

UNIVERSIDAD NACIONAL
FEDERICO VILLARREAL

Vicerrectorado de
INVESTIGACIÓN

ESCUELA UNIVERSITARIA DE POSGRADO

TESIS

**“BIOTRANSFORMACIÓN DE CÁSCARAS DE *Ananas comosus*
(PIÑA) PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL EN EL MARCO DE
DESARROLLO SOSTENIBLE DE LAS REGIONES PRODUCTORAS
DEL PERÚ”**

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTOR EN MEDIO AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE

AUTOR:

DECHECO EGÚSQUIZA ALICIA CECILIA

ASESOR:

DR. CIRO RODRIGUEZ RODRIGUEZ

JURADO:

DR. ROSADIO BERNAL RAÚL

DRA. RAMOS VERA JUANA ROSA

DR. MORALES GODO ÁNGEL FRANCISCO

LIMA – PERÚ

2019

DEDICATORIA

A Dios, por iluminar cada día mi camino.

A la memoria de mis queridos padres Emilia Josefina y Luis Cesar Augusto y a mi hermana Rosa a quienes recuerdo con gran cariño y siempre han sido una guía y ejemplo en mi camino.

A mi madre por haberme inculcado que la educación es la herramienta principal para enfrentar a la vida y por su apoyo inquebrantable.

A mis hermanas Elena y Lidia y mis hermanos Lucho y Sergio porque siempre serán una parte de mí.

A mi hijo Álvaro el gran soporte de mi vida; quien me impulsa a ser mejor persona cada día y me otorga su amor, comprensión y apoyo para superar cualquier dificultad y por su motivación para seguir en busca de mis sueños.

Agradecimientos

A la Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos de la Universidad Nacional del Callao, por el gran apoyo y respaldo brindado durante la realización del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Ciro Rodríguez Rodríguez, quien no solo me asesoró, sino también, cultivó en mí el hábito de investigar y me orientó a lo largo del desarrollo y culminación de esta tesis.

Al Dr. Stalein Jackson Tamara Tamariz por su apoyo en la interpretación de los análisis estadísticos de la presente investigación.

A mis profesores del Doctorado de Medio ambiente y Desarrollo sostenible de la Universidad Nacional Federico Villarreal por contribuir a la construcción de conocimientos en el ámbito del desarrollo sostenible que permitan la solución de los problemas ambientales y del desarrollo acorde a la realidad nacional e internacional.

A todas las personas que de manera directa o indirecta han colaborado en la realización de la presente tesis.

ALICIA DECHECO E.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE CONTENIDOS	4
ÍNDICE DE TABLAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	14
ÍNDICE DE GRAFICOS	18
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	20
RESUMEN	21
ABSTRAC	22
RIASSUNTO	23
INTRODUCCIÓN	24
CAPÍTULO I	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
1.1. Descripción del problema	27
1.1.1. Delimitación del problema	27
1.2. Formulación del Problema	28
1.3. Justificación e importancia de la investigación	29
1.3.1. Justificación	29
1.3.2. Importancia	30
1.4. Limitaciones de la Investigación	33

1.5. Objetivos	34
1.5.1. Objetivo General	34
1.5.2. Objetivos Específicos	35
CAPÍTULO II	46
MARCO TEÓRICO	46
2.1. Antecedentes	36
2.1.1. Antecedentes internacionales	36
2.1.2. Antecedentes nacionales	41
2.2. Marco conceptual	41
2.2.1. Piña	42
2.2.2. Composición y valor nutritivo de la piña	46
2.2.3. Componentes de la Cáscara de piña	48
2.2.4. Componentes de la lignocelulosa	50
2.2.5. Etanol	55
2.2.6. Etapas de obtención de Etanol biolignocelulosico	56
2.2.7. Hidrólisis enzimática	60
2.2.8. Fermentación	63
2.2.9. Fermentación Alcohólica	64
2.2.10. Microorganismos fermentadores	67
2.2.11. Destilación	71
2.3. Aspectos de responsabilidad social y medioambiental	71

2.3.1. Desarrollo sostenible	72
2.3.2. Aprovechamiento y valoración de la piña	73
2.3.3. Situación de la obtención de alcohol	75
CAPÍTULO III	77
MÉTODO	77
3.1. Tipo de Investigación	77
3.1.1. Diseño de la investigación	79
3.1.2. Diseño Experimental de Investigación	80
3.1.3. Estrategia de Prueba de Hipótesis	82
3.2. Población y muestra	83
3.3. Hipótesis	84
3.4. Operacionalización de las variables	85
3.4.1. Variables	85
3.4.2. Operacionalización de las variables	86
3.5. Instrumentos	89
3.5.1. Técnicas de Investigación	89
3.5.2. Instrumentos de recolección de datos	91
3.6. Procedimiento	93
3.6.1. Metodología	93
3.6.2. Procedimiento metodológico de cada etapa de la investigación	95
3.7. Análisis de Datos	109

CAPÍTULO IV	111
PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	111
4.1. Contrastación de Hipótesis	111
4.2. Análisis e Interpretación	112
4.2.1. Comparación de los Grados alcohólicos (°A) del mosto sin destilar obtenidos respecto a sólidos solubles (°Bx) y los tiempos de fermentación	113
4.2.1.1. Contrastación de la Hipótesis general para el grado alcohólico del mosto	114
4.2.1.2. Contrastación de la Hipótesis específica 1 para el grado alcohólico del mosto	116
4.2.1.3. Contrastación de la Hipótesis específica 2 para el Grado alcohólico del mosto	118
4.2.1.4. Contrastación de la Hipótesis específica 3 para el grado alcohólico del mosto	120
4.2.2. Comparación del porcentaje de etanol destilado (%Et) obtenido respecto a sólidos solubles (°Bx) y los tiempos de fermentación (TFer)	124
4.2.2.1. Contrastación de la Hipótesis general para el porcentaje de etanol destilado	125
4.2.2.2. Contrastación de la Hipótesis específica 1 para el porcentaje de etanol destilado	127

4.2.2.3. Contrastación de la Hipótesis específica 2 para el porcentaje de etanol destilado	129
4.2.2.4. Contrastación de la Hipótesis específica 3 para la calidad del etanol obtenido	131
4.2.3. Comparación del porcentaje de rendimiento del etanol (%Ret) obtenido respecto a sólidos solubles (°Bx) y los tiempos de fermentación (TFer)	137
4.2.3.1. Contrastación de la Hipótesis general para el porcentaje de rendimiento del etanol destilado	137
4.2.3.2. Contrastación de la Hipótesis específica 1 para el porcentaje de rendimiento del etanol destilado	139
4.2.3.3. Contrastación de la Hipótesis específica 2 para el porcentaje de rendimiento del etanol destilado	141
4.2.3.4. Contrastación de la Hipótesis específica 3 para el porcentaje de rendimiento del etanol destilado	143
CAPÍTULO V	148
5.1. Discusión	148
5.1.1. Primera Etapa Experimental: Pretratamientos	148
5.1.2. Segunda Etapa Experimental: Proceso fermentativo de los mostos hidrolizados de las cáscaras de piña por	

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	151
5.1.3. Tercera Etapa Experimental: destilación y caracterización del etanol	156
5.1.4. Discusión General	160
5.2. CONCLUSIONES	165
5.3. RECOMENDACIONES	168
CAPÍTULO VI	170
REFERENCIAS	170
CAPÍTULO VII	194
ANEXOS	194
7.1. Definición de términos	194
7.2. Fichas de la enzima	196
7.3. Tablas de Resultados	198
7.4. Evidencias Fotográficas	204
7.5. Matriz de Consistencia	225

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación botánica de la Piña <i>Ananas comosus</i>	42
Tabla 2. Determinaciones químicas proximales a muestras representativas de piña (<i>Ananas comosus</i>)	47
Tabla 3. Características fisicoquímicas de la Piña (<i>Ananas comosus</i>)	48
Tabla 4. Componentes químicos proximales de la cáscara de piña seca y fresca	49
Tabla 5. Propiedades Fisicoquímicas del etanol	55
Tabla 6. Tipos de pretratamientos para materiales Lignocelulósicos	59
Tabla 7. Parámetros de operación de la Celulasa para la hidrólisis enzimática	61
Tabla 8. Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
Tabla 9. Aplicaciones de alcohol etílico en la industria	75
Tabla 10. Operacionalización de la variable de Sólidos solubles (°Bx)	86
Tabla 11. Operacionalización de la variable Tiempo de fermentación (TFer)	87
Tabla 12. Operacionalización de la variable Grado alcohólico del mosto (°A)	87
Tabla 13. Operacionalización de la variable Porcentaje Etanol destilado (%Et)	88
Tabla 14. Operacionalización de la variable Porcentaje rendimiento de etanol destilado (%REt)	88

Tabla 15. Análisis de variancia del Grado alcohólico del Mosto versus los sólidos solubles (Grados Brix) y los tiempos de fermentación (TFer)	115
Tabla 16. Análisis estadístico de comparaciones múltiples de Tukey del efecto de los sólidos solubles (°Brix) para la variable dependiente: Grado alcohólico (°A)	117
Tabla 17. Análisis estadístico de comparaciones múltiples de Tukey del efecto del tiempo de fermentación (TFer) para la variable dependiente: Grado alcohólico (°A)	119
Tabla 18. Superficies de respuesta y optimización del Grado alcohólico del mosto sin destilar según el grado Brix y el tiempo de fermentación (TFer)	121
Tabla 19. Coeficientes de regresión múltiple estimados de Grado Alcohólico del mosto	122
Tabla 20. Análisis de variancia de pruebas post hoc del tiempo de fermentación (TFer) para la variable dependiente: Porcentaje de Alcohol Destilado (%Et)	126
Tabla 21. Análisis estadístico de comparaciones múltiples de Tukey del efecto de los sólidos solubles (°Bx) para el porcentaje de etanol (% Et)	128

Tabla 22. Análisis estadístico de comparaciones múltiples de Tukey del efecto del tiempo de fermentación (Tfer) para el Porcentaje de etanol (% Et)	130
Tabla 23. Superficie de respuesta y optimización del porcentaje de etanol destilado (% Et) según el grado Brix y el tiempo de fermentación (TFer)	133
Tabla 24. Coeficientes de regresión múltiple estimados del Porcentaje de etanol destilado (% Et)	134
Tabla 25. Análisis estadístico de variancia de pruebas post hoc del tiempo de fermentación (Tfer) para la variable dependiente: Porcentaje de etanol destilado (% Et)	138
Tabla 26. Análisis estadístico de DHS de Tukey de los sólidos solubles (Grados Brix) para la variable dependiente: Calidad del etanol obtenido expresada por el Porcentaje de rendimiento de etanol destilado (% REt).	140
Tabla 27. Análisis estadístico de comparaciones múltiples de Tukey del tiempo de fermentación (Tfer) para la variable dependiente: Calidad del etanol obtenido expresada por el Porcentaje de rendimiento de etanol destilado (% REt)	142
Tabla 28. Superficie de respuesta y optimización del porcentaje de rendimiento de obtención de etanol (% REt) según el grado Brix y el tiempo de fermentación (TFer)	144

Tabla 29. Coeficientes de regresión múltiple estimados del	
Porcentaje de rendimiento de obtención de etanol (% REt)	145
Tabla 30. Balances de materia para la obtención de etanol de cáscaras	
de Piña	148
Tabla 31. Variaciones promedio de los sólidos solubles (°Br) de los	
mostos de cáscara de piña en los diferentes tratamientos	
durante el tiempo de fermentación	153
Tabla 32. Ficha Técnica enzima Gramozyme celulasa	196
Tabla 33. Certificado de Análisis. Gramozyme Celulasa	197
Tabla 34. Relación entre los Grados Brix y tiempos de fermentación	
de los mostos de cáscara de piña con los grados alcohólicos	
(°A) obtenidos en cada tratamiento	198
Tabla 35. Relación entre los Grados Brix y tiempos de fermentación	
de los mostos de cáscara de piña con el porcentaje de etanol	
destilado (%Et) en cada tratamiento	200
Tabla 36. Relación entre los Grados Brix y tiempos de fermentación	
con el Porcentaje de rendimiento del etanol destilado (%Et)	
en cada tratamiento	202

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras morfológicas de la planta de piña (<i>Ananas comosus</i>)	43
Figura 2. Principales regiones productoras de piña en el Perú	44
Figura 3. Principales variedades de piña en el Perú	45
Figura 4. Organización estructural de los componentes lignocelulósicos	50
Figura 5. Conformación de la Celulosa	52
Figura 6. Interacción de polisacáridos y proteínas de la pared celular	52
Figura 7. Conformación de la Hemicelulosa	53
Figura 8. Estructura de la Lignina	54
Figura 9. Proceso de obtención de etanol lignocelulósico	57
Figura 10. Cambio estructural del material lignocelulósico luego de un pretratamiento	58
Figura 11. Hidrólisis de la celulosa amorfa y microcristalina	62
Figura 12. Ruta metabólica de la fermentación alcohólica	65
Figura 13. Imágenes de levaduras en microscopio óptico	69
Figura 14. Enfoque de Desarrollo Sostenible	73
Figura 15. Diagrama del procedimiento metodológico completo aplicado para la obtención de Etanol por biotransformación de cáscaras de piña de la variedad Golden. (Etapas experimentales 1, 2 y 3)	81

Figura 16. Diagrama del procedimiento metodológico aplicado para el tratamiento y estandarización de las cáscaras de piña (Etapa 1).	97
Figura 17. Diagrama del procedimiento metodológico del proceso aplicado para la hidrólisis enzimática (HE) por las enzimas celulasas a partir de mostos de cáscara de piña. (Etapa 1)	100
Figura 18. Diagrama del procedimiento metodológico aplicado en la Etapa experimental 2	105
Figura 19. Diagrama del procedimiento metodológico aplicado para la Separación del etanol por destilación a partir del mosto alcohólico y la caracterización final del etanol (Etapa 3)	108
Figura 20. Equipos utilizados	204
Figura 21. Materiales utilizados	205
Figura 22. Reactivos utilizados	206
Figura 23. Selección, lavado, pesado y trozado de las cáscaras de piña (Etapa 1)	207
Figura 24. Tratamiento térmico, enfriamiento, licuado de las cáscaras de piña (Etapa 1)	208
Figura 25. Acondicionamiento de mostos en frascos esterilizados para su tratamiento térmico en autoclave (Etapa 1)	209
Figura 26. Hidrólisis enzimática de las cáscaras de piña con Celulasa al 2%. (Etapa 1)	210

Figura 27. Control de grados Brix y pH de los hidrolizados enzimáticos (Etapa 1)	211
Figura 28. Tratamiento térmico de mostos hidrolizados a 85°C por 10 minutos para inactivar la enzima Celulasa. (Etapa 1)	212
Figura 29. Filtración de mostos hidrolizados (Etapa 1)	212
Figura 30. Preparación de las muestras para analizar azúcares reductores (Método Eynon-Lane). (Etapa 1)	213
Figura 31. Prueba cuantitativa de determinación de azúcares reductores método volumétrico de Eynon-Lane. (Etapa 1)	214
Figura 32. Preparación y activación de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (Etapa 2)	215
Figura 33. Proceso fermentativo de las cáscaras de piña por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Inoculación de la levadura (Etapa 2)	216
Figura 34. Proceso fermentativo de las cáscaras de piña por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Fermentación alcohólica (Etapa 2)	217
Figura 35. Proceso de destilación para la obtención de etanol destilado (Etapa 3)	218
Figura 36. Destilados del tratamiento de 14 grados Brix en 48, 72, 96 y 120 horas de fermentación (Etapa 3)	219

Figura 37. Destilados del tratamiento de 17 grados Brix en 48, 72, 96 y 120 horas de fermentación (Etapa 3)	220
Figura 38. Destilados del tratamiento de 20 grados Brix en 48, 72, 96 y 120 horas de fermentación (Etapa 3)	221
Figura 39. Destilados del tratamiento de 23 grados Brix en 48, 72, 96 y 120 horas de fermentación (Etapa 3)	222
Figura 40. Prueba de acidez titulable del etanol destilado de cada tratamiento	223
Figura 41. Determinación por alcolimetría del porcentaje de etanol destilado obtenido en cada tratamiento	224

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Gráfica de superficie de respuesta del grado alcohólico (°A) del mosto sin destilar versus el tiempo de fermentación y grado Brix	122
Gráfico 2. Superficies de respuesta y optimización del grado alcohólico (°A) del mosto sin destilar según el grado Brix y el tiempo de fermentación	123
Gráfico 3. Coeficiente de correlación de Pearson del grado alcohólico (°A) del mosto sin destilar con el porcentaje de etanol destilado (%Et)	132
Gráfico 4. Superficie de respuesta y optimización del Porcentaje de Etanol destilado (%Et) versus los sólidos solubles (grados Brix) y el tiempo de fermentación	135
Gráfico 5. Superficie de respuesta y optimización del Porcentaje de Etanol destilado (% Et) versus los sólidos solubles (grados Brix) y el tiempo de fermentación (TFer)	136
Gráfico 6. Gráfica de superficie de respuesta y optimización del porcentaje de rendimiento de obtención de etanol destilado (%REt) versus el tiempo de fermentación y los sólidos solubles (°Brix)	146
Gráfico 7. Análisis estadístico de las superficies de respuesta y optimización del porcentaje de rendimiento de obtención de etanol (%REt) versus el tiempo de fermentación y los sólidos solubles (°Brix)	147

Gráfico 8. Variaciones promedio de los sólidos solubles (°Bx) durante el tiempo de fermentación (TFer)	152
Gráfico 9. Relación entre los sólidos solubles (°Brix) y Tiempos de fermentación (TFer) con el grado alcohólico (°A) de los mostos obtenidos de cáscara de piña en cada tratamiento	154
Gráfico 10. Relación entre los sólidos solubles (°Bx) y Tiempos de fermentación (TFer) con el Porcentaje de etanol destilado (%Et) obtenido de la cáscara de piña en cada tratamiento	156
Gráfico 11. Relación entre los sólidos solubles (°Brix) y Tiempos de fermentación (TFer) con el Porcentaje de rendimiento del etanol destilado (%Et) obtenidos de cáscara de piña en cada tratamiento	158

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- ACL: Agua caliente en fase líquida
- °A: Grado Alcohólico
- °Be: Grados Baumé
- °Bx: Grados Brix
- HE: Hidrólisis enzimática
- HFS: Hidrólisis y fermentación por separado
- MPC: Material pretratado completo
- PF: Proceso fermentativo
- p/p: Relación peso/peso
- p/v: Relación peso/volumen
- r.p.m.: Revoluciones por minuto
- TIn: Tiempos de incubación
- TM: Tratamiento Mecánico (físico)
- TT: Tratamiento Térmico
- TFer: Tiempos de fermentación
- % Et: Porcentaje de etanol
- % REt: Porcentaje rendimiento de etanol

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo obtener etanol por *Saccharomyces cerevisiae* mediante la biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus* de la variedad Golden. Las variables independientes a controlar fueron los sólidos solubles (14, 17, 20 y 23 grados Brix) y el tiempo de fermentación (48, 72, 96 y 120 horas). La variable dependiente fue la Calidad del etanol obtenido expresada como Grado alcohólico del mosto, Porcentaje de etanol destilado y Porcentaje de rendimiento de etanol destilado. Existieron diferencias significativas para los sólidos solubles (°Brix) y los tiempos de fermentación versus la Calidad del etanol obtenido. El nivel de 23°Brix fue en el que se presentó un mayor aumento de grado alcohólico (7.23°A) a las 120 horas y un porcentaje de etanol destilado (67%) a las 96 horas de fermentación. Se determinó una correlación de Pearson fuerte positiva de 0.80085 entre el grado de alcohólico con el porcentaje de etanol. El análisis de superficie de respuesta y optimización determinó que los niveles de las variables que optimizan la obtención y calidad del etanol fueron los sólidos solubles de 23 °Brix y los tiempos de fermentación de 120 horas. Las cáscaras de piña tienen potencial para la obtención de etanol y los resultados sirven de punto de partida hacia estudios más detallados que determinen la factibilidad de utilizar el material lignocelulósico de las cáscaras de piña como materia prima y alternativa ecológica atractiva al valorizar los residuos de piña para reducir su impacto ambiental en el marco de desarrollo sostenible de las regiones productoras de piña del Perú.

Palabras clave: Desarrollo sostenible, cáscara de piña, fermentación, levadura, Etanol.

ABSTRAC

The objective of the present study was to obtain ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* through the biotransformation of pineapple peels *Ananas comosus* of the Golden variety. The independent variables to be controlled were the soluble solids (14, 17, 20 and 23 degrees Brix) and the fermentation time 48, 72, 96 and 120 hours). The dependent variable was the quality of the ethanol obtained expressed as the alcoholic strength of the must, the percentage of ethanol distilled and the percentage of yield of ethanol distilled. There were significant differences for soluble solids (°Brix) and fermentation times versus the quality of the ethanol obtained. The level of 23 °Brix was in which there was a greater increase in alcoholic strength (7.23 °A) at 120 hours and a percentage of distilled ethanol (67%) at 96 hours of fermentation. A positive strong Pearson correlation of 0.80085 was determined between the degree of alcoholic and the percentage of ethanol. The response surface analysis and optimization determined that the levels of the variables that optimize the obtaining and quality of the ethanol were the soluble solids of 23 °Brix and the fermentation times of 120 hours. Pineapple peels have the potential to obtain ethanol and the results serve as a starting point towards more detailed studies that determine the feasibility of using the lignocellulosic material of pineapple peels as an attractive raw material and ecological alternative when valorizing pineapple residues to reduce its environmental impact within the framework of sustainable development of the pineapple producing regions of Peru.

Key words: Sustainable development, pineapple peel, fermentation, yeast, Ethanol.

RIASSUNTO

L'obiettivo di questo studio era di ottenere l'etanolo da *Saccharomyces cerevisiae* attraverso la biotrasformazione delle bucce di ananas *Ananas comosus* della varietà Golden. Le variabili indipendenti da controllare erano i solidi solubili (14, 17, 20 e 23 gradi Brix) e il tempo di fermentazione (48, 72, 96 e 120 ore). La variabile dipendente era la qualità dell'etanolo ottenuto espresso come il titolo alcolometrico del mosto, la percentuale di etanolo distillato e la percentuale di resa di etanolo distillato. C'erano differenze significative per solidi solubili (°Brix) e tempi di fermentazione rispetto alla qualità dell'etanolo ottenuto. Il livello di 23 °Brix era in cui vi era un maggiore aumento del titolo alcolometrico (7,23 °A) a 120 ore e una percentuale di etanolo distillato (67%) a 96 ore di fermentazione. Una correlazione Pearson forte positivo di 0.80085 è stata determinata tra il grado alcolico e la percentuale di etanolo. L'analisi e l'ottimizzazione della superficie di risposta ha determinato che i livelli delle variabili che ottimizzano l'ottenimento e la qualità dell'etanolo sono stati i solidi solubili di 23 °Brix e i tempi di fermentazione di 120 ore. Le bucce di ananas hanno il potenziale per ottenere etanolo e i risultati servono come punto di partenza per studi più dettagliati che determinano la fattibilità dell'uso del materiale lignocellulosico delle bucce di ananas come materia prima interessante ed alternativa ecologica quando si valorizzano i residui di ananas ridurre il suo impatto ambientale nel quadro dello sviluppo sostenibile delle regioni produttrici di ananas del Perù.

Parole chiave: Sviluppo sostenibile, buccia d'ananas, fermentazione, lievito, etanolo.

INTRODUCCIÓN

La piña es una fruta utilizada para elaborar productos alimenticios, farmacéuticos, cremas cosméticas, etc. El fruto de la piña es el más utilizado pero sus ejes de inflorescencia, cáscara y tallo no son aprovechados por lo que el uso de estos residuos beneficiaría al medio ambiente.

Las cáscaras de piña son residuos sólidos que resultan al consumir directamente la fruta o al procesarlas para la obtención de jugo, mermeladas, vinagre y conservas de piña, y que ya no son útiles para el proceso que los generó, pero que pueden aprovecharse para generar un producto como el etanol con valor agregado económico, comercial y principalmente la eliminación de una fuente de contaminación del medio ambiente.

Se necesita usar materia prima renovable como la biomasa lignocelulósica para que no presenten problemas de seguridad alimentaria y contaminación ambiental debido a su disposición final inadecuada.

El principal objetivo de cualquier investigación debe sustentarse en aportar conocimientos y experiencias que ayuden al desarrollo de cierta actividad. El presente

estudio trata de sustentar las ventajas de utilizar las cáscaras que se generan en el proceso de la piña para obtener etanol.

El interés para desarrollar la presente investigación surge a partir de la falta de aprovechamiento adecuado de residuos sólidos de las cáscaras de piña y permitir el desarrollo sostenible de las regiones productoras del país que contribuiría a los mercados y empresas agroindustriales a disminuir los costos de la disposición de residuos y su efecto en el ambiente. Este trabajo pretende utilizar las cáscaras de piña para la biotransformación por la levadura de los componentes lignocelulósicos de las cáscaras de piña en etanol y se pueda obtener un valor económico ambiental.

Este trabajo de investigación es un aporte de beneficio para empresas de transformación de materia orgánica, industria química, industria farmacéutica, empresas agroindustriales y mercados para promover el aprovechamiento de residuos sólidos de vegetales como las cáscaras de piña y poder obtener con este insumo desechado un subproducto con valor agregado como el etanol teniendo en cuenta que las cáscaras de piña son un residuo muy a menudo no utilizado que podrían constituir una fuente de contaminación importante y que podrían ser aprovechados adecuadamente como una alternativa de interés con el fin de considerarse dentro del marco de desarrollo sostenible a largo plazo de las regiones productoras de Piña del Perú.

En el presente estudio se quiere explicar cómo se puede medir la dependencia de la variable dependiente obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* en la biotransformación de cáscaras de piña manipulando las variables independientes de contenido de sólidos solubles (Grados Brix) y de tiempos de fermentación (TFer) para ver cómo se relacionan las variables y cómo influyen en el metabolismo de azúcares por la levadura para producir etanol.

Los conocimientos derivados de la presente investigación contribuirán a un aprovechamiento adecuado de los residuos sólidos de las cáscaras de piña evitando su alteración y contaminación por su degradación ya que las cáscaras de piña son un residuo muy a menudo no utilizado que se puede alterar fácilmente y se quiere plantear una alternativa de interés dentro del marco de desarrollo sostenible en el seguimiento continuo del desarrollo a nivel ambiental, social y económico de las regiones productoras de piña del Perú mediante el uso de residuos desechados de la piña para permitir una sacarificación y fermentación y poder obtener un subproducto con valor agregado como el etanol.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción del problema

En las últimas décadas y actualmente los residuos agroindustriales sólidos, semisólidos o líquidos están siendo estudiados porque pueden aprovecharse o transformarse generando nuevos productos de valor agregado y son utilizados como insumo para generar productos, obtener bioenergéticos y para reducir el impacto ambiental que ocasionan. (Mejías et al., 2016).

Una opción atractiva es utilizar residuos de la agroindustria como insumo de bajo costo y obtener sustancias químicas refinadas (Gil, 2008). Debido a este motivo, se necesita buscar opciones energéticas limpias y medioambientales sostenibles como el bioetanol obtenido de residuos de la agroindustria. (Conesa, 2017).

1.1.1. Delimitación del problema

Espacial (geográfico)

En cuanto a la delimitación espacial del presente estudio, las etapas experimentales se realizaron en los laboratorios de la Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos de la Universidad Nacional del Callao.

Temporal

El estudio se realizó en un periodo de 12 meses. De setiembre del 2017 al mes de agosto del 2018.

1.2. Formulación del problema

Problema General

¿Cómo obtener etanol por *Saccharomyces cerevisiae* mediante la biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus* evaluando los sólidos solubles y el tiempo de fermentación?

Problemas Específicos

1. ¿Cómo es posible establecer a nivel de laboratorio los sólidos solubles para obtener etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus*?
2. ¿Cómo es posible establecer a nivel de laboratorio los tiempos de fermentación para obtener etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus*?
3. ¿Cómo es posible obtener a nivel de laboratorio etanol de calidad por biotransformación de cáscaras de piña de manera eficiente?

1.3. Justificación e importancia de la investigación

1.3.1. Justificación de la investigación

La piña es una fruta utilizada para elaborar jugos, mermeladas, vinagre, productos farmacéuticos, producción de cremas, etc. El fruto de la piña es más utilizado pero sus ejes de inflorescencia, cáscara y tallo no son aprovechados por lo que el uso de estos residuos beneficiaría al medio ambiente.

En nuestro país de la obtención de jugo, mermeladas y conservas de piña se producen gran cantidad de residuos sólidos como la cáscara, siendo conveniente utilizarlos para obtener productos de mayor valor agregado anulando una fuente contaminante del ambiente.

Para su aprovechamiento es importante contar con suficiente cantidad del residuo en el lugar de producción para que se asegure la obtención del producto de utilidad (Saval, 2012).

Del procesamiento de la piña, los desechos representan un 65% del fruto que se elimina luego del ciclo comercial, determinándose que se producen 300 TM de rastrojo por hectárea de piña (Araya, 1998).

El interés para desarrollar la presente investigación surge a partir de la falta de aprovechamiento adecuado de residuos sólidos de las cáscaras de piña y

permitir el desarrollo sostenible de las regiones productoras del país que contribuiría a los mercados y empresas agroindustriales a disminuir los costos de la disposición de residuos y su efecto en el ambiente.

Este trabajo pretende utilizar las cáscaras de piña para la biotransformación por la levadura de los componentes lignocelulósicos de las cáscaras de piña en etanol 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.

1.3.2. Importancia

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 cáscaras son desechadas sin conocer que estos pueden ser aprovechados para ser procesados y obtener subproductos como el etanol.

Los materiales lignocelulósicos son objeto de investigación, pero por su estructura compleja no es fácil acceder a los azúcares para fermentarlos y se deben implementar pretratamientos y estrategias eficientes para la fermentación y producción de etanol. (Liscano, 2014).

En su mayoría los residuos agroindustriales corresponden a biomasa lignocelulósica y lipídica que, pese a su dificultad de degradación en algunos casos, es posible desdoblarlos a monosacáridos y ésteres más simples mediante procesos físicos, químicos y/o biológicos. (Mejías et al., 2016).

Se puede obtener etanol de melazas, azúcares del agave, cereales, así como materiales lignocelulósicos que son biodegradables, y renovables por lo que su utilización es una opción sostenible y amigable con el medio ambiente (Arellano, 2015).

Los residuos industriales de la piña contienen glucosa, fructosa, sacarosa y porciones de celulosa y hemicelulosa que pueden ser hidrolizados y fermentados siendo una opción de bajo costo para obtener etanol (Conesa et al., 2012).

Por ello debemos considerar 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 (Monsalve et al., 2006).

El principal objetivo de cualquier investigación debe sustentarse en aportar conocimientos y experiencias que ayuden al desarrollo de cierta actividad. El presente estudio trata de sustentar las ventajas de utilizar las cáscaras de piña que se generan del proceso de la piña y obtener etanol.

Por lo tanto, se determinó el potencial para obtener etanol por biotransformación de cáscara de piña de la variedad Golden en condiciones de laboratorio a una temperatura constante de 30°C y nivel de pH de 4.5. Se realizó previamente un pretratamiento físico, térmico y una hidrólisis enzimática con celulasa al 2% para obtener un mayor contenido en azúcares fermentables.

Se evaluó la acción de fermentación de la levadura con diversos niveles de Sólidos solubles (14, 17, 20, 23 °Brix) y además se evaluaron los tiempos de fermentación (48, 72, 96 y 120 horas). Por medio del mejor resultado de producción de etanol destilado y grado alcohólico, se establecieron los niveles óptimos del contenido de Sólidos solubles iniciales y los tiempos de fermentación adecuados en los cuales se obtuvieron mayores grados alcohólicos, porcentaje de etanol y 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 y mercados para promover el aprovechamiento de residuos sólidos de vegetales como las cáscaras de piña y poder obtener con este insumo desechado un subproducto con valor agregado como el etanol teniendo en cuenta que las cáscaras de piña son un residuo muy a menudo no utilizado que podrían constituir una fuente de contaminación importante y que podrían ser aprovechados adecuadamente

como una alternativa de interés con el fin de considerarse dentro del marco de desarrollo sostenible a largo plazo de las regiones productoras de Piña del Perú.

1.4. Limitaciones de la investigación

Este estudio contempla obtener etanol por biotransformación de cáscara de piña de la variedad Golden siendo una investigación de tipo aplicada y nivel explicativo.

Esta investigación quiere explicar cómo se puede medir la dependencia de la variable dependiente obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* en la biotransformación de cáscaras de piña manipulando las variables independientes de contenido de sólidos solubles (Grados Brix o °Bx) y de tiempos de fermentación (TFer) para ver cómo se relacionan las variables y cómo influyen en el metabolismo fermentativo de la levadura teniendo así el presente estudio un nivel explicativo. La metodología es cuantitativa porque se desea medir con precisión las variables del estudio independientes y dependientes.

Los limitantes que restringieron el estudio fueron las siguientes:

- Existe poca información a nivel nacional de investigaciones sobre el empleo de cáscaras de frutas para obtener sustancias valoradas.
- Debido a su complejidad en la biomasa lignocelulósica de las cáscaras es necesario luego del pretratamiento físico de las cáscaras de piña realizar una hidrólisis química (ácida o alcalina) y biológica (enzimática) para obtener la cantidad necesaria de azúcares para la acción fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* cuyo producto final es el etanol.
- Aunque se conocen las diferentes formas de obtener bioetanol tales como la fermentación, aun no existen conocimientos sólidos de la extracción de bioetanol a partir de cáscaras de piña, a pesar de que existen investigaciones relacionadas en otros países sobre del tema. Aún se desconocen varios aspectos del proceso, como las condiciones operacionales de la fermentación que aumenten la eficiencia del proceso.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo General

Obtener etanol por *Saccharomyces cerevisiae* mediante la biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus* evaluando los sólidos solubles y el tiempo de fermentación.

1.5.2. Objetivos Específicos

1. Establecer a nivel de laboratorio los sólidos solubles para obtener etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus*.
2. Establecer a nivel de laboratorio los tiempos de fermentación para obtener etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus*.
3. Obtener a nivel de laboratorio etanol de calidad por biotransformación de cáscaras de piña de manera eficiente.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

2.1.1. Antecedentes internacionales

Se registra en la Universidad Estatal de Kansas, la Tesis de grado de Doctor en Filosofía de Deysi Corredor Y. (2008), titulado: **Pretratamiento e hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica** donde realiza un estudio con cáscaras de soya y sorgo forrajero para obtener etanol y aumentar el aprovechamiento de los azúcares fermentables utilizando una tecnología de tratamiento previo de alta eficiencia. Utilizó el ácido diluido y la explosión de vapor modificada como tecnologías de pretratamiento para aumentar los rendimientos de azúcares fermentables. Estudio los efectos de temperatura, tiempo de reacción, tipo de ácido y concentración del ácido en la hidrólisis de la hemicelulosa en las cáscaras de soya y los rendimientos totales de azúcar. Identificó los parámetros óptimos de pretratamiento y las condiciones de hidrólisis enzimática para transformar los sustratos en azúcares fermentables. Reporta que se obtuvieron hasta 72% de rendimiento de hexosa y 94% de rendimiento de pentosa usando explosión de vapor "modificada" con ácido sulfúrico al 2% a 140°C durante 30

min e hidrólisis enzimática con celulasa (15 FPU/g de celulosa) y β glucosidasa (50 CBU/g celulosa). (Corredor, 2008).

Se registra la tesis de Maestría de Olga L. Rodríguez S. (2008) donde reporta que el método con mayor potencial para la hidrólisis de azúcares contenidos en los componentes lignocelulósicos demanda de enzimas industriales y recomienda optar por esquemas de proceso que simplifique el proceso y busquen integrar los residuos generados en proyectos destinados a suplir los requerimientos energéticos del proceso y espera que a largo plazo mejoren las eficiencias de conversión enzimática y de fermentación. (Rodríguez, 2008).

Se registra en la Revista Biotecnología, año 2009, Vol. 13(3), el artículo de investigación de Laura Cuervo et al., donde realizan una revisión con el propósito de presentar los métodos desarrollados para hidrolizar lignocelulosa. Señalan que la utilización del material lignocelulósico es impedida por la recalcitrancia intrínseca del mismo y que existen diversos métodos fisicoquímicos y biológicos desarrollados para obtener azúcares que se fermenten y se conviertan en bioetanol. Indican que para obtener etanol a partir de lignocelulosa existen estrategias utilizando enzimas celulolíticas y levaduras fermentadoras para lograr un proceso para sacarificar y fermentar a la vez y poder alcanzar buenos rendimientos de etanol (Cuervo et al., 2009).

Se registra la tesis de Grado de Doctor de Elia Tomas (2010), que integra las etapas de proceso estudiando diversas conformaciones para producir etanol utilizando paja de trigo. Utilizando diversas estrategias y diferentes cepas de levaduras fermentadoras comparó la máxima producción, rendimiento y productividad de etanol. Informa que obtuvo un mejor nivel de integración al utilizar el material pretratado completo en una sacarificación y fermentación simultáneas utilizando la cepa adaptada de *S. cerevisiae* F12 y que, aunque se aumentó el rendimiento de etanol, no superaron los resultados que obtuvieron de sacarificación y fermentación simultáneas en semicontinuo a 42°C con *Kluyveromyces marxianus* CCT 10875 utilizando residuos sólidos insolubles (RSI) lavados. Aconseja continuar con investigaciones de obtención de cepas recombinantes resistentes a inhibidores formados en el pretratamiento que tengan mejor capacidad de fermentación (Tomas, 2010).

Se registra en la Revista *Bioresour Technol* el artículo de investigación de Talebnia Farid et al., (2010), enfocado en revisar los avances más recientes con paja de trigo (pretratamiento, hidrólisis y fermentación). Con base en el tipo de método de pretratamiento aplicado, el rendimiento de azúcar obtenido fue del 74-96% del máximo teórico después del hidrólisis enzimática de la paja de trigo. Investigaron diversas bacterias, levaduras y hongos con un rendimiento de etanol que oscila entre el 65% y el 99% del valor teórico. Informan que los mayores resultados obtenidos con respecto al rendimiento, concentración final

y productividad de etanol se obtuvieron con *Saccharomyces cerevisiae* nativa no adaptada. Algunas bacterias recombinantes y levaduras han mostrado resultados prometedores y están siendo consideradas para escalar comercialmente. (Talebnia, et al., 2010).

Se registra el artículo de investigación de Tejada et al., (2010) quien estudio la producción de etanol utilizando cascaras de naranja y piña. Realizaron el pretratamiento físico, hidrolisis alcalina y ácida para obtener un jarabe azucarado que fue fermentado por la levadura. Separaron el etanol por microdestilación y realizaron cromatografía de gases para determinar su contenido. De los residuos de naranja obtuvieron 8.4 mg/g de etanol y de la piña 1,0 mg/g de etanol (Tejada et al., 2010).

Se registra la tesis de grado de Doctor de Carolina Bellido Diez (2013), donde estudió la obtención de biocombustibles utilizando biomasa vegetal de la fermentación de hidrolizados de paja de trigo y reporta que la aireación limitada faculta aprovechar los hidratos de carbono produciendo etanol de segunda generación con un aumento de rendimiento del 32% y sostiene que la micro aireación en la fermentación ozonizada aumenta un 29% la producción de etanol (Bellido, 2013).

Se registra en la Universidad Veracruzana la Tesis de Magister en Ciencias en procesos biológicos de Carla Arellano Perales (2015), donde evaluó la obtención de bioetanol de residuos de la cáscara de *Jatropha curcas* y *Pennisetum sp* sometidos a hidrólisis enzimática. Realizó pretratamientos ácidos, alcalinos y autohidrólisis y luego una hidrólisis enzimática para determinar el pretratamiento ideal. Luego del hidrolisis de las cáscaras, estas fueron fermentadas por cepas de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*. Se utilizaron técnicas cromatográficas para detectar el etanol. De la cáscara de *Pennisetum sp*, se obtuvo mayor concentración de etanol (10.27 g/L) a partir del pretratamiento alcalino e hidrólisis enzimática comparado con *Jatropha curcas* (1.53 g/L) de etanol. (Arellano, 2015).

Se registra la tesis de Grado de Doctor de Claudia Conesa Domínguez (2017), donde evaluó la obtención de bioetanol a partir de residuos agroalimentarios de la piña y el caqui, cuyo objetivo fue investigar su revaloración y evaluó estrategias diversas para incrementar la obtención de bioetanol. Confrontó tecnologías que mejoran el rendimiento utilizando enzimas para hidrolizar los residuos de piña. Determinó que para sacarificar residuos de piña la enzima celulasa de *Aspergillus niger* actúa mejor que la de *Trichoderma reesei*, sobre todo si es combinada con hemicelulasa. Indican que el rendimiento del hidrólisis enzimática para la sacarificación es mejor si se combina con microondas en un medio alcalino. (Conesa, 2017).

2.1.2. Antecedentes nacionales

En el Perú existe escasa información sobre el aprovechamiento de cáscaras de frutas para la obtención de productos de valor agregado.

Se cuenta con información de Virreira F. y O. Góngora (2014), que a partir de 20g. de cáscara seca de naranja y pomelo en 600 ml de solución ácida, lograron obtener 250 ml de jarabe azucarado de 10 y 12 grados brix respectivamente. La fermentación alcohólica se realizó durante siete días, utilizando *Sacharomyces cerevisiae*. El rendimiento en bioetanol obtenido fue de 0,27% y 0,40% en volumen con una conversión de 0,034 ml de bioetanol/gramo de cáscara de naranja y 0,05 ml. de bioetanol/gramo de cáscara de pomelo.

2.2. Marco conceptual

En la industria es fundamental considerar aprovechar los residuos generados y utilizar la materia prima residual para crear productos nuevos, colaborando en buscar el equilibrio sostenible del planeta. (Hernández et al., 2015).

La Agenda 21, como ejes de transformación considera para su diseño metodologías fundadas en la planificación estratégica y dan un rol básico a la

participación ciudadana como indicativo de la sostenibilidad local. (Sandoval y Liévano, 2012).

La presente investigación cuyo objetivo es obtener etanol por *Saccharomyces cerevisiae* mediante la biotransformación de cáscaras de piña está relacionada a la gestión ecológicamente racional de la biotecnología y a la transferencia de la tecnología, cooperación y aumento de la capacidad de la Agenda 21.

2.2.1. Piña

a. Descripción Botánica

En la Tabla 1 se muestra la clasificación botánica de la Piña.

Tabla 1. Clasificación botánica de la Piña *Ananas comosus*.

Reino	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Subclase:	Commelinidae
Orden:	Poales
Familia:	Bromeliáceas
Subfamilia:	Bromelioideae
Género:	<i>Ananas</i>
Especie:	<i>A. comosus</i> (L) Merr.1917

Fuente: NCBI, 2017.

Se localizan sobre todo en América tropical, (Sandoval & Torres, 2011). Según estudios reportan su origen entre Brasil, Argentina y Paraguay y su cultivo se extendió al Amazonas, Venezuela y Guyanas (Páez,1998).

La planta de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr., crece como arbustos, se cultivan ampliamente en las zonas tropicales y subtropicales. La planta adulta tiene forma de un trompo (Figura 1) y mide de 1- 2 m de altura y 1- 2 m de ancho (Garcidueñas, 2013).

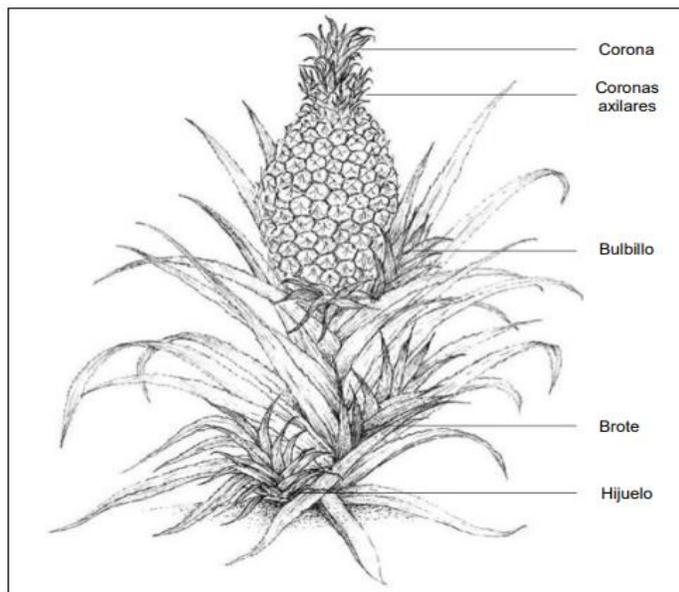


Figura 1. Estructuras morfológicas de la piña (*Ananas comosus*)

Fuente: Garcidueñas, 2013.

b. Producción de Piña

El productor más importante de piña en el 2014 a nivel mundial fue Costa Rica (2'915.628 Tn,) y luego Brasil (2'646,243 Tn) (FAO, 2017).

Para el cultivo de la piña, en América los países de mayor producción son Costa Rica, Brasil, México, Colombia y Venezuela. Nuestro país ocupa el sexto lugar. En el Perú, la producción de piña aumentó del 2007 al 2013 de 212,1 mil toneladas a 438,6 mil toneladas (Ministerio de Agricultura y Riego, 2016).

En el año 2015, las tres principales regiones del Perú con mayor producción fueron Junín (74%), La Libertad (5%) y Puno (4%) (Figura 2).

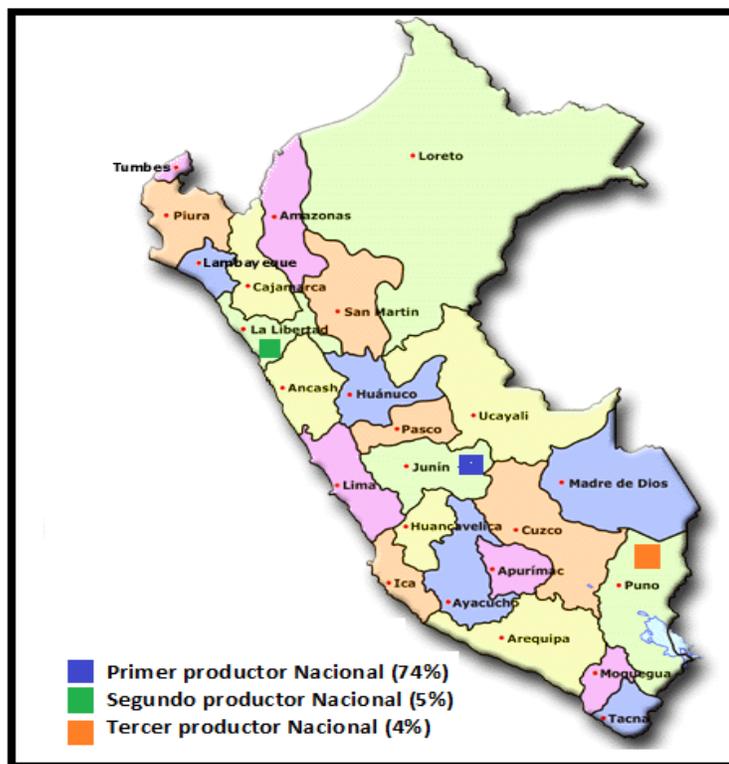


Figura 2. Principales regiones productoras de piña en el Perú.

Fuente: Adaptado de Ministerio de Agricultura y Riego, 2016.

d. Principales Variedades de Piña en el Perú.

Existen muchas variedades de piña, pero muy pocas son comercializadas de manera importante. La Cayena Liza es la variedad que se cultiva más a nivel del mundo, y dentro de ésta los más importantes son la Champaca F-153 y la Hawaiana. (UTEPI, 2006). En la selva central, las variedades comerciales que se cultivan son: Cayena Lisa, Golden, Hawaiana, Samba Chanchamayo y Lagarto que se destinan al mercado regional y nacional (Julca, 2010). (Figura 3).

La piña Golden (MD-2) es un híbrido de la variedad Cayena lisa, fue introducida al Perú en la década del 2000. (Munive, 2015). Es una variedad conocida como Dorada con frutos cilíndricos, pulpa firme, amarillo intenso, fibroso, aromática con alto contenido de azúcares y sus frutos pesan hasta 3.2 kg. (Sandoval & Torres, 2011); se utiliza para el consumo directo y en la industria y es altamente aceptada a nivel internacional. (PEPP, 2010).



Figura 3. Principales variedades de piña en el Perú.

Fuente: Adaptado de Sánchez, 2012.

e. Procesamiento de la piña y sus residuos

La piña tiene un gran consumo en fresco, a nivel industrial se procesa en jugo concentrado, trozos y rebanadas, almíbar enlatados y purés. (CNSPP, 2009; Sánchez et al., 2015). Tiene un sabor dulce (alrededor de 12°Brix), posee un considerable contenido de fibra, vitamina A, vitamina C y tiene propiedades diuréticas, siendo su variedad roja trujillana la más ácida. Soporta bien el almacenamiento, transporte y su vida de anaquel es larga (Cáceres, 2008).

Los desechos del procesamiento de la piña comprenden el 65% del fruto, utilizándose el 35 a 44%, lo que representa una gran pérdida. Estos residuos presentan 11% de sólidos solubles (75 a 80% son azúcares y 7 a 9% es ácido cítrico) (Sánchez et al., 2015).

Estos residuos por estar formados de celulosa, hemicelulosa y lignina son lignocelulósicos y pueden usarse en composta, textiles, enzimas, papelería y generar combustibles. (Khalil et al., 2006).

2.2.2. Composición y valor nutritivo de la piña.

La parte comestible de la piña se compone de agua (85-90%), azúcares (8-10%), siendo la sacarosa las dos terceras partes y el resto son glucosa y fructuosa (Cubas et al., 2016). Casi no presentan el polisacárido almidón y tiene bajo nivel de grasa y proteínas (Tabla 2).

Presenta de 0.6 a 0.9% de ácidos (87% es ácido cítrico y lo demás ácido málico). Tiene alto contenido de la Vitamina C y buen nivel de las vitaminas hidrosolubles B₁, B₂ y B₆ (Arias y Toledo, 2000). La piña contiene un 20% de fibra dietética en base seca (Ramulu & Udayasekhara, 2003). La pulpa se caracteriza por presentar bajo nivel de cenizas y compuestos nitrogenados (0.001%) (Sánchez et al., 2015).

Tabla 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 et al., 2016.

En la piña, los ácidos predominantes son ácido cítrico y málico (Tabla 3). Casi el 80% de la acidez total se atribuye al ácido cítrico. Presenta poco ácido ascórbico (Morales et al., 2001). La acidez titulable muestra un leve aumento durante la post cosecha, pero posteriormente disminuye ligeramente (Tejada, 2010).

Tabla 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 et al., 2001.

La piña tiene propiedades medicinales. Presenta la enzima proteolítica bromelina en la cáscara y otras partes, que contribuye en el metabolismo de los alimentos, es diurético y desintoxicante (Fernández et al., 2014).

2.2.3. Componentes de la Cáscara de piña

Básicamente la cáscara de piña contiene un 77.61% de fibra, 6.56% de proteína cruda y 12% de carbohidratos no estructurales (Montilla & Álvarez, 2007). La composición de polisacáridos de la cáscara (Tabla 4) es de celulosa,

hemicelulosa y lignina que las personas no digieren, pero podría convertirse en productos de valor agregado (Rani & Nand, 2004).

Tabla 4. Componentes químicos proximales 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: Rani & Nand, 2004.

En la variedad de piña Cayena lisa, la actividad antioxidante de la cáscara, se debe a los fenoles totales y antocianinas y en la variedad Lorenza se debe a los fenoles totales que tiene un valor más elevado y en pequeñas cantidades a los taninos y flavonoides. (Contreras & Tamani, 2016).

2.2.4. Componentes de la lignocelulosa.

La biomasa lignocelulósica es un heteropolímero formado de esteres extraíbles, proteínas, carbohidratos, celulosa, hemicelulosa, lignina y minerales. Presente en residuos agrícolas, industriales, forestales, municipales, pastos, etc. La energía almacenada en sus componentes, la hacen tener un enorme potencial biotecnológico. (Medina et al., 2011).

En la pared celular vegetal, los polisacáridos celulosa, hemicelulosa y lignina forman microfibrillas (Figura 4), dispuestas en macrofibras que dan firmeza. (Bellido, 2013).

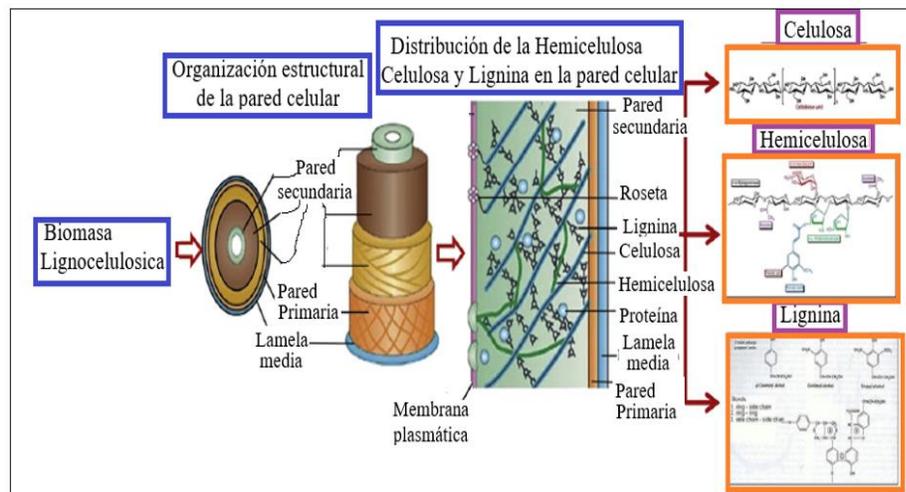


Figura 4. Organización estructural de los componentes lignocelulósicos.

Fuente: adaptado de Bellido, 2013).

a. Polisacáridos

Mayormente los carbohidratos se encuentran en forma de polisacáridos (60 a 80%), constituidos de azúcares que pueden enlazarse covalentemente a otras moléculas de aminoácidos, péptidos, proteínas y lípidos (Pérez et al., 2002).

Celulosa

La celulosa es un biopolímero de alto peso molecular formada por moléculas de glucosa unidos por enlaces covalentes β 1-4 glucosídicos (Laureano et al., 2005). Presenta cadenas lineales largas de microfibrillas con uniones intramoleculares de fuerzas de Van der waals y puentes de hidrógeno (Cuervo et al., 2009).

Formando una estructura cristalina (Figura 5), donde las microfibrillas son muy ordenadas y son resistentes a ser hidrolizadas y con zonas amorfas sensibles a ser degradadas enzimáticamente (Ovando & Waliszewski, 2005). El grado de polimerización de la celulosa fluctúa de 1000 y 10000 y depende de la fuente lignocelulósica y las condiciones ambientales (Domínguez, 2003).

El tipo de residuo lignocelulósico y las condiciones ambientales influyen en el grado de polimerización de la celulosa (1000 a 10000) (Domínguez, 2003).

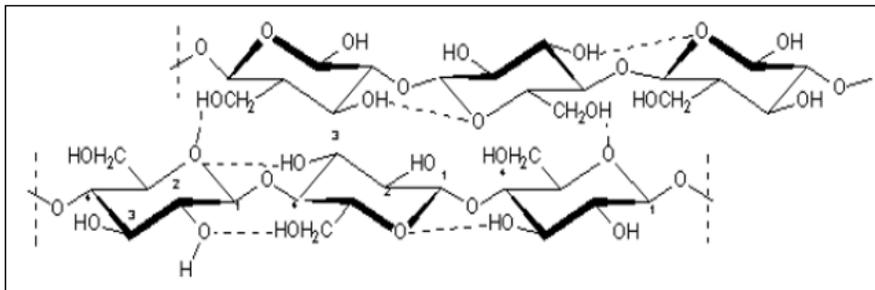


Figura 5. Conformación de la Celulosa

Fuente: Bellido, 2013.

En la figura 6 se muestra la interacción de polisacáridos y proteínas de la pared celular.

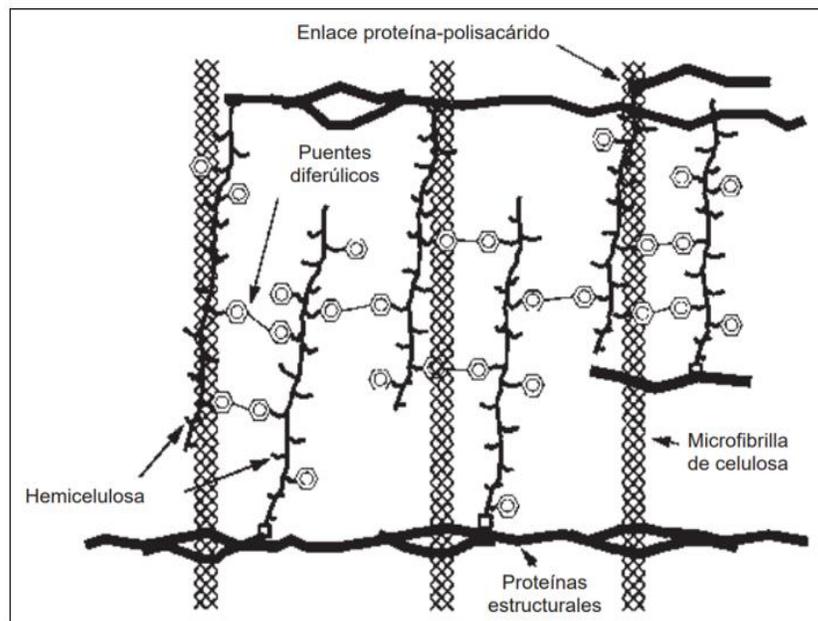


Figura 6. Interacción de polisacáridos y proteínas de la pared celular

Fuente: Modificado de Saha, 2003.

Hemicelulosa

Son heteropolisacáridos de las paredes celulares vegetales junto con la lignina y la celulosa. Tienen peso molecular relativamente bajo (Martín y Manzanares 1994), formada por azúcares unidos por enlaces β -1,4 y a veces por β -1,3 (Figura 7). Tiene cadenas ramificadas de azúcares de 5 carbonos como la xilosa y arabinosa y de seis carbonos como la glucosa, manosa, galactosa y además contienen los ácidos metilglucurónico, galacturónico y glucurónico (Pérez et al., 2002).

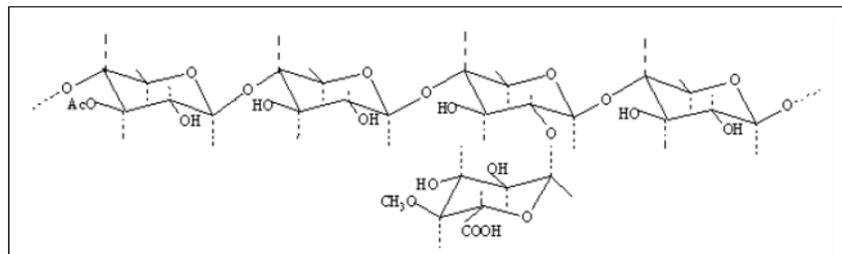


Figura 7. Conformación de la Hemicelulosa

Fuente: Pérez et al., 2002; Bellido, 2013.

Al aumentar la temperatura también aumenta la solubilidad de los componentes de la hemicelulosa cuya solubilización en agua se inicia a 180°C bajo condiciones neutras (Gray et al., 2003).

El pH y la humedad influyen, las condiciones acidas o alcalinas facilitan la extracción del xilano, pero en el caso de glucomanano se necesita ambientes alcalinos fuertes (Talebna, 2010).

Lignina

Heteropolímero formado por alcoholes aromáticos, amorfo, tridimensional y ramificado (Figura 8), dando impermeabilidad, soporte, firmeza y protege a la celulosa y hemicelulosa, resiste altamente la degradación biológica y química (Howard et al., 2003). Su contenido difiere entre los diferentes materiales lignocelulósicos (Tomás, 2010). Pocos microorganismos pueden degradarlo significativamente, los más convenientes son los basidiomicetos (hongos) (Martin & Manzanares 1994).

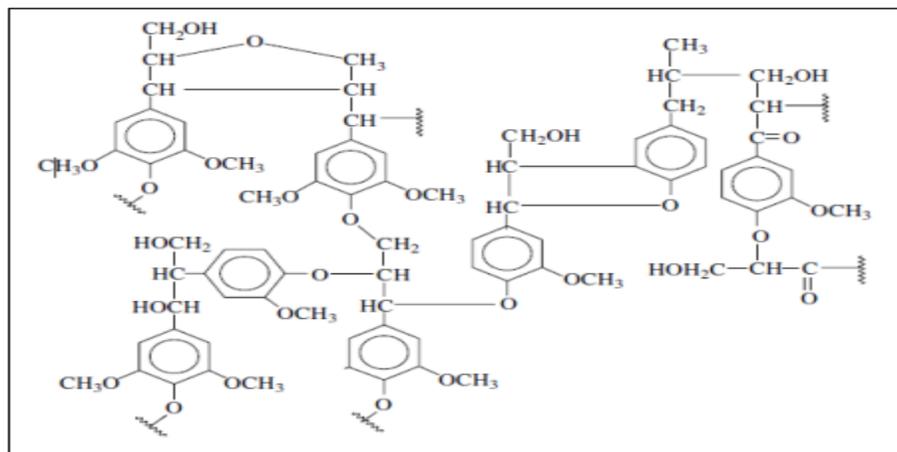


Figura 8. Estructura de la Lignina

Fuente: Tejado et al., 2007.

2.2.5. Etanol

El etanol resulta de la fermentación del azúcar, almidón hidrolizado o celulosa contenida en los desechos agrícolas, urbanos y forestales. Sus componentes son carbono, hidrógeno y oxígeno (Barrientos, 2009), es un líquido sin color que se inflama a 78°C (Tabla 5), su estructura química es CH₃-CH₂OH (Garzón y Hernández, 2009).

Tabla 5. Propiedades Fisicoquímicas del etanol

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

Fuente: Salomón, 2001.

El bioetanol de primera generación se puede obtener en forma directa de las frutas, cereales y otros vegetales. El bioetanol de segunda generación o lignocelulósico se obtiene de sustancias que contienen celulosa (madera y residuos agrícolas), (Merino & Cherry, 2007). Se ha obtenido etanol lignocelulósico de residuos de piña ricos en polisacáridos (Nigam, 2000).

El material lignocelulósico debe ser sometido a diferentes técnicas de pretratamiento con el fin de producir azúcares reductores asimilables (Triana, 2010). Aunque existen muchas variables y el procesamiento pueda variar de acuerdo a la materia prima y microorganismo utilizados, implica la preparación del sustrato, fermentación y destilación (Machado, 2010).

2.2.6. Etapas de obtención de Etanol biolignocelulósico

Para convertir la biomasa lignocelulósica a etanol deben realizarse cuatro etapas; 1) pretratamiento, para desagregar y solubilizar la lignina total o parcialmente, hidrolizar el polisacárido hemicelulosa y disminuir la cristalinidad de la celulosa; 2) hidrólisis de la celulosa, para obtener glucosa; 3) fermentación y 4) destilación del etanol (Mateus, 2011). (Figura 9).

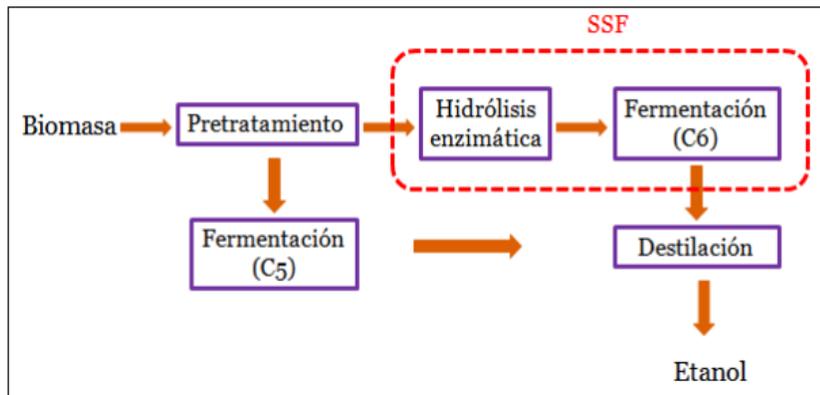


Figura 9. Proceso de obtención de etanol lignocelulósico

Fuente: Mateus, 2011.

Pretratamientos

En la conversión de biomasa lignocelulósica a etanol, la biomasa necesita ser tratada para que la celulosa en la biomasa quede expuesta. Existen diversos métodos para el tratamiento previo de materiales lignocelulósicos antes de la hidrólisis enzimática. Estos métodos se clasifican en biológicos, físicos, químicos y una combinación de estos métodos (Myat & Hyung, 2015).

El tratamiento previo permite que el complejo celulósico se convierta en azúcares como la glucosa que se puede fermentar (Han et al., 2011). los azúcares simples son capaces de biotransformarse por fermentación en etanol, sujeto al tipo de microorganismo utilizado. (Mateus, 2011).

La lignocelulosa es muy resistente al hidrolisis, porque sus componentes se unen entre sí mediante enlaces covalentes, fuerzas de van der Waals y puentes intermoleculares (Kumar et al., 2010). Los pretratamientos generan regiones amorfas en la celulosa susceptibles a ser hidrolizadas (Hu y Wen, 2008).

El objetivo principal de los pretratamientos es incrementar el contacto de las celulasas y celulosa al romper la estructura cristalina, despolimerizándola y solubilizando la lignina y la hemicelulosa (Castro et al., 2009) (Figura 10).

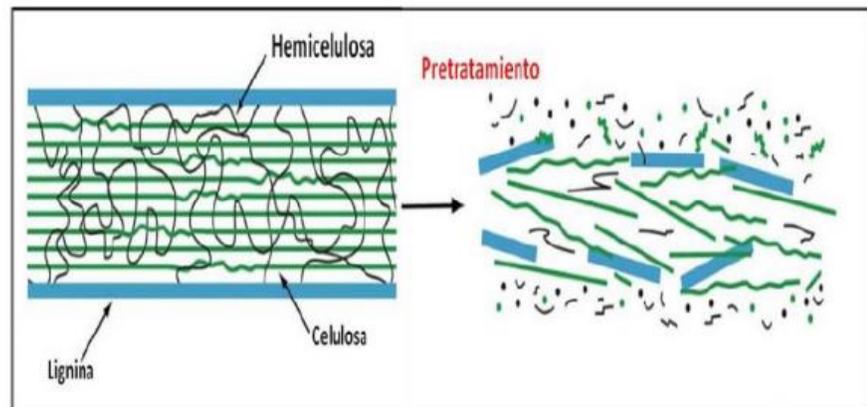


Figura 10. Cambio estructural del material lignocelulósico luego de un pretratamiento

Fuente: Juri, 2011.

La tasa de producción de etanol aumenta por el incremento de azúcares para la hidrólisis luego de los pretratamientos (Talebnia et al., 2010).

El pretratamiento se puede realizar por métodos físicos, químicos o biológicos. (Cuervo et al., 2009; Demers et al., 2009; Arellano, 2015). En la Tabla 6 se muestran algunos tipos de pretratamientos para materiales Lignocelulósicos.

Luego de seleccionar el pretratamiento para el insumo que se va a evaluar, se realiza la hidrolisis del material para generar azúcares monoméricos. (Medina et al., 2011).

Tabla 6. Tipos de pretratamientos para materiales Lignocelulósicos.

Pretratamiento	Descripción
Físico	Reducción de tamaño de partícula para aumentar el área de superficie de hidrolisis.
Autohidrolisis	Altas temperaturas (150 - 180 °C) y presión, la hemicelulosa y lignina comienzan a solubilizarse dejando a la celulosa más expuesta.
Químicos	Solubilizan la lignina y la hemicelulosa dejando a la celulosa expuesta para ser hidrolizada. Se emplean ácidos y/o bases.
Oxidativos	Se agregan agentes oxidantes como ácido acético, peróxido de hidrogeno u ozono, donde se afecta a la lignina y hemicelulosa.
Biológicos	Utilización de hongos y bacterias capaces de solubilizar la lignina y dejar expuesta la celulosa para ser hidrolizada.

Fuente: Arellano, 2015.

2.2.7. Hidrólisis enzimática

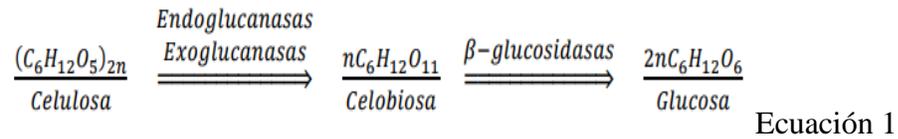
Durante el pre tratamiento se aumenta la digestibilidad del sustrato lignocelulósico al incrementarse los poros que permiten el acceso de las enzimas celulasas a la celulosa. (Castro et al., 2009).

La efectividad enzimática en la hidrólisis depende de: tipo de sustrato, actividad celulolítica y condiciones para la reacción (Mateus, 2011). La actividad hidrolítica enzimática es susceptible a inhibición por el sustrato y también por el producto final que podría influir en el rendimiento de obtención de bioetanol (Talebnia et al., 2010; Castro et al., 2009).

Se proponen usar celulasas y hemicelulasas producidas por mohos para la hidrólisis enzimática (Krogh et al., 2004; Sehnem et al., 2006).

El complejo de las celulasas incluye tres enzimas que hidrolizan en conjunto la celulosa (Wen et al., 2005). Las enzimas involucradas actúan en sinergia y se denominan endoglucanasas (hidrolizan sitios internos de la celulosa), exoglucanasas (hidrolizan los extremos libres) y β -glucosidasas (convierten la celobiosa en glucosa). (Talebnia et al., 2010).

En la Ecuación 1 se muestra el mecanismo de conversión de celulosa en unidades de glucosa. (Talebnia et al., 2010).



Las celulasas actúan a un pH y temperatura óptima de 5,3 y 50°C respectivamente (Paredes et al., 2010). En la Tabla 7 se encuentran los parámetros de operación que permiten la hidrólisis enzimática de la celulosa en condiciones óptimas para obtener altos rendimientos de glucosa.

Tabla 7. Parámetros de operación de la Celulasa para la hidrólisis enzimática.

PARÁMETRO	RANGO ÓPTIMO DE OPERACIÓN
Temperatura	45 -55°C
pH	4 - 5
Dosis de Celulasa	10 – 30 [FPU/g material lignocelulósico]
Tiempo de acción	48 -72 horas

Fuente: Juri, 2011.

En la Figura 11 se esquematiza la hidrólisis de la celulosa amorfa y microcristalina por los sistemas de celulosa no complejada (A) y complejada (B). Los extremos reductores se indican con los cuadrados sólidos y los extremos no reductores con cuadrados abiertos. Se indican las Regiones amorfas y cristalinas. La celulosa, las enzimas y los productos hidrolíticos no se muestran a escala. (Lynd et al., 2002).

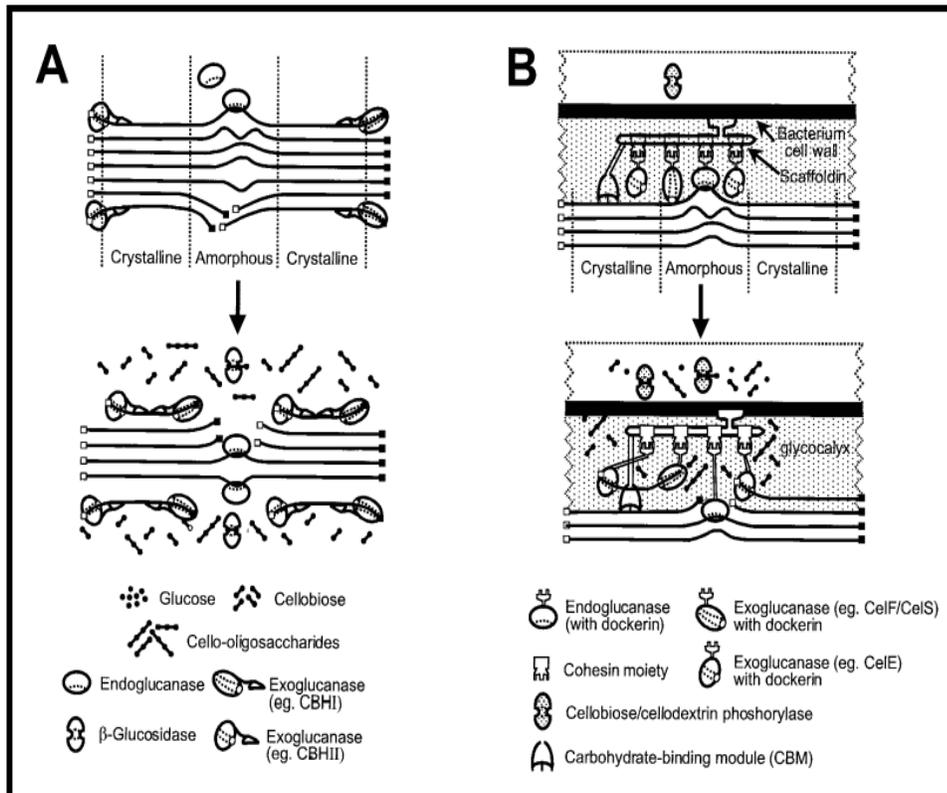


Figura 11. Hidrólisis de la celulosa amorfa y microcristalina

Fuente: Lynd et al., 2002.

2.2.8. Fermentación

La fermentación resulta del metabolismo de bacterias, levaduras o mohos (Ertola et al., 2003). La fermentación es una vía metabólica anaerobia de la glucosa que la puede convertir en diferentes productos como etanol, lactato, butirato y acetato de acuerdo al sustrato y microorganismo productor (Mathews et al., 2004).

La fermentación depende de los nutrientes, pH, temperatura, concentración del azúcar, uso de microorganismos tolerantes a niveles altos de alcohol, contaminación, anaerobiosis y destilación. (Ertola et al., 2003).

Materias primas para la fermentación

Se han utilizado diferentes fuentes de carbono como insumo para obtener etanol para su transformación en azúcar fermentable. Su aplicación dependerá del rendimiento en etanol, costo y microorganismo que se utilice. (Santamaría et al., 1995).

Las materias primas pueden ser **Sacarosas** (caña de azúcar, melaza, sorgo dulce), etc., **Almidones**, (cereales y tubérculos) y **Celulosa** (madera, residuos agrícolas y forestales), (Barrientos, 2009).

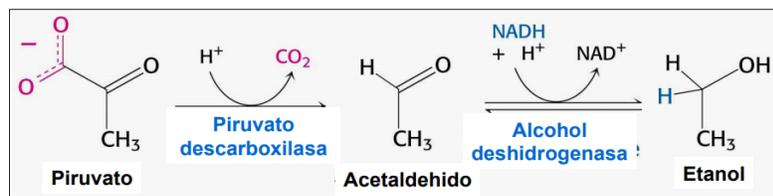
En el Perú los cultivos de los cuales se podría obtener mayor rendimiento para producir alcohol son caña de azúcar, sorgo dulce, canola, higuierilla, girasol y papa (Barreda, 2015).

En la calidad y cantidad del etanol influyen el tipo de fruta que se fermente y los sólidos solubles que se biotransforman a etanol pues al disminuir los grados Brix el alcohol aumenta. (Mitis, 2015).

2.2.9. Fermentación Alcohólica

La fermentación alcohólica de levaduras y algunas bacterias pertenece al metabolismo anaerobio donde la glucosa es oxidada parcialmente por la glucólisis hasta piruvato, el cual se descarboxila y es reducido a etanol por la acción de la coenzima NADH₂. (Mathews et al., 2004; McKee & McKee, 2014) (Figura N°12).

La ecuación general de la conversión de piruvato en etanol se indica en la Ecuación 2:



Ecuación 2

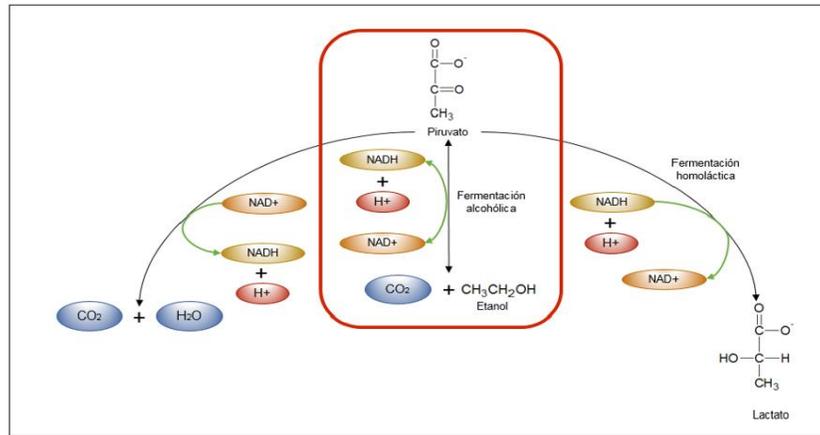


Figura 12. Ruta metabólica de la fermentación alcohólica.

Fuente: McKee & McKee, 2014.

Limitantes de la fermentación alcohólica.

La levadura consume azúcares reductores para obtener etanol y la eficacia de la conversión depende de las adecuadas condiciones. (Argote et al., 2015).

Se deben tener en cuenta los siguientes factores:

a) Tolerancia de alcohol

De la composición de la membrana y su fluidez depende la habilidad celular para tolerar el alcohol (Tomasso, 2004). El etanol mayor al 8% puede inhibir el crecimiento celular, la viabilidad y la fermentación (Suárez et al., 2016).

No se recomienda terminar la fermentación con alto grado alcohólico (Riegel & Kent., 2003).

b) Acidez del sustrato.

Las levaduras se afectan por el ambiente ácido o alcalino siendo el nivel idóneo de pH de 3.5 a 5.5 (Acosta, 2012), durante la fermentación, el pH disminuye al producirse ácidos (Ríos et al., 2005). Las levaduras soportan medios más ácidos que otros microorganismos, lo que permite controlar bacterias que compiten por el sustrato. (Beltran et al., 2002).

c) Aireación.

Saccharomyces cerevisiae posee alta actividad metabólica, en la fase aerobia produce biomasa y en la anaeróbica produce etanol (Arimuya & Tecco, 2014). El oxígeno permite la selección del microorganismo y los productos (Acosta, 2012).

d) Presión osmótica.

El estrés osmótico disminuye el volumen celular, velocidad de fermentación y la viabilidad celular (Seo et al., 2005). El nivel de azúcar afecta la osmosis dentro de la membrana celular, siendo óptima de 10 a 18% pero a 22% tienen problemas en la respiración celular (Ríos et al., 2005). En bajas concentraciones de azúcares se afecta el grado alcohólico final. En mostos de grado Brix muy bajo el grado alcohólico será menor, pero en niveles elevados se impide la actividad de las levaduras y no ocurre la fermentación. (Carrascosa et al., 2005).

e) **Temperatura.**

Se debe controlar la temperatura porque afecta el crecimiento, duración de la fermentación y el metabolismo de las levaduras (Torija et al., 2002). Las levaduras son mesófilas, la temperatura óptima es 30°C, a más de 50°C se produce su muerte. Si es mayor de 35°C se disminuye la acción y por encima de 40°C esta se puede detener (Ríos et al., 2005).

f) **Nutrientes**

Es necesario considerar para permitir el crecimiento del organismo fermentador los nutrientes que requiere. (Garzón & Hernández, 2009; Acosta, 2012).

2.2.10. Microorganismos fermentadores

Los organismos empleados para obtener etanol deben ser tolerantes al etanol, a temperaturas y concentraciones de azúcar altas, tener buen rendimiento alcohólico, fermentación eficiente y buena productividad (Zuzuarregui, 2005).

Las levaduras son muy utilizadas para la producción de etanol por fermentación (Madigan & Martinko, 2009), tienen alta productividad para convertir azúcares a bioetanol, separándose bien luego de la fermentación.

(Zambrano, 2013) y soportan concentraciones altas de Etanol (hasta 150 g-L - 1), (Claassen et al., 1999).

Los microorganismos más empleados son las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *S. ellipsoideus*, *S. anamensis*, *S. carlsbergensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida seudotropicalis*, *Candida bytyrii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia stipitis* y *Pichia membranaefaciens* (Frazier & Westhoff, 2000).

Saccharomyces cerevisiae

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* son hongos (Tabla 8) que se reproducen por gemación, son unicelulares, eucarióticos, con metabolismo heterótrofos y son osmotróficos (Frazier & Westhoff, 2000).

Tabla 8. Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*

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

Fuente: Nieto, 2009.

En las fermentaciones industriales *S. cerevisiae* es más utilizada porque metaboliza sacarosa, glucosa, galactosa, fructosa, maltosa y maltotriosa (Hernández & Martínez, 2012), pero no hidroliza almidón ni dextrinas y necesita una hidrólisis enzimática para transformar los oligosacáridos y obtener etanol (Casp & Abril, 2003). Tampoco fermentan la rafinosa, trehalosa ni lactosa. (González, 2014).

Tolera altos niveles de etanol, produce pocos subproductos, es osmotolerante, puede reciclar, flocular y sedimentar (Fajardo & Sarmiento, 2008) y es fácil de manipular y recuperar (Torija, 2002).

Sus dimensiones son 4.5 a 21 micras de largo por 2.5 a 10 micras de ancho. En el microscopio se les visualiza de forma redonda y ovoide (Gonzales, 2014), elipsoides a veces cilíndricas y filamentosas (Figura 13). Su aireación recomendada es de 0.6-0.9 vvm (Fajardo & Sarmiento, 2008).

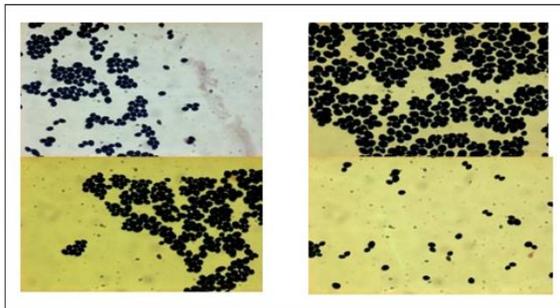


Figura 13. Imágenes de levaduras en microscopio óptico

Fuente: González, 2014.

a. Requerimientos nutricionales:

Necesita carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo que estén disponibles de asimilar (Fajardo & Sarmiento, 2008). En aerobiosis requiere vitaminas como pantoténico de calcio, piridoxina, tiamina y biotina. En anaerobiosis es menos exigente y solo requiere inositol (González, 2014).

b) Requerimientos fisicoquímicos.

Saccharomyces es acidófila, con un pH de 4.0 y 4.5 crece mejor (Fajardo & Sarmiento, 2008), el pH para su crecimiento varía de 4 a 7, a pH de 8 a 9 metabolizan por la fermentación glicérica. En pH neutro forma biomasa y baja la producción de etanol, a pH ligeramente ácidos se favorece la vía metabólica de la glucólisis para la fermentación alcohólica. (Hernández & Martínez, 2012).

Saccharomyces cerevisiae desarrolla bien de 28 a 35 °C, recomendándose 30°C, muere cuando se expone a 55°C por 5 minutos (Fernández et al., 2014), algunas cepas pueden fermentar bien a bajas temperaturas y otras lo hacen en altas temperaturas (Torija, 2002). En la fermentación se recomienda utilizar cepas de *S. cerevisiae* que produzcan en corto tiempo un mayor porcentaje de alcohol (Peña y Arango, 2009).

2.2.11. Destilación

La destilación es un procedimiento muy utilizado para desagregar y purificar líquidos, aprovechando las volatilidades diferentes de los compuestos que integran una mezcla y los separa (Murgas & Vásquez, 2012).

El agente separador es el calor (Escalante & Fuentes, 2013), y se obtiene un vapor del compuesto de la mezcla que tiene mayor volatilidad. (Arimuya & Tecco, 2014).

En la destilación Simple por lotes o diferencial, el vapor producido va directamente hacia un condensador. Se calienta la mezcla líquida hasta su ebullición y conforme transcurre el tiempo se disminuye la concentración de los compuestos más volátiles del líquido (Angulo, 2010).

2.3. Aspectos de responsabilidad social y medioambiental

El aprovechamiento de residuos agroindustriales ha venido evolucionado a través de investigaciones implementadas en países desarrollados donde se han convertido en materia prima de uso al dar valor agregado a los mismos, de lo contrario presentarían un gran problema ambiental debido a su disposición final (Mejías et al., 2016).

Este trabajo de investigación es una búsqueda de oportunidades de aprovechamiento de las cáscaras de piña de la variedad Golden para obtener etanol como producto de valor agregado y que pueda ser considerado, con un enfoque de responsabilidad ambiental con el fin de alcanzar la sostenibilidad y buscar el desarrollo a largo plazo, a nivel económico, social y ambiental de las regiones productoras de Piña del Perú.

2.3.1. Desarrollo sostenible

La sociedad debe tener el anhelo del desarrollo sostenible, para expresar su esfuerzo de establecer y reforzar las capacidades y entender lo que necesita en el presente y futuro, debe considerar las capacidades en el presente y trazarse una ruta utilizando estrategias viables para lograr sus metas (Figura 14). Debe suministrar condiciones físicas para lograr este propósito sin afectar su sostenibilidad en el tiempo. (Bazán, 2013).

El desarrollo sostenible es una estrategia para que las comunidades busquen el desarrollo económico que a la vez beneficie al ambiente y la calidad de vida. (Díaz, 2017).



Figura 14. Enfoque de Desarrollo Sostenible

Fuente: Chota, 2008.

2.3.2. Aprovechamiento y valoración de la piña

Existe interés de aprovechar los residuos para obtener productos con valor agregado (Saval, 2012). Del bagazo de la piña se ha obtenido celulosa y etanol, obteniéndose 35% de etanol del bagazo y 57% de la celulosa a las 48 y 72 horas de fermentación (Antonio et. al., 2011).

Se han utilizado fibras de rastrojo de piña para reforzar la fortaleza de resinas de poliéster (Quesada et al., 2005) y se han obtenido materiales carbonosos empleando cáscaras de piña tratadas químicamente (García et al., 2013).

Un punto clave para el desarrollo sostenible es innovar utilizando nuevas técnicas, procesos, programas de capacitación y estandarizar procedimientos para producir nuevas sustancias valoradas (Lazo et al., 2017).

En nuestro país, el modelo productivo no considera el impacto de los procesos sobre el ambiente alejándonos de la sostenibilidad ambiental y arriesgando la viabilidad económica y limitando las condiciones de vida de los peruanos. (Bazán, 2013).

La presente investigación es aplicada porque el propósito fue resolver un problema de naturaleza práctica, con aplicación, utilización y resultado de saberes. Las cáscaras de piña son residuos sólidos que resultan al consumir directamente la fruta o al procesarlas para la obtención de jugo, mermeladas, vinagre y conservas de piña, y que ya no son útiles para el proceso que los generó, pero que pueden aprovecharse para obtener un producto como el etanol con valor agregado económico, comercial y principalmente la eliminación de una fuente de contaminación del medio ambiente.

Los conocimientos derivados de la presente investigación contribuirán a un aprovechamiento adecuado de los residuos sólidos de las cáscaras de piña evitando su alteración y contaminación por su degradación ya que las cáscaras de piña son un residuo muy a menudo no utilizado que se puede alterar fácilmente y se quiere plantear una alternativa de interés dentro del marco de desarrollo sostenible en el seguimiento continuo del desarrollo a nivel ambiental, social y económico de las regiones productoras de piña del Perú mediante el uso de residuos desechados de la piña para permitir una sacarificación y fermentación y poder obtener etanol como subproducto con valor adicional.

2.3.3. Situación de la obtención de alcohol

A nivel mundial, Estados Unidos a partir del maíz y Brasil a partir de la caña de azúcar son principales productores de alcohol, luego se encuentran China, India y Francia (Howard & Raymond 2003). Se han desarrollado industrias en crecimiento en Europa, Tailandia, Filipinas, Guatemala, Colombia y República Dominicana (Mercado, 2006).

En la Tabla 9 se muestran las aplicaciones de alcohol etílico para las diferentes industrias a nivel mundial.

Tabla 9. Aplicaciones de alcohol etílico en la industria

Aplicaciones	
Esteres	Jabones
Compuestos Orgánicos	Perfumería
Detergentes	Medicina
Pinturas	Mezcla de Solventes
Cosméticos	Alimentos
Aerosoles	

Fuente: Adaptado de IICA, 2004.

Biocombustible

La biomasa lignocelulosa y los subproductos agroindustriales ya no son productos de desecho y son materia prima potencial para diferentes procesos

agrícolas e industrial, como obtener alcohol carburante. Debido a la compleja degradación de la lignocelulosa existen muchos limitantes para la obtener etanol (Sánchez et al., 2010).

Los combustibles de origen biológico obtenidos de materia transformada utilizando residuos orgánicos que serían desaprovechados se les denomina biocombustibles. (Barrientos, 2009).

Diversos factores influyen en el rendimiento de la producción del alcohol tales como las condiciones de aireación, las propiedades esenciales de la cepa, concentración del inculo, condiciones de fermentación, composición del medio y nutrientes (Gilces, 2006).

CAPÍTULO III

MÉTODO

Este trabajo de investigación es una búsqueda de oportunidades para aprovechar las cáscaras de piña, generadas como residuos en las zonas productoras de nuestro país, para poder obtener etanol a partir de ellas luego de su pretratamiento, fermentación y destilación.

El presente estudio a nivel experimental se ejecutó en el Departamento de Lima, provincia constitucional del Callao en las instalaciones de los laboratorios de Bioquímica, Fisicoquímica y Microbiología de la Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos de la Universidad Nacional del Callao.

3.1. Tipo de Investigación

El estudio de “Biotransformación de cáscaras de *Ananas comosus* (Piña) para la obtención de etanol en el marco de desarrollo sostenible de las regiones productoras del Perú”, es aplicada y con nivel explicativo.

Es aplicada debido a que su propósito fue resolver un problema de naturaleza práctica, pues las cáscaras de piña son residuos sólidos que resultan al consumir directamente la fruta o al procesarlas para la obtención de jugo, mermeladas y conservas de piña, y que ya no son útiles para el proceso que

los generó, pero que pueden aprovecharse para generar un producto como el etanol con valor agregado económico, comercial y principalmente la eliminación de una fuente de contaminación del medio ambiente.

Los conocimientos que se deriven de este estudio podrán colaborar en lograr un aprovechamiento adecuado para los residuos sólidos de las cáscaras de piña y evitar su degradación ya que las cáscaras de piña son residuos orgánicos muy a menudo no utilizados que se pueden alterar fácilmente y se quiere plantear una alternativa de interés dentro del marco de desarrollo sostenible en la búsqueda del desarrollo a mediano o largo plazo a nivel económico, social y ambiental de las regiones productoras de piña del Perú mediante la obtención a partir de insumos desechados diferentes subproductos con valor adicional como el etanol.

En esta investigación se quiere explicar cómo se puede medir la dependencia de la variable dependiente calidad del etanol obtenido por *Saccharomyces cerevisiae* en la biotransformación de cáscaras de piña manipulando las variables independientes de contenido de sólidos solubles (Grados Brix) y de tiempos de fermentación (TFer) para ver cómo influyen en la obtención de etanol. Trata de esclarecer porque se produce este suceso (obtención de etanol) y bajo qué circunstancias ocurre (contenido de sólidos solubles y tiempo de fermentación) o porque se relacionan dos o más variables. La metodología es cuantitativa porque se desea medir con precisión las variables del estudio independientes y dependientes.

3.1.1. Diseño de la investigación

En un diseño de investigación se organizan elementos que participan en un evento problemático para guiar al examinador a buscar su solución. (Ávila, 2006). Se necesita un método para obtener datos que se analicen estadísticamente para aceptar o rechazar las hipótesis (Hernández et. al., 2014). Por este motivo a lo largo de la presente investigación se realizaron una serie de pruebas, análisis y controles de los diferentes tratamientos estudiados.

El presente estudio es de tipo experimental y analítico, ya que permitió determinar en condiciones de laboratorio la relación de las variables Sólidos solubles (Grados Brix) y tiempo de fermentación (TFer) en el problema planteado (obtención de etanol de cáscaras de piña) conforme se vaya realizando la investigación. Todos los resultados observados serán llevados en una bitácora, anotando la fecha de montaje experimental, tipos de pruebas, observaciones, controles, fecha de análisis y los resultados obtenidos.

En el diseño experimental de este estudio se evaluó la obtención de etanol de las cáscaras de piña (elemento de estudio) para optimizar los factores causales realizando un proceso de pretratamiento físico, térmico y enzimático antes de la fermentación y su posterior destilación. Se realizó una comparación de la acción fermentativa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* manipulando las variables independientes de Sólidos solubles o Grados Brix (°Bx) y de

tiempos de fermentación (TFer) para controlar la producción de etanol y poder establecer los niveles óptimos en condiciones de laboratorio en los cuales se obtengan mayores grados alcohólicos del mosto fermentado y Porcentaje de etanol destilado por biotransformación de la lignocelulosa hidrolizada de las cáscaras de piña de la variedad Golden.

También es analítico porque busca encontrar una relación causa-efecto de las variaciones de los contenidos de sólidos solubles (°Brix) y tiempos de fermentación (TFer) sobre la obtención del etanol por *Saccharomyces cerevisiae* a partir de la biotransformación de cáscaras de piña.

3.1.2. Diseño Experimental de Investigación

De acuerdo a Hernández et. al., (2014) el presente estudio corresponde a los experimentos puros, puesto que se manipulan las variables independientes de contenido de sólidos solubles (°Brix) y tiempos de fermentación (TFer) para ver sus efectos sobre la variable dependiente de calidad del etanol obtenido determinada de acuerdo al grado alcohólico del mosto, porcentaje de etanol destilado y porcentaje de rendimiento de etanol destilado (%REt).

El diseño es Experimental y analítico completamente al azar con metodología de superficie de respuesta para hallar los niveles de las variables que optimizan una respuesta y seleccionar las condiciones operativas adecuadas.

En la Figura 15, se observa es esquema del procedimiento metodológico completo aplicado en las tres etapas experimentales desarrolladas para obtener etanol mediante la biotransformación de cáscaras de piña (*Ananas comosus*) de la variedad Golden.

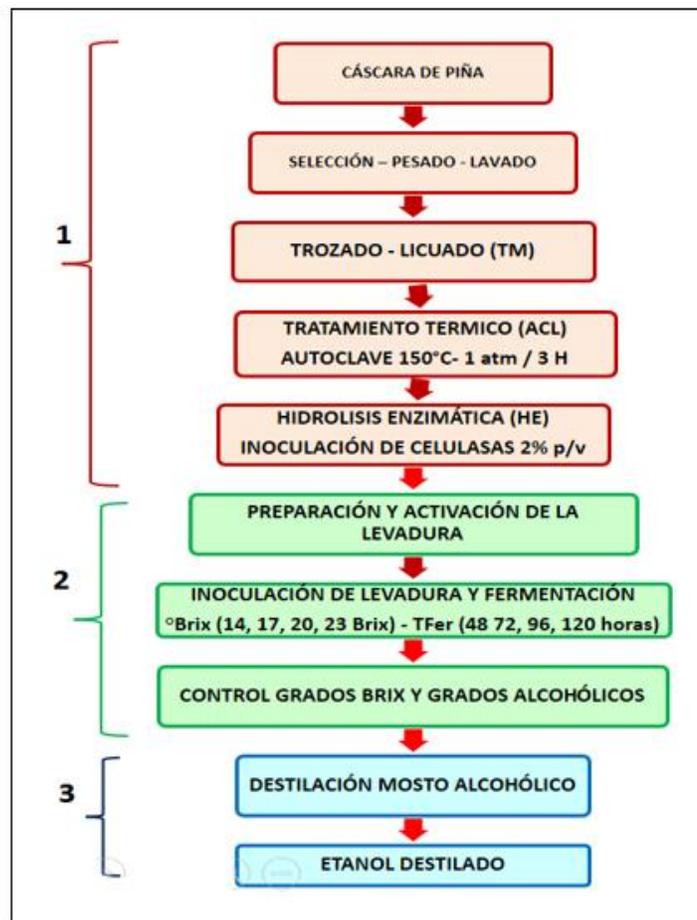


Figura 15. Diagrama del procedimiento metodológico completo aplicado para la obtención de Etanol por biotransformación de cáscaras de piña de la variedad Golden. (Etapas experimentales 1, 2 y 3).

Fuente: De acuerdo al procedimiento realizado.

3.1.3. Estrategia de Prueba de Hipótesis

En un estudio experimental la prueba de hipótesis debe realizarse utilizando una técnica estadística que permita identificar y cuantificar las causas de un efecto (Ávila, 2006).

Las variables dependientes estudiadas fueron la calidad del mosto alcohólico producido de cáscaras de piña expresado como grado alcohólico ($^{\circ}\text{A}$), porcentaje de etanol destilado (%Et) y porcentaje de rendimiento de etanol destilado (%REt). Se manipularon deliberadamente las variables independientes de Grados Brix ($^{\circ}\text{Bx}$) y tiempos de fermentación (TFer), para medir el efecto que tienen sobre la obtención de mayores grados alcohólicos ($^{\circ}\text{A}$), Porcentaje de etanol (%Et) y porcentaje de rendimiento de etanol destilado (% REt), por biotransformación de cáscaras de piña de la variedad Golden.

Para probar la hipótesis la estrategia se basó en aplicar modelos estadísticos y matemáticos para comprobar e interpretar datos utilizando Pruebas de los efectos inter-sujetos, Pruebas post hoc de Comparaciones múltiples y DHS de Tukey de las variables independientes (Sólidos solubles y tiempos de fermentación). También se hizo la correlación del grado de alcohol del mosto sin destilar con el porcentaje de alcohol destilado y las pruebas estadísticas de superficies de respuesta y optimización para el grado alcohólico del mosto

alcohólico sin destilar, el porcentaje de etanol destilado y el porcentaje de rendimiento de etanol destilado cuyo propósito fue determinar la aceptación o rechazo de la hipótesis General y las específicas sustentadas en los márgenes de error permitidos.

3.2. Población y muestra

Población

Durante la presente investigación, se utilizaron como material biológico veinte kilos de cáscara de piña obtenido de los frutos de la piña (*Ananas comosus*) variedad Golden tratado por procesos fermentativos de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura seca instantánea Fleischmann), para la obtención de etanol.

Muestra

Muestra poblacional (n)

Está delimitada y puntual a las variables de contenidos de sólidos solubles (grados Brix) y tiempos de fermentación. Muestra de 1000 ml de solución de cáscara de piña variedad Golden trozada, en tres repeticiones por tratamiento con los 04 diferentes contenidos de sólidos solubles o Grados Brix (14, 17, 20 y 23) y 04 diferentes tiempos de fermentación (48, 72, 96 y 120 horas) para la fermentación alcohólica.

Las cáscaras de piña se acopiaron de puestos de venta de rodajas y jugos de piña, localizados en los mercados de Lima y Callao.

3.3. Hipótesis

Hipótesis general

- La aplicación del proceso de biotransformación permitirá obtener etanol por *Saccharomyces cerevisiae* mediante la biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus* evaluando los sólidos solubles y el tiempo de fermentación.

Hipótesis específicas

1. El contenido inicial de sólidos solubles influye en la obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus*.
2. El tiempo de fermentación influye en la obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus*.
3. La calidad del etanol obtenido por biotransformación de cáscaras de piña será eficiente de acuerdo al grado alcohólico del mosto, porcentaje de etanol destilado y porcentaje de rendimiento de obtención de etanol destilado.

3.4. Operacionalización de las variables

3.4.1. Variables

Las variables independientes y dependientes son definidas en función a la hipótesis general planteada. Las variables independientes son los “Sólidos solubles” (°Brix o °Bx) y los “Tiempos de fermentación” (TFer) como las causantes del fenómeno estudiado y la variable dependiente es la Calidad del etanol obtenido expresada como Grado alcohólico del mosto, Porcentaje de etanol destilado y Porcentaje de rendimiento de etanol destilado, los cuales varían cuando se manipulan las variables independientes (Solidos solubles y tiempos de fermentación).

En la presente investigación las variables que fueron medidas y observadas fueron las siguientes:

Variables independientes:

- *Grados Brix*: Concentración en sólidos solubles de una solución,
- *Tiempo de fermentación*: cantidad de horas requeridas para el proceso fermentativo por *Saccharomyces cerevisiae*

Variables dependientes:

Calidad del etanol producido de la biotransformación de cáscara de piña fermentada expresado como:

- *Grado alcohólico del mosto*: número de volúmenes de etanol expresado en grados.
- *Porcentaje de etanol destilado*: concentración porcentual de etanol en volumen.
- *Porcentaje de rendimiento de etanol destilado*: cantidad de producto sintetizado a partir de la cantidad de sustrato consumido.

3.4.2. Operacionalización de las variables

La operacionalización de las variables independientes y dependientes se indican en las Tablas 10, 11, 12, 13 y 14.

Tabla 10. Operacionalización de la variable de Sólidos solubles (°Bx)

Denominación	Sólidos solubles
Tipo	Independiente
Naturaleza	Cuantitativa
Medición	Numérica
Indicador	Nivel de sólidos solubles
Unidad de medida	Grados Brix (°Bx)
Instrumento	Refractómetro
Dimensión	Química, Física.
Definición operacional	Medida objetiva de la concentración de azúcares disueltos en un producto y nivel de dulzura del mismo
Definición conceptual	Concentración en sólidos solubles de una solución.

Fuente: De acuerdo a las características de la variable

Tabla 11. Operacionalización de la variable Tiempo de fermentación (TFer)

Denominación	Tiempo de Fermentación
Tipo	Independiente
Naturaleza	Cuantitativa
Medición	Numérica
Indicador	Inicio de la fermentación
Unidad de medida	Horas
Instrumento	Reloj
Dimensión	Física
Definición operacional	Proporcionan una medida objetiva para controlar adecuadamente la fermentación alcohólica.
Definición conceptual	Es el tiempo requerido en horas para realizar el proceso fermentativo para la obtención de etanol

Fuente: De acuerdo a las características de la variable

Tabla 12. Operacionalización de la variable Grado alcohólico del mosto

(•A)

Denominación	Grado Alcohólico
Tipo	Dependiente
Naturaleza	Cuantitativa
Medición	Numérica
Indicador	Cambio de componentes químicos y físicos
Unidad de medida	Grados de Gay-Lussac
Instrumento	Tabla de °Baume -°Brix-°Alcohol.
Dimensión	Química, Física.
Definición operacional	Proporcionan una medida objetiva de la concentración de etanol de una solución.
Definición conceptual	Número de volúmenes de alcohol (etanol) expresado en grados

Fuente: De acuerdo a las características de la variable

Tabla 13. Operacionalización de la variable Porcentaje Etanol destilado (%Et)

Denominación	Porcentaje Etanol destilado
Tipo	Dependiente
Naturaleza	Cuantitativa
Medición	Numérica
Indicador	Cambio de componentes químicos y físicos
Unidad de medida	Porcentaje de etanol
Instrumento	Destilador - Alcohólímetro
Dimensión	Química, Física
Definición operacional	Proporcionan una medida objetiva del contenido de etanol destilado.
Definición conceptual	Concentración porcentual en volumen de alcohol en 100 cc.

Fuente: De acuerdo a las características de la variable

Tabla 14. Operacionalización de la variable Porcentaje rendimiento de etanol destilado (%REt).

Denominación	Grado alcohólico
Tipo	Dependiente
Naturaleza	Cuantitativa
Medición	Numérica
Indicador	Rendimiento sustrato/producto
Unidad de medida	Porcentaje de rendimiento de etanol
Instrumento	Material volumétrico
Dimensión	Física
Definición operacional	Proporcionan una medida objetiva del aprovechamiento del sustrato para la obtención del producto.
Definición conceptual	Es la cantidad de producto sintetizado por cantidad de sustrato consumido

Fuente: De acuerdo a las características de la variable

3.5. Instrumentos

3.5.1. Técnicas de Investigación

Las técnicas que se van a emplear son el paso siguiente a realizar luego de haber definido el tipo y diseño de la investigación. Son recursos utilizados para facilitar la recolección y el análisis de los hechos observados. (Hernández et al., 2014).

El presente trabajo de investigación utilizó las siguientes técnicas para obtener información:

a. Técnicas de investigación de referencias bibliográficas

- Análisis documental: se buscó información de referencias en escritos, libros, normas legales, revistas científicas, videos, fotografías e internet para analizarlas.
- Análisis de contenido: para encontrar documentos para utilizarlos en el marco teórico y discusión de resultados.
- Elaboración de fichas: para registrar y almacenar datos de cada tema y análisis realizado.

b. Técnica de laboratorio

- Objetiva: técnica que facilitó obtener información sobre las variables y datos a registrar en las diferentes etapas experimentales de la investigación.

Para realizar el diseño experimental, el estudio se dividió en tres etapas experimentales que fueron las siguientes:

Etapa 1:

- Pretratamiento físico y térmico de las cáscaras de piña
- Hidrólisis enzimática de las cáscaras de piña

Etapa 2:

- Preparación y activación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- Proceso fermentativo de los mostos hidrolizados de las cáscaras de piña por *Saccharomyces cerevisiae*.

Etapa 3:

- Separación del etanol por destilación a partir del mosto alcohólico
- Caracterización final del etanol: determinación del grado alcohólico del mosto fermentado y porcentaje de etanol destilado
- Interpretación de resultados

3.5.2. Instrumentos de recolección de datos

Se utilizaron tablas donde se tomaron los datos obtenidos en las tres etapas experimentales desarrolladas: Pretratamiento de las cáscaras de piña (Etapa 1), Fermentación alcohólica de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en los mostos de cáscara de piña (Etapa 2), así como también los valores obtenidos al momento de realizar la destilación del mosto alcohólico para obtener el alcohol destilado (Etapa 3).

Instrumentos de recolección de información en laboratorio

Equipos:

- Balanza de precisión, modelo 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, Autoclave, Refrigeradora.

- Materiales de vidrio y otros:

Vasos de precipitado de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml, probetas de 100, 250, 500 y 1000 ml recipientes pyrex, buretas de 25 y 50 ml, pipetas volumétricas de 2,5 y 10 ml, placas petri pyrex, lunas 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, frascos de vidrio, papel filtro Whatman N° 1 y N° 4, cocina eléctrica, espátulas, varilla de vidrio, pro-pipetas, cronómetro, picetas, gradillas y otros.

- **Material biológico:**

Las muestras biológicas fueron cáscara de piña, enzima celulasa y levadura.

Se utilizó cáscaras de piña de la variedad Golden acopiada en puestos de jugos de frutas del pabellón de frutas y verduras, ubicados en el mercado de Lima y Callao. Debido a que la cáscara de piña es un residuo orgánico de fácil degradación es importante que luego de su recolección se transporte al laboratorio lo más pronto posible en envases estériles para evitar contaminaciones. Durante el periodo del estudio se llegaron a utilizar 20 kilos de cáscara de piña que permitieron obtener los mostos para la fermentación que se obtuvo durante los meses de setiembre del 2017 a agosto del 2018 en condiciones de laboratorio a una temperatura de 30°C.

Para la hidrólisis enzimática (HE) se utilizó la Enzima Gramozyme Celulasa fungal al 2%

Se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* seca instantánea Fleischmann, para la fermentación alcohólica.

- **Reactivos:**

Agua potable, agua destilada, hidróxido de sodio 0,1 y 1 N y al 5%, ácido cítrico al 1% (p/v), solución de Bicarbonato de sodio al 1% (p/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 , fenolftaleína al 1%.

Las fotos experimentales de los reactivos, materiales y equipos utilizados se muestran en los Anexos en la Figuras 20, 21 y 22.

3.6. Procedimiento

3.6.1. Metodología

La metodología seguida se basó en el conocimiento científico y tecnológico disponible de la siguiente manera:

En la **Etapa 1** se realizó el tratamiento y estandarización de las cáscaras de piña de la variedad Golden que consistía en el pretratamiento mecánico (TM), el tratamiento térmico (TT) por agua caliente en fase líquida (ALC) y la hidrólisis enzimática (HE) con celulasas. El pretratamiento mecánico (TM)

permitía disminuir el tamaño de las cáscaras y ampliar la superficie de hidrolisis y la disminución de la polimerización y cristalinidad de la lignocelulosa (según Arellano, 2015). El tratamiento térmico (TT) por agua caliente en fase líquida (ALC) fue realizado en la autoclave con altas temperaturas (150-180°C) y presión permitía que los polisacáridos hemicelulosa y lignina se empiecen a solubilizar para dejar la celulosa libre (según Talebnia et al., 2010). La hidrólisis enzimática (HE) se realizó con celulasas fúngicas que se encargan de hidrolizar la celulosa en oligosacáridos y luego en glucosa (según Sehnem et al., 2006).

Una vez listo el mosto hidrolizado de las cáscaras de piña se continuó con la **Etapa 2** donde se realizó la preparación y activación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (recomendada por Torija, 2002 y por Fajando & Sarmiento, 2008), se empleó la levadura seca instantánea Fleischmann y el material pretratado completo (MPC) de las cáscaras de piña obtenido en la Etapa 1 para el proceso fermentativo (PF) por la levadura considerando cuatro diferentes niveles de sólidos solubles o grados Brix (14, 17, 20 y 23 °Bx) y se inició el ciclo de fermentación con la levadura en 4 tiempos de fermentación (TFer) diferentes (48, 72, 96 y 120 horas).

Consecutivamente terminado este proceso fermentativo (PF), se realizó la **Etapa 3** de la caracterización final del mosto alcohólico y del destilado para ello se filtró el mosto alcohólico se calcularon los grados alcohólicos y se

realizó la destilación para su posterior determinación del porcentaje de alcohol por alcoholimetría (recomendado por Angulo, 2010; Arimuya & Tecco 2014). Durante el presente estudio de investigación se procedió en forma continua a realizar las etapas experimentales para obtener suficientes datos para la interpretación de los resultados y para corroborar los resultados obtenidos.

3.6.2. Procedimiento metodológico de cada etapa de la investigación

Etapa 1:

- *Pretratamiento físico y estandarización de las cáscaras de piña*

Es necesario el pre-tratamiento físico y térmico de la lignocelulosa de las cáscaras de piña de la variedad Golden. Se realizaron 3 pre-tratamientos: tratamiento mecánico (TM) y tratamiento térmico (TT) y un tratamiento térmico con presión en agua caliente en fase líquida (ACL).

El procedimiento desarrollado en la Etapa 1 para el pre-tratamiento de la lignocelulosa en las cáscaras de piña fue el siguiente:

- Las cáscaras de piña de la variedad Golden fueron seleccionadas descartando aquellas que presentaban daño causado por insectos o presencia de enfermedades.
- Se procedió luego al pesado de las cáscaras de piña, y posterior lavado de las mismas con agua potable para eliminar las impurezas y tierra adherida.

- Para el Pretratamiento de la deslignificación (eliminación de lignina), los residuos de cáscara de piña luego fueron sometidos a un proceso de tratamiento mecánico (TM) por trozado fino para la reducción a un tamaño entre 0,3 y 0,5 cm, para disminuir la dimensión de la partícula y aumentar la zona de contacto de la enzima celulasa para facilitar la hidrólisis enzimática que sigue el proceso.
- Luego los trozos de las cáscaras (30% p/v) fueron sometidos a un tratamiento térmico (TT) en agua a 90°C durante 1 hora, para favorecer que se desprenda la lignina y se ablanden las cáscaras. 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 cáscaras de piña y preservar de esta manera el sustrato en buenas condiciones para su hidrólisis enzimática y evitar la competencia microbiana por los nutrientes del medio.
- Después del tratamiento térmico (TT), se dejó enfriar y posteriormente se licuaron las cáscaras de piña.
- Se midieron los volúmenes de los mostos licuados de las cáscaras de piña y se colocaron en frascos de vidrio de borosilicato (resistentes al calor) previamente esterilizados de 1 litro de capacidad.
- Luego los frascos conteniendo los mostos de las cáscaras de piña fueron colocadas en la autoclave a 150°C y 1 atmósfera de presión por 3 horas para

un tratamiento térmico en agua caliente en fase líquida (ACL) y permitir que las altas temperaturas y presión provoquen una autohidrólisis térmica y permitan que la hemicelulosa y lignina se disuelvan y la celulosa quede expuesta facilitando la hidrólisis enzimática (HE) con la celulasas.

El esquema del procedimiento metodológico aplicado en el Tratamiento y Estandarización de las cáscaras de piña (Etapa 1) se indica en la Figura 16.

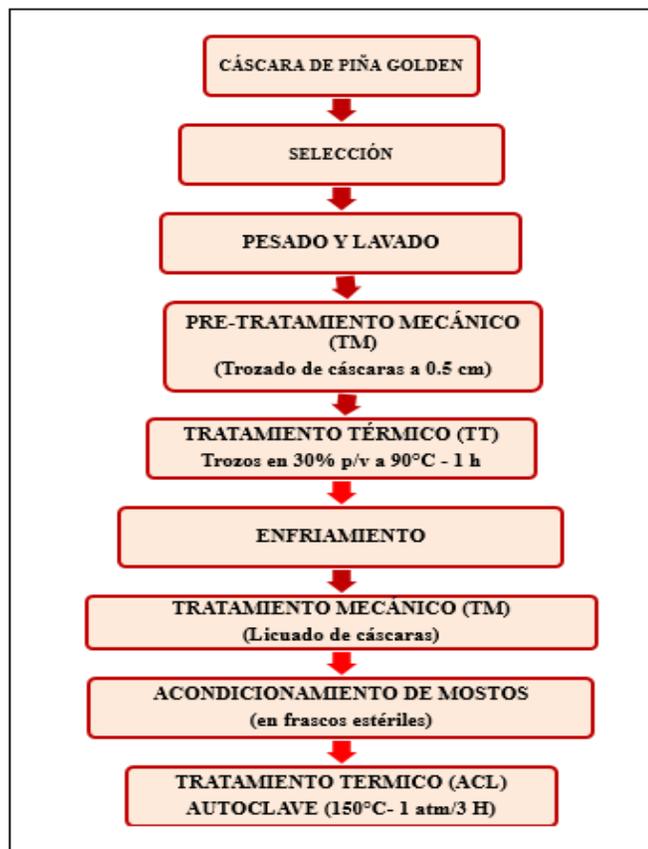


Figura 16. Diagrama del procedimiento metodológico aplicado para el tratamiento y estandarización de las cáscaras de piña (Etapa 1).

Fuente: De acuerdo al procedimiento realizado.

- *Hidrólisis enzimática de las cáscaras de piña con celulasa*

Para realizar la hidrólisis enzimática (HE), se utilizó la enzima Celulasa (Gramozyme) de origen fúngico en polvo de color crema. La Ficha Técnica de Gramozyme Celulasa (Granotec - Perú) y el Certificado de Análisis Gramozyme Celulasa se muestran en anexos en la Tabla 32 y 33.

El procedimiento de la hidrólisis enzimática (HE), fue el siguiente:

- Se utilizó la enzima Celulasa en concentraciones de 2.0 % (p/v) para obtener azúcares simples necesarios para la fermentación.
- Se colocaron las soluciones de celulasa en el agitador magnético Fratom durante 3 minutos para que se pueda homogeneizar completamente. Posteriormente se la añadió la solución enzimática a los frascos conteniendo los mostos licuados pre-tratados mecánica (TM) y térmicamente (TM).
- Se colocaron los frascos de los mostos preparados a partir de cáscaras de piña en incubación a 50 °C y pH 5 (dentro del rango de temperatura y pH de actividad de la Celulasa de acuerdo a Juri S. (2011) y Talebnia *et al.*, 2010).
- Se anotó el tiempo de inicio de hidrólisis enzimática registrando el cambio de los grados Brix de los mostos de las cáscaras de piña. Se mantuvo la

temperatura requerida para la actividad de la celulasa de 50°C en la incubadora en diferentes tiempos de incubación hasta alcanzar los niveles de grados Brix (°Bx) requeridos (14, 17, 20 y 23 °Bx).

- Se midió el grado Brix inicial utilizando el refractómetro de 0-32% Brix RHB-32/ATC.
- Para la medida del nivel de pH inicial se utilizó el medidor portátil de pH Hanna.
- Luego de obtener los niveles de sólidos solubles (°Brix) evaluados en el estudio (14, 17, 20 y 23 °Brix), se llevó a un tratamiento térmico a 85°C en baño maría por 10 minutos y poder inactivar la Celulasa y bloquear que continúe su actividad.
- Luego se procedió a filtrar los mostos hidrolizados. Se separó el sobrenadante y se midieron los niveles de pH y grados Brix de los mismos.
- Se determinaron los azúcares reductores con el método de Eynon-Lane anotándose sus resultados de la prueba de hidrólisis enzimática (método de Eynon-Lane. INDECOPI. NTP 203.002-1979).

El diagrama del procedimiento metodológico proceso aplicado para la hidrólisis enzimática (HE) por las enzimas celulasas a partir de mostos de cáscara de piña. (Etapa 1) se presenta en la Figura 17.

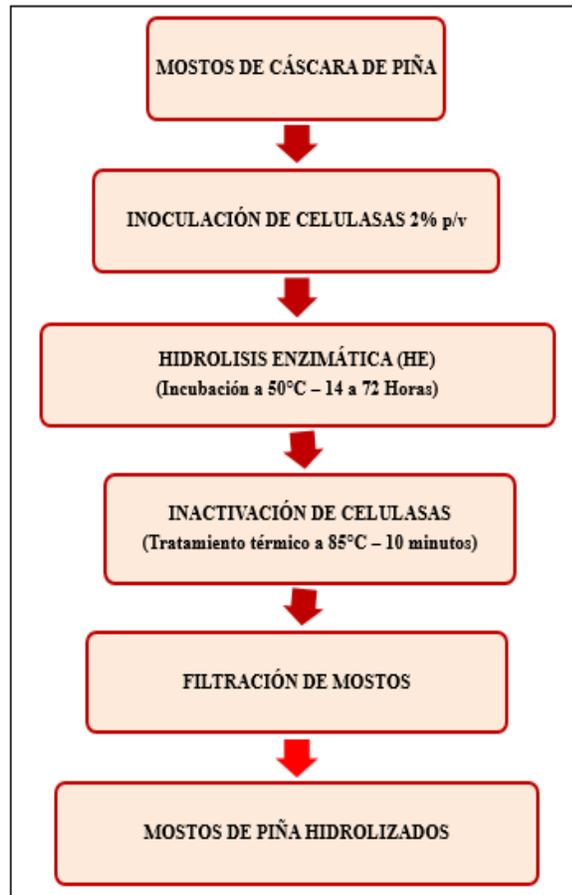


Figura 17. Diagrama del procedimiento metodológico del proceso aplicado para la hidrólisis enzimática (HE) por las enzimas celulasas a partir de mostos de cáscara de piña. (Etapa 1).

Fuente: De acuerdo al procedimiento realizado.

Las fotos experimentales del procedimiento desarrollado para esta primera etapa experimental del presente estudio se muestran en los Anexos en las figuras 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 y 31.

a. **Etapa 2:**

- *Preparación y activación de la levadura Saccharomyces cerevisiae.*

En esta parte experimental para la preparación y estandarización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se realizó la activación de la levadura seca instantánea Fleischmann y la preparación de la solución nutritiva para lograr una mayor actividad metabólica fermentativa.

El procedimiento de la preparación y estandarización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, fue el siguiente:

Activación de la levadura

- Para activarla se colocó 0.4 g de levadura en agua destilada con 3 g. de azúcar (como lo reportan Arimuya & Tecco 2014). Se utilizó levadura seca instantánea Fleischmann.
- Homogenizamos la mezcla en el agitador magnético Fratom por 5 minutos.
- Se cubrió la mezcla y se dejó en reposo por 15 a 20 minutos a temperatura de 30°C en la incubadora.

Preparación de la solución de Nutritiva

- Es necesario ayudar el proceso de fermentación añadiendo nutrientes adicionales para que la levadura pueda metabolizarlos junto con la glucosa.
- Para preparar la solución nutritiva, se utilizan los siguientes reactivos: 0,5 mg de Sulfato de magnesio $MgSO_4$, 2,5 mg de Fosfato de amonio $(NH_4)_2PO_4$, 0,5 mg de Sulfato de manganeso $MnSO_4$, 5mg de Sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$, y 2,5 mg de Sulfato de zinc $ZnSO_4$ y se disuelven en 20 ml de agua destilada (como lo reportan Arimuya & Tecco, 2014).
- Se diluye a 100 ml y se guarda para su posterior uso.

Proceso fermentativo de los mostos hidrolizados de las cáscaras de piña por *Saccharomyces cerevisiae*.

Se utilizó el material pretratado completo (MPC) de los mostos de las cáscaras de piña variedad Golden obtenido en la Etapa 1 para el proceso fermentativo (PF) por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* considerando cuatro diferentes niveles de sólidos solubles o grados Brix (14, 17, 20 y 23) y se inició el ciclo de fermentación con la levadura en 4 tiempos de fermentación diferentes (48, 72, 96 y 120 horas).

El procedimiento de la preparación y estandarización de la levadura fue el siguiente:

Inoculación de la levadura

- Para la fermentación se adicionó a los mostos con los grados Brix de estudio, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en proporción de 0.08g/100g (dato recomendado según Albán & Carrasco, 2012).
- Como fermentadores o biorreactores de tipo estático, se utilizaron frascos de borosilicato de 1000 ml capacidad, que fueron esterilizados previamente para impedir la presencia de otros microorganismos que podrían alterar el proceso fermentativo de la levadura.
- En los frascos, se añadió 850 ml de los mostos de cascara de piña con los 04 diferentes niveles de grados Brix (14, 17, 20 y 23°Bx).
- El nivel de pH de los mostos fue regulado a 4.5 adicionando el reactivo ácido cítrico.
- En cada uno de los frascos con mosto de cáscara de piña se inoculó 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 Fratam y cerramos los frascos.

Fermentación Alcohólica

- Se procedió al inicio de la fermentación alcohólica colocando los frascos de mostos de cáscara de piña de diferentes grados Brix (14, 17, 20 y 23°Bx) en una incubadora a una temperatura controlada de fermentación de 30°C durante los diferentes tiempos de fermentación (TFer) estudiados (48, 72, 96 y 120 horas) en condiciones anaerobias sin agitación.
- La fermentación se realizó a temperatura de 30°C tomando en consideración las recomendaciones de Fernández et al., (2014) y Ríos et al., (2005) que la consideran la temperatura óptima.
- En cada tratamiento la fermentación fue realizada por triplicado
- Al culminar el tiempo de fermentación del tratamiento evaluado se realizó una primera filtración de los residuos sólidos de las cáscaras de piña.
- Se controló la fermentación de los mostos alcohólicos evaluando los cambios de grados Brix en cada tratamiento evaluado para establecer los efectos de la combinación de ambas variables (°Bx y TFer) en los grados alcohólicos y etanol producido por la levadura. Se hicieron las medidas triplicadas con un Refractómetro 0 - 32% Brix RHB-32/ATC a temperatura ambiente.
- Se midió el pH final de la fermentación alcohólica en cada tratamiento.

- Las fotos experimentales del procedimiento de la segunda etapa experimental se muestran en los Anexos en las Figuras 32, 33 y 34.

En la Figura 18 se muestra el esquema del procedimiento metodológico aplicado en la segunda etapa experimental.

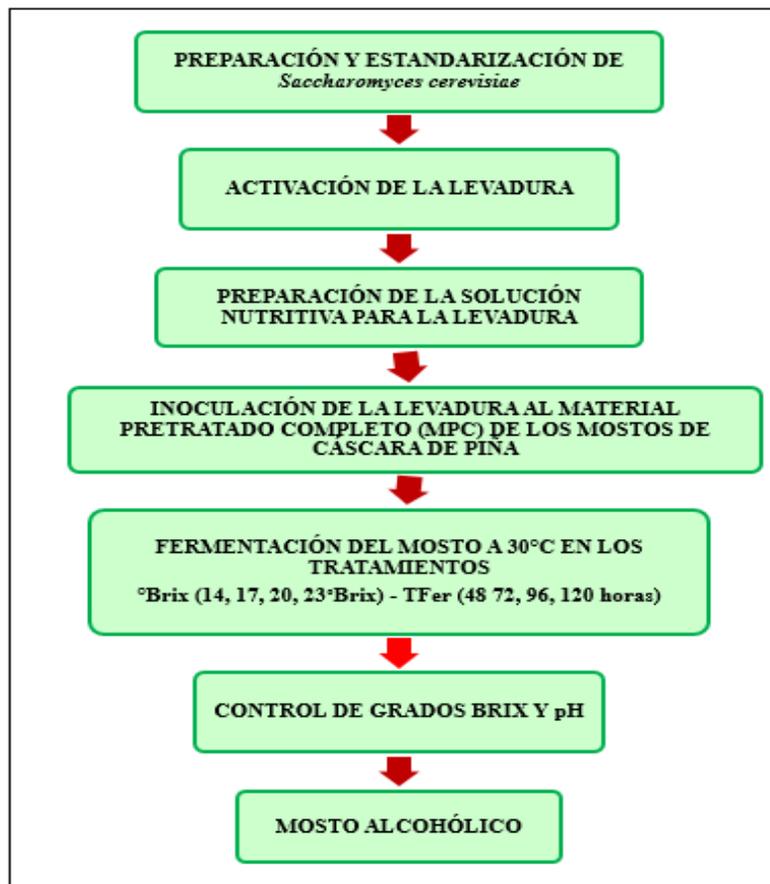


Figura 18. Diagrama del procedimiento metodológico aplicado en la Etapa experimental 2.

Fuente: De acuerdo al procedimiento realizado.

c. **Etapa 3:**

- *Separación del etanol por destilación a partir del mosto alcohólico.*

En los mostos alcohólicos obtenidos en la etapa 2, se hizo la conversión de los datos de Grados Brix ($^{\circ}\text{Brix}$) a Grado Alcohólico (GA) utilizando la Tabla de Conversión de Gravedad Específica a $^{\circ}\text{Baumé}$ ($^{\circ}\text{Be}$) - $^{\circ}\text{Brix}$ ($^{\circ}\text{Bx}$) - $^{\circ}\text{Alcohol}$ (GA) donde ($^{\circ}\text{Be} \times 1,8 = ^{\circ}\text{Brix}$). (de acuerdo a Amerine & Ough, 2001).

Se realizó de la siguiente manera:

- En los mostos alcohólicos (fermentados) antes de ser destilados se realizó un segundo filtrado para reducir dificultades en el equipo de destilación.
- Los mostos alcohólicos filtrados se destilaron aproximadamente por a una temperatura de 80 a 90°C para aislar el etanol de las distintas sustancias en el mosto.
- El alcohol obtenido de la destilación fue incoloro y libre de impurezas
- Al final, el volumen destilado fue medido volumétricamente y se guardó en botellas de vidrio para su análisis con el alcoholímetro, con la finalidad cuantificar la cantidad de etanol.

Caracterización final del etanol:

Se realizó de la siguiente manera:

- Se realizó la determinación del grado alcohólico del mosto alcohólico sin destilar.
- Se cuantificó el etanol destilado por alcoholimetría.
- Se determinó el contenido del alcohol destilado en porcentaje de etanol (% Et) en cada tratamiento utilizando el Alcoholímetro a 20°C.
- También se determinó la acidez titulable de etanol destilado

Interpretación de resultados

Los resultados de los análisis realizados se registraron para su interpretación estadística.

Las fotos experimentales del procedimiento desarrollado para la tercera etapa experimental del presente estudio se muestran en los Anexos en las figuras 35, 36, 37, 38, 39, 40 y 41.

El diagrama del procedimiento metodológico aplicado para la Separación del etanol por destilación a partir del mosto alcohólico y la caracterización final del etanol (Etapa 3) se presenta en la Figura 19.

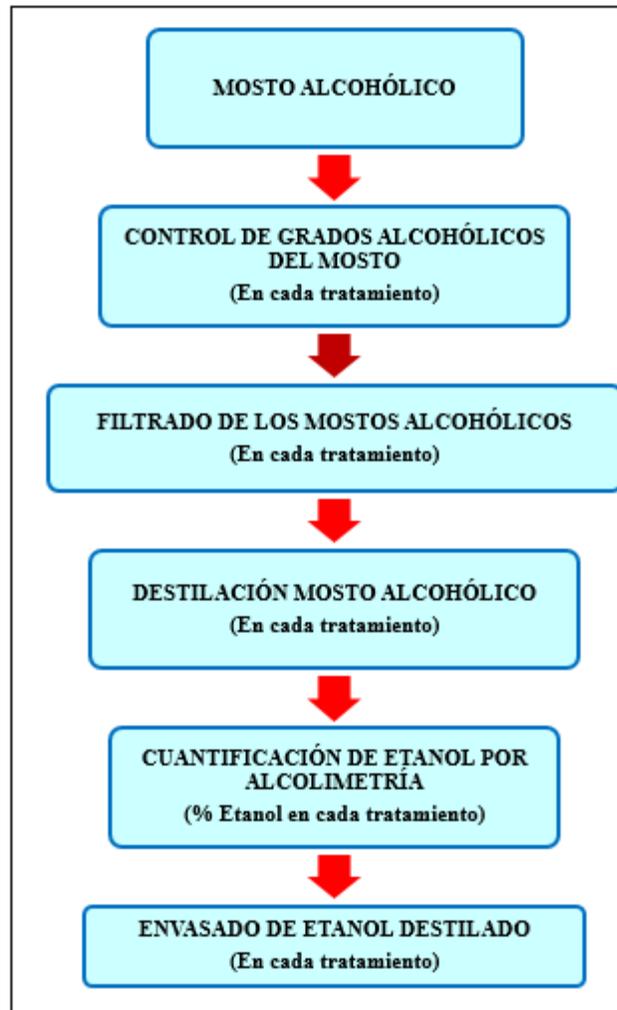


Figura 19. Diagrama del procedimiento metodológico aplicado para la Separación del etanol por destilación a partir del mosto alcohólico y la caracterización final del etanol (Etapa 3).

Fuente: De acuerdo al procedimiento realizado.

3.7. Análisis de datos

Considerando que el presente estudio, es una investigación aplicada de carácter experimental, para recolectar datos se realizaron análisis de las muestras de los diferentes tratamientos del estudio en base a las normas técnicas ya establecidas tales como:

1. Determinación de grado alcohólico. Tabla de Conversión de Gravedad Específica a °Baumé - °Brix - °Alcohol (Amerine & Ough, 2001).
2. Determinación del porcentaje de etanol por alcoholimetría. (*Norma Peruana* ITINTEC 210.011. Bebidas alcohólicas).
3. Determinación de la acidez (INDECOPI, NTP 203.070. 1977. Revisada el 2012; INDECOPI, NTP 211.040. 2012).

Para observar el nivel de significación de como afectaban las variables independientes (grados Brix y tiempos de fermentación) a la variable dependiente de la calidad del etanol destilado se realizaron diferentes análisis estadísticos que fueron los siguientes:

- Análisis multifactorial de varianza (ANOVA), para comprobar la existencia de diferencias estadísticas entre tratamientos.

- Análisis de contraste múltiple de rangos (Método Tukey para comparaciones múltiples), para comprobar diferencias estadísticas entre las medias.
- Análisis estadístico de superficie de respuesta y optimización de las variables de estudio para determinar que niveles de las variables optimizan una respuesta y poder elegir qué condiciones operativas se requieren para cumplir con las especificaciones de un proceso (obtención de etanol). Permite entender como los cambios en las variables (sólidos solubles y tiempos de fermentación) afectan una respuesta de interés (calidad del etanol obtenido).
- Análisis de regresión múltiple porque se estudia la posible relación entre variables independientes que son predictorias o explicativas (sólidos solubles y tiempos de fermentación) y otra variable dependiente (respuesta) que es la calidad del etanol obtenido expresado en grados alcohólicos del mosto, porcentaje de etanol destilado y porcentaje de rendimiento de obtención de etanol destilado.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Contrastación de Hipótesis

Considerando que la hipótesis comprende juicios problemáticos donde aún no se ha demostrado si son verdaderos o falsos e involucran dos o más de variables que están sujetas a comprobarse empíricamente (Pájaro, 2002), se procederá a contrarrestar las hipótesis del estudio que fueron las siguientes:

Hipótesis general:

- La aplicación del proceso de biotransformación permitirá obtener etanol por *Saccharomyces cerevisiae* mediante la biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus* evaluando los sólidos solubles y el tiempo de fermentación.

Hipótesis específicas:

1. El contenido inicial de sólidos solubles influye en la obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus*.

2. El tiempo de fermentación influye en la obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus*.
3. La calidad del etanol obtenido por biotransformación de cáscaras de piña será eficiente de acuerdo al grado alcohólico del mosto, porcentaje de etanol destilado y porcentaje de rendimiento de obtención de etanol destilado.

Para rechazar o aceptar las hipótesis planteadas en el presente estudio, se sometieron en base a análisis estadísticos los datos recolectados obtenidos en las pruebas experimentales realizadas en las tres etapas experimentales a nivel de laboratorio cuyos procedimientos se detallaron en el Capítulo III, a la observación y explicación de resultados según el requerimiento e información que se planteó en el plan tesis y a la información científica pertinente y confiable referida en el Capítulo II.

4.2. Análisis e interpretación

Después de realizar la recolección de datos al realizar los análisis en base a normas técnicas ya establecidas que se indicaron en el Capítulo III (Tabla de

°Baume-°Brix-°Alcohol; *Norma Peruana* ITINTEC 210.011; Norma INDECOPI, NTP 203.070. 1977. Revisada el 2012 y Norma INDECOPI, NTP 211.040. 2012), los datos resultantes fueron sometidos a los análisis estadísticos para apreciar el comportamiento para su respectiva interpretación de las variables involucradas (independientes y dependientes).

4.2.1. Comparación de los Grados alcohólicos (°A) del mosto sin destilar obtenidos respecto a sólidos solubles (°Bx) y los tiempos de fermentación

Los resultados obtenidos que permiten ver la relación entre las variables independientes de los sólidos solubles (Grados Brix) y tiempos de fermentación de los mostos de la cáscara de piña con la variable dependiente de grados alcohólicos obtenidos en cada tratamiento se indican en Anexos, Tabla 34.

Los resultados se procesaron utilizando análisis estadísticos para observar el nivel de significación de las variaciones en el contenido de sólidos solubles y los tiempos de fermentación sobre el grado alcohólico del mosto sin destilar, el porcentaje de etanol destilado y el porcentaje de rendimiento de etanol.

4.2.1.1. Contrastación de la Hipótesis general para el grado alcohólico del mosto

Hipótesis General:

- *Hipótesis nula (H_0)*

La aplicación del proceso de biotransformación no permitirá obtener etanol por *Saccharomyces cerevisiae* mediante la biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus* evaluando los sólidos solubles y el tiempo de fermentación.

- *Hipótesis alterna (H_a)*

La aplicación del proceso de biotransformación permitirá obtener etanol por *Saccharomyces cerevisiae* mediante la biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus* evaluando los sólidos solubles y el tiempo de fermentación.

Los análisis estadísticos de análisis de variancia (ANOVA) de la variable dependiente de calidad del etanol expresada como Grado alcohólico del mosto (sin destilar) demostraron que existieron diferencias significativas entre los sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) y los tiempos de fermentación (TFer) versus la calidad del etanol expresado en Grados alcohólicos ($^{\circ}$ A) del mosto sin destilar. (Tabla 15).

Tabla 15. Análisis de variancia del Grado alcohólico del Mosto versus los sólidos solubles (Grados Brix) y los tiempos de fermentación (TFer).

Pruebas de los efectos inter-sujetos (Inter-grupos)
Variable dependiente: Calidad del etanol en Grado alcohólico

Fuente de variación	Suma de cuadrados Tipo III	GI	Media Cuadrática	F	Significación
°Brix	14.330	3	4.777	20.583	.000
TFer	26.329	3	8.776	37.817	.000

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

En base a los análisis estadísticos realizados, se ACEPTA la Hipótesis General alterna debido a que se encontró:

- Respecto a los sólidos solubles (°Brix) se observa a una significación de $0.000 < 0.05$ de máximo valor aceptable de error, existe diferencias entre al menos uno de los niveles de sólidos solubles (grados Brix) evaluados.
- Respecto a los tiempos de fermentación se observa a una significación de $0.000 < 0.05$ de máximo valor aceptable de error, existe diferencias entre al menos uno de los Tiempos de Fermentación (TFer) evaluados.

4.2.1.2. Contrastación de la Hipótesis específica 1 para el grado alcohólico del mosto

Hipótesis Específica 1:

- *Hipótesis nula (H_0)*

*El contenido inicial de sólidos solubles no influye en la obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus*.*

- *Hipótesis alterna (H_a)*

*El contenido inicial de sólidos solubles influye en la obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus**

Con los datos obtenidos se realizó el método Tukey para comparaciones múltiples para el análisis de contraste múltiple de rangos y poder determinar que medias son significativamente diferentes unas de otras.

Los análisis estadísticos demostraron que existieron diferencias significativas entre los sólidos solubles (°Brix) versus los grados alcohólicos del mosto sin destilar. (Tabla 16)

Tabla 16. Análisis estadístico de comparaciones múltiples de Tukey del efecto de los sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) para la variable dependiente: Grado alcohólico ($^{\circ}$ A).

Pruebas post hoc

**Grados Brix (Mostos sin destilar)
Comparaciones múltiples
DHS de Tukey**

(I) Grados Brix	(J) Grados Brix	Significación	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite superior	Límite inferior
14	17	.765	-.7183	.3349
	20	.001	-1.3724	-.3192
	23	.000	-1.9058	-.8526
17	14	.765	-.3349	.7183
	20	.010	-1.1808	-.1276
	23	.000	-1.7141	-.6609
20	14	.001	.3192	1.3724
	17	.010	.1276	1.1808
	23	.046	-1.0599	-.0067
23	14	.000	.8526	1.9058
	17	.000	.6609	1.7141
	20	.046	.0067	1.0599

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

De acuerdo a los análisis estadísticos realizados, se ACEPTA la Hipótesis Específica 1 alterna debido a que se encontró:

Respecto a los sólidos solubles (°Brix) a una significación del 0.05 (máximo valor aceptable de error) se observa que sólo entre los grados Brix de 14 y 17 no existieron diferencias significativas ($0.765 > 0.05$) en el grado alcohólico obtenido, en los demás niveles si se observaron diferencias significativas.

4.2.1.3. Contrastación de la Hipótesis específica 2 para el grado alcohólico del mosto

Hipótesis Especifica 2:

- Hipótesis nula (H_0)

El tiempo de fermentación no influye en la obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus*.

- Hipótesis alterna (H_a)

El tiempo de fermentación influye en la obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus*.

Los análisis estadísticos demostraron diferencias significativas entre el tiempo de fermentación (TFer) versus los grados alcohólicos del mosto sin destilar. (Tabla 17).

Tabla 17. Análisis estadístico de comparaciones múltiples de Tukey del efecto del tiempo de fermentación (TFer) para la variable dependiente: Grado alcohólico (°A).

Tiempo de Fermentación
DHS de Tukey

(I) Tiempo de Fermentación	(J) Tiempo de Fermentación	Significación	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite superior	Límite inferior
48	72	.002	-1.2891	-.2359
	96	.000	-2.0391	-.9859
	120	.000	-2.4683	-1.4151
72	48	.002	.2359	1.2891
	96	.002	-1.2766	-.2234
	120	.000	-1.7058	-.6526
96	48	.000	.9859	2.0391
	72	.002	.2234	1.2766
	120	.145	-.9558	.0974
120	48	.000	1.4151	2.4683
	72	.000	.6526	1.7058
	96	.145	-.0974	.9558

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

Considerando los análisis estadísticos realizados, se ACEPTA la Hipótesis

Específica 2 alterna debido a que se encontró:

- Respecto a los tiempos de fermentación a una significación del 0.05 (máximo valor aceptable de error) se observa que sólo entre los tiempos de fermentación de 96 y 120 horas no existieron diferencias significativas ($0.145 > 0.05$) en el grado de alcohol obtenido, en los demás si se observaron diferencias significativas.

4.2.1.4. Contrastación de la Hipótesis específica 3 para el grado alcohólico del mosto

Hipótesis Específica 3:

- *Hipótesis nula (H_0)*

La calidad del etanol obtenido por biotransformación de cáscaras de piña no será eficiente de acuerdo con el grado alcohólico del mosto, porcentaje de etanol y rendimiento de la obtención de etanol.

- *Hipótesis alterna (H_a)*

La calidad del etanol obtenido por biotransformación de cáscaras de piña será eficiente de acuerdo con el grado alcohólico del mosto, porcentaje de etanol y rendimiento de la obtención de etanol

Se realizaron los análisis estadísticos aplicando la regresión múltiple para la variable dependiente de la calidad del etanol expresado como grado alcohólico del mosto sin destilar. El análisis estadístico se realizó utilizando unidades codificadas y los Coeficientes de regresión estimados de Grado Alcohólico mosto (Tabla 18).

Tabla 18. Superficies de respuesta y optimización del Grado alcohólico del mosto sin destilar según el grado Brix y el tiempo de fermentación (TFer).

SUPERFICIES DE RESPUESTA Y OPTIMIZACIÓN

Término	Coef	Coef. error standard	t	p
Constante	4.8542	0.05381	90.207	0.000
Grado <u>Brix</u> inicial	0.7188	0.07220	9.956	0.000
Tiempo Fermentación (H)	0.9863	0.07220	13.661	0.000

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

Los análisis demostraron que a una significación del 0.05 (máximo valor de aceptación de error), se comprueba que la constante, la variable de grados Brix y la variable de tiempo de fermentación son estables (son confiables los valores para el modelo matemático) para la variable dependiente de calidad del etanol expresado como grado alcohólico del mosto sin destilar (Tabla 19).

Tabla 19. Coeficientes de regresión múltiple estimados de Grado Alcohólico del mosto

Término	Coef
Constante	4.79244
Grado Brix inicial	-0.121056
Tiempo Fermentación (H)	0.0344421

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

Modelo de regresión múltiple:

$$^{\circ}\text{Alcohol Mosto sin destilar} = 4.79244 - 0.121056(GB) + 0.0344421(TFer)$$

Donde TFer: Tiempo de fermentación.

GB: Grados Brix

En el Gráfico 1, se puede observar la Gráfica de superficie de respuesta del grado alcohólico del mosto sin destilar versus tiempo de fermentación y grado Brix.

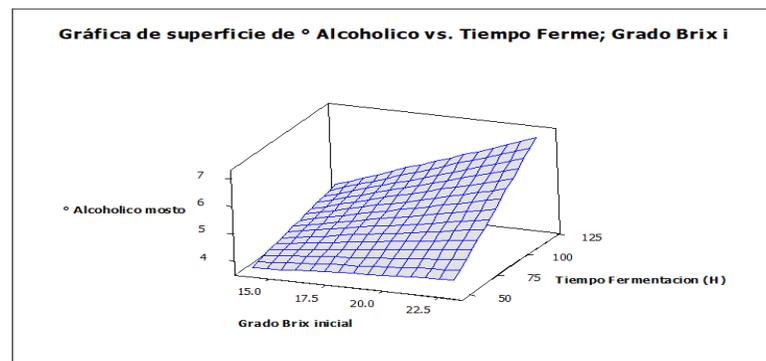


Gráfico 1. Gráfica de superficie de respuesta del grado alcohólico (°A) del mosto sin destilar versus el tiempo de fermentación y grado Brix.

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

El análisis estadístico de superficie de respuesta y optimización de las variables de estudio para determinar que niveles de las variables optimizan una respuesta y permitió entender como los cambios en las variables de sólidos solubles (Grados Brix) y tiempos de fermentación afectan la calidad del etanol obtenido expresado como grado alcohólico del mosto sin destilar. En el Gráfico 2, se observa que el gráfico de superficie del grado alcohólico versus el tiempo de fermentación y los sólidos solubles (°Brix) es un plano lo que cumple el modelo de regresión múltiple de la variable dependiente de calidad del etanol expresado como grado alcohólico del mosto sin destilar.

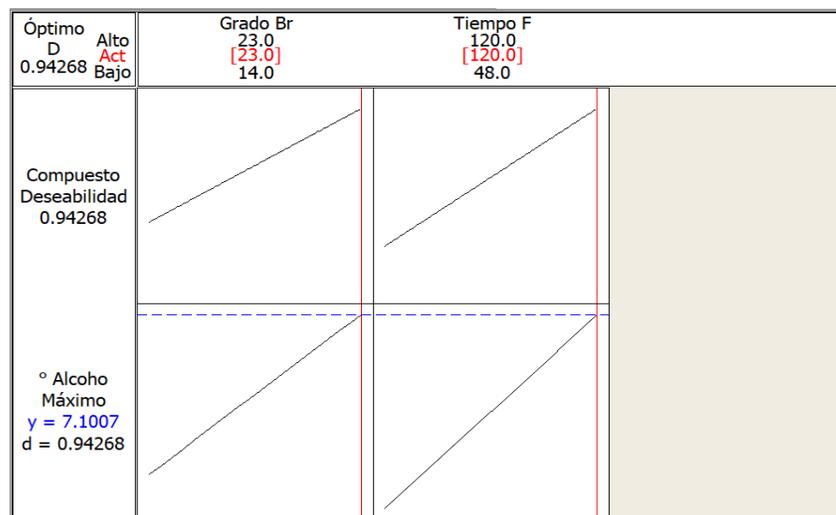


Gráfico 2. Superficies de respuesta y optimización del grado alcohólico (°A) del mosto sin destilar según el grado Brix y el tiempo de fermentación.

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

Interpretación:

- Según la gráfica de superficie de respuesta y optimización se aprecia para una aceptación de 0.94268 de valor deseado que se puede obtener 7.1007 como valor máximo de grado de alcohol del mosto sin destilar cuando se somete a 23 Grados Brix y a un tiempo de fermentación de 120 horas.
- Se ACEPTA la hipótesis específica 3 alterna de la calidad del etanol expresada para el grado alcohólico.

4.2.2. Comparación del porcentaje de etanol destilado (%Et) obtenido respecto a sólidos solubles (°Bx) y los tiempos de fermentación (TFer)

Los resultados obtenidos que permiten ver la relación entre las variables independientes de sólidos solubles (°Brix) y tiempos de fermentación (TFer) de los mostos de cáscara de piña con la variable dependiente de porcentaje de etanol destilado obtenidos en cada tratamiento que fueron determinados por alcolimetría como se expuso en el capítulo III se muestra en la Tabla 35 de anexos.

4.2.2.1. Contrastación de la Hipótesis general para el porcentaje de etanol destilado

Hipótesis general:

- *Hipótesis nula (H_0)*

La aplicación del proceso de biotransformación no permitirá obtener etanol por *Saccharomyces cerevisiae* mediante la biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus* evaluando los sólidos solubles y el tiempo de fermentación.

- *Hipótesis alterna (H_a)*

La aplicación del proceso de biotransformación permitirá obtener etanol por *Saccharomyces cerevisiae* mediante la biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus* evaluando los sólidos solubles y el tiempo de fermentación.

Los análisis estadísticos de análisis de variancia (ANOVA) demostraron que existieron diferencias significativas entre los sólidos solubles (°Brix) y los tiempos de fermentación para la variable dependiente de la calidad del etanol expresado como porcentaje de alcohol destilado. (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis de variancia de pruebas post hoc del tiempo de fermentación (TFer) para la variable dependiente: Porcentaje de Alcohol Destilado (% Et).

Pruebas de los efectos inter-sujetos
Variable dependiente: Porcentaje de Alcohol destilado

Fuente	Suma de cuadrados Tipo III	GI	Media Cuadrática	F	Significación
°Brix	7847.167	3	2615.722	258.941	.000
Tiempo	3608.333	3	1202.778	119.068	.000

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

En base a los análisis estadísticos realizados, se ACEPTA la Hipótesis General alterna debido a:

- Respecto a los sólidos solubles (°Brix) se observa a una significación de $0.000 < 0.05$ (máximo valor aceptable de error), existe diferencias entre al menos uno de los grados Brix evaluados para obtener alcohol destilado.
- Respecto a los tiempos de fermentación se observa a una significación de $0.000 < 0.05$ (máximo valor aceptable de error), existe diferencias entre al menos uno de los Tiempos de Fermentación evaluados para obtener alcohol destilado.

4.2.2.2. Contrastación de la Hipótesis específica 1 para el porcentaje de etanol destilado

Hipótesis Específica 1:

- *Hipótesis nula (H_0)*

*El contenido inicial de sólidos solubles no influye en la obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus*.*

- *Hipótesis alterna (H_a)*

*El contenido inicial de sólidos solubles influye en la obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus**

Los análisis estadísticos demostraron que existieron diferencias significativas entre los sólidos solubles (°Brix) versus la variable dependiente de la calidad del etanol expresado como porcentaje de alcohol destilado (% Et). (Tabla 21).

Tabla 21. Análisis estadístico de comparaciones múltiples de Tukey del efecto de los sólidos solubles (°Bx) para el porcentaje de etanol (% Et).

Grados Brix
DHS de Tukey

(I) Grados Brix	(J) Grados Brix	Significación	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite superior	Límite inferior
14	17	.000	-20.06	-13.11
	20	.000	-30.06	-23.11
	23	.000	-37.64	-30.69
17	14	.000	13.11	20.06
	20	.000	-13.47	-6.53
	23	.000	-21.06	-14.11
20	14	.000	23.11	30.06
	17	.000	6.53	13.47
	23	.000	-11.06	-4.11
23	14	.000	30.69	37.64
	17	.000	14.11	21.06
	20	.000	4.11	11.06

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

De acuerdo a los análisis realizados se encontró:

- Respecto a los sólidos solubles (°Brix) a una significación del 0.05 (máximo valor aceptable de error) se observa que entre todos los tratamientos de Grados Brix evaluados existieron diferencias significativas ($0.00 < 0.05$) en el porcentaje de alcohol destilado obtenido. Se ACEPTA la hipótesis específica 1 alterna para la variable dependiente de la calidad del etanol expresado como porcentaje de alcohol destilado.

4.2.2.3. Contrastación de la Hipótesis específica 2 para el porcentaje de etanol destilado

Hipótesis específica 2

- Hipótesis nula (H_0)

El tiempo de fermentación no influye en la obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus*.

- Hipótesis alterna (H_a)

El tiempo de fermentación influye en la obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus*.

Los análisis estadísticos del método Tukey para comparaciones múltiples, demostraron que existieron diferencias significativas entre los tiempos de fermentación (TFer) versus la variable dependiente de la calidad del etanol expresado como porcentaje de alcohol destilado (% Et). (Tabla 22).

Tabla 22. Análisis estadístico de comparaciones múltiples de Tukey del efecto del tiempo de fermentación (T_{fer}) para el Porcentaje de etanol (% Et).

Tiempo de Fermentación				
DHS de Tukey				
Tiempo de Fermentación	Tiempo de Fermentación	Significación	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite superior	Límite inferior
48	72	.000	-14.14	-7.19
	96	.000	-22.97	-16.03
	120	.000	-25.64	-18.69
72	48	.000	7.19	14.14
	96	.000	-12.31	-5.36
	120	.000	-14.97	-8.03
96	48	.000	16.03	22.97
	72	.000	5.36	12.31
	120	.185	-6.14	.81
120	48	.000	18.69	25.64
	72	.000	8.03	14.97
	96	.185	-.81	6.14

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

De acuerdo a los análisis realizados se encontró:

Respecto a los tiempos de fermentación a una significación del 0.05 (máximo valor aceptable de error) se observa que sólo entre los tiempos de fermentación de 96 y 120 horas no existieron diferencias significativas ($0.185 > 0.05$) en el porcentaje de etanol alcohol destilado obtenido, en la demás si se observaron diferencias significativas. Por lo tanto, se ACEPTA la Hipótesis Específica 2 alterna.

4.2.2.4. Contrastación de la Hipótesis específica 3 para la calidad del etanol obtenido

Hipótesis Específica 3:

- *Hipótesis nula (H_0)*

La calidad del etanol obtenido por biotransformación de cáscaras de piña no será eficiente de acuerdo con el grado alcohólico del mosto, porcentaje de etanol y rendimiento de la obtención de etanol.

- *Hipótesis alterna (H_a)*

La calidad del etanol obtenido por biotransformación de cáscaras de piña será eficiente de acuerdo con el grado alcohólico del mosto, porcentaje de etanol y rendimiento de la obtención de etanol

a. Correlación grado de alcohol del mosto sin destilar con el porcentaje de etanol destilado

El coeficiente de correlación de Pearson (r) es una medida lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas. Es independiente de la escala de medida de las variables. se mide en una escala de 0 a 1, tanto en dirección positiva como negativa. Un valor de “0” indica que no hay relación lineal entre las variables. Un valor de “1” o “-1” indica, respectivamente, una correlación positiva perfecta o negativa perfecta entre dos variables.

De acuerdo a los análisis estadísticos realizados se encontró que existió una correlación fuerte positiva entre el grado de alcohol del mosto sin destilar con el porcentaje de alcohol destilado y es de 0.80085 y la influencia del alcohol sin destilar respecto al alcohol destilado es de un 65.36%. (Gráfico 3).

Por lo que se ACEPTA la Hipótesis Especifica 3 alterna.

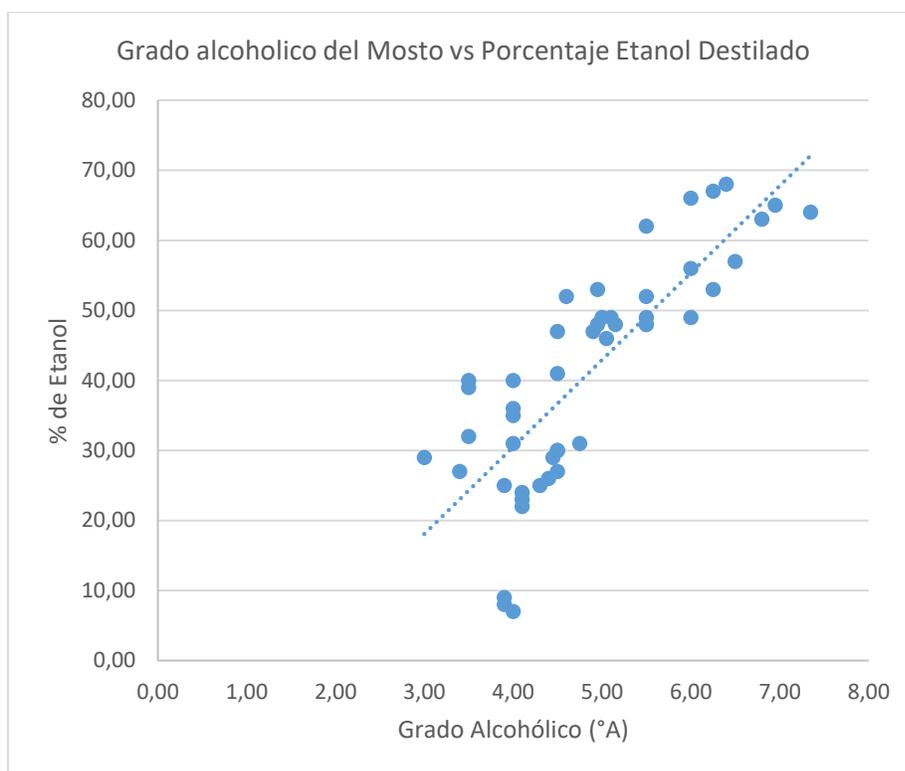


Gráfico 3. Coeficiente de correlación de Pearson del grado alcohólico (°A) del mosto sin destilar con el porcentaje de etanol destilado (%Et)

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

b. Análisis estadístico de la superficie de respuesta y optimización del porcentaje de etanol destilado

Se realizaron los análisis estadísticos aplicando el modelo matemático de regresión múltiple para la variable dependiente de la calidad del etanol expresado como porcentaje de etanol destilado. El análisis estadístico se realizó utilizando unidades codificadas y los Coeficientes de regresión estimados del porcentaje de etanol destilado. La superficie de respuesta y optimización del porcentaje de etanol destilado (%Et) se indica en la Tabla 23.

Tabla 23. Superficie de respuesta y optimización del porcentaje de etanol destilado (% Et) según el grado Brix y el tiempo de fermentación (TFer).

**SUPERFICIES DE RESPUESTA Y OPTIMIZACIÓN.
ETANOL DESTILADO**

Término	Coef	Coef. error standard	t	p
Constante	41.0833	0.6381	64.381	0.000
Grado <u>Brix</u> inicial	16.8750	0.8561	19.711	0.000
Tiempo Fermentación (H)	11.3000	0.8561	13.199	0.000

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

Los análisis demostraron que a una significación del 0.05 (máximo valor de aceptación de error), se comprueba que la constante, la variable de grados Brix y la variable de tiempo de fermentación son estables es decir son confiables los valores para el modelo matemático (Tabla 24). Por tal motivo se acepta el modelo de regresión múltiple de la variable dependiente calidad del etanol expresado como porcentaje de etanol destilado es decir se ACEPTA la hipótesis específica 3 alterna.

Tabla 24. Coeficientes de regresión múltiple estimados del Porcentaje de etanol destilado (% Et).

Término	Coef
Constante	-46.4567
Grado <u>Brix</u> inicial	3.30667
Tiempo Fermentación (H)	0.216250

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

Modelo:

$$\% \textit{Etanol destilado} = -46.4567 + 3.30667(GB) + 0.216250(TFer)$$

Donde T Fer: Tiempo de fermentación.

GB: Grados Brix

El análisis estadístico de superficie de respuesta y optimización de las variables de estudio para hallar los niveles de las variables que optimizan una respuesta y

permitió entender como los cambios en las variables de sólidos solubles (Grados Brix) y tiempos de fermentación afectan la calidad del etanol obtenido expresado como porcentaje de etanol destilado.

En el Gráfico 4, se puede observar que el gráfico de superficie de respuesta y optimización del porcentaje de etanol versus el tiempo de fermentación y los sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) es un plano lo que cumple el modelo de regresión múltiple para la variable dependiente de calidad del etanol expresado como porcentaje de etanol destilado.

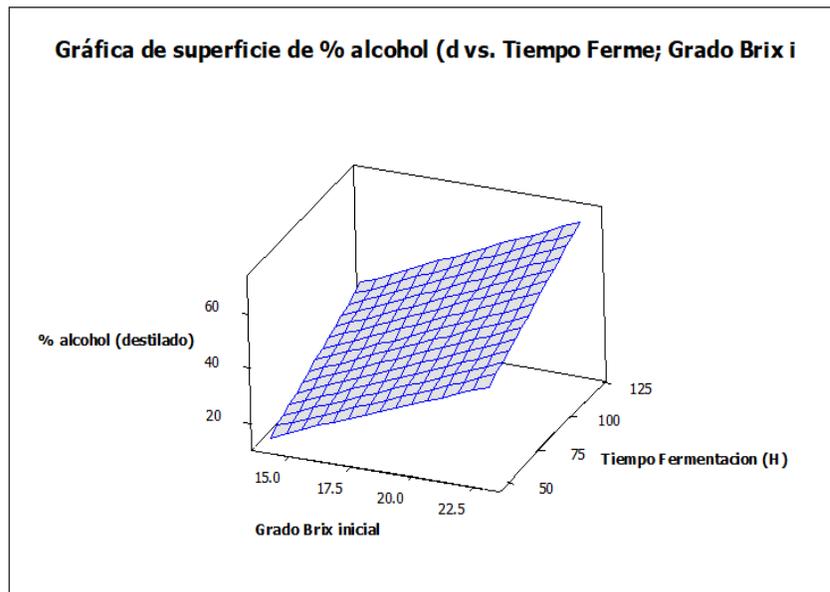


Gráfico 4. Superficie de respuesta y optimización del Porcentaje de Etanol destilado (%Et) versus los sólidos solubles (grados Brix) y el tiempo de fermentación.

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

De acuerdo a la gráfica del análisis estadístico de las superficies de respuesta y optimización del porcentaje de etanol destilado en la gráfica de superficie se observa que a una aceptación de 1.0000 de valor deseado se puede obtener como máximo de porcentaje de etanol destilado 70.1133, cuando se somete a 23 Grados Brix y a un tiempo de fermentación de 120 horas. (Gráfico 5).

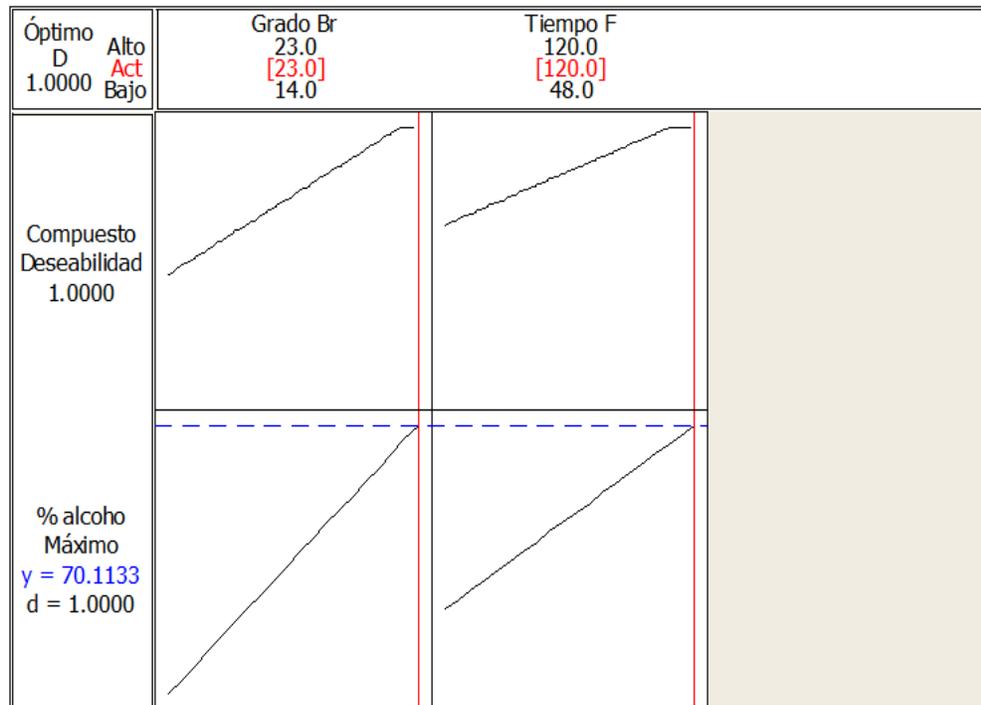


Gráfico 5. Superficie de respuesta y optimización del Porcentaje de Etanol destilado (%Et) versus los sólidos solubles (grados Brix) y el tiempo de fermentación (TFer).

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

4.2.3. Comparación del porcentaje de rendimiento del etanol (%Ret) obtenido respecto a sólidos solubles (°Bx) y los tiempos de fermentación (TFer)

Con los datos de los volúmenes de etanol destilado obtenidos a partir de los volúmenes de mostos alcohólicos de las cáscaras de piña se calculó el porcentaje de rendimiento del etanol destilado en cada tratamiento evaluado los resultados obtenidos que permiten ver la relación entre las variables independientes de sólidos solubles (°Brix) y tiempos de fermentación (TFer) en mostos de cáscara de piña con el porcentaje de rendimiento del etanol destilado obtenidos en cada tratamiento los que se muestran en la tabla 36 de anexos.

4.2.3.1. Contrastación de la Hipótesis general para el porcentaje de rendimiento del etanol destilado.

Hipótesis General:

- *Hipótesis nula (H_0)*

La aplicación del proceso de biotransformación no permitirá obtener etanol por *Saccharomyces cerevisiae* mediante la biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus* evaluando los sólidos solubles y el tiempo de fermentación.

- *Hipótesis alterna (H_a)*

La aplicación del proceso de biotransformación permitirá obtener etanol por *Saccharomyces cerevisiae* mediante la biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus* evaluando los sólidos solubles y el tiempo de fermentación.

El análisis de variancia (ANOVA), demostró que existió diferencias estadísticas significativas para los sólidos solubles (°Brix) y los tiempos de fermentación versus el porcentaje de rendimiento del etanol destilado. (Tabla 25).

Tabla 25. Análisis estadístico de variancia de pruebas post hoc del tiempo de fermentación (TFer) para la variable dependiente: Porcentaje de Etanol destilado (% Et).

Pruebas de los efectos inter-sujetos
Variable dependiente: % de Rendimiento Etanol destilado

Fuente	Suma de cuadrados Tipo III	GI	Media Cuadrática	F	Significación
°Brix	707.896	3	235.965	117.953	.000
Tiempo	551.563	3	183.854	91.904	.000

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

En base a los análisis estadísticos realizados, se ACEPTA la Hipótesis General alterna debido a que se encontró:

Para la variable independiente de grados Brix se observa a una significación de $0.000 < 0.05$ (máximo valor aceptable de error), existe diferencias entre al menos uno de los grados Brix evaluados para obtener porcentaje de rendimiento de etanol destilado.

Para la variable independiente de Tiempos de Fermentación, se observa a una significación de $0.000 < 0.05$ de máximo valor aceptable de error, existe diferencias entre al menos uno de los Tiempos de Fermentación evaluados para obtener porcentaje de rendimiento de etanol destilado.

4.2.3.2. Contrastación de la Hipótesis específica 1 para el porcentaje de rendimiento del etanol destilado.

Hipótesis Específica 1:

- *Hipótesis nula (H_0)*

*El contenido inicial de solidos solubles no influye en la obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus**

- *Hipótesis alterna (H_a)*

*El contenido inicial de solidos solubles influye en la obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus**

Los análisis estadísticos demostraron que existieron diferencias significativas entre los sólidos solubles (°Brix) versus el porcentaje de rendimiento del etanol destilado.

A una significación del 0.05 (máximo valor aceptable de error) se observa que entre todos los niveles de sólidos solubles (°Brix) evaluados existieron diferencias significativas ($0.00 < 0.05$) en el porcentaje de rendimiento del etanol destilado. (Tabla 26).

Tabla 26. Análisis estadístico de DHS de Tukey de los sólidos solubles (Grados Brix) para la variable dependiente: Calidad del etanol obtenido expresada por el Porcentaje de rendimiento de etanol destilado (% REt).

Grados Brix
DHS de Tukey

(I) Grados Brix	(J) Grados Brix	Significación	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite superior	Límite inferior
14	17	.015	-3.38	-.29
	20	.000	-11.05	-7.95
	23	.000	-8.63	-5.54
17	14	.015	.29	3.38
	20	.000	-9.21	-6.12
	23	.000	-6.80	-3.70
20	14	.000	7.95	11.05
	17	.000	6.12	9.21
	23	.001	.87	3.96
23	14	.000	5.54	8.63
	17	.000	3.70	6.80
	20	.001	-3.96	-.87

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

En base a los análisis estadísticos realizados, se ACEPTA la Hipótesis Específica 1 alterna.

4.2.3.3. Contrastación de la Hipótesis específica 2 para el porcentaje de rendimiento del etanol destilado.

Hipótesis Específica 2:

- Hipótesis nula (H_0)

El tiempo de fermentación no influye en la obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus*.

- Hipótesis alterna (H_a)

El tiempo de fermentación influye en la obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* por biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus*.

El análisis estadístico de comparaciones múltiples de Tukey del tiempo de fermentación (Tfer) para la variable dependiente: Calidad del etanol obtenido expresada por el Porcentaje de rendimiento de etanol destilado (% REt), se encuentra en la Tabla 27.

Tabla 27. Análisis estadístico de comparaciones múltiples de Tukey del tiempo de fermentación (*Tfer*) para la variable dependiente: Calidad del etanol obtenido expresada por el Porcentaje de rendimiento de etanol destilado (% *REt*).

Tiempo de Fermentación
DHS de Tukey

(I) Grados Brix	(J) Grados Brix	Significación	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite superior	Límite inferior
48	72	.000	-4.55	-1.45
	96	.000	-8.05	-4.95
	120	.000	-10.46	-7.37
72	48	.000	1.45	4.55
	96	.000	-5.05	-1.95
	120	.000	-7.46	-4.37
96	48	.000	4.95	8.05
	72	.000	1.95	5.05
	120	.001	-3.96	-8.7
120	48	.000	7.37	10.46
	72	.000	4.37	7.46
	96	.001	.87	3.96

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

De acuerdo a los análisis realizados se encontró:

- A una significación del 0.05 (máximo valor aceptable de error) se observa que entre todos los tiempos de fermentación evaluados existieron diferencias significativas ($0.185 > 0.05$) en el rendimiento de etanol obtenido. Por lo cual se ACEPTA la hipótesis específica 2 alterna.

4.2.3.4. Contrastación de la Hipótesis específica 3 para el porcentaje de rendimiento del etanol destilado.

Hipótesis Específica 3:

- *Hipótesis nula (H_0)*

La calidad del etanol obtenido por biotransformación de cáscaras de piña no será eficiente de acuerdo con el grado alcohólico del mosto, porcentaje de etanol y rendimiento de la obtención de etanol.

- *Hipótesis alterna (H_a)*

La calidad del etanol obtenido por biotransformación de cáscaras de piña será eficiente de acuerdo con el grado alcohólico del mosto, porcentaje de etanol y rendimiento de la obtención de etanol.

Se realizaron los análisis estadísticos de la superficie de respuesta y optimización aplicando el modelo matemático de regresión múltiple de la variable dependiente calidad del etanol expresado como porcentaje de rendimiento de obtención de etanol destilado. El análisis estadístico se realizó utilizando unidades no codificadas y los Coeficientes de regresión estimados del porcentaje de rendimiento de obtención de etanol destilado (Tabla 28 y 29).

Tabla 28. Superficie de respuesta y optimización del porcentaje de rendimiento de obtención de etanol (% REt) según el grado Brix y el tiempo de fermentación (TFer).

**SUPERFICIES DE RESPUESTA Y OPTIMIZACIÓN.
PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE ETANOL**

Término	Coef	Coef. error standard	t	p
Constante	23.271	0.3456	67.340	0.000
Grado <u>Brix</u> inicial	4.338	0.4636	9.355	0.000
Tiempo Fermentación (H)	4.538	0.4636	9.787	0.000

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

Los análisis demostraron que a una significación del 0.05 (máximo valor de aceptación de error), se comprueba que la constante, la variable de grados Brix y la variable de tiempo de fermentación son estables (son confiables los valores para el modelo matemático).

Por tal motivo se acepta el modelo de regresión múltiple para la variable dependiente de calidad del etanol expresado como porcentaje de rendimiento de obtención de etanol destilado es decir se **ACEPTA** la hipótesis específica 3 alterna.

Tabla 29. Coeficientes de regresión múltiple estimados del Porcentaje de rendimiento de obtención de etanol (% REt).

Término	Coef
Constante	-20.6167
Grado <u>Brix</u> inicial	1.80000
Tiempo Fermentación (H)	0.310185

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

Modelo:

$\% \text{ de Rendimiento} = -20.6167 + 1.80000(GB) + 0.310185(TFer)$

Donde TFer: Tiempo de fermentación.

GB: Grados Brix

El análisis estadístico de superficie de respuesta y optimización de las variables de estudio permitió entender como los cambios en las variables de sólidos solubles y tiempos de fermentación afectan calidad del etanol expresado como porcentaje de rendimiento de obtención de etanol destilado.

En el Gráfico 6, se puede observar que el gráfico de superficie de respuesta y optimización del porcentaje de rendimiento de obtención de etanol destilado versus el tiempo de fermentación y los sólidos solubles (°Brix) es un plano lo que cumple el modelo de regresión múltiple para la variable dependiente de calidad del etanol expresado como porcentaje de rendimiento de obtención de etanol destilado.

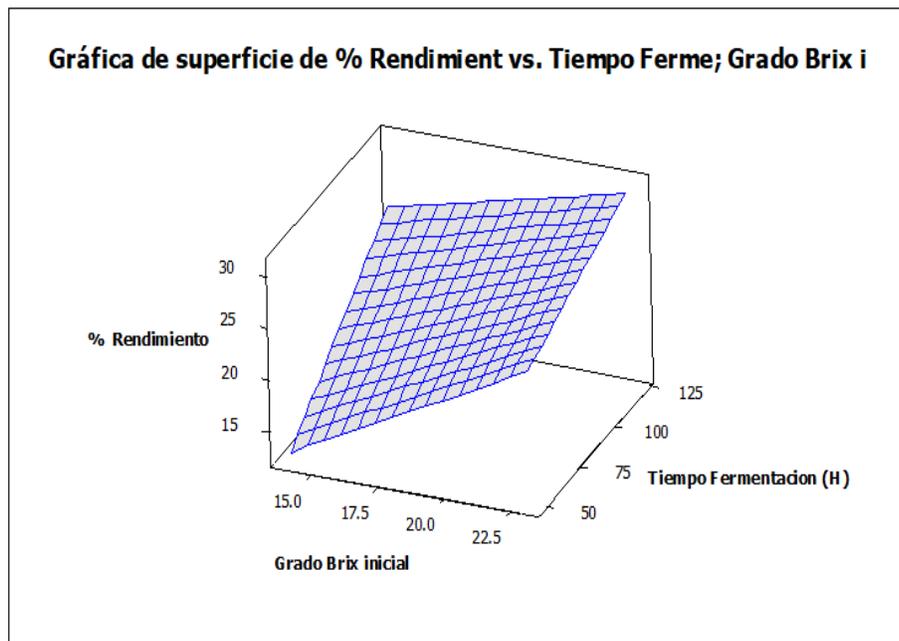


Gráfico 6. Gráfica de superficie de respuesta y optimización del porcentaje de rendimiento de obtención de etanol destilado (%REt) versus el tiempo de fermentación y los sólidos solubles (°Brix).

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

De acuerdo a la gráfica del análisis estadístico de las superficies de respuesta y optimización del porcentaje de rendimiento de obtención de etanol destilado en la gráfica de superficie se observa que a una aceptación de 0.87667 de valor deseado se puede obtener como máximo de grado de porcentaje de rendimiento de 30.5333 cuando se somete a 23 Grados Brix y a un tiempo de fermentación de 120 horas. (Gráfico 7).

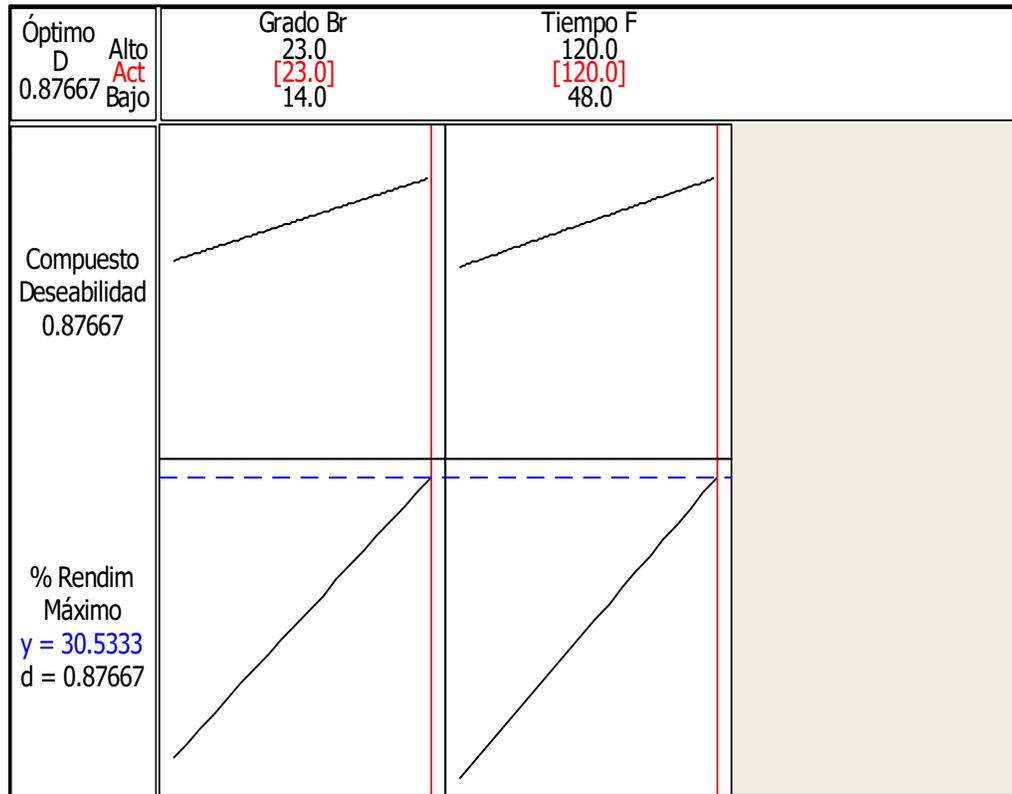


Gráfico 7. Superficies de respuesta y optimización del porcentaje de rendimiento de obtención de etanol (% REt) versus el tiempo de fermentación y los sólidos solubles (°Brix).

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

CAPÍTULO V

5.1. DISCUSION

5.1.1. Primera Etapa Experimental: Pretratamientos

Para obtener etanol por biotransformación de cáscara de piña Golden, se requiere seleccionar inicialmente las cáscaras de piña descartando aquellas que presentaban daño causado por insectos, hongos o presencia de enfermedades para obtener resultados confiables al realizar las pruebas de pretratamientos y fermentación alcohólica utilizando los componentes lignocelulósicos de las cáscaras de la piña.

En la tabla 30 se indican los balances de materia para obtener etanol utilizando 20 kilogramos de cáscaras de piña variedad Golden.

Tabla 30. Balances de materia para la obtención de etanol de cáscaras de Piña

Cáscara de Piña Característica evaluada	Valor
Peso de la cáscara (Kg.)	20.00
Humedad (%)	71.84.
Acidez <u>Titulable</u> (%)	1.5
pH	4.7

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

Para obtener etanol por biotransformación de cáscaras de piña es muy importante un tratamiento mecánico y térmico previo de las cáscaras lo que concuerda con algunos investigadores que manifiestan que para procesar bien los materiales lignocelulósicos se deben realizar pretratamientos para promover la actividad de celulasas en la hidrólisis de celulosa y obtener azúcares que se fermentables (Medina et al., 2011) ya que la lignocelulosa es muy resistente a ser hidrolizada debido a la unión de enlaces covalentes, fuerzas de van der Waals y puentes intermoleculares entre sus componentes (Kumar et al., 2010), por lo que el tratamiento mecánico, aumenta la superficie para ser hidrolizada y disminuye la polimerización (Palmowski y Mueller 1999). Los pretratamientos del sustrato lignocelulósico generan regiones amorfas en la celulosa susceptibles a hidrolisis (Hu y Wen, 2008) y aumenta la digestibilidad incrementando la porosidad lo que permite el acceso a la celulosa en la etapa de hidrólisis (Casp & Abril, 2003) y permite su paso a azúcares como la glucosa que se pueden fermentar (Han et al., 2011) lo que aumenta la tasa de producción de etanol (Talebnia et al., 2010).

Se realizaron también tratamientos térmicos en fase líquida (ALC) a 150°C y 1 atm de presión en la autoclave por 3 horas lo que permitió que la alta temperatura permita que los polisacáridos de la lignocelulosa de las cáscaras de piña se solubilicen y permitan la posterior hidrólisis enzimática de la celulosa por las enzimas Celulasa.

Para el presente estudio posterior al tratamiento mecánico (TM) y el tratamiento térmico (ACL) en la primera etapa experimental (Etapa 1) se utilizó la enzima Gramozyme Celulasa fungal que provocó la hidrólisis del polisacárido celulosa a oligosacáridos de cadena corta que se evidenció por el aumento de contenido de azúcares reductores y la obtención de mostos glucosados que fueron utilizados en la segunda etapa experimental del proceso fermentativo de los mostos hidrolizados de las cáscaras de piña por *Saccharomyces cerevisiae*. Se debe realizar la hidrólisis enzimática del polisacárido celulosa por la incapacidad de la levadura al no tener celulasas para hidrolizarla. Al respecto, Casp & Abril (2003), señalan que *Saccharomyces cerevisiae* no hidroliza polisacáridos como almidón o dextrinas y se debe realizar una hidrólisis enzimática para la biotransformación de los oligosacáridos en etanol. Por su parte, Rodríguez (2008), indica que el método con mayor potencial de hidrólisis de azúcares de la lignocelulosa demanda de enzimas industriales y espera que a largo plazo mejoren las eficiencias de conversión enzimática y de fermentación. Diversos autores proponen usar enzimas celulasas y hemicelulasas de mohos para hidrolizar residuos lignocelulósicos que convierten la celulosa cristalina y la hemicelulosa a azúcares simples (Krogh et al., (2004; Sehnem et al., (2006). Por su parte, Medina (2011), señala que se debe ajustar el nivel de pH y la temperatura para favorecer la hidrólisis enzimática. A su vez, Corredor (2008) indica que es importante identificar los parámetros óptimos de pretratamiento y

las condiciones de hidrólisis enzimática para convertir las cáscaras en azúcares fermentables.

5.1.2. Segunda Etapa Experimental: Proceso fermentativo de los mostos hidrolizados de las cáscaras de piña por *Saccharomyces cerevisiae*.

Variaciones de sólidos solubles en el proceso fermentativo

Al utilizar el material pretratado completo (MPC) de los mostos de las cáscaras de piña variedad Golden obtenido en la Etapa 1 luego del tratamiento mecánico (TM), tratamiento térmico (ACL) y el tratamiento de hidrólisis enzimática (HE) para iniciar el proceso fermentativo (PF) por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* considerando cuatro diferentes niveles de sólidos solubles (14, 17, 20 y 23 °Bx) y cuatro diferentes tiempos de fermentación (48, 72, 96 y 120 horas) en el ciclo de fermentación con la levadura se observó que conforme aumentaba el tiempo de fermentación durante el proceso fermentativo de los mostos de las cáscaras de piña, iba disminuyendo en forma creciente los grados Brix y consumiéndose los azúcares reductores en diferentes niveles de acuerdo al Grado Brix inicial (14, 17, 20 y 23°Brix) y tiempos de incubación (48, 72, 96 y 120 horas) en cada tratamiento. Esta disminución ocurrió por el alto porcentaje de sólidos solubles iniciales que metabolizaron las levaduras en la fermentación y con el transcurso del tiempo disminuían los sólidos solubles. (Gráfico 8).

Al respecto Machado & Abreu, (2007) señalan que en la fermentación los azúcares son transformados por microorganismos en alcohol y gas carbónico. Esto concuerda con Mitis (2015), quien señala que el contenido de sólidos solubles del mosto influye debido a que son azúcares que se fermentan y producen alcohol y que cuando estos descienden, la cantidad de alcohol aumenta. Argote et al., (2015), informan que la levadura consume azúcares para obtener etanol y la eficacia de la conversión depende de las adecuadas condiciones.

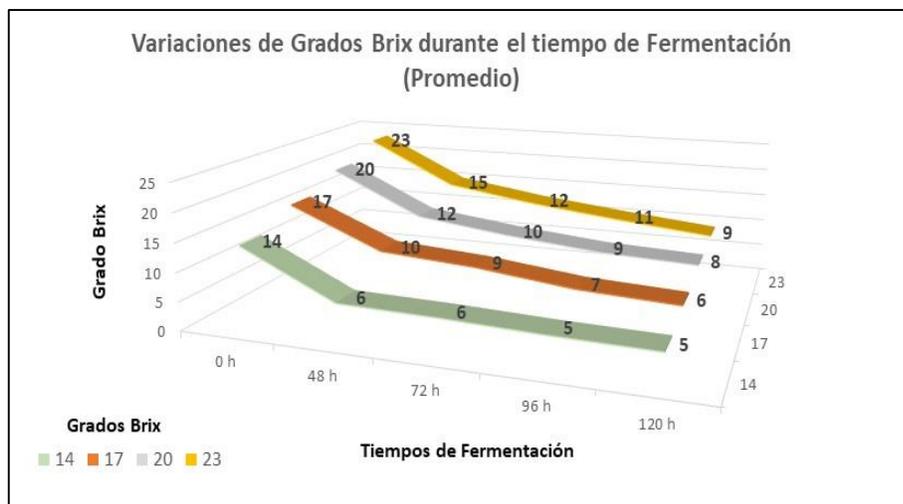


Gráfico 8. Variaciones promedio de los sólidos solubles (°Bx) durante el tiempo de fermentación (TFer).

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

En todos los tratamientos el mayor descenso de los sólidos solubles (°Bx) ocurrió al quinto día de la fermentación (120 horas), siendo el mosto de 23

°Brix el que presentó un descenso más rápido de los sólidos solubles (°Bx) con un consumo de 14.07 unidades de sólidos solubles (°Bx) a las 120 horas de la fermentación, mientras que en los tratamiento de 14°Bx y 17°Bx el consumo fue más lento el proceso fermentativo llegando a un consumo de 9.13 y 10.73 unidades de sólidos solubles (°Bx) a las 120 horas de la fermentación (Tabla 31).

La mayor disminución del grado Brix y aumento del grado alcohólico se observó a las 120 horas del inicio de la fermentación, lo que no coincide con Hernández y Martínez (2012) que reportaron que el mayor tiempo de fermentación ronda las 72 horas.

Tabla 31. Variaciones promedio de los sólidos solubles (°Br) de los mostos de cáscara de piña en los diferentes tratamientos durante el tiempo de fermentación.

Sólidos solubles (°Bx)						
°Bx Tratamiento	°Bx 0 h	°Bx 48 h	°Bx 72 h	°Bx 96 h	°Bx 120 h	Consumo total
14	14	6.13	5.80	5.20	4.87	9.13
17	17	10.13	9.00	7.07	6.27	10.73
20	20	12.33	10.23	8.67	8.00	12.00
23	23	15.00	12.47	10.57	8.93	14.07

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

Variaciones de los grados alcohólicos durante el proceso fermentativo

En los tratamientos de sólidos solubles ($^{\circ}\text{Bx}$), el mayor aumento de grados alcohólicos ($^{\circ}\text{A}$) ocurrió a las 96 y 120 horas de la fermentación siendo el mosto de 23 $^{\circ}\text{Brix}$ donde ocurrió el mayor nivel de grados alcohólicos (7.23°A) a las 120 horas de fermentación, mientras que los tratamientos de 14 $^{\circ}\text{Bx}$ y 17 $^{\circ}\text{Bx}$ registraron los valores de grados alcohólicos ($^{\circ}\text{A}$) más bajos llegando a niveles promedio máximos de 4.57 y 5.37 $^{\circ}\text{A}$ respectivamente a las 120 horas de la fermentación. (Gráfico 9).

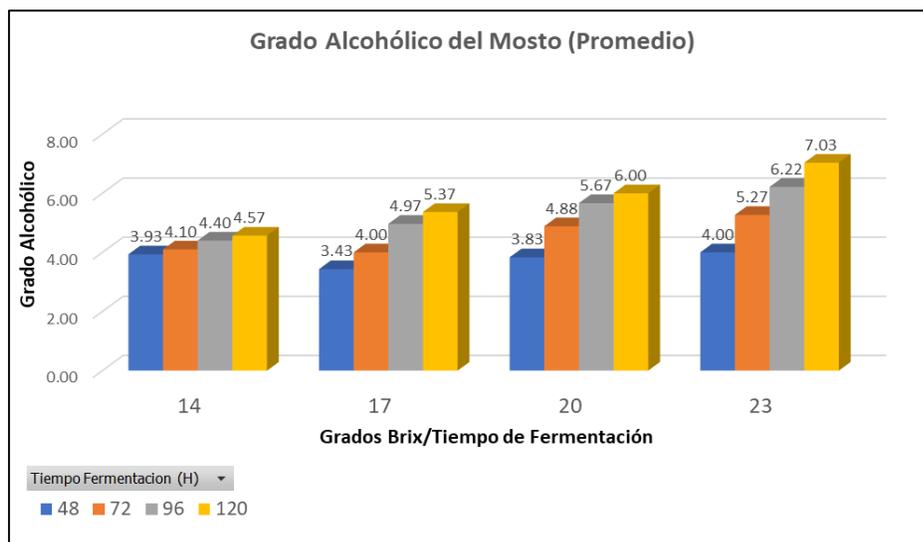


Gráfico 9. Relación entre los sólidos solubles ($^{\circ}\text{Brix}$) y Tiempos de fermentación (TFer) con el grado alcohólico ($^{\circ}\text{A}$) de los mostos obtenidos de cáscara de piña en cada tratamiento.

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

Se observó que conforme aumentaba el tiempo de fermentación en el proceso fermentativo de los mostos de las cáscaras de piña, mientras disminuían los grados Brix en diferentes niveles de acuerdo al Grado Brix inicial (14, 17, 20 y 23°Brix) y tiempos de fermentación (48, 72, 96 y 120 horas) en cada tratamiento aumentaba el nivel de grado alcohólico.

Este aumento de los grados alcohólicos es debido al consumo de sólidos solubles iniciales y su conversión por la actividad metabólica fermentativa de la levadura en etanol. Esto concuerda con Argote et al., (2015) quienes mencionan que la obtención de etanol está relacionada fundamentalmente al consumo de azúcares reductores y no al crecimiento celular de la misma, por esta razón se consigue en función de las condiciones idóneas para la fermentación del microorganismo.

Se observaron para los tratamientos de mostos de cáscaras de piña con sólidos solubles de 14 y 17 °Brix poca formación de grados alcohólicos. Al respecto Carrascosa et al., (2005), indican que las bajas concentraciones de azúcares, afecta el grado alcohólico final pero no limita el crecimiento de la levadura. En un mosto si se tienen niveles bajos de sólidos solubles (°Brix) el grado alcohólico resultante será escaso, pero si es alto no ocurre la fermentación, por la alta presión osmótica sobre las levaduras no permite su actividad fermentativa.

5.1.3. Tercera Etapa Experimental: destilación y caracterización del etanol

Variaciones del porcentaje de etanol en los tratamientos

En todos los tratamientos de sólidos solubles ($^{\circ}\text{Bx}$), el mayor porcentaje de etanol destilado ocurrió a las 96 y 120 horas de la fermentación siendo el mosto de 23°Brix el que presentó un mayor porcentaje de etanol llegando a su nivel más alto de 67% a las 96 horas y 64% a las 120 horas de fermentación sin presentar diferencias estadísticas entre ellos, mientras que los tratamientos de 14, 17 y 20°Bx registraron menores valores de porcentaje etanol (%Et) llegando a niveles promedio máximos de 30 y 48.33 y 58.33 %Et, respectivamente a las 120 horas de la fermentación y presentando diferencias estadísticas entre ellos. (Gráfico 10).

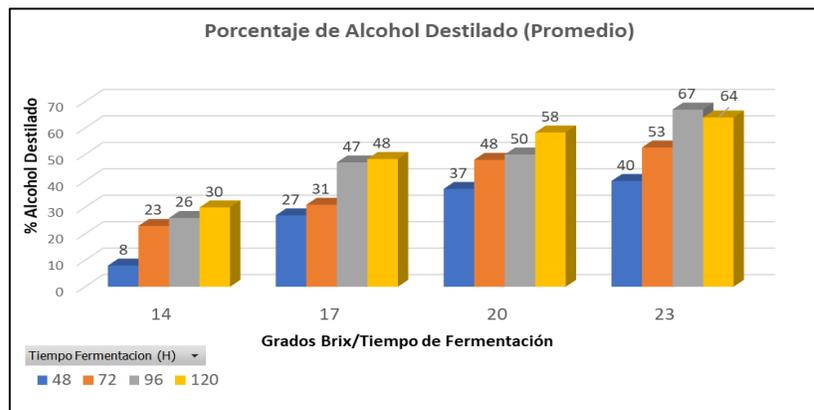


Gráfico 10. Relación entre los sólidos solubles ($^{\circ}\text{Bx}$) y Tiempos de fermentación (TFer) con el Porcentaje de etanol destilado (%Et) obtenido de la cáscara de piña en cada tratamiento.

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

Por otro lado, los resultados más altos de porcentaje de etanol destilado fue el de 23 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 23 grados Brix. Es en ese nivel donde el porcentaje de azúcar trabaja mejor con la levadura formado mayor cantidad de etanol. Al respecto, Peña y Arango (2009), indican que en la fermentación se recomienda utilizar cepas de *S. cerevisiae* que produzcan altos porcentaje de alcohol en menor tiempo de fermentación.

Por su parte, Ertola et al., (2003), indican que es importante considerar para la correcta fermentación el nivel de azúcar, nivel de pH y temperatura idóneas, agregar nutrientes, evitar contaminación de otros microorganismos, usar microorganismos que resistan elevados niveles de alcohol, mantener anaerobiosis y una pronta destilación.

Variaciones del porcentaje de rendimiento de obtención de Etanol

Referente al porcentaje de rendimiento de obtención de etanol (%REt) en los diferentes tratamientos al analizar estadísticamente los resultados obtuvieron diferencias significativas entre ellos.

En los tratamientos de solidos solubles (°Bx), el mayor porcentaje de rendimiento de etanol destilado obtenido ocurrió entre las 96 y 120 horas de la

fermentación siendo el mosto de 20°Brix inicial el que presentó un mayor porcentaje de rendimiento de etanol (%REt) llegando a su nivel más alto de 32.52% a las 120 horas, mientras que los tratamientos de 14 y 17 °Brix registraron menores valores de porcentaje de rendimiento de obtención de etanol (%REt) llegando a porcentajes promedio máximos de 23.95 y 27 (%REt) respectivamente a las 120 horas de la fermentación. Para el tratamiento de 23 °Brix inicial se obtuvo un 27.57% (%REt) a las 96 horas de la fermentación. (Gráfico 11).

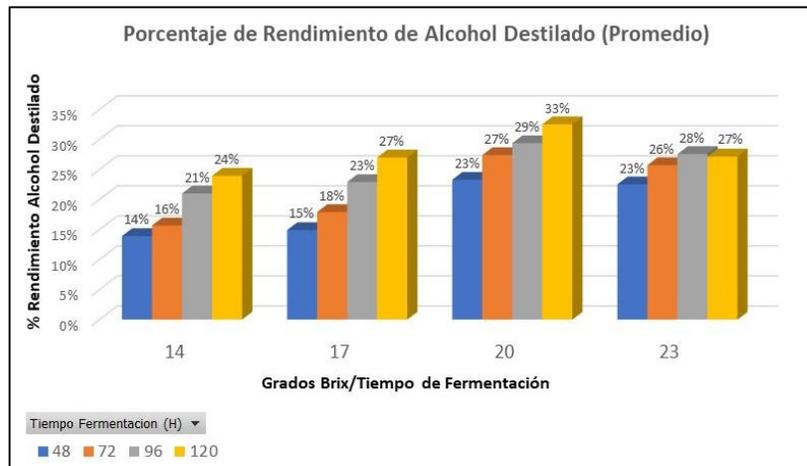


Gráfico 11. Relación entre los sólidos solubles (°Brix) y Tiempos de fermentación (TFer) con el Porcentaje de rendimiento del etanol destilado (%Et) obtenidos de cáscara de piña en cada tratamiento.

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

En los tratamientos con nivel de sólidos solubles iniciales de 23°Brix a pesar que obtuvo el mayor grado alcohólico promedio (7.03 GA a las 120 horas), los porcentajes de rendimiento de etanol obtenido fueron menores (27.57 % REt) comparados con el tratamiento de sólidos solubles iniciales de 20 grados Brix que, aunque tuvo menor grado alcohólico (6.0 °A) a las 120 horas tuvo mayor rendimiento de etanol (32.52 %REt) en el mismo tiempo de fermentación. Esto pudo deberse a la tolerancia al alcohol de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura) que se empleó como microorganismo fermentador de los azúcares reductores fermentables de los mostos de las cáscaras de piña.

Al respecto, Tomasso (2004), indica que de la composición de la membrana y su fluidez depende la habilidad celular para tolerar el alcohol. Por su parte, Suarez et al., (2016) indica que el etanol mayor al 8% puede inhibir el crecimiento celular, la viabilidad y la fermentación. A su vez, Riegel et al., (2003), señala que no se recomienda terminar la fermentación con alto grado alcohólico.

Pero también debe tomarse en cuenta que si bien fueron menores los rendimientos de etanol obtenidos a 23 °Brix tuvieron los mayores porcentajes de etanol destilado (64%) a las 120 horas comparados con el tratamiento de 20°Brix con valores máximos de porcentaje de etanol de 58.33%, en el mismo tiempo de fermentación. Gilces, (2006), indica que el rendimiento de la producción del alcohol está relacionado a las características propias de la cepa,

aireación, nivel de inóculo, componentes del medio, condiciones de fermentación y nutrientes.

Aunque la cáscara de piña presenta buen potencial de azúcares fermentables, los porcentajes de etanol destilado no fueron tan altos como se esperaba posiblemente porque las condiciones de trabajo fueron poco favorecedoras para su conversión en etanol, por lo que se plantea investigar otras condiciones de tratamiento para la cáscara de piña. Al respecto, Bellido (2013), reporta que limitar la aireación durante la fermentación permite utilizar casi todos los carbohidratos produciendo etanol de segunda generación con un aumento de rendimiento del 32% con respecto al proceso sin aireación limitada.

5.1.4. Discusión General

La obtención de etanol por biotransformación de la cáscara de piña por fermentación es bastante reproducible, siempre y cuando se mantengan constantes los parámetros de pH y temperatura y se realice el pretratamiento, fermentación y destilación.

Se pudo aprovechar un recurso orgánico nacional que ha sido subutilizado como la cáscara de piña (*Ananas comosus*) de la variedad Golden. Se obtuvo etanol a partir de los diferentes niveles iniciales de sólidos solubles (Grados Brix) y tiempos de fermentación evaluados luego del pretratamiento completo

de la cáscara de piña de la variedad Golden, fermentación por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y posterior destilación del mosto alcohólico, al respecto, Rani & Nand (2004), informan que la cáscara está compuesta por polisacáridos, que las personas no digieren, pero podría convertirse en productos de valor agregado.

Medina et al., (2011), indican que luego de seleccionar el pretratamiento para el insumo que se va a evaluar, se realiza la hidrólisis del mismo para producir azúcares monoméricos. Mateus (2011), señala que los azúcares simples son capaces de biotransformarse por fermentación en etanol, sujeto al tipo de microorganismo utilizado. Esto concuerda con Monsalve et al., (2006), 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.

La variación en el pH no fue considerable ya que en todas las pruebas realizadas no varió mucho estando en un rango de pH de 4.5 a 5,5 apropiados para que la levadura pudiera fermentar los mostos de cáscara de piña luego del proceso de pretratamiento completo de deslignificación.

Los resultados obtenidos, pueden ser de utilidad para posteriores estudios. La buena disponibilidad a nivel regional de la piña hace que el uso de sus cáscaras

sea una alternativa viable y atractiva para proponerse como materia prima que sea una fuente de azúcares fermentables para obtener etanol.

Por lo tanto, es factible obtener etanol por biotransformación utilizando cáscaras de piña, pero se necesita estudiar a fondo las condiciones idóneas de cada etapa para posteriormente llevar a cabo esta técnica a escala de planta piloto y nivel industrial con los residuos que resultan del proceso de elaboración de jugos, néctares, mermeladas y conservas de piña.

Al respecto, Conesa (2017), evaluó estrategias diversas para incrementar la obtención de bioetanol y confrontó tecnologías para mejorar el rendimiento utilizando enzimas para hidrolizar los residuos de piña. Determinó que para sacarificar residuos de piña la enzima celulasa de *Aspergillus niger* actúa mejor que la de *Trichoderma reesei*, sobre todo si es combinada con hemicelulasa. Indican que el rendimiento del hidrólisis enzimática para la sacarificación es mejor si se combina con microondas en un medio alcalino.

Las fases del proceso deben controlarse para que los resultados sean más eficientes en cuanto al nivel de grados Brix y tiempos de fermentación. 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 y poder establecer el tiempo que se necesita para el proceso fermentativo lo que concuerda con Montilla & Álvarez

(2007) que indican que se necesita especificar el tiempo de fermentación del mosto para que no se acidifique y se convierta en vinagre.

Para nuevos estudios se aconseja experimentar a nivel de laboratorio modificando 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 obtención de etanol.

Deben realizarse investigaciones comparando la producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* y de otros microorganismos con capacidad metabólica fermentadora como *Torulopsis*, *Kloeckera*, *Candida*, *Zimomonas*, *Mucor*, *Aspergillus*, etc., para determinar los más eficientes y profundizar los conocimientos del metabolismo alcohólico y realizar la curva de desarrollo levaduras o cepas utilizadas, para determinar exactamente su fase de crecimiento, y así establecer cuando inocular el microorganismo antes de la fermentación así como el tiempo global del proceso.

Esto concuerda con Tomas (2010), quien aconseja continuar con investigaciones de obtención de cepas recombinantes resistentes a inhibidores formados en el pretratamiento que tengan mejor capacidad de fermentación. A su vez, Talebnia, et al., (2010), señalan que algunas bacterias recombinantes y levaduras han mostrado resultados prometedores y están siendo consideradas para escalar comercialmente. Zuzuarregui (2005), señala que los

microorganismos empleados para obtener etanol deben ser tolerantes al etanol, a temperaturas y concentraciones de azúcar altas, tener buen rendimiento alcohólico, fermentación eficiente y buena productividad.

También se debe investigar sobre microorganismos que puedan hidrolizar los componentes lignocelulósicos de las cáscaras de piña y a la vez que tengan capacidad fermentativa para obtener etanol por hidrólisis y fermentación simultáneas que permitan mayores rendimientos y productividades en la obtención de etanol. 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. Al respecto Cuervo et al., (2009), indican que para obtener etanol a partir de lignocelulosa existen estrategias utilizando enzimas celulolíticas y levaduras fermentadoras para lograr un proceso para sacarificar y fermentar a la vez y poder alcanzar buenos rendimientos de etanol.

Las cáscaras de piña tienen potencial para la obtención de etanol y los resultados sirven de punto de partida hacia estudios más detallados que determinen la factibilidad de utilizar el material lignocelulósico de las cáscaras de piña como materia prima y alternativa ecológica atractiva al valorizar los residuos orgánicos de piña para reducir su impacto ambiental en el marco de desarrollo sostenible de las regiones productoras de piña del Perú.

5.2. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos según las hipótesis planteadas se tienen las siguientes conclusiones:

1. Se obtuvo etanol por *Saccharomyces cerevisiae* mediante la biotransformación de cáscaras de piña *Ananas comosus* mediante el pretratamiento, fermentación y destilación.
2. Existieron diferencias significativas para los sólidos solubles (°Brix) y los tiempos de fermentación versus la Calidad del etanol obtenido.
3. Para el grado alcohólico obtenido, respecto a los sólidos solubles (°Brix) a una significación del 0.05 se observó que sólo los grados Brix de 14 y 17 no existieron diferencias significativas ($0.765 > 0.05$), en los demás si se observaron diferencias significativas.
4. Para el grado alcohólico obtenido, respecto a los tiempos de fermentación a una significación del 0.05 se observó que sólo en los tiempos de fermentación de 96 y 120 horas no existieron diferencias significativas ($0.145 > 0.05$), en los demás si se observaron diferencias significativas.
5. El nivel de solidos solubles inicial de 23°Brix fue en el que se produjo un aumento mayor de grado alcohólico alcanzando su mayor nivel (7.23 °A) a las 120 horas de fermentación, mientras que los tratamientos de 14, 17 y 20 °Brix registraron valores menores llegando a niveles promedio de 4.57, 5.37 y 6.0°A respectivamente a las 120 horas de la fermentación.

6. Para el porcentaje de etanol destilado, los análisis demostraron que existieron diferencias estadísticas significativas para los sólidos solubles ($^{\circ}\text{Brix}$) y los tiempos de fermentación.
7. Para el porcentaje de etanol destilado respecto a los sólidos solubles ($^{\circ}\text{Brix}$) a una significación del 0.05 en todos los tratamientos de sólidos solubles iniciales existieron diferencias significativas ($0.00 < 0.05$) en el porcentaje de etanol destilado obtenido.
8. Para el porcentaje de etanol destilado obtenido, respecto a los tiempos de fermentación a una significación del 0.05 se observó que sólo en los tiempos de 96 y 120 horas no existieron diferencias significativas ($0.185 > 0.05$), en los demás si se observaron diferencias significativas.
9. Se presentó una correlación de Pearson fuerte positiva de 0.80085 entre el grado de alcohólico del mosto sin destilar con el porcentaje de etanol destilado.
10. Para el porcentaje de etanol destilado en la gráfica de superficie de respuesta y optimización en una aceptación de 1.0000 de valor deseado se puede obtener como máximo de porcentaje de etanol destilado de 70.1133, cuando se somete a 23 Grados Brix y a un tiempo de fermentación de 120 horas.
11. El mosto de cáscara de piña de 23°Bx fue con el que se obtuvo un mayor porcentaje de etanol destilado alcanzando su nivel mayor (67%) en las 96 horas, mientras que los tratamientos de 14°Bx , 17°Bx y 20°Bx registraron valores de porcentaje de etanol menores llegando a niveles promedio de 30% 48.35% y 58.33 % respectivamente a las 120 horas de la fermentación.

12. Para el porcentaje de rendimiento de etanol destilado, los análisis demostraron que existieron diferencias estadísticas significativas para los sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) y los tiempos de fermentación en todos los tratamientos.
13. El mayor valor de porcentaje de rendimiento de etanol destilado ocurrió entre las 96 y 120 horas de la fermentación. El nivel inicial de 20° Brix presentó un el valor más alto de 32.52% a las 120 horas, mientras que los tratamientos de 14 y 17° Brix registraron menores valores llegando a porcentajes promedio máximos de 23.95 y 27 (%REt) respectivamente a las 120 horas. Para el tratamiento de 23° Brix inicial se obtuvo un 27.57% (%REt) a las 96 horas de la fermentación.
14. En la gráfica de superficie de respuesta y optimización a una aceptación de 0.87667 de valor deseado se puede obtener como máximo de grado de porcentaje de rendimiento de etanol de 30.5333 cuando se somete a 23 Grados Brix y a un tiempo de fermentación de 120 horas.
15. El análisis de superficie de respuesta y optimización determinó que los niveles de las variables que optimizan la obtención y calidad del etanol fueron los sólidos solubles de 23° Brix y los tiempos de fermentación de 120 horas.
16. El alcohol obtenido de la destilación fue incoloro y libre de impurezas.
17. Los resultados sirven de punto de partida hacia estudios más detallados que determinen la factibilidad de utilizar el material lignocelulósicos de las cáscaras de piña como materia prima y una alternativa ecológica y atractiva en la reducción de residuos orgánicos para reducir su impacto ambiental en el marco de desarrollo sostenible para las zonas productoras de piña del Perú.

5.3. RECOMENDACIONES

De los resultados obtenidos para las siguientes investigaciones es recomendable:

1. Es necesario profundizar en el estudio de los elementos que intervienen en la fermentación que no fueron considerados en este estudio, tales como la concentración de la levadura, la agitación y el nivel de oxígeno disuelto con el objetivo de aumentar los grados alcohólicos, el porcentaje de etanol destilado y el rendimiento de porcentaje de etanol destilado en un menor tiempo de fermentación.
2. Se deben estudiar más las características de los subproductos del procesamiento de residuos de cáscaras de piña y determinar si se puede dar algún uso a los mismos.
3. Hacer pruebas experimentales variando la proporción de diferentes residuos y que se utilicen como sustratos para determinar que residuos ricos en azúcares pueden aumentar la producción de bioetanol.
4. Realizar estudios futuros sobre la determinación de la mejor relación del contenido de sólidos solubles y tiempos de fermentación utilizando diversos residuos orgánicos como materias primas para compararlos.
5. Realizar una doble destilación de los mostos fermentados para la obtención de mayor contenido de alcohol.

6. Para tener datos más precisos de la cantidad de etanol y de otros posibles compuestos que podrían estar en el alcohol destilado se recomendaría hacer análisis de cromatografía de gases.
7. Comparar la obtención de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* y de otros microorganismos con capacidad metabólica fermentadora como *Torulopsis*, *Kloeckera*, *Candida*, *Zimomonas*, *Mucor*, *Aspergillus*, etc., para determinar los más eficientes.
8. Investigar sobre los microorganismos que puedan hidrolizar la lignocelulosa de las cáscaras de piña y simultáneamente fermentarla y que permitan un mayor rendimiento y productividad en la obtención de etanol.
9. La investigación y desarrollo de tecnología para la obtención de etanol debe de encaminarse hacia los materiales lignocelulósicos que presentan mayores beneficios asociados a su manejo de disposición final y de sustentabilidad.

VI. REFERENCIAS

- Acosta Romero C. (2012). Evaluación de la Fermentación Alcohólica para la Producción de Hidromiel. Universidad Nacional de Colombia, p.6. 144.
- Albán García, C. & Carrasco Ordonéz, 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 Título Ingenieros Agroindustriales. Universidad Estatal de Bolívar. Ecuador. Recuperado de:
<http://www.biblioteca.ueb.edu.ec/bitstream/15001/1049/1/0.34%20Al.pdf>.
- Amerine M. A. & Ough Cornelius. S. (2001). *Análisis de vinos y mostos*. Zaragoza, España. Editorial Acribia.
- Angulo, V. A. (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*, 40-45; 63. Recuperado de URI: <http://rpositorio.espe.edu.ec/handle/21000/2828>.
- Antonio Cruz, R., Mendoza Martínez, A. M., Chávez Cinco, M. Y., Rivera Armenta, J. L. y Cruz Gómez, M. J. (2011). Aprovechamiento del bagazo de piña para obtener celulosa y etanol. *Afinidad LXVLLL*, (Enero - Febrero), 38-43.

- 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. Costa Rica.
- Arellano Perales C. (2015). Obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos sometidos a hidrolisis enzimática. Tesis de Maestría en Ciencias en procesos biológicos. Recuperado de:
<file:///C:/Users/USER/Downloads/Dialnet-ProduccionDeBioetanolAPartirDeSubproductosAgroindu-3628225.pdf>
- Argote V. F. E., Cuervo M. R., Osorio C. E., Delgado O. J., Villada H. S. (2015). Evaluación de la producción de etanol a partir de melaza con cepas nativas *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13 (2), 40-48. Doi: 1018684/BSAA (13)40-48.
- Arias Velásquez, C. J. y Toledo Hevia, J. (2000). *Manual de manejo poscosecha de frutas tropicales (Papaya, piña, plátano, cítricos)*. Proyecto FAO, Recuperado de:
http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ac304s/ac304s00.htm#toc.
- Arimuya M. S., & Tecco P. E. (2014). *Obtención de etanol a partir del residuo lignocelulósico cervecero de la cervecería amazónica – Iquitos*. Tesis Título Ingeniero Químico. Recuperado de: URI:
<http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/UNAP/3648>.

- Ávila Baray, H. L. (2006) *Introducción a la metodología de la investigación*. Edición electrónica. Texto completo en www.eumed.net/libros/2006c/203.
- Barreda Tamayo S.E. (2015). *El uso del etanol y la promoción de biocombustible, Ley N° 28054, en la costa norte del Perú, 2003-2010*. Tesis Grado Maestro. Recuperado de: <http://cybertesis.uni.edu.pe/handle/uni/2750>.
- Barrientos Felipa P. (2009). Los biocombustibles y la producción de etanol. *Pensamiento Crítico* (9), 114-136.
Doi: <http://dx.doi.org/10.15381/pc.v9i0.9027>.
- Bazán Borja M. F. (2013). *La regionalización en el Perú: un análisis de la reforma del gobierno regional de Junín 2008-2009 desde el enfoque de Desarrollo Sostenible*. Tesis grado de Magíster en Desarrollo Ambiental.
Recuperado de:
http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/123456789/5192/BAZAN_BORJA_MARIO_REGIONALIZACION_DESARROLLO.pdf?sequence=1.
- Bellido Diez C. (2013). *Obtención de bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo. Fermentación de los penta y hexa carbohidratos con Pichia stipitis*. Tesis Doctoral. Recuperado de:
<https://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/4556/1/TESIS501-140301.pdf>.

- Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamon, J.M. (2002).
Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six-year
follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 287-293.
Doi: 10.1078/0723-2020-00097.
- Cáceres Palomino E. (2008). Manual Técnico para 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. Recuperado de:
https://pepp.gob.pe/archivos/transparencia/29062017203442manual_de_la_pina.pdf
- Carrascosa A. V., Muñoz R., & González R. (2005). *Microbiología del vino*. España.
Ed. AMV. Ediciones 398 p.
- Casp A., Abril J. (2003). *Procesos de Conservación de Alimentos*. Madrid, España.
Ediciones Mundi-Prensa. Segunda Edición.
- Castro C., Valverde M., Paredes. O. (2009). Biocombustibles: Biomasa
lignocelulósica y procesos de producción. *ide@sCONCYTEG, Año 4*,
(54), 1246-1269. Recuperado de [docplayer.es/9880696-Biocombustibles-
biomasa-lignocelulosica-y-procesos-de-produccion.html](http://docplayer.es/9880696-Biocombustibles-biomasa-lignocelulosica-y-procesos-de-produccion.html)
- Chota. (2008). Enfoques de desarrollo. Enero. Recuperado de:
<https://es.slideshare.net/dgato/enfoques-de-desarrollo>.

- Claassen, P., Van, J., López, A., Sijtsma, L., Stams, A., De Vries, S. & Weusthuis, R. (1999). Utilization of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 741-755.
- Comité Nacional Sistema Producto Piña (CNSPP) (2009). *Plan Rector sistema Producto Piña del Estado de Oaxaca*. Veracruz. México.
- Conesa D. C., Seguí L., Fito P. (2012). *Sacarificación de residuos industriales de piña con mezclas de enzimas comerciales*. Tesis Maestría. Instituto Universitario de Ingeniería de Alimento para el Desarrollo-Universitat Politècnica de Valencia. Valencia (España). Recuperado de <http://hdl.handle.net/10251/28121>.
- Conesa D. C. (2017). *Desarrollos tecnológicos para la mejora y control del proceso de obtención de bioetanol a partir de residuos agroalimentarios*. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de Valencia. Valencia (España).
Doi:10.4995/Thesis/10251/861446.
- Contreras T. J & Tamani M. L. (2016). *Evaluación de la composición bromatológica y su capacidad antioxidante de la Ananas comosus (piña) en las variedades de Cayena Liza y Lorenza*. Tesis de grado. Universidad de la Amazonia Peruana. Perú. Recuperado de
URI:<http://repositorio.unapikitos.edu.pe/handle/UNAP/4590>.
- Corredor, D. Y. (2008). *Pretreatment and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass*. Tesis Doctoral. Manhattan Kansas State University, USA. Recuperado de <http://adsabs.harvard.edu/abs/2008PhDT.....108C>

- Cubas J. L. M., Seelén L. O. P., León R. N. (2016). 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 Sei*, (6) 97-105. Recuperado de
File:///C:/Users/USER/Downloads/1133-3150-1-PB.pdf.
- Cuervo, L., Folch J. L., Quiroz R.E. (2009). Lignocelulosa como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. Centro de investigación en Biotecnología UAEM, México. *BioTecnología*, 13 (3). 11-25. Recuperado de:
http://www.academia.edu/26149126/Lignocelulosa_Como_Fuente_de_Az%C3%BAcares_Para_la_Producci%C3%B3n_de_Etanol
- Demers, A., Doane, R., Guzman, S., & Pagano, R. Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass for the Production of Second Generation Biofuels. 2009.
https://www.researchgate.net/publication/265562709_Enzymatic_Hydrolysis_of_Cellulosic_Biomass_for_the_Production_of_Second_Generation_Biofuels
- Díaz Coutiño R. (2017). *Desarrollo sustentable: una oportunidad para la vida*. México. Mc Graw Hill Interamericana. Segunda Edición.
- Domínguez, J. (2003). *Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre Kluyveromyces*

- marxianus*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. Recuperado de <https://eprints.ucm.es/4804/1/T26833.pdf>
- Escalante C.J. & Fuentes A.H. (2013). *Estudio experimental de obtención de bioetanol a partir de residuos agrícolas de banano orgánico en Piura*. Tesis Ingeniero Industrial y de Sistemas. Universidad de Piura. Perú. Recuperado de http://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/1744/ING_531.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Ertola, O. R., Yantorno C. Mignone. (2003). *Microbiología Industrial*. Madrid: Editorial McGraw-Hill.
- Fajardo C., & Sarmiento E. (2008). *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyce cereviseae*. Tesis. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. Bogotá Colombia. Recuperado de <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis26.pdf>
- FAO (2017). Organización Mundial para la Agricultura. Estadísticas de producción mundial de piña. Recuperado de <http://faostat.fao.org/>.
- Fernández A. B., Gómez S. M., Ferrer G. J & Rincón M. (2014). Determinación del grado de conversión global del jugo de piña en etanol por medio de la fermentación alcohólica. *Revista tecnológica URU*, (7), 49-57.
- Frazier. W. C & Westhoff D. C. (2000). *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza. Editorial Acribia.

- Gallinar Tercero A.G. (2015). Control robusto de columnas de destilación para mezclas binarias ideales. Universidad veracruzana.
- 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. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.4236/anp.2013.24053>
- Garcidueñas Paz J. (2013). *Caracterización morfológica y molecular de piña Ananas comosus (L.) híbrido MD-2 y su establecimiento in vitro*. Tesis Maestro en Ciencias en Biotecnología Agrícola Universidad Autónoma de Chapingo. México. Recuperado de <http://chapingo.mx/horticultura/pdf/tesis/TESISMIBA2013120210127862.pdf>
- Garzón Castaño S. C., & Hernández Londoño C. (2009). *Estudio comparativo para la producción de etanol entre Saccharomyces cerevisiae silvestre. Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 y Candida utilis ATCC 9950*. Tesis Químico Industrial. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. Recuperado de: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/1689/66182G245.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Gil-Horán R., Domínguez-Espinoza R. M., Pacho-Carrillo J. D. (2008). Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación. *Tecnol. CienciaEd. (IMIQ)*, 23(2), 79-90. Recuperado de <http://www.redaluc.org/articulo.oa?id=48223207>
- Gilces, P. (2006). *Estudio del uso de los nutrientes para la levadura en fermentación con el propósito de mejorar la producción de alcohol etílico*. Tesis Ingeniero Químico. Universidad de Guayaquil. Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/737/1/975.pdf>
- González L. M. (2014). *Caracterización bioquímica y biotecnología de la levadura Saccharomyces cerevisiae GL15*. Tesis Máster en Química Avanzada. Universidad de la Rioja. Servicio de Publicaciones. Recuperado de http://biblioteca.unirioja.es/tfe_e/TFE000802.pdf
- Gray M., Converse, A. & Wyman, C. (2003). Sugar monomer and oligomer solubility. Data and predictions for application to biomass hydrolysis. *Appl biochem. Biotechnol*, 179-193.
- GRANOTEC. Certificado de análisis. Gramozyme Celulasa. Perú. 2018.
- GRANOTEC. Ficha Técnica enzima Gramozyme Celulasa. Perú. 2018.
- Han, M., Kim, Y., Kim, Youngran, Chung, B. & Choi, G. (2011). Bioethanol production from optimized pretreatment of cassava stem. *Korean J. Chem. Eng., January*, 28(1), 119-125. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s11814-010-0330-4>

- Hernández Duarte S.Y. & Martínez Torres C. E. (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. Universidad de El Salvador. El salvador.
- Hernández Sampieri R. C., Fernández Collado M., & Baptista L. (2014). *Metodología de la Investigación*. México D. F. McGraw-Hill. Interamericana Editores, S.A. de C.V. Sexta Edición.
- Hernández N. G., Santamaría O. A., Rubio T. M. (2015). Aprovechamiento concientizado de los residuos como materia prima para el diseño de nuevos productos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2(5), 71-81. Recuperado de URI: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/58281>.
- Howard, A. G. & Raymond, J. (2003). *Fermented Beverage Production*, Ed. Springer Verlag, ISBN 0-306-47706-8.
- Howard R. L., Abotsi E., Rensburg J., Howard S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2, 602-619. Recuperado de <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/1923/1/jb03112.pdf?pagewanted=all>.
- Hu, Z., Wen, Z. (2008). Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*, (38), 369-378. Doi: 10.1016/J.BEJ.2007.08.001.

- IICA Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (2004). Cadena Agroindustrial-Etanol, Nicaragua. Recuperado de:
<http://repositorio.iica.int/bitstream/11324/6553/1/BVE30466014e.pdf>
- INDECOPI, NTP 203.070. 1977. (Revisada el 2012). Productos elaborados a partir de frutas y otros vegetales. Determinación de Acidez.
- INDECOPI. NTP 203.OO2-1979. Determinación del contenido de Azúcares reductores. Método de Eynon-Lane. 1979.
- INDECOPI, NTP 211.040. (2012). Bebidas alcohólicas. Método de ensayo. Determinación de Acidez.
- ITINTEC 210.011. Bebidas alcohólicas. Determinación del porcentaje de etanol por alcoholimetría. (*Norma Peruana*).
- Julca, O. A. (2010). El cultivo de piña (*Ananas comosus*) en el Perú. En: Memorias VII Seminario Internacional de Frutas Tropicales Agroindustria e Innovación. Medellín, Colombia. 23 y 24 p. Recuperado de
<https://es.scribd.com/document/55772948/memoriasseminariofrutastropicales>
- Juri Awad, S.A. (2011). *Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pretratamientos alternativos: líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca*. Tesis Ingeniero Civil en Biotecnología. Chile. Universidad de Chile.

Recuperado de

https://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2011/cf-juri_sa/pdfAmont/cf-juri_sa.pdf

Khalil A., Alwani M. S., Omar A. K. M. (2006). Chemical Composition, Anatomy, Lignin Distribution, and Cell Wall Structure of Malaysian Plant Waste Fibers. *BioResources*, 1(2), 220-232. Recuperado de

File:///D:/ETANOL%20PLATANO/18-561-1-PB.pdf

Krogh, K.B., Mørkeberg, A., Jørgensen, H., Frisvad, J. C.; Olsson, L. (2004). Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*. 113-116: 389-401.

Doi:10.1385/ABAD:114:1-3:3:389.

Kumar, S., Gupta R., Lee, Y., & Gupta, R. B. (2010). Cellulose pretreatment in subcritical water: Effect of temperature on molecular structure and enzymatic reactivity. *Bioresource technology*. 101(4): 1337 – 1347.

Doi:10.1016/j.biortech.2009.09.035.

Laureano-Pérez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B.H. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 1081 – 1100.

DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-59259-991-2_91.

Lazo Huaynalaya E., Marcas García N. & Serna D.N. (2017). *Planeamiento Estratégico de la Piña de Junín*. Tesis Maestría en Administración

estratégica de empresas. Pontificia Universidad Católica del Perú.

Recuperado de URI

<http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/123456789/10101>.

Liscano Martínez Y. (2014). Producción de bioethanol a partir de tallos de yuca.

Tesis Magister en Ciencias – Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. Recuperado de

<http://bdigital.unal.edu.co/46389/1/94544622.2014.pdf>

Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H. & Pretorius, I. S. (2002). Microbial

cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(3): 506-577. Doi: [10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002].

Machado, C. M., & Abreu, F. R. (2007). Produção de álcool combustível a partir de

carboidratos”. *Revista de Política Agrícola*, 15. 64-82. Recuperado de

https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/121716/1/Paginas_depolagr0320062p.6478.pdf

Machado C.M. (2010). Situación de los Biocombustibles de 2da y 3era Generación

en América Latina y Caribe. Organización Latinoamericana de Energía (OLADE) y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). 99 pp. Recuperado de

http://legacy.iica.int/esp/programas/Innovacion/Documents/Resumen_Machado_Embrapa.pdf

Madigan, M.T. Martinko, J.M. (2009). *Brock. Biología de los Microorganismos*.

Madrid. España. Pearson. 12a. Ed.

- Martín C. & Manzanares P. (1994). *Biomasa lignocelulósica. Polímeros constitutivos. Procesos biológicos de degradación de lignina*. Madrid, España. Impreso por Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT 754-ISSN 0214-087X). Recuperado de <http://www.osti.gov/etdeweb/serlets/purl/202930091>
- Mateus Fontecha, L. (2011). *Evaluación de los pretratamientos con ácido sulfúrico diluido y AFEX en la biomasa lignocelulósica del tipo pasto gigante Pennisetum sp.* Tesis Magister Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/4237/1/LadyMateusFontecha.2011.pdf>
- Mathews, C.K., Van Holde K.E., & K.G. Ahern. (2004). *Bioquímica*. España. Editorial Pearson. Tercera Edición.
- McKee, Trudy & McKee James. (2014). *Las bases moleculares de la vida. En BIOQUÍMICA*. México. Mc Graw Hill. Quinta Edición.
- Medina-Morales M.A., Lara-Fernández L., Aguilar C.N., de la Garza-Toledo C.N. (2011). Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 3, (6), 35-41. Recuperado de <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM6/aRT%204.pdf>

- Mejías-Brizuela, N., Orozco-Guillen, E., y Galáan-Hernández, N. (2016). Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, 2, (6): 27-41. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/323959087_Aprovechamiento_de_los_residuos_agroindustriales_y_su_contribucion_al_desarrollo_sostenible_de_Mexico
- Mercado, C. (2006). *Rendimiento de etanol y producción de vinaza con cuatro sustratos para la fermentación de melaza con Saccharomyces cerevisiae*. Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria, Zamorano, Honduras. 34p.
- Merino S.T., & Cherry J. (2007). Progress and Challenges in Enzymes Development for Biomass Utilization. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108: 95-120. Recuperado de https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F10_2007_066
- Myat L. & Hyung R.G. (2015). Pretreatments and factor affecting saccharification and fermentation for lignocellulosic ethanol production. Recuperado de File:///C:/Users/USER/Downloads/_var_www_cct_html_authors_1_1373_1373_2016-02-23_3_1456220527.pdf
- Ministerio de Agricultura y Riego. (2016). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola y Ganadera 2015*. Sistema Integrado de Estadística Agraria. Edición: noviembre 2016.

Recuperado de

<http://siea.minagri.gob.pe/siea/?q=produccion-agricola-y-ganadera-2015>.

Mitis Madroñero H. W. (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 Ingeniero Agroindustrial. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Ecuador.

Montilla, M., & Álvarez, C. (2007). Producción de alcohol Etílico a partir de cáscara de piña (*Ananás sativus*). *ALIMENTICA*, (6), 22-25. Recuperado de <https://avalon.utadeo.edu.co/dpendencias/publicaciones/alimentica6.pdf>

Monsalve G., Medina de Pérez J., & Ruiz Colorado, A. (2006). Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y almidón de yuca. *Dyna*, Año 73, (150), 21-27. ISSN 0012-7353. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49615002>.

Morales M., Hernández M. S., Cabezas M., Barrera J., & Martínez O. (2001). Caracterización de la maduración del fruto de piña nativa (*Ananas comosus* L. Merrill) CV. India. *Agronomía colombiana*, 18, (1-2), 63-69. 2001. Recuperado de <https://bdigital.unal.edu.co/24519/1/21706-74299-1-PB.pdf>

Munive Salas L. (2015). *Producción del cultivo de Piña cv. Golden en la selva Central Mazamari – Satipo (Junín)*. Tesis Título Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima – Perú. Recuperado de URI: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/2078>.

- Murgas, J., & Vásquez, M. (2012). *Evaluación de la obtención de bioetanol a partir del almidón de ñame (Dioscorea rotundata, Dioscorea alata y Dioscorea trifida) mediante la hidrólisis enzimática y posterior fermentación*. Tesis Ingeniero Químico. Universidad de San Buenaventura, Cartagena.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information (2017). Classification: taxonomy. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=4615&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.
- 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*. Sangolqui: Escuela Politécnica del Ejército.
- Nigam, J. N. (2000). Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. *Journal of Biotechnology*, 80, 189-193. Recuperado de [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00246-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00246-7).
- Ovando-Chacón S. L & Waliszewski K. N (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21(42), 111-120. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=15404206>.
- Páez, M. G. 1998. Caracterización morfológica de especies silvestres de *Ananas* spp. *Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort*, (42), 128-132.

- Pájaro Huertas D. (2002). La Formulación de Hipótesis. *Cinta moebio*, 15: 373-388.
- Recuperado de
- <http://www2.facso.uchile.cl/publicaciones/moebio/15/pajaro.htm>.
- Palmowski, L., Muller, J. (1999). Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. II International symposium on anaerobic digestion of solid waste. Barcelona, 15 – 17 June, pp. 137 – 144.
- Paredes Medina D., M. Álvarez Núñez, M. Silva Ordoñez. (2010). Obtención de Enzimas Celulasas por Fermentación Sólida de Hongos para ser Utilizadas en el Proceso de Obtención de Bioalcohol de Residuos del Cultivo de Banano. *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*, 23, (1), 81-88.
- Peña C. & Arango R. (2009). Evaluación de la producción de etanol utilizando cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de melaza de caña de azúcar. *Dyna*, Año 76, (159), 153-161. Recuperado de:
- <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49611945017>. ISSN 0012-7253
- PEPP. Proyecto Especial Pichis-Palcazú (2010). Manual de Piña. Proyecto Mejoramiento de la producción del cultivo de la Piña mediante sistemas agroforestales en el Distrito de Perené - Chanchamayo. Recuperado de:
- https://pepp.gob.pe/archivos/transparencia/29062017203442manual_de_la_pina.pdf.
- 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. DOI:10.1007/s10123-002-0062-3.

- 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 Polimeros*, 6(2), 12-17. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/28087816>.
- 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. Doi:10.1016/S0889-1575(03)00095-4.
- Rani S., & Nand K., (2004). Ensilage of pineapple processing waste for methane generation. *Science Direct*, 523 – 528.
Doi: 10.1016/j.wasman.2003.10.010.
- Riegel, E. R. & Kent, J.A. (2003). Riegel's Handbook of Industrial Chemistry. Ed, Springer Verlag. ISBN 0-306-47411-5.
- Ríos C., Fajardo M., Pérez J. (2005). Evaluación de una cepa de levadura para fermentar diferentes concentraciones de miel *Apis mellifera*. Estación experimental apícola. Cuba.
- Rodríguez Salas O. L. (2008). *Producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica en México*. Tesis Maestro Sistemas ambientales. Monterrey. Recuperado de <http://hdl.handle.net/11285/568601>
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30: 279-91. DOI: 10.1007/s10295-003-0049-x

- Salomón, R. (2001). Propiedades fisicoquímicas del alcohol etílico. Recuperado de:
<https://www.cubasolar.cu/biblioteca/energia/Energia29/HTML/articulo07.htm>
- Sánchez Riaño, G. M. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga* (5), 61-91.
Recuperado de: File:///C:/Users/USER/Downloads/Dialnet-ProduccionDeBioetanolAPartirDeSubproductosAgroindu-3628225.pdf
- Sánchez Escalante, A. (2012). *Manual para la Producción de una piña de calidad*. Satipo. Perú. Imprenta grafica LESREN SRL
- Sánchez-Hernández, Miguel Ángel, Ahuja-Mendoza, Saul y Acevedo- Gómez, Ricardo. (2015). *Producción de Piña Cayena Lisa y MD2 (Ananas comosus L.) en condiciones de Loma Bonita, Oxaca. México*.
Recuperado de:https://www.ecorfan.org/handbooks/Ciencias-BIO-T_I/Handbook_Biologia_y_Agronomia_Tl_Vl_109_119.pdf
- Sandoval I. & Torres E. (2011). *Guía técnica del cultivo de la piña*. Programa MagCenta-frutales. Centro Nacional De Tecnología Agropecuaria y Forestal. San Andrés. Recuperado de:
<http://www.centa.gob.sv/docs/guias/frutales/guia%20tecnica%20pin%cc%83a%202011.pdf>
- Sandoval, J. M. & Lievano, J. P. (2012). Colombia, 20 años siguiendo la Agenda 21. Bogota, D.C. Colombia, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.

Recuperado de https://www.minambiente.gov.co/images/asuntos-internacionales/pdf/colombia-20-a%C3%B1os-siguiendo-la-agenda-21/040512_balance_agenda_21.pdf

Santamaría P. López R. Guitiérrez A. R. García-Escudero E. (1995). Influencia de la temperatura en la fermentación alcohólica. *INIA* (España), (7): 137-197.

Recuperado de <file:///C:/Users/USER/Downloads/Dialnet-InfluenciaDeLaTemperaturaEnLaFermentacionAlcoholic-110328.pdf>

Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente, y Futuro. *Biotecnología*, 16(2), 14-46. Recuperado de

https://smbb.mx/wp-content/uploads/2017/10/Revista_2012_V16_n2.pdf

Sehnm, N.T.; Bittencourt, L.R.; Camassola, M.; Dillon, A. J. P. (2006). Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72(1):163-167. DOI:10.1007/s00253.005-0251-z.

Seo J. S., Chong H., Park H. S., Yoon K.O., Jung C., Kim J. J., Hong J.H., Kim H., Kim J.H., Kil J.I., Park C.J., Oh H.M., Lee J.S., Jin S.J., Um H.W., Lee H.J., Oh S.J., Kim J.Y., Kang H.L., Lee S.Y., Lee K.J. & Kang H.S. (2005). The genome sequence of the ethanogenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nat Biotechnol*, 23(1):63-8. DOI: 10.1038/nbt1045.

Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N.A., & Guevara-Rodríguez, C.A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión

bibliográfica. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar
Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420004>.

Talebnia F., Karakashev D., & Angelidaki I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 101(13): 4744-4753. Doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.080. Epub 2009 Dec 23.

Tejada L., Tejada C., Villabona Á., M. R. Alvear, Tarón A., Albear M., Castillo C., Hernao D., Marimón W. & Madariaga N. (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 de Educación de Ingeniería*, 10, 120-125. Doi: <http://dx.doi.org/10.26507/rei.v5n10.104>

Tejado, A., Peña C., Labidi J., Echevarria J.M. & Mondragon I. (2007). Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis. *Bioresource Technology*, 98(8), 1655-1663. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.05.042

Tomás Pejó E. (2010). Bioetanol de paja de trigo: Estrategias de integración de las etapas del proceso. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. Recuperado de <https://eprints.ucm.es/10802/1/T31774.pdf>

Tomasso M. (2004). Tolerancia de las levaduras al etanol. Universidad de la República Uruguay. Facultad de Química.

- Toriya M. J., Rozes N., Montse P. J., Guillamon M. & Mas A. (2002). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 47-53.
Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810277>
- Toriya M. J. (2002). *Ecología de las levaduras, selección y adaptaciones vínicas*. Tesis Doctoral. Universitat Rovira I Virgili. Biotecnología. Tarragona. España. Recuperado de <http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/8643/Tesismjt.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Triana Carantón, C. F. (2010). Producción de bioetanol a partir de residuos provenientes del cultivo de café. Tesis Maestría. Universidad Nacional del Colombia. Colombia. Repositorio Universidad Nacional de Colombia. Recuperado de <https://bdigital.unal.edu.co/1974/1/cristianfernandotrianacaranton.2010.pdf>.
- UTEPI. Unidad Técnica de estudios para la industria. (2006). *Piña. Estudio Agroindustrial en el Ecuador: Competitividad de la Cadena de Valor y Perspectivas de Mercado*. Quito. Recuperado de http://www.unido.org/sites/default/files/2009-04/Pina_estudio_agroindustrial_en_el_Ecuador_0.pdf
- Virreira Flores Julio y Oscar Góngora Pereira. (2014). *Caracterización fisicoquímica de las cascaras de naranja (Citrus sinensis L.) y pomelo (Citrus grandis)*,

para obtener bioetanol – Iquitos. Tesis Ingeniero Químico. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Perú.

Wen, Z., Liao, W. & Chen, S. (2005). Production of cellulase/ β -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Appl Biochem Biotechnol*, 121(1-3), 93-104.

Doi: <https://doi.org/10.1385/ABAB:121:1-3:0093>

Zambrano Bedón, G. (2013). *Estudio Técnico–Económico para la obtención de alcohol a partir de camote (Ipomea batata)*. Tesis Título de Ingeniería Química. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador. Recuperado de

<https://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1173/1T-UCE-0017-35.pdf>

Zuzuarregui Miró A. (2005). *Caracterización fisiológicas y moleculares de cepas vínicas de Saccharomyces sp. Influencia entre su comportamiento de vinificación*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. España.

Recuperado de:

<https://docplayer.es/3986555-Universidad-de-elsalvador-facultad-de-quimica-y-farmacia.html>

VII. ANEXOS

7.1. Definición de términos

Aeróbico: Organismo que se desarrolla y necesita oxígeno para su metabolismo y crecimiento.

Anaeróbico: Organismo que se no desarrolla y necesita oxígeno para su metabolismo y crecimiento. Habitualmente sintetiza metabolitos secundarios.

Azúcar reductor: Azúcar que efectúa la acción de agente reductor por poseer un grupo carbonilo.

Biotecnología: Utilización de un ser vivo para realizar transformaciones químicas de aprovechamiento industrial en provecho del ser humano.

Biotransformación: Transformación realizada por un ser vivo modificando un compuesto que lo convierte en otro.

Celulasa: Enzima que hidroliza la celulosa liberando muchas moléculas de glucosa.

Etanol: Alcohol líquido, incoloro, volátil, inflamable y soluble en agua

Fermentación: Oxidación biológica incompleta que se realiza en anaerobiosis.

Fermentador: Tanque para realizar una fermentación industrial.

Glucosa: Azúcar simple de seis carbonos que presenta un grupo carbonilo en el carbono uno.

Grados Brix: Concentración de sólidos solubles de una solución que indica el nivel de dulzura de un producto.

Hidrólisis: Proceso que transforma en medio acuoso polímeros al romper sus enlaces y forma moléculas degradables

Levaduras: Hongos heterotróficos unicelulares que necesitan para su desarrollo carbono orgánico y minerales.

Material lignocelulósico: Componentes de la pared celular vegetal que forman un armazón de microfibrillas de celulosa cubiertas de hemicelulosa y rodeadas de lignina.

Polisacáridos: Polímeros de azúcares monosacáridos con diferentes funciones principalmente energéticas y estructurales

pH: Grado de acidez o alcalinidad de una solución

Residuos Orgánicos: Aquellos que pueden degradarse fácilmente y que se generan a nivel doméstico o industrial.

7.2. Fichas de la enzima

Tabla 32. *Ficha Técnica enzima Granozyme celulasa.*

Nutrición y Biotecnología para la Salud **GRANOTEC**

FICHA TÉCNICA

Granozyme Celulasa

DESCRIPCIÓN: Compuesto por enzima Celulasa y harina de trigo como carrier.

ESPECIFICACIONES:

Físico Químicas	
Apariencia	Polvo
Color	Crema a amarillo cremoso(*)
Humedad	Máx. 10%
Plomo (Pb)	Máx. 2 ppm (**)
Metales pesados (como Pb)	Máx. 10 ppm
Microbiológicas (***)	
Coliformes Totales	Máx. 30 ufc/g
Escherichia coli	Ausencia en 25 g
Salmonella	Ausencia en 25 g

(*) El color puede variar de batch a batch.
(**) Especificaciones de acuerdo a General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations used in Food Processing.
(***) Especificaciones de acuerdo a General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations used in Food Processing.

APLICACIÓN: Enzima para el tratamiento de harinas integrales, con alto contenido de fibra
Otorpa excelente volumen
Muy buena tolerancia en fermentación
Se obtiene masas secas, no pegajosas
Excelente sinergia con xilanasas
Aplicado en procesos largos o cortos

DOSIFICACION: La dosificación depende de la calidad de la harina, formulación y especialmente del proceso, y debe determinarse mediante ensayos de panificación. Se recomiendan los siguientes rangos:
5 – 50 ppm

Código: MG.02.FG.01 Versión: 01

- Granotec Perú garantiza la calidad de sus productos en el cumplimiento de las especificaciones indicadas en sus fichas técnicas.
- Cualquier información aquí contenida, y/o proporcionada por Granotec Perú, son sugerencias realizadas en base a pruebas de laboratorio y a la experiencia de Granotec Perú. En ningún caso estas informaciones reemplazan la necesidad del cliente de realizar sus propias pruebas para evaluar resultados y hacer los ajustes que garanticen las características deseadas en su producto final antes de cualquier aplicación comercial industrial.
- El cliente es el responsable del adecuado almacenamiento, manipulación, dosificación, uso, aplicación, proceso productivo, etc. de los productos adquiridos, por lo tanto Granotec Perú no puede ser responsable del cumplimiento de las especificaciones en un producto final del cliente.
- Este producto ha sido fabricado en una planta que procesa gluten (harina de trigo), leche y sus derivados, soya y productos a base de soya.

Granotec Perú S.A.
 Av. Los Ingenieros No. 117
 Urb. Santa Rosa 4 Dept. Lima |

Tel: +51 01 445 1798
www.granotec.com

Transparencia
 Tecnológica
 Capacitación

Innovación
 Tecnológica
 y Desarrollo

Habilidades e
 Ingredientes
 Productos

Barrota
 Dávalos y
 Compañía

UR 0518

Fuente: GRANOTEC. 2018.

Tabla 33. Certificado de Análisis. Gramozyme Celulasa.

Nutrición y Biotecnología para la Salud 

CERTIFICADO DE ANALISIS

Granozyme Celulasa

Fecha actual : 30/05/18
 N° Certificado : 1185
 Lote N° : 180529-05
 Fecha de producción : 29/05/18
 Fecha de vencimiento : 29/05/20
 Presentación : Bolsas

ANÁLISIS	UNID	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
Fisico Químicas			
Apariencia	---	Polvo	Cumple
Color	---	Crema – amarillo cremoso	Cumple
Humedad	%	Máx. 10	8.00
Plomo	ppm	Máx. 2.0	< 2
Microbiológicas			
Coliformes Totales	ufc/g	Máx. 30	< 10
Escherichia coli	/25g	Ausencia	Ausencia
Salmonella	/25g	Ausencia	Ausencia

Si necesita mayor información, por favor contactarse al correo laboratorio@granotec.com.pe


GRANOTEC PERÚ S.A.
 Gabriela González Morales
 Gerente Técnico

Granotec Perú S.A.
 Av. Los Ingenieros No. 112
 Urb. Santa Raquel I Etapa, Lima 3

Tel.: +01 (0) 349-7708
www.granotec.com

Transferencia
Tecnológica
Capacitación

Innovación
Investigación
y Desarrollo

Nutrientes e
Ingredientes
Productos

Garantía
Calidad y
Compromiso



Fuente: GRANOTEC. 2018.

7.3. Tablas de Resultados

Tabla 34. *Relación entre los Grados Brix y tiempos de fermentación de los mostos de cáscara de piña con los grados alcohólicos obtenidos (°A) en cada tratamiento.*

°Brix inicial	Tiempo Fermentación (H)	°Brix Final	°Brix Final Prom.	° Alcohólico (mosto)	° Alcohólico Prom. (mosto)
14	48	6	6.13	4.00	3.93
14	48	6.2		3.90	
14	48	6.2		3.90	
14	72	5.8	5.80	4.10	4.10
14	72	5.8		4.10	
14	72	5.8		4.10	
14	96	5.2	5.20	4.40	4.40
14	96	5.4		4.30	
14	96	5		4.50	
14	120	5	4.87	4.50	4.57
14	120	5.1		4.45	
14	120	4.5		4.75	
17	48	10.2	10.13	3.40	3.43
17	48	11		3.00	
17	48	9.2		3.90	
17	72	9	9.00	4.00	4.00
17	72	10		3.50	
17	72	8		4.50	
17	96	6.9	7.07	5.05	4.97
17	96	7.1		4.95	
17	96	7.2		4.90	
17	120	6	6.27	5.50	5.37
17	120	6		5.50	

17	120	6.8		5.10	
20	48	12	12.33	4.00	3.83
20	48	13		3.50	
20	48	12		4.00	
20	72	9.7	10.23	5.15	4.88
20	72	11		4.50	
20	72	10		5.00	
20	96	9	8.67	5.50	5.67
20	96	9		5.50	
20	96	8		6.00	
20	120	9	8.00	5.50	6.00
20	120	8		6.00	
20	120	7		6.50	
23	48	16	15.00	3.50	4.00
23	48	15		4.00	
23	48	14		4.50	
23	72	13.8	12.47	4.60	5.27
23	72	13.1		4.95	
23	72	10.5		6.25	
23	96	10.5	10.57	6.25	6.22
23	96	11		6.00	
23	96	10.2		6.40	
23	120	9.1	8.93	6.95	7.03
23	120	9.4		6.80	
23	120	8.3		7.35	

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

Tabla 35. Relación entre los Grados Brix y tiempos de fermentación de los mostos de cáscara de piña con el porcentaje de etanol destilado (%Et) en cada tratamiento.

Grado Brix inicial	Tiempo Fermentación (H)	% alcohol (destilado)	% alcohol prom. (destilado)
14	48	7.00	8.00
14	48	9.00	
14	48	8.00	
14	72	23.00	23.00
14	72	22.00	
14	72	24.00	
14	96	26.00	26.00
14	96	25.00	
14	96	27.00	
14	120	30.00	30.00
14	120	29.00	
14	120	31.00	
17	48	27.00	27.00
17	48	29.00	
17	48	25.00	
17	72	31.00	31.00
17	72	32.00	
17	72	30.00	
17	96	46.00	47.00
17	96	48.00	
17	96	47.00	
17	120	48.00	48.33
17	120	48.00	
17	120	49.00	
20	48	35.00	37.00
20	48	40.00	

20	48	36.00	
20	72	48.00	48.00
20	72	47.00	
20	72	49.00	
20	96	49.00	50.00
20	96	52.00	
20	96	49.00	
20	120	62.00	58.33
20	120	56.00	
20	120	57.00	
23	48	39.00	40.00
23	48	40.00	
23	48	41.00	
23	72	52.00	52.67
23	72	53.00	
23	72	53.00	
23	96	67.00	67.00
23	96	66.00	
23	96	68.00	
23	120	65.00	64.00
23	120	63.00	
23	120	64.00	

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

Tabla 36. Relación entre los Grados Brix y tiempos de fermentación con el Porcentaje de rendimiento del etanol destilado(%REt) en cada tratamiento.

°Brix inicial	TFer (H)	Vol. Mosto alcohólico	Vol. Etanol destilado	Vol. Etanol destilado prom	Rendimiento Etanol destilado (%)	Rendimiento Etanol destilado (%) prom
14	48	700	98.00	97.33	14.00%	13.90%
14	48	700	90.00		12.86%	
14	48	700	104.00		14.86%	
14	72	700	112.00	109.67	16.00%	15.67%
14	72	700	107.00		15.29%	
14	72	700	110.00		15.71%	
14	96	700	150.00	147.00	21.43%	21.00%
14	96	700	146.00		20.86%	
14	96	700	145.00		20.71%	
14	120	700	168.00	167.67	24.00%	23.95%
14	120	700	170.00		24.29%	
14	120	700	165.00		23.57%	
17	48	700	101.00	104.33	14.43%	14.90%
17	48	700	107.00		15.29%	
17	48	700	105.00		15.00%	
17	72	700	123.00	125.33	17.57%	17.90%
17	72	700	128.00		18.29%	
17	72	700	125.00		17.86%	
17	96	700	164.00	160.33	23.43%	22.90%
17	96	700	160.00		22.86%	
17	96	700	157.00		22.43%	
17	120	700	190.00	189.00	27.14%	27.00%
17	120	700	185.00		26.43%	

17	120	700	192.00		27.43%	
20	48	700	163.00	163.00	23.29%	23.29%
20	48	700	160.00		22.86%	
20	48	700	166.00		23.71%	
20	72	700	198.00	191.67	28.29%	27.38%
20	72	700	187.00		26.71%	
20	72	700	190.00		27.14%	
20	96	700	203.00	205.67	29.00%	29.38%
20	96	700	208.00		29.71%	
20	96	700	206.00		29.43%	
20	120	700	231.00	227.67	33.00%	32.52%
20	120	700	224.00		32.00%	
20	120	700	228.00		32.57%	
23	48	700	160.00	157.67	22.86%	22.52%
23	48	700	155.00		22.14%	
23	48	700	158.00		22.57%	
23	72	700	182.00	180.00	26.00%	25.71%
23	72	700	178.00		25.43%	
23	72	700	180.00		25.71%	
23	96	700	190.00	193.00	27.14%	27.57%
23	96	700	193.00		27.57%	
23	96	700	196.00		28.00%	
23	120	700	190.00	190.00	27.14%	27.14%
23	120	700	192.00		27.43%	
23	120	700	188.00		26.86%	

Fuente: De acuerdo a los datos observados.

7.4. Evidencias Fotográficas



Figura 20. Equipos utilizados

Fuente: Fotografías experimentales



Figura 21. Materiales utilizados

Fuente: Fotografías experimentales



Figura 22. Reactivos utilizados

Fuente: Fotografías experimentales



Figura 23. Selección, lavado, pesado y trozado de las cáscaras de piña (Etapa 1).

Fuente: Fotografías experimentales



Figura 24. Tratamiento térmico, enfriamiento, licuado de las cáscaras de piña (Etapa 1).

Fuente: Fotografías experimentales



Figura 25. Acondicionamiento de mostos en frascos esterilizados para su tratamiento térmico en autoclave (Etapa 1).

Fuente: Fotografías experimentales



**Figura 26. Hidrólisis enzimática de las cáscaras de piña con Celulasa al 2%.
(Etapa 1)**

Fuente: Fotografías experimentales

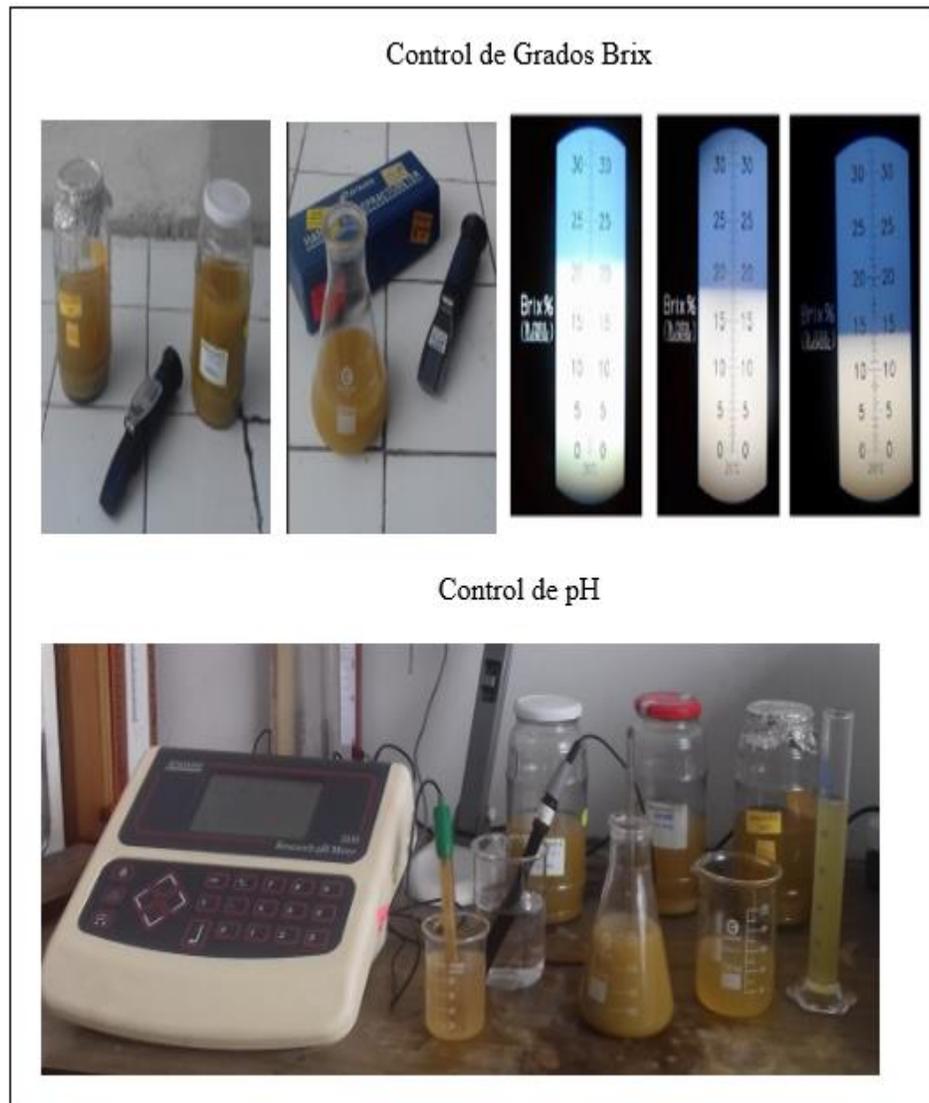


Figura 27. Control de grados Brix y pH de los hidrolizados enzimáticos (Etapa 1).

Fuente: Fotografías experimentales



Figura 28. Tratamiento térmico de mostos hidrolizados a 85°C por 10 minutos para inactivar la enzima Celulasa. (Etapa 1)

Fuente: Fotografías experimentales

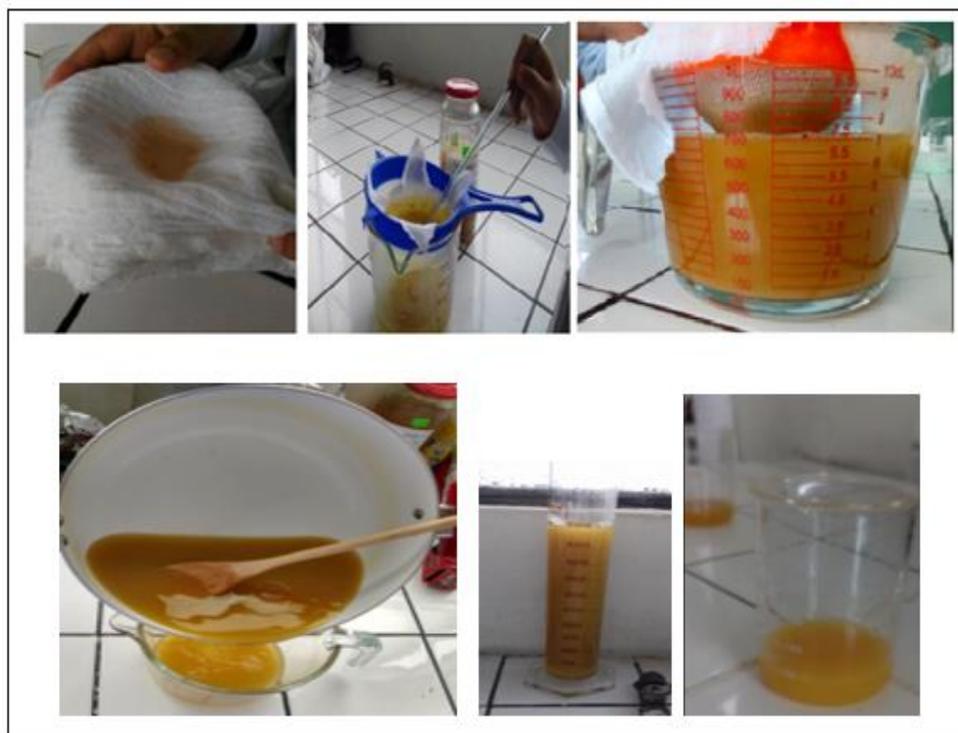


Figura 29. Filtración de los mostos hidrolizados (Etapa 1).

Fuente: Fotografías experimentales



Figura 30. Preparación de las muestras para analizar azúcares reductores (Método Eynon-Lane). (Etapa 1).

Fuente: Fotografías experimentales



Figura 31. Prueba cuantitativa de determinación de azúcares reductores método volumétrico de Eynon-Lane (Etapa 1).

Fuente: Fotografías experimentales



Figura 32. Preparación y activación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. (Etapa 2).

Fuente: Fotografías experimentales



Figura 33. Proceso fermentativo de las cáscaras de piña por *Saccharomyces cerevisiae*. Inoculación de la levadura (Etapa 2).

Fuente: Fotografías experimentales

**Incubacion a 30°C durante la Fermentación alcohólica del mosto a 30°C en los
tratamientos °Bx (14, 17, 20 y 23°Bx) - T_{Fer} (48, 72, 96 y 120 horas)**



Figura 34. Proceso fermentativo de las cáscaras de piña por *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentación alcohólica (Etapa 2).

Fuente: Fotografías experimentales

Destilación de los mostos alcohólicos

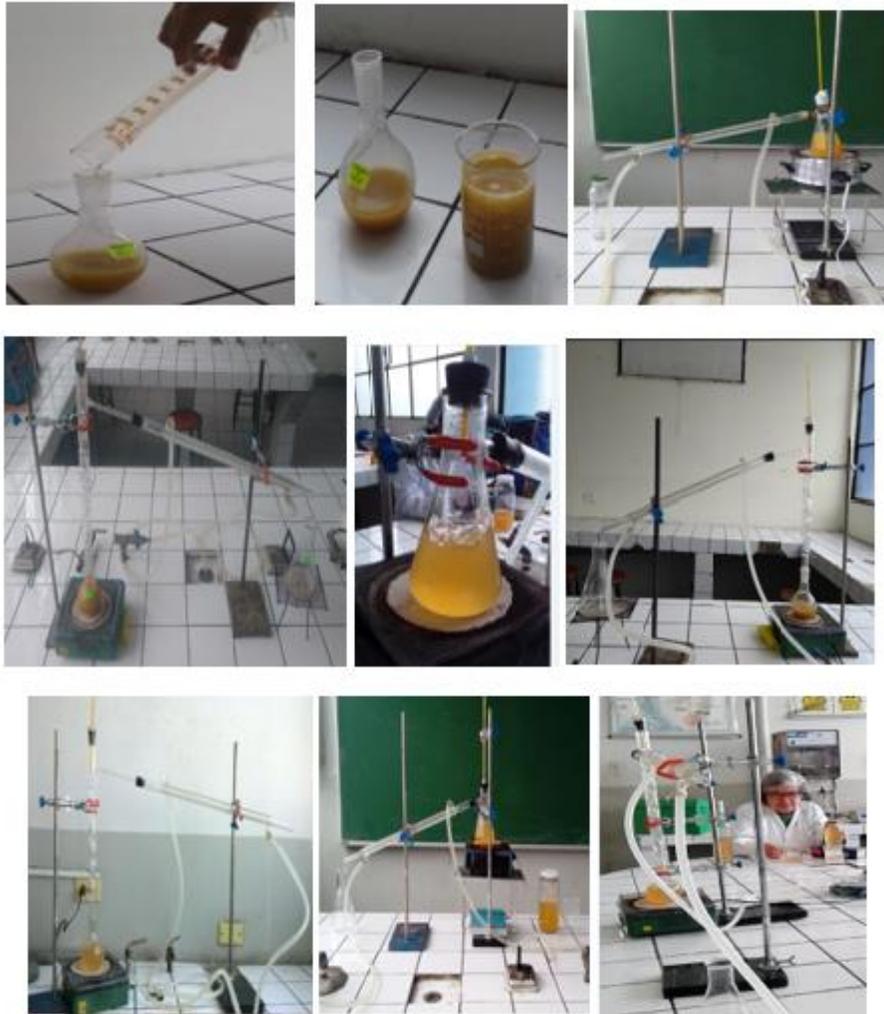


Figura 35. Proceso de destilación para la obtención de etanol destilado (Etapa 3).

Fuente: Fotografías experimentales



Figura 36. Destilados del tratamiento de 14 grados Brix en 48, 72, 96 y 120 horas de fermentación (Etapa 3).

Fuente: Fotografías experimentales



Figura 37. Destilados del tratamiento de 17 grados Brix en 48, 72, 96 y 120 horas de fermentación (Etapa 3).

Fuente: Fotografías experimentales



Figura 38. Destilados del tratamiento de 20 grados Brix en 48, 72, 96 y 120 horas de fermentación (Etapa 3).

Fuente: Fotografías experimentales

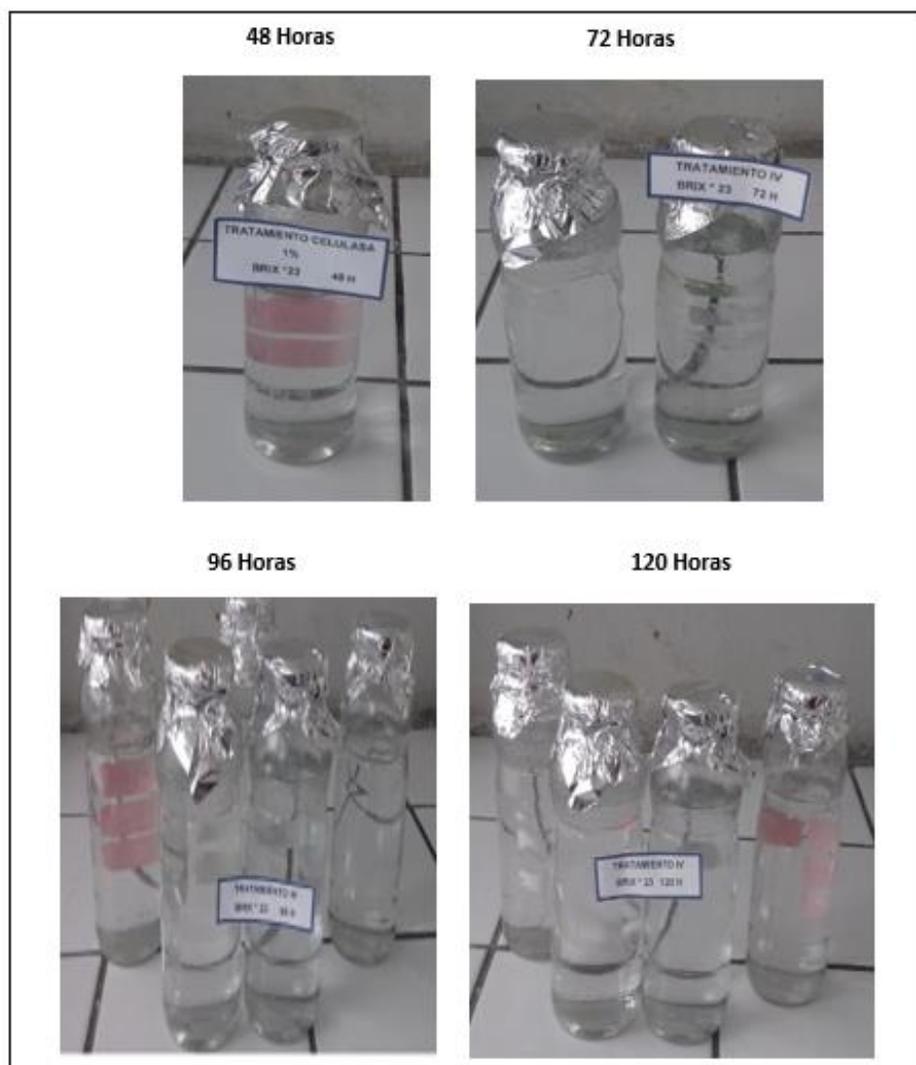


Figura 39. Destilados del tratamiento de 23 grados Brix en 48, 72, 96 y 120 horas de fermentación (Etapa 3).

Fuente: Fotografías experimentales

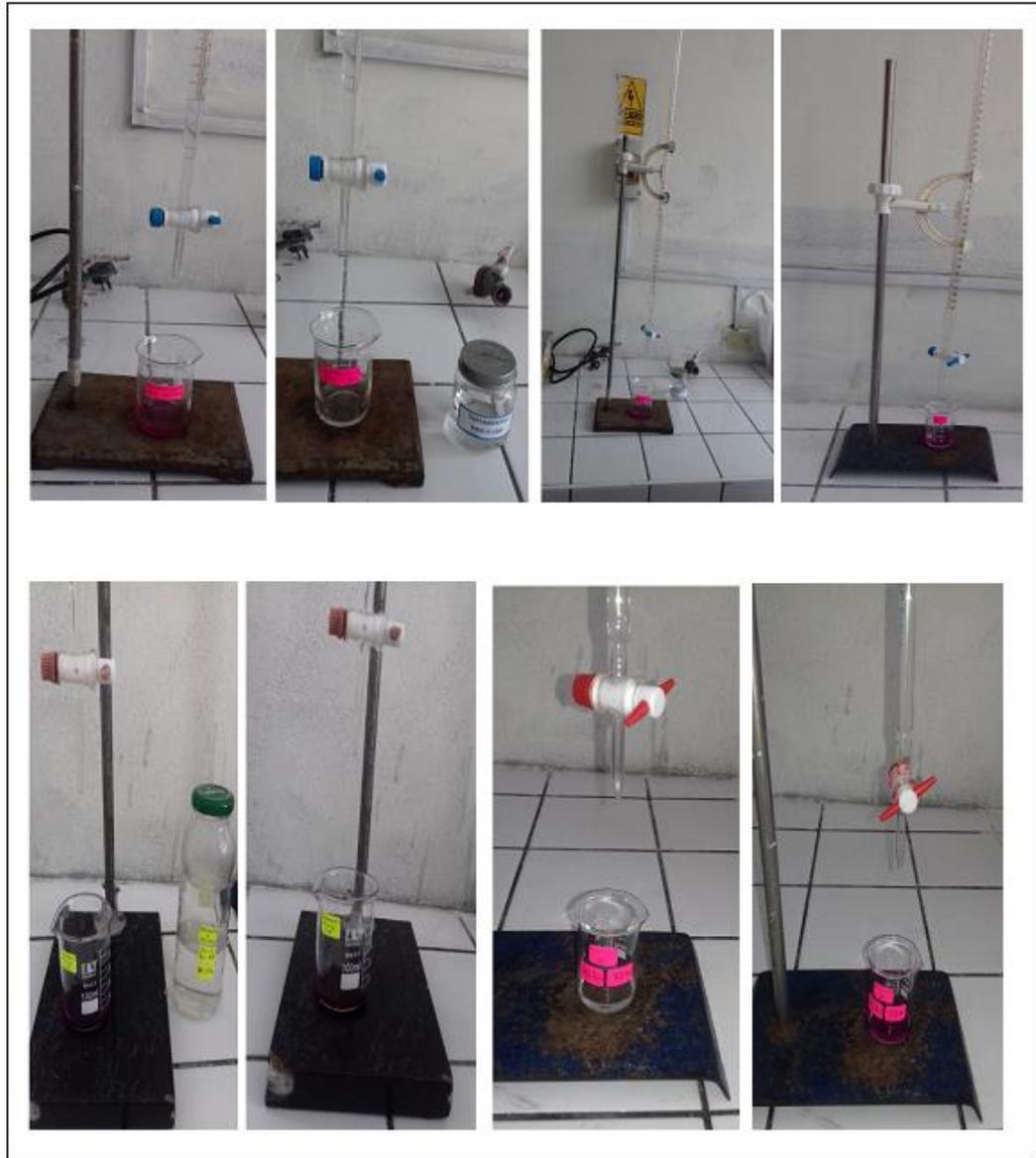


Figura 40. Prueba de acidez titulable del etanol destilado de cada tratamiento.

Fuente: Fotografías experimentales

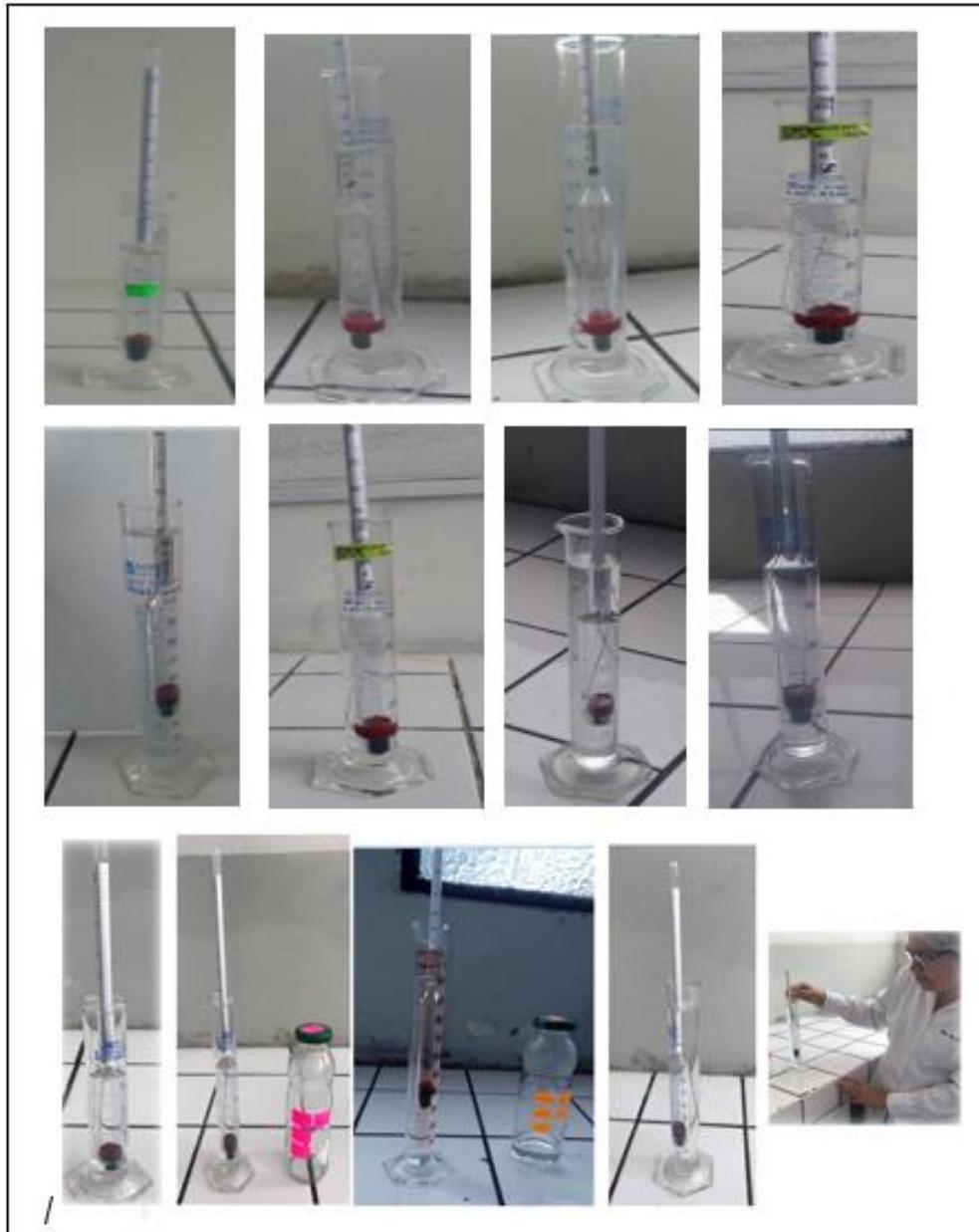


Figura 41. Determinación por alcolimetría del porcentaje de etanol destilado obtenido en cada tratamiento

Fuente: Fotografías experimentales

7.5. Matriz de Consistencia

PROBLEMA GENERAL Y ESPECIFICOS	OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICOS	HIPOTESIS	MARCO TEORICO	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGIA
<p>1. Problema General ¿Cómo obtener etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mediante la biotransformación de cáscaras de piña <i>Ananas comosus</i> evaluando los sólidos solubles y el tiempo de fermentación?</p> <p>2. Problemas secundarios ¿Cómo es posible establecer a nivel de laboratorio los sólidos solubles para obtener etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por biotransformación de cáscaras de piña <i>Ananas comosus</i>?</p> <p>¿Cómo es posible establecer a nivel de laboratorio los tiempos de fermentación para obtener etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por biotransformación de cáscaras de piña <i>Ananas comosus</i>?</p> <p>¿Cómo es posible obtener a nivel de laboratorio etanol de calidad por biotransformación de cáscaras de piña de manera eficiente?</p>	<p>1. Objetivo General - Obtener etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mediante la biotransformación de cáscaras de piña <i>Ananas comosus</i> evaluando los sólidos solubles y el tiempo de fermentación.</p> <p>2. Objetivo específico 1. Establecer a nivel de laboratorio los sólidos solubles para obtener etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por biotransformación de cáscaras de piña <i>Ananas comosus</i>.</p> <p>2. Establecer a nivel de laboratorio los tiempos de fermentación para obtener etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por biotransformación de cáscaras de piña <i>Ananas comosus</i>.</p> <p>3. Obtener a nivel de laboratorio etanol de calidad por biotransformación de cáscaras de piña de manera eficiente.</p>	<p>1. Hipótesis General - La aplicación del proceso de biotransformación permitirá obtener etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mediante la biotransformación de cáscaras de piña <i>Ananas comosus</i> evaluando los sólidos solubles y el tiempo de fermentación.</p> <p>2. Hipótesis específicas 1. El contenido inicial de sólidos solubles influye en la obtención de etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por biotransformación de cáscaras de piña <i>Ananas comosus</i>.</p> <p>2. El tiempo de fermentación influye en la obtención de etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por biotransformación de cáscaras de piña <i>Ananas comosus</i>.</p> <p>3. La calidad del etanol obtenido por biotransformación de cáscaras de piña será eficiente de acuerdo al grado alcohólico del mosto, porcentaje de etanol destilado y porcentaje de rendimiento de obtención de etanol destilado.</p>	<p>Antecedentes Corredor, 2008, Cuervo et al., 2009, Tomas, 2010, Bellido, 2013, Arellano, 2015, Conesa, 2017.</p> <p>Bases teóricas Piña, Aprovechamiento y valoración de la piña, Proceso de obtención de etanol lignocelulósico</p> <p>Definición de Términos</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Aeróbico ▪ Anaeróbico ▪ Azúcar reductor ▪ Biotecnología ▪ Biotransformación ▪ Celulasa ▪ Etanol ▪ Fermentación ▪ Fermentador ▪ Glucosa ▪ Grados Brix ▪ Hidrólisis ▪ Levaduras ▪ Material lignocelulósico ▪ Polisacáridos ▪ pH ▪ Residuos Orgánicos 	<p>VARIABLE INDEPENDIENTE</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sólidos solubles • Tiempo de fermentación <p>VARIABLE DEPENDIENTE Calidad del etanol producido de la biotransformación de cáscaras de piña fermentada expresado como:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Grado alcohólico del mosto: número de volúmenes de etanol expresado en grados. - Porcentaje de etanol destilado: concentración porcentual de etanol en volumen. - Porcentaje de rendimiento de etanol destilado: cantidad de producto sintetizado a partir de la cantidad de sustrato consumido. <p>INDICADORES:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sólidos solubles (°Grados Brix) • Tiempo de fermentación (horas) • Grado alcohólico (°GL) • Contenido de etanol (%) • Porcentaje rendimiento de etanol 	<p>Tipo: Aplicada Nivel: Explicativo Diseño: Experimental y Analítico Completamente al azar y metodología de superficie de respuesta</p> <p>Universo poblacional (N) Se utilizará como material biológico veinte kilos de cáscara de piña obtenido de los frutos de la piña (<i>Ananas comosus</i>) tratado por procesos fermentativos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para la obtención de etanol.</p> <p>Muestra poblacional (n) Muestra de 1000 ml de solución de cáscara de piña, en tres repeticiones por tratamiento con los 04 diferentes contenidos de sólidos solubles o Grados Brix (14, 17, 20 y 23) y 04 diferentes tiempos de fermentación (48, 72, 96 y 120 horas) para la fermentación alcohólica.</p> <p>Métodos de Análisis Determinación de la acidez (INDECOPI, NTP 203.070. 1977. Revisada el 2012; INDECOPI, NTP 211.040. 2012). Determinación de grado alcohólico. Tabla de Conversión de Gravedad Específica a °Baumé - °Brix - °Alcohol. (Amerine M.A. & Ough C.S., 2001). Determinación del porcentaje de etanol por alcoholimetría. (Norma Peruana ITINTEC 210.011. Bebidas alcohólicas).</p>

