

UNIVERSIDAD LE CORDON BLEU



OFICINA DE INVESTIGACIÓN

INFORME FINAL DE INVESTIGACION

Proyecto de Investigación:

**"APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS DE *Ananas comosus* (PIÑA)
PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL POR VÍA FERMENTATIVA DE
Saccharomyces cerevisiae"**

(Resolución Comisión Organizadora N° 001-CO-ULCB-2016 del 15 Enero del 2016)

PROFESORA INVESTIGADORA:

Blga. Ms.C. ALICIA CECILIA DECHECO EGÚSQUIZA

AÑO:

2016

Agradecimientos

A la Universidad Le Cordon Bleu, por el apoyo y respaldo brindado durante la realización del presente trabajo de investigación.

A la Universidad Nacional del Callao por brindarme la oportunidad de desarrollar determinaciones a nivel de laboratorio.

Al Mg. Stanlein Tamara Tamariz por su valiosa colaboración en los análisis estadísticos del presente estudio.

A la memoria de mis queridos padres; Emilia Josefina y Luis Cesar Augusto
La infinita gratitud que les debo por sus buenos consejos, comprensión, paciencia y esfuerzo y el inmenso amor que me brindaron y a quienes recuerdo con gran cariño y admiración

A mi hijo Álvaro el gran apoyo de mi vida; por el aliento que me da y que me impulsa a ser mejor persona cada día

A todas aquellas personas que de manera directa o indirecta estuvieron involucradas en el desarrollo de este trabajo.

Le agradezco a Dios, por ser mí fuerza en cada triunfo y derrota.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	04
ABSTRACT	05
1. INTRODUCCION	06
- Problema	06
- Objetivos	08
- Justificación de la investigación	08
2. MARCO TEORICO	11
3. MATERIALES Y METODOS	40
4. RESULTADOS	66
5. DISCUSION	74
6. CONCLUSIONES	84
7. RECOMENDACIONES	86
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	88

RESUMEN

En ensayos a escala laboratorio se evaluó la fermentación alcohólica para la producción de etanol a partir de cascaras de piña *Ananas comosus*.

Las variables independientes a controlar durante el presente estudio fueron el Grado Brix y Nivel de pH inicial de los mostos fermentables. Las variables dependientes fueron Porcentaje de etanol y Grado alcohólico. Se evaluó la capacidad de producción de etanol por fermentación a partir de las cascaras de piña, se realizó una comparación de la acción fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* en 3 diferentes niveles iniciales de grados Brix (20, 23 y 25) y además se utilizaron tres niveles iniciales de pH (3, 4 y 5). Se obtuvo etanol de la cascara de Piña que fue cuantificado por alcoholimetría. En todos los tratamientos el mayor descenso del Grado Brix y mayor aumento del grado alcohólico ocurrió al tercer día de la fermentación (72 horas). Los grados brix de los mostos para la fermentación y que presentaron diferencias significativas fue el de 20 grados Brix con menor tiempo de fermentación pero los de mayor porcentaje de etanol en los mostos destilados fue el mosto de 25 Grados Brix. No existió diferencias significativas de los grados de alcohol respecto al nivel de pH, pero si existió diferencias significativas de los Porcentajes de etanol destilado respecto a los pH evaluados. La Prueba de Tukey, observo que existe diferencias significativas entre los Porcentaje de Etanol Destilado de los mostos de nivel de pH 3 con 4 y de pH 3 con pH 5. En cambio entre los mostos de nivel de pH 4 con pH 5 no existió diferencias significativas.

Si existieron diferencias significativas de los Porcentaje de Etanol Destilado respecto a los grados Brix. Se pudo observar en los intervalos de confianza que los Porcentaje de Etanol Destilado en los mostos de 20 Grados Brix tienen diferencias significativas con los Porcentaje de etanol destilado en los mostos de 25 Grados Brix. En cambio con los Grados Brix 20 con 23 fue poca diferencias significativas. En los mostos de cascara de piña de 20, 23 y 25 °Brix, la variable óptima de pH de mayor producción de etanol en el proceso fermentativo fue de pH 3 y 4 (medio ácido) ya que a esta condición se obtuvieron mayores grados alcohólicos mostrando ser el medio eficaz para el desarrollo del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*. El mosto de cascara de piña de 20°brix y pH 4 fue el que presento un aumento más rápido del grado Alcohólico llegando a su nivel más alto (7.5°A) al quinto de la fermentación. En el tratamiento de 25°brix el aumento de los grados alcohólicos fue más lento pero registro los valores más altos de grados alcohólicos (9.3°A y 9.4°A) a pH 3 y pH 5 al doceavo día de la fermentación. El mayor porcentaje de etanol obtenido fue 52.6% obtenido del mosto de cascara de piña de 25°Brix y pH 4.

ABSTRACT

In laboratory-scale trials, alcoholic fermentation was evaluated for the production of ethanol from pineapple peels *Ananas comosus*.

The independent variables to be controlled during the present study were the Brix Degree and initial pH level of the fermentable musts. The dependent variables were Percentage of ethanol and Degree of alcohol. The ethanol production capacity was evaluated by fermentation from the pineapple peels, a comparison of the fermentative action of *Saccharomyces cerevisiae* was carried out in 3 different initial levels of Brix degrees (20, 23 and 25) and three levels were used Initials of pH (3, 4 and 5). Ethanol was obtained from the pineapple peel which was quantified by alcoholimetry. In all treatments, the highest Brix grade decrease and the highest increase in alcohol content occurred on the third day of fermentation (72 hours). The brix degrees of the musts for the fermentation and that presented significant differences was the 20 degrees Brix with less time of fermentation but the ones of greater percentage of ethanol in the distilled musts was the must of 25 Brix Grades. There were no significant differences between the levels of alcohol and the pH level, but there were significant differences between the percentages of distilled ethanol and the pH values. The Tukey test, observed that there are significant differences between the Percent of Distilled Ethanol of the musts of level of pH 3 with 4 and of pH 3 with pH 5. In contrast between the musts of level of pH 4 with pH 5 there were no differences Significant.

f there were significant differences of the Percent of Distilled Ethanol with respect to the degrees Brix. It was observed in the confidence intervals that the Percentage of Distilled Ethanol in the 20 Brix Grams have significant differences with the percentage of ethanol distilled in the 25 Brix Grams. In contrast with the Brix Grades 20 with 23 there were few significant differences. In the 20, 23 and 25 ° Brix pineapple musts, the optimum pH variable of higher ethanol production in the fermentation process was pH 3 and 4 (acid medium), since this condition obtained higher alcoholic degrees Showing to be the effective means for the development of the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. The pineapple wort of 20 ° brix and pH 4 was the one that presented a faster increase of the Alcoholic degree reaching its highest level (7.5 ° A) to the fifth of the fermentation. In the treatment of 25 ° brix the increase of the alcoholic degrees was slower but registered the highest values of alcoholic degrees (9.3 ° A and 9.4 ° A) to pH 3 and pH 5 to the 12th day of the fermentation. The highest percentage of ethanol obtained was 52.6% obtained from pine needles of 25 ° Brix and pH 4.

1. INTRODUCCION

1.1. PROBLEMA

La tendencia mundial es el notable crecimiento en la generación de residuos, derivado del incremento en la generación de productos comercializables. A partir del marco de referencia anterior, se puede entonces decir que los residuos agroindustriales son materiales en estado sólido o líquido que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, y que ya no son de utilidad para el proceso que los generó, pero que son susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor económico, de interés comercial y/o social.

El crecimiento acelerado de residuos sólidos ha hecho necesario la implementación de desarrollo tecnológico e industrial de proyectos que revaloricen esta materia y así minimizar el impacto que genera la incorrecta disposición final que se le da, adicional a esto siempre se obtiene un segundo beneficio brindado por el producto generado. La alta producción de residuos sólidos orgánicos está impulsando a los investigadores a estudiar los productos agrícolas y subproductos de las mismas después de ser sometidas a procesos de transformación agroindustrial, estos subproductos o residuos en su mayoría corresponden a biomasa lignocelulósica rica en polímeros de celulosa y hemicelulosa entre 75-80% (Sánchez Riaño, 2010). Por ejemplo, de la hidrólisis de residuos lignocelulósicos como la cáscara de frutas que en su gran mayoría son consideradas biomasas desvalorizadas (Tejeda L. *et al*, 2010), se puede obtener jarabes glucosados para obtener bioetanol.

El problema al que se enfrentan los residuos agroindustriales es que no existe una clara conciencia ambiental para su manejo, además de que falta capacidad tecnológica y recursos económicos para darles un destino final, así como una legislación específica para promover la gestión de este tipo de residuos, que asegure un buen manejo desde su generación hasta su disposición final. Aún en nuestros días, esta problemática prevalece a nivel mundial. (Saval S. 2012).

En nuestro país los mercados y las industrias agroalimentarias generan una gran cantidad de residuos sólidos vegetales que comprometen gravemente los ecosistemas por su alta concentración de materia orgánica. Nuestras ciudades generan cada vez más cantidad de residuos cuya disposición final se realiza en botaderos a cielo abierto o cuerpos de agua constituyendo un problema para la salud pública, además los elevados volúmenes suponen importantes costos de recolección y disposición final.

La piña es un producto altamente utilizado a nivel mundial, por la variedad de subproductos, como: jugos de piña, jaleas, vinagre, productos farmacéuticos, producción de cerveza y otros. Siendo el fruto de la piña el producto más utilizado como tal; pero los ejes de inflorescencia y cáscara que son los residuos producidos de este producto, algunas veces quedan en el abandono y no son utilizados; es el caso de la cascara de piña. Las cáscaras de piña son desechadas en hoteles, restaurantes y despulpadoras de frutas.

En la actualidad se trabaja fundamentalmente en la búsqueda de materias primas baratas, que sustituyan a las tradicionales materias azucaradas, para alcanzar mayor eficiencia en los procesos de fermentación, recuperación y purificación de alcohol producido.

El bioetanol es producido por fermentación alcohólica de los azúcares presentes en materiales renovables. Dicha fermentación está influenciada por factores como la concentración de azúcares del sustrato y el microorganismo fermentador que se emplee (Peña, 2008).

El etanol se perfila como un recurso energético potencialmente sostenible, de alta viabilidad técnica, que puede ofrecer ventajas medioambientales y económicas a largo plazo puesto que a diferencia del petróleo, éste se obtiene a partir de fuentes vivas como microorganismos, los cuales realizan la fermentación de azúcares que pueden provenir de subproductos de grandes procesos industriales; emplear éstos subproductos, como sustratos para ser fermentados y obtener etanol, generan una oportunidad importante en el desarrollo de nuevas formas de energía renovable y en los cuales se encuentre un desarrollo sostenible con el medio ambiente (Garzón C. y Hernández L. 2009).

Al buscar una oportunidad de aprovechamiento de los residuos, se hace necesaria su caracterización para conocer su composición, la calidad de sus componentes y la cantidad que se genera, con esto se pueden definir las tecnologías más apropiadas para su aprovechamiento y posterior tratamiento. En la búsqueda de oportunidades de aprovechamiento de residuos este aspecto deberá ser considerado, con un enfoque de responsabilidad ambiental.

Por tal motivo, en esta investigación se pretende obtener etanol de origen orgánico y utilizar en este caso la cascara de piña como materia prima esencial del proceso y darle valor agregado a productos o subproductos a partir de la piña, lo que permitirá incrementar el nivel comercial de esta fruta y la optimización de estos productos mediante el aprovechamiento integral de la piña en nuestro país.

1.2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Obtener etanol por vía fermentativa a partir de cáscaras de *Ananas comosus* (Piña) usando *Saccharomyces cerevisiae*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los parámetros de la biodegradación de la cascara de piña por procesos fermentativos de *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención de etanol.
- Obtener etanol por vía fermentativa a partir de cáscaras de *Ananas comosus* (piña) evaluando el pH y grados Brix.
- Realizar un estudio comparativo de los porcentajes de etanol obtenidos con cada tratamiento estudiado.

1.3. JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION

El interés social por la conservación del medio ambiente ha resultado en el endurecimiento de legislaciones ambientales y cambios de política fiscal que buscan impulsar a la industria química y reducir su impacto ambiental. Por tal motivo, la utilización de residuos agroindustriales como materia prima de bajo costo, para la obtención de productos químicos finos por biotransformación está ganando interés. Esta opción de transformar desechos en nuevas materias primas se perfila como una opción atractiva para reducir la dependencia del petróleo y, al mismo tiempo, obtener compuestos que son económica o técnicamente inviables de obtener por síntesis química tradicional. (Gil-Horán R. *et al.*, 2008)

El uso racional de los recursos es un factor importante que orienta al diseño a sumar esfuerzos para crear estrategias de consumo y reducción de impactos generados a lo largo del ciclo de vida de los productos; de esta forma, en los procesos de desarrollo y fabricación de productos debe considerarse el aprovechamiento concientizado de los residuos que se generan, así como la utilización de la materia prima residual para la creación de nuevos productos, ayudando además, a la búsqueda del equilibrio sostenible del planeta. (Hernández Neria G. *et al.*, 2015)

Actualmente, la utilización de residuos agroindustriales, como materia prima de bajo costo, en procesos biotecnológicos para la obtención de productos químicos finos, se perfila como una opción atractiva para reducir la dependencia del petróleo y, al mismo tiempo, obtener nuevos compuestos que son económica o técnicamente inviables de obtener por síntesis química. En el Perú se genera un gran volumen de desechos sólidos (cáscara y bagazo), producto de la obtención de jugo y conservas de piña, siendo deseable su aprovechamiento para la producción de productos de alto valor agregado y la eliminación de una fuente de contaminación importante.

Actualmente, existen varios estudios encaminados al aprovechamiento de la fracción sólida de frutas, como sustrato de biorreacción en fase sólida para la producción a bajo costo de ácidos orgánicos, particularmente ácido L(+) láctico. De los residuos de los frutos, la industria de las conservas puede obtener alcoholes, azúcares y vinagres.

La piña es la tercera fruta tropical de importancia económica en el mundo, su producción a nivel mundial, entre 2006 - 2010, fue de 17,5 – 18 millones de toneladas de fruta fresca, siendo Filipinas, Brasil, Costa Rica, Tailandia y China los principales países productores, los cuales representan el 55% del total de la producción (Adegbite *et al.*, 2014).

Es importante que el residuo esté disponible localmente y en las cantidades necesarias para asegurar la fabricación de un producto de interés. (Saval S. 2012). En este sentido los desechos de la industrialización de la piña constituyen hasta el 65% del fruto. Además de la corona (parte superior del fruto), el corazón y las cáscaras, se genera el rastrojo, el cual corresponde al material vegetal de la planta y se elimina después del ciclo comercial. Se ha determinado que, por hectárea de piña cultivada, se genera cerca de 300 TM de rastrojo. (Araya S., 1998).

En nuestro país, el mercado industrial y minorista utiliza del fruto de la piña, la pulpa para el procesamiento y posterior consumo, mientras que las cascadas son desechadas sin conocer que estos pueden ser aprovechados para ser procesados y obtener subproductos como el etanol.

El interés para desarrollar la presente investigación surge a partir de la falta de aprovechamiento de residuos sólidos vegetales y asimismo, los mercados y las empresas agroindustriales disminuirán los costos asociados a la disposición de residuos sólidos vegetales y por lo tanto el impacto al ambiente será menor. Este trabajo pretende utilizar las cascadas de piña como sustrato para la producción fermentativa de metabolitos de interés como el etanol al utilizar la biomasa microbiana de las cascadas

de piña y se puede obtener un valor económico ambiental porque va a originar un producto que puede ser utilizado en la agroindustria, empresas de transformación de materia orgánica, industria química y farmacéutica.

Los residuos industriales de la piña son una alternativa de bajo coste para la producción de bioetanol. Este desecho contiene azúcares simples fermentables (glucosa, fructosa y sacarosa) y cantidades significativas de celulosa y de hemicelulosa potencialmente hidrolizables.

También se plantea la necesidad de atender de una manera ambientalmente responsable, la disposición final de los residuos que ya no pueden ser reutilizados, tomando como base el marco regulatorio vigente, para evitar que se conviertan en contaminantes de suelos y agua subterránea.

Por lo tanto, para la realización de este trabajo de investigación se evaluó la capacidad de producción de etanol por fermentación a partir de las cascarras de piña, se realizó una comparación de la acción fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* en 3 diferentes niveles de grados Brix, distantes uno del otro para verificar las diferencias (20, 23 y 25) y además se utilizaron tres niveles de pH (3, 4 y 5). Por medio del mejor resultado de producción de etanol y grado alcohólico, se estableció los niveles óptimos en condiciones de laboratorio de pH y grados Brix en los cuales se obtengan mayores rendimientos de etanol.

Este trabajo de investigación es un aporte de beneficio para empresas de transformación de materia orgánica, industria química, industria farmacéutica, empresas agroindustriales, mercados y de consulta para profesores, profesionales, alumnos y empresarios afines al quehacer alimentario, y en consecuencia participar fortaleciendo a la institución.

La presente investigación fue viable en cuanto a recursos humanos, materiales y tiempo y permitió sustentar conceptual y metodológicamente la importancia de aprovechar los residuos orgánicos agroindustriales generados del procesamiento de la piña para obtener productos intermedios de alto valor agregado y su impacto en la calidad de los productos derivados para consumo humano.

En cuanto a la delimitación del proyecto, la extracción del almidón, la hidrólisis ácida y enzimática, preparación del jarabe de glucosa y el estudio de la calidad del jarabe se

realizó en las instalaciones de los laboratorios de la Universidad Le Cordon Bleu y de la Universidad Nacional del Callao.

2. MARCO TEORICO

2.1. Piña

La piña (*Ananas comosus L.*) es originaria de América del Sur, del centro y Sureste de Brasil, y Noreste de Argentina y Paraguay. Ha sido seleccionada desarrollada y domesticada desde tiempo prehistóricos. En la actualidad los frutos de piña y sus derivados tienen gran importancia económica en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Jiménez, 2014).

En los últimos años ha adquirido una relevancia significativa debido a la importancia que tiene en la región y por ser una fuente de empleo importante en los procesos de producción y comercialización del fruto fresco, asimismo en el proceso de industrialización (CEFP, 2002).

La piña (*Ananas comosus (L.) Merr*) es el fruto de las plantas, tales como arbustos se cultiva ampliamente en las zonas tropicales y subtropicales (Jaelani A., 2013), la producción de piña en el Perú aumentó del 2007 al 2013 de 212,1 mil toneladas a 438,6 mil toneladas (Ministerio de Agricultura y Riego, 2014), la piña tiene un sabor dulce conteniendo sólidos solubles alrededor de 12°Brix y la variedad roja trujillana es la más ácida, soporta bien el almacenamiento, transporte y la duración de la piña en anaquel es bastante larga (Carhuancho P., 2011).

Es una planta, herbácea, perenne de reproducción principalmente asexual, a través de hijos (Carvajal, 2009). El jugo de frutas se considera como un producto alimenticio saludable y actualmente consumen con frecuencia un gran porcentaje de la población mundial (Luckow y Delahunty, 2004).

Como sabemos el cultivo de la piña se concentra principalmente en la selva central del Perú, donde se plantan las dos variedades tradicionales 'Samba' y 'Hawaiana' y las introducidas 'Cayena Lisa' y MD-2, actualmente conocido como Golden. Pero, la piña, es cultivada en toda la selva peruana donde se plantan un sin número de tipos; de las que sobresalen los ecotipos "Pucalpina o Negra"; "Motilona", "Blanca", "Azúcar", "Real" o "Hawaiana"; "Casha piña", "Guacamayo", "Roja Trujillana" entre otros. (Cáceres Palomino E., 2008). (Figura N°1).

Figura N° 1. Características morfológicas de una planta y fruto de Piña (*Ananas comosus*).



Fuente: Cáceres Palomino Efrain (2008).

La piña es la que mayor industrialización puede desarrollar por ser transformada en jugo concentrado, trozos y rebanadas (CNSPP, 2009). Para su consumo en fresco es considerada como una buena alternativa, por ofrecer un sabor exótico y poseer un alto contenido en vitamina A y C, además de fibra y propiedades diuréticas. La piña es una planta natural de los trópicos americanos y pertenece a la familia de las bromelias. Aunque la planta tiene un gran valor ornamental, su fruta es considerada una de las más exquisitas y exóticas que se producen en el mundo (COVECA, 2010).

Taxonomía de la Piña.

Cuadro N° 1. Clasificación botánica de la Piña planta *Ananas comosus*.

Reino	Plantae
División:	Monocotiledóneas
Clase:	Liliopsida
Orden:	Bromeliales
Familia:	Bromeliaceae
Género:	Ananas
Especie:	A. comosus (L) Merr

Fuente: (Sandoval, 2011)

Composición y valor nutritivo.

Nutritionalmente, la parte comestible de la piña está constituida principalmente por un 85-90 por ciento de agua y de 8 a 10% de azúcares de los cuales dos terceras partes

se encuentran en forma de sacarosa y el resto como glucosa y fructosa (Olivares P., 2003). Prácticamente no contiene almidón y su contenido de proteínas y grasa es muy baja. Contiene 0.6 a 0.9 % de ácidos de los cuales el 87 % es ácido cítrico y el resto ácido málico. Es rica en Vitamina C y buena fuente de Vitaminas B1, B2 y B6” (Arias C. y J. Toledo, 2000). Cuadro N°2.

Este rol nutritivo de la piña también es debido a que es una buena fuente de fibra dietética; al respecto Ramulu P. y Udayasekhara R. (2003) señalaron que esta fruta presenta un 20% de fibra dietética, correspondiendo 16,43% a fibra insoluble y 3,57% a fibra soluble, en base seca.

Cuadro N°2. Determinaciones químicas proximales a muestras representativas de piña (*Ananas Comosus*).

Características	Piña (%)
Humedad	90,9
Proteína	0,58
Grasa	0,24
Carbohidratos	7,98
Fibra cruda	0,62
Ceniza	0,30
Vitamina C (mg)	65,04
°Brix	10.8
Acidez titulable	1,47
pH	3,38

Fuente: Cubas Juárez L. M. *et al.* 2016.

Los ácidos de mayor importancia en la piña, basado en su concentración son el cítrico y el málico. De estos, el primero aporta alrededor del 80% de la acidez total. También existe en la fruta pequeña cantidad de ácido ascórbico, pero este contribuye en muy baja proporción a su acidez (Morales, M., *et al.* 2001). (Cuadro N°3).

Durante la post cosecha la acidez titulable exhibe un leve aumento, pero posteriormente tiende a bajar hasta llegar ligeramente arriba de su punto inicial. (Tejeda L., 2010).

Cuadro N°3. Características fisicoquímicas de la Piña (*Ananas Comosus*).

Acidez Total Titulable (% Ác Cítrico)	pH	Ácido Propiónico (ppm)	Azúcares Totales (%)	Azúcares Reductores (%)
---	----	------------------------------	-------------------------	-------------------------------

0.71	3.83	2.73	6.22	3.17
------	------	------	------	------

Fuente: Morales, M., *et al.* 2001.
Componentes de la Cáscara de piña

Composición de la lignocelulosa.

La biomasa lignocelulósica está compuesta por los polisacáridos, lignina y otras sustancias.

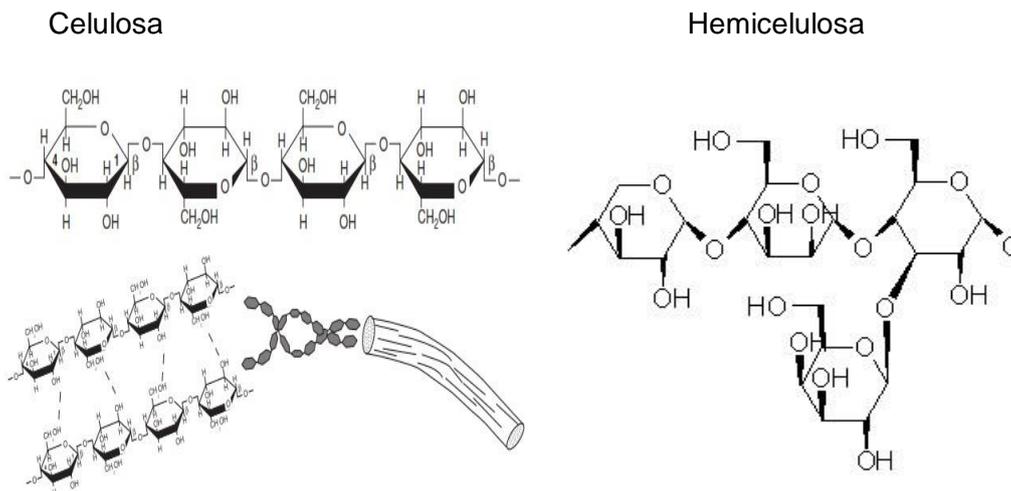
a. Polisacáridos.

Comprende del 60-80% del material lignocelulósico. Este componente hace referencia a la celulosa y hemicelulosa que son hidrocarbomos de alto peso molecular (Mathews, C.K., K.E. Van Holde Y K.G. Ahern. 2004).

La celulosa es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos β -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Ovando & Waliszewski, 2005).

La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4- O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, los azúcares están unidos por enlaces β -1,4 y ocasionalmente por enlaces β -1,3 (Pérez, et al., 2002).

Figura N°2. Estructura de la Celulosa y hemicelulosa.

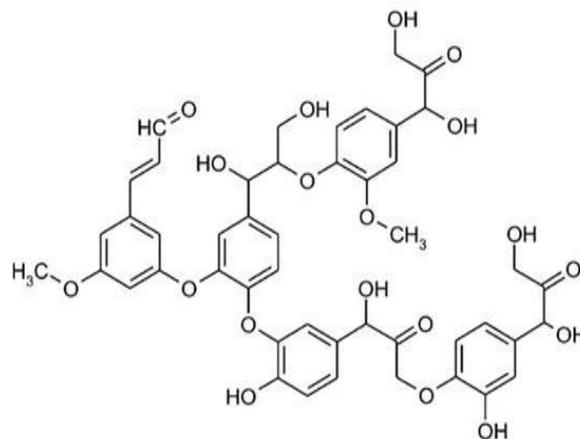


Fuente: Mathews, C.K., K.E. Van Holde Y K.G. Ahern. 2004.

b. La lignina

Es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos que da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica (Pérez, *et al.*, 2002). Figura N°3.

Figura N°3. Estructura de la lignina.



Fuente: Mathews, C.K., K.E. Van Holde Y K.G. Ahern. 2004.

c. Otras sustancias.

Son aquellas que no hacen parte de la estructura de la pared celular, ejemplo de estas son: grasas, ceras, alcaloides, proteínas, fenoles simples y complejos, azúcares simples, pectinas, mucílagos, gomas, resinas, terpenos, etc. Estas pueden ser intermediarios metabólicos o que simplemente aportan propiedades físicas.

La cascara de piña está compuesta principalmente por fibra (77.61), proteína cruda (6.56%) y carbohidratos no estructurales (12%). (Montilla, M., & Álvarez, C., 2007).

La cáscara y la corona están constituidas principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, las cuales la hacen no comestibles para los humanos, pero potencialmente

aprovechables para obtener otros productos de valor agregado. (Swaroop Rani & Krishna, 2004). (Cuadro N°4).

Cuadro N° 4. Composición química proximal de la de la cáscara de piña seca y fresca.

Parámetros	Húmeda	Seca
Humedad (%)	71.07	27.43
Sólidos totales (%)	29.03	72.57
Sólidos volátiles (%)	96.12	95.90
pH	4.70	4.70
Cenizas (%)	3.88	4.10
<i>% en base seca</i>		
Celulosa	11.20	12.00
Hemicelulosa	7.00	6.50
Pectina	6.70	7.10
Sólidos en éter solubles	6.10	6.70
Proteína	3.13	3.30
Azúcares reductores	25.80	27.80
Azúcares no reductores	5.70	4.90
Lignina	11.52	11.00
Ácidos grasos volátiles (mg/L)	800	650

Fuente: (Swaroop Rani & Krishna, 2004).

Aprovechamiento y valoración de la piña

El deficiente manejo y disposición que se hace de los desechos agroindustriales está conduciendo a preocupantes problemas ambientales que va en aumento debido a la producción de desechos, los cuales directa o indirectamente llegan a las corrientes superficiales y por otra parte deteriora los suelos y pastizales agrícolas. Debido a la problemática ambiental por residuos generados al año se ha despertado cierto interés para el aprovechamiento de los desechos considerados como residuo para la obtención de nuevos productos de valor agregado (Saval S., 2012).

De acuerdo a la bibliografía consultada se han realizado estudios como la obtención de celulosa y bioetanol a partir del bagazo de piña, en la cual se presentan producciones

de etanol del 35% con bagazo y del 57% con celulosa, por tiempos de fermentación de 48 y 72 h (Antonio *et al.*, 2010). Por otra parte, Quesada-Solís *et al.*, (2005) menciona el aprovechamiento de fibras del rastrojo de piña para reforzar resinas de poliéster, observando mejoras en la resistencia a la ruptura por tensión. Asimismo García-Rosales *et al.*, (2013) presenta la preparación de carbones acondicionados con nano partículas utilizando cáscaras de piña tratadas con sales de hierro, obteniendo materiales carbonosos con área superficial esférica de 167 m²/ g y nano partículas de hierro con un diámetro entre 10 y 30 nm.

En el material lignocelulósico se dispone de una gran cantidad de azúcares fermentables, sin embargo, su utilización se puede ver impedida por la recalcitrancia intrínseca del material, una solución a este problema han sido los diversos métodos fisicoquímicos y biológicos que se han desarrollado para liberar los azúcares fermentables y obtener bioetanol. Algunas estrategias utilizando microorganismos como las levaduras se han enfocado en la obtención de etanol a partir de lignocelulosa mediante la expresión de enzimas celulolíticas y aprovechando la capacidad fermentadora de la levadura. En este proceso de sacarificación y fermentación simultánea se han obtenido cantidades y rendimientos significativos de etanol lo cual representa un punto de partida que conducirá al desarrollo de tecnologías encauzadas a satisfacer las necesidades energéticas en el futuro. (Cuervo L., J. Folch, R. Quiroz., 2009).

Entre las propiedades medicinales de la piña, la más notable es la de la enzima proteolítica llamada bromelina, que ayuda a metabolizar los alimentos. Es también diurético, ligeramente antiséptico, desintoxicante. Se ha estudiado su uso como auxiliar en el tratamiento de la artritis reumatoide, la ciática y el control de la obesidad. La alta concentración de bromelina en la cascara y otras partes ha llevado a su uso para aliviar infecciones laríngeas y faríngeas, así como en uso tópico para la cistitis y otras infecciones. (Fernández A. y Gómez S. 2011)

Etanol

El etanol o alcohol etílico es el producto químico orgánico sintético más antiguo usado por el hombre, se presenta como un líquido incoloro e inflamable con un punto de ebullición de 78 °C, su fórmula química es CH₃-CH₂OH, siendo el componente activo esencial de las bebidas alcohólicas, además es una de las materias primas importantes para las síntesis. Puede obtenerse a través de dos procesos de elaboración: la

fermentación o descomposición de los azúcares contenidas en distintas frutas, y la destilación, la cual consiste en la depuración de las bebidas fermentadas (Garzón, 2009). Cuadro N°5.

Cuadro N°5. Propiedades Fisicoquímicas.del etanol

Propiedades fisicoquímicas	Descripción
Estado de agregación	Líquido
Apariencia	Incoloro
Densidad	810 kg/m ³ ; (0,810 g/cm ³)
Masa molecular	46,07 uma
Punto de fusión	158,9 K (-114,1 °C)
Punto de ebullición	351,6 K (78,6 °C)
Temperatura crítica	514 K (241 °C)
Presión crítica	63 atm.
Temperatura de inflamación:	13 °C

Fuente: Salomón, R. 2001.

La producción del alcohol es un fenómeno complejo cuyo rendimiento depende de diversos factores; por ejemplo las características intrínsecas de la cepa, las condiciones de aireación, la concentración del inóculo, la composición del medio, las condiciones de fermentación, los nutrientes que influyen en el crecimiento de la fermentación, entre otros (Gilces, 2006).

Fermentación

Es un proceso que transforma las moléculas de azúcar a diferentes productos que dependerán del sustrato y del tipo de microorganismo que se utilice, las principales sustancias que se obtienen de la fermentación son: alcohol etílico, ácido láctico, ácido butírico, ácido acético, entre otros y de acuerdo a estos se denomina el tipo de fermentación, además algunas fermentaciones como la alcohólica producen dióxido de carbono. (Mathews, C.K., K.E. Van Holde Y K.G. Ahern. 2004).

Con la fermentación se realiza la conversión de los carbohidratos en alcohol. La determinación de los grados alcohólicos (GA) probables, expresados también en grados Gay Lussac (°GL) se puede hallar en función de los grados Brix, grados baumé y de la densidad, (Amerine M. A. & Cornelius S. Ough, 2001).

Producción de etanol vía fermentativa

La fermentación es un proceso biológico resultante del metabolismo de bacterias, levaduras o mohos. Todos los organismos tienen un proceso conocido como la glucólisis que ocurre en el citoplasma de sus células. La glucólisis convierte una molécula de azúcar grande (glucosa, fructosa) en dos pequeñas moléculas de ácido pirúvico liberando energía en el proceso. En ausencia de oxígeno (condiciones anaeróbicas) el organismo puede ácido pirúvico ruta a una vía de la fermentación alcohólica (Jensen, 2004). La producción de etanol por la acción de levadura sobre malta o extractos de fruta ha sido llevada a cabo a gran escala por muchos años y fue el primer proceso industrial para la producción de un metabolito microbiano. Es por la vía fermentativa que se obtiene la mayor cantidad de etanol a nivel mundial. El 95% del etanol en el mundo se obtiene por fermentación a partir de materias primas que contengan carbohidratos la gran aplicabilidad del etanol en procesos tradicionales como por ejemplo solvente, alimento, bebidas y biocombustible. (Ertola R., O. Yantorno y C. Mignone 2003).

El éxito de una buena fermentación depende de la eficacia del tratamiento preliminar: concentración del azúcar, pH y temperatura óptimos; la adición de sustancias nutritivas al mosto, contaminación por otros microorganismos, empleo de un organismo resistente a altas concentraciones de alcohol, mantenimiento de condiciones anaerobias y la inmediata destilación del producto fermentado. (Ertola R., O. Yantorno y C. Mignone 2003).

Materias primas y su importancia en el proceso fermentativo.

Para la producción de etanol han sido utilizadas diferentes fuentes de carbono como materia prima; estas deben ser transformadas con facilidad en azúcar fermentable. Su uso práctico estará determinado por el rendimiento en etanol, por su costo y el tipo de microorganismo que se utilice. (Santamaría P., *et al.*, 1995).

Varios autores, coinciden en definir 3 tipos de materias primas para la producción de etanol: (Crueger, W. y A. Crueger. 1993)

- Materiales portadores de azúcares simples que contienen carbohidratos como fuente de azúcares. (Tales como jugo de caña de azúcar, melazas, sorgo dulce, etc.). -

Materiales amiláceos los cuales contienen almidón como fuente de azúcares. (Tales como la yuca, maíz, papa, etc.).

- Materiales celulósicos, que contienen celulosa, hemicelulosa, Tales como el bagazo, la madera, residuos agrícolas, etc.

El etanol se produce por fermentación de estas materias primas con levaduras u otros microorganismos. Las de la primera clase fermentan directamente. El segundo tipo consta de hidratos de carbono complejos, como el almidón, que primero se deben convertir en azúcares fermentables mediante la acción de enzimas. Las sustancias celulósicas de la tercera clase se convierten en azúcares fermentables por hidrólisis con ácidos inorgánicos, principalmente residuos Lignocelulósicos. (Martínez T. J., 2002).

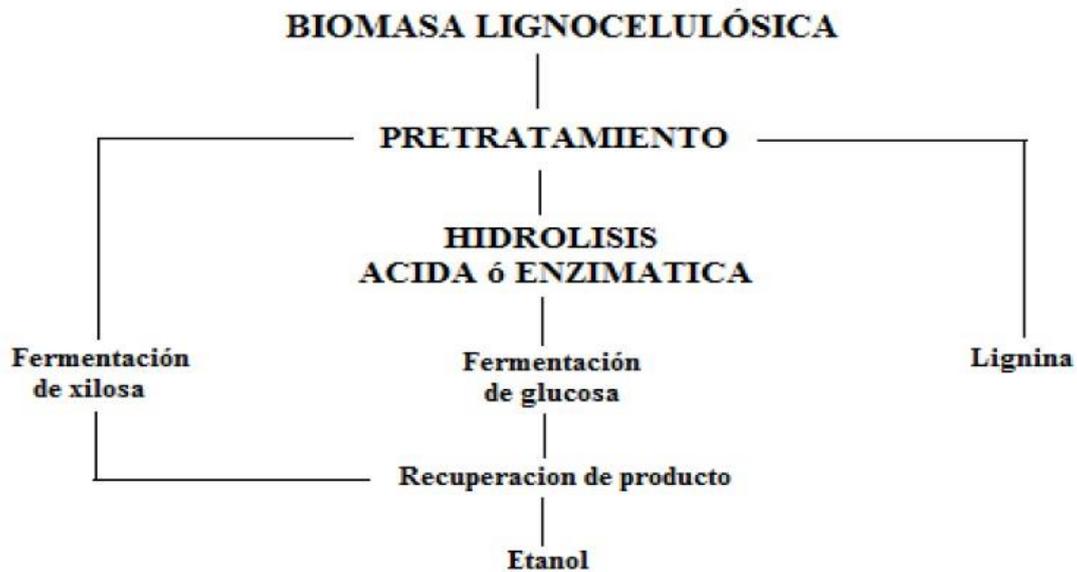
El empleo de alimentos como fuente de obtención de bioetanol (bioetanol de primera generación) compite con el mercado mundial de alimentos con la consiguiente subida de los precios de los mismos. Este motivo ha suscitado que en las últimas dos décadas las investigaciones se hayan centrado en la búsqueda de nuevas fuentes de obtención de bioetanol más rentables, eficaces y menos perjudiciales para el medioambiente y la sociedad. Una alternativa es el uso de los residuos lignocelulósicos resultado de procesos agrícolas, forestales o industriales (Wright J., 1998; Duff S. y W. Murray, 1996).

Dentro de este grupo, se encuentran los residuos de industrialización de la piña, muy difíciles de degradar por sus altas demandas bioquímicas y químicas de oxígeno (DBO y DQO) y que pueden suponer hasta un 80% de la materia prima procesada (Tewari H. *et al.*, 1987). En los últimos años, se ha conseguido obtener bioetanol y biometanol a partir de los residuos de la piña por ser éstos ricos en azúcares, almidón y hemicelulosa (Nigam J., 2000).

La producción de etanol combustible a partir de materiales lignocelulósicos parte del hecho de que sus tres principales componentes son celulosa (36-61%), hemilelulosa (13-39%) y lignina (6-29%). Igualmente, el bagazo de cebada está constituido por celulosa (31-45%), hemicelulosa (27-38%) y lignina (14-19%). El bioetanol es entonces un sustituto prometedor para los combustibles tradicionales derivados del petróleo. Para liberar monómeros de azúcar fermentable el material lignocelulósico es hidrolizado químicamente (ácidos, bases), enzimáticamente o por la combinación de ambos. La conversión de la lignocelulosa en etanol, comprende dos etapas generales: (i) pretratamiento e hidrólisis, donde se obtienen los azúcares simples fermentables (glucosa, xilosa) y (ii) fermentación, donde estos azúcares son convertidos a etanol.

(Arimuya M. y E. Tecco Pisco 2014). Figura N° 4.

Figura N°4. Proceso de obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica



Fuente: Arimuya M. y E. Tecco Pisco 2014.

3.7. Fermentación Alcohólica

La fermentación es un término general, que indica la degradación aeróbica o anaeróbica de un substrato orgánico a diversos productos, por la acción de levaduras y algunas bacterias que producen enzimas para realizar dicha función y obtener energía en forma de ATP. La degradación anaeróbica es quizá la más antigua, puesto que los organismos vivos aparecieron en una tierra primitiva, la cual era carente de oxígeno (Mathews C., Holde K.E. y Ahern K. G. 2004).

Existen muchas clases de fermentaciones, dependiendo de: el tipo de organismo que las produce, del substrato, o incluso de las condiciones impuestas, tales como el pH ó el abastecimiento de oxígeno. Una de las más importantes y mejor conocidas es la fermentación alcohólica, la cual es una biorreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono mediante la siguiente reacción química conocida, como la ecuación de Gay-Lussac:



La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico realizado por levaduras o bacterias. Donde el sustrato celular; monosacárido y disacárido en su mayoría, son transformados principalmente en alcohol etílico y dióxido de carbono, con la generación de equivalentes de reducción de los compuestos NADH/NAD^+ y NADHP/NADP^+ y enlaces de alta energía de fosfato, ATP. Para que se pueda desarrollar la glucólisis y el metabolismo del piruvato, es necesaria que la molécula de glucosa o fructosa sean transformadas a glucosa-6-fosfato o la fructosa-6-fosfato respectivamente. Será a partir del piruvato que se desarrollarán las reacciones por las que se obtiene el alcohol, como las reacciones son anaeróbicas para el caso de fermentación alcohólica la reducción del piruvato a etanol es posible por la acción de la forma reducida de la coenzima NAD, encargada de realizar la oxidación (Acosta Romero, C. 2012).

La fermentación alcohólica va acompañada de la liberación de moléculas energéticas (ATP) – energía materialmente comprometida – puestas a disposición de las levaduras” (Vincent *et al.*, 2006).

La fermentación alcohólica es un proceso anaerobio en el que las levaduras y algunas bacterias, descarboxilan el piruvato obtenido de la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (glicolisis) dando acetaldehído, y éste se reduce a etanol por la acción del NADH_2 , como se ilustra en la Figura N°5.

Los microorganismos de fermentación alcohólica siguen un proceso de Glucólisis, también llamado vía de Embden Meyerhof Parnas (EMP) para degradar glucosa: La glucosa se divide en dos unidades de tres carbonos (piruvato). Se oxidan numerosos átomos de carbono. La pequeña cantidad de energía generada de las reacciones se almacena de forma temporal en dos moléculas de ATP (trifosfato de adenosina) y una de NADH (deshidrogenasa del dinucleótido de nicotinamida y adenina) por cada triosa. El destino metabólico subsiguiente del piruvato depende del organismo que se considere y de sus circunstancias metabólicas. En los organismos anaerobios, el piruvato puede convertirse en productos de desecho como etanol, ácido láctico, ácido acético y moléculas semejantes; en los organismos aerobios, como los animales y los vegetales, oxidan el piruvato para formar CO_2 y H_2O (McKee T. & McKee J., 2014).

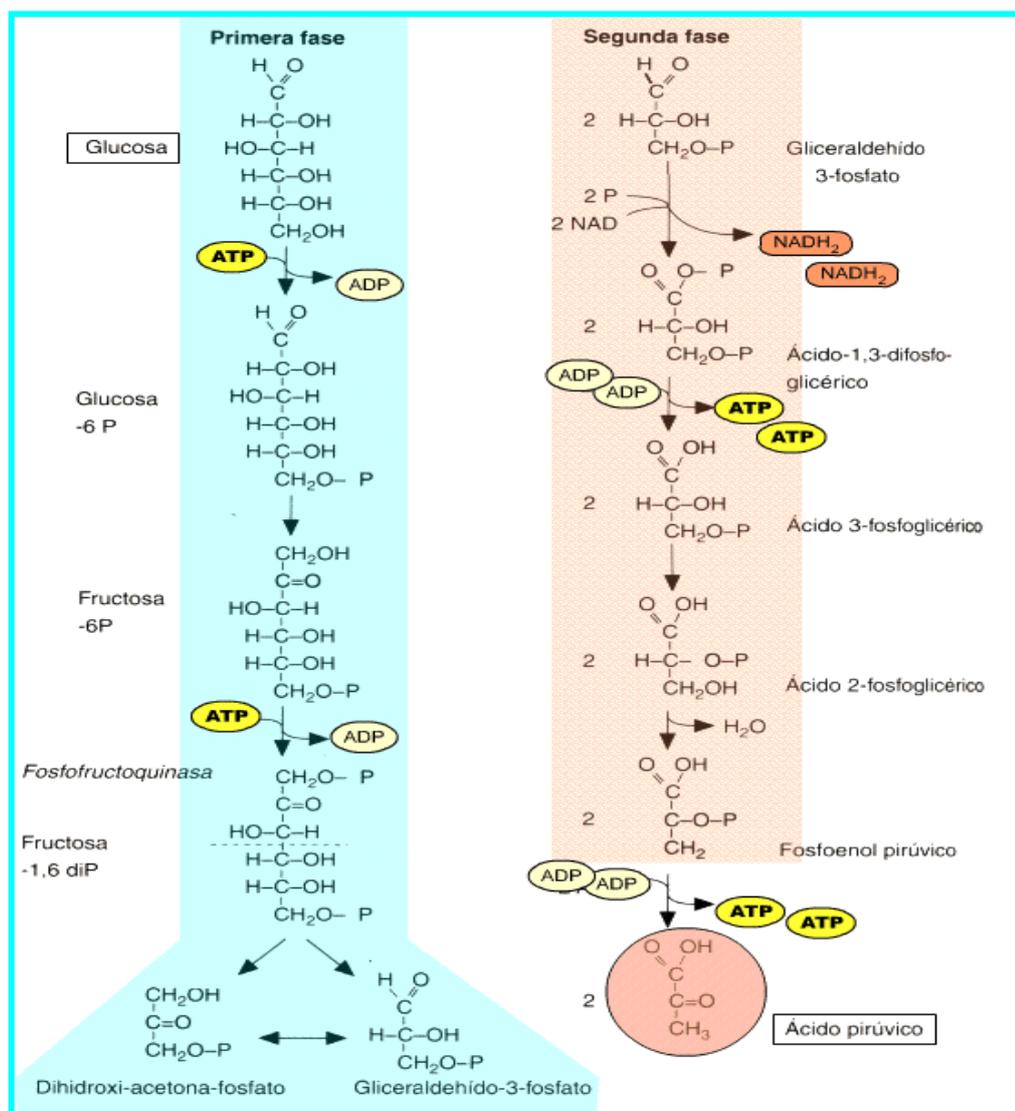
La glucólisis que consta de 10 reacciones, sucede en dos fases:

- 1) La glucosa se fosforila dos veces y se fracciona para formar dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato (G-3-P). Las dos moléculas de ATP que se consumen durante

esta fase son como una inversión, debido a que ésta etapa crea los sustratos reales de la oxidación en una forma que está atrapada dentro de la célula.

2) El Gliceraldehido-3-fosfato se convierte en piruvato. Se producen cuatro moléculas de ATP y dos de NADH. Debido a que se han consumido dos ATP en la primera fase, la producción neta de moléculas de TAP por molécula de glucosa es dos (McKee T. & McKee J., 2014).

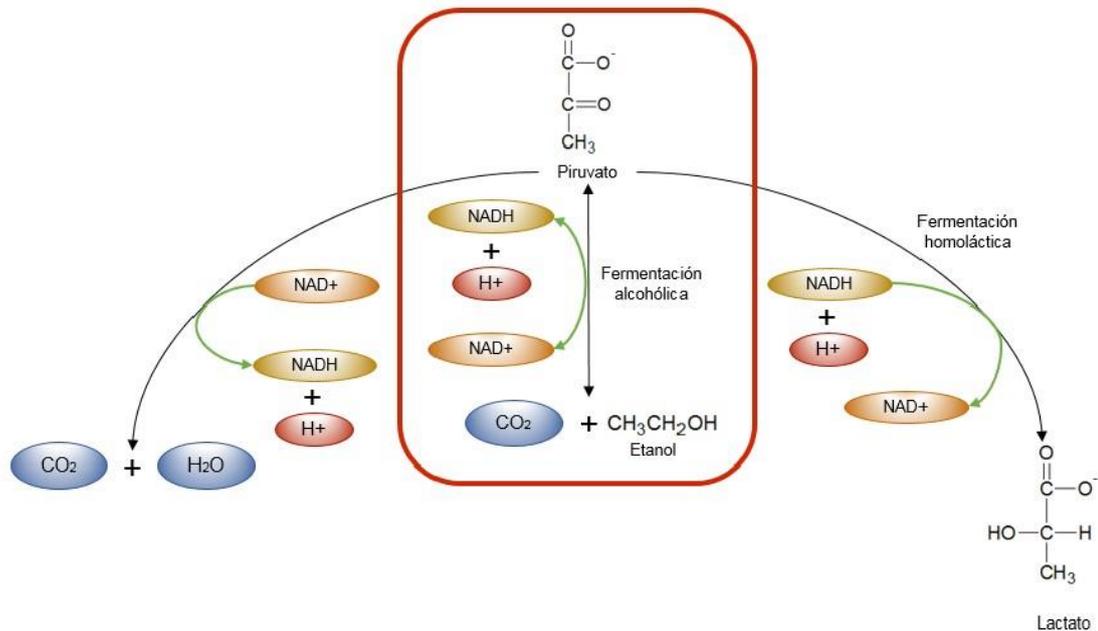
Figura N° 5. Ruta Embden-Meyerhof-Parnas (glicolisis)



Fuente: (Gómez G.J. y C. Nieto., 2002).

En condiciones anaerobias se impide la oxidación posterior del piruvato. Un gran número de células y de organismos lo compensan convirtiendo esta molécula en un compuesto orgánico más reducido y regenerando el NAD⁺ que se requiere para que continúe la glucólisis (Figura N°6). Este proceso de regeneración del NAD⁺ se denomina fermentación (McKee T. & McKee J., 2014).

Figura N° 6. Ruta de la fermentación alcohólica.



Fuente: (McKee & McKee, 2014).

De manera general, la producción de etanol a partir de piruvato está definida por la siguiente ecuación:



3.8. Parámetros a controlar en el proceso de fermentación alcohólica.

La fermentación alcohólica es una de las etapas principales que transforman el mosto o zumo azucarado, en un líquido con un determinado contenido de alcohol etílico. Dura, aproximadamente una semana, a una temperatura de 20 °C, y se traduce por una disminución del mosto” (Vincent et al., 2006).

Esto implica que una vez que la materia prima tiene contacto con un sustrato rico en nutrientes, azúcares u otro componente que sea iniciador de proceso de fermentación; se producirá un líquido conteniendo alcohol. (Reyes K., 2014).

El éxito de una buena fermentación depende de la eficacia del tratamiento preliminar: concentración del azúcar, pH y temperatura óptimos; la adición de sustancias nutritivas al mosto, contaminación por otros microorganismos, empleo de un organismo resistente a altas concentraciones de alcohol, mantenimiento de condiciones anaerobias y la inmediata destilación del producto fermentado (Prescott S., C. Gordon. 1992).

a) Temperatura.

Es uno de los factores más importantes al momento de realizar cualquier reacción, especialmente si estas vienen dadas por microorganismos, ya que estos tienen un rango específico de temperatura para que sea posible su crecimiento. (Acosta Romero, C. 2012).

La temperatura durante la fermentación debe controlarse ya que durante la misma se produce un relativo aumento de esta, pues la descomposición de los azúcares produce una reacción exotérmica es decir con desprendimiento de calor. La temperatura óptima para la fermentación oscila entre 24 y 32°C siendo 27°C la más adecuada. Si la temperatura es muy baja la fermentación es lenta, si la temperatura excede de los 35°C disminuye la acción de los microorganismos y si esta aumenta por encima de los 40°C esta se puede detener. (Guzmán R. 2013).

b) pH.

El pH tiene una gran influencia en los productos finales del metabolismo anaerobio, por lo tanto es importante tener un control sobre esta variable durante el desarrollo del proceso de fermentación puesto que los microorganismos poseen un pH óptimo en el cual tienen mayor velocidad de crecimiento y rendimiento. (Arimuya Manamu S. M. y E. R. Tecco Pisco, 2014).

c) Nutrientes.

Un medio de cultivo debe de tener todos los elementos necesarios para el crecimiento microbiano, para esto se debe tener en cuenta los requerimientos nutricionales del microorganismo con el cual se va a trabajar. (Garzón C. S., y C. Hernández Londoño.

2009).

d) Aireación.

La ausencia o presencia de oxígeno permite una selección tanto del microorganismo como de los productos del mismo. Cuando el cultivo se realiza en presencia de oxígeno la fermentación se denomina aeróbica y cuando este carece de oxígeno se denomina anaeróbica. Si la fermentación es anaeróbica, la mayor parte del carbono se emplea como energía y solo el 2 % se asimila como material celular. (Ramírez N. y J. Pedroza, J. 2001).

Saccharomyces cerevisiae es una levadura que posee alta actividad metabólica, por lo que en un proceso fermentativo en fase aerobia se caracteriza por la producción de biomasa y en fase anaeróbica generalmente por la producción de etanol. (Arimuya M. y E. Tecco Pisco 2014).

e) Productividad.

La productividad se define como la producción de biomasa por unidad de volumen, por unidad de tiempo de cultivo, dado en concentración de biomasa (g/L) en función de tiempo (hr.).

3.9. Limitantes de la fermentación alcohólica.

a) Concentración de alcohol.

Las levaduras, presentan cierta resistencia a las concentraciones de alcohol que se producen durante la fermentación, debido a que el etanol, inhibe el transporte de Dxilosa, amonio, glicina y algunos aminoácidos, así como afecta la función y estabilidad de algunas enzimas citoplasmáticas como la hexoquinasa, debido a que a concentraciones críticas de etanol, se presenta la formación de un complejo hexoquinasa-etanol el cual puede detener la reacción glucosa a glucosa-6 fosfato. En conclusión la tolerancia al alcohol depende de la habilidad de la célula para exportar el etanol del interior al medio externo, un proceso que depende de la composición de la membrana y de la fluidez de la misma La célula modifica la composición en ácidos grasos de la membrana para minimizar los efectos de la fluidez que produce el etanol, de la misma manera la adaptación de las levaduras al etanol también obedece a una modificación de la

composición lipídica de las membranas debido básicamente a un enriquecimiento de las mismas en esteroides y ácido grasos de cadena larga, de esta manera para las levaduras poder adaptarse a altas concentraciones de alcohol debe existir un aumento del contenido de ácidos grasos insaturados con respecto a los saturados y un aumento en la longitud de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos (Tomasso M. 2004).

b) Acidez del sustrato.

El pH es un factor limitante en el proceso de la fermentación debido a que las levaduras se ven afectadas por el ambiente en el cual se desarrollan es decir alcalino o ácido. Las levaduras tienen rango óptimo de pH que va desde 3.5 hasta 5.5. En el proceso de fermentación, el pH tiende a disminuir debido a la producción de ácidos, formados al tomar los nitrógenos de los aminoácidos perdiendo su carácter anfótero. En los procesos industriales, se hace uso de soluciones tampón para mantener niveles óptimos de acidez (Ríos, *et al* 2005).

c) Concentración de Azúcares.

Las concentraciones altas de azúcares afectan los procesos de osmosis dentro de la membrana celular, el rango óptimo de concentración de azúcar es de 10 a 18%, puesto que a concentraciones de 22% las levaduras empiezan a tener problemas en su proceso de respiración celular (Ríos, *et al* 2005).

d) Temperatura.

La temperatura a la que se lleva a cabo la fermentación alcohólica afecta: (i) al crecimiento de las levaduras y por tanto a la duración de la fermentación, (ii) a la contribución que las diferentes especies de levaduras tienen en la fermentación y (iii) al metabolismo de las levaduras, que es el que determina la composición química y organoléptica del vino (Torija M. *et al.*, 2002).

Las levaduras son microorganismo mesófilos, por lo tanto su temperatura no puede sobrepasar a 50°C, puesto que a esta temperatura o temperaturas superiores se produce su muerte. Por lo tanto debido a que la fermentación es un proceso exotérmico, se debe mantener en el mismo un control de temperatura para mantener la temperatura en su valor óptimo que es de 30 °C.

e) Ritmo de crecimiento de las cepas.

Durante la fermentación las cepas crecen en número debido a las condiciones favorables que se presentan en el medio, esto hace que se incremente la concentración de levaduras.

Microorganismos

En aras de la obtención de etanol, se pretende impulsar las vías biotecnológicas empleando levaduras y hongos que además pueden ser microorganismos nativos o genéticamente modificados (tabla 21, anexo 1), cuyas rutas metabólicas convierten diferentes sustratos orgánicos en etanol (Triana Caranton, 2010).

Por otra parte, los microorganismos pueden clasificarse según su necesidad de oxígeno: existen los aerobios estrictos (que llevan a cabo su metabolismo únicamente en presencia de oxígeno atmosférico), también están los anaerobios estrictos (que únicamente pueden crecer en ausencia de oxígeno) y los organismos facultativos (que pueden crecer en situaciones de aerobiosis y de anaerobiosis (Madigan, M.T, Martinko, J.M.. Brock. 2009), en estos últimos se clasifican las levaduras industriales y por supuesto las levaduras alcohólicas (Ward O., 1991).

Estos microorganismos pueden ser cepas naturales que metabolizan azúcares de seis carbonos, cepas naturales que consuman tanto azúcares de seis como de cinco carbonos, microorganismos modificados genéticamente con la finalidad de aprovechar todo el sustrato presente en el medio o un cultivo mixto para realizar una co.fermentación (Bellido C., 2013).

Los cultivos microbianos utilizados en la fermentación deben tener las siguientes características: tolerancia al etanol, a las altas temperaturas, a altas concentraciones de azúcar, rendimiento alcohólico, eficiencia en la fermentación y productividad.

(Zuzuarregui Miró A. 2005).

Microorganismos utilizados en la fermentación alcohólica

La levadura es la fuente principal para empezar la incubación, multiplicación de las células encargadas de transformar todo el azúcar contenido en la melaza en alcohol dentro del proceso de fermentación (Gilces, 2006).

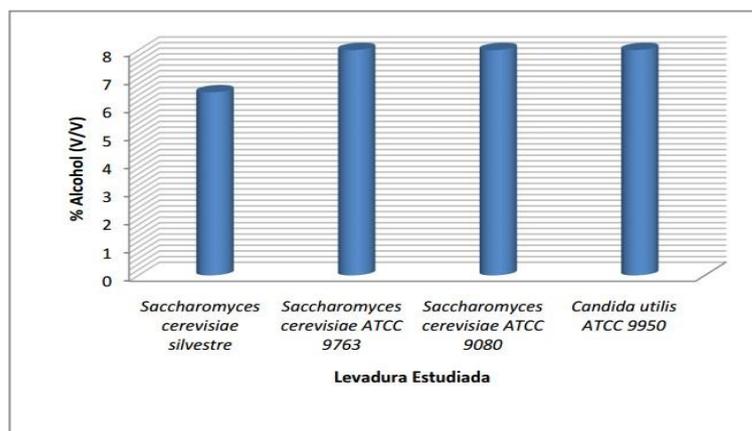
Las levaduras son los microorganismos más utilizados para la producción de etanol por la vía fermentativa, debido a su alta productividad en la conversión de azúcares a bioetanol y a que se separan mejor después de la fermentación. (Zambrano B., 2013). Además, la producción de toxinas es muy inferior a la de otros microorganismos. Entre las especies más utilizadas están: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. ellipsoideus*, *S. anamensis*, *Candida seudotropicalis*, *S. carlsbergensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida bytyrii*, *Pichia stipitis*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Pichia membranaefaciens*. (Frazier, W. C. y Westhoff D. C. 2000).

Las principales responsables de esta degradación son las levaduras. *Saccharomyces cerevisiae*, es la especie de levadura usada con mayor frecuencia, pero existen diversos estudios que comprueban la producción de alcohol por otros tipos de levaduras y algunas bacterias como *Zymomona mobilis*, pero su explotación a nivel industrial es mínima (Vázquez y Dacosta, 2007).

S. cerevisiae es la levadura más ampliamente utilizada en las fermentaciones industriales, metaboliza los azúcares: sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa y maltotriosa en distinto orden. La sacarosa debe ser primero hidrolizada por la invertasa localizada en el espacio periplásmico extracelular. Desgraciadamente, *S. cerevisiae* es incapaz de hidrolizar el almidón e incluso las dextrinas, es necesario efectuar un pretratamiento de hidrolisis con enzimas bacterianas para que *S. cerevisiae* pueda transformar los oligosacáridos obtenidos en etanol, (Casp A. & J. Abril, 2003).

Las cepas *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 , ATCC 9080 y *Candida utilis* ATCC 9950 presentaron un porcentaje de alcohol del 8 % (V/V), mientras que la 18 *Saccharomyces cerevisiae* silvestre mostro un porcentaje del 6,5 % (V/V) a la concentración de 250 g/L; el etanol obtenido fue cuantificado por alcoholimetría y cualificado por cromatografía de gases. (Garzón C. y Hernández L. 2009). Figura N°7.

Figura N°7. Comparación % etanol obtenido para cada una de las levaduras estudiadas.



Fuente: (Garzón C. y Hernández L. 2009).

Saccharomyces cerevisiae

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* son hongos unicelulares eucarióticos, heterótrofos, osmotróficos (no ingieren sus alimentos lo absorben por digestión externa del sustrato empleando exoenzimas) se reproducen por gemación. (Frazier, W. C. y Westhoff D. C. 2000).

CUADRO N° 6. Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Reino	Hongo
División	Amastogomycota
Clase	Ascomycetes
Subclase	Hemiascomycetidae
Orden	Endomycetales
Familia	Sacchaomycetaceae
Subfamilia	Saccharomycetidae
Género	<i>Saccharomyces</i>
Especie	<i>cerevisiae</i>

Fuente: (Nieto H., 2009).

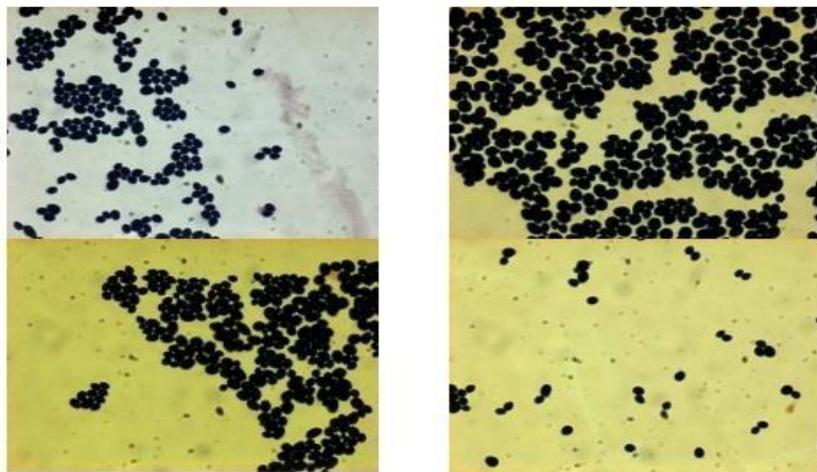
Saccharomyces cerevisiae es la especie de levaduras utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial puesto que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo (Martínez T. 2002). Tolerancia a altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas

concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior (Fajardo y Sarmiento, 2008). Una célula de una levadura de cerveza típica tiene, cuando se halla completamente desarrollada entre 8 y 14µm de diámetro y una masa de materia seca de aproximadamente 40pg.

La levadura ***Saccharomyces cerevisiae***, es la especie de mayor uso en la industria de vinos y cerveza. Se describe normalmente como un anaerobio facultativo, de modo que crece tanto en condiciones anaerobias como aeróbicas, es capaz de emplear un amplio rango de sustratos entre mono-, di- y oligo-sacáridos, así como etanol, acetato, glicerol y hasta lactatos; siendo la glucosa su fuente de carbón preferida (Drapcho, C. *et al.* 2008).

Sus dimensiones son: 2.5-10 micras de ancho y 4.5-21 micras de largo. Microscópicamente se observan redondas y ovoides, elipsoides a veces cilíndricas y filamentosas. La aireación óptima es de 0.6-0.9vvm (Fajardo y Sarmiento, 2008).

Figura N°8. Imágenes de una misma preparación de levaduras tras una tinción de Gram (630 X aumentos). Vistas en el microscopio óptico con campo claro (AXIOSKOP 2 plus, Hal 100, Zeiss)



Fuente: Gonzales Lázaro M. 2014

Como se puede observar en la Figura N° , las levaduras tienen una forma ovalada, siendo en algunos casos redondeadas, se las ve en algunos casos en proceso de gemación. (Gonzales Lázaro M. 2014).

Las levaduras del género *Saccharomyces* (principalmente *S. cerevisiae*) son los microorganismos responsables de la producción de las bebidas alcohólicas, ya que fermentan y asimilan la glucosa y, normalmente, la sacarosa, la maltosa y la galactosa. (Cuadro N° 7). (Hernández, S. & Martínez, C., 2012). No fermenta rafinosa, trehalosa ni lactosa. (Gonzales Lázaro M., 2014).

Cuadro N°7. Carbohidratos fermentables por *Saccharomyces cerevisiae*

Fermentación	
Glucosa	+
Galactosa	+
Sacarosa	+
Maltosa	+
Lactosa	-
Rafinosa	1/3

Fuente: Hernández, S. & Martínez, C. (2012).

a. Requerimientos nutricionales:

Saccharomyces cerevisiae requiere ciertos nutrientes y condiciones ambientales para su apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son básicamente necesarios como por ejemplo carbono, hidrogeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo. El carbono sirve como fuente de energía y como material constitutivo de la masa celular. El nitrógeno se encuentra en la célula formando parte esencial de las proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos; el fósforo se encuentra en los ácidos nucleicos en la lecitina y en diversos compuestos fosforilados que participan activamente en los procesos de degradación oxidativa y de intercambio energético (ATP, ADP, AMP, NADP). Para que las fuentes de nitrógeno, fósforo y carbono presentes en el sustrato

sean aprovechados por la levadura se requiere que se encuentren en forma asimilable (Fajardo y Sarmiento, 2008).

En condiciones aeróbicas la levadura necesita para su crecimiento las siguientes vitaminas: pantotenato de calcio, piridoxina, tiamina y biotina. En condiciones anaeróbicas con presencia de inositol tiene un crecimiento óptimo. (Gonzales Lázaro M. 2014).

c) Requerimientos fisicoquímicos.

El crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se ve favorecido por un pH aproximado de 4.0 a 5.0 y no se desarrollan bien en medio alcalinos a menos que se hayan adaptado al mismo. A pesar de la tolerancia bastante amplia de esta para las variaciones de pH a partir de los sustratos habitualmente usados en los medios de cultivo forman productos en especial ácidos que influyen en el crecimiento celular, producción enzimática y utilización de glucosa. Así por ejemplo, algunas investigaciones han observado que con un pH inicial del medio a valores entre 4.0 y 4.5 se obtiene mejor crecimiento (Fajardo y Sarmiento 2008).

Saccharomyces cerevisiae es una levadura catalogada como acidofila, el pH de crecimiento ronda de entre 4-7, aunque a valores de 8-9 puede fermentar metabolitos considerados por la vía metabólica glicérica. A pH de 7 aumenta la formación de biomasa y disminuye el proceso fermentativo de producción de etanol por vía de EMP. A pH ligeramente ácidos se ve favorecida la ruta metabólica EMP para fermentación alcohólica. (Hernández, S. & Martínez, C. 2012).

DESTILACIÓN

La destilación es una operación unitaria, es uno de los métodos más utilizados para separar y purificar líquidos. El objetivo principal de este proceso es aprovechar las diferentes volatilidades de los componentes presentes en una mezcla y separar los volátiles de los no volátiles. La efectividad de esta operación unitaria depende de la cantidad de la muestra, el equipo de destilación que se utilice, la formación de azeótropos, entre otros (Angulo Valencia, A., 2010).

El objetivo consiste básicamente en separar el etanol del agua. El etanol es una sustancia más volátil que el agua, pues su presión de vapor es menor, por tanto cualquier par de sustancias que no tengan tensiones de vapor idénticas en todo el intervalo de temperaturas pueden separarse por destilación. A presión atmosférica las

temperaturas de ebullición son 78,2 °C y 100 °C para el etanol y el agua respectivamente, se considera que para realizar una destilación sencilla la diferencia entre puntos de ebullición debe ser de unos 70 a 80 °C, por tanto la destilación de la mezcla etanol agua se realiza por destilaciones sencillas repetidas. Este proceso va obteniendo un vapor que es cada vez más rico en el componente más volátil; el etanol, este se vuelve a destilar y así sucesivamente el líquido se va enriqueciendo en etanol. (Arimuya M. y E. Tecco Pisco 2014).

Entre los principales tipos de destilación se consideran:

- a. Destilación Flash o de Equilibrio:** esta destilación ocurre en una sola etapa, se caracteriza porque la mezcla líquida se vaporiza parcialmente, luego se establece un equilibrio entre la fase líquida y la de vapor, para luego separarse. Este tipo de destilación no es muy recomendable para separación de componentes de volatilidades parecidas. (Gallinar Tercero; A. G., 2015).
- b. Destilación Simple por lotes o diferencial:** esta destilación es la que se realiza generalmente en laboratorios cuando no se tiene un sistema de reflujo, el vapor que se produce va directamente hacia un condensador. La destilación simple se realiza calentando la mezcla líquida inicial hasta su punto de ebullición; en el líquido a medida que pasa el tiempo va disminuyendo la concentración de los componentes más volátiles (Angulo Valencia, A., 2010).
- c. Destilación simple con arrastre de vapor:** cuando los líquidos tienen un punto de ebullición muy alto no se puede destilar a presión atmosférica, puesto que la temperatura necesaria para esta separación no se alcanza con un montaje de destilación simple. La mayoría de sustancias de alto punto de ebullición son insolubles en agua, el arrastre de vapor permite que se alcance la separación a temperaturas bajas. (Gallinar Tercero; A. G., 2015).

Sólidos Solubles (°BRIX).

En esta prueba se mide la cantidad de elementos solubles presentes en la muestra, mediante la refractometría, la cual está dada por la desviación de ángulo luminoso, los azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes hacen parte de estos elementos solubles. La concentración en sólidos solubles de una solución se expresa en grados Brix. Originariamente, los grados Brix son una medida de densidad. Un grado Brix es la densidad que tiene, a 20° C, una solución de sacarosa al 1 %, y a esta concentración corresponde también un determinado índice de refracción.

Como los sólidos no son solamente sacarosa, sino que hay otros azúcares, ácidos y sales, un grado Brix no equivale a una concentración de sólidos disueltos de 1g/10ml. Los grados Brix son, por tanto, un índice comercial, aproximado, de esta concentración que se acepta convencionalmente como si todos los sólidos disueltos fueran sacarosa.

2.1.1. Estudios relacionados a la Investigación

Los residuos sólidos han ocasionado impactos ambientales negativos por su disposición inadecuada y porque cada vez son más, asunto asociado al incremento de la población humana, a los procesos de transformación industrial (globalización), y a los hábitos de consumo de los individuos. (Jaramillo G. y L. Zapata, 2008).

Desde hace varias décadas los residuos agroindustriales han sido un foco de atención para varios investigadores a nivel mundial, debido a que parte de sus constituyentes pueden ser materia prima para generar diversos productos de interés, esta situación sigue prevaleciendo en la actualidad y se prevé que continuará en el futuro. (Saval S. 2012).

En Costa Rica, López C., M. Molina y A. Huguet (2004), evaluaron la producción de etanol por fermentación a partir de cuatro sustratos diferentes preparados por hidrólisis de banano maduro. Dichos sustratos fueron la pulpa, la fruta completa, el jugo de la pulpa y el jugo de la fruta. Para la hidrólisis de la pulpa y de la fruta se probaron dos grupos de enzimas: a) -amilasas, -amiloglucosidasas y b) pectinasas. Se encontró que la hidrólisis con pectinasas es la que genera mayores rendimientos de jugo, con el menor consumo energético. En la fermentación se estudió la producción de etanol para ser utilizado como combustible, considerando como variables de diseño el tipo de sustrato, el tiempo de fermentación, la concentración inicial de *S. cerevisiae* y la tasa de dilución del sustrato. Además, se dio seguimiento cinético a la fermentación en un volumen de 5 L durante 35 h. Los rendimientos de etanol más altos se obtuvieron mediante la fermentación de los sustratos de pulpa y fruta. El rendimiento máximo fue de 0,0742 L de etanol/kg de banano de la fruta completa.

En Colombia Monsalve G., J., Medina de Pérez, V., & Ruiz Colorado, A. (2006) evaluaron la hidrólisis ácida del almidón presente en yuca y de la celulosa presente en cáscara de banano y su posterior fermentación a etanol, se ajustaron los medios de fermentación para los microorganismos *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-2034 y *Zymomonas mobilis* CP4. Se caracterizó la cáscara de banano, la cual posee un

contenido de almidón, celulosa y hemicelulosa que representan más del 80 % de la cáscara ameritando el estudio de ésta como fuente de carbono. Reportaron que la hidrólisis ácida de cascara de banano produce 20 g/l de azúcares reductores. Para la Yuca con 170 g/l de almidón a; pH 0.8 en 5 horas se logra conversión completa a azúcares reductores y no se nota ningún efecto inhibitorio por parte de los cultivos realizados con cáscara de banano y yuca por la presencia de cianuro en la yuca y por la formación de compuestos tóxicos al hidrolizar la celulosa en banano. Para la fermentación realizada con *Sacharomyces cerevisiae* se logra una concentración de etanol de $7.92 \pm 0.31\%$ y no se aprecia una producción considerable de etanol (menor de 0.1 g/l) para ninguno de los medios fermentados con *Zymomonas mobilis*.

En México, Gil-Horán *et. al.*, (2008), realizaron una investigación que tuvo como objetivo proponer un proceso para la obtención de ácido láctico a partir de la biotransformación de cáscara y bagazo de naranja en fase sólida con *Rhizopus oryzae*. Como producto se obtiene un concentrado que cumple con el estándar del Código Químico de Alimentos (FCC, *Food Chemical Codex*) en grado alimenticio. Se evaluaron tres técnicas de separación sólido-líquido (prensado mecánico, centrifugación y filtración al vacío), al mismo tiempo que se determinó la máxima cantidad necesaria de agua para llevar a cabo la extracción del ácido láctico presente en el sólido biotransformado. Posteriormente, evaluó la viabilidad técnica de utilizar operaciones de intercambio iónico como pasos intermedios para la reducción de impurezas. Asimismo, se evaluaron y compararon dos procesos: (a) Esterificación del ácido láctico con 1-butanol y (b) Cristalización evaporativa de sales de sulfato de calcio, como posibles rutas de separación secundaria y concentración. Los resultados experimentales permitieron generar una hoja de proceso para llevar a cabo balances de materia y energía teóricos usando el programa *SuperPro Designer*® 6.0, apoyándose con los paquetes *Aspen Plus* y *Aspen Split*® 11.1 para la estimación de propiedades físicas y termodinámicas, así como del equilibrio de fases en las diferentes unidades del proceso. Dicha simulación permitió identificar que una planta con capacidad de procesamiento de 400 ton/año de cáscara de naranja con 12% p/p de humedad puede transformar los desechos de una planta de jugo de tamaño medio con una producción de 5.5 ton/año de solución de ácido láctico al 36% en masa.

En Colombia, Tejeda L. (2010), realizó un trabajo cuyo objetivo fue obtener bioetanol a partir de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*) y piña (*Ananás sativus*). Se determinó el contenido de azúcares reductores de los materiales lignocelulósicos. Mediante un

pretratamiento físico se redujo el tamaño de las muestras y, la remoción de lignina se realizó con hidróxido de sodio y sulfato de calcio. La hidrólisis ácida se llevó a cabo con ácido sulfúrico al 5% a 125°C y 15 psi para obtener un jarabe azucarado. Este jarabe fue fermentado con *Saccharomyces cerevisiae* en un reactor con agitación durante 7 horas. El etanol obtenido fue separado por microdestilación. Se determinó el contenido de etanol por cromatografía de gases y se encontró, finalmente, que con las cáscaras de naranja se obtuvo mayor contenido de etanol, 8.4 mg/g, que con las cáscaras de piña, 1.0 mg/g.

En Costa Rica, Araya-Cloutier C. (2010), realizó una investigación que tuvo como objetivo evaluar el potencial de un desecho agroindustrial de piña para su utilización en la producción de ácido láctico por fermentación, utilizando *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus*. Se realizaron fermentaciones del sustrato de piña como tal e hidrolizado enzimáticamente con invertasa. El tratamiento enzimático permitió aumentar el rendimiento de 84 a 98% (m/m) y la concentración de ácido láctico de 64 a 75 g/L, al obtenerse un consumo total de los azúcares presentes en el medio hidrolizado, en comparación con la fermentación del medio sin hidrólisis que presentó una concentración residual de sacarosa de 15 g/L. La productividad total del proceso de fermentación del medio sin hidrólisis fue de 5,4 g/h de ácido láctico, mientras que la fermentación del medio invertido obtuvo una productividad menor de 4,3 g/h; esto producto del aumento en el tiempo total de fermentación de 35 a 40h al hidrolizar la sacarosa. La productividad máxima disminuyó de 5,5 a 3,9 g/L.h de ácido láctico, al realizar el tratamiento enzimático. Debido a la alta eficiencia obtenida en la conversión de los azúcares en ácido láctico, la hidrólisis enzimática del medio es la mejor opción para obtener una concentración mayor de este compuesto y para su potencial aplicación en la producción de plásticos biodegradables.

En México, Antonio Cruz R. *et al.* (2011), realizaron un estudio con el objetivo fue obtener celulosa y bio-etanol del bagazo de piña (desecho agrícola). La finalidad fue estudiar un proceso para extraer celulosa del bagazo de piña, y mediante hidrólisis ácida de celulosa y bagazo se obtuvo glucosa. Esta glucosa se neutralizó a pH de 5 y se realizó la fermentación en un medio anaeróbico, utilizando el microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*, variando tiempos de fermentación (36, 40, 48 y 72 h) y manteniendo la temperatura a 30°C. La celulosa obtenida presentó una conversión del 60% y mediante FTIR se corroboró que la celulosa fue tipo II. Se obtuvo bio-etanol mediante destilación,

presentando un rendimiento del 35% con bagazo y del 57% con celulosa con un tiempo de fermentación de 48 y 72 h, respectivamente.

En el Salvador, Hernández D. y C. Martínez (2012), en su trabajo de tesis, tiene como objetivo general "Obtención de etanol por vía fermentativa a partir de cáscaras de *Ananas comosus* (piña) evaluando dos de sus principales variables (pH y grados Bríx), usando como microorganismo productor *Saccharomyces cerevisiae*". Los aportes de esta investigación se fundamentan principalmente en las condiciones óptimas a las cuales se obtienen los mejores resultados de fermentación. Siendo estos: el mayor pH para producción de etanol es 4, los grados Brix óptimos son 20, el mayor tiempo de fermentación ronda las 72 horas con un 24 % de rendimiento y un grado alcohólico de 50; fuera de estos parámetros la calidad se ve sacrificada.

En Colombia, Dubán González Á. (2013) realizó un trabajo que trata de sustentar conceptual y metodológicamente la importancia de aprovechar los residuos orgánicos generados en una Central de Abastos para obtener productos intermedios de alto valor agregado que serán utilizados bajo un concepto denominado "producción de alimentos funcionales desde la nutrición animal". De esta forma, expone la importancia de los ingredientes bioactivos presentes en la dieta y su relación con la salud humana, abordando la información disponible actualmente para producir alimentos funcionales y finalmente mostrando un panorama general de cómo incorporar sustancias bioactivas provenientes de residuos agroindustriales en la dieta animal y su impacto en la calidad de los productos derivados para consumo humano.

En México, Jiménez B. (2014) realizó un trabajo cuyo objetivo fue obtener fue la producción de carbón activado (CA) a partir de los residuos celulósicos de la piña (*Ananas comosus L.*), cáscara y corona, mediante su activación química utilizando como agente activante ácido fosfórico. La experimentación se llevó a cabo en dos etapas. La primera etapa consistió en la activación química de los residuos de piña, variando el volumen de agente activante (10 y 30 ml) y la temperatura de pirólisis (500, 550 y 600 °C), para posteriormente ser neutralizados y acondicionados. En la segunda etapa se evaluó la capacidad de adsorción de los CA mediante la técnica de la capacidad de adsorción del azul de metileno, a partir de una solución de 100 ppm de concentración. Los resultados obtenidos muestran un rendimiento en CA entre 5.50% (corona, 10 ml de ácido fosfórico, 500 °C) y 11.50% (cáscara, 30 ml de ácido fosfórico, 550 °C). Por otro lado, la capacidad de remoción del azul de metileno fue superior al 90% para todos

los CA obtenidos. Esta capacidad de remoción corresponde a las características de adsorción de los carbones denominados mesoporosos. Por lo tanto, se demuestra que sí es posible obtener carbón activado a partir de residuos celulósicos de piña con una buena capacidad de adsorción, siendo una alternativa para disminuir el impacto ambiental generado por estos residuos agroindustriales.

En Colombia, Duque Quinaya S. (2014), realizó un trabajo que tuvo como objetivo evaluar la posibilidad de producir glucosa a nivel industrial considerando varias escalas de producción (1, 5 y 26 toneladas mensuales), se consideró la evaluación con base a características fundamentales para entender completamente el proceso y se consignaron en 8 capítulos que consideran: La logística, Experimentación y pilotaje, Adecuación, Transformación, separación, evaluación de la cáscara, evaluación económica, Impacto ambiental. Se desarrollaron tanto simulaciones como evaluaciones matemáticas de los equipos, y requerimientos necesarios para el desarrollo del proceso. Como resultados se encontraron costos de proceso de 2329 pesos por kg, ingresos promedios de mil millones de pesos anuales para una escala de 26 toneladas, posibilidad de generar 17 empleos directos con apoyo a 38 asociaciones. Además se encontró que Manizales era la mejor ubicación para la planta, el proceso puede producir también 840 kg/mes de ácido glutámico. El rendimiento final de producción de glucosa obtenido fue de 226 kg de glucosa por tonelada de plátano. Al final se obtuvo un proceso con tecnologías simples para obtener un producto multi-transformable de valor agregado como base para una biorefinería.

En México, González-Sánchez M. *et. al.*, (2015), realizaron un trabajo que tuvo como objetivo estudiar la biodegradabilidad, la producción de metano y el comportamiento de poblaciones de eubacterias y arqueobacterias durante la digestión anaerobia de residuos de plátano, mango y papaya provenientes de la agroindustria, adicionando un inóculo microbiano. Los residuos de mango y plátano tenían mayor contenido de materia orgánica (94 y 75 %, respectivamente) que el residuo de papaya con base en su relación sólidos volátiles/sólidos totales. Después de 63 días de tratamiento, la mayor producción de metano se observó en la digestión anaerobia del residuo de plátano: 63,89 ml de metano por g de demanda química de oxígeno del residuo. Los resultados del potencial bioquímico de metano demostraron que el residuo de plátano tiene el mejor potencial para ser usado como materia prima en la producción de metano. A través de un análisis por PCR-DGGE con oligonucleótidos específicos se logró evaluar el tamaño y la composición de las poblaciones de eubacterias y arqueobacterias presentes en la digestión anaerobia de residuos agroindustriales a lo largo del proceso.

En Ecuador, Mitis Madroñero H. (2015), realizó un trabajo que tuvo como objetivo la evaluación del proceso de extracción de etanol a partir de: *Ananas comosus* (Piña), *Citrus reticulata* (Naranja) y *Musa paradisiaca* (Banano) e indica que hay factores que pueden influir en su proceso de obtención como son el tipo de fruta en el proceso fermentativo que puede influir en la calidad y cantidad del producto final, el contenido de °Brix del mosto por lo que son azúcares, se convierten en alcohol durante la fermentación. Señala que a medida que los grados Brix disminuyen, la cantidad de alcohol en líquido aumenta y que la relación agua – jugo, y jugo puro influyen en el rendimiento de contenido de alcohol.

En Colombia, Santos A. y D. Zabala (2016), evaluaron la viabilidad de obtener alcohol a partir de los residuos orgánicos que se generan en la empresa Alimentos SAS S.A.S. realizando la experimentación con los residuos de limón, lulo, maracuyá, mango y mora, teniendo en cuenta la composición química de cada uno de ellos. Con el objetivo de seleccionar los residuos se realizó una matriz de selección, la cual pasó por dos condiciones de evaluación, la primera relacionaba la cantidad de residuos que produce cada una de las frutas y la frecuencia con que se generan estos residuos. La segunda condición relacionaba variables químicas (sólidos totales y pH), y de acuerdo con los resultados se seleccionaron los seis residuos mencionados anteriormente.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. UBICACIÓN.

- La realización del presente estudio de investigación se dio lugar en condiciones de laboratorio en las instalaciones de los laboratorios de la Universidad Le Cordon Bleu y de la Universidad Nacional del Callao.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Materiales

a. Materiales de vidrio y otros:

- Vasos de precipitado de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Probetas de 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Buretas de 25 y 50 ml.
- Pipetas volumétricas de 2, 5 y 10 ml.
- Recipientes pyrex
- Placas petri
- Luna de reloj

- Tubos de ensayo de vidrio (1,5 x 16,0 cm)
- Embudos de vidrio
- Termómetro de -10°C a 250°C
- Soporte Universal con pinzas
- Recipientes de porcelana
- Cuchillos de acero inoxidable.
- Lienzo de tela de nylon
- Frascos de vidrio
- Papel filtro Whatman N° 1 y N° 4
- papel pH indicador con escala
- Cocina eléctrica
- Espátulas
- Varilla de vidrio
- Pro-pipetas
- Cronómetro.
- Picetas
- Gradillas y otros.

b. MATERIAL BIOLÓGICO

- La obtención de las cascaras de piña se realizó a partir de cascaras de piña variedad Golden acopiada en puestos de jugos de frutas del pabellón de frutas y verduras, ubicados en el mercados de Lima y Callao. Durante el periodo del estudio se llegaron a utilizar 10 kilos de cascara de piña que permitieron obtener los mostos para la fermentación que se obtuvo durante los meses de marzo a octubre del presente en condiciones de laboratorio a temperatura ambiente.
- Para la fermentación alcohólica se utilizó levadura seca instantánea Fleischmann.

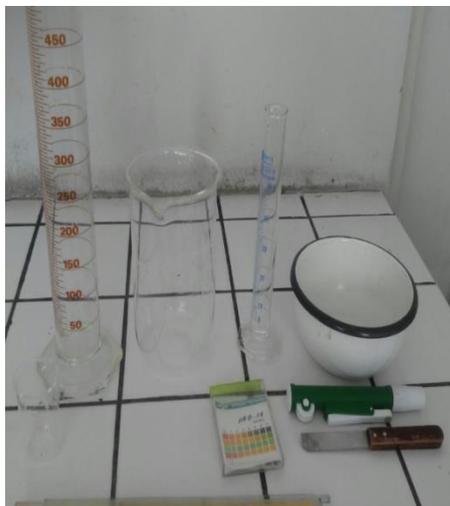
c. Reactivos

- Agua potable
- Agua destilada
- Hidróxido de sodio 0,1 y 1 N y al 5% □ Solución de ácido cítrico al 1% (w/v).
- Solución de Bicarbonato de sodio al 1%(w/v).
- Reactivo de Benedict
- Fosfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$
- Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Sulfato de zinc ZnSO_4
- Sulfato de manganeso MnSO_4
- Sulfato de magnesio MgSO_4

- Solución de fenolftaleína al 1%

3.2.2. Equipos

- Balanza de precisión DT-300A
- Balanza Analítica Adam
- Agitador magnético Fratom
- Refractómetro 0 - 32% Brix RHB-32/ATC
- Alcoholímetro a 20°C
- Equipo de destilación simple
- Medidor portátil de pH Hanna
- Estufa
- Incubadora
- Refrigeradora
- **MATERIALES Y REACTIVOS UTILIZADOS**





EQUIPOS





REACTIVOS



3.3. METODOS

La metodología seguida se basó en el conocimiento científico y tecnológico disponible. Para evaluar las variables de estudio se realizó los análisis en los laboratorios de la Universidad Le cordon Bleu y de la Universidad Nacional del Callao.

En el acondicionamiento se realizó el tratamiento y estandarización de las cascara de piña y la adición del sustrato (azucar/agua), 0,01% de levadura; una vez listo el mosto dulce a tres diferentes grados Brix (20, 23 y 25) y 3 niveles de pH (3,4 y 5) se inició el ciclo de fermentación durante 10 días, consecutivamente terminado este proceso se filtró y se realizó la destilación para su posterior determinación por alcoholimetría.

Recolección y conservación de la materia prima

Al ser la cascara de piña una materia prima orgánica, cuyos componentes son de fácil degradación se considera de gran importancia que su transporte sea en el menor tiempo posible y que se disponga de recipientes que aíslen el calor o que en su defecto, disminuyan el impacto de la luz sobre la cáscara. Adicionalmente, respecto a su conservación debe generarse condiciones aisladas para evitar contaminaciones y a

temperaturas no menores a 4°C para evitar su congelación, más en lo posible procurar su disposición inmediata a pretratamiento.

Durante el presente estudio de investigación se procedió en forma continua a realizar la primera etapa experimental de la investigación que consistía en el tratamiento y estandarización de las cascaras de piña y la preparación y estandarización del microorganismo productor (*Saccharomyces cerevisiae*) para las diferentes pruebas y análisis de la presente investigación.

Se realizó aplicando las modificaciones al proceso de producción de etanol que se realizó durante el primer, segundo y tercer trimestre de la investigación para obtener suficientes datos para la interpretación de los resultados y para corroborar los resultados obtenidos en la calidad del etanol a partir de cascara de piña.

Para llevar a cabo el presente trabajo, el estudio se segmentó en tres etapas. Se establecieron los métodos específicos para cada una de ellas, descritos a continuación:

ETAPA 1: Tratamiento y estandarización de las cascaras de piña.

Preparación y estandarización del microorganismo productor (*Saccharomyces cerevisiae*)

ETAPA 2: Proceso fermentativo de las cascaras de piña por *Saccharomyces cerevisiae*.

ETAPA 3: Caracterización final del mosto alcohólico.

El procedimiento completo desarrollado fue el siguiente:

1. Tratamiento y estandarización de las cascaras de piña

- Es necesario que las cascaras de piña sean seleccionadas descartando aquellas que presentaban daño causado por insectos o presencia de enfermedades.
- Se procedió luego al pesado de las cascaras de piña, y posterior lavado de la mismas con agua potable para eliminar las impurezas y tierra adherida en las cascaras.

- Los residuos de cascara de piña luego de ser seleccionados, fueron sometidos a un proceso de trozado fino, con el fin de disminuir el tamaño de la materia prima y así tener una mayor área de contacto entre el sustrato, la levadura y los reactivos químicos que se van a utilizar para facilitar la fermentación alcohólica que sigue el proceso.
- Luego las cascaras fueron sometidos a un tratamiento térmico en agua (proporción 1:2) a punto de ebullición durante 1 hora, para facilitar el desprendimiento de la lignina presente en estos y producir el ablandamiento de las cascaras. Para el mantenimiento de la temperatura del agua se utilizaron cocinas eléctricas como fuente de calor.
- Este procedimiento también permitía la muerte o eliminación de la flora microbiana acompañante no deseable en las cascaras de piña y preservar de esta manera el sustrato en buenas condiciones para su fermentación y evitar la competencia microbiana por los nutrientes del medio.
- Posteriormente se licuaron las cascaras de piña y se observó los °Brix iniciales con el fin de ajustarlos a los requeridos en el presente estudio.
- La medida de los grados °Brix iniciales se realizó mediante un Refractómetro de 0 - 32% Brix RHB-32/ATC, para ello se colocó la muestra en el foco del prisma, mirando por el ocular, dirigiéndose hacia la luz hasta visualizar una línea definida en el espacio de observación y se procedió a leer el índice de refracción en la escala superior.
- Posteriormente se filtraron.

2. Activación de la Levadura.

- En un vaso de precipitado se colocó 20 ml de agua estéril y 3 g. de azúcar, luego adicionamos y diluimos 0.4 g., de levadura (como lo reportan Arimuya M, y E. Tecco Pisco. 2014). Se utilizó levadura comercial seca instantánea.
- Homogenizamos la mezcla en el agitador magnético por 5 minutos.
- Cubrimos la mezcla y la dejamos reposar de 15 a 20 minutos a temperatura a 30°C en la incubadora.

3. Acondicionamiento del mosto al contenido de sólidos solubles del mosto (grado brix) de los tratamientos

- Se procedió a regular el filtrado de las cascara a los °Brix requeridos (20, 23 y 25°Brix)
- El Ajuste de los grados °Brix se realizó mediante la adición de azúcar hasta llegar a los °Brix requeridos tomando en consideración los grados Baume.
- Un grado Baumé equivale a 17 gramos por litro de azúcar o peso potencial del mosto que son conceptos equivalentes ya que 17 gramos de azúcar por litro producen un grado de alcohol. (Amerine M.A. & Ough C.S.,2001).
- La relación entre °Brix y °Baumé se reflejada de la siguiente manera: grados Baumé (°Be) se multiplica por 1,8 (aproximadamente) para determinar los grados °Brix ($^{\circ}\text{Be} \times 1,8 = ^{\circ}\text{Brix}$). (Amerine M.A. & Ough C.S.,2001).
- Se hicieron las medidas triplicadas con un Refractómetro 0 - 32% Brix RHB32/ATC a temperatura ambiente.

4. Ajuste del pH de los mostos dulces de cascara de piña:

- Para evaluar la influencia del pH los mostos dulces en la fermentación alcohólica, se preparó las muestras de 1000 ml, de la cascara de piña licuada y filtrada.
- Se midió el pH inicial y se ajusto el pH del mosto a valores de: 3, 4, 5 respectivamente, usando ácido cítrico al 1% (w/v) para disminuir el pH y bicarbonato de sodio al 1% (w/v) para incrementar el pH.
- Para comprobar el ajuste del nivel de pH se utilizó papel pH indicador con escala mediante inmersión directa en la muestra.

5. Preparación de la solución de Nutritiva.

- Debido a que al mismo tiempo la levadura utiliza la glucosa y nutrientes adicionales para metabolizarlos y reproducirse, es necesario que a los procesos se les debe ayudar complementando con la adición de nutrientes, control de niveles de azúcar y levadura para que enriquezcan la fermentación.
- Para preparar la solución nutritiva, en un vaso de precipitado añadimos 20 ml de agua destilada y luego agregamos: 2,5 mg de Fosfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, 5 mg. de Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5 mg. de Sulfato de zinc ZnSO_4 , 0,5 mg. de Sulfato de manganeso MnSO_4 y 0,5 mg. de sulfato de magnesio MgSO_4 . (como lo reportan Arimuya M, y E. Tecco Pisco. 2014).
- Diluimos a 100 ml y guardamos para su posterior uso.

6. Inoculación de la levadura.

- Para la fermentación se adiciono a los mostos dulces, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* libre en proporción de 0.08g/100g (dato recomendado según Albán & Carrasco, 2012).
- Como fermentadores o biorreactores de tipo estático, se utilizaron frascos de vidrio de 1000 ml de capacidad, que fueron esterilizados previamente a fin de evitar la contaminación y el desarrollo de otro tipo de microorganismos que alteren el proceso de obtención de alcohol.
- En los frascos, se añadió 850 ml de los mostos dulces de cascara de piña con los 03 diferentes niveles de grados Brix (20, 23 y 25°Brix) y con los 03 niveles de pH (3, 4 y 5).
- En cada uno de los frascos con mosto de cascara de piña se inoculo de forma individual la levadura 20 ml de la levadura activada de *Saccharomyces cerevisiae* y se añadió 5 ml de la solución nutritiva, para seguir a la fermentación, homogenizamos en el Agitador magnético Fratom y cerramos herméticamente, colocando manguera conectada desde el frasco a un vaso con agua que contiene una cucharadita de bicarbonato de sodio.

7. Fermentación Alcohólica.

- Se inició fermentación alcohólica a temperatura ambiente en los frascos sin agitación.
- La fermentación se realizó a temperatura ambiente tomando en consideración que según (Torija M. *et. al.*, 2002) el rango habitual de temperaturas de todo tipo de vinificaciones es de 15 a 35°C.
- La fermentación se realizó por triplicado para cada parámetro de evaluación.
- Al tercer día se realizó una primera filtración de los residuos sólidos de las cascara de piña.
- Se controló la fermentación de los mostos alcohólicos por 12 días los cambios de grados Brix y pH en cada tratamiento evaluado para determinar los efectos de la combinación de ambas variables en los grados alcohólicos y etanol producido por la levadura.
- Se midió el pH final de la fermentación alcohólica en cada tratamiento.
- Se hizo la conversión de los datos de °B x a GA utilizando la Tabla de Conversión de Gravedad Específica a °Baumé - °Brix - °Alcohol (Amerine M.A. & Ough C.S., 2001).

8. Destilación de los mostos alcohólicos

- En los mostos alcohólicos (fermentados) antes de ser destilados se realizó un segundo filtrado de los residuos sólidos, reduciendo problemas en el equipo de destilación.
- La destilación del producto fermentado se hizo a nivel laboratorio, se tomaron 250mL de cada uno y se llevaron al montaje de destilación simple durante dos horas en un rango de temperatura entre 70°C y 80°C para aislar el etanol de las distintas sustancias en el mosto.
- Al final, el volumen destilado fue medido volumétricamente y se guardó en botellas de vidrio.

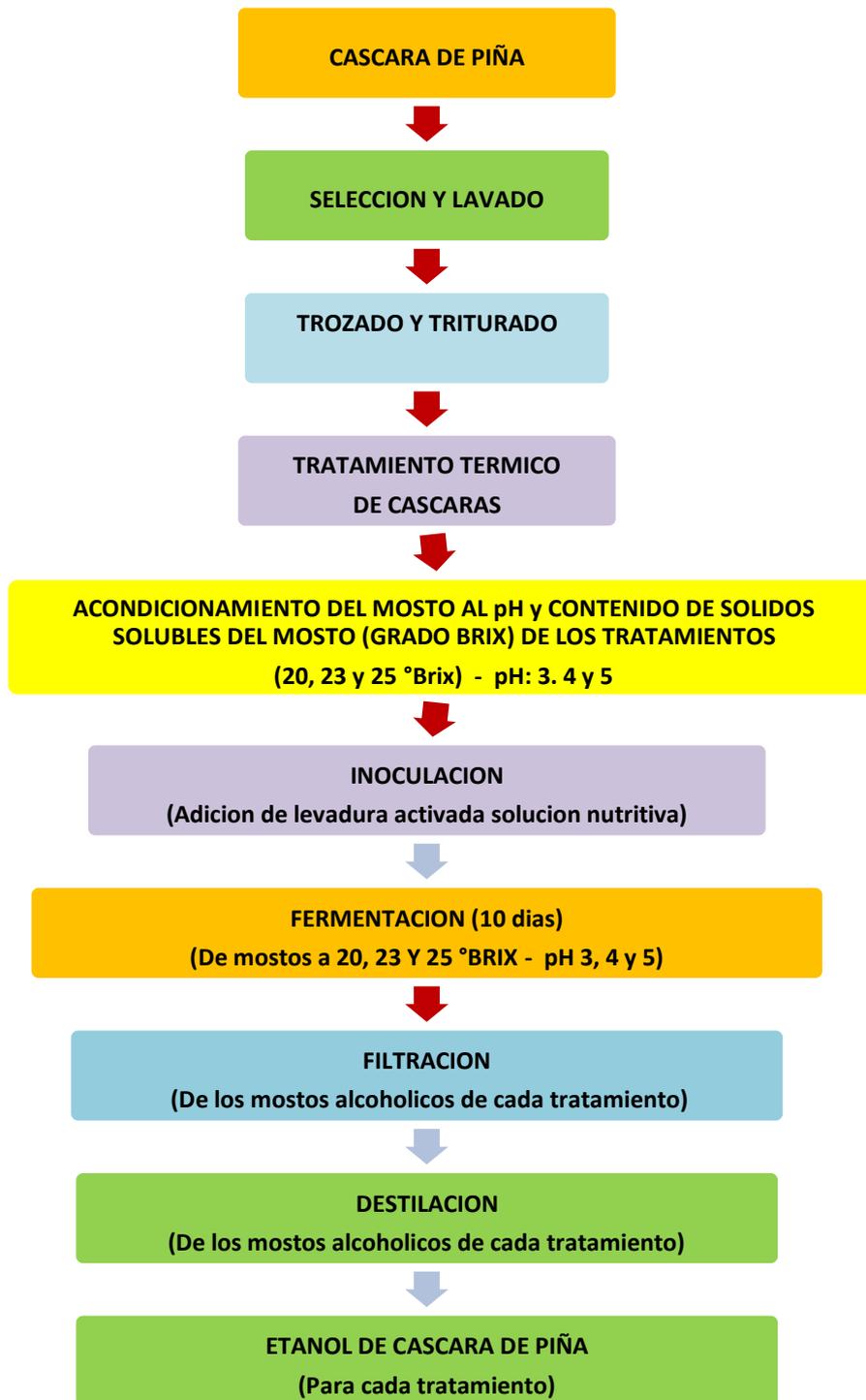
9. Cuantificación por alcoholimetría del etanol destilado

- Se determinó el contenido del alcohol destilado (en %) en cada tratamiento utilizando el Alcoholímetro a 20°C.
- Se determinó la acidez titulable de etanol destilado.

PROCESO DE OBTENCIÓN DEL ETANOL

En la Figura N°9 se indica el diagrama de proceso de obtención del etanol a partir de cascaras de Piña.

Figura 9. Diagrama de proceso aplicado para obtener Etanol a partir de cascara de piña.



A continuación se muestran las fotos del proceso.

- **SELECCIÓN DE LA CASCARA DE PIÑA**



• PESADO DE LA CASCARA



TROZADO DE LA CASCARA





TRATAMIENTO TÉRMICO DE LA CASCARA





ENFRIAMIENTO



LICUADO Y HOMOGENIZACION DEL MOSTO



ACONDICIONAMIENTO DEL MOSTO AL CONTENIDO DE SOLIDOS SOLUBLES

DEL MOSTO (GRADO BRUX) DE LOS TRATAMIENTOS

(20, 23 y 25 °Brix)



ACONDICIONAMIENTO DEL MOSTO AL pH DE LOS TRATAMIENTOS

(pH 3, 4 y 5)



ACTIVACIÓN DE LA LEVADURA.



PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE NUTRITIVA.



INOCULACION Y HOMOGENIZADO DE LOS MOSTOS CASCARA DE PIÑA.



FERMENTACION DE MOSTOS



- **PRIMER FILTRADO**

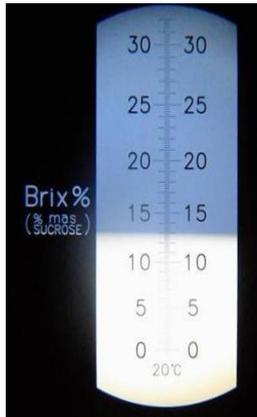
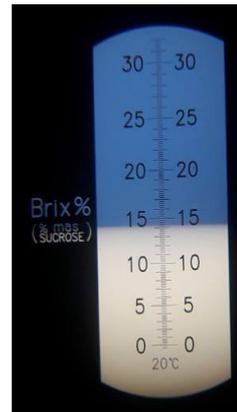
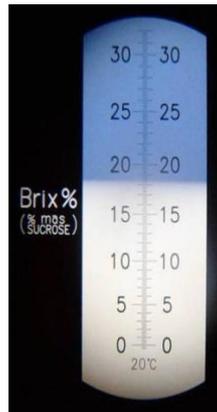
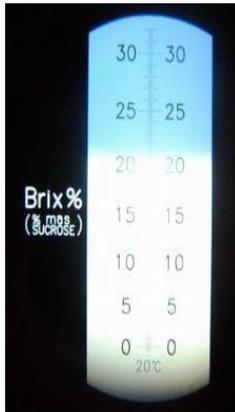


- CONTROL DEL PH DURANTE LA FERMENTACION ALCOHOLICA



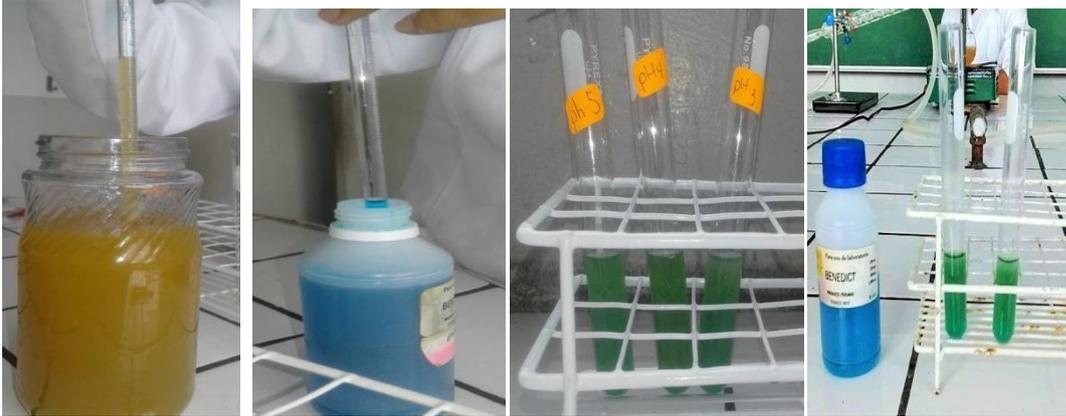
- CONTROL DE GRADOS BRIX DURANTE LA FERMENTACION

ALCOHOLICA



PRUEBA DE DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES

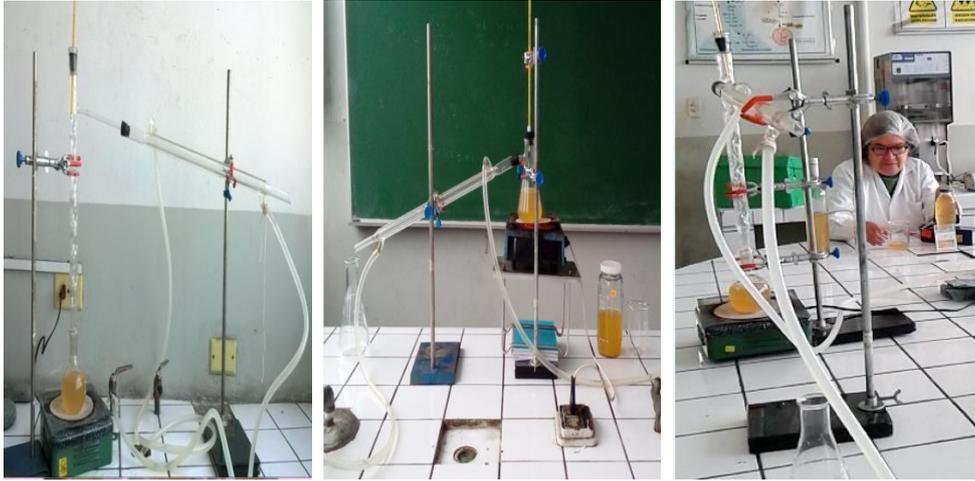
DE LOS MOSTOS ALCOHOLICOS



• SEGUNDO FILTRADO



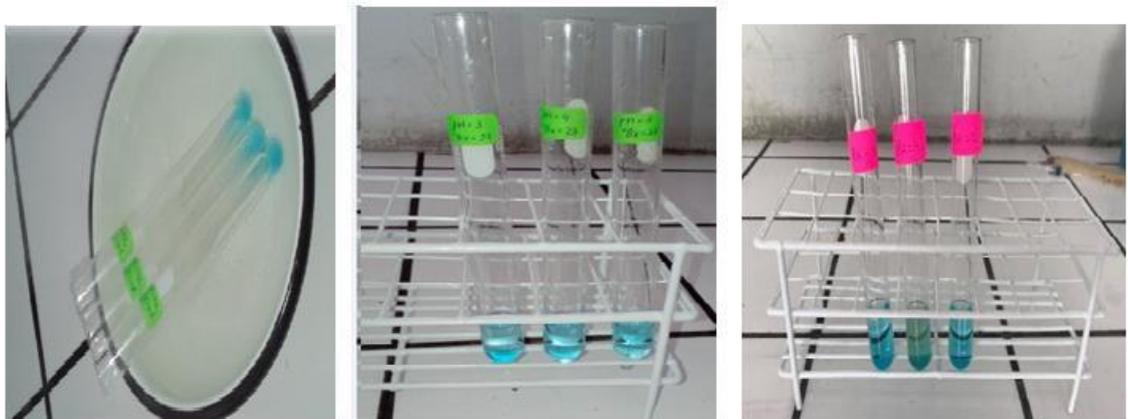
DESTILACION DE LOS MOSTOS ALCOHOLICOS



- **CALCULO VOLUMEN Y pH DEL ETANOL DESTILADO**



PRUEBA DE DETERMINACION CUALITATIVA DE AZUCARES REDUCTORES DEL ETANOL DESTILADO



CUANTIFICACIÓN POR ALCOHOLIMETRÍA DEL ETANOL DESTILADO



10. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Se determinó la humedad de la cascara de piña. Se utilizó el método gravimétrico de determinación de humedad (NTP 209.264. 2001).

Para el cálculo del porcentaje de humedad se empleó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Donde P_i , es el peso inicial de la muestra antes de colocarla en la estufa, P_f es el peso de la muestra después de someterla en la estufa.

Determinación de humedad de la cascara de piña:

- Pesar 10 gramos de cascara de piña en una placa Petri (Se determinó en cinco muestras).
- Colocar en la estufa de 100-110°C por 24 horas y luego volver a pesar.



Determinación de la acidez Titulable (INDECOPI, NTP 203.070).

El método consiste en determinar la acidez por medio de una titulación ácido-base con una solución de álcali estandarizado, expresando los resultados de la acidez titulable como el equivalente en masa de ácido cítrico por ser el ácido predominante de la piña.

Para las mediciones de acidez titulable se colocaron 10 ml del alcohol destilado y se le añadieron 2 gotas de fenolftaleína al 1% como indicador.

Posteriormente se tituló con NaOH 0.1N hasta observar el primer tono rosado en el destilado. Se realizó para todos los tratamientos evaluados por triplicado. La acidez fue reportada como porcentaje de ácido cítrico según el método NTP 203.070:1977 (REVISADA EL 2012)

Para el cálculo de la acidez Titulable se empleó la siguiente ecuación:

$$\% \text{Acido} : \frac{N \times Vb \times \text{Meq. ácido}}{Vm} \times 100$$

N= Normalidad de la base (NaOH) usada para titular

Vb= Volumen de la solución de la base usada para titular (gasto)

Meq= Miliequivalente del ácido

Vm= Volumen de la muestra

El miliequivalente para el ácido cítrico es de 0.064

Acidez titulable (Tratamiento °Brix 20)

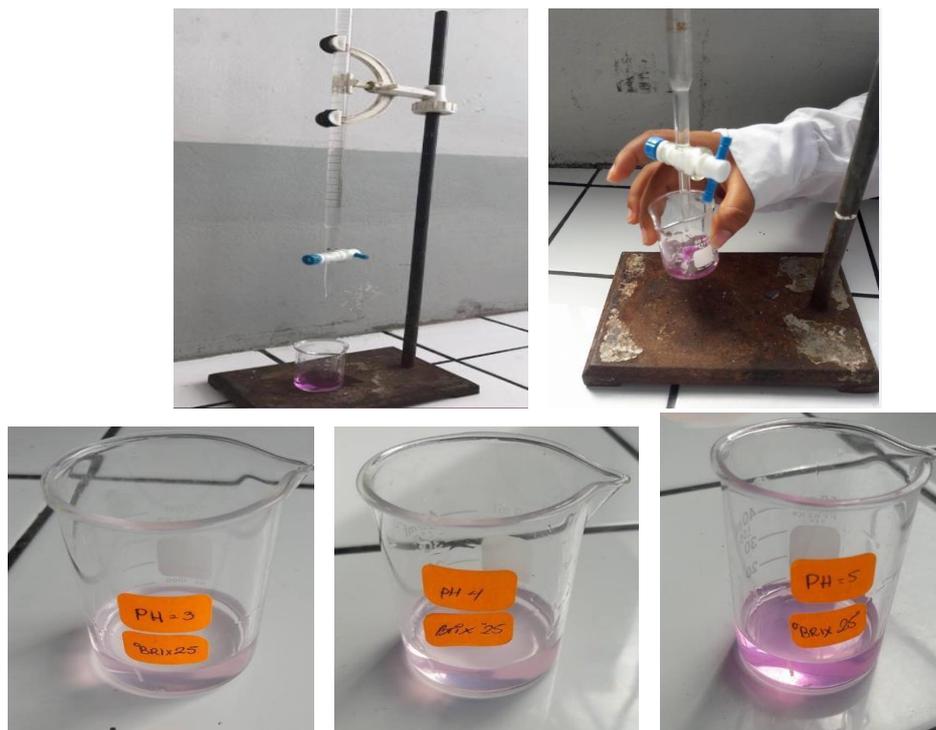


Acidez titulable (Tratamiento °Brix 23)





Acidez titulable (Tratamiento °Brix 25)



3.3.1. Evaluación del producto

- El proceso de destilación para producir etanol, se realizó en un equipo de destilación tradicional a 80°C durante 2 horas, el destilado obtenido se filtró y se colocó en frascos para su análisis con el alcoholímetro, con la finalidad cuantificar la cantidad de etanol, así como determinar los características fisicoquímicas y el análisis cualitativo de azúcares reductores con el reactivo de benedict.
- Se anotaron los resultados de las pruebas realizadas para su análisis e interpretación estadística.

4. RESULTADOS

4.1. FERMENTACIÓN DE LAS CASCARAS DE PIÑA

Para elaborar etanol a partir de cascara de piña *Ananas comosus* se requiere utilizar cascaras previamente seleccionadas descartando aquellas que presentaban daño causado por insectos, hongos o presencia de enfermedades para obtener mejores resultados en el proceso de extracción de etanol.

En el Cuadro N°8, se muestran los balances de materia en la obtención de etanol de cascaras de piña a partir de 10 kilogramos de cascaras que se utilizaron en el presente estudio.

Cuadro N°8. Balances de materia en la obtención de etanol de cascara de Piña.

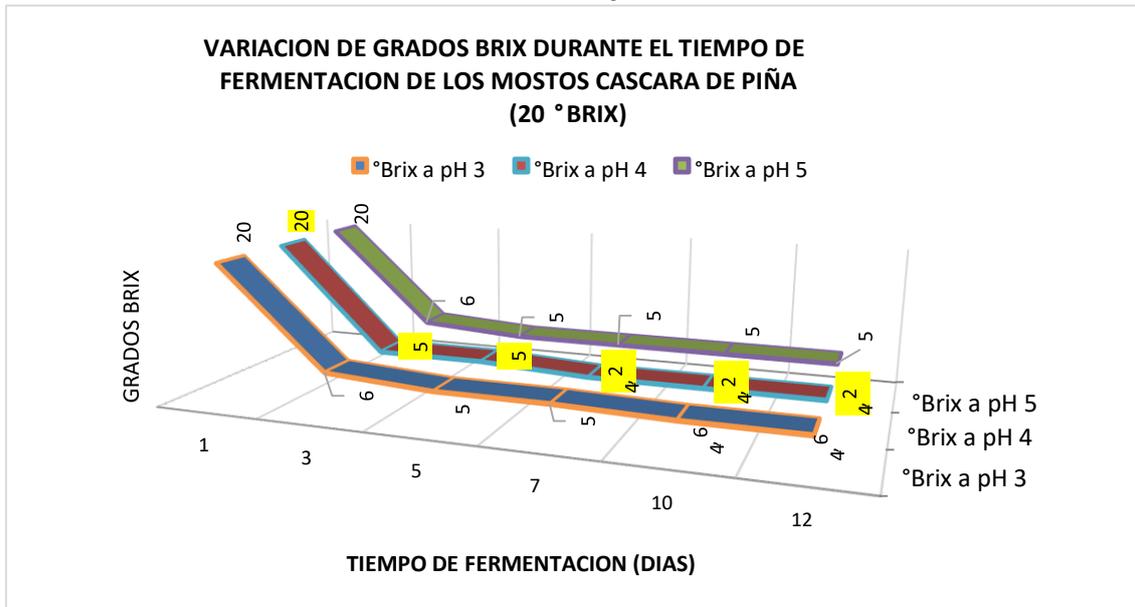
Característica evaluada	Valor
Peso de la cascara (Kg.)	10.00
Humedad cascara de piña (%)	71.84.
pH	4.7

I. Variaciones de sólidos solubles en el proceso fermentativo

Se observó que conforme aumentaban el tiempo de incubación en el proceso fermentativo de los mostos de las cascaras de piña, iba disminuyendo en forma creciente los grados Brix y formándose azúcares reductores en diferentes niveles de acuerdo al Grado Brix inicial (20, 23 y 25°Brix) y los pH (3,4 y 5) en cada tratamiento. Este descenso es debido al alto porcentaje de sólidos solubles iniciales y de estos se alimentan las levaduras durante la fermentación y como van pasando los días disminuía el porcentaje de sólidos solubles.

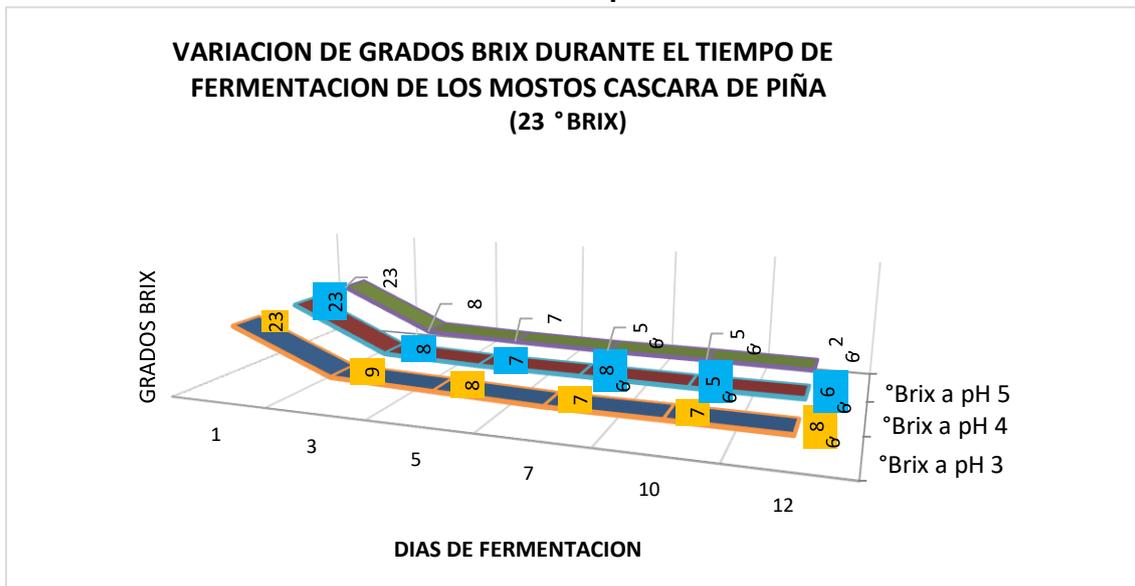
En todos los tratamientos el mayor descenso ocurrió al tercer día de la fermentación (72 horas), siendo el mosto de cascara de piña de 20°brix y pH 4 el que presento un descenso más rápido del °Brix llegando a 4.2 °Brix al día N°7 de la fermentación, mientras el tratamiento de 25°brix y pH 5 fue más lento el proceso fermentativo llegando a 6.2°Brix al día N°12 de la fermentación (Figuras N°10, N°11 y N°12).

Figura N°. 10 Variaciones de sólidos solubles (°Brix) durante el tiempo de fermentación de los mostos de Cascara de piña de 20°Brix.



NºDIAS	°Brix a pH 3	°Brix a pH 4	°Brix a pH 5
1	20	20	20
3	6	5	6
5	5	5	5
7	5	4.2	5
10	4.6	4.2	5
12	4.6	4.2	5

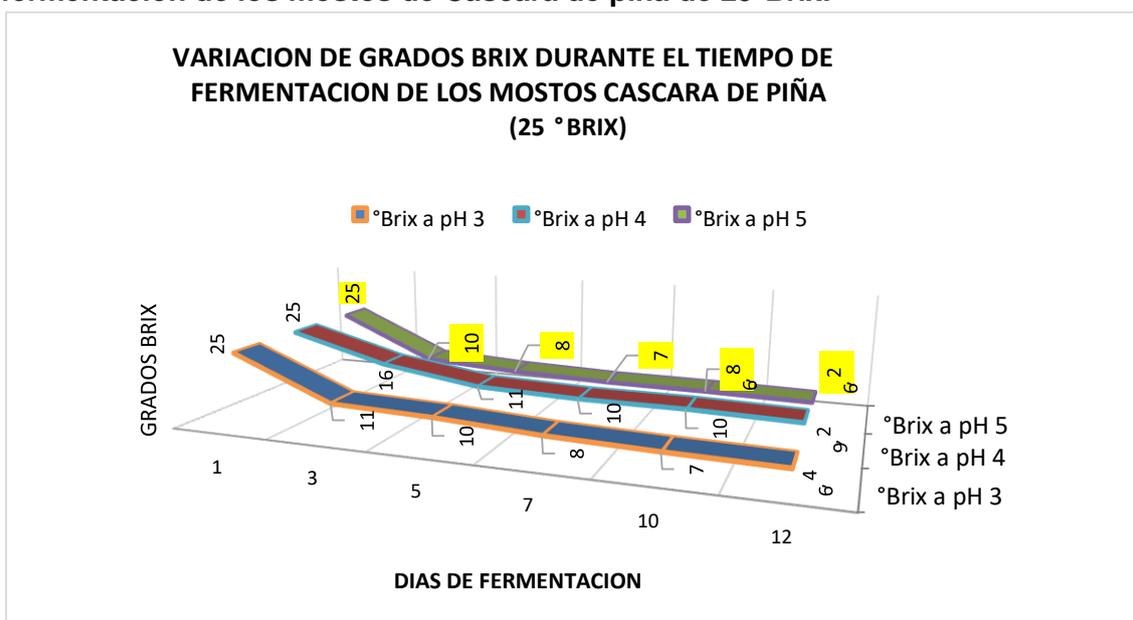
Figura N°. 11 Variaciones de sólidos solubles (°Brix) durante el tiempo de fermentación de los mostos de Cascara de piña de 23°Brix.



NºDIAS	°Brix a pH 3	°Brix a pH 4	°Brix a pH 5
1	23	23	23
3	9	8	8
5	8	7	7
7	7	7	7
10	6	6	6
12	6	6	6

1	23	23	23
3	9	8	8
5	8	7	7
7	7	6.8	6.5
10	7	6.5	6.5
12	6.8	6.6	6.2

Figura N°. 12 Variaciones de sólidos solubles (°Brix) durante el tiempo de fermentación de los mostos de Cascara de piña de 25°Brix.



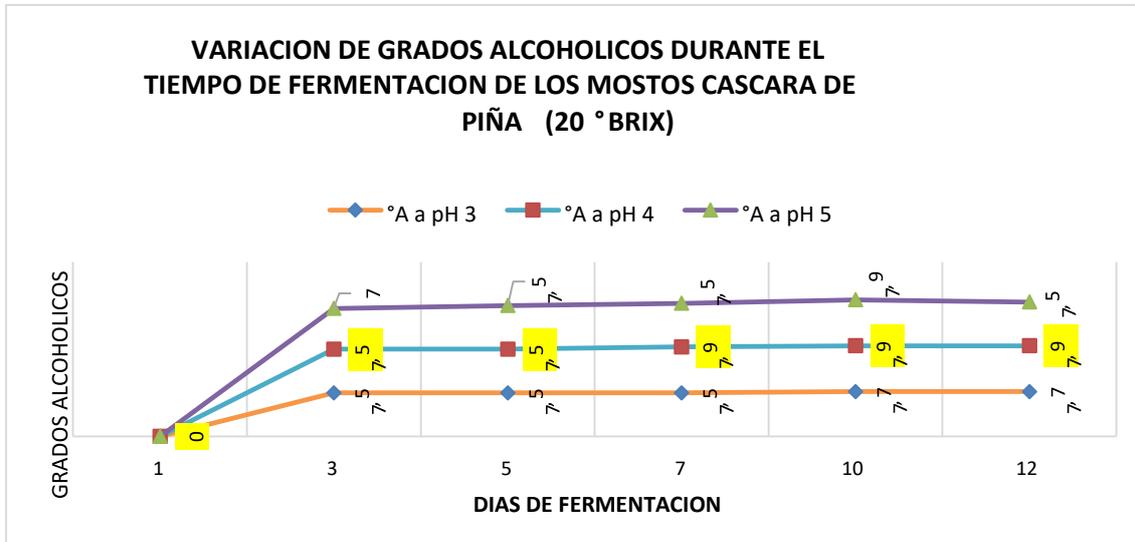
N° Dias	°Brix a pH 3	°Brix a pH 4	°Brix a pH 5
1	25	25	25
3	11	16	10
5	10	11	8
7	8	10	7
10	7	10	6.8
12	6.4	9.2	6.2

II. Variaciones de grados alcohólicos en el proceso fermentativo.

En todos los tratamientos el mayor aumento de los grados alcohólicos ocurrió al tercer día de la fermentación (72 horas), siendo el mosto de cascara de piña de 20°brix y pH 4 el que presento un aumento más rápido del alcohólico llegando a su nivel más alto (7.5°A) al quinto de la fermentación.

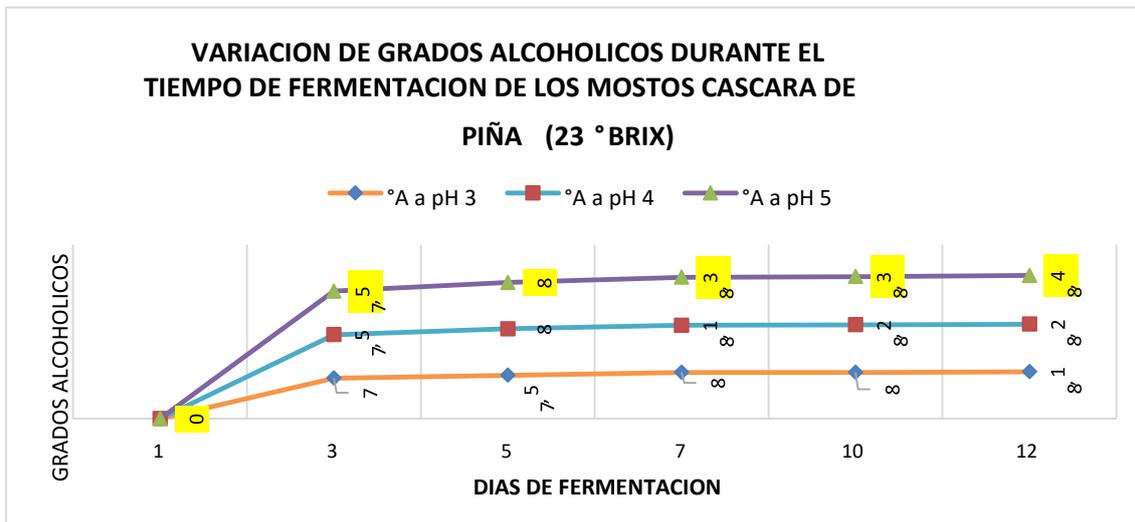
En el tratamiento de 25°brix el aumento de los grados alcohólicos fue más lento pero registro los valores más altos de grados alcohólicos (9.3°A y 9.4°A) a pH 3 y pH 5 al doceavo día de la fermentación. (Figuras N°13, N°14 y N°15).

Figura N°. 13 Variaciones de los grados alcohólicos (°A) durante el tiempo de fermentación de los mostos de Cascara de Piña de 20°Brix.



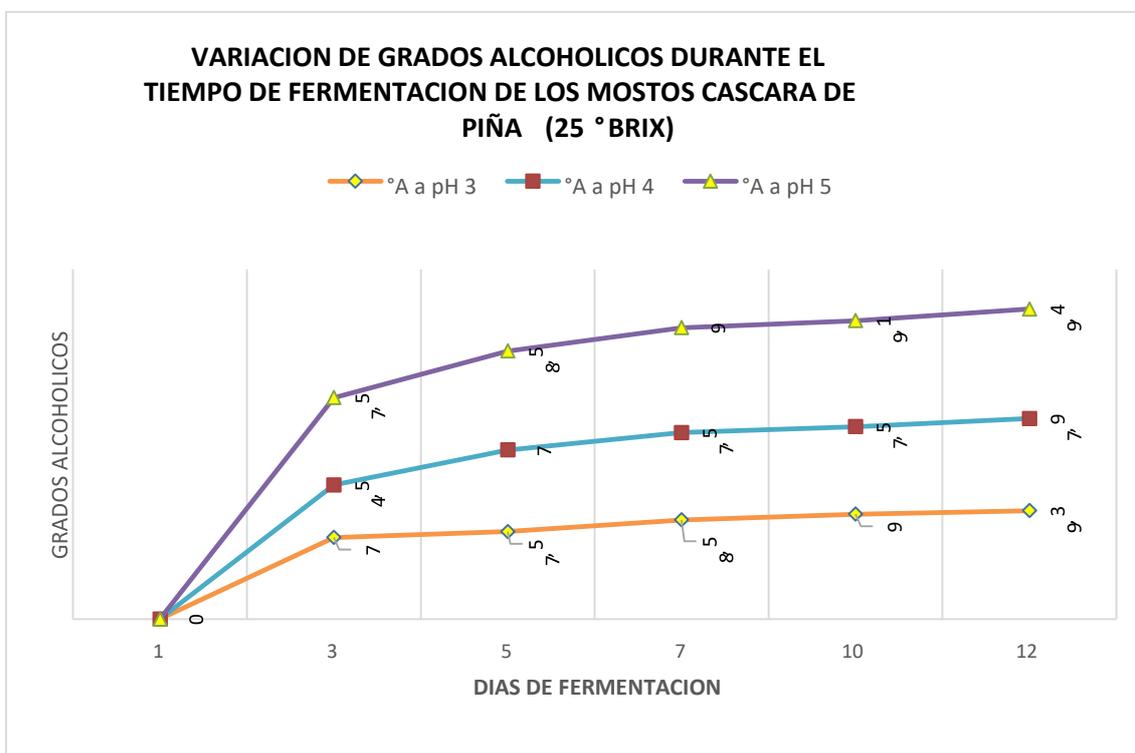
NºDIAS	°A a pH 3	°A a pH 4	°A a pH 5
1	0	0	0
3	7.5	7.5	7
5	7.5	7.5	7.5
7	7.5	7.9	7.5
10	7.7	7.9	7.9
12	7.7	7.9	7.5

Figura N°. 14 Variaciones de los grados alcohólicos (°A) durante el tiempo de fermentación de los mostos de Cascara de Piña de 23°Brix.



NºDIAS	°A a pH 3	°A a pH 4	°A a pH 5
1	0	0	0
3	7	7.5	7.5
5	7.5	8	8
7	8	8.1	8.3
10	8	8.2	8.3
12	8.1	8.2	8.4

Figura N°. 15. Variaciones de los grados alcohólicos (°A) durante el tiempo de fermentación de los mostos de Cascara de Piña de 25°Brix.



N°DIAS	°A a pH 3	°A a pH 4	°A a pH 5
1	0	0	0
3	7	4.5	7.5
5	7.5	7	8.5
7	8.5	7.5	9
10	9	7.5	9.1
12	9.3	7.9	9.4

III. Comparación del nivel de pH y Grado Brix respecto al grado alcohólico.

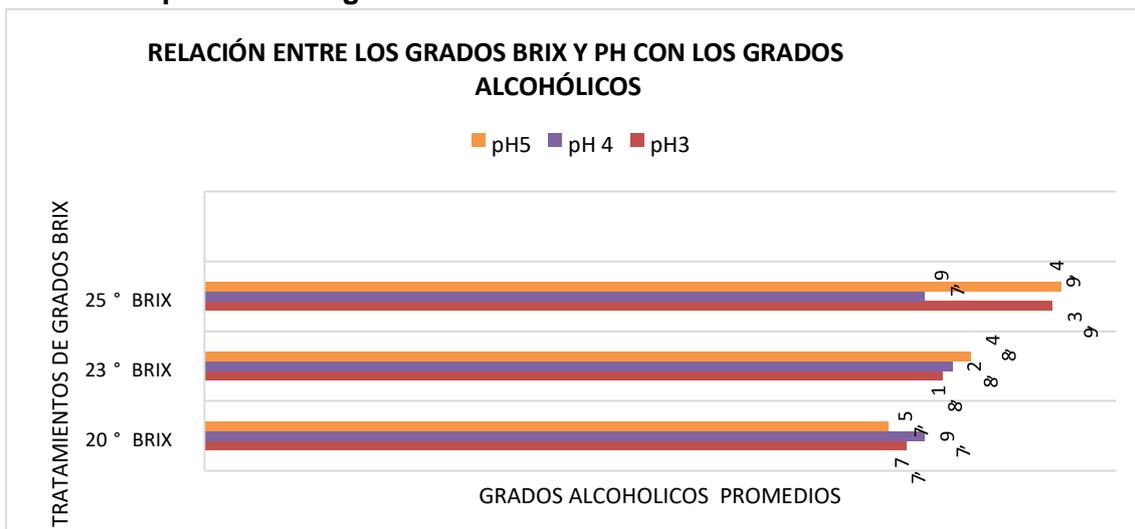
En el tratamiento de 25°brix se registró los valores más altos de grados alcohólicos (9.3°A y 9.4°A) a pH 3 y pH 5. Siendo el mosto de cascara de piña de 20°brix a pH 3 y pH 5 los menores grado alcohólicos (7.7 y 7.5). En el tratamiento de 23°brix se registraron valores intermedios de grados alcohólicos. Cuadro N° 9 y Figura N° 16.

Cuadro N° 9. Relación entre los Grados Brix y pH iniciales de los mostos de cascara de piña con los grados alcohólicos obtenidos.

GRADOS BRIX	pH	Grados alcohólicos (mosto alcohólico)	Grados alcohólicos promedio
20	3	7.9	7.7
20	3	7.5	
20	3	7.6	
20	4	8	7.9
20	4	7.7	
20	4	7.9	
20	5	7.5	7.5
20	5	7.6	
20	5	7.5	
23	3	7.7	8.1
23	3	8.6	
23	3	8.0	
23	4	7.6	8.2

23	4	8.7	
23	4	8.2	
23	5	8.1	8.4
23	5	8.7	
23	5	8.5	
25	3	9.4	9.3
25	3	9.5	
25	3	9.0	
25	4	7.4	7.9
25	4	7.6	
25	4	8.6	
25	5	10.6	9.4
25	5	8.3	
25	5	9.4	

Figura N°. 16. Relación entre los Grados Brix y pH iniciales de los mostos de cascara de piña con los grados alcohólicos obtenidos.



IV. Comparación del nivel de pH y Grado Brix respecto al con el Porcentaje de etanol destilado.

En el tratamiento de 25°brix se registró los valores más altos de Porcentaje de etanol destilado (52.6 % y 49.7%) a pH 4 y pH 5. Siendo el mosto de cascara de piña de 20°brix

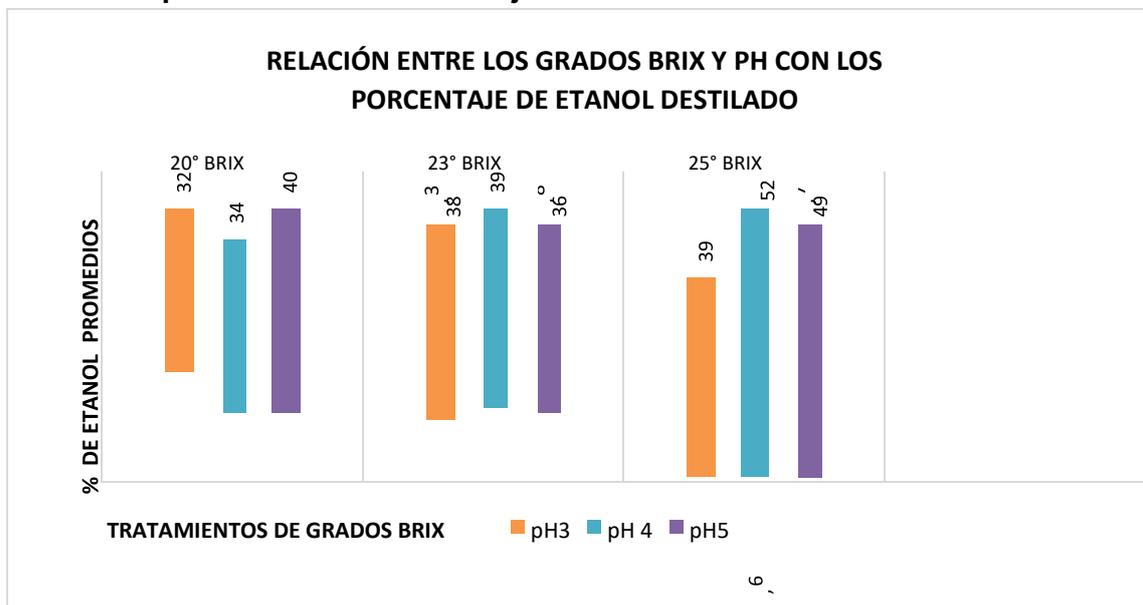
a pH 3 y pH 4 los menores Porcentaje de etanol destilado (32 y 34%). En el tratamiento de 23°brix se registraron valores intermedios de Porcentaje de etanol destilado. Cuadro N° 10 y Figura N° 17. Los valores de acidez titulable se muestran en el cuadro N° 11 expresado en % de ácido cítrico.

Cuadro N° 10. Relación entre los Grados Brix y pH iniciales de los mostos de cascara de piña con el Porcentaje de etanol destilado.

GRADOS BRIX	pH	Porcentaje de etanol destilado	Porcentaje de etanol destilado Promedio
20	3	34	32
20	3	30	
20	3	32	
20	4	35	34
20	4	33	
20	4	35	
20	5	42	40
20	5	40	
20	5	38	
23	3	39.5	38.3
23	3	39	
23	3	36.5	
23	4	37	39
23	4	41	
23	4	39	
23	5	35.5	36.8
23	5	39	
23	5	36	
25	3	42	39
25	3	37	
25	3	38	
25	4	46	52.6
25	4	52	
25	4	60	

25	5	51	49.7
25	5	43	
25	5	55	

Figura N°. 17. Relación entre los Grados Brix y pH iniciales de los mostos de cascara de piña con con el Porcentaje de etanol destilado.



Cuadro N° 11. Acidez titulable (Ácido cítrico) del etanol destilado en los tratamientos de 20, 23 y 25°Brix.

GRADOS BRUX	pH 3	pH 4	pH 5
20 °Brix	0,045	0,048	0,045
23 °Brix	0.048	0.042	0.049
25°Brix	0,038	0,038	0,045

5. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN DE LAS VARIABLES EN ESTUDIO DEL ETANOL A PARTIR DE *Ananas comosus* (piña)

Los datos resultantes fueron procesados mediante diferentes análisis estadísticos, con el fin de observar el nivel de significancia de las variaciones de **sólidos solubles (°Brix)** y los niveles de pH sobre el porcentaje de etanol y grado alcohólico.

Los métodos estadísticos fueron:

- Análisis multifactorial de varianza, con el fin de observar si existieron diferencias significativas en cada una de las muestras de acuerdo a los diferentes tratamientos.
- Análisis de contraste múltiple de rangos; este procedimiento se llevara a cabo con el fin de realizar una comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras.
- Prueba de medias por mínimos cuadrados; este procedimiento permite establecer la media para cada nivel de factores, de igual manera permite presentar el error estándar de cada media la cual es una medida de la variabilidad en la muestra sobre las diferencias encontradas del porcentaje de etanol y grado alcohólico con relación al grado Brix y el nivel de pH.

5.1 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE pH y GRADO BRUX RESPECTO AL GRADO ALCOHÓLICO.

El Análisis de varianza para cada una de las variables en estudio (Grado Brix y pH) respecto al grado alcohólico obtenido de cascara de piña *Ananas comosus* mostro los siguientes resultados:

Factores inter-sujetos

		N
pH	3	9
	4	9
	5	9
GRADOS BRUX	20	9
	23	9
	25	9

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Grados Alcohólicos

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	7.495(a)	4	1.874	4.789	.006
Intersección	1843.467	1	1843.467	4711.382	.000
PH	1.241	2	.620	1.585	.227
Grados_Brix	6.254	2	3.127	7.992	.002
Error	8.608	22	.391		
Total	1859.570	27			
Total corregida	16.103	26			

De

acuerdo a los análisis realizados se encontró:

- A una significancia de $0.05 < 0.227$, podemos concluir que no existe diferencias significativas de los grados de alcohol respecto al nivel de pH.
- A una significancia de $0.05 > 0.002$, podemos concluir que existe diferencias significativas de los grados de alcohol respecto a los Grados Brix.

Medias marginales estimadas

1. Nivel de pH

Variable dependiente: Grados Alcohólicos

pH	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
3	8.356	.209	7.923	8.788
4	7.967	.209	7.534	8.399
5	8.467	.209	8.034	8.899

De acuerdo a los análisis realizados se encontró:

Se puede observar en los intervalos de confianza que no existe independencia entre los pH

2. Contenido de Sólidos Solubles (GRADOS BRIX)

Variable dependiente: Grados Alcohólicos

GRADOS BRIX	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
20	7.689	.209	7.256	8.121
23	8.233	.209	7.801	8.666
25	8.867	.209	8.434	9.299

De acuerdo a los análisis realizados se encontró:

Se puede observar en los intervalos de confianza que los Grados Alcohólicos en los mostos de 20 Grados Brix tienen diferencias significativas con los Grados Alcohólicos en los mostos de 25 Grados Brix.

De acuerdo a Guzmán R. (2013), el mosto para la fermentación alcohólica debe tener un brix entre 16 y 20, pues si el brix es muy bajo el grado alcohólico obtenido será pobre. Por lo contrario si el brix es muy alto la fermentación no se efectúa, pues la presión osmótica que se ejerce sobre los microorganismos es grande y no permite que actúen sobre los azúcares.

Pruebas post hoc pH

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Grados Alcohólicos

DHS de Tukey

(I) pH	(J) pH	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación	Intervalo de confianza al 95%.	
					Límite superior	Límite inferior
3	4	.389	.2949	.400	-.352	1.130
	5	-.111	.2949	.925	-.852	.630
4	3	-.389	.2949	.400	-1.130	.352
	5	-.500	.2949	.229	-1.241	.241
5	3	.111	.2949	.925	-.630	.852
	4	.500	.2949	.229	-.241	1.241

De acuerdo a los análisis realizados se encontró:

La Prueba de Tukey al 5% de significancia, se observa que no existe diferencias significativas entre los pH para los grados alcohólicos obtenidos. Todos son mayores a 0.05.

GRADOS BRIX

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Grados Alcohólicos

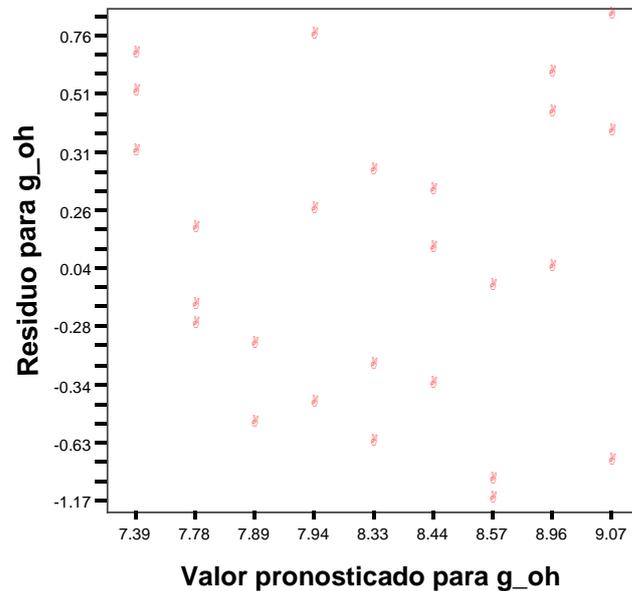
DHS de Tukey

(I) GRADOS BRIX	(J) GRADOS BRIX	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación	Intervalo de confianza al 95%.	
					Límite superior	Límite inferior
20	23	-.544	.2949	.178	-1.285	.196
	25	-1.178(*)	.2949	.002	-1.919	-.437
23	20	.544	.2949	.178	-.196	1.285

	25		-0.633	.2949	.103	-1.374	.107
25	20		1.178(*)	.2949	.002	.437	1.919
	23		.633	.2949	.103	-.107	1.374

De acuerdo a los análisis realizados se encontró:

La Prueba de Tukey al 5% de significancia, se observa que existe diferencias significativas entre los Grados Alcohólicos en los mostos de 20 Grados Brix con los Grados Brix (25), es menor a 0.05.



El gráfico de correlación nos indica que no existe interacción entre el pH y los Grados Brix, referente los Grados Alcohólicos de los mostos fermentados, no podemos estimar un modelo de tendencia.

5.2 COMPARACIÓN DEL NIVEL DE pH y GRADO BRUX RESPECTO AL PORCENTAJE DE ETANOL DESTILADO.

Factores inter-sujetos

		N
pH	3	9
	4	9
	5	9
GRADOS BRUX	20	9
	23	9

25	9
----	---

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje de Etanol Destilado

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	865.704(a)	4	216.426	10.489	.000
Intersección	43641.120	1	43641.120	2115.113	.000
PH	190.907	2	95.454	4.626	.021
Grados_Brix	674.796	2	337.398	16.352	.000
Error	453.926	22	20.633		
Total	44960.750	27			
Total corregida	1319.630	26			

De

acuerdo a los análisis realizados se encontró:

- A una significancia de $0.05 > 0.021$, podemos concluir que existe diferencias significativas de los Porcentaje de Etanol Destilado respecto al PH encontrado
- A una significancia de $0.05 > 0.000$, podemos concluir que existe diferencias significativas de los Porcentaje de Etanol Destilado respecto a los Grados Brix.

Medias marginales estimadas

1. pH

Variable dependiente: Porcentaje de Etanol Destilado

pH	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
3	36.444	1.514	33.304	39.585
4	42.000	1.514	38.860	45.140
5	42.167	1.514	39.027	45.307

De acuerdo a los análisis realizados se encontró:

Se puede observar en los intervalos de confianza que hay aproximaciones a independencia entre los mostos de nivel de pH 3 con pH 4 y de pH 3 con pH 5; respecto a pH 4 y pH 5 se puede observar que es fuerte la relación es decir no hay cambios significativos.

2. GRADOS BRIX

Variable dependiente: Porcentaje de Etanol Destilado

GRADOS BRIX	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
20	35.444	1.514	32.304	38.585
23	38.056	1.514	34.915	41.196
25	47.111	1.514	43.971	50.251

De acuerdo a los análisis realizados se encontró:

Se puede observar en los intervalos de confianza que los Porcentaje de Etanol Destilado en los mostos de 20 Grados Brix tienen diferencias significativas con los Porcentaje de Etanol Destilado en los mostos de 25 Grados Brix. En cambio con los Grados Brix 20 con 23 es poco las diferencias significativas.

Pruebas post hoc pH

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Porcentaje de Etanol Destilado

DHS de Tukey

(I) pH	(J) pH	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación	Intervalo de confianza al 95%.	
					Límite superior	Límite inferior
3	4	-5.556(*)	2.1413	.042	-10.935	-.177
	5	-5.722(*)	2.1413	.036	-11.101	-.343
4	3	5.556(*)	2.1413	.042	.177	10.935
	5	-.167	2.1413	.997	-5.546	5.212
5	3	5.722(*)	2.1413	.036	.343	11.101
	4	.167	2.1413	.997	-5.212	5.546

De acuerdo a los análisis realizados se encontró:

La Prueba de Tukey al 5% de significancia, se observa que existe diferencias significativas entre los Porcentaje de Etanol Destilado de los mostos de nivel de pH 3 con 4 y de pH 3 con pH 5 son menores a 0.05. En cambio entre los mostos de nivel de pH 4 con pH 5 no existe diferencias significativas porque es mayor a 0.05.

GRADOS BRIX

Comparaciones múltiples

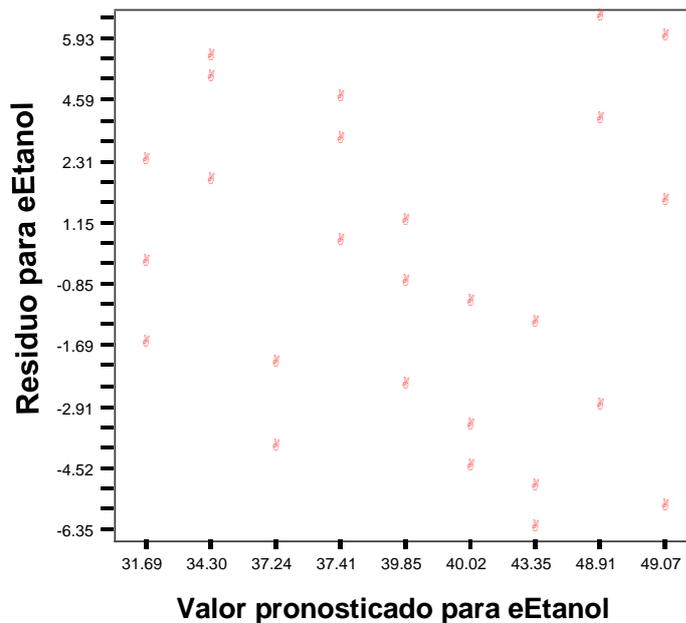
Variable dependiente: Porcentaje de Etanol Destilado

DHS de Tukey

(I) GRADOS BRIX	(J) GRADOS BRIX	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación	Intervalo de confianza al 95%.	
					Límite superior	Límite inferior
20	23	-2.611	2.1413	.455	-7.990	2.768
	25	-11.667(*)	2.1413	.000	-17.046	-6.288
23	20	2.611	2.1413	.455	-2.768	7.990
	25	-9.056(*)	2.1413	.001	-14.435	-3.677
25	20	11.667(*)	2.1413	.000	6.288	17.046
	23	9.056(*)	2.1413	.001	3.677	14.435

De acuerdo a los análisis realizados se encontró:

La Prueba de Tukey al 5% de significancia, se observa que existe diferencias significativas para el Porcentaje de Etanol Destilado entre los mostos de 20 Grados Brix con los de 25 Grados Brix y del Porcentaje de Etanol Destilado entre los mostos de 23 con 25 debido a que son es menores a 0.05 en cambio no ocurre lo mismo con los Porcentaje de Etanol Destilado entre los mostos de 23 Grados Brix 23 con los de 20 Grados Brix.



El grafico de correlación nos indica que no existe interacción entre el pH y los Grados Brix, no podemos estimar un modelo de tendencia.

Se pudo aprovechar un residuo orgánico muy poco subutilizado elaborando etanol a partir de la cascara de Piña *Ananas comosus* y se obtuvo etanol de la cascara de Piña en los diferentes grados Brix y niveles de pH estudiados. Esto concuerda con Monsalve G., J., Medina de Pérez, V., & Ruiz Colorado, A. (2006) y con Reyes K. A. (2014), que mencionan que todos los desechos de frutas que contienen azúcares en sus diferentes formas, son susceptibles de fermentación, produciendo alcohol que pueden ser usados en otros procesos, inclusive como biocombustibles.

Se observó que conforme aumentaban el tiempo de incubación en el proceso fermentativo de los mostos de las cascara de piña, iba disminuyendo en forma creciente los grados Brix y aumentando los grados alcohólicos en diferentes niveles de acuerdo al Grado Brix inicial (20, 23 y 25°Brix) y los pH (3,4 y 5) en cada tratamiento. Esto concuerda con Mitis Madroñero H. (2015), quien señala que el contenido de °Brix del mosto por lo que son azúcares, se convierten en alcohol durante la fermentación y que a medida que los grados Brix disminuyen, la cantidad de alcohol en líquido aumenta. En todos los tratamientos el mayor descenso del grado brix y mayor aumento del grado alcohólico ocurrió al tercer día de la fermentación (72 horas) lo que concuerda con Hernández D. y C. Martínez (2012) reportaron que el mayor tiempo de fermentación ronda las 72 horas.

De los resultados obtenidos se observó que a partir del quinto día al doceavo día el aumento de los grados alcohólicos en los mostos fermentados de todos los tratamientos era muy baja lo cual indico el consumo de sustrato por la levadura. Esto concuerda con Fernández A. y Gómez S. (2011) quienes al realizar la determinación del grado de conversión global del jugo de piña en etanol por medio de la fermentación alcohólica comprobaron que el proceso de fermentación culminó aproximadamente entre el cuarto y quinto día donde observaron que los °Brix se mantuvieron constantes. Al respecto, Torija M. *et al.*, (2002), menciona que el proceso fermentativo termina cuando ya se han desdoblado prácticamente todos los azúcares y cesa la fermentación.

Se observó que en todos los tratamientos se llevó a cabo el proceso de fermentación alcohólica a temperatura ambiente que durante la realización del estudio a nivel de laboratorio fluctuó entre 19°C y 21°C. Al respecto, Torija M. *et al.*, (2002), al realizar estudios de fermentación alcohólica en vinos señala que la temperatura de fermentación puede ser un criterio a considerar ya que se trata de una variable muy importante en vinificación y que según el análisis de la capacidad fermentativa de las cepas de

levaduras a diferentes temperaturas se determinó que el rango habitual de temperaturas de todo tipo de vinificaciones es de 15 a 35°C.

En las primeras 30 horas de la inoculación de los fermentados, no se presentaron disminuciones marcadas de los grados brix de los mostos, este tiempo se considera como la fase de adaptación de la levadura al sustrato, a partir de tiempos superiores a 48 horas se obtuvo mayores cambios de los grados brix iniciales lo que implicaba la conversión de los azúcares fermentables en alcohol y se demostró con el aumento gradual de los grados alcohólicos.

De los resultados obtenidos para los grados brix de los mostos más aconsejables para la fermentación y que presentaron diferencias significativas fue de 20 grados brix con menor tiempo de fermentación que disminuirían los costos operativos de la fermentación lo que concuerda con Hernández D. y C. Martínez (2012) reportaron que reportaron que el mayor pH para producción de etanol es 4, los grados Brix óptimos son 20, con un 24 % de rendimiento y un grado alcohólico de 50; fuera de estos parámetros la calidad se ve sacrificada.

Por otro lado los resultados de mayor porcentaje de etanol en los mostos destilados fue el mosto de 25 Grados Brix inicial por lo que se comprobó que el mejor tratamiento para la producción de etanol es cuando se inicia con un mosto a 25 grados brix. Es ese nivel donde el porcentaje de azúcar trabaja mejor con la levadura formando mayor cantidad de etanol. Al respecto, Peña, C. y R. Arango. (2009) al evaluar la producción de etanol utilizando cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de melaza de caña de azúcar indican que en el proceso de fermentación es más rentable utilizar cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que presenten el mayor porcentaje de alcohol y menor tiempo de fermentación.

Aunque se observó la fermentación a pH 3 y pH 5, el pH donde se obtuvo mejores resultados para la fermentación alcohólica fue de 4, mostrando ser el medio eficaz para el desarrollo del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* lo que concuerda con (Hernández, S. & Martínez, C. 2012) que informan que a pH ligeramente ácidos se ve favorecida la ruta metabólica EMP para fermentación alcohólica y que el mayor pH para producción de etanol es 4.

Se realizaban los controles de la fermentación alcohólica cada 24 horas pero es recomendable un control más exhaustivo para poder tener información más precisa en los tratamientos a estudiar para determinar el tiempo máximo que dura la fermentación

lo que concuerda con Montilla, M., & Álvarez, C. (2007) que indica que se debe seguir un cronograma más detallado del tiempo de fermentación para evitar que se empiece a acidificar el fermento y el mosto se transforme en vinagre.

La utilización de residuos agroindustriales es un campo que está desarrollándose pero da pauta a que el aprovechamiento de los desechos genere rentabilidad y minimice los impactos al ambiente. Los residuos industriales de la piña son una alternativa de bajo coste para la producción de bioetanol. Este desecho contiene azúcares simples fermentables (glucosa, fructosa y sacarosa) y cantidades significativas de celulosa y de hemicelulosa potencialmente hidrolizables.

Si bien en la presente investigación se logró obtener la fermentación de cascaras de piña para la producción de etanol, sería favorable la utilización de otros pretratamientos de la matriz lignocelulósica para favorecer la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa y tener mayor proporción de azúcares fermentables para su posterior fermentación alcohólica usando como microorganismo productor *Saccharomyces cerevisiae*. Algunos posibles tratamientos serían pretratamientos químicos con ácidos como lo plantean Monsalve G., J., Medina y Ruiz C. A. (2006) que trabajaron con cáscara de banano y de almidón de yuca, o los autores Arimuya M. y E. Tecco Pisco (2014) que estudiaron la obtención de etanol a partir del residuo lignocelulósico cervecero; Tejeda L. *et al.* (2010) para la producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña o el uso de ondas electromagnéticas (microondas) o tratamientos enzimáticos.

6. CONCLUSIONES

- Se pudo aprovechar un residuo orgánico muy poco subutilizado elaborando etanol a partir de la cascara de Piña *Ananas comosus*.
- Se obtuvo etanol de la cascara de Piña que fue cuantificado por alcoholimetría en los diferentes grados brix y pH estudiados.
- Se pudo demostrar todo el proceso de formación y destilación de alcohol etanol, desde un punto de vista bioquímico a partir de un mosto de cascara de piña el cual fue fermentado por levaduras.
- En todos los tratamientos el mayor descenso del grado brix y mayor aumento del grado alcohólico ocurrió al tercer día de la fermentación (72 horas).
- Los grados brix de mostos para la fermentación y que presentaron diferencias significativas fue de 20 grados Brix inicial con menor tiempo de fermentación pero los de mayor porcentaje de etanol en los mostos destilados fue el mosto de 25 Grados Brix inicial.
- El grafico de correlación nos indica que no existe interacción entre el pH y los Grados Brix, referente los Grados Alcohólicos de los mostos fermentados.
- Si existe diferencias significativas de los Porcentaje de Etanol Destilado respecto al PH encontrado.
- Si existe diferencias significativas de los Porcentaje de Etanol Destilado respecto a los Grados Brix.
- La Prueba de Tukey al 5% de significancia, se observa que existe diferencias significativas entre los Porcentaje de Etanol Destilado de los mostos de nivel de pH 3 con 4 y de pH 3 con pH 5 son menores a 0.05. En cambio entre los mostos de nivel de pH 4 con pH 5 no existe diferencias significativas
- Se puede observar en los intervalos de confianza que los Porcentaje de Etanol Destilado en los mostos de 20 Grados Brix tienen diferencias significativas con

los Porcentaje de Etanol Destilado en los mostos de 25 Grados Brix. En cambio con los Grados Brix 20 con 23 es poco las diferencias significativas.

- La Prueba de Tukey al 5% de significancia, se observa que existe diferencias significativas para el Porcentaje de Etanol Destilado entre los mostos iniciales de 20 Grados Brix con los de 25 Grados Brix y del Porcentaje de Etanol Destilado entre los mostos de 23 con 25 debido a que son es menores a 0.05 en cambio no ocurre lo mismo con los Porcentaje de Etanol Destilado entre los mostos de 23 Grados Brix con los de 20 Grados Brix.
- En los mostos de cascara de piña de 20, 23 y 25 °Brix, la variable óptima de pH de mayor producción de etanol en el proceso fermentativo fue de pH 3 y 4 (medio ácido) ya que a esta condición se obtuvieron mayores grados alcohólicos mostrando ser el medio eficaz para el desarrollo del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*.
- El mosto de cascara de piña de 20°brix y pH 4 fue el que presento un aumento más rápido del grado Alcohólico llegando a su nivel más alto (7.5°A) al quinto de la fermentación.
- En el tratamiento de 25°brix el aumento de los grados alcohólicos fue más lento pero registro los valores más altos de grados alcohólicos (9.3°A y 9.4°A) a pH 3 y pH 5 al doceavo día de la fermentación.
- El mayor porcentaje de etanol obtenido mediante el proceso fermentativo desarrollado en esta investigación fue etanol al 52.6 obtenido del mosto de cascara de piña de 25°Brix y pH 4, el cual se comprobó usando el alcoholímetro de Gay-Lussac.
- Los fermentadores a usar deben ser esterilizados a fin de evitar la contaminación y el desarrollo de otro tipo de microorganismos que alteren el proceso de obtención de alcohol.
- Es importante la adopción de las BPM durante el desarrollo de todo producto para evitar contaminaciones indeseables, mejorar la calidad de los productos y reducir desperdicios.
- De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible obtener etanol a partir del residuo de cascara de piña y se debe ensayar otros desechos agroindustriales que también son fermentables y generan alcohol, vinagre y otros subproductos de valor para el ser humano.
- Para la producción de etanol a nivel de empresas agroindustriales a mediana o gran escala se debe utilizar biorreactores para llevar a cabo la fermentación de

tipo alcohólica para que proporcionen las condiciones internas adecuadas y faciliten la producción de etanol.

7. RECOMENDACIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos y para siguientes investigaciones se recomienda:

1. Para elaborar etanol a partir de cascara de piña *Ananas comosus* se requiere utilizar cascara de piña fresca previamente seleccionadas descartando aquellas que presentaban daño causado por insectos o presencia de enfermedades para obtener un mayor rendimiento en la extracción del etanol y para realizar las pruebas de control de la fermentación alcohólica.
2. Es muy importante que todas las fases del proceso puedan ser controladas, para que los resultados sean más eficientes en cuanto al nivel de grados brix y de pH.
3. Es necesaria más investigación de las variables que intervienen en el proceso fermentativo, no consideradas en este estudio, tales como la concentración de microorganismo, temperatura, cantidad de oxígeno disuelto en el medio y agitación, con el objetivo de aumentar el rendimiento de producción de etanol y reducir el tiempo de fermentación alcohólica en el proceso.
4. Realizar una doble destilación de los mostos fermentados para la obtención de mayor contenido de alcohol.
5. Realizar estudios futuros sobre la determinación de la mejor relación brix-pH en la fermentación utilizando diversos residuos como materias primas.
6. Se debe estudiar más sobre los tiempos de fermentación más convenientes para la producción de bioetanol a partir de residuos orgánicos.
7. Hacer un análisis de los costos de producción del bioetanol para definir la viabilidad o no del uso de residuos orgánicos.

8. Se deben estudiar más las características de los subproductos del procesamiento de residuos de cascaras de piña y determinar si se puede dar algún uso a los mismos.
9. Realizar un estudio para determinar la concentración de levadura que permita obtener el mayor valor de grados alcohólicos (GA) y pueda efectuar una disminución de tiempos de fermentación para la elaboración de etanol.
10. En la determinación de etanol producido se recomienda hacer pruebas más rigurosas como cromatografías, para tener un dato más exacto de la cantidad de etanol presente en las muestras fermentadas y además poder reconocer que otros compuestos están presentes en estas, para poder comparar la calidad del bioetanol obtenido.
11. Para posteriores investigaciones se recomienda hacer experimentaciones a nivel laboratorio variando la proporción de diferentes subproductos o residuos de un proceso industrial que se utilicen como sustratos y poder determinar que residuos ricos en azúcares pueden aumentar o disminuir la producción de bioetanol.
12. Realizar estudios de comparación de la producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* con la de otros microorganismos y levaduras que también son capaces de producir etanol tales como *Torulopsis*, *Kloeckera*, *Candida*, *Zimomonas*, *Mucor*, *Aspeguillus*, etc. para aumentar el estudio del comportamiento metabólico involucrado en la fermentación alcohólica.
13. Realizar la curva de crecimiento de las levaduras o cepas a estudiar, para determinar con precisión las fases de ésta, y así determinar el tiempo óptimo de inoculación previo a la fermentación y el tiempo total del proceso.
14. Realizar estudios de hidrolisis enzimática de compuestos lignocelulosicos para aumentar la concentración de azucars fermentables y aumentar la producción del alcohol a partir de residuos agroindustriales.
15. Tanto la piña como otros productos agrícolas, generan grandes cantidades de desecho por lo que es recomendable el desarrollo de nuevas alternativas ecológicas para reutilizar material que al momento solo contamina y que genera una problemática ambiental.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Acosta Romero, Carolina. Evaluación de la Fermentación Alcohólica para la Producción de Hidromiel. Universidad Nacional de Colombia, 2012. p. 6. 144.
2. Adegbite O., O. Oni, y I. Adeoye. 2014. Competitiveness of pineapple production in Osun State, Nigeria. *Journal of Economics and Sustainable Development* 5(2): 205-214.
3. Albán García, C. & Carrasco Ordóñez, J. (2012). Elaboración de una Bebida Alcohólica Destilada, evaluando dos niveles de levadura utilizando como sustrato Papa China (*Colocasia esculenta*) y Camote (*Ipomoea batatas* L). Tesis para la Obtención del Título de Ingenieros Agroindustriales. Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Escuela de Ingeniería Agroindustrial.
Disponible en:
<http://www.biblioteca.ueb.edu.ec/bitstream/15001/1049/1/0.34%20AI.pdf>
4. Amerine M.A. & Ough C.S. (). *Análisis de vinos y mostos*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
5. Angulo Valencia, Alexandra E. 2010. "Efectividad de microorganismos nativos en relación a *Aspergillus niger*, *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 y *Zymomonas Mobilis* para la producción de bioetanol a partir de residuos de sandía *Citrullus lanatus* a escala piloto". Escuela Politécnica del Ejército. p. 40-45; 63.

6. Antonio Cruz Rocío, Ana M. Mendoza Martínez, M. Yolanda Chávez Cinco, J. Luis Rivera Armenta, M. Javier Cruz Gómez. 2011. "Aprovechamiento del bagazo de piña para obtener celulosa y etanol". *Afinidad LXVLLL*, 551. México, D.F. Enero – Febrero: 38-43.
7. Araya Sánchez R., 1998. "Utilización del rastrojo de piña (*Ananas comusus*) para la obtención de pulpa para la producción de papel". Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Universidad de Costa Rica. Escuela de Ingeniería. San José, Costa Rica.
8. Araya-Cloutier Carla, Carolina Rojas-Garbanzo y Carmela Velázquez-Carillo. 2010. "Síntesis de ácido láctico, a través de la hidrólisis enzimática simultánea a la fermentación de un medio a base de un desecho de piña (*Ananas comusus*), para su uso como materia prima en la elaboración de ácido poliláctico". *Revista Iberoamericana de Polímeros* Diciembre. 11(7), 407-416.
9. Arias Velázquez, C. J. y Toledo Hevia, J. 2000. Manual de manejo poscosecha de frutas tropicales (Papaya, piña, plátano, cítricos). Proyecto FAO, disponible http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ac304s/ac304s00.htm#toc.
10. Arimuya Manamu, Sandro Marvin y Edwin Roberto Tecco Pisco. 2014. "Obtención de etanol a partir del residuo lignocelulósico cervecero de la cervecería amazónica – Iquitos". Tesis para optar el Título de Ingeniero Químico. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Facultad de Ingeniería Química. Iquitos – Perú.
11. Bellido, C. (2013). *Obtención de bioetanol 2g a partir de hidrolizados de paja de trigo. Fermentación conjunta de los penta y hexa carbohidratos con Pichia stipitis*. Universidad de Valladolid.
12. Cáceres Palomino Efrain (2008). Manual Técnico para el Cultivo de la Piña. Proyecto: "Mejoramiento de la Producción del Cultivo de la Piña Mediante Sistemas Agroforestales en el Distrito de Perené - Chanchamayo". Proyecto Especial Pichis Palcazú. Perú.

13. Carhuacho, P. 2011. Mejoramiento de la Producción del Cultivo de Piña, mediante Sistemas Agroforestales en el Distrito de Perené - Chanchamayo. Junín, Perú.
14. Carvajal, D. (2009). *Comparación de la dinámica poblacional de nematodos en el cultivo de Piña (Ananas comosus) (L) Merr. híbrido md-2 bajo técnicas de producción convencional y orgánica la virgen de Sarapíqui, Heredia*. Instituto Tecnológico de Costa Rica Sede Regional San Carlos.
15. Casp A., Abril J. *Procesos de Conservación de Alimentos*. 2da Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 2003.
16. Centro de Estudios de Finanzas Públicas. (CEFP) 2002. "La problemática actual de la producción de piña en México". Cámara de diputados. Palacio legislativo de San Lázaro, D.F. México.
17. Comité Nacional Sistema-Producto piña (CNSPP) 2009. "Plan Rector Nacional". Veracruz. México.
18. Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria (COVECA). 2010. "Monografía de la Piña". Veracruz. México.
19. Crueger, W. y A. Crueger. *Manual de Microbiología Industrial*. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A. 1993. 1993.
20. Cubas Juárez Lissett M.; Oscar P. Seclén Leonardo; Noemí León Roque. Influencia del porcentaje de adición de quinua (*Chenopodium quinoa*), piña (*Ananas comosus* L. Merr) y nivel de dilución en la fortificación del néctar de manzana (*Malus domestica*) sobre la calidad del producto. *Agroind Sci* 6 (2016) 97-105. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Facultad de Ingeniería Química e Industrias Alimentarias, Departamento de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Lambayeque, Perú.
21. Cuervo Laura, Jorge Luis Folch, Rosa Estela Quiroz. 2009. "Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol". *BioTecnología*, Año, Vol. 13 No. 3: 11-25.

22. Díez, S. B. Obtención de Bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo: fermentación conjunta de los penta y hexa carbohidratos con *Pichia stipitis*. Universidad de Valladolid, Escuela de Ingenierías Industriales. 2013.
23. Drapcho, Caye M.; NGHIM, Nhuan Ph and Walker, Terry. Ethanol Production. En: McGraw Hill Professional, Access Engineering, 2008.
24. Dubán González Á. 2013. "Aprovechamiento de residuos agroindustriales para la producción de alimentos funcionales: una aproximación desde la nutrición animal". Trabajo de grado para optar al Título de Ingeniero de Alimentos. Corporación Universitaria Lasallista. Facultad de Ingeniería de Alimentos. Caldas- Antioquia. Colombia.
25. Duff, S. J. B. y Murray, W. D. 1996. "Bioconversion of forest products industry waste cellulosic to fuel ethanol: a review". Bioresour. Technol. 55: 1-33.
26. Duque Quinaya Sergio H. 2014. "Evaluación y simulación de la producción de glucosa a partir del plátano y sus residuos como alternativa competitiva en el mercado Nacional". Tesis Maestría Investigativa – Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Instituto de Biotecnología y Agroindustria. Colombia.
27. Ertola, O. R., Yantorno C. Mignone. *Microbiología industrial*. Editorial McGrawHill, Madrid. 2003.
28. Fajardo C., E. Sarmiento, 2008. "Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyce cereviseae*". Tesis. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. Facultad de ciencias Básicas. Bogota Colombia.
29. Fernández A, Briceida y Gómez S, Maite. 2011. "Determinación del grado de conversión global del jugo de piña en etanol por medio de la fermentación alcohólica". Título de Ingeniero Químico. Universidad Rafael Urdaneta. República Bolivariana de Venezuela.
30. Frazier, W. C. y D. C. Westhoff. *Microbiología de los alimentos*. Cuarta Edición. Zaragoza: Acribia, España. 2000.

31. Gallinar Tercero Ana Gabriel. Control robusto de columnas de destilación para mezclas binarias ideales. Universidad veracruzana. 2015.
32. García-Rosales, G., Longoria-Gándara, L. C., Martínez-Gallego, S. y González-Juárez, J. 2013. "Synthesis and Characterization of Carbon Conditioned with Iron Nanoparticles Using Pineapple-Peel". Scientific Research, Advances in Nanoparticles 2: 384-390.
33. Garzón Castaño Sandra Catalina., Catalina Hernández Londoño. 2009 "Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. Tesis. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías. Escuela de Tecnología Química. Colombia.
34. Gil-Horán Ricardo Heliodoro, Rosa María Domínguez-Espinosa, Juan Daniel Pacho-Carrillo. 2008. "Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación". Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ) Vol. 23(2):79-90.
35. Gilces, P. (2006). *Estudio del uso de los nutrientes para la levadura en fermentación con el propósito de mejorar la producción del alcohol etílico*. Guayaquil - Ecuador: Universidad de Guayaquil.
36. Gómez, G.J. y C. Nieto. *Compendio de Bioquímica Ilustrada*. Universidad Nacional Agraria La Molina. Peru. 2002.
37. Gonzales Lázaro Miriam. 2014. "Caracterización bioquímica y biotecnológica de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* GL15". Tesis Máster en Química Avanzada. Universidad de la Rioja. Servicio de Publicaciones.
38. González-Sánchez María E., Sergio Pérez-Fabiel, Arnoldo Wong-Villarreal, Ricardo Bello-Mendoza y Gustavo Yanez-Ocampo. 2015. "Residuos agroindustriales con potencial para la producción de metano mediante la digestión anaerobia". Rev. Argent Microbiol. 47(3): 229-235.
39. Guzmán Romero Raúl Alberto. 2013. "Obtención de licor mediante la destilación del fermentado de piña y pera". Tesis para obtener Título de Ingeniero Químico

- Industrial. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas. México D.F.
40. Hernández Duarte Sandra Yesenia y Carlos Ernesto Martínez Torres. 2012. "Obtención de etanol por vía fermentativa a partir de cáscaras de *Ananas comosus* (piña) evaluando dos de sus principales variables (pH y grados Brix) usando como microorganismo productor *Saccharomyces cerevisiae*". Tesis de licenciatura. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. El Salvador.
 41. Hernández Neria Gerardo, Arturo Santamaría Ortega, Miguel Angel Rubio Toledo. 2015. "Aprovechamiento concientizado de los residuos como materia prima para el diseño de nuevos productos". Revista Iberoamericana de Ciencias. RelbCi – Septiembre. Vol. 2(5): 71-81.
 42. INDECOPI. NTP 203.070. Determinación de Acidez.
 43. INDECOPI. NTP 209.264. 2001. Determinación de humedad. Método gravimétrico. 1ª Edición.
 44. INDECOPI. NTP 211.034:2012. Bebidas Alcohólicas. Alcohol etílico. Método de ensayo. Determinación de residuo no volátil. 2ª Edición. Reemplaza a la NTP 211.034:2003.
 45. Jaelani, A. 2013. Sirup Kulit Nanas Yang Bervitamin dan Ekonomis. Surabaya : Balai Diklat Keagamaan.
 46. Jaramillo Henao Gladys y Liliana María Zapata Márquez. 2008. "Aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos en Colombia". Monografía para optar el título de Especialistas en Gestión Ambiental. Universidad de Antioquia. Facultad de Ingeniería. Especialización en Gestión Ambiental. Colombia.
 47. Jensen, P. (2004). *Producción de Etanol a partir de jaca*. Universidad de Queensland.

48. Jiménez Bustamante, José Miguel. 2014. "Aprovechamiento de residuos celulósicos de piña para la producción de carbón activado". Tesis. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Químicas. Xalapa. México.
49. López A., Molina M., Huguet S., Estudio comparativo de la producción de etanol vía fermentativa utilizando cuatro sustratos preparados a partir de banano maduro. *Ingeniería* 14 (1,2): 67-77, ISSN:1409-2441; 2004. San José, Costa Rica.
50. Luckow, T.; Delahunty, C. 2004. Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. *Food Quality Preference*, 15: 751–759.
51. Madigan, M.T, Martinko, J.M.. Brock. *Biología de los Microorganismos*. 12a. Ed. Pearson. Madrid. España. 2009.
52. Martínez T. J. 2002. "Ecología de las levaduras, selección y adaptaciones vínicas". Tesis doctoral. Universitat Rovira I Virgili Departament de Bioquímica I Biotecnologia. Facultat D'Enologia. Tarragona. España.
53. Mathews, C.K., K.E. Van Holde Y K.G. Ahern. *Bioquímica*. España. Editorial Pearson. Tercera Edición. 2004.
54. McKee, Trudy & James McKee. *Las bases moleculares de la vida*. En *BIOQUÍMICA*. Mc Graw Hill. Quinta Edición. 2014.
55. Ministerio de Agricultura y Riego. 2014 - Oficina de Estudios Económicos y Estadísticos. Disponible en: <http://minagri.gob.pe/portal/objetivos/151-herramientas/organos-de-apoyo/2287-oficina-deestudios-economicos-yestadisticos>.
56. Mitis Madroñero Hector Willian. 2015. "Evaluación del proceso de extracción de etanol a partir de: *Ananas comosus* (piña), *Citrus reticulata* (naranja) Y *Musa paradisiaca* (banano) de la zona central de Ecuador". Tesis de grado previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Facultad de Ciencias de la Ingeniería. Escuela de Ingeniería para el Desarrollo Agroindustrial. Carrera de Ingeniería Agroindustrial.

57. Monsalve G., J., Medina de Pérez, V., & Ruiz Colorado, A. (2006). *Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y almidón de yuca*. Dyna, Año 73, Nro. 150, pp. 21-27. Medellín, Noviembre de 2006. ISSN 0012-7353
58. Montilla, M., & Álvarez, C. 2007. Producción de alcohol Etílico a partir de cáscara de piña (*Ananas sativus*). *ALIMENTICA*. N°6: 22-25.
59. Morales, Madelaide., Maria Soledad Hernández., Marco Cabezas., Jaime Barrera y Orlando Martínez. 2001. "Caracterización de la maduración del fruto de pina nativa (*Ananas comosus* L. Merrill) CV. India". En: *Agronomía colombiana*. vol. 18, No. 1-2, p. 63-69.
60. Nieto, H. (2009). *Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando Saccharomyces cerevisiae y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol*. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército.
61. Nigam, J.N. 2000. "Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells". *Journal of Biotechnology*. 80: 189-193.
62. Olivares Pérez, R. J. 2003. "Influencia de diferentes dosis de productos inductores de la floración (carburo de calcio y Ethrell), en dos variedades de piña (*Ananas comosus* (L) Merril) sobre la calidad poscosecha". Tesis profesional. Universidad Nacional Agraria. Nicaragua.
63. Ovando-Chacón SL & Waliszewski KN 2005. "Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos". *Universidad y Ciencia*, 21: 111-120.
64. Peña, C. (2008). evaluación de la producción de etanol utilizando cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de melaza de caña de azúcar. *www.redalyc.org*, <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49611945017>.
65. Pérez J, Muñoz-Dorado A, De la Rubia T & Martínez, E. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5: 53–63.

66. Prescott S., & C. D. Gordon. *Microbiología Industrial*. 3ª ed. Editorial aguilar, S.A. Madrid.1992.
67. Quesada-Solís, K., Alvarado-Aguilar, P., Silbaja-Ballesteros, R. y Vega-Baudrit, J. 2005. "Utilización de las fibras del rastrojo de piña (*Ananas comusus*, variedad champaka) como material de refuerzo en resinas de poliéster". Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen 6(2). España.
68. Ramírez Nieto, G., & Pedroza Florez, J. (2001). *Desarrollo de una fermentación alcohólica a pH regulado y temperatura de 25°C en el Biorreactor Bioflo 3000 M1227 y estudio inicial de fermentaciones en sistema continuo*. Bogotá: Universidad de La Sabana.
69. Ramulu, P. & Udayasekhara Rao, P. 2003. "Total, insoluble and soluble dietary fiber contents of Indian fruits". *Journal of Foods composition and Analysis* 16(6): 677-685.
70. Reyes Karla Anabella. 2014. "Diseño de investigación para incremento de la productividad en el proceso de envasado; utilizando vinagre de cáscara de piña obtenido por fermentación doble alcohólica y acética, en una empresa Guatemalteca". Tesis para optar el título de Ingeniero Químico. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química.
71. RÍOS C., M. FAJARDO, J. PÉREZ, 2005. Evaluación de una cepa de levadura para fermentar diferentes concentraciones de miel *Apis mellifera*. Estación experimental apícola. Cuba.
72. SALOMÓN, Roberto. Propiedades fisicoquímicas del alcohol etílico. [en línea]. Colombia: Estudiantes del litoral. 2001. [Fecha de consulta: 21 noviembre del 2016]. Disponible en:
<http://www.cubasolar.cu/biblioteca/energia/Energia29/HTML/articulo07.htm>
73. Sánchez Riaño, G. M. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Tumbaga*, 61-83.

74. Sandoval, I. (2011). *Guía técnica del cultivo de la piña*. El Salvador: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova".
75. Santamaría P. López R. Gutiérrez A.R. García-Escudero E. 1995. Influencia de la temperatura en la fermentación alcohólica. INIA (España).; 7: 137-197.
76. Santos Aguilar Judith y Diego Andrés Zabala García. Evaluación de la producción de etanol a partir de residuos orgánicos y sus diferentes mezclas, generados en la empresa de alimentos SAS S.A.S. Fundación Universidad de América. Facultad de Ingenierías. Programa de Ingeniería Química. Bogotá. 2016.
77. Saval, Susana. 2012. "Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro". *Biotecnología*, Vol. 16(2): 14-46. México, D.F.
78. Swaroopa Rani, R., & Krishna, N. 2004. "Ensilage of pineapple processing waste for methane generation". *Science Direct*, 523–528.
79. Tejada Lesly P., Candelaria Tejada, Ángel Villabona, Mario R. Alvear, Carlos R. Castillo, Daniela L. Henao, Wilfredo Marimón, Natali Madariaga, Arnulfo Tarón. 2010. "Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña". Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias. (Colombia). *Revista Educación en Ingeniería*. N° 10: 120-125.
80. Tewari, H.K.; Marhawa, S.S.; Rupal, K; Kennedy, J.F. 1987. "Bio-utilization of pineapple wastes for ethanol generation. In *Wood and Cellulosics: Industrial utilization, biotechnology, structure and properties*". Eds. Kenney, J.F.; Phillips, G.O. & Williams, P.A.: 251-259. Chichester: Ellis Horwood.
81. Tomasso Mauricio. 2004. Tolerancia de las levaduras al etanol. Universidad de la República Uruguay. Facultad de Química.
82. Torija Ma. Jesús, Nicolas Rozes, Montse Poblet, Jose Manuel Guillamon, Albert Mas. 2002. "Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*". *International Journal of Food Microbiology* 80 () 47 – 53.

83. Triana Carantón, Cristian Fernando. Producción De Bioetanol a Partir De Residuos Provenientes Del Cultivo De Café. Universidad Nacional de Colombia - Sede Manizales, 2010. p. 35. Repositorio Universidad Nacional de Colombia.
84. Vázquez H.J. y Da costa O. 2007. "Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas". Ingeniería Investigación y Tecnología México Distrito Federal, VIII. 4. 249-259.
85. Vincent, M. *Química Industrial Orgánica*. España: Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. 2006.
86. Ward, Owen P. *Bioteología de la fermentación*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. 1991.
87. Wright, J. D. 1998. "Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis". Chem. Eng. Prog. 84 (8): 62-74.
88. Zambrano Bedón, G. 2013. "Estudio Técnico-Económico para la obtención de alcohol a partir de camote (Ipomea batata)". Tesis de Grado para la Obtención de Título de Ingeniería Química. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador.
89. Zuzuarregui Miró A. 2005. "Caracterización fisiológicas y moleculares de cepas vínicas de *Saccharomyces sp.* Influencia entre su comportamiento de vinificación". Tesis doctoral. Valencia: *Servei de Publicacions*, Universidad de Valencia. España.