



UNIVERSIDAD DEL AZUAY

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**Estudio comparativo del rendimiento y contenido de grado
alcohólico por fermentación controlada con levaduras en agua
miel de penco.**

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN ALIMENTOS

Autor:

ARIOLFO GONZALO OCHOA PADILLA

Director:

CLAUDIO ESTEBAN SÁNCHEZ JÁUREGUI

CUENCA, ECUADOR

2017

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo, a mi Dios quien supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en el camino siempre enseñándome a encarar las adversidades sin perder la dignidad ni respeto ni desfallecer en el intento ya que siempre había una voz presente en mis sueños y en mis ratos de silencio que me alentaba a culminar mi meta.

A mis padres Mami Michí y Ariolfo Ochoa, gracias por cada palabra por cada consejo, ayuda y apoyo en los momentos más difíciles, por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona gracias por los valores por los principios y el coraje para terminar mis objetivos.

Cada palabra en mi trabajo está dedicada a mi esposa Flor Romero pilar fundamental de mi vida, a mi hijito a quien lo amo más que a vida, gracias Iker por tus pequeñas palabras que alentaban día a día y recordarte en mi ciclo de estudios cuando tu no estabas presente físicamente me alentabas en solo saber que todo lo que hago y todo el esfuerzo es para ti hijito mío.

A mis hermanas Silvia y Jennifer, por estar presentes en cada momento y al darme cuenta que ustedes seguían mis pasos di todo de mi para no decepcionarles y ser un buen guía en sus vidas cotidianas y profesionales.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis primeramente me gustaría agradecerle a ti Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

A mi director de tesis, Ingeniero Claudio Sánchez, por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito.

A la Ingeniera María Fernanda Rosales, Dr. Piercosimo Tripaldi, Dr. Jonathan Avilés gracias a ellos por su paciencia y tiempo dedicado, sin la ayuda de ustedes este trabajo no hubiese sido posible.

Durante todo este tiempo he conocido a personas muy importantes, a grandes amigos que jamás los voy a olvidar y siempre ocuparán un lugar en mi corazón, porque los amigos son la familia que uno escoge, muchas gracias a mi gran amigo desde el primer día que puse pie en la Universidad Diego Montero, a mis amigos con quienes he caminado juntos Jonathan Cadme, María Isabel, Nube Rivera, Miriam A, Vanesa Ch, Mayra A Omar Aguilar, Nelly Herrera, amigos con quienes hemos compartido muchas cosas y jamás nos podremos olvidar de cada uno de los momentos vividos, de todos los viajes, los proyectos, en fin todas las anécdotas que recordaré con una grata alegría en mi corazón.

Gracias a Oswaldo Molina, Paul Valverde, porque con ellos he aprendido el valor de una verdadera amistad y el apoyo incondicional.

Durante estos dos años de experiencia en mi trabajo he conocido mucha gente importante que me han sabido apoyar con sus consejos y experiencias compartidas Gracias Ing, Cecilia Barahona, Ing. Hugo Larriva, Don Johnny Segarra, Ing. Juan Andrés Alvarado, que ha sido como mi segundo padre gracias por todo el apoyo moral y vivencias compartidas.

Por eso y por muchas cosas más, lo último que me queda decir es GRACIAS....

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRAT.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	2
OBJETIVO GENERAL.....	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
CAPÍTULO I: MARCO TEORICO.....	3
1.1 Fermentación.....	3
1.1.1 Etanol.....	3
1.1.2 Etanol como resultado de fermentaciones alcohólicas.....	4
1.1.3 Elementos que afectan el incremento y desarrollo de levaduras durante la fermentación...5	5
1.1.3.1 Temperatura.....	5
1.1.3.2 Aireación.....	6
1.1.3.3 PH.....	6
1.2 Levaduras.....	6
1.2.1 Generalidades.....	6
1.2.2 Levaduras productoras de alcohol.....	7

1.2.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
1.2.2.2 <i>Candida utilis</i> ATCC 9950.....	8
1.2.2.3 <i>Saccharomyces uvarum</i> o <i>bayanus</i>	9
1.2.3 Taxonomía.....	10
1.2.3.1 Composición química de las levaduras.....	10
1.3 Inulina.....	11
1.4 Enzimas.....	12
1.4.1 Generalidades.....	12
1.4.2 Clasificación.....	12
1.4.3 Inulinasa E.C 3.2.1.7.....	13
1.5 Cabuya o Penco (<i>Agave americana</i> L).....	14
1.5.1 Aguamiel.....	15
1.5.1.1 Azúcares del aguamiel.....	16
1.5.2 Pulque.....	16
1.6 Azúcares reductores.....	17
CAPÍTULO II: METODOLOGIA.....	18
2.1 Ubicación del experimento.....	18
2.1.1 Equipos materiales e instalaciones.....	18
2.1.1.2 Equipos.....	18
2.1.1.3 Materiales de laboratorio.....	19
2.1.1.4 Cepas utilizadas.....	19
2.2 Métodos de análisis.....	19
2.2.1 Aislamiento de <i>Saccharomyces spp</i> de uva.....	19
2.2.2 Identificación macroscópica de <i>Saccharomyces spp</i>	20
2.2.3 Activación de las cepas.....	21
2.2.3.1 Activación de levaduras liofilizadas.....	21
2.2.3.1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
2.2.3.1.2 <i>Cándida Utilis</i> ATCC 995.....	22

2.3 Medición pH.....	23
2.4 Elaboración del diseño experimental.....	24
2.4.1 Diseño Experimental de Mezclas.....	24
2.4.2 Formato de matriz.....	25
2.5.2 Determinación de la concertación de las cepas.....	25
2.5.2.1 Estandarización de levaduras mediante Patrón McFarland.....	25
2.6 Fermentación del agua miel.....	26
2.6.1 Pasteurización del aguamiel.....	26
2.7 Fermentación en matraz.....	27
2.8 Cuantificación de inulina antes de la hidrolisis.....	27
2.8.1 Determinación de inulina.....	27
2.8.1.1 Determinación de azúcares reductores por el método Lane Eynon.....	27
Preparación de solución estándar de azúcar invertido.....	28
Clarificación del fermento.....	28
Determinación de azúcares por titulación por método Fehling – Causse – Bonnans.....	29
2.8.1.2 Determinación de azúcares reductores Totales por el método Fenol-sulfúrico (ART).....	29
2.9 Hidrolisis de inulina presente en el agua miel.....	30
2.9.1 Cuantificación de inulina después de hidrolisis.....	31
2.10 Inoculación de levaduras.....	31
2.11 Destilación del fermentado.....	32
2.12 Cuantificación de etanol mediante hidrómetro.....	32
2.12 Caracterización genética de las levaduras mediante ADN.....	33
2.12.1 Extracción de ADN.....	33
2.12.1.1 Descripción del proceso.....	33
2.12.2 Electroforesis.....	37
2.12.2.3 Electroforesis con gel de agarosa al 1%.....	37
2.12.2.3.1 Preparación del TAE 50X.....	37
2.12.2.4 Preparación del gel de agarosa al 1%.....	38

CAPÍTULO III: CÁLCULOS Y RESULTADOS.....	41
3.1 Determinación de inulina antes del hidrolizado de agua miel.....	41
3.1.1 Calculo de azúcares reductores (AR).....	41
3.1.2 Calculo de azúcares reductores totales (ART).....	42
3.1.3 Cuantificación de porcentaje de inulina.....	43
3.2 Determinación de inulina después del hidrolizado de agua miel.....	43
3.2.1 Calculo de azúcares reductores (AR).....	43
3.2.2 Calculo de azúcares reductores totales (ART).....	44
3.2.3 Cuantificación de porcentaje de inulina residual.....	44
3.2.4 Resultado de hidrolisis enzimática con inulinasa en agua miel nativa e hidrolizada.....	45
3.3 Cuantificación de etanol por hidrometría.....	45
3.3.1 Interpretación de diseño de mezclas.....	46
3.3.1.1 interpretaciones en triángulo de Superficie de respuesta.....	47
3.4 Análisis de Metanol y alcoholes superiores por Cromatografía de gases.....	49
3.5 Resultados de caracterización de ADN.....	50
DISCUSIONES.....	53
CONCLUSIONES.....	55
BIBLIOGRAFÍA.....	58
ANEXOS.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1 Etanol (alcohol etílico).....	4
Fig. 1.2 Levadura.....	7
Fig. 1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
Fig. 1.4 <i>Candida utilis</i>	9
Fig. 1.5 <i>Saccharomyces bayanus</i>	10
Fig. 1.6 Estructura de la inulina.....	11
Fig. 1.7 Molécula de inulinasa.....	14
Fig. 1.8 Penco.....	15
Fig. 1.9 Aguamiel.....	16
Fig. 1.10 Pulque.....	17
Fig. 2.1 Preparación de los medios de cultivo.....	20
Fig. 2.2 Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae uvarum</i>	20
Fig. 2.3 Vista de <i>Saccharomyces spp</i>	21
Fig. 2.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio de cultivo.....	22
Fig. 2.5 Vista de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mediante microscopio.....	22
Fig. 2.6 Cepas de <i>Candida utilis</i> ATTC 995.....	23
Fig. 2.7 Vista de Cepas de <i>Candida utilis</i> ATTC 995.....	23
Fig. 2.8 Estandarización de las cepas de levaduras a 6×10^8 u.f.c/mL.....	26
Fig. 2.9 Muestras para construcción de curva de calibración.....	30
Fig. 2.10 Incubación de agua miel con inulinasa.....	31
Fig. 2.11 Destilación de muestras.....	32
Fig. 2.12 Pesado de aguamiel con higrómetro.....	32
Fig. 2.13 Equipo de electroforesis.....	39
Figura 2.14 Gel de agarosa.....	39
Figura 2.15 Gel de agarosa en equipo ENDURO GDS.....	40
Fig. 2.16 Fotografía tomada por equipo ENDURO GDS.....	39

Fig. 2.17 Programa Totallab.....	40
Fig. 3.1 Producción de etanol (%) en los Experimentos.....	46
Fig. 3.2 Diagrama de superficie de respuesta MÓdelo lineal.....	47
Fig. 3.3 Diagrama de superficie de respuesta MÓdelo Tridimensional.....	47
Fig. 3.4 Diagrama de Traza de la respuesta estimada.....	48
Fig. 3.5 Valores óptimos de mezcla.....	48
Fig. 3.6 Diagrama de Pareto.....	49
Fig 3.7 Captura de pantalla de análisis de alcoholes por Cromatografía de gases.....	50
Fig 3.8 Resultados de análisis de alcoholes por cromatografía de gases.....	50
Fig. 3.9 Presencia de ADN en los diferentes experimentos.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Composición química de los concentrados proteicos.....	10
Tabla 2.1: Relación de volumen para mezcla de levaduras.....	25
Tabla 3.1: Tabla de dilución para aplicar el método Fehling – Causse – Bonnans.....	41
Tabla 3.2: Curva estándar de patrones de glucosa.....	42
Tabla 3.3: determinación de (%) inulina mediante diferencia de azúcares.....	45
Tabla 3.4: determinación de (%) etanol mediante diferencia de densidades.....	45
Tabla 3.5: experimentos en donde se comprueba la existencia de ADN en Ladder 1.....	51
Tabla 3.6: Valores de bandas de corrido de ADN.....	52
Tabla 3.7: Valores de peso molecular de levaduras en estudio.....	52

ÍNDICE DE ANEXOS

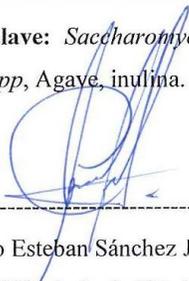
Anexo 1 Muestras de Agua Miel en Balón de Aforo.....	64
Anexo 2 Preparación de patrones de McFarland.....	64
Anexo 3 Espectrofotómetro UV Thermo.....	65
Anexo 4 Preparación de patrones de Glucosa.....	65
Anexo 5 Soluciones para determinación de azúcares reductores por Lane Eynon.....	66
Anexo 6 Titulación de fermentado por Método Fehling - Causse – Bonnans.....	66
Anexo 7 Centrifuga refrigerada EPPENDORF 4804.....	67
Anexo 8 Muestras para la extracción de a ADN.....	67
Anexo 9 Siembra de muestras para electroforesis.....	68
Anexo 10 Equipo de electroforesis.....	68
Anexo 11 Método de determinación de alcohol mediante Hidrómetro.....	69
Anexo 12 Análisis de corridas de banda en Programa Totallab.....	70
Anexo 13 Reporte de cromatografía de gases.....	86
Anexo 14 REPORTE DE PROGRAMA STATISTICA 10.....	88

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL RENDIMIENTO Y CONTENIDO DE GRADO
ALCOHOLICO POR FERMENTACIÓN CONTROLADA CON LEVADURAS EN
AGUA MIEL DE PENCO**

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo comparar la producción de etanol utilizando tres tipos de cepas de levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Candida utilis* ATCC 9950 y *Saccharomyces cerevisiae* spp en aguamiel de penco *Agave Americana* L, la misma que fue hidrolizada con inulinasa, reduciendo la inulina presente en azúcares simples ayudando al proceso de fermentación, utilizando un diseño de mezclas simplex lactice, con el fin de encontrar el mayor porcentaje de etanol producido, obteniendo un resultado de mezcla de 0.333 mL de *Saccharomyces spp* y 0,667 mL de *Candida Utilis* ATCC se obtuvo un 7,3 % de alcohol, mientras que la mezcla 0,667 mL de *Saccharomyces spp* y 0,33 mL de *Saccharomyces cerevisiae silvestre*, presento el porcentaje más bajo de fue de 4,6 %.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* ATCC 9950 y *Saccharomyces cerevisiae* spp, Agave, inulina.



Ing. Claudio Esteban Sánchez Jáuregui
Director del Trabajo de Titulación



Dra. Diana Chalco Quezada
Directora de Escuela



Ariolfo Gonzalo Ochoa Padilla

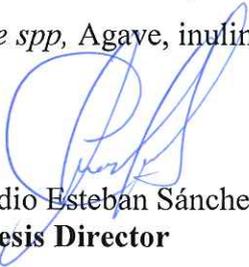
Autor

**COMPARATIVE STUDY OF YIELD AND ALCOHOLIC CONTENT BY
AGAVE NECTAR MEAD YEASTS CONTROLLED FERMENTATION**

ABSTRACT

This work aimed to compare the production of ethanol using three types of yeast strains such as wild *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* ATCC 9950 and *Saccharomyces cerevisiae* spp in *Agave Americana* L nectar mead hydrolyzed with inulinase, reducing the Inulin present in simple sugars and helping the fermentation process. A simplex lactice mixture design was used in order to find the highest percentage of ethanol produced, obtaining a mixture result of 0.333 mL of *Saccharomyces* spp, and 0.667 mL of *Candida Utilis* ATCC; 7.3% of alcohol was obtained, while the 0.667 mL mix of *Saccharomyces* spp and 0.33 mL of wild *Saccharomyces cerevisiae*, presented the lowest percentage, which was 4.6%.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* ATCC 9950 and *Saccharomyces cerevisiae* spp, Agave, inulin.



Ing. Claudio Esteban Sánchez Jáuregui
Thesis Director



Diana Chalco Quezada, PhD
School Director



Ariolfo Gonzalo Ochoa Padilla
Author



Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

Ariolfo Gonzalo Ochoa Padilla

Trabajo de Titulación

Ing. Claudio Esteban Sánchez Jáuregui

Noviembre, 2017.

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL RENDIMIENTO Y CONTENIDO DE GRADO
ALCOHOLICO POR FERMENTACIÓN CONTROLADA CON LEVADURAS
EN AGUA MIEL DE PENCO**

INTRODUCCIÓN

Ecuador es un país que presenta diversos pisos ecológicos, posee climas variados que van desde cálidos y semi-cálidos en la costa, pasando por templados, fríos, semi-cálidos en la sierra hasta llegar al oriente, lo cual favorece el crecimiento de una gran variedad de plantas alimenticias, una de estas plantas es el penco crece y se adapta bien en las zonas áridas y secas de las regiones (Moya, 2016).

La planta de agave, cabuya o penco, resulta ser una alternativa viable para su aprovechamiento en la obtención de bebidas alcohólicas. El aguamiel está compuesto principalmente por una alta cantidad de azúcares fermentables y es particularmente utilizado para la elaboración artesanal del pulque, una bebida alcohólica tradicional. Por lo cual es necesario la investigación en el estudio del proceso de recuperación del aguamiel para el desarrollo de nuevas alternativas de uso de esta savia, así como de otros subproductos obtenidos del Agave.

En la actualidad los procesos biotecnológicos en la producción de etanol, para la elaboración de bebidas alcohólicas destiladas están creciendo, mientras que por otra parte las personas son más exigentes en calidad, debido a esto se utilizara levaduras para fermentar agua miel de penco sin enriquecer, es decir sin adición de azúcares ajenos, así evitando la producción de metanol durante la fermentación, logrando obtener un etanol puro y de alta calidad, por otra parte reduciendo costos y procesos de hidrólisis con ácidos de la inulina y fructooligosacaridos presentes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar mediante un estudio comparativo de rendimiento y contenido de grado alcohólico por fermentación con *Candida utilis* ATCC 9950, *Saccharomyces cerevisiae silvestre* y *Saccharomyces spp*, aplicando inulinasa en agua miel de penco.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Hidrolizar el agua miel aplicando la enzima inulinasa (inulase, Novozym 960).
- Caracterizar mediante relación de hidrolisis enzimática la inulina presente en el agua miel antes y después de la hidrolisis.
- Aislar las cepas de *Saccharomyces spp* obtenido de la uva.
- Realizar un estudio comparativo de tres tipos de levaduras, mediante diseño de mezclas simplex lattice.
- Determinar el porcentaje de metanol y alcoholes superiores obtenido por fermentación de agua miel mediante cromatografía de gases.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1 Fermentación

Es una forma de respiración anaerobia, llamada también respiración intermolecular, este término generalmente se reserva para la actividad de ciertos microorganismos (Muller, 1964). Desde la antigüedad se conoce la actividad de transformación de la materia por parte de hongos y bacterias, si bien algunos de sus procesos han sido utilizados para la elaboración de pan, quesos, vinos o cerveza (Collado, 2011). En el caso de fermentación alcohólica, se refiere a una bio-reacción en donde los azúcares se transforman en alcohol.

Los productos de la fermentación son muy variados según el sustrato, tipo de microorganismo y principales factores que gobiernan el proceso. La presencia de oxígeno gaseoso es necesaria para la fermentación por ejemplo el alcohol etílico o etanol. (Muller, 1964). En estequiometria, el proceso de transformación de la glucosa en alcohol y CO₂ es complejo, ya que se evalúa dos parámetros: el desempeño biomasa – sustrato que es la porción de levadura obtenida por el sustrato que se consume y; el desempeño sustrato - producto, que es lo que se obtiene de producto sintetizado por el sustrato que se utiliza (Vásquez; Dacota, 2007).

1.1.1 Etanol

Conocido también como alcohol etílico, es uno de los primeros productos químicos orgánicos sintéticos usado por los seres humanos y el más importante elemento en las bebidas alcohólicas; de estado líquido, incoloro e inflamable, posee punto de ebullición |de 78 °C, además químicamente se expresa mediante la fórmula CH₃-CH₂OH. La transformación de los azúcares que se encuentran en varias frutas, da como consecuencia

el etanol, el mismo que se le destila para purificar las bebidas fermentadas (Garzón, Hernández, 2009).

Los métodos de obtención de etanol pueden ser realizados a partir de síntesis química o biológica. En el primer caso, la producción parte de la oxidación de etileno, cumpliendo requisitos estrictos de temperatura y presión. El segundo método de fabricación, por vía biológica, es más antiguo que el primero y es en donde se emplea principalmente microorganismos productores de alcohol como las levaduras del tipo *Saccharomyces* y *Kluyveromices*, ya sea para su aplicación en la industria química o en la elaboración de bebidas alcohólicas (García Garibay, 2004).

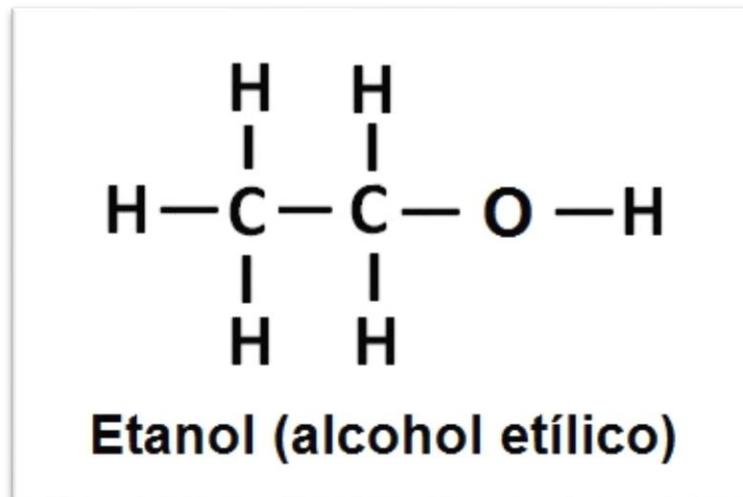


Figura 1.1 Etanol (alcohol etílico)

Fuente: paisagrowseeds, 2016

1.1.2 Etanol como resultado de fermentaciones alcohólicas

La fermentación alcohólica es uno de los procesos más empleados para la elaboración de bebidas alcohólicas. Esta reacción que transforma azúcar en etanol y en CO_2 se da de manera natural gracias a la labor de las levaduras, las cuales son responsables directas de dicha transformación, en ausencia de aire. Sin embargo, a nivel industrial, la gran parte de levaduras inciden en la glucosa y en menor cantidad, a la maltosa, dextrina, etc.; por

lo que se requiere utilizar hongos con alto contenido de amilasa la cual hidroliza el almidón y la dextrina (Casado, 2006).

Por otro lado cabe resaltar que una de las diferencias más importantes entre los mohos y las levaduras es el lugar donde viven dentro del líquido, por una parte, los primeros se establecen en la superficie, las segundas, habitan dentro del líquido y rara vez ascienden al exterior formando una membrana denominada velo. En efecto, se puede ejemplificar con el vino, ya que su levadura se localiza encima de las vides durante la fase de maduración, luego se traslada al mosto en la etapa de estrujamiento y finalmente comienza el periodo de fermentación del mosto, es decir, la conversión a vino (Casado, 2006).

1.1.2 Elementos que afectan el incremento y desarrollo de levaduras durante la fermentación

Los componentes que intervienen en el incremento de levaduras son varios, estos en ciertas circunstancias llegan a favorecer el proceso y en otras, a inhabilitarlo, considerándose en la actualidad algo improbable de pronosticar de manera precisa la cinética de una fermentación alcohólica. Dichos agentes incluyen desde características fisicoquímicas hasta requerimientos nutritivos de las levaduras los cuales pueden ser incorporados para estimular la fermentación, tomando en consideración los criterios de inhibición de la fermentación y su probable detenimiento (Togorres, 2011).

1.1.3.1 Temperatura

Conforme al balance de energía que se produce en la fermentación alcohólica, se obtiene una segregación de energía calórica que llega al medio fermentativo de 25,4 Kcal por cada molécula de azúcar fermentada. Por consiguiente, al comienzo de la fermentación alcohólica, el rango de temperatura va desde los 5 °C - 35 °C, considerándose un rango desde los 28 °C – 32 °C, el mejor para el desarrollo de la fermentación alcohólica, entretanto que temperaturas que superen los 40 °C pueden causar la muerte de las células a causa de la alteración de sus proteínas y finalmente, en el sentido contrario, el

desarrollo de la fermentación puede ser impedido por causa de temperaturas bajas sin matar las levaduras (Togores, 2011).

1.1.3.2 Aireación

Para una adecuada acción de las levaduras, la aireación, es un factor muy importante específicamente al inicio y fin del proceso fermentativo, esto se alcanza gracias a los movimientos y la recirculación, puesto que hay una movilización total del material contenido en el depósito. Además, aplicar la aireación posibilita preservar uniformemente la temperatura a lo largo de todo el proceso de fermentación, ayudando con la efectividad y supervivencia de las levaduras (Hernández, Sastre, 1999).

1.1.3.3 pH

También conocida como medida de iones hidrogeno influye en los lugares activos de las enzimas y por ende, la rapidez con la que se dan las reacciones de la fermentación alcohólica (Cardona, 1998). El mejor nivel de pH para el crecimiento de levaduras se halla en el rango de 4.0 a 6.0 con un rango mínimo de 2.60 a 2.80, puesto que si se baja de estos niveles, la fermentación alcohólica no se daría; siendo los valores óptimos de un mosto 3.0 y 3.8 en el cual la fermentación se realizará sin problemas (Togores, 2011).

1.2 Levaduras

1.2.1 Generalidades

Son conocidas también como hongos, los cuales producen colonias viscosas en la zona de cultivo; por lo general son de forma esférica, ovoide, elipsoide o alargada, en cuanto a tamaño, suelen estar comprendidas de 1 a 9 micrómetros de grosor y de 2 a 20 micrómetros de largo, dependiendo el tipo de especie, edad, nutrición etc. Por otra parte, es importante señalar que las levaduras se dividen en dos tipos de hongos: en

ascomicetos y basidiomicetos, pese a que varias de ellas se manifiestan habitualmente en la forma imperfecta (Carrillo, Audisio, 2007).

Al mismo tiempo, cabe resaltar su característica de ser organismos anaerobios y, pese a que varias especies son fermentadoras, otras carecen de esta particularidad, se puede ejemplificar las variedades *Cryptococcus* y *Rhodoturula*. Las levaduras habitualmente fermentan pequeñas cantidades de glúcidos, por lo general hexosas y di sacáridos. La variedad *Saccharomyces* es fermentadora energética de azúcares en condiciones anaerobias. Por otra parte, los lugares donde se las puede encontrar comúnmente son hojas, flores, el suelo y, aunque en pequeñas cantidades, se encuentran en insectos y animales (Carrillo, Audisio, 2007).



Figura 1.2 Levadura

Fuente: Venelogia, 2016

1.2.2 Levaduras productoras de alcohol

Al hablar de fermentación, directamente se lo relaciona con microorganismos, generalmente con levaduras y algunas bacterias. Son diversos los elementos resultantes de la fermentación, puesto que dependen de factores como el tipo de sustrato, microorganismos o los agentes que dirigen el procedimiento. Con respecto a la

proliferación o de la levadura, esta sucede por medio asexual a través de la duplicación celular, con un tiempo estimado de reproducción de dos a tres horas, con una capacidad de multiplicación de cuatro a cinco veces (Gallego, 2007).

1.2.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Conocida desde la antigüedad, como la levadura del pan, del vino y de la cerveza, se ha convertido en un organismo de estudio común en el laboratorio. La investigación biotecnológica ha mantenido el uso tradicional que se ha hecho de esta levadura, mejorando e innovando los procesos de panificación y de producción de bebidas alcohólicas (Gonzales, Valenzuela, 2000). Cabe destacar que, al ser un elemento muy empleado en la industria, su estudio es muy extenso, llegándose a conocer a profundidad su genética y fisiología (Méndez, 2014).



Figura 1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Fuente: Herbolaria.altervista, 2016

1.2.2.2 *Candida utilis* ATCC 9950

Esta levadura se ha utilizado desde hace 70 años en la producción de alimentos y potenciadores de sabor, es utilizada para múltiples procesos de fermentación y degradación de residuos celulíticos. (Y. H. Hui, 1995). La *candida utilis* tiene una amplia capacidad de aclimatación frente a las distintas variaciones de los factores de

crecimiento y desarrollo, además de contar con una gran cantidad de proteínas y aminoácidos esenciales.



Figura 1.4 *Candida utilis*

Fuente: Stiftung-france, 2016

1.2.2.3 *Saccharomyces uvarum* o *bayanus*

Actualmente existe una gran variedad de especies, todas con diferente homología con *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* y *S. pastoreanus*. La *S. uvarum* es considerada muy idéntica a la *S. cerevisiae* en términos de deterioro lento de bebidas. (Barbara M. Lund, 2000). Específicamente la *S. uvarum* posee la aptitud de desarrollar su función metabólica a temperaturas bajas, potenciando la creación de elementos volátiles, los mismos que diferencian a las bebidas alcohólicas que las usan (Muñoz *et al*, 2012). Cabe señalar que, en cuanto a las características propias de la *S. uvarum*, se puede citar su baja productividad en cuanto a ácido acético se refiere, su gran capacidad de obtención de glicerol, su aptitud para liberar esteres (fenil - 2 - etanol) y de tioles; por otro lado, dentro de sus particularidades fermentativas es importante resaltar que necesita muy poco nitrógeno, trabaja a bajas temperaturas (desde los 10 °C), tiene bajo rendimiento en la obtención de acidez volátil y H₂S (Abiet, 2011).

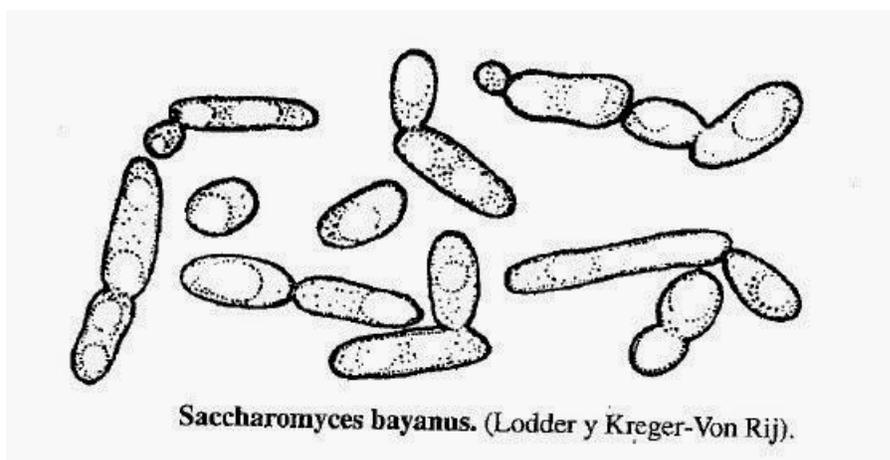


Figura 1.5 *Saccharomyces bayanus*

Fuente: Urbinavinos.blogspot, 2015

1.2.3 Taxonomía

A continuación, se muestran en recuadros las diferentes taxonomías de las levaduras:

1.2.3.1 Composición química de las levaduras

Tabla 1.1 Composición química de los concentrados proteicos

TABLA I
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS CONCENTRADOS PROTEICOS / CHEMICAL COMPOSITION OF THE PROTEIN CONCENTRATES

	C ₁ (% p/p)	C ₂ (% p/p)
Humedad	6,85 ^a ± 0,11	6,17 ^a ± 0,02
Cenizas	4,40 ^a ± 0,09	13,21 ^b ± 0,12
Grasa	5,25 ^a ± 0,04	3,48 ^b ± 0,05
Proteína cruda	75,81 ^a ± 0,39	73,16 ^b ± 0,34
Nitrógeno no proteico (NNP)	0,90 ^a ± 0,02	0,51 ^b ± 0,01
Proteína verdadera	70,16 ^a ± 0,33	69,94 ^a ± 0,34
ARN	4,59 ^a ± 0,02	2,71 ^b ± 0,01
Carbohidratos	8,25 ^a ± 0,52	4,04 ^b ± 0,22

C₁: concentrado proteico obtenido por extracción alcalina y precipitación isoeléctrica. C₂: concentrado proteico obtenido por extracción alcalina, fosforilación con trimetafosfato de sodio y precipitación isoeléctrica. Los valores seguidos de la misma letra, para cada fila horizontal, no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Mann-Whitney (P < 0,05).

Fuente: Cori *et al*, 2006

De acuerdo a Garzón y Hernández quienes citan a Fajardo y Sarmiento, los componentes inorgánicos que poseen las levaduras, normalmente componen un 5-9 % en peso seco.

Las sustancias más importantes son ácido fosfórico, con un porcentaje del 50 % y potasio del 30 %. Los elementos nitrogenados tienen unos dos tercios del peso seco de las levaduras (30-75 %), conteniendo de un 5 % y 12 % de Nitrógeno. Estos compuestos se distribuyen en un 64% de proteína, 10 % de purina, 10 % de aminoácidos y peptonas, 8 % de amonio y la diferencia se distribuye en pirimidinas y vitaminas. La cantidad habitual de aminoácidos obedece a su nutrición, suministro de oxígeno, temperatura, cultivo, etc. (Garzón, Hernández, 2009).

1.2 Inulina

La inulina es un carbohidrato no asimilable, disponible en diferentes tipos de vegetales, frutos y granos. Al día de hoy, en la industria alimentaria, este compuesto se obtiene de la raíz de la achicoria, piñas y hojas de las variedades de agave y se emplea considerablemente a manera de ingrediente en alimentos funcionales. La oligofruktosa y la fructooligosacáridos, elementos que se derivan de la inulina, por lo general se las denomina fructanos, mismos que se encuentran formados básicamente por cadenas lineales de fructosa (Madrigal, Sangronis, 2007).

La inulina reacciona favorablemente en el organismo, puesto que normaliza los niveles de colesterol en la sangre, disminuye la aparición de ciertos tipos de cáncer, fortalece el sistema inmune y ayuda a prevenir problemas gastrointestinales. Con respecto a su uso, en la industria alimentaria se emplea para espesar, gelificar, emulsionar, reemplazar al azúcar y humectar (Madrigal, Sangronis, 2007).

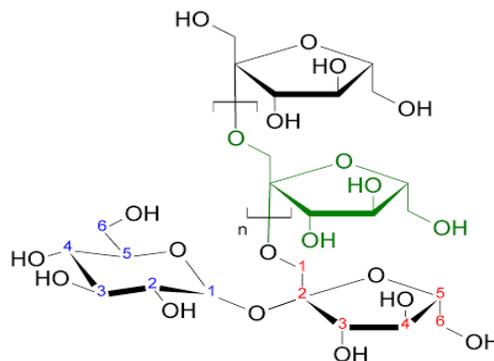


Figura 1.6 Estructura de la inulina

Fuente: Bromatopesquisa, 2012

1.4 Enzimas

1.4.1 Generalidades

Las enzimas son elementos catalizadores de procedencia biológica que aumentan la velocidad de las reacciones químicas. La organización de los metabolismos se da gracias a que toda célula posee una cantidad de enzimas definida genéticamente. Por otro lado, se debe tener en cuenta que la mayoría de enzimas son proteínas, aunque también se puede encontrar ácidos nucleicos llamados ribozimas que poseen una función catalizadora (Koolman y Röhm, 2004).

Acosta y Cárdenas quienes citan a Ferket, mencionan que las enzimas poseen un elevado peso molecular (de 10 000 a 500 000 Da), siendo muy sensibles al entorno físico - químico, el mismo que puede cambiar su función. En relación a lo anterior, los mismos autores citando a Sabatier y Fish, indican que otra propiedad muy importante que tienen las enzimas, radica en que pueden catalizar grandes porciones de sustrato en tiempos cortos. Una mol tiene la capacidad de reaccionar con un sustrato de 1000 a 10000 veces por segundo, gracias a la afinidad que poseen estos dos (enzima y su sustrato).

Cabe agregar que, para medir la acción catalizadora de una enzima, se debe considerar el aumento de la velocidad de la reacción bajo circunstancias concretas, en otras palabras, se debe cuantificar el margen de diferencia de recambio tardío entre la parte catalizada y no catalizada (de color naranja a amarillo) durante un periodo de tiempo específico; expresándose la velocidad de la reacción como cambio de concentración por la unidad de tiempo respectiva (Koolman y Röhm, 2004).

1.4.2 Clasificación

Las enzimas son clasificadas según la reacción catalizada (Acosta y Cárdenas, 2006):

- Óxido – reductasas Ec 1: reacción de oxidación - reducción, transferencia de electrones.
- Transfererasas Ec 2: reacción de transferencia de grupo(s) funcional(es)

- Hidrolasas Ec 3: reacción de hidrólisis (transferencia al agua)
- Liasas Ec 4: adición de grupos a dobles enlaces o creación de dobles enlaces eliminando grupos.
- Isomerasas Ec 5: traslado de grupos de igual molécula para dar isómeros, isomerización.
- Ligasas Ec 6: creación de enlaces con escisión del ATP

1.4.3 Inulinasa E.C 3.2.1.7

Es una enzima que tiene la propiedad de hidrolizar la inulina en fructosa casi purificada en su totalidad, por lo general se emplea en el área de los alimentos industrializados como una alternativa al azúcar, con una capacidad de dulzor que va desde 1.5 a 2 veces lo que endulza la sacarosa. Por otro lado, esta enzima también se obtiene de algunas variedades del reino vegetal, así como de microorganismos, y éstos dan cantidades idóneas para trabajar a nivel industrial (Castillo y Chamy, 2010).

Castillo y Chamy, quienes citan a Kushi *et al* y a Laloux *et al*, se refieren a la inulinasa como la enzima que cataliza la hidrólisis β -D-(2-1)-fructosídicos en la inulina formando fructosa y glucosa. Y los mismos autores, mencionando esta vez a Rouwenhorst *et al*, indican que las inulinasas se dividen en exoinulinas y endoinulinasa. Las primeras catalizan la remoción de unidades de fructosa desde el principio hasta el fin de la cadena con la hidrólisis de residuo de sacarosa. Las segundas, catalizan la hidrólisis de los enlaces internos de la molécula de inulina, originando inulotriosa, inulotetrosa, inulopentosa sin actividad invertasa para hidrolizar el residuo de sacarosa (2010).

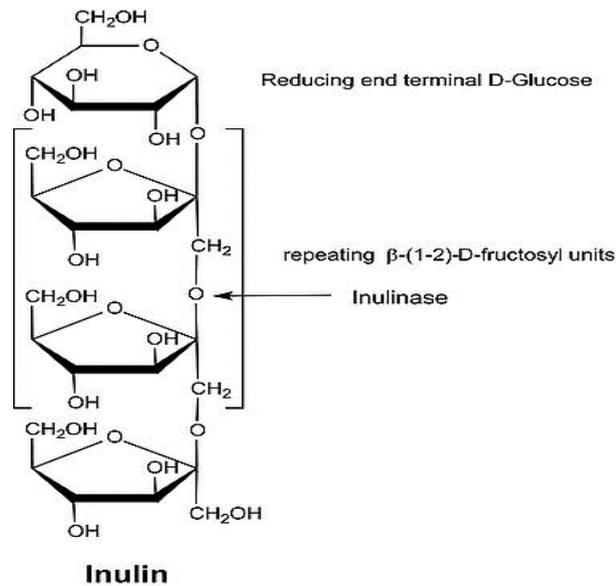


Fig. 1.7: Molécula de inulina

Fuente: Sigma – Aldrich, 2016

1.5 Cabuya o Penco (*Agave americana L*)

Llamada también cabuya negra es un vegetal originario de Ecuador, el cual se emplea de diferentes maneras, tales como cerco de terrenos, dar de comer a animales de ganado, para la producción de costales, hilos, etc. Sin embargo, cabe destacar su importancia al ofrecer varias propiedades nutricionales al ser humano, puesto que posee gran cantidad de fructoligosacarios, elemento que lo constituye como un alimento prebiótico, contribuyendo a la reconstitución de la micro flora intestinal (Chancusig, 2007).

Chancusig quien cita a Semarnap, aclara que las zonas donde comúnmente se pueden encontrar a esta planta son ambientes con climas secos, con precipitaciones de lluvia que alcanzan los 300 mm al año, temperaturas promedio de 16°C – 18 °C, zonas con un rendimiento agrícola muy escaso, asimismo se pueden ubicar en pendientes ásperas, en elevaciones de la serranía con escaso material orgánico y pH neutro con pequeñas tendencias tanto a la acidez como a la alcalinidad (2007).



Fig. 1.8 Penco

Fuente: Ecoosfera, 2011

1.5.1 Aguamiel

El aguamiel es el líquido se puede extraer de diferentes tipos de agaves, su formación se da en la etapa de maduración y se puede sacar en la fase previa al florecimiento, menciona además, que el aguamiel posee carbohidratos en abundancia, siendo los más importantes la inulina, sacarosa y fructosa. Asimismo, Ramírez mencionando a Flores *et al*, declara que se puede extraer de cada agave un promedio de 3 a 6 litros diarios de aguamiel durante un periodo de 3 a 5 meses. Es importante resaltar que el fluido se puede beber directamente o se hierve en un periodo corto de tiempo; prolongando de esta forma su duración (Ramírez, Moreno, 2010).



Fig. 1.9 Aguamiel

Fuente: Rutasbioculturales 2012

1.5.1.1 Azúcares del aguamiel

El aguamiel es una bebida dulce (7 a 14 °Bx) con aromas herbáceos, es incoloro y posee proteínas, carbohidratos y minerales. La cantidad de sacarosa (azúcar con mayor presencia) que contiene el agave maduro es considerable, por lo que se lo utiliza a modo de materia prima en el área de la fermentación en donde se llega a obtener proteínas de levadura, dextranas para fin alimentario o médico, vitaminas, ácidos orgánicos, jarabes y miel. Además, posee otros azúcares, pero en menor medida tales como oligofruetosacáridos y polifruetosacáridos, mismo que son polisacáridos compuestos por glucosa y fructosa respectivamente (Flores, Mora y Romero 2011).

1.5.2 Pulque

Es considerada como una de las bebidas alcohólicas más tradicionales y e históricas de México, la cual puede ser obtenida mediante la transformación de la savia azucarada usualmente llamada aguamiel. Esta bebida, de consistencia espesa y levemente ácida, se consume por lo general en localidades indígenas y mestizas de los países en los que se pueden encontrar al agave. La fase de fermentación empieza en el maguey, en el cual se

hallan los microorganismos muy útiles para el proceso, tales como levaduras, bacterias tanto lácticas como etanólicas y creadoras de exopolisacáridos. Todas estas llegan a fermentar fragmentos de los azúcares aprovechables en el aguamiel, pero cabe destacar que el desarrollo de toda la fase se realiza a mayor velocidad agregando una parte de pulque producido con anterioridad (semilla) (Cervantes, Pedroza, 2008).



Fig. 1.10 Pulque

Fuente: Criteriohidalgo

1.6 Azúcares reductores

Son aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo intacto y que a través del mismo pueden reaccionar con otras moléculas como reductores, todos los mono sacáridos son azúcares reductores ya que al menos tienen un $-OH$ hemiacetalico libre, por lo que dan positivo al reactivo de Fehling, Maillard y Benedic. (Franklin, 2013) (Cruz Crintacho, 2014).

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1 Ubicación del experimento

El presente trabajo fue llevado a cabo en el laboratorio de Biotecnología y en el laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ingeniería de alimentos, ubicado en la Facultad de Ciencia y Tecnología perteneciente a la Universidad del Azuay.

El agua miel obtenida fue de la zona de Nabón perteneciente a la provincia del Azuay, la muestra fue recolectada en condiciones asépticas directamente del agave para así poder evitar lo máximo contaminaciones con bacterias, levaduras y hongos, la muestra presentaba una temperatura de 18°C, lo cual se le agrego hielo para bajar la temperatura y así poder conservar hasta llegar al laboratorio.

2.1.1 Equipos materiales e instalaciones

2.1.1.2 Equipos

Cámara de flujo laminar CSB 120

Espectrofotómetro Uv THERMO

Equipo fermentador TECNOPAST

Incubadora GEMMYCO MOL-O10

Microscopio OLYMPUS CX22LED

Autoclave THERMO

Potenciómetro CSB 120

Termómetro

Brixómetro BOECO

Refrigeradora

Centrifugadora EPPENDROF 5804

2.1.1.3 Materiales de laboratorio

Azas de siembra

Cajas Petri

Pipetas serológicas

Pipetas automáticas de 10, 100 y 1000 ul

Puntas estériles de 10, 100 y 1000 ul

Pipetas volumétricas

Mechero de alcohol

Balones de aforo 25, 50, 100, 1000 mL

Vasos de precipitación

Probetas

Vasos de Erlenmeyer

Agitador

Bureta

Gradilla

Marcadores

Mechero de alcohol

2.1.1.4 Cepas utilizadas

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* ATCC 995 y *Saccharomyces spp.*

2.2 Métodos de análisis

2.2.1 Aislamiento de *Saccharomyces spp* de uva

El aislamiento de la levadura se llevó a cabo utilizando un medio de cultivo selectivo

El cual fue caldo SABOURAUD, para lo cual se tomó 6 gramos de SABOURAUD y se mezcló con 100 ml de agua destilada, se llevó a esterilización a 120°C durante 20 minutos se dejó enfriar unos 5 minutos para después colocarlas en cajas Petri trabajando dentro de una cámara de flujo laminar.

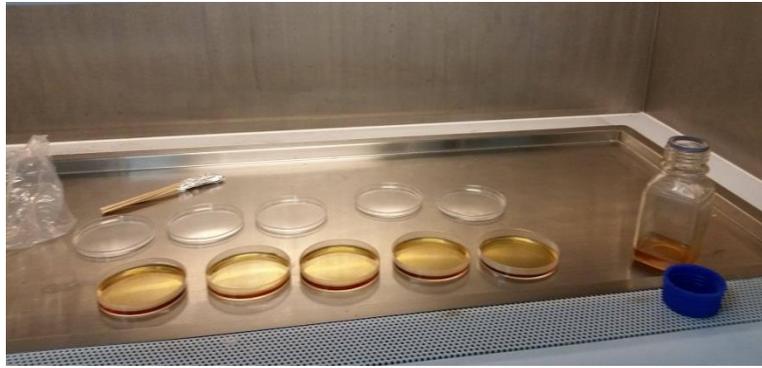


Fig. 2.1 Preparación de los medios de cultivo

Por otra parte, se consiguió uvas negras (*vitis vinifera*), la cual se llevó a proceso de troceado se lo coloco en un frasco aséptico y se lo llevo a incubación por 24 horas a temperatura de 28°C, luego con hisopos estériles se introdujo en el mosto fermentado para luego ser frotado en el medio de cultivo, se puso en incubación durante 48 horas durante 28 °C, se observaron colonias resultantes y se observó el crecimiento obtenido en el microscopio, las colonias tenia contaminación por hongos.

Para obtener levaduras sin contaminación por hongos lo que he hizo fue, hacer resiembras raspando cuidadosamente solo la parte de las levaduras y traspasándolas a cajas Petri con medio de cultivo SABOURAUD, dejándolas en incubación y dando un seguimiento en el microscopio hasta que no haya señales de contaminación por hongos visual como microscópicamente.

2.2.2 Identificación macroscópica de *Saccharomyces spp.*



Fig. 2.2 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae uvarum*

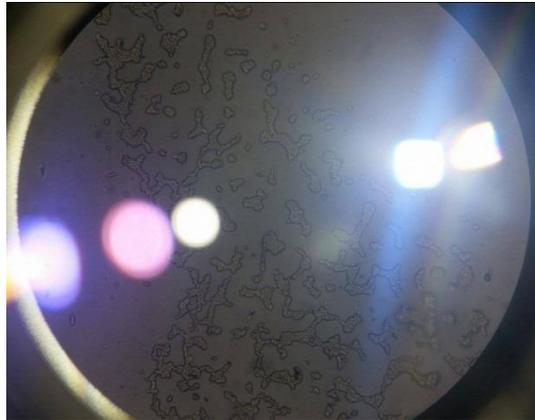


Fig. 2.3 Vista de *Saccharomyces spp*

2.2.3 Activación de las cepas

A continuación, se detalla todos los pasos de la metodología llevada a cabo según sus diferentes etapas.

Se partió de las levaduras de *Saccharomyces spp* y *Candida Utilis* ATCC 995

2.2.3.1 Activación de levaduras liofilizadas

2.2.3.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras liofilizadas comerciales se activaron utilizando caldo de SABOURAUD. Se prepararon 25 mL de caldo en un frasco de dilución lo cual se llevó a esterilización a 120 °C durante 20 minutos dejando enfriar esta se trasvaso a cajas Petri y se dejó enfriar durante 30 minutos para luego proceder a la siembra.

Para la activación se procedió a diluir las levaduras en agua estéril a 28 °C la cual es ideal para su activación, luego se procedió a frotar en el medio de cultivo ya antes preparado, utilizando una cámara de flujo se incubo en una estufa a temperatura de 28 °C durante 2 días.

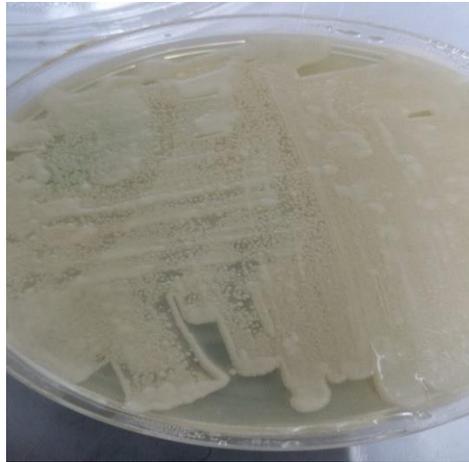


Fig.2.4 *Saccharomyces cerevisiae* en medio de cultivo

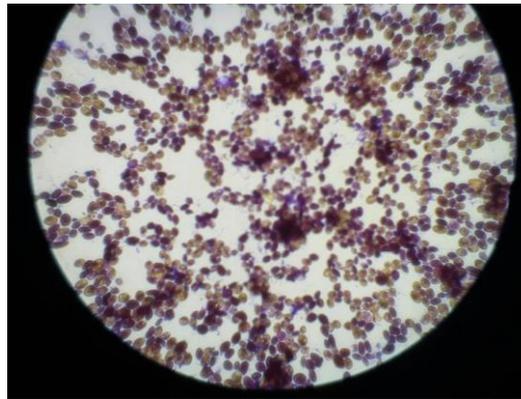


Fig. 2.5 Vista de *Saccharomyces cerevisiae* mediante microscopio

2.2.3.1.2 *Cándida Utilis* ATCC 995

Para esta levadura se procedió a romper el hisopo donde contiene la levadura y realizar la siembra directa sobre agar Sabraud, se incubo en una estufa durante dos días a 28 °C para su posterior almacenamiento a temperatura de refrigeración.

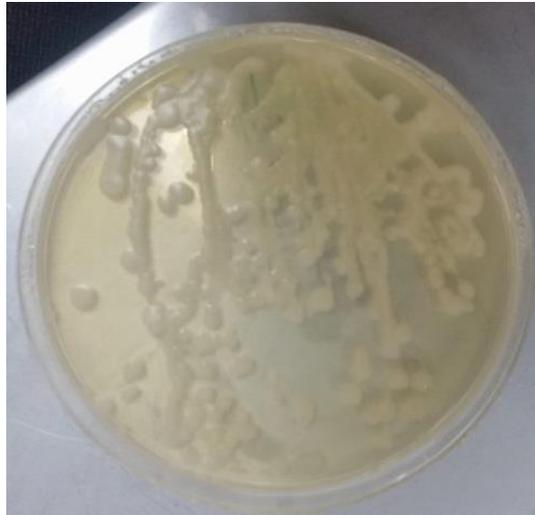


Fig. 2.6 Cepas de *Candida utilis* ATTC 995

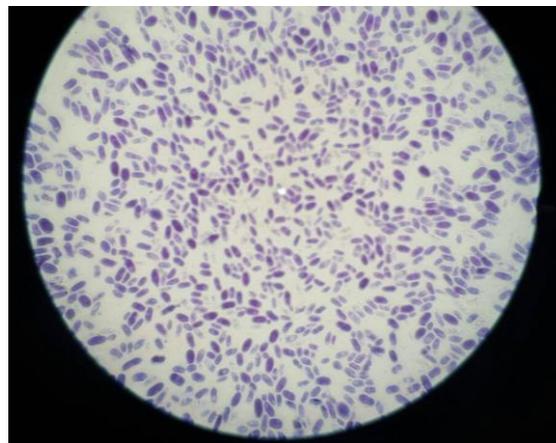


Fig. 2.7 Vista de Cepas de *Candida utilis* ATTC 995

2.3 Medición pH

Dependiendo del lugar en donde crece la savia o agua miel presenta un pH menor a 7, por lo que se utilizó para su medida, un ph metro o potenciómetro Meter Toledo, el cual fue previamente calibrado soluciones de buffer de 4,7 y 7,02 tomando una muestra homogénea de 50 mL.

2.4 Elaboración del diseño experimental

Se empleó el diseño de mezclas o simplex lattice con este método es el indicado para estudiar mezclas experimentales para la obtención respuestas confiables y seguras, los factores son componentes o ingredientes por consecuencia sus niveles no son independientes, por consecuencia cambiando la proporción entre ellos cambiara el nivel de al menos otro componente, ya que la proporción de los componentes es la característica de interés y el total de la mezcla de entre los componentes debe de resultar siempre al 100%. (Gómez 2013).

Para acomodar una ecuación polinomial para representar la superficie de respuesta sobre la región entera del simplex, una elección natural para un diseño podría ser una de la cual los puntos esparcidos regularmente sobre todo el espacio factor simplex.

2.4.1 Diseño Experimental de Mezclas

El diseño de mezclas para la formulación de nuevos productos ha venido ganando mucho interés específicamente para la formulación de alimentos, ya que con esto se puede realizar combinaciones de productos buscando nuevas características funcionales y optimizar recursos como la de las materias primas para su elaboración, reduciendo costos y tiempos de fabricación. Dentro de la industria Alimentaria, es necesario acudir a herramientas estadísticas de diseño robusto y experimental para varios componentes o ingredientes en una mezcla. En la elaboración de jugos, néctares, compotas, bebidas alcohólicas, etc., que se requiera encontrar la mezcla óptima de ingredientes que permita generar mejores características organolépticas como físicas, reológicas o químicas, incluso si hay algún componente que sea muy costoso el investigador podrá interactuar con el diseño y encontrar la mezcla óptima.

En estos tipos de experimentos los factores que intervienen son las proporciones de los componentes de la mezcla y las respuestas a optimizar son funciones de esas proporciones con respecto a la total y no depende de la cantidad de cada componente.

La forma de análisis e interpretación es a través una superficie de respuesta, que es la que permite encontrar una mezcla óptima.

2.4.2 Formato de matriz

Los tres factores a evaluar son las levaduras:

FACTOR 1 (X1): *Saccharomyces cerevisiae*

FACTOR 2 (X2): *Saccharomyces spp*

FACTOR 3 (X3): *Candida Utilis* ATCC 995

La variable dependiente a evaluar va ser la cantidad de alcohol producida por la mezcla de levaduras.

Tabla 2.1 Relación de volumen para mezcla de levaduras

	X1	X2	X3
1	0,000000	0,333333	0,666667
2	0,666667	0,333333	0,000000
3	0,000000	0,666667	0,333333
4	0,333333	0,333333	0,333333
5	0,333333	0,666667	0,000000
6	0,333333	0,000000	0,666667
7	0,000000	0,000000	1,000000
8	0,666667	0,000000	0,333333
9	0,000000	1,000000	0,000000
10	1,000000	0,000000	0,000000

2.5.2 Determinación de la concertación de las cepas

2.5.2.1 Estandarización de levaduras mediante Patrón McFarland

- Se preparó 100 mL de solución salina en este caso utilizamos ClNa al 0,85 %, la solución fue colocada 25 mL en tres tubos de ensayo estériles, vez preparada la solución con la ayuda de un asa bacteriológica se procedió a tomar colonias del medio de cultivo y trasvasarlas al tubo de ensayo en donde dependiendo la cantidad

de colonias visualmente vamos comparando con la solución patrón hasta llegar a la concentración requerida.

- Para nuestro diseño y estandarización utilizaremos el patrón numero 2 ya que cuenta con un número considerable de levaduras que sería un aproximado de 6×10^8 u.f.c/mL.



Fig. 2.8 Estandarización de las cepas de levaduras a 6×10^8 u.f.c/mL

2.6 Fermentación del agua miel

Se le dio un tratamiento al agua miel, para después medir la concentración de inulina y azúcares, los pasos son detallados a continuación.

2.6.1 Pasteurización del aguamiel

Se llevó a proceso de pasteurización a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 segundos, logrando así eliminar cualquier tipo de contaminación que podía haber ocurrido en la recolección y pudiendo así afectar a la fermentación.

Una vez pasteurizada se almacena en envases estériles a temperatura de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.7 Fermentación en matraz.

Se utilizó 10 matraz de de 1 L de capacidad en la cual se le adiciono una tapa hermética al recipiente la misma que fue sellada con Parafilm para ayudar a que no ingresen agentes contaminantes, la tapa cuenta con un orificio en la cual esta introducida una válvula con para el escape de CO₂ producido durante la fermentación, orificio con para la toma de muestra para la medición de ph y azucars las muestras se incubaron a 28 °C.

2.8 Cuantificación de inulina antes de la hidrolisis

2.8.1 Determinación de inulina

2.8.1.1 Determinación de azúcares reductores por el método Lane Eynon.

En soluciones alcalinas, los azucars reductores como la sacarosa, la glucosa, la fructosa etc., tienen la propiedad de oxidarse a sus respectivos ácidos carboxílicos, reduciendo el cobre en estado cúprico (Cu⁺²) a óxido cuproso (Cu⁺¹). El método Lane y Eynon calcula el volumen de una solución que contengan azucars que se requiere para precipitar todo el cobre presente en una cierta cantidad de solución de Fehling de concentración conocida.

El Reactivo de Fehling reacciona la oxidación alcalina de aldosas y de cetosas que van a transformarse en ácido glucónico.

Este reactivo está compuesto de dos soluciones A y B que deben mezclarse al momento de su uso. La solución A contiene CuSO₄. La solución B contiene tartrato de sodio en NaOH. El tartrato tiene la función de acomplejar al Cu²⁺ produciendo coloración azul. La especie oxidante es el Cu²⁺ que se reduce a Cu⁺ precipitando como óxido de cobre Cu₂O rojo. La oxidación total de los monosacáridos tiene lugar por la intercepción de la forma de cadena abierta presente en el equilibrio hemiacetal del aldehído - cetona, a un que en cualquier momento sólo hay una cantidad pequeña de la forma de la cadena abierta, esa cantidad se reduce y continúa hasta que toda la muestra ha experimentado la reacción.

Partiendo de los fundamentos anteriores existen diferentes técnicas han sido utilizadas para determinar el óxido cuproso que se forma y se han obtenido datos de calibración, de estos métodos los más utilizados son: Lane-Eynon y Munson y Walter.

El método Lane-Eynon se titula en dos etapas utilizando Fehling caliente, se añade una cantidad hasta que haya total reducción, determinando el punto final con azul de metileno por goteo, controlando la temperatura y haciendo cada titulación por duplicado.

Para la de terminación de azúcares reductores por el método Lane Eynon debemos seguir los siguientes pasos:

Preparación de solución estándar de azúcar invertido

- Disolver 23.75 g de sacarosa pura en cerca de 120 mL de agua en un matraz volumétrico de 250 mL. Añadir 9 ml de HCl concentrado y déjese en reposo durante 8 días a temperatura ambiente. Diluir hasta la marca con agua.
- Transferir 200 mL a un matraz volumétrico de 2 L. Añadir cerca de 200 mL de agua agitando y 71.4 mL de una solución de NaOH 1 N y 4 g de ácido benzoico. Agregar 1 L de agua, mezclar y que la solución tenga aproximadamente un pH de 3. Ajustar si es necesario y diluir hasta la marca. Esto produce una solución estable al 1% (m/v) de azúcar invertido.

Clarificación del fermento

- Tomar 100 mL de muestra y colocarlo en un vaso de precipitado.
- Neutralizar exactamente con solución de NaOH 1N. Para soluciones coloreadas es conveniente utilizar un potenciómetro para controlar la neutralización.
- Agregar por pequeñas porciones, solución de acetato neutro de plomo, hasta que no se observe la formación de más precipitado.

- Diluir con agua hasta la marca del matraz, mezclar y dejar en reposo.
- Filtrar la parte sobrenadante, utilizar papel y embudos secos.
- Agregar por pequeñas porciones, oxalato de potasio anhidro, agitando después de cada adición hasta que no se observe la formación de más precipitado. Volver a filtrar.

Determinación de azúcares por titulación por método Fehling – Causse – Bonnans.

- Colocar en un erlenmeyer de 500 mL, 15 mL de agua destilada, 5 mL de la solución B y 5 mL de la solución A.
- Añadir algunas perlas de vidrio y colocar el erlenmeyer con la solución de Fehling en una placa calefactora.
- Hervir la solución exactamente 2 minutos.
- Agregar 4 gotas de azul de metileno 5 segundos antes de terminar el periodo de ebullición.
- Añadir desde la bureta el fermento a la solución en ebullición hasta que desaparezca el color azul dejando la coloración roja debida a la aparición de óxido cuproso. Esta titulación no debe sobrepasar los 3 minutos.
- Realizar la titulación por duplicado

2.8.1.2 Determinación de azúcares reductores Totales por el método Fenol-sulfúrico (ART).

Para esta valoración de azúcares en medios líquidos, pueden ser cuantificados como azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados, se recomienda el método fenol/sulfúrico

puesto que es sensible rápido y exacto (Nuffield, 1984), estos azúcares dan un color naranja muy estable cuando reaccionan con fenol en presencia de ácido sulfúrico concentrado, esta coloración depende del porcentaje de azúcares presentes, la absorbancia se realiza a 490 nm y la concentración se mide a través de una curva de calibración antes ya preparada (Higuera, 2010).

Para esta determinación se deben seguir los siguientes pasos:

- Realizar una curva de calibración (límites del método: concentración de azúcares 50 $\mu\text{g/mL}$) y un blanco.

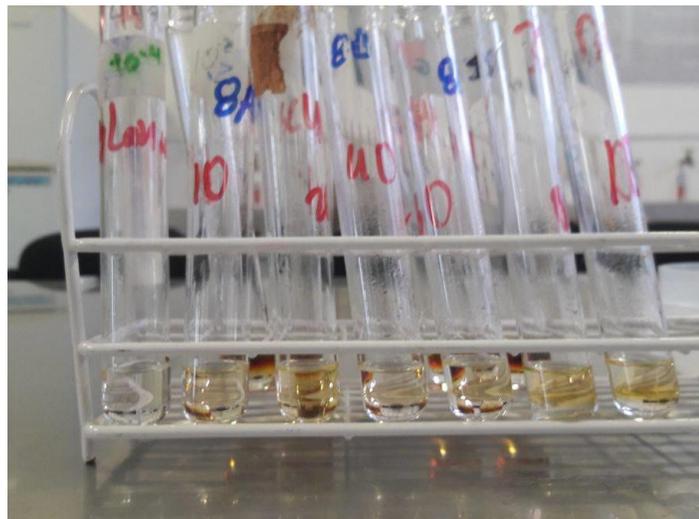


Fig. 2.9 Muestras para construcción de curva de calibración

- En un tubo de ensayo colocamos 200 μL de muestra.
- Adicionamos 2 mL de agua destilada.
- 200 μL de fenol más 1 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Se mantiene que reaccione por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Después pasamos a baño maría 30 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos.
- Hacer la lectura a 490 nm.

2.9 Hidrolisis de inulina presente en el agua miel.

Por lo tanto lo que se llevó a cabo en el laboratorio fue en 3 L de aguamiel previamente pasteurizada, en un recipiente se vertió los 3 L de agua miel y se llevó a calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 55 $^{\circ}\text{C}$ y adicionando 60 μL de inulinasa se agitó durante 1 minuto

para lograr una buena mezcla y pasarla a una estufa a temperatura de 55°C durante una hora. Pasada la hora se procedió a pasteurizar nuevamente para inactivar la enzima, para su posterior cuantificación de azúcares.



Fig. 2.10 Incubación de agua miel con inulinasa

2.9.1 Cuantificación de inulina después de hidrolisis

Para esta cuantificación se procedió a trabajar con la muestra de aguamiel ya hidrolizada y realizar todos los pasos de cuantificación de azúcares que realice en el agua miel nativa, para luego de terminada la cuantificación saber con certeza si hubo hidrolisis de inulina para una mejor fermentación.

2.10 Inoculación de levaduras

La incubación fue realizada en el modelo de bioreactor, a las mismas se les dio seguimiento cada día tomando lecturas de Ph y grados Brix todo el proceso de fermentación.

2.11 Destilación del fermentado

Consiste en calentar un mosto hasta que sus componentes volátiles pasan a la fase de vapor y después de forma inmediata enfriar el vapor para recuperar los componentes en forma líquida por medio de la condensación. El objetivo principal de la destilación es separar los componentes volátiles de los no volátiles.

La muestra promedio fue enviada en recolector con tapa hermética para ser enviada para su posterior análisis.



Fig. 2.11 Destilación de muestras

2.12 Cuantificación de etanol mediante hidrómetro.

Un hidrómetro es un instrumento utilizado Para medir el progreso de la fermentación y determinar el porcentaje, mide la densidad del líquido en relación con el agua. En la fabricación de cerveza o vino estamos midiendo cuánto azúcar está en solución. El azúcar más que está en solución, más alto el hidrómetro flotará. Como el azúcar se convierte en alcohol durante la fermentación, el hidrómetro se hunde en la solución, Cuando se termina la fermentación, el hidrómetro se detendrá hundimiento para cuantificar la lectura se tiene que medir el peso Original y Final. Para más detalles del método de análisis ver ANEXO 11.



Fig. 2.12 Lectura de densidad del aguamiel con higrómetro

2.12 Caracterización genética de las levaduras mediante ADN.

Las técnicas de extracción de ADN son muy utilizadas hoy en día para la caracterización de las levaduras, esta técnica se realiza mediante corridas en geles de agarosa lo que permite que las moléculas migren y se pueda determinar los diferentes pesos moleculares de cada una de las bacterias en estudio. De esta manera se puede armar una base de datos con los resultados obtenidos. Para realizar esta técnica se preparó diferentes reactivos como el TAE (tris base, ácido acético, EDTA), el cual es necesario para preparar los geles de agarosa.

2.12.1 Extracción de ADN

Ultraclean Microbial DNA Isolation Kit está diseñado para aislar genomas de alta calidad de microorganismos. Una variedad de microorganismos, incluyendo esporas bacterianas y de hongos, se han probado con éxito con este kit.

2.12.1.1 Descripción del proceso

Las células microbianas, resuspendidas en la solución de perlas se someten a un tubo de batido que contiene perlas, seguido por solución de lisis. El principal es lisar los microorganismos mediante la combinación de calor, detergente y fuerza mecánica contra muestras especiales. Los

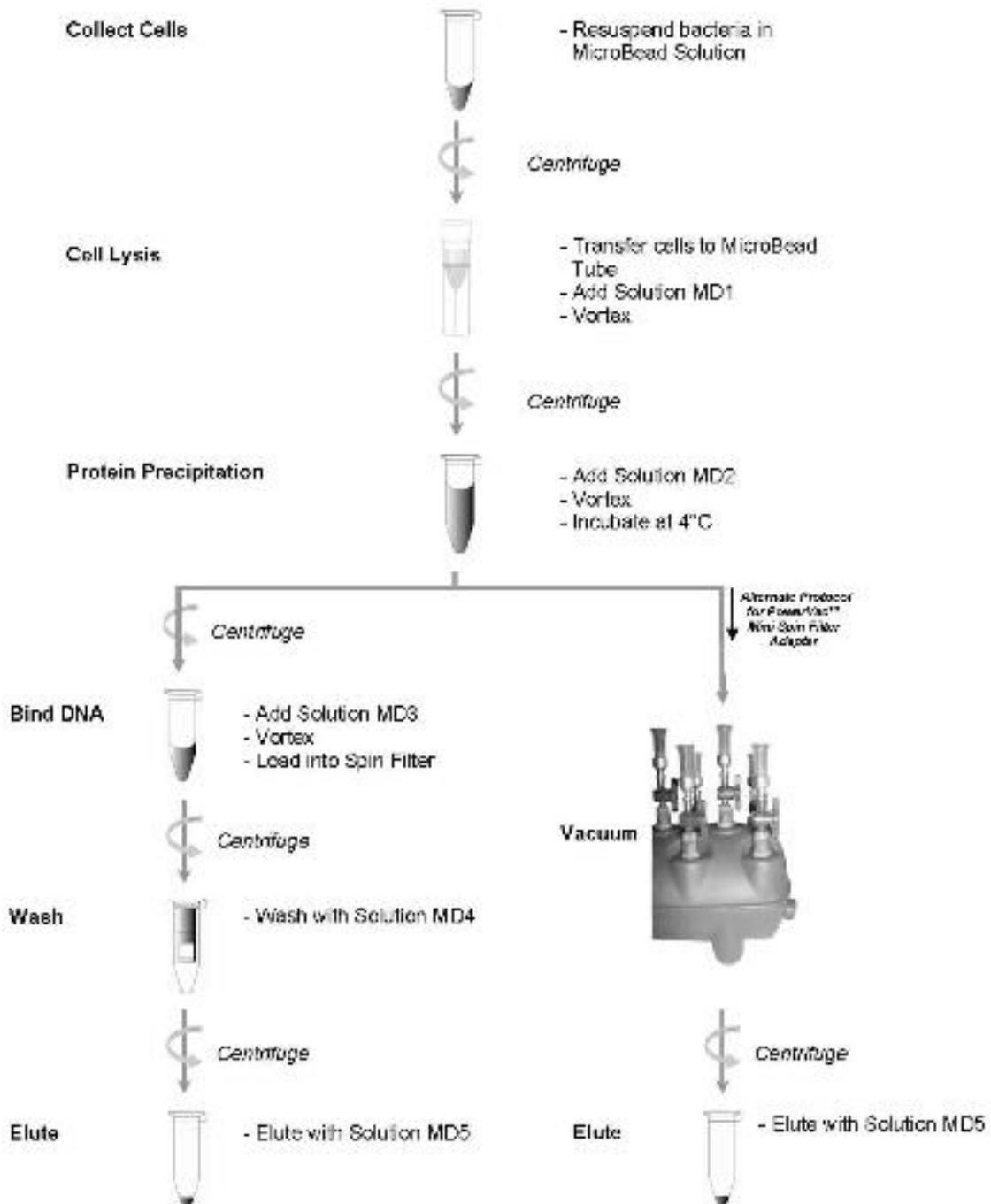
componentes celulares se lisan por acción mecánica utilizando un adaptador MO VIOLE BIO especialmente diseñado en un Vortex estándar. A partir de las células lisadas, el ADN liberado se une a un Filtro Spin silica. El filtro se lava, y el ADN se recupera en este tampón sin ADN certificado.

1. Añadir 1,8 ml de cultivo microbiano (bacterias, levaduras) a un tubo de recogida de 2 ml (suministrado) y centrifugar a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente. Decantar el sobrenadante y girar los tubos a 10.000 x Durante 30 segundos a temperatura ambiente y eliminar por completo el sobrenadante del medio con una punta de pipeta. NOTA: En base al tipo de cultivo microbiano, puede ser necesario centrifugar durante más de 30 segundos.
2. Resuspender el sedimento celular en 300 mL de Solución MicroBead y agitar suavemente para mezclar. Transferir las células resuspendidas a un tubo de MicroBead.
3. Compruebe la solución MD1. Si se precipita la solución MD1, se calienta la solución a 60 ° C hasta que se ha disuelto el precipitado. Añada 50 mL de la Solución MD1 al Tubo MicroBead
4. Asegure los tubos de MicroBead horizontalmente usando el soporte de tubo MO BIO Vortex Adapter para el vórtice (MO BIO Catalog # 13000-V1) o asegure los tubos horizontalmente en una almohadilla de vortex plana con cinta adhesiva. Vórtice a velocidad máxima durante 10 minutos. (Consulte "Sugerencias y guía de solución de problemas" para reducir el cizallamiento del ADN).
5. Asegúrese de que los tubos MicroBead de 2 mL giren libremente en la centrífuga sin frotar. Centrifugar los tubos a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente. PRECAUCIÓN: Asegúrese de no exceder los 10.000 x g o los tubos pueden romperse.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo de recogida limpio de 2 mL (suministrado).
7. NOTA Espere de 300 a 350 microlitros de sobrenadante.
8. Añadir 100 microl de Solución MD2, al sobrenadante. Vórtice durante 5 segundos. Luego se incubaba a 4 ° C durante 5 minutos.
9. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 x g.
10. Evitando el sedimento, transfiera todo el volumen del sobrenadante a un tubo de recogida limpio de 2 mL (suministrado). Espere aproximadamente 450 µL de volumen.

11. Agite para mezclar la Solución MD3 antes de usar. Añadir 900 μL de solución MD3 al sobrenadante y vértice durante 5 segundos.
12. Cargar alrededor de 700 μL en el filtro de centrifugado y centrifugar a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente. Deseche el flujo, agregue el sobrenadante restante al filtro Spin, y centrifugar a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente.
13. NOTA: Se requieren un total de 2 a 3 cargas para cada muestra procesada. Deseche todo el flujo a través del líquido.
14. Añadir 300 ml de solución de MD4 y centrifugar a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 x g
15. Deseche el flujo.
16. Centrifugar a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000x g.
17. Teniendo cuidado de no salpicar el líquido en la cesta del filtro de giro, coloque el filtro Spin en un nuevo tubo de Colección de 2 ml (suministrado).
18. Añadir 50 μL de solución MD5 al centro de la membrana filtrante blanca.
19. Centrifugar a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000x g.
20. Deseche el filtro de centrifugado.

Esquema de preparación de muestra

UltraClean[®] Microbial DNA Isolation Kit



2.12.2 Electroforesis

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico dichas partículas migran hacia el cátodo de (electrodos - y +), dependiendo de la combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. (García Hilda., 2000)

2.12.2.3 Electroforesis con gel de agarosa al 1%

La electroforesis en gel de agarosa se basa en la separación de las moléculas de las muestras según su carga, dependiendo de su tamaño y forma a través de una matriz sólida que funciona como un filtro de las mismas. Las moléculas más pequeñas pasan fácilmente por la trama del gel de agarosa que las moléculas más grandes (García Hilda., 2000), (Sanz Magrané, M., 2012)

Con la presencia de ADN en cada una de las muestras preparadas y extraídas con Ultraclean Microbial DNA Isolation Kit podemos seguir el análisis para la caracterización de cada una de las muestras experimentales de levaduras.

2.12.2.3.1 Preparación del TAE 50X

- Preparación de 1000 mL de TAE 50X:
- Medir 57,1 mL de ácido acético glacial,
- 100 mL de EDTA 0,5 M
- Pesar 242 g de tris base
- Todos reactivos se pesan y colocan en una botella de vidrio BOECO
- Disolver completamente y llevar a autoclavado durante 15 minutos a temperatura de 121 °C.

También en el análisis se necesita la preparar de TAE 1X, para esto necesitamos bajar la concentración del TAE 50X, para esto necesitamos realizar los siguientes pasos:

Partiendo de la ecuación de Dilución:

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

$$C1: \text{TAE } 50X$$

$$V1: \text{Volumen a utilizar del TAE } 50X$$

$$C2: \text{TAE } 1X$$

$$V2: \text{Volumen a preparar de TAE } 1X (1000 \text{ ml})$$

$$V1 = (C2 * V2) / C1$$

$$V1 = (1 * 1000) / 50$$

$$V1 = 20 \text{ ml de TAE } 50X$$

Para preparar 1000 mL de TAE 1X necesitamos 20 ml de TAE 50X y 980 mL de agua ultra pura.

2.12.2.4 Preparación del gel de agarosa al 1%

- Colocar en un Erlenmeyer de 250 mL 80 ml de TAE 1X
- Pesar 0,8 g de agarosa para preparar un gel al 1%,
- Disolver completamente la mezcla calentando en un horno microondas en 4 intervalos de 15 segundos hasta obtener que la mezcla esté completamente disuelta.
- Agregar 8µl de Syber Safe 10000X de concentración.
- Mezclar completamente y se coloca en el molde de preparación de geles.
- Colocar la peñeta para formar los pocillos.
- Dejar reposar por minutos colocados en un ambiente oscuro
- Una vez formado el gel se retira la peñeta.

Colocamos el gel formado en el equipo de electroforesis colocamos el TAE cubriendo la superficie del gel, colocamos en el primero y ultimo pocillo 0,5 µL de agua ultrapura y 0,5 µL

de LADDER, en el penúltimo pocillo se coloca el blanco preparado y en los siguientes pocillos se colocan una mezcla de 2 μL de Loading Buffer y 8 μL de la muestra.

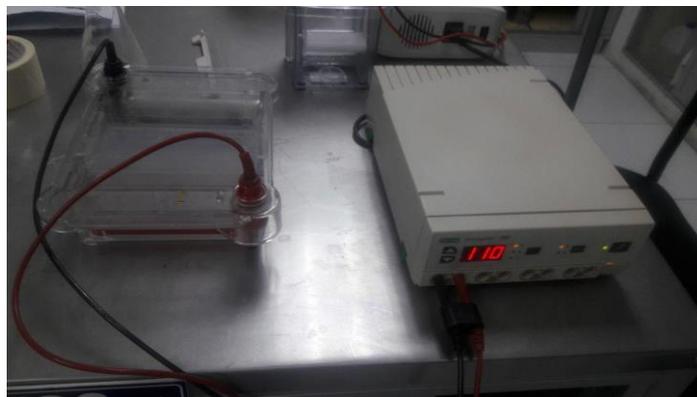


Fig. 2.13 Equipo de electroforesis.

Se calibra el equipo a 110 V por 25 minutos tiempo en que las moléculas van a migrar según su carga. Una vez realizado el proceso con cada una de las muestras se coloca el gel en el equipo ENDURO GDS, equipo que se utiliza para revelar los gels de agarosa a través de un transiluminador de luz ultravioleta.



Figura 2.14 Gel de agarosa



Figura 2.15 Gel de agarosa en equipo ENDURO GDS

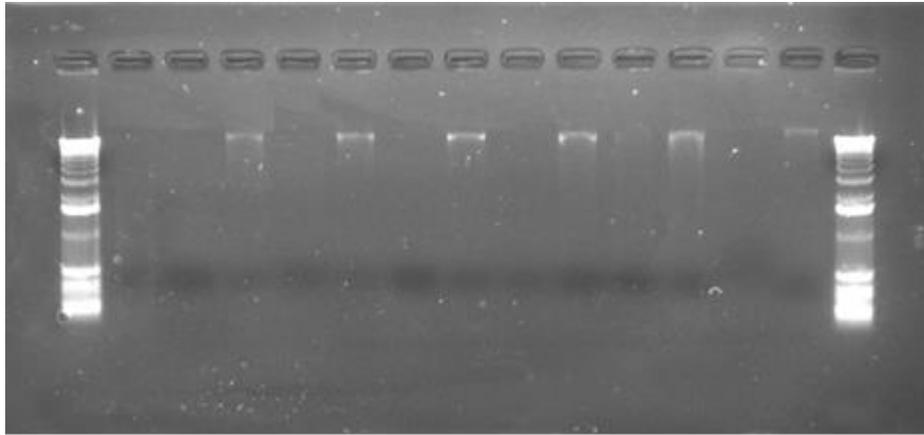


Fig. 2.16 Fotografía tomada por equipo ENDURO GDS.

Para culminar con este análisis, las fotografías tomadas con el transiluminador se estudiaron y analizaron con el programa Totallab, midiendo los diferentes recorridos de las moléculas de ADN de cada una de las muestras en el gel de agarosa.

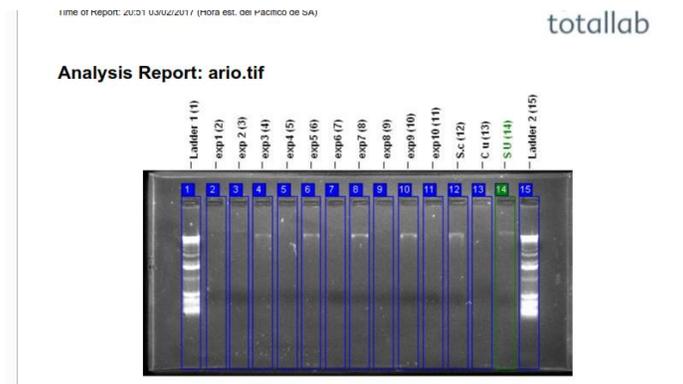


Fig. 2.17 Programa Totallab.

CAPÍTULO III

CÁLCULOS Y RESULTADOS

3.1 Determinación de inulina antes del hidrolizado de agua miel

3.1.1 Cálculo de azúcares reductores (AR)

Formula

$$\%AR = \frac{V1 * F * 100}{Vm * G}$$

DONDE:

V1= Volumen total (100 mL).

F = Factor Fehling. (0,043mL).

Vm= Volumen de muestra. (35mL)

G= Gasto de la solución. (7,2mL)

$$\%AR = \frac{V1 * F * 100}{Vm * G}$$

$$\%AR = \frac{100\text{mL} * 0,042\text{mL} * 100}{35\text{mL} * 7,2 \text{ mL}}$$

1,667 % AR

Para titular los azúcares reductores por el método de Fehling – Causse - Bonnans, es necesario que la concentración de azúcares esté comprendida entre 3 y 10 g por litro. Teniendo en cuenta que el extracto seco del vino menos el contenido en azúcares reductores da un valor aproximadamente constante, se calcula la dilución conveniente en base al dato de extracto seco. Se puede utilizar para el cálculo de dilución la siguiente tabla:

Tabla 3.1: Tabla de dilución para aplicar el método Fehling – Causse – Bonnans

Extracto seco (g/l)	Azúcar probable (g/l)	Dilución
Hasta 30	0-10	---
30-40	10-20	½
40-70	20-50	1/5
70-125	50-100	1/10
125-300	100-275	1/25

Puesto que por revisión bibliografía sabemos que el porcentaje de azúcares en entreacto seco de aguamiel comprenden entre 75% a 80% (Montañez Soto Jose, 2011), (Bautista Justo M, 2001), se realiza la dilución de 1/10 por lo tanto la concentración de ART quedaría de la siguiente manera:

1,667 % ARTx10 (factor de dilución)

AR= 16,67%

3.1.2 Calculo de azúcares reductores totales (ART)

Tabla 3.2: Curva estándar de patrones de glucosa

Concentración de glucosa ($\mu\text{g/mL}$)	Solución Estándar de Glucosa (100 $\mu\text{L/mL}$)	Agua (mL)	Absorbancia (nm)
0	0	10	0
10	1	9	0,103
20	2	8	0,200
40	4	6	0,145
60	6	4	0,300
80	8	2	0,410
100	10	0,0	0,500

La absorbancia de la muestra nativa no hidrolizada dio una lectura promedio de **195 nm** por lo tanto utilizando y reemplazando en la ecuación de la recta:

$$y = 0,0047X + 0,038$$

$$X = \%ART = \frac{0,195 - 0,038}{0,0047}$$

ART = 33,4%

3.1.3 Cuantificación de porcentaje de inulina

La inulina se cuantifico con la diferencia entre Azúcares Reductores Totales y Azúcares Reductores, tomando como referencia a la inulina como azúcar no libre (Ramírez Abril, 2010).

Por lo tanto, tenemos:

$$\%INULINA = ART - AR$$

$$ART = 33,4\%$$

$$AR = 16,67\%$$

$$INULINA = 16,73\%$$

3.2 Determinación de inulina después del hidrolizado de agua miel

3.2.1 Calculo de azucres reductores (AR)

Fórmula

$$\%AR = \frac{V1 * F * 100}{Vm * G}$$

DONDE:

V1= volumen total (100 mL).

F = Factor fehling. (0,043 mL).

Vm= Volumen de la muestra. (35 mL)

G= Gasto de la solución. (7,2 mL)

$$\%AR = \frac{V1 * F * 100}{Vm * G}$$

$$\%AR = \frac{100mL * 0,043mL * 100}{35mL * mL}$$

$$AR = 3,613 \%$$

Multiplicando por el factor de dilución el porcentaje de azucres reductores (AR) expresado en porcentaje:

$$AR = 3,613 \% \times 10$$

$$AR = 36,13\%$$

3.2.2 Cálculo de azúcares reductores totales (ART)

Construcción de curva estándar de patrones de glucosa

Para esta determinación se utilizó la misma curva de calibración que empleamos para de determinación de ART antes del hidrolizado.

La absorbancia de la muestra hidrolizada dio una lectura promedio de **0,232 nm** por lo tanto utilizando y reemplazando en la ecuación de la recta:

$$y = 0,0047X + 0,038$$

$$X = \%ART = \frac{0,232 - 0,038}{0,0047}$$

$$ART = 41,28\%$$

3.2.3 Cuantificación de porcentaje de inulina residual.

Se cuantifico con diferencia entre Azucares Reductores Totales y Reductores, tomando como referencia a la inulina como azúcar no libre (Ramírez Abril, 2010).

Por lo tanto, tenemos:

$$\%INULINA = ART - AR$$

$$ART = 41,28\%$$

$$AR = 36,16\%$$

$$INULINA = 5,12\%$$

Con los porcentajes obtenidos entre la cuantificación de inulina nativa e inulina hidrolizada se puede decir que el porcentaje de hidrolisis fue de:

$$\%Hidrolisis = \frac{5,12 \times 100\%}{16,34}$$

$$\%Hidrolisis = 31,33$$

3.2.4 Resultado de hidrolisis enzimática con inulina en agua miel nativa e hidrolizada

Tabla 3.3: determinación de (%) inulina mediante diferencia de azucares

Antes del Hidrolizado		% Inulina	Después del Hidrolizado		% Inulina	
AR	ART	16,73	AR	ART	5,12	
16,67	33,4		36,16	41,28		

Con los porcentajes obtenidos entre la cuantificación de inulina nativa e inulina hidrolizada se puede decir que el porcentaje de hidrolisis fue de:

$$\% \text{Hidrolisis} = \frac{5,12 \times 100\%}{16,73}$$

$$\% \text{Hidrolisis} = 30,60$$

3.3 Cuantificación de etanol por hidrometría.

Dónde:

(Lectura de la densidad original) - (lectura de densidad final) x (131) = % de alcohol Contenido de volumen.

Tabla 3.4: determinación de (%) etanol mediante diferencia de densidades

Experimento	Densidad Inicial	Densidad Final	DI-DF	(%) Etanol (V/V)
1	1,034	0,986	0,048	6,29
2	1,034	0,988	0,046	6,03
3	1,034	0,982	0,052	6,81

4	1,034	0,982	0,052	6,81
5	1,034	0,978	0,056	7,34
6	1,034	0,986	0,048	6,26
7	1,034	0,994	0,040	5,24
8	1,034	0,990	0,044	5,76
9	1,034	0,999	0,035	4,59
10	1,034	0,986	0,048	6,29

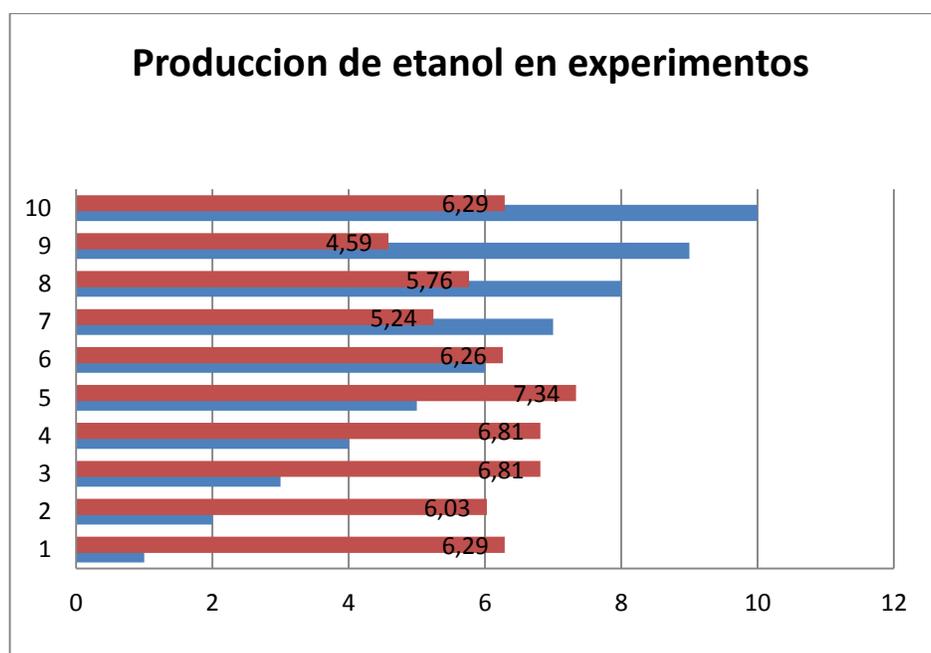


Fig. 3.1 Producción de etanol (%) en los Experimentos

3.3.1 Interpretación de diseño de mezclas

Una vez obtenidos los porcentajes de alcohol, se utilizó un programa estadístico STATISTICA 10. Este programa ayudara a encontrar la mezcla óptima e indicara el comportamiento de cada variable por separado.

3.3.1.1 interpretaciones en triángulo de Superficie de respuesta.

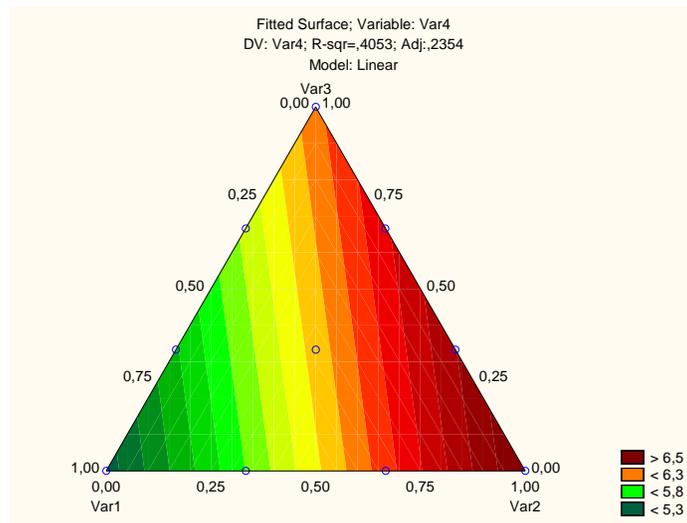


Fig. 3.2 Diagrama de superficie de respuesta Móldele lineal

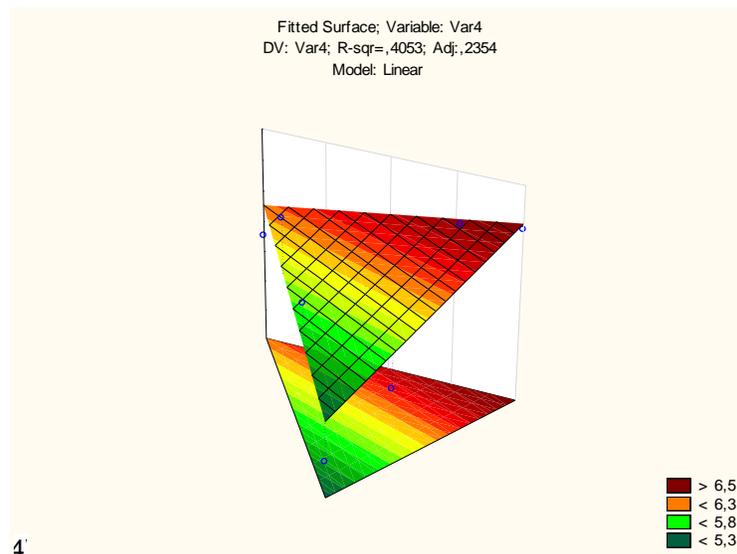


Fig. 3.3 Diagrama de superficie de respuesta Móldele Lineal Tridimensional

Mediante el triángulo podemos determinar que la respuesta óptima se encuentra en la variable 2 en la franja roja oscura, cada unidad porcentual de la variable 1 afecta positivamente a la mezcla, la variable 1 tiene aporte nulo, mientras que la variable 3 es más estable y cada unidad porcentual no aporta positiva o negativamente.

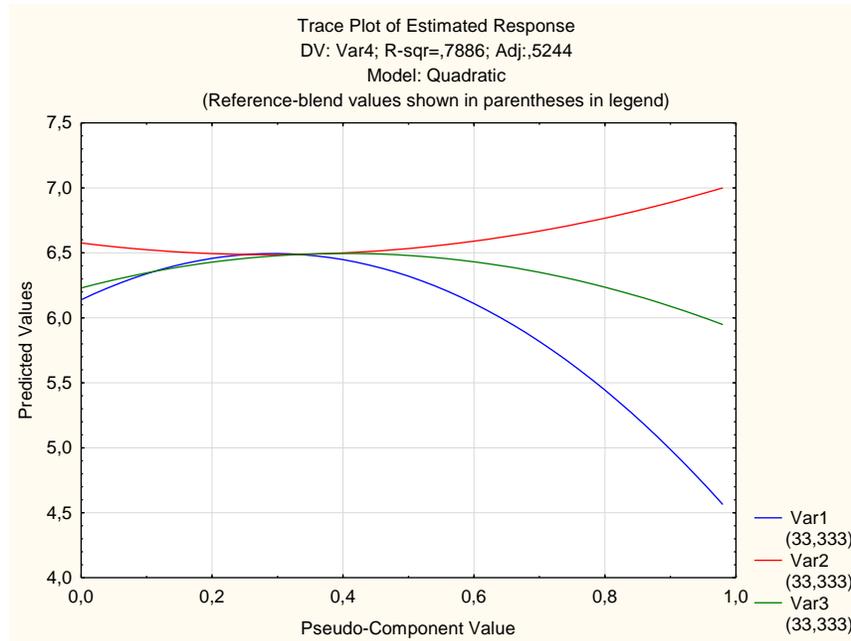


Fig. 3.4 Diagrama de Traza de la respuesta estimada

En el diagrama de traza de respuesta estimada podemos observar que la variable 1 es extremadamente sensible, cada unidad porcentual de la variable afecta la mezcla que el resto de variables 2 y 3. La variable 3 es más estable en su comportamiento, mientras que la variable 2 y 3 presentan un comportamiento asimétrico, esto quiere decir que en determinados porcentajes en cada uno de las variables van a diferir muy significativamente.

Critical values; Variable: Var4 (Spreadsheet Solution: saddlepoint) Predicted value at solution: 6,493653			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
Var1	0,00	29,9876	100,000
Var2	0,00	33,7163	100,000
Var3	0,00	36,2960	100,000

Fig. 3.5 Valores óptimos de mezcla

Las respuestas obtenidas permitieron determinar los porcentajes óptimos de levadura de la mezcla para la obtención de mayor volumen o porcentaje de alcohol el valor óptimo de cada levadura fue de Variable 1 (*Saccharomy cescerevisiae*) 29,98 % Variable 2 (*Saccharomyces spp*) 33,71 % Variable 3 (*Candida Utilis ATCC 995*) 36,29%

El diagrama de Pareto nos indica cuales son las variables e interacciones más representativas en mi producto o mezcla.

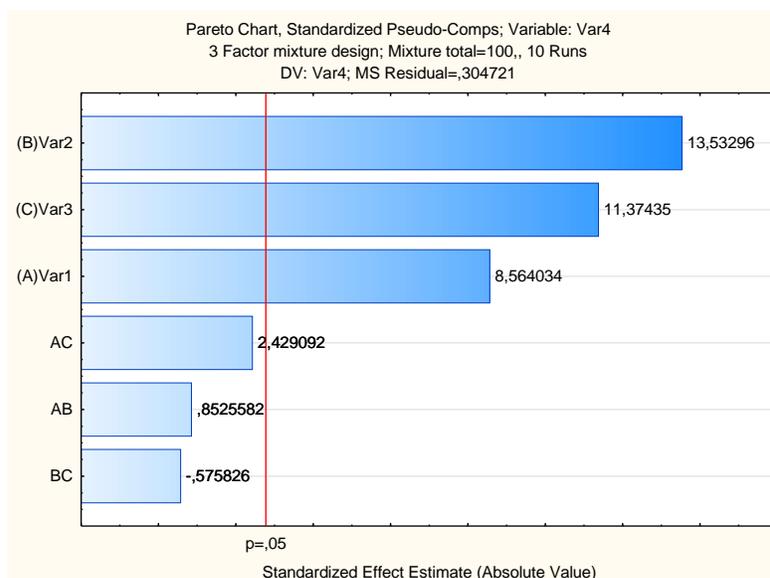


Fig. 3.6 Diagrama de Pareto

Podemos observar que la variable 2 es la más fuerte y con mayor aporte al producto, por otro lado, las mezclas de las variables 1 y 3 son la base en la mezcla, también se puede afirmar que la variable 2 es la que más aporte va a tener en la mezcla.

Mediante el programa STATISTICA 10. También se obtuvo la ecuación de polinomio:

$$V4=6,3765x+6,4572y+6,3663z-6,3435xy+1,2287xz+0,4616yz$$

3.4 Análisis de Metanol y alcoholes superiores por Cromatografía de gases.

Se eligió la muestra del experimento 6 del destilado que mayor contenido de alcohol presento se recolecto en un frasco para luego ser enviadas para su respectivo análisis el cual se llevó a cabo en la Corporación AZENDE, la misma que se analizó utilizando un patrón interno con la que la empresa cuenta para sus análisis, en un cromatógrafo Pekin Elmer 116E el cual cuenta con revelador térmico de llama, a temperatura constante de 189 °C en longitud de columna de 1 metro. Para mayor detalle del análisis. **Ver ANEXO 13.**

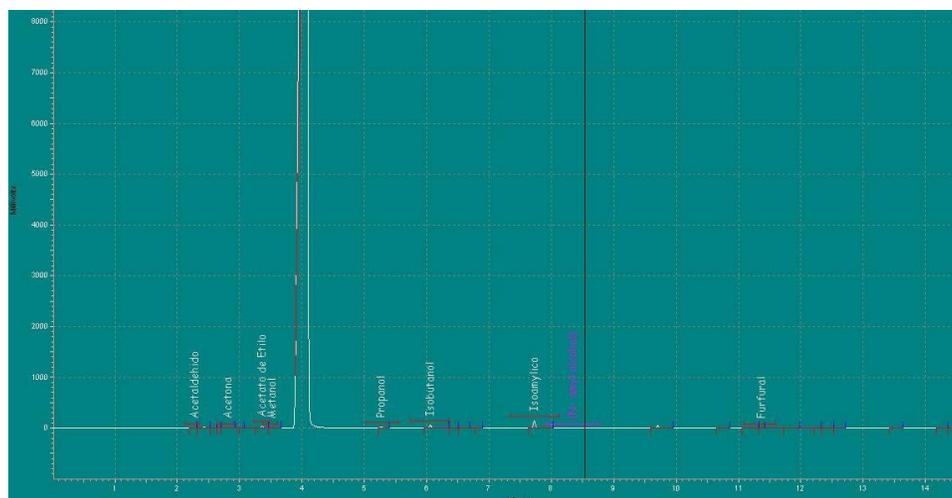


Fig 3.7 Captura de pantalla de análisis de alcoholes por Cromatografía de gases

Pk #	Name	Retention Time	Area	Concentration
1	Acetaldehído	2.255	46629	10.932
5	Acetona	2.782	43655	0.858
7	Acetato de Etilo	3.340	863255	15.967
8	Metanol	3.495	57184	0.410
10	Propanol	5.248	518074	4.344
11	Isobutanol	6.035	1257753	14.533
15	Isoamílico	7.707	3212214	39.281
	N. amyl alcohol			0.000 BDL
19	Furfural	11.345	10082	0.000
Totals			6008846	86.325

Fig 3.8 Resultados de análisis de alcoholes por cromatografía de gases

3.5 Resultados de caracterización de ADN

Como se observó en las fotografías tomadas por el programa del equipo ENDURO GDS, se puede apreciar claramente la existencia de ADN de las diferentes levaduras y mezclas de ellas que existen en cada experimento.

En la figura 3.3 se puede observar claramente la presencia de ADN en los Experimentos 3, 4, 6, 8, 10, 12 y 14, mientras que en los experimentos 2, 5, 7, 11 y 13, no existe presencia debido a que probablemente en los experimentos la o las mezclas de levaduras crecieron en menor cantidad, u otro de los casos puede ser que el método de extracción para ciertos casos debe de ser afinado para determinar trazas más pequeñas de ADN, la Presencia de ADN en el resto de bandas se debe a que las levaduras están en su máxima existencia y desarrollo.

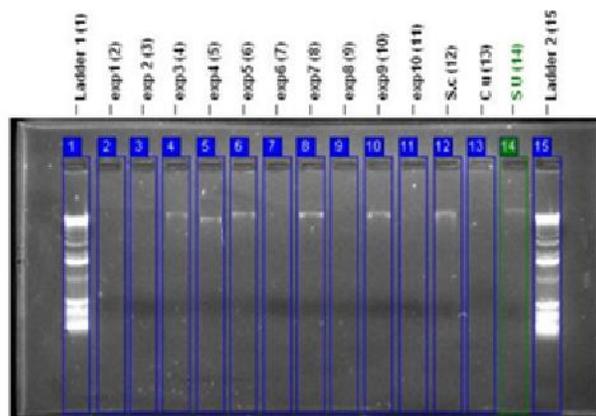


Fig. 3.9 Presencia de ADN en los diferentes experimentos.

Para determinar el peso molecular de las tres levaduras utilizadas en los experimentos, se utiliza la relación de los pesos moleculares de los Ladders mostrados en la tabla 3.5, si no hay existencia de pesos moleculares se realiza una extrapolación, tomando en cuenta el valor más cercano de las bandas ADN de las levaduras analizadas.

Tabla 3.5 experimentos en donde se comprueba la existencia de ADN en Ladder 1.

LEADDER 1		
Experimento	Recorrido	Peso Molecular (pb)
1	217	6856,78
2	248	7836,32
3	0	0
4	263	8310
5	277	8752
6	0	0
7	299	9447,82
8	0	0
9	360	11375
10	0	0,00

A continuación se determinara la distancia de corrida de ADN para las 3 levaduras.

Tabla 3.6 Valores de bandas de corrido de ADN.

Levadura	Valores de Bandas
<i>Saccharomy cescerevisiae</i>	310
<i>Candida Utilis ATCC 995</i>	0
<i>Saccharomyces spp</i>	348

Una vez determinados los valores de las bandas de ADN de las tres levaduras se determinan mediante los cálculos correspondientes para determinar los pesos moleculares de las levaduras estudiadas, en las cuales se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 3.7 Valores de peso molecular de levaduras en estudio.

Levadura	Peso Molecular (pb)
<i>Saccharomy cescerevisiae</i>	9795,4
<i>Candida Utilis ATCC 995</i>	0
<i>Saccharomyces spp</i>	10996,12

DISCUSIONES

- La hidrólisis de agua miel con enzima (inulase, Novozym 960), los resultados se verificaron exitosamente, mientras que (Velásquez Y Col.,) en su estudio de **PRODUCCIÓN DE FRUCTANHIDROLASAS FÚNGICAS CON ESPECIFICIDAD SOBRE FRUCTANOS DE AGAVE** menciona que utilizó la enzima (Fructozym 960®) para hidrolizar miel de agave en tiempo de 480 minutos de reacción de hidrólisis, alcanzando una relación sacarosa/inulina (S/I) de 0.58 U/g indicando así que la enzima (Fructozym 960®) y (inulase, Novozym 960) tienen preferencia por hidrolizar fructosa de la inulina, en este trabajo se cuantificó inulina nativa dando como resultado el 16,33 % y la inulina hidrolizada de 5,12 %, con estos datos obtenidos podemos verificar el porcentaje de hidrólisis que se llevó a cabo en el experimento dando un valor de 31,33%.
- La activación de las levaduras se realizó exitosamente, en el caso de las *Saccharomyces spp (s. uvarum)* se aisló en agar SABUROAD, la cual se recomienda hacer varias réplicas hasta que se verifique que no exista contaminación con mohos, se incubó por 48 horas a temperatura de 37 °C. Según Castaño (2009) en su tesis, dice que las levaduras deben ser incubadas a 28°C por 5 días, pero en este caso las levaduras fueron incubadas a 38 °C por 48 obteniendo excelentes resultados.
- El programa ESTADÍSTICA 10. Es una herramienta muy útil en un diseño de mezclas ya que permite conocer, como se comporta las variables dentro del triángulo de mezclas, además cuenta con herramientas para poder ejecutar una formulación óptima, diagramas como la de Pareto, Trazas, diagramas que nos proporcionan información muy útil para una formulación dentro del campo de los alimentos.
- En el caso del análisis de etanol analizado por el método de hidrometría se obtuvo un resultado de 7,34 (% v/v), Castaño en su tesis de ESTUDIO COMPARATIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL entre *saccharomyces cerevisiae silvestre*, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 Y *Candida utilis* ATCC 9950 en melaza, indica

que analizo dicha fermentación con el método de cromatografía de gases obteniendo resultados muy semejantes a los obtenidos en esta investigación en agua miel de penco, el promedio de dos ensayos y realizada en cada una de las levaduras por separado, los valores fueron *saccharomyces cerevisiae silvestre* 6,5 (%v/v), *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 8 (%v/v), *Candida utilis* ATCC 9950 8 (%v/v).

CONCLUSIONES

- Se hidrolizó el agua miel de penco con la enzima (inulase, Novozym 960), dando resultados positivos en el análisis de inulina hidrolizada, que esta fue comprobada exitosamente con los análisis de ART y AR, los cuales la miel de agave nativa presento un porcentaje de inulina del 16,33 % y la inulina hidrolizada de 5,12 %, con estos datos obtenidos podemos verificar el porcentaje de hidrolisis que se llevó a cabo en el experimento dando un valor de 31,33%.
- Se aisló las cepas de *Saccharomyces spp (s. uvarum)* provenientes de uvas en AGAR SABOURAUD, las cuales tenían contaminación con mohos, para su aislamiento se verifico su presencia y taxonomía mediante un microscopio, la cual fue cuidadosamente trasvasado a otra placa con SABOURAUD y nuevamente verificado que no exista contaminación para su siembra en el agua miel para continuar su análisis.
- Se activó las dos levaduras que se encontraban liofilizadas *Candida utilis* ATCC 9950, *Saccharomyces cerevisiae silvestre*, en agar SABOURAUD y fue inoculada a 28 °C temperatura por 48 horas en donde observó un nivel de crecimiento rápido y exitoso.
- Los experimentos que fueron sometidos a incubación en un fermentador, en donde fueron controlados los parámetros de Ph, Grados Brix, Tiempo y temperatura, dando como resultado un consumo de grados brix y descenso de pH, los cuales indicaron una fermentación optima en cada uno de los experimentos, así dando como resultado el experimento 6 la mezcla de 0,333ml de *Saccharomyces spp (uvarum)* y 0,667 ml de *Candida Utilis* ATCC 995 a una escala del patrón de Mcfarland de 0.5 en el cual se obtuvo un porcentaje de etanol cuantificado mediante hidrómetria de 7,34 %, mientras que el experimento 2 que fue una mezcla de 0,667 de *Saccharomyces spp (uvarum)* y 0,33 de *Saccharomyces cerevisiae silvestre*, presento el porcentaje más bajo de fue de 4, 59%.

- Mediante el triángulo de superficie de respuesta se obtuvo que la variable más importante y que más aporte tiene a la mezcla es levadura de *Saccharomyces spp (uvarum,)*, mientras que la *Candida Utilis* ATCC 995 tiene comportamiento neutral, y *Saccharomyces cerevisiae* es extremada sensible y su presencia tiene aporte nulo.
- En el diagrama de traza se pudo observar con más claridad que el incremento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* va afectar negativamente en la producción de alcohol, lo mismo sucede con la levadura de *Candida Utilis* ATCC 995 con diferencia de que es un poco más estable ya que un pequeño incremento de esta levadura no afectaría en la producción de alcohol, en el caso de *Saccharomyces spp (uvarum)* su incremento en la mezcla fermentable afecta muy positivamente en el porcentaje de alcohol etílico.
- Con la ayuda del programa STATISTICA 10 permitió determinar los porcentajes óptimos de cada levadura para obtener mayor porcentaje de producción o fermentación de alcohol el valor óptimo de cada levadura fue de *Saccharomyces cerevisiae* 29,98 % *Saccharomyces spp* 33,71 % y *Candida Utilis* ATCC 995 36,29 %.
- El análisis por cromatografía de gases de metanol fue de 0,41 mL en 100 mL de alcohol Anhidro. La norma INEN nos dice que el porcentaje máximo para Metanol debe de ser de 4 mL en 100 mL de Alcohol Anhidro con el resultado de análisis se cumple con la norma.
- Se recopiló toda la información suficiente en cuanto a las levaduras productoras de alcohol utilizadas en los experimentos, en donde se ha conocido su taxonomía, generalidades y características, temperatura y tiempo óptimo de crecimiento, de esta manera se ha logrado extraer el ADN y caracterizar los diferentes pesos moleculares dando como resultado:

Levadura	Peso Molecular (pb)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9795,4
<i>Candida Utilis</i> ATCC 995	0
<i>Saccharomyces spp</i>	10996,12

En la levadura de *Candida Utilis* ATCC 995 no hubo presencia de ADN esto se debe a que la cantidad de muestra fue muy pequeña o por otro parte el método de análisis de esta levadura necesito ser afinando.

BIBLIOGRAFÍA

- Abiet, L. (2011). *Solutions for wine making*. Internet: lamothe-abiet.com. Disponible en: http://www.lamothe-abiet.com/images/stories/telechargement/Fiches-commerciales/FC-espagnol/FC_ES_alliance_uvarum.pdf Acceso 28 Agosto. 2016.
- Acosta, A y Cárdenas, M; (2006). Enzimas en la alimentación de las aves. *Fitasas. Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 40() 377-387. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193017672001>
- Cardona, A. (1998). *Primer encuentro técnico nacional de producción y transformación de yuca*. Bogotá: Le'Print Club Express, p.252.
- Bautista Justo M, .. G. (11 de Abril de 2001). <http://www.acuedi.org>. Recuperado el 2016 de 11 de 25, de <http://www.acuedi.org>: <http://www.acuedi.org/ddata/1025.pdf>
- Betty A Forbes., Daniel F Saham. *DIACNOSTICO MICROBIOLOGICO* (2009), (12 EDICION) disponible en <https://books.google.com.ec/books?id=239cauKqSt0C&pg=PA189&dq=patron+de+mcfarland&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj5pTF9YjQAhWC4yYKHXmJAasQ6AEIHTAA#v=onepage&q=patron%20de%20mcfarland&f=false>
- Chamy, Rolando y Augusto Castillo; (2010). Producción de inulina por levaduras de *Kluyveromyces marxianus*. *Scientia Agropecuaria*, 1() 235-245. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=357633696007>
- Chancusig, Pedro. (2007). “ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS DEL DULCE DE CABUYO NEGRO (Agave americana) PARA LA ELABORACIÓN DE UN EDULCORANTE BAJO EN CALORÍAS” (Ingeniería). Universidad Técnica de Ambato.
- Cori, M. *et al* (2006). OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DOS CONCENTRADOS PROTEICOS A PARTIR DE BIOMASA DE *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* CULTIVADA EN SUERO LÁCTEO DESPROTEINIZADO. *SciELO*, XVI (3).

Criteriohidalgo .*El pulque, una bebida con mucha historia*. (2016). *criteriohidalgo.com*. Retrieved 5 September 2016, from <http://www.criteriohidalgo.com/suplementos/bon-appetit/el-pulque-una-bebida-con-mucha-historia>

Cruz, L. M. C., & Soler, R. A. M. *MANUAL DE MÉTODOS GENERALES PARA DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS*.

Donald Voet, J. G. (2009). *Fundamentos De Bioquímica*. España: Medica Panamericana.

Ecoosfera .*El residuo del agave es un purificador de agua; descubren mexicanos - Ecoosfera*. (2016). *Ecoosfera*. Retrieved 5 September 2016, from <http://ecoosfera.com/2015/07/el-residuo-del-agave-es-un-purificador-de-agua-descubren-mexicanos/>

Flores, Areli, Mora, Rosalva y Lucero Romero. *EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL AGUAMIEL DE TRES VARIEDADES DE MAGUEY PULQUERO. (Agave spp)* (2011) (1st ed.). México D.F.: Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. Internet: <http://file:///home/chronos/u-eb95ec73b2373ede536e6351d2751dab0eef012e/Downloads/A058.pdf>

Gallego, C. (2007). *Influencia de la acidez volátil en el proceso de fermentación de la planta de alcohol del Ingenio Risaralda*. Ingeniería. Universidad Tecnológica de Pereira.

García, Mariano, Rodolfo Quintero y Agustín López. (2004). *Biología Alimentaria*. México, D. F.: Editorial Limusa, p.617.

García Pérez Hilda Marilin. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.pdf

Garzón, Sandra y Catalina Hernández, C. (2009). *ESTUDIO COMPARATIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL ENTRE Saccharomyces cerevisiae silvestre, Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 Y Candida utilis ATCC 9950*. Ingeniería. UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA, FACULTAD DE TECNOLOGÍAS.

Gerard J. Tortora, B. R. (2007). Introducción a la microbiología. EEUU: MEDICA PANAMERICANA S.A.

Gonzalez, Alicia y Valenzuela Lourdes. *Saccharomyces cerevisiae*, En: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 2000.

Gómez-Pérez, C. R., Paula-Perotti, A., García-Rodríguez, A., Esmerio-Mazzaferro, J. A., Rubén-Gonzalez, A., & Guerra-Machado, I. (2013). Diseño Mc. Lean-Anderson aplicado para obtener recubrimientos de electrodos aleados con carbono, cromo y titanio. *Ingeniería Mecánica*, 16(2), 132-143.

Herbolaria.altervisa. *Levadura de cerveza (Saccharomyces cerevisiae)*. (2016). *Herbolaria.altervista.org*. Acceso: 5 Septiembre 2016, Internet: <http://herbolaria.altervista.org/plantas/levadura.html>

Hernández, Rodríguez, M. y Sastre Gallego, A. (1999). *Tratado de nutrición*. Madrid: Díaz de Santos.

Higuera, A. R. (2010). *EVALUACION DEL EFECTO PREBIOTICO DEL AGUAMIEL DE MAGUEY (Agave salmiana) En Lactobacillus delbrucki subsp. bulgaricus*. Mexico.

Koolman, J. y Röhm, K. (2004). *Bioquímica*. España: Medica panamericana.

Larav *et al*; (2011). Composición química y valor nutritivo de la levadura *torula (Candida utilis)*, desarrollada sobre vinaza de destilería, en la alimentación de aves. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 45() 261-265. Recuperado de <http://oai.redalyc.org/articulo.oa?id=193022270008>

Magrané, M. M. (Septiembre de 2012). *Electroforesis de ADN en gel de agarosa*.

Obtenido de http://www.formacionprofesionalquimica.com/index.php?option=com_k2&view=item&id=149:protocolo-4&Itemid=120&lang=ca

Méndez, Beatriz S.; (2014). *Saccharomyces cerevisiae* es un buena amiga. Química Viva, Agosto-, 88-90.

Mercado, J. (1995). *Bebidas Fermentadas*. Bogotá: Unisur.

Montañez Soto Jose, J. V. (Diciembre de 2011). *scielo.org.ve*. Recuperado el 5 de 11 de 2016, de scielo.org.ve: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612011000300007

Moya, R. (2006). *Climas del Ecuador*. 1st ed. Quito: INAMHI, pp.9, 10. Internet: <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/gisweb/METEOROLOGIA/CLIMATOLOGIA/Climas%20del%20Ecuador%202006.pdf>. Acceso: 29 May 2016.

Muñoz, E., Fernandez, F., Rodriguez, M. and Cantoral, J. (2012). *Análisis diferencial del proteoma de Saccharomyces bayanus var. uvarum inducido por la temperatura. Implicación en la calidad de los tintos D.O. Ribera del Duero*. Internet: Helvia.uco.es. Disponible en: <http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/10735/pro85.pdf?sequence=1> Acceso 26 Agosto. 2016.

Nuffield. (1984). *Química Ciencia de la Alimentación*. España: REVERTE S.A.

Paisagrowseeds .*Cuál es la diferencia entre el etanol y el alcohol*. (2016). Acceso: 5 Septiembre 2016, Internet: <http://www.paisagrowseeds.com/cual-es-la-diferencia-entre-el-etanol-y-el-alcohol/>

Palacios Vallejo Mayra., (2012). ESCALA DE MCFARLAN. Internet: slideshare. Disponible en <http://es.slideshare.net/ponysjism/mc-farland-15704291>

Ramírez, Abril (2010). *EVALUACIÓN DEL EFECTO PREBIOTICO DEL AGUAMIEL DE MAGUEY (Agave salmiana) EN Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Licenciatura). Instituto Politécnico Nacional.

Rodríguez, Patricia et al. www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_XIV/CXIV-10.pdf. 1st ed. México, D.F.: Departamento de Biología. Disponible en:

http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_XIV/CXIV-10.pdf Acceso: 31 Aug. 2016.

Rutasbioculturales (2016). *Rutas Bioculturales*. Retrieved 5 September 2016, from <http://rutasbioculturales.org/post/115640543016/para-la-obtenci%C3%B3n-del-aguamiel-se-raspa-la>

Slideplayer .MQ-0200. *JGZI ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE CARBOHIDRATOS*. - ppt descargar. (2016). *Slideplayer.es*. Retrieved 5 September 2016, from <http://slideplayer.es/slide/2906739/>

Stiftung-france. *Thema anzeigen - Picture 24 The humification of fallen fruit*. (2016). *Stiftung-france.de*. Acceso: 5 Septiembre 2016, Internet: <http://stiftung-france.de/forum/viewtopic.php?f=91&t=630>

Tamy de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (Agosto de 2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>

Urbina Vinos Blog: *Descripción de las Principales Levaduras Vínicas*. (2016). *Urbinavinos.blogspot.com*. Acceso: 5 September 2016, Internet: <http://urbinavinos.blogspot.com/2015/01/descripcion-de-las-principales.html>

Vásquez, H. y O. Dacosta, (2007). *Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas*. *Ingeniería. Investigación y Tecnología*, VIII (4), pp.249-259. Internet: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=40480404>. Acceso: 28 Mayo 2016.

Veana, Fabiola *et al.* (2011). *Invertasa del Género Aspergillus y su Impacto Biotecnológico*. Acceso: 31 Agosto 2016, Internet: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2011_1/Veana_Invertasa.pdf

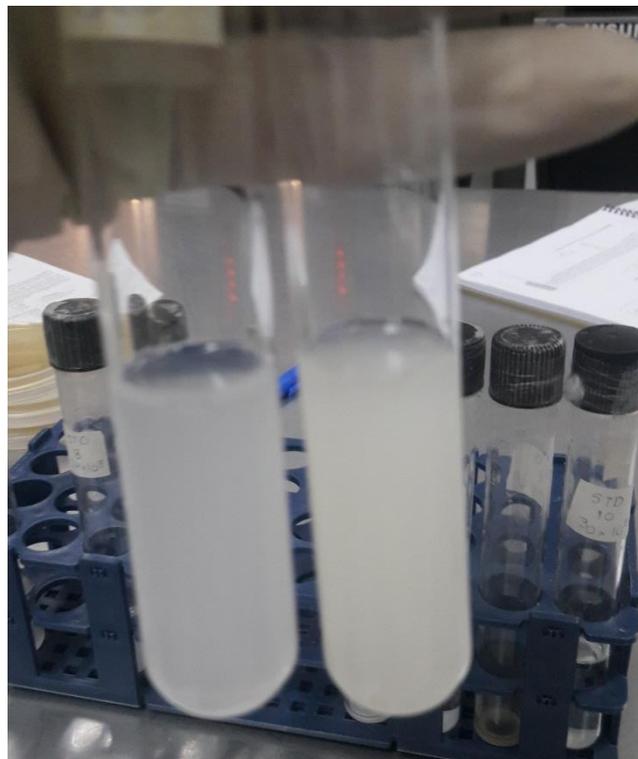
Venologia. *Beneficios y Propiedades de la Levadura de Cerveza*. (2016). *Venologia*. Acceso 5 Septiembre 2016. Internet: <http://www.venologia.com/archivos/3569/>

ANEXOS

Anexo 1 Muestras de Agua Miel en Balón de Aforo



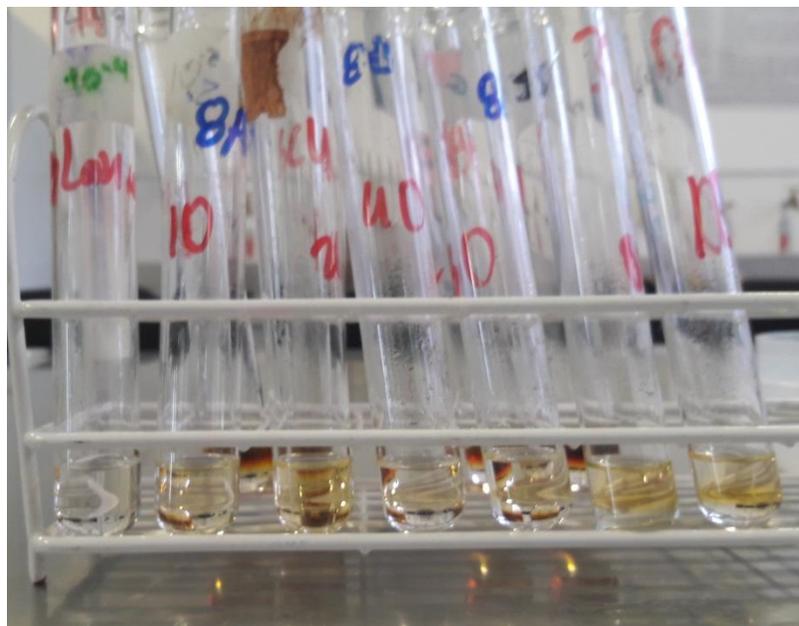
Anexo 2 Preparación de patrones de McFarland



Anexo 3 Espectrofotómetro UV Thermo



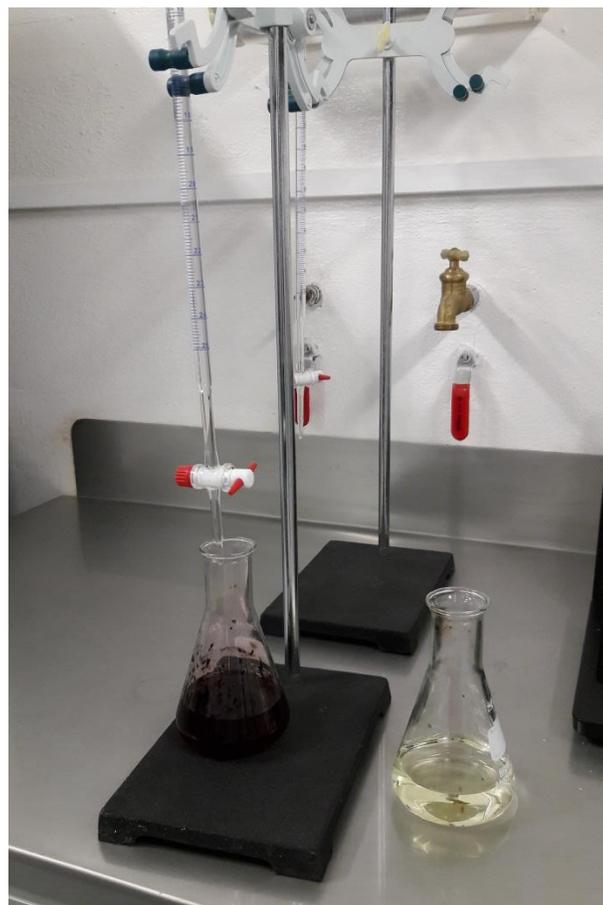
Anexo 4 Preparación de patrones de Glucosa



Anexo 5 Soluciones para determinación de azúcares reductores por Lane Eynon



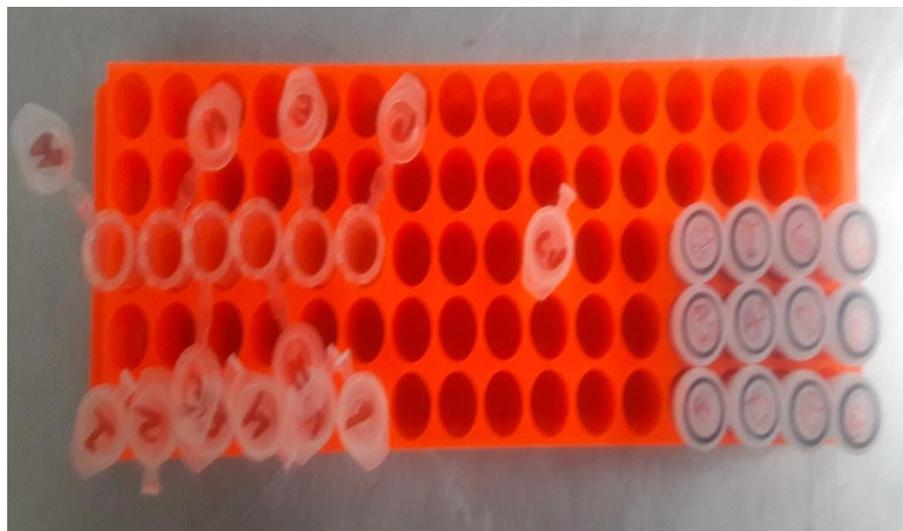
Anexo 6 Titulación de fermentado por Método Fehling - Causse – Bonnans.



Anexo 7 Centrifuga refrigerada EPPENDORF 4804



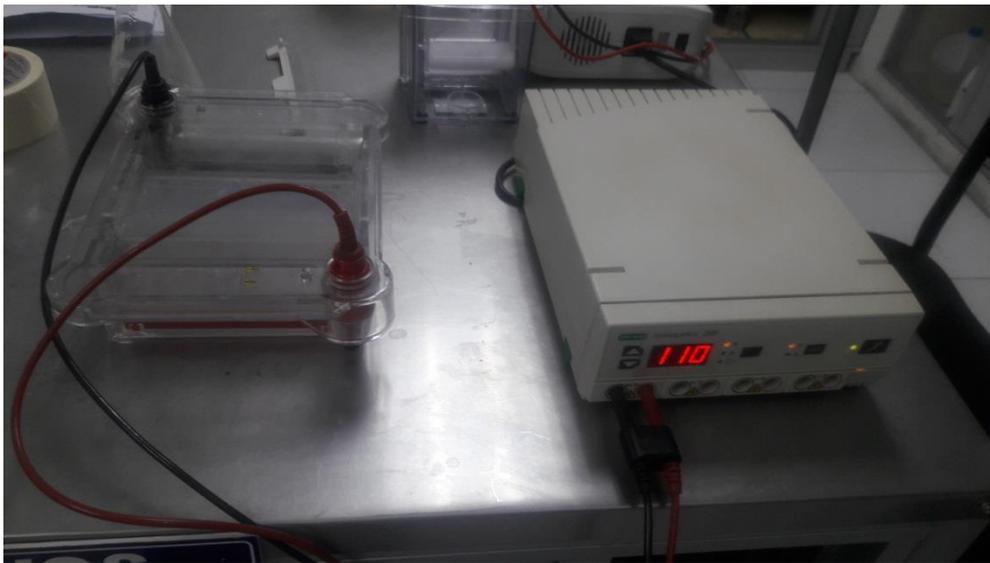
Anexo 8 Muestras para la extracción de a ADN



Anexo 9 Siembra de muestras para electroforesis



Anexo 10 Equipo de electroforesis



Anexo 11 Método de determinación de alcohol mediante Hidrómetro



Triple Scale Beer & Wine Hydrometer • Please Note: Always handle your hydrometer with care and DO NOT BOIL

Why Use a Hydrometer – A Hydrometer is an instrument used to measure the progress of fermentation and determine alcohol percentage.

Hydrometer Theory – A Hydrometer measures the density of a liquid in relation to water. In beer or wine making we are measuring how much sugar is in solution. The more sugar that is in solution, the higher the hydrometer will float. As sugar is turned into alcohol during the fermentation, the hydrometer will slowly sink lower in the solution. When fermentation is finished, the hydrometer will stop sinking.

Three Scales – What are they used for? – Each of our Fermentap hydrometers comes with three scales. The Specific Gravity scale is most often used in brewing. The Brix scale is most often used in winemaking. The Potential alcohol scale is a rough estimate of potential alcohol that can be used in beer or wine making.

How to Use My Hydrometer – Place a sample of the liquid to be tested into a hydrometer testing jar, and lower the hydrometer into the sample. Spin the hydrometer to eliminate any air bubbles that might cling to the side of the hydrometer. Once the Hydrometer stops moving, take your first reading from the Specific Gravity (beer) or Brix (wine) scale. In beer making, the first reading is often called the “Original Gravity Reading”, which implies it was taken prior to the onset of fermentation. See our included diagram for an example of how to read your hydrometer. From years of experience, we suggest you write down your reading on a recipe or log sheet.

Determining when Fermentation is Over – When fermentation stops, usually indicated by a lack of bubbles in your airlock or blow off, take a final hydrometer reading and record on your recipe or log sheet. If you are unsure if fermentation is over, you can use your Hydrometer to test. Take two readings 1-2 days apart. If the reading drops between the two you still have an active fermentation.

How to Determine Alcohol Percentage for Beer – The most accurate way to determine alcohol percentage by volume in beer is to make an *Original Gravity* reading and *Final Gravity* reading. Then plug those numbers into the following formula:

$$(\text{Original Gravity Reading} - \text{Final Gravity Reading}) \times 131 = \% \text{ Alcohol Content by volume.}$$

Example formula: 1.073 was the Original Gravity reading and 1.012 is the Final Gravity reading.: $1.073 - 1.012 = .06 \times 131 = 7.99\% \text{ Alc. By Vol}$

How to Determine Alcohol Percentage for Wine – For Wine, your final reading is often below zero. In wine, nearly all the sugar is converted to alcohol – because alcohol is lighter than water, your reading at the end of a wine fermentation is often negative. When the reading is negative, you have to add this back to your first reading. Here is an example for these situations:

Example Using Potential Alcohol Scale for Wine:

Original Reading: 12.5 Potential alcohol

Final Reading: - .7 Potential alcohol

$$(12.5 + .7) = 13.2 \% \text{ alcohol by volume}$$

Temperature Correction Chart

The Fermentap hydrometer has been calibrated to give an accurate reading at 68 °F. This means that if the temperature of the liquid being tested is something other than 68 °F, the Temperature Correction Chart below must be used to obtain an accurate reading.

Temperature in degrees F.	Specific Gravity Correction
54.2	-.002
61.5	-.001
68	No correction
73.7	+.001
79.2	+.002
84.3	+.003

Correction Example:

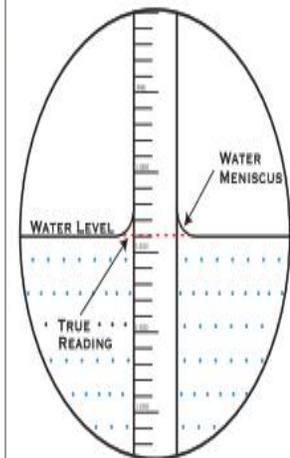
If the temperature of the “Wort” or “Must” is 84 °F. and the Specific Gravity is 1.040, the true reading would be:

$$\text{The Specific Gravity} = 1.040$$

$$\text{The Correction Figure} = +.003$$

$$1.043$$

How to Read A Hydrometer



Tips:

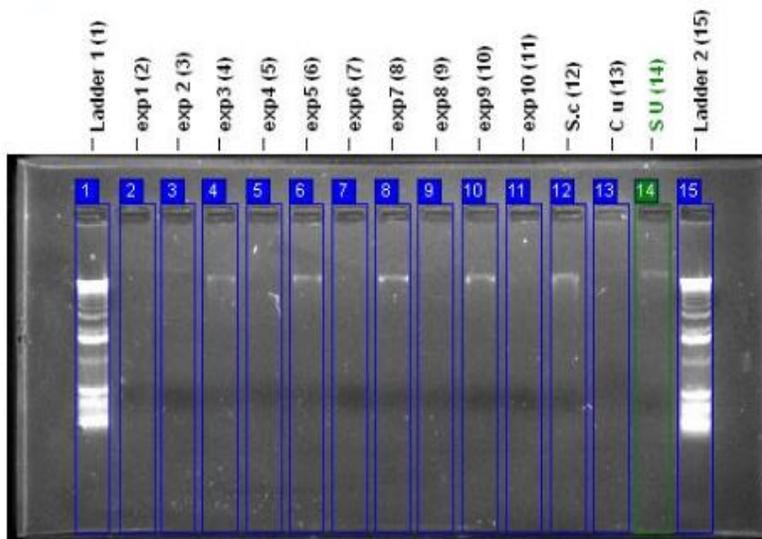
- Perform your readings in a hydrometer sample jar, available from any homebrew shop, rather than in the ferment itself.
- The easiest way to draw a sample out of a fermenter is to use a sample taker. Sample takers look like variations of a turkey baster.
- Once the reading has been taken, it is best to discard tested liquid rather than risk contamination by adding it back into your beer or wine.

Anexo 12 Análisis de corridas de banda en Programa Totallab.

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
 Time of Report: 20:51 03/02/2017 (Hora est. del Pacifico de SA)



Analysis Report: ario.tif



Lane Table

Lane	Bands	Band Volume	Lane Volume
Ladder 1	5	63644960.00	1043493728.00
exp1	1	11095136.00	1375806432.00
exp 2	1	8504672.00	1381492064.00
exp3	1	267006592.00	1340664800.00
exp4	0	0.00	0.00
exp5	1	7652288.00	1349100704.00
exp6	0	0.00	0.00
exp7	1	255156096.00	1351489472.00
exp8	0	0.00	0.00
exp9	1	251740608.00	1351387552.00
exp10	0	0.00	0.00
S.c	1	256028896.00	1339832160.00
C u	1	6500672.00	1364510848.00
S U	1	7624864.00	1371675584.00
Ladder 2	7	70084416.00	1053613440.00

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
 Time of Report: 20:51 03/02/2017 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: ario.tif, Lane 1

Summary

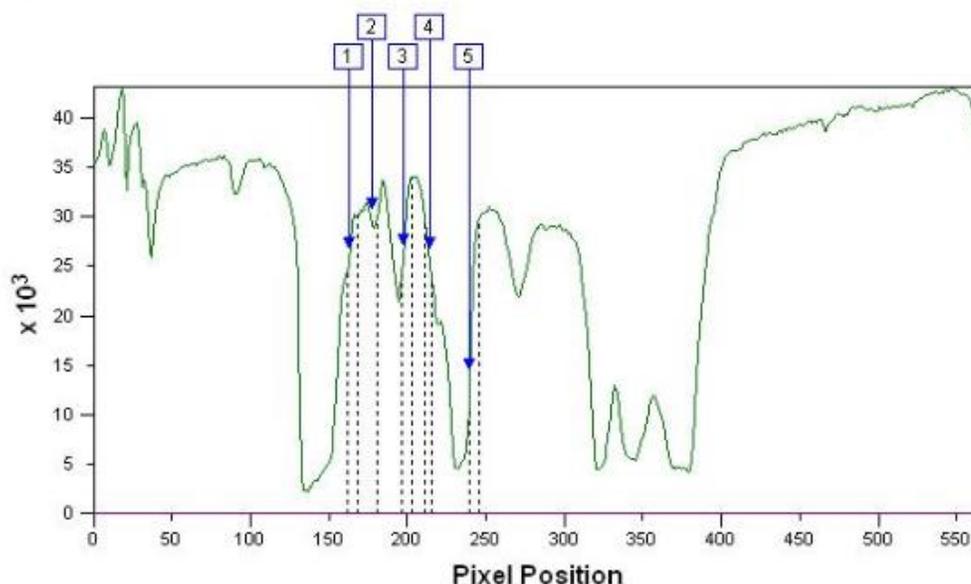
Name: Ladder 1

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Percentage
 Percentage: 1
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (mm)	Volume	Vol+Bk Gnd	Calib Vol (pmole)
1	156	248	163	57.52	10647008.00	10647008.00	-
2	156	263	178	62.81	25239008.00	25239008.00	-
3	156	283	198	69.87	11223360.00	11223360.00	-
4	156	299	214	75.51	7026528.00	7026528.00	-
5	156	325	240	84.69	9509056.00	9509056.00	-

Band No	Area	Base Pairs	Rf
1	384	-	0.288
2	832	-	0.315
3	384	-	0.350
4	256	-	0.379
5	448	-	0.425

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
 Time of Report: 20:51 03/02/2017 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: ario.tif, Lane 2

Summary

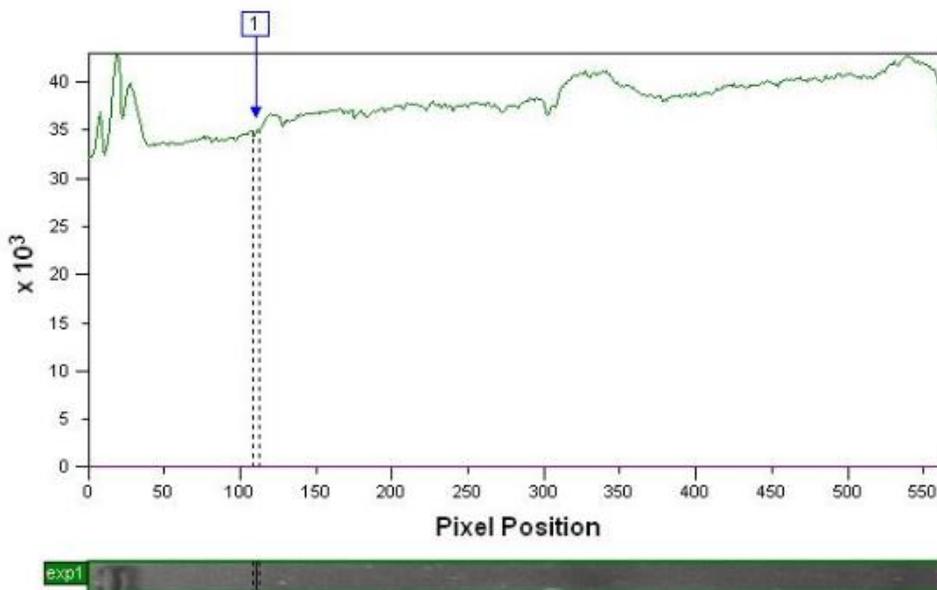
Name: exp1

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Percentage
 Percentage: 1
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (mm)	Volume	Vol+BkGnd	Calib Vol(pmole)
1	239	196	111	39,17	11095136,00	11095136,00	-

Band No	Area	Base Pairs	Rf
1	320	-	0,196

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
 Time of Report: 20:51 03/02/2017 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: ario.tif, Lane 3

Summary

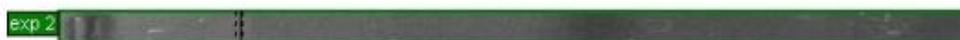
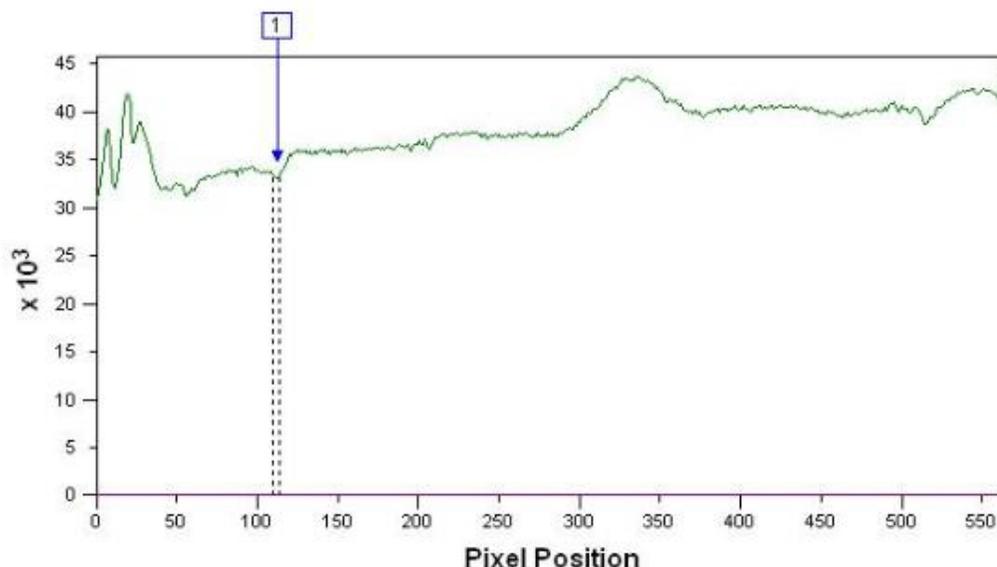
Name: exp 2

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Percentage
 Percentage: 1
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (mm)	Volume	Vol+BkGnd	Calib Vol(pmoles)
1	314	198	113	39.87	8504672.00	8504672.00	-

Band No	Area	Base Pairs	Rf
1	256	-	0.200

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
 Time of Report: 20:51 03/02/2017 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: ario.tif, Lane 4

Summary

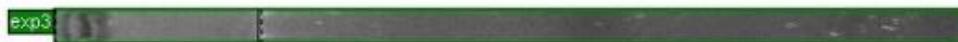
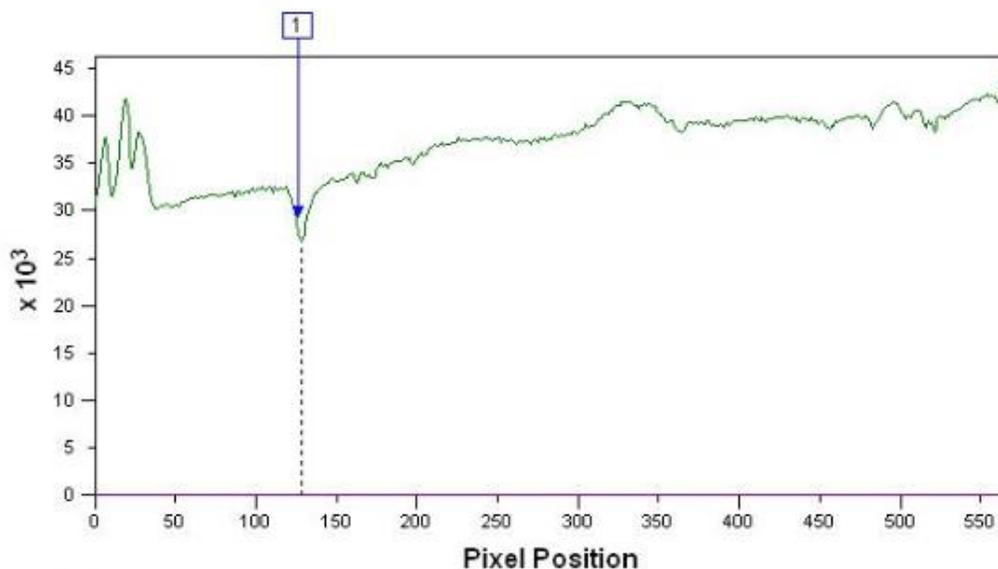
Name: exp3

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Percentage
 Percentage: 1
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (mm)	Volume	Vol+BkGnd	Calib Vol(pmoie)
1	391	211	126	44.46	267006592.00	267006592.00	-

Band No	Area	Base Pairs	Rf
1	8192	-	0.223

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
Time of Report: 20:51 03/02/2017 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: ario.tif, Lane 5

Summary

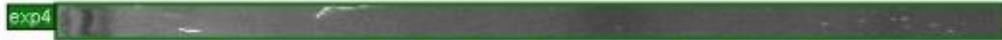
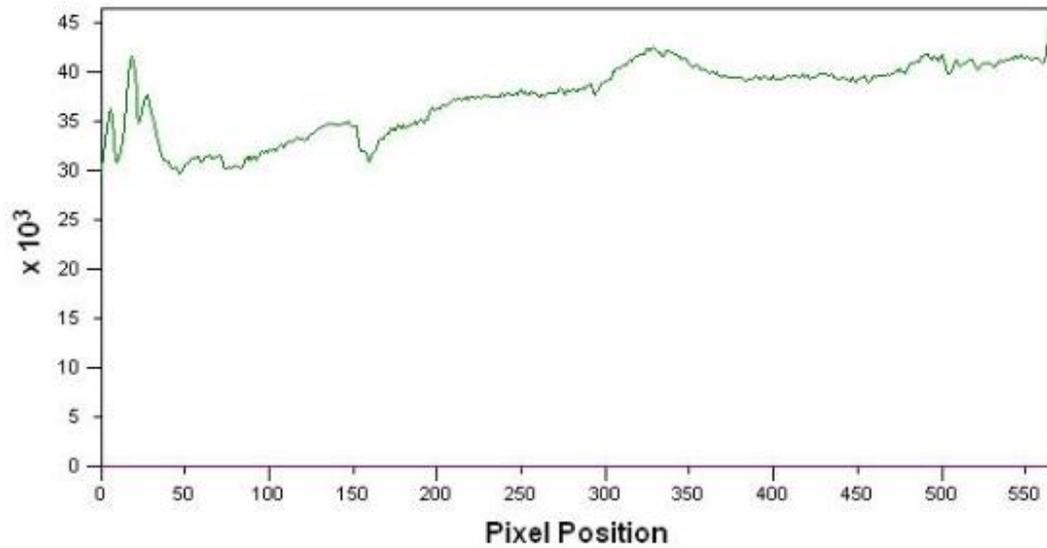
Name: exp4

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
Edge Detection Method: Automatic Edges
Band Positions Edited: No



Band Table

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
 Time of Report: 20:51 03/02/2017 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: ario.tif, Lane 6

Summary

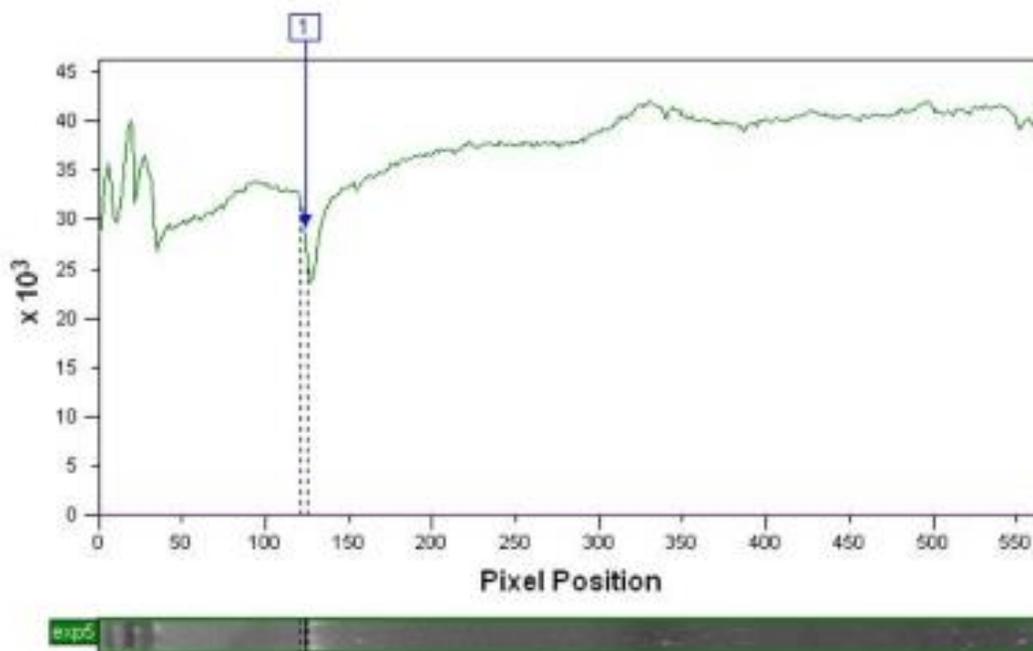
Name: exp5

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Percentage
 Percentage: 1
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (mm)	Volume	Vol**BkGnd	CallB Vol(p/mole)
1	551	209	124	43,75	7652266,00	7652266,00	-

Band No	Area	Base Pairs	RF
1	256	-	0,219

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
Time of Report: 20:51 03/02/2017 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: ario.tif, Lane 7

Summary

Name: exp6

Background

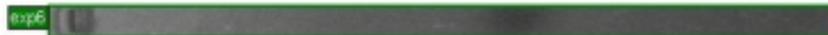
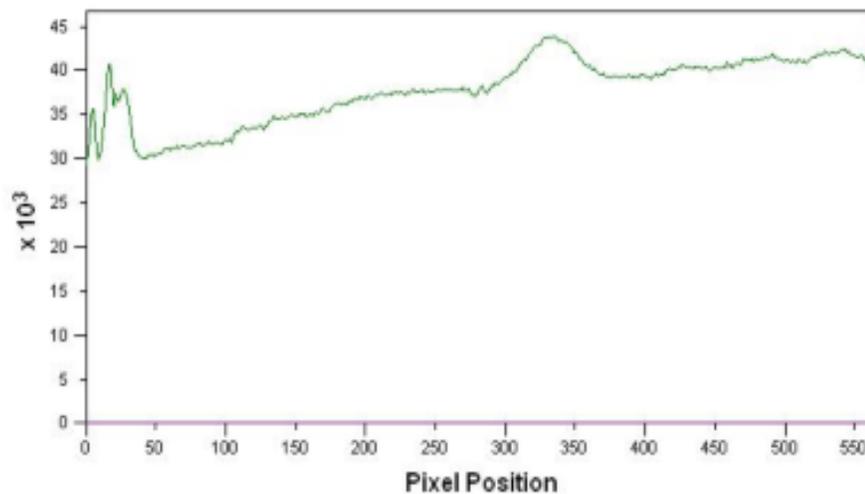
Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No

Edge Detection Method: Automatic Edges

Band Positions Edited: No



Band Table

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
 Time of Report: 20:51 03/02/2017 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: ario.tif, Lane 8

Summary

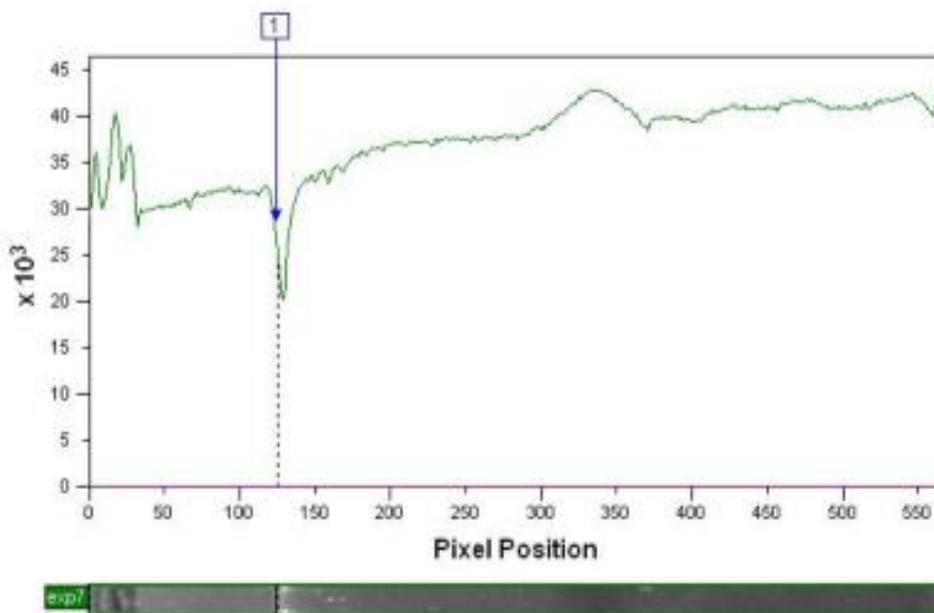
Name: exp7

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Percentage
 Percentage: 1
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (mm)	Volume	Vol*BkGrd	Cells Vol(pixels)
1	710	200	124	43.75	255156096.00	255156096.00	-

Band No	Area	Base Pixels	RI
1	8000	-	0.219

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
 Time of Report: 20:51 03/02/2017 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: ario.tif, Lane 9

Summary

Name: exp8

Background

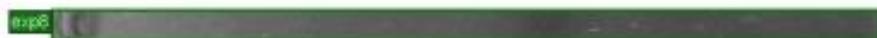
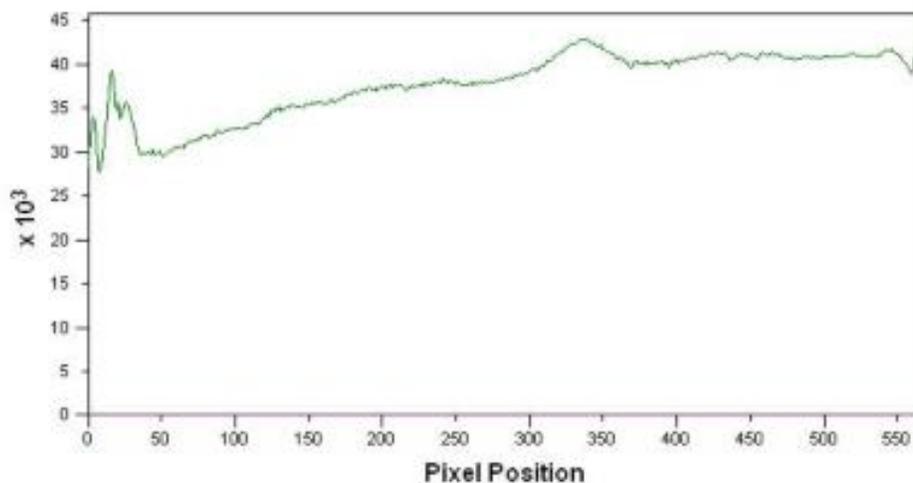
Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No

Edge Detection Method: Automatic Edges

Band Positions Edited: No



Band Table

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
 Time of Report: 20:51 03/02/2017 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: ario.tif, Lane 10

Summary

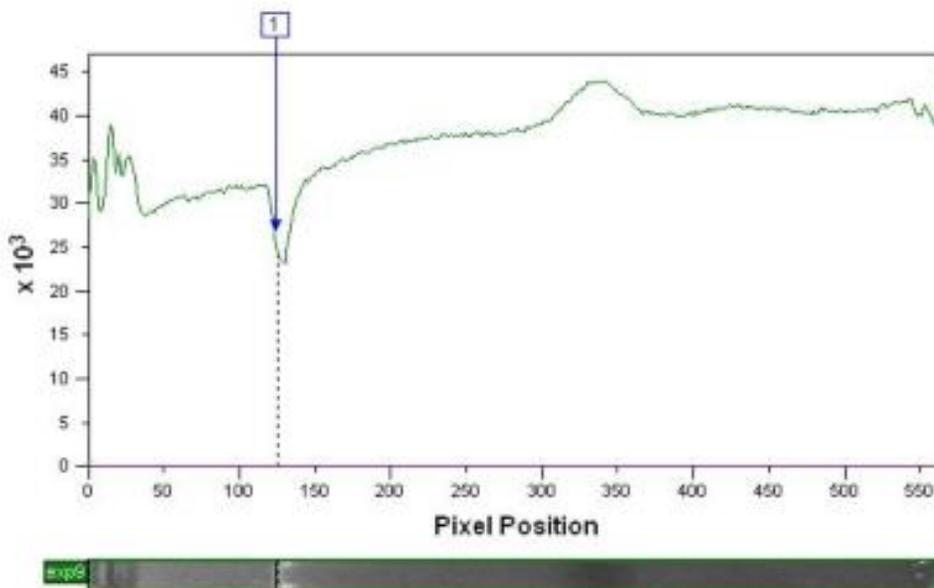
Name: exp9

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Percentage
 Percentage: 1
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (mm)	Volume	Vol*BgGnd	Calib Vol(μmole)
1	870	209	124	43.75	251740008.00	251740008.00	-

Band No	Area	Base Pels	RI
1	8000	-	0.219

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
Time of Report: 20:51 03/02/2017 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: ario.tif, Lane 11

Summary

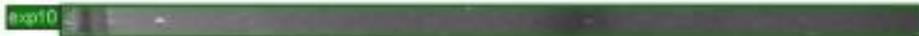
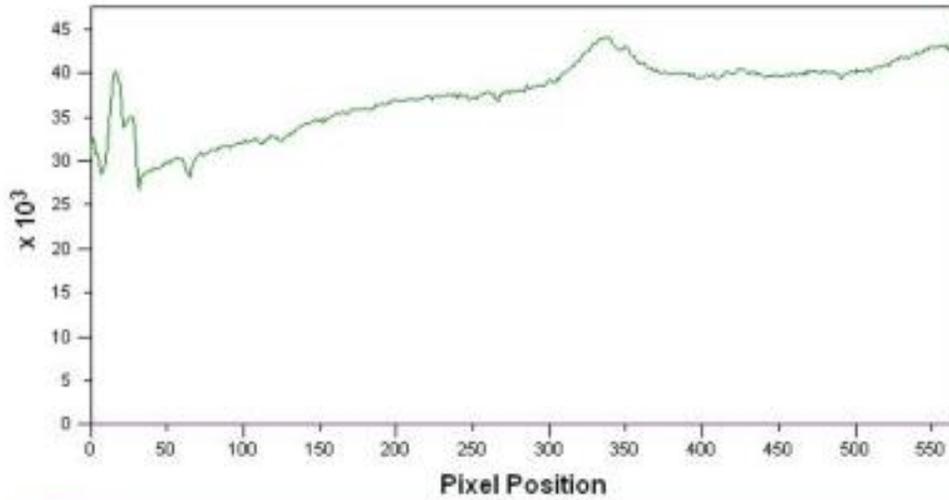
Name: exp10

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
Edge Detection Method: Automatic Edges
Band Positions Edited: No



Band Table

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
 Time of Report: 20:51 03/02/2017 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: ario.tif, Lane 12

Summary

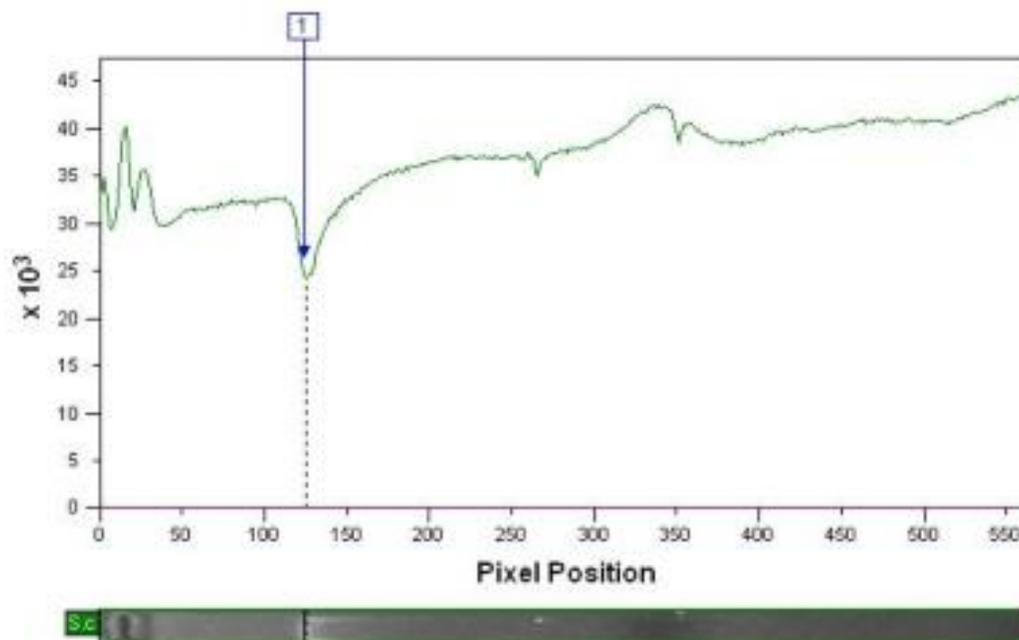
Name: S.c

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Percentage
 Percentage: 1
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (mm)	Volume	Vol*BkGnd	Calib Vol(pmoles)
1	1034	209	124	43,75	256026696,00	256026696,00	-

Band No	Area	Base Pairs	RF
1	8000	-	0,219

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
 Time of Report: 20:51 03/02/2017 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: ario.tif, Lane 13

Summary

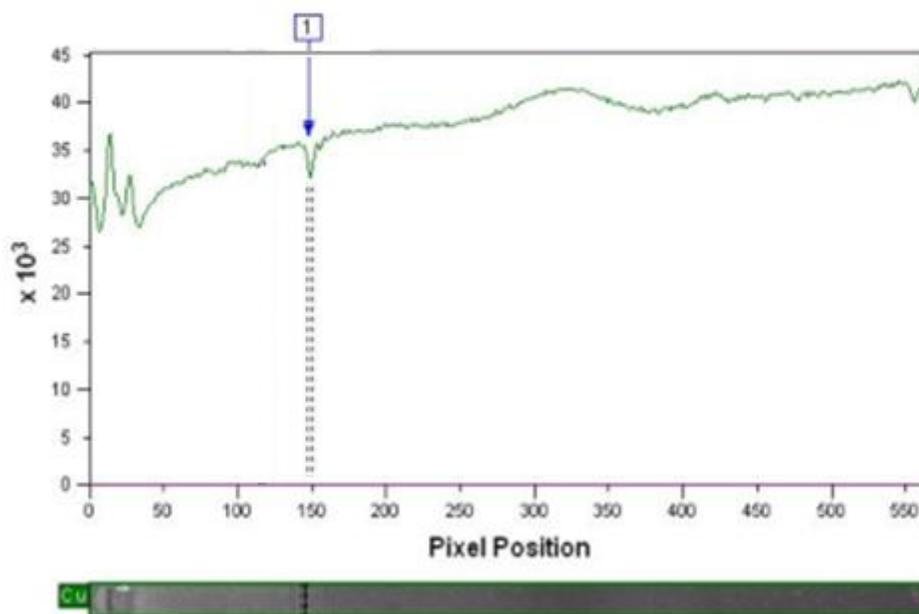
Name: Cu

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Percentage
 Percentage: 1
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	X Coord (pixels)	Y Coord (pixels)	Position	Position (mm)	Volume	Vol*DtGnd	Cells Vol(p/mole)
1	1114	202	117	41.28	8500872.00	8500872.00	-

Band No	Area	Base Pairs	Rf
1	192	-	0.207

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
 Time of Report: 20:51 03/02/2017 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: ario.tif, Lane 14

Summary

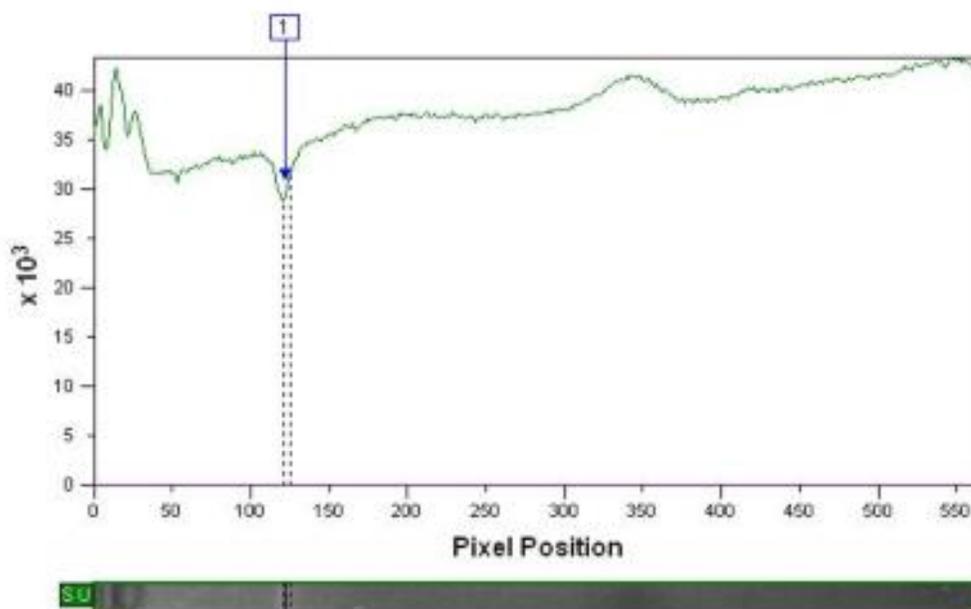
Name: S U

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Percentage
 Percentage: 1
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (mm)	Volume	Vol*5kGrnd	Calib Vol(μmole)
1	1189	207	122	43.00	7624864.00	7624864.00	-

Band No	Area	Base Pairs	RF
1	256	-	0.216

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
 Time of Report: 20:51 03/02/2017 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: ario.tif, Lane 15

Summary

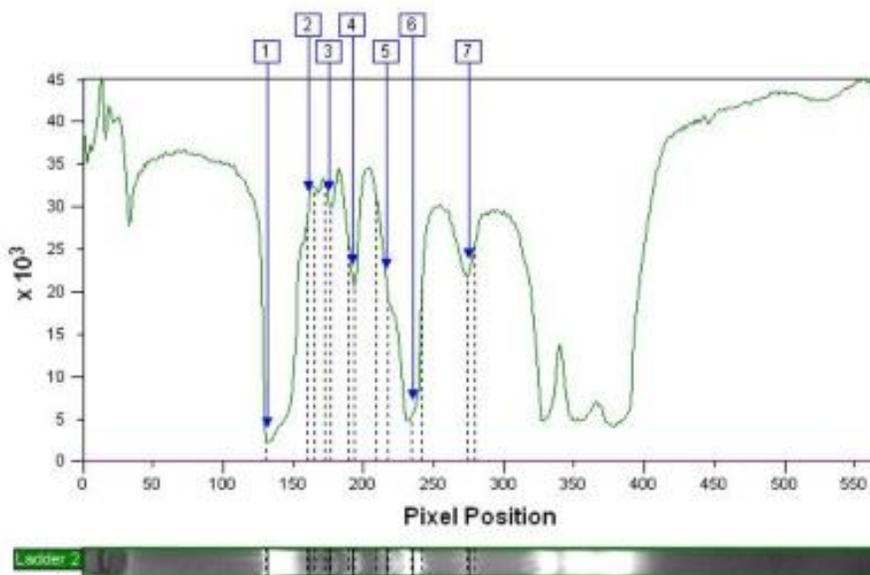
Name: Ladder 2

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Percentage
 Percentage: 1
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (mm)	Volume	Vol*DiskGain	Calib Volt(pmole)
1	1269	217	132	46.56	18775264.00	18775264.00	-
2	1269	246	161	56.51	9929632.00	9929632.00	-
3	1269	261	176	62.10	10176224.00	10176224.00	-
4	1269	277	192	67.75	8080320.00	8080320.00	-
5	1269	301	216	76.22	13536240.00	13536240.00	-
6	1269	320	235	82.82	4207392.00	4207392.00	-
7	1269	360	275	97.04	7377344.00	7377344.00	-

Band No	Area	Base Pairs	RF
1	1836	-	0.234
2	320	-	0.285
3	320	-	0.312
4	296	-	0.340
5	512	-	0.362
6	512	-	0.418
7	320	-	0.487

Anexo 13 Reporte de cromatografía de gases



Condiciones cromatografías de análisis

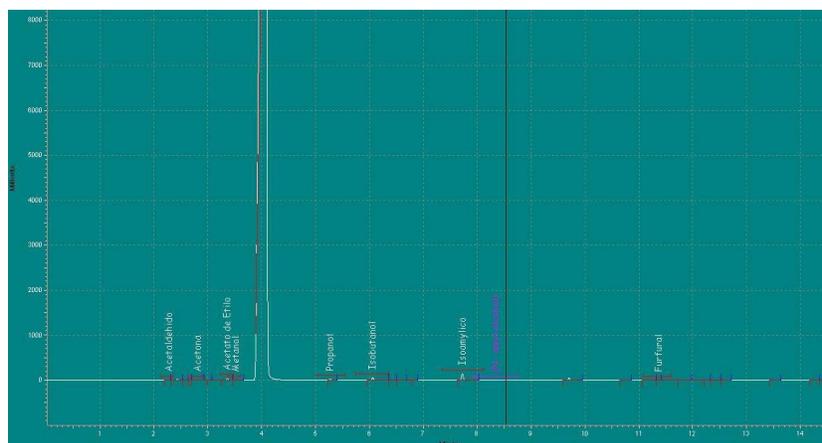
Columna de cobre, 1 m longitud, 4,8 mm diámetro interior

Relleno	:	Porapak Q
Temperatura de columna	:	189 °C
Temperatura del detector	:	175 °C
Temperatura de inyección	:	200 °C
Caudal gas portador, argón	:	65ml/min
Caudal hidrógeno	:	53ml/min
Caudal aire	:	525 ml/min
Detector	:	FID
Sensibilidad del detector	:	100 x 32 y 100 x 16



Cromatograma obtenido de análisis de metanol y alcoholes superiores

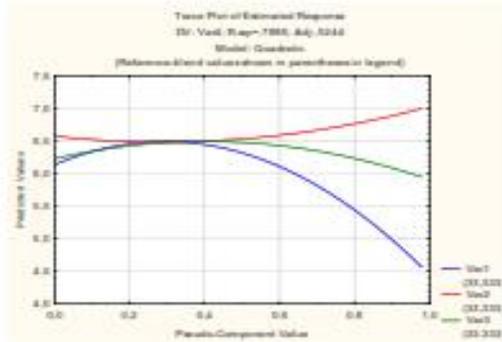
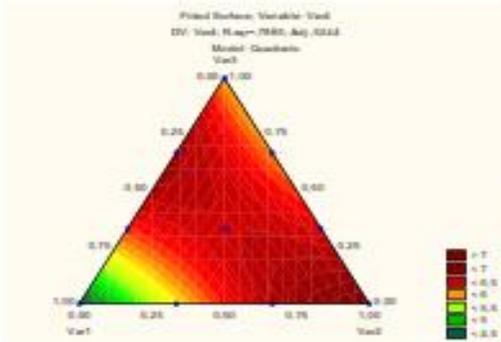
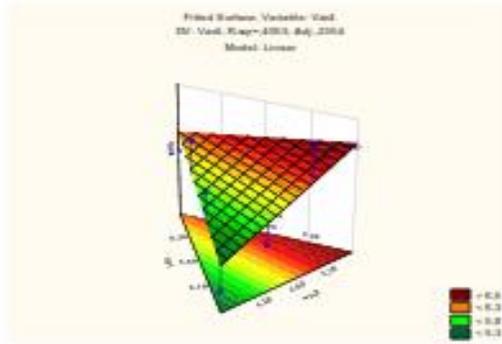
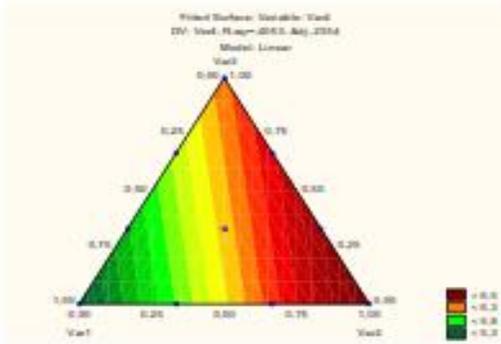
La representación gráfica de las variaciones de respuesta del detector, en función de la concentración, con columna de Porapak Q y bajo las condiciones expuestas, resultan función lineal para alturas y áreas de pico, tanto cuando se consideran respuestas absolutas como relativas al patrón interno.



Valores obtenidos de las determinaciones de Metanol y alcoholes superiores

Pk #	Name	Retention Time	Area	Concentration
1	Acetaldehído	2.255	46629	10.932
5	Acetona	2.782	43655	0.858
7	Acetato de Etilo	3.340	863255	15.967
8	Metanol	3.495	57184	0.410
10	Propanol	5.248	518074	4.344
11	Isobutanol	6.035	1257753	14.533
15	Isoamílico	7.707	3212214	39.281
	N- amyl alcohol			0.000 BDL
19	Furfural	11.345	10082	0.000
Totals			6008846	86.325

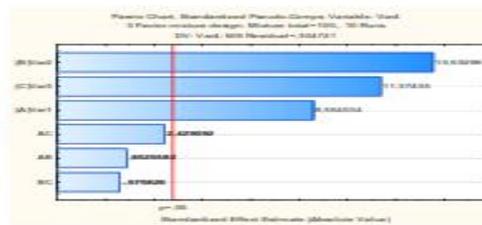
Anexo 14 REPORTE DE PROGRAMA STATISTICA 10.



ANOVA; Var.:Var4 (Spreadshe				
3 Factor mixture design; Mixture				
Sequential fit of models of incre				
Model	SS Effect	df Effect	MS Effect	F
Linear	2,337293	2	1,168647	3,4
Quadratic	2,209983	3	0,736661	1,2
Total Adjusted	5,766160	9	0,640684	

Overall Fit of Model; Var.: Var4				
3 Factor mixture design; Mixture				
Source	SS	df	MS	F
Model	4,547276	5	0,909455	2,9845
Total Error	1,218884	4	0,304721	
Total Adjusted	5,766160	9	0,640684	

Factor	Coeffs (original comps); Var.:Var4; R-s			
	Coeff.	Std.Err.	t(4)	p
(A)Var1	0,044491	0,005195	8,56403	0,0010
(B)Var2	0,070306	0,005195	13,53296	0,0001
(C)Var3	0,059091	0,005195	11,37435	0,0003
AB	0,000196	0,000230	0,85256	0,4419
AC	0,000559	0,000230	2,42906	0,0720
BC	-0,000132	0,000230	-0,57583	0,5955



ANOVA; Var.:Var4 (Spreadshe				
3 Factor mixture design; Mixture				
Sequential fit of models of incre				
Model	SS Effect	df Effect	MS Effect	F
Linear	2,337293	2	1,168647	3,4
Quadratic	2,209983	3	0,736661	1,2
Total Adjusted	5,766160	9	0,640684	

Overall Fit of Model; Var.: Var4				
3 Factor mixture design; Mixture				
Source	SS	df	MS	F
Model	4,547276	5	0,909455	2,9845
Total Error	1,218884	4	0,304721	
Total Adjusted	5,766160	9	0,640684	

