J., & Melgarejo, L. M. (19 -24 de septiembre de 2009). *Cambios fisiologicas durante la maduracion del fruto de materiales regionales de guayaba( *psidium guayava l.* ). veles Santander*, colombia: Presentacion Cartel.
- Somogyi, Y., Ramaswamy, H., & Will, Y. (2004). *Procesamiento de frutas ciencias y tecnologicas. principales Aplicaciones Tecnologicas*. (Vol. I). (Second, Ed.) Florida, USA: CRC Press LLC. Boca Raton.
- Tejeda, L., Tejeda, C., Villabona, A., Alvear, M., Castillo, C., Henao, D., . . . Taron, A. (2010). *Produccion de bioetanol a partir de la fermentacion alcoholica de*

*jarabes glucosados derivados de cascaras de naranja y piña.* Educacion en Ingenieria, 120 - 125.

Tungland, B. C., & Meyer, D. (2002). Non-Digestible Oligo and Polysaccharides (Dietary Fibre): Their Physiology and Role in Human Health and Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 1*, 73-92.

Vasquez, H. J., & Dacosta, O. (2007). Fermentacion alcoholica: Una opcion para la produccion de energia renovable a partir de desechos agricolas. *Ingenieria investigacion y tecnologia* , 5.

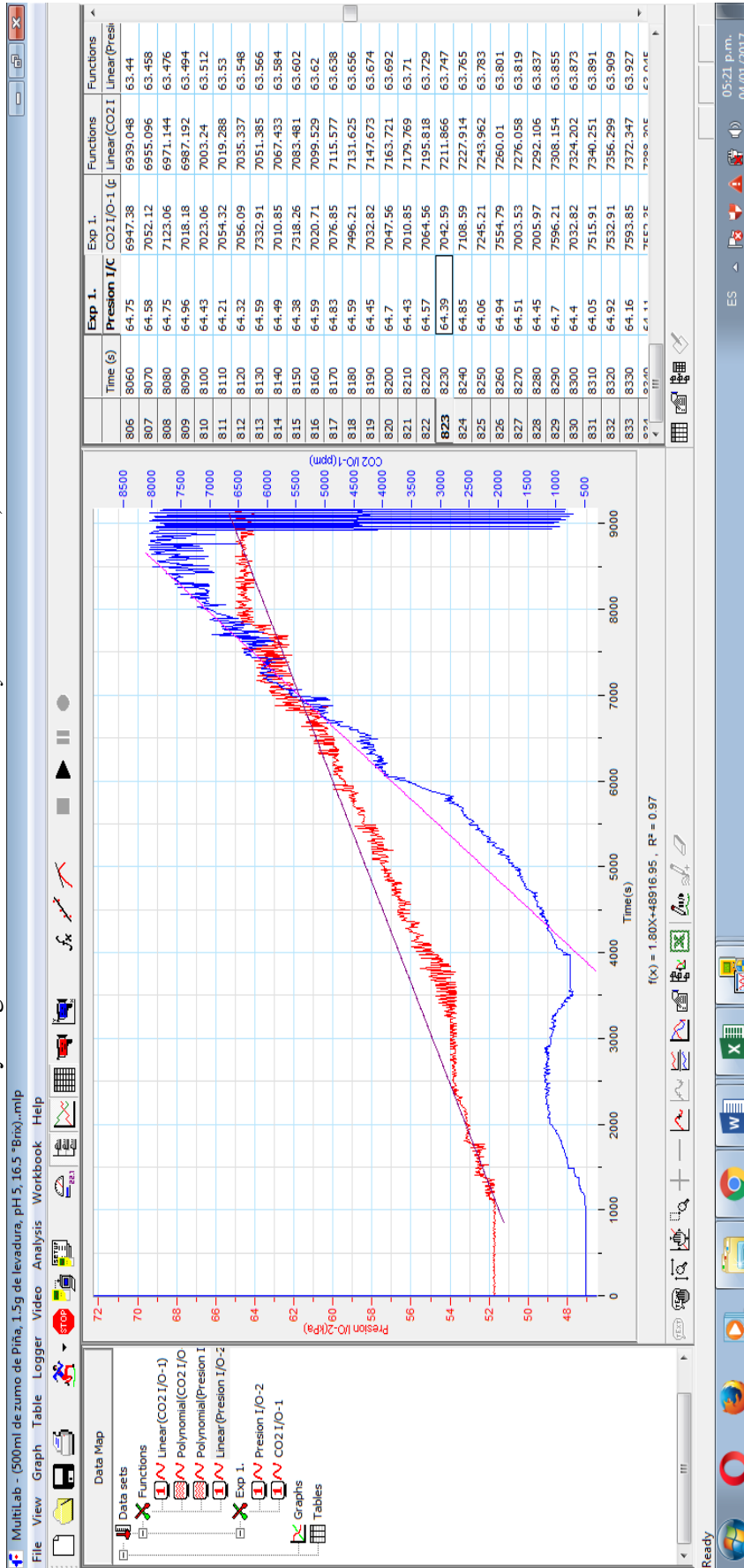
Wang, D., Cooney , C., Demian, A., Dunhill, P., Humphrey, A., & Lilly, M. (1979). *Fermentation and Enzyme Technology* (Vol. I). New York - USA.

Ward, O. P. (1991). *Biotecnologia de la fermentacion. Principios, Procesos Y Producto.* Zaragoza - España: Acribia.

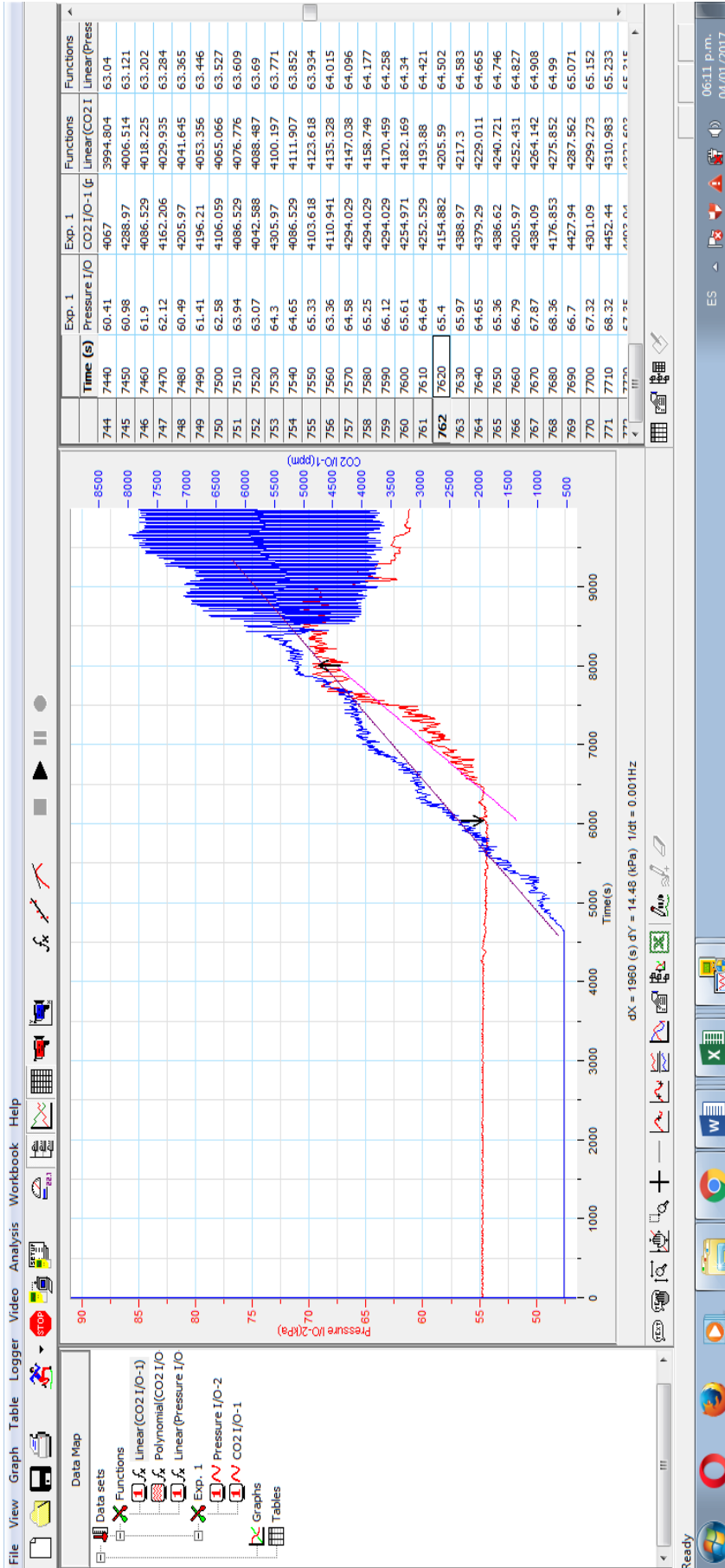
Wills, R., McGlasson, B., Graham, D., & Joyce, D. (1998). *Introduccion a la fisiologia y manipulacion de frutas, hortalizas y plantas ornamentales* (2da. ed., Vol. II). Pereira, Colombia: Acribia S.A.

**ANEXOS**

ANEXO 1. FIGURA DE RECOLECCIÓN DE DATOS CON EL SOFTWARE DE MULTILAB PARA LA MUESTRA (5pH, 16.5 °Brix y 1.5g con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*).



ANEXO 2. FIGURA DE RECOLECCIÓN DE DATOS CON EL SOFTWARE DE MULTILAB PARA LA MUESTRA (5pH, 16.5 °Brix y 250cm<sup>2</sup> con la levadura silvestre).



**ANEXO 3. TABLA DE TRATAMIENTOS UTILIZANDO LA LEVADURA***Saccharomyces cerevisiae*

<b>BLOQUE</b>	<b>pH</b>	<b>°Brix de la mezcla</b>	<b>Cantidad de levadura</b>	<b>Concentración de alcohol</b>
1	4	15	1	<b>0.7</b>
1	6	15	1	<b>0.8</b>
1	4	18	1	<b>0.6</b>
1	6	18	1	<b>0.8</b>
1	4	15	2	<b>0.7</b>
1	6	15	2	<b>0.6</b>
1	4	18	2	<b>0.7</b>
1	6	18	2	<b>0.7</b>
1	5	16.5	1.5	<b>1</b>
1	3.23617	16.5	1.5	<b>0.7</b>
1	6.76383	16.5	1.5	<b>0.8</b>
1	5	13.8542	1.5	<b>0.8</b>
1	5	19.1458	1.5	<b>0.6</b>
1	5	16.5	0.618083	<b>0.7</b>
1	5	16.5	2.38192	<b>0.6</b>
1	5	16.5	1.5	<b>1</b>



**ANEXO 4. TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA LEVADURA**

*Saccharomyces cerevisiae*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>l</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:pH	0.00996078	1	0.00996078	4.38	0.0907
B:°Brix de la mezcla	0.00875018	1	0.00875018	3.84	0.1072
C:Cantidad de levadura	0.00996056	1	0.00996056	4.38	0.0907
AA	0.0703759	1	0.0703759	30.92	<b>0.0026</b>
AB	0.005	1	0.005	2.2	0.1984
AC	0.02	1	0.02	8.79	<b>0.0314</b>
BB	0.10062	1	0.10062	44.21	<b>0.0012</b>
BC	0.005	1	0.005	2.2	0.1984
CC	0.136258	1	0.136258	59.87	<b>0.0006</b>
bloques	0.00035738	1	0.000357384	0.16	0.7083
4					
Error total	0.0113802	5	0.00227604		
Tot al (corr.)	0.2375	15			

C.V.=0.62

R-cuadrada = 95.2083 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 85.625 por ciento

**COEFICIENTE DE REGRESIÓN**

Los efectos estimados para grado alcohólico (°GL).

<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
Promedio	0.999913	0.0337297	
A:Ph	0.052929	0.025301	1
B:°Brix de la mezcla	-0.049608	0.0253007	1
C:Cantidad de levadura	-0.052928	0.0253009	1
AA	-0.164223	0.0295333	1.40984
AB	0.05	0.0337346	1
AC	-0.1	0.0337346	1
BB	-0.196358	0.0295322	1.40984
BC	0.05	0.0337346	1
CC	-0.228507	0.0295331	1.40984
bloque	0.009527	0.0240425	1

Errores estándar basados en el error total con 10 g.L.

**Los coeficientes estimados para la concentración de alcohol**

<i>Coficiente</i>	<i>Estimado</i>
constante	-12.2909
A:pH	0.722578
B:°Brix de la mezcla	1.29009
C:Cantidad de levadura	1.26811
AA	-0.082111
AB	0.0166667
AC	-0.1
BB	-0.043635
BC	0.0333333
CC	-0.457014

Intervalo de confianza al 95%.

**Tabla de optimización de la concentración de alcohol con la levadura**

*Saccharomyces cerevisiae*

Valor óptimo = 1.0063

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
pH	3.23617	6.76383	5.19459
°Brix de la mezcla	13.8542	19.1458	16.315
Cantidad de levadura	0.618083	2.38192	1.41412

**ANEXO 5. TABLA DE TRATAMIENTOS UTILIZANDO LA LEVADURA SILVESTRE**

<b>bloque</b>	<b>pH</b>	<b>°Brix de la mezcla</b>	<b>Cantidad de levadura</b>	<b>Concentración de alcohol</b>
1	4	15	100	<b>0.02</b>
1	6	15	100	<b>0.02</b>
1	4	18	100	<b>0.02</b>
1	6	18	100	<b>0.01</b>
1	4	15	400	<b>0.03</b>
1	6	15	400	<b>0.04</b>
1	4	18	400	<b>0.01</b>
1	6	18	400	<b>0.02</b>
1	5	16.5	250	<b>0.1</b>
1	3.23617	16.5	250	<b>0.01</b>
1	6.76383	16.5	250	<b>0.02</b>
1	5	13.8542	250	<b>0.02</b>
1	5	19.1458	250	<b>0.03</b>
1	5	16.5	65.9	<b>0.02</b>
1	5	16.5	468.2	<b>0.03</b>
1	5	16.5	250	<b>0.1</b>

**ANEXO 6. TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA UTILIZANDO LA LEVADURA  
SILVESTRE.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>l</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Ph	5.37101E-05	1	5.37101E-05	0.85	0.4001
B:°Brix de la mezcla	0.000073634	1	0.000073634	1.16	0.3309
C:Cantidad de levadura	0.000159574	1	0.000159574	2.51	0.1739
AA	0.0080946	1	0.0080946	127.37	<b>0.0001</b>
AB	0.0000125	1	0.0000125	0.2	0.6759
AC	0.0001125	1	0.0001125	1.77	0.2408
BB	0.00633376	1	0.00633376	99.66	<b>0.0002</b>
BC	0.0001125	1	0.0001125	1.77	0.2408
CC	0.00633381	1	0.00633381	99.66	<b>0.0002</b>
Bloques	3.21598E-05	1	3.21598E-05	0.51	0.5087
Error total	0.000317765	5	0.000063553		
Total (corr.)	0.011775	15			

C.V.=0.06

R-cuadrada = 97.3014 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 91.9041 por ciento

### COEFICIENTES DE REGRESIÓN

Los efectos de estimación para la concentración de alcohol

<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
Promedio	0.099974	0.00563625	
A:pH	0.00388664	0.0042278	1.0
B:°Brix de la mezcla	-0.00455074	0.00422776	1.0
C:Cantidad de levadura	0.00669927	0.00422779	1.0
AA	-0.0556953	0.00493502	1.40984
AB	-0.0025	0.00563706	1.0
AC	0.0075	0.00563706	1.0
BB	-0.0492647	0.00493484	1.40984
BC	-0.0075	0.00563706	1.0
CC	-0.0492664	0.00493499	1.40984
bloque	0.0028579	0.00401752	1.0

Los coeficientes de estimación para la concentración de alcohol

<i>Coficiente</i>	<i>Estimado</i>
constante	-3.92942
A:pH	0.28292
B:°Brix de la mezcla	0.371424
C:Cantidad de levadura	0.0347297
AA	-0.0278477
AB	-0.000833333
AC	0.00075
BB	-0.0109477
BC	-0.0005
CC	-0.000985327

Intervalo de confianza al 95%.

**TABLA DE OPTIMIZACIÓN PARA CONCENTRACIÓN DE  
ALCOHOL**

Valor óptimo = 0.1002

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
pH	3.23617	6.76383	5.04109
°Brix de la mezcla	13.8542	19.1458	16.4205
Cantidad de levadura	6.18083	23.8192	15.3754

ANEXO 7. PANEL DE FOTOGRAFÍAS

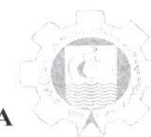
<p><b>MATERIA PRIMA</b></p>	<p><b>ZUMO DE PIÑA</b></p>
	
<p><b>AJUSTE DE °BRIX</b></p>	<p><b>ACTIVACIÓN DE LEVADURA</b></p>
	

<p><b>FERMENTACIÓN DE ZUMO DE PIÑA</b></p>	<p><b>SISTEMA DE INSTALACIÓN</b></p>
<p><b>MONITORIO Y RECOLECCIÓN DE DATOS</b></p>	<p><b>REACTOR ACONDICIONADO</b></p>
<p><b>MEDICIÓN DE °G/L</b></p>	<p><b>DESTILACIÓN</b></p>





**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRONÓMICA  
LABORATORIO DE TAXONOMÍA VEGETAL**



**CONSTANCIA**

EL QUE SUSCRIBE JEFE DEL LABORATORIO DE TAXONOMÍA VEGETAL DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS DE LA U. N. A. PUNO, HACE CONSTAR QUE EL ESPECÍMEN BOTÁNICO (Infructescencia : SOROSIS), PUESTO A DISPOSICIÓN PERTENECE A LA ESPECIE *Ananas comosus* L. cv. Golden "Piña" que posee la siguiente Posición Taxonómica.

REINO Vegetal  
 SUB REINO Phanerogamae  
 DIVISIÓN Angiospermae  
 CLASE Monocotyledoneae  
 ÓRDEN Bromeliales  
 FAMILIA Bromeliaceae  
 GÉNERO Ananas  
 ESPECIE *Ananas comosus* L.  
 CULTIVAR *Ananas comosus* L cv. Golden

SE EXPIDE LA PRESENTE CONSTANCIA A PETICIÓN ESCRITA DE LA SEÑORITA **CAROLINA COILLO VALERO** EGRESADA DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS, UNA PUNO, PARA LOS FINES QUE VIERE POR CONVENIENTE.

PUNO, C.U. 23 de enero del 2017



**ING. MARIO A. SOLANO LARICO**  
 Jefe Laboratorio Taxonomía Vegetal  
 FCA. UNA. - PUNO