



UNIVERSIDAD TECNICA DE MACHALA

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUIMICAS Y DE LA
SALUD**

CARRERA DE INGENIERÍA QUIMICA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO**

TEMA:

**ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VINO DE ARAZA
(*Eugenia stipitata*) UTILIZANDO ENZIMAS PROTEOLITICAS
(PAPAINA) COMO AGENTE CLARIFICANTE, MACHALA 2014.**

AUTOR:

EDGAR PATRICIO GADVAY YAMBAY

TUTOR:

DR. HUGO ÍTALO ROMERO BONILLA, MG. SC

MACHALA - EL ORO - ECUADOR

2015

CERTIFICACIÓN

El presente trabajo de Titulación “ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VINO DE ARAZA (*Eugenia stipitata*) UTILIZANDO ENZIMAS PROTEOLITICAS (PAPAINA) COMO AGENTE CLARIFICANTE, MACHALA 2014.”, realizado por el autor Edgar Patricio Gadvay Yambay, egresado de la carrera de Ingeniería Química, ha sido prolijamente dirigido y revisado, por lo tanto autorizo su presentación previo a la obtención del título de Ingeniero Químico.



Dr. Hugo Ítalo Romero Bonilla, Mg. Sc.

TUTOR

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTORIA

Yo **Edgar Patricio Gadvay Yambay**, con cédula de identidad 0703973198, egresado de la carrera de Ingeniería Química de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, de la Universidad Técnica de Machala, responsable del Presente Trabajo de Titulación titulado “**ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VINO DE ARAZA (*Eugenia stipitata*) UTILIZANDO ENZIMAS PROTEOLITICAS (PAPAINA) COMO AGENTE CLARIFICANTE, MACHALA 2014.** ”, Certifico que la responsabilidad de la investigación, resultados y conclusiones del presente trabajo pertenecen exclusivamente a mi autoría; una vez que ha sido aprobada por mi Tribunal de Sustentación autorizando su presentación. Deslindo a la Universidad Técnica de Machala de cualquier delito de plagio y cedo mis derechos de Autor a la Universidad Técnica de Machala para ella proceda a darle el uso que crea conveniente.



Edgar Patricio Gadvay Yambay
C.I. 0703973198
AUTOR

RESPONSABILIDAD

El presente trabajo de Titulación: resultados, conclusiones y recomendaciones son de responsabilidad única y exclusiva del autor.

A handwritten signature in blue ink, reading "Edgar Patricio Gadvay Yambay", is enclosed within a hand-drawn oval. Below the signature, there are several horizontal scribbles.

Edgar Patricio Gadvay Yambay
C.I. 0703973198
AUTOR

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido la culminación de mi carrera profesional con éxito.

Con todo cariño por el apoyo incondicional de mis padres Francisco Gadvay y Elisa Yambay, a mi esposa Carmen Chanalata, a mi pequeña y adorada hija Dayana Gadvay, a mis hermanos Martha, Roberto, Marco, Hugo, Lourdes, Katty, Gabriela y a todos quienes constituyen mi familia, porque en ellos encontré paciencia apoyo constante, comprensión, para así poder alcanzar una de mis mayores metas trazadas durante mi vida estudiantil.

Edgar Patricio Gadvay Yambay

AUTOR

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios, a mis padres y a toda mi querida familia, por haberme permitido y ayudado a desarrollar el presente trabajo de investigación.

Mi sincero agradecimiento a la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud que me ha formado como profesional, a mis compañeros de aula por su apoyo incondicional durante todos los periodos lectivos, a nuestros profesores por entregarnos sus conocimientos, paciencia y comprensión que forjaron un espíritu de esfuerzo motivándome a alcanzar la meta propuesta.

Edgar Patricio Gadvay Yambay
AUTOR

ÍNDICE

CERTIFICACIÒN.....	ii
CESIÒN DE DERECHOS DE AUTORIA	iii
RESPONSABILIDAD.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
INTRODUCCIÒN	1
PROBLEMA.....	3
JUSTIFICACIÒN	3
OBJETIVOS	4
Objetivo General.....	4
Objetivos Específicos	4
PREGUNTAS DE INVESTIGACION	4
VARIABLES	5
Variable Independiente	5
Variable Dependiente	5
HIPOTESIS	5
1. MARCO TEÒRICO	6
1.1. EL VINO.....	6
1.1.1. FermentaciÒn del Vino.....	6
1.1.1.1. <i>FermentaciÒn Maloláctica</i>	7
1.1.1.2. <i>La MaduraciÒn</i>	7
1.1.1.3. <i>Embotellado</i>	7

1.1.1.4.	<i>Clarificación</i>	8
1.1.1.5.	<i>Estabilización</i>	8
1.1.1.6.	<i>Filtración</i>	8
1.2.	COMPOSICION DEL MOSTO DE VINO	8
1.2.1.	Azucares.....	8
1.2.2.	Alcoholes	9
1.3.	VINO DE FRUTAS	9
1.3.1.	Diagrama de Flujo de Elaboración de Vino de Arazá (<i>Eugenia stipitata</i>)	10
1.3.1.1.	Descripción del Proceso.....	11
1.3.2.	Características Organolépticas del Vino.....	12
1.3.2.1.	Color.....	13
1.3.2.2.	Sabor y Aroma	13
1.3.2.3.	Calidad del Vino	14
1.3.2.4.	Defectos y Alteraciones del Vino	14
1.4.	ARAZA (<i>Eugenia stipitata</i>).....	19
1.4.1.	Composición de los Frutos	19
1.5.	MICROORGANISMO UTILIZADO EN LA FERMENTACION ALCOHOLICA	20
1.5.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.5.1.1.	Morfología.....	¡Error! Marcador no definido.
1.5.1.2.	Clasificación Científica.....	21
1.5.1.3.	Metabolismo.....	22
2.	METODOLOGÍA.....	23
2.1.	LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....	23
2.1.1.	Tipo de Investigación.....	24

2.1.2.	Diseño de Experimental de la Investigación.....	24
2.1.3.	Proceso de Elaboración del Vino de Arazá (<i>Eugenia stipitata</i>)	26
2.1.3.1.	Preparación del Mosto.....	26
2.2.	METODOS ANALITICOS UTILIZADOS EN LA CARACTERIZACION DE LA MATERIA PRIMA Y EN EL CONTROL DE CALIDAD DEL VINO DE ARAZA (<i>Eugenia stipitata</i>)	29
2.2.1.	Análisis bromatológico.....	29
2.2.1.1.	Humedad. Método por secado de estufa.....	29
2.2.1.2.	Sólidos Totales	29
2.2.1.3.	Sólidos Solubles Totales.....	30
2.2.1.4.	Cenizas .Método de Cenizas Totales.....	30
2.2.1.5.	Acidez Total	30
2.2.1.6.	pH	31
2.2.1.7.	Determinación de Azucares Reductores.....	31
2.2.1.8.	Determinación de Etanol	32
2.2.	MATERIALES	32
2.2.1.	Recursos Empleados	32
2.2.2.	Recursos Físicos	32
2.2.2.1.	Materiales de Laboratorio Análisis.	32
2.2.2.2.	Materiales de Procesamiento.....	32
2.2.2.3.	Sustancias y reactivos	33
2.2.2.4.	Varios	33
3.	RESULTADOS	34
3.1.	OBTENCIÓN DE LA ENZIMA PAPAÍNA PARA SU APLICACIÓN EN EL VINO DE ARAZÁ COMO AGENTE CLARIFICANTE.....	34

3.2.	ACCIÓN CLARIFICANTE DE LA PAPAÍNA EN EL VINO DE ARAZÁ	35
3.2.1.	Análisis Estadístico de la acción Clarificante de la Enzima	36
3.2.1.1.	<i>Prueba de Tukey</i>	37
3.2.1.2.	<i>Prueba de Hipótesis</i>	38
3.3.	CARACTERIZACIÓN CROMATOGRAFÍA DEL VINO DE ARAZÁ OBTENIDO... ..	39
4.	CONCLUSIONES.....	41
5.	RECOMENDACIONES	42
6.	BIBLIOGRAFIA	43
	ANEXOS	45

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue determinar la influencia de la adición de enzima papaína en la clarificación del vino de arazá (*Eugenia stipitata*), mediante la aplicación de procesos biotecnológicos se puede obtener vino el mismo que se utilizó para adicionar enzima en tres concentraciones (1 g/L, 1,5 g/L y 2 g/L). Se utilizó el la levadura *Saccharomyces cereviceae*, como agente fermentadora, para lo cual se prepararon tres formulaciones de diferentes relación de agua- fruta (1:1, 2:1 y 3:1), para medir el efecto de la adición de la enzima se cuantifico la concentración inicial y finales de las unidades de color de los 9 tratamientos para determinar el % de unidades de color eliminadas durante el proceso de clarificación del vino. Mediante espectrofotometría UV-Visible se pudo determinar las unidades de color que se redujeron durante el clarificado del vino, el tratamiento que alcanza el más alto porcentaje de disminución de las unidades de color es el tratamiento E (2:1 fruta: agua y 1,5 g/L de enzima) con 77,38 unidades, el vino obtenido en este tratamiento alcanzo los 8 °GL y la caracterización cromatografía de este indica que no existe la formación de metanol. Mediante el análisis estadístico del proceso de clarificación del vino, se pudo determinar que si existe diferencia significativa ($p < 0,05$) en la adición de enzimas, a mayor concentración de enzimas, mayor porcentaje de eliminación de unidades de color.

Palabras claves: Arazá, Papaína, Vino, *Saccharomyces cereviceae*, Color

ABSTRACT

The objective of this research was to determine the influence of the addition of papain enzyme in the clarification of wine arazá (*Eugenia stipitata*), by applying biotechnological processes can be obtained came the same that was used to add enzyme at three concentrations (1 g / L, 1,5 g / L and 2 g / L). The yeast *Saccharomyces cereviceae* was used as leavening agent, for which three different formulations water- fruit ratio (1: 1, 2: 1 and 3: 1) were prepared to measure the effect of the addition of enzyme the initial concentration and final color units 9 treatments was quantified to determine the% color units removed during clarification of wine. By UV-visible spectrophotometry could determine the color units that were reduced during the clarified wine, the treatment reaches the highest percentage decrease in color units is treatment E (2: 1 fruit: water and 1, 5 g / L of enzyme) with units 77,38, wine from this treatment reached 8 ° GL and this characterization chromatography indicates no formation of methanol. Through statistical analysis of the process of clarification of wine, it was determined that if there is significant difference ($p < 0,05$) in the addition of enzymes, the higher the concentration of enzymes, higher percentage of removal of color units.

Key words: Arazá, Papain, Wine, *Saccharomyces cereviceae*, Color

INTRODUCCIÓN

El arazá (*Eugenia stipitata*) es una planta originaria de las selvas húmedas de la Amazonia occidental, encontrándose principalmente en plantaciones naturales en la Amazonia peruana, especialmente en la cuenca inferior del río Ucayali. Aunque ha sido utilizada y casi domesticada desde tiempos inmemoriales por los nativos de la Amazonia, apenas en enero de 1930 fue colectada y herborizada por G. Klug en Loreto, en la población de Mishuyacu, cerca de Iquitos -Perú-, y las colecciones enviadas al Field Museum of Natural History de Chicago, donde en 1956 el Dr. Roger McVaugh la describió como una especie nueva para la ciencia con el nombre de *Eugenia stipitata* McVaugh de la familia de la Mirtáceas, o sea, prima de la guayaba.

Este frutal de la selva se caracteriza por ser un arbolito o arbusto pequeño, que alcanza hasta 3 m de altura. Las hojas son simples, opuestas, de forma elíptica; la lámina está ligeramente cubierta por pubescencia, con la nervadura muy sobresaliente por el envés. La dimensión de las hojas varía entre 8 y 14 cm de largo por 3 a 6 cm de ancho. Las flores se encuentran tanto solitarias como en grupos de cuatro, con cuatro pétalos blancos y alrededor de 100 estambres, y es polinizada por las abejas.

La producción de frutos en plantas adultas se da todo el año, ya que la planta tiene simultáneamente flores y frutos, aunque existen períodos de mayor cosecha: de octubre a enero y de abril a junio. Los frutos son redondeados, hasta de 10 cm de diámetro y con un peso entre 200-600 gramos. No es de sorprenderse que el arazá pueda producir entre 20 y 30 toneladas de frutos por hectárea.

Habiendo sido introducida hace algunos años en Ecuador, y pudiéndosele observar actualmente en algunos huertos familiares, principalmente en la zona cálida, sin duda lo que más impresiona cuando se le ve por primera vez es que siendo un arbolito tan pequeño produzca flores y frutos tan coloridos. El arazá en estado fresco tiene un sabor ácido, lo que dificulta su consumo en forma directa, sin embargo se comporta muy bien procesado bajo diversas modalidades. Al respecto Guevara (1991), encontró buenos resultados al procesarla bajo la forma de pulpa, néctar, mermelada y fruta en almíbar. En los últimos años, la tendencia de los consumidores esta direccionado hacia el consumo de productos naturales y novedosos.

Una respuesta a ello, es sin duda alguna, el procesamiento de frutas exóticas, para la obtención de licores, bebidas espirituosas, y por supuesto, vinos.

El propósito fundamental del presente estudio fue comprobar si la adición de enzima papaína acelera el proceso de clarificado del vino de arazá.

PROBLEMA

En la actualidad existe en el mercado local gran cantidad de vinos de frutas, los cuales utilizan en sus procesos de elaboración y clarificación grandes cantidades de productos químicos perjudiciales para la salud humana como meta bisulfito de sodio, fosfato de amonio (irrita los ojos, piel y a los pulmones), tierras diatomáceas, etc. Empleados para la pasteurización del vino, acondicionamiento y clarificación del vino respectivamente.

JUSTIFICACIÓN

En nuestro país se puede constatar la ausencia de la industria dedicada a la producción de bebidas alcohólicas fermentadas (vino de arazá) de buena calidad, una limitada utilización de levaduras de carácter vínico que garanticen la obtención de un vino de óptima calidad que se convierta en competencia para los productos extranjeros que comúnmente se comercializan en el mercado nacional, se ha podido evidenciar el desinterés de los agricultores por el cultivo de frutas no tradicionales o si se lo realiza es en forma no planificada o como plantas ornamentales. De esta forma se está incentivando a la búsqueda de nuevas alternativas de producción industrial que aporten a la economía de la región sur de nuestro país, para lo cual se tomó en cuenta una fruta representativa que se cultiva en la provincia de el Oro como lo es el arazá (*Eugenia stipitata*) la cual presenta cualidades muy apetecidas por los consumidores como la jugosidad, aroma, dulzor y sabor y que en esta época se encuentra en el mercado con un alto porcentaje de producción. Para la elaboración de vino a partir de esta fruta se planteó incorporar enzimas proteolíticas (papaína), para determinar el efecto que tiene sobre el proceso de clarificación de vino.

Para el diseño experimental se utilizó como variables, relación fruta/agua (1:1, 2:1 y 3:1), y la concentración de enzima (1 g/L, 1,5 g/L y 2 g/L) y mediante espectrofotometría UV-Visible determinar el efecto de la adición de enzima.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Elaborar y caracterizar vino de arazá (*Eugenia stipitata*), utilizando enzimas como la papaína como agente clarificante.

Objetivos Específicos

1. Obtener la enzima papaína para su aplicación como agente clarificante.
2. Demostrar la acción clarificante de la papaína en el vino de arazá.
3. Caracterizar el vino de arazá obtenido.

PREGUNTAS DE INVESTIGACION

¿Cuáles son las características bioquímicas del arazá?

¿Cuáles son los parámetros de control en la elaboración de vino?

¿Cuáles son las condiciones para que actúe la papaína?

¿Qué efectos tiene la adicción de la enzima papaína en el proceso de fermentación y clarificación del vino de arazá?

¿Cuáles son los análisis para el control de calidad del vino?

VARIABLES

Variable Independiente

- Concentración de enzimas (g/L),

Variable Dependiente

- Color del Vino de Arazá (Unidades de color)

HIPOTESIS

H₀ = Aplicando enzimas proteolíticas (papaína) como agente, no es posible reducir el tiempo de clarificación del vino de arazá.

H₁ = Aplicando enzimas proteolíticas (papaína) como agente, es posible reducir el tiempo de clarificación del vino de arazá.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. EL VINO

Es una bebida obtenida mediante la fermentación alcohólica de su mosto o zumo. La Fermentación se produce por la acción metabólica de levaduras que transforman los azúcares del fruto en alcohol etílico y gas en forma de dióxido de carbono. El azúcar y los ácidos que posee la fruta *Eugenia stipitata* hace que sean suficientes para el desarrollo de la fermentación. No obstante, el vino es una suma de un conjunto de factores ambientales clima, latitud, altitud, hora de luz etc. (Konemann & Bonner, 1999).

1.1.1. Fermentación del Vino

“La fermentación es la parte principal del proceso de la elaboración del vino, en realidad el vino no puede elaborarse de forma sin la fermentación. La fermentación tiene como principal efecto la conversión de los azúcares del mosto en alcohol etílico.

El organismo capaz de elaborar la fermentación son las levaduras del género de las *Saccharomyces cerevisiae*”

“La fermentación se ve afectada por una variedad de factores, entre ellos se encuentra la temperatura, el rango de temperaturas entre los que es posible la fermentación se encuentra entre los 5 °C y los 38 °C en algunos casos la presencia de fungicidas y pesticidas puede limitar la fermentación” (Deaconess., 2009).

“La fermentación necesita de nutrientes diversos que están incluidos naturalmente en el mosto inicial, y dependiendo de la fase son necesarios unos u otros. Por ejemplo es la fase de crecimiento exponencial la presencia del ion fosfato (H_2PO_4) es esencial en todos los procesos de transferencia de energía celular así como es el crecimiento de las levaduras.

Su presencia en el mosto es suficiente para la fermentación, pero en algunas ocasiones con el objeto de activar la fermentación se añade fosfato diamónico (de fórmula $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) con el objeto de regular el balance de fosfatos y de nitrógenos”

1.1.1.1. Fermentación Maloláctica

“En paralelo con la fermentación, se produce una reacción similar denominada fermentación maloláctica en la que actúan bacterias lácticas presentes de forma natural en el arazá para convertir el ácido láctico reduciendo la acides del vino. La fermentación maloláctica es completamente imprevisible, pero los viticultores pretenden que ocurre al mismo tiempo que *la fermentación alcohólica mediante levaduras*”.

1.1.1.2. La Maduración

En la actualidad se la realiza en recipientes de acero inoxidable. A veces se suele añadir astillas de madera de roble (*quercus fragmentus*) con el objeto de acelerar el proceso de adopción de *sabores de la madera, aunque esta práctica está regulada por ley en cada país.*

1.1.1.3. Embotellado

“El embotellado es una operación relativamente reciente en la historia del vino.

Se empezó a realizar cuando era posible elaborar vidrios más robustos y asequibles. Las botellas actuales tienen un volumen estándar de 750 ml, destacando por su cualidades la *Bordelesa*”

Un elemento importante en el embotellado es la encapsulación que puede emplear tapones de materiales naturales (tapón de corcho), semisintéticos, sintéticos, y capsulas metálicas. Por regla general antes de embotellar se realizan operaciones de:

1.1.1.4. Clarificación

Corresponden al conjunto de operaciones que hacen del vino un líquido limpio, para ellos se emplean diversas sustancias tales como la papaína que es una enzima derivada de la papaya, y es también usada para tiernizar carnes.

Trabaja destacando proteínas en un rango de temperatura muy estrecho. Su uso es perfecto en cervecerías comerciales durante la pasteurización y tiene mucho valor en la clarificación del vino de azara”.

1.1.1.5. Estabilización

Con el objeto de que sea permanente en el tiempo de la limpidez lograda en la clasificación.

1.1.1.6. Filtración

La filtración elimina cualquier residuo del proceso de elaboración del vino.

1.2. COMPOSICION DEL MOSTO DE VINO

“Para comprender lo que es el vino desde el punto de vista de sus componentes hay que distinguir su composición de los compuestos del azara, al ser mosto y posterior vino. El mosto antes de la fermentación se compone principalmente de agua y azúcares así como también de ácidos (málico y tartárico), además otros componentes químicos en menor cantidad son responsables de la composición final del vino “. Otros elementos se añaden al vino de forma artificial y componen lo que se denomina aditivos del vino, estos aditivos tienen por objeto estabilizar algunos compuestos (proteínas, azúcares, cristales de tartarato, etc) reducir el nivel de ácidos, agentes antioxidantes (ácido ascórbico), agentes antimicrobianos (dióxido de azufre, ácido sórbicos, sorbatos, ácido benzoico, ácido fumárico).

1.2.1. Azúcares

“Los principales azúcares presentes en el mosto son la glucosa y la fructuosa, otros azúcares se encuentran en la uva pero en porciones insignificantes. La concentración de azúcar en el

aráz o en el mosto se suele medir en EEUU en Brix, mientras que en Europa se hace en grados Baumé. La concentración de azúcares es crítica para el desarrollo de las levaduras durante la fermentación, la principal levadura del vino (*Saccharomyces cerevisiae*) se alimenta principalmente de glucosa y fructuosa (Wales, 2009)”

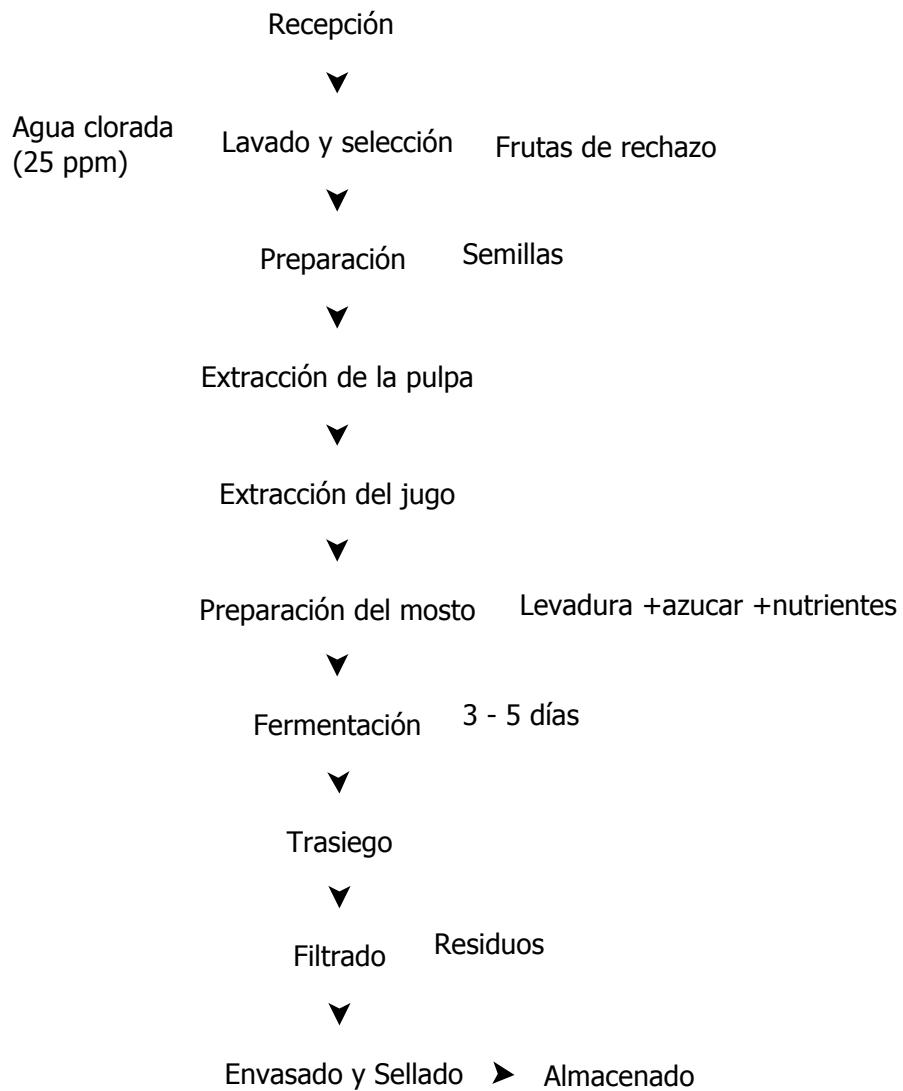
1.2.2. Alcoholes

Uno de los efectos nocivos del consumo del vino, debido a su contenido de etanol, es el alcoholismo. “La fermentación alcohólica es un proceso metabólico anaeróbico (en ausencia de oxígeno) que permite a las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) consumir los azúcares del mosto para liberar dióxido de carbono y alcohol etílico (etanol de fórmula $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) que permanece en disolución en el vino final. La concentración de alcohol se suele medir en porcentaje de volumen total. La forma más común para averiguar el contenido de alcohol en un vino es medir el punto de ebullición.

1.3. VINO DE FRUTAS

El vino es una bebida alcohólica elaborada por fermentación alcohólica del jugo de la fruta. Los azúcares del jugo, bajo acción de las levaduras, se transforman en etanol, dióxido de carbono y diferentes compuestos que contribuirán al aroma del vino. Se debe distinguir vino y vino de fruta. El vino, si no se especifica nada, es un jugo de uva fermentado. Sin embargo, otras frutas o plantas, como la flor de Jamaica, y por supuesto el araza, permiten obtener excelentes bebidas vinosas que tienen mucho en común con los jugos de uva fermentados. En ellos se fabrican especialmente bebidas similares, el vino preparado a base de manzanas y peras, contribuyen en gran medida a un sustituto del vino propiamente dicho con frecuencia difícil de conseguir, mereciendo gran aprecio como bebida popular. Además de manzanas y peras se emplean grosellas, arándano y grosella espinosa para fabricar vino, aunque también fresas, cerezas, escaramujos y tallos de rubarbe. Dentro de ciertos límites sirven así mismo las zarzamoras, frambuesas y arándanos rojos (VOGT, 1985).

1.3.1. Diagrama de Flujo de Elaboración de Vino de Arazá (*Eugenia stipitata*)



1.3.1.1. Descripción del Proceso

Recepción: Consiste en cuantificar la fruta que entrara en proceso. Esta operación se realiza utilizando recipientes adecuados y balanzas calibradas y limpias.

Lavado: Se hace para eliminar bacterias superficiales, residuos de insecticidas y suciedad adherida a la fruta. Se debe utilizar agua clorada (25 ppm).

Selección: Se elimina la fruta que no tiene el grado de madurez adecuado o presente golpes o magulladuras.

Preparación de la Fruta: La eliminación de pedúnculos de la fruta, así como obtener un producto de mejor calidad, la carambola al ser una fruta de corteza fina se realiza pelada. La preparación puede incluir un escalado que permita por una parte desactivar la acción enzimática y por otra ablandar los tejidos de la fruta para facilitar la extracción de la pulpa.

Extracción de la pulpa: Se hace por medio de un despulpador o licuando la fruta esta operación se realiza con la finalidad de solubilizar toda la fruta en la solución y que la levadura de cerveza *Saccharomyces cerevisiae* pueda fermentar todos los azúcares presentes en la fruta.

Preparación del mosto: Al jugo obtenido en la etapa anterior se adiciona azúcar hasta que el mosto contenga 25 °Brix, levadura al 2 g/l. El nutriente, que se suele añadir es el fosfato de amonio, se agrega una proporción de 1 g/l.

Análisis del mosto: Al mosto obtenido se lo analiza con la finalidad de conocer con cuanto °Brix se va a iniciar la etapa de fermentación alcohólica, la acidez, densidad y G.L.

Fermentación: En esta etapa del proceso se realiza la inoculación de la levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) en la proporción antes indicada, al birreactor se le coloca una trampa de aire, para evitarla entrada de aire al sistema y evitar que el mosto se oxide a vinagre y solo permita la salida de CO₂. La mezcla se deja fermentar en los birreactores de 3 y 5 días, a una temperatura de 30 °C. La fermentación se interrumpe cuando ya no hay producción de gas CO₂.

Filtrado: Se hace pasar la mezcla fermentada por una tela fina o colador con la finalidad de eliminar la mayor cantidad posible de sólidos en suspensión, previamente esterilizado.

Trasiego: Este paso consiste en separar los precipitados del vino con la finalidad que se clarifique rápidamente el producto. Este procedimiento se lo realiza cada tres días hasta que el producto quede clarificado.

Estandarizado: Es una etapa opcional que se hace agregando alcohol, en diferentes proporciones según la clase de vino que se requiera. Si es un vino generoso, el volumen de alcohol está entre el 6 al 10 %, pero si es una bebida espirituosa el contenido es de 30 a 50%. 30 A 50 %.

Envasado: Por lo general, se hace en botellas de vidrio. Los envases deben esterilizarse sumergiéndolos en agua caliente (95 °C) durante 10 minutos.

Sellado: El sellado puede hacerse manual o mecánicamente. Es frecuente que el tapón de la botella sea de corcho.

1.3.2. Características Organolépticas del Vino

La fase visual cobra cada vez más importancia en la calidad de los productos alimenticios debido a la actitud de preferencia de los consumidores. El vino no es ajeno a esta situación y su aspecto se hace más importante sobre todo a medida que el consumidor es más exigente y adquiere más conocimientos sobre el producto. Es evidente que factores como la limpidez (brillo, transparencia, etc.) y color, en su sentido más amplio, son las características visuales más importantes de los vinos, y todas ellas están estrechamente ligadas a los compuestos fenólicos, (GONZALEZ 2009).

La evaluación del vino comienza con el sentido de la vista, podemos tener una opinión general con solo mirarlo, pero hay que cumplir con unos cuantos requisitos referidos a conocimientos específicos, experiencias y medio ambiente. Los vinos nos presentan colores y matices que van desde un amarillo pálido hasta un rojo rubí intenso pasando por múltiples variantes y combinaciones. Los responsables principales son unas sustancias contenidas en los hollejos de

las diferentes uvas y en forma secundaria por las semillas, (a madera de las barricas, la irradiación de la luz solar en las botellas, las técnicas de la elaboración, la edad, la conservación, su salud, etc.). El color en los vinos blancos varía desde lo casi incoloro, algunos con variados matices desde el verdoso hasta un amarillo intenso. Los vinos pierden color y brillo con la edad. Por ello es posible determinar si se trata de tintos muy joven o añejo. La técnica indica observar la copa el vino desde el centro hacia los borde. Si mantiene el matiz uniforme es muy posible que sea un vino joven. Si en los bordes es más claro o con tonos marrones es casi seguro que se trata de un vino de cierta edad. (ARIANSEN, 2009).

1.3.2.1. Color

Las antocianinas son las responsables principales del color rojo en el vino. Las antocianinas se encuentran en diversas frutas cumpliendo una misión similar. Este compuesto químico se encuentra en la capa exterior de la piel de la uva y durante el proceso de maceración se extrae antes que los taninos. La mayoría de los mostos (incluso los de uvas negras) son incoloros, así que la maceración es un proceso importante en la coloración de los vino. El color rojo o rosado depende, por completo, de la forma en que se extrae las antocianinas de la piel de la uva durante el proceso de fermentación. (PASCAL, 2003).

1.3.2.2. Sabor y Aroma

Los principales componentes de sabor en la uva son los azúcares, los ácidos y los polifenoles. Estos tres compuestos proporcionan al vino tres de los cinco sabores básicos: dulce, ácido y amargo. De todas formas existe una gran cantidad de sustancias en las uvas que acaban proporcionando un sabor, estas sustancias se presentan en cantidades ínfimas. Todas estas sustancias dan a la uva un sabor característico denominado sabor primario. El sabor primario caracteriza a la variedad de la *Vitis vinífera*. La mayoría de los componentes de sabor se encuentran ubicados en la parte interior de la piel de la uva, es por esta razón por la que el prensado ocupa un proceso fundamental a la hora de proporcionar sabores primarios al vino.

En enología existe una distinción entre aroma y bouquet. El aroma es un olor específico proveniente de la variedad de empleada, mientras que el bouquet es un olor característico de la

forma de procesar el vino. De esta forma, por ejemplo, dos vinos de la misma uva poseen el mismo aroma, pero distinto bouquet (si se han madurado de forma distinta). (BRYCE, 2000).

1.3.2.3. Calidad del Vino

La calidad del vino es el conjunto de sus cualidades, es decir el de las propiedades que lo hacen aceptables o apetecible por el consumidor, quien no tiene en cuenta los datos analíticos sino las particularidades que halagan sus sentidos; por eso es que el problema de la calidad debe ser resuelto por métodos técnicos de elaboración y conservación, que buscan ante todo mantener y, si es posible, desarrollar sus propiedades. La calidad es, por ende el conjunto de caracteres gustativos agradable, directamente ligados a la composición química. (RIBEREAW, 1989).

Pero se sabe bien, por una parte, todo lo que hay de impreciso y subjetivo en la definición y la apreciación de esos caracteres gustativos, y por otra, lo difícil que resulta relacionar cualquiera de estos caracteres y su conjunto con la composición química del vino; a decir verdad, es imposible resolver totalmente el problema también sabemos que la noción de calidad es relativa, que el gusto del consumidor evoluciona profundamente en el curso de la historia, y que difiere de una región a otra. (RIBEREAW, 1989).

1.3.2.4. Defectos y Alteraciones del Vino

Los vinos pueden sufrir tres tipos de trastornos o alteraciones:

1. Accidentales (accidentes)
2. Trastornos biológicos (enfermedades)
3. Trastornos químicos (quebras)

Accidentes: Se llama así a ciertas alteraciones por su carácter accidental y porque también de forma accidental se altera el color, aroma, sabor, etc., de los vinos generalmente provocadas por descuido en la vigilancia y cuidado de los mismos (Falta de higiene en la bodega, falta de

ventilación, exceso de humedad, etc.), errores en el manejo de las maquinarias y muchos otros. (MIJARES, 2000).

Enfermedades: Son los trastornos producidos en los vinos por causas biológicas.

Son producidos por microorganismos generalmente fermentos o bacterias y se producen unas en presencia del aire (aeróbicas) y otras en ausencia del mismo (anaeróbicas). Estos fermentos atacan ciertos componentes del vino causando todo tipo de alteraciones en el olor sabor y tacto del vino y a veces en el aspecto (turbidez, color sonido, etc.). Son muchos los tipos de enfermedades y algunas difíciles de diagnosticar y mucho más de prevenir. Aclaremos que no debe confundirse el término enfermedad con el agente causal de enfermedades a los humanos.

Son enfermedades para el vino porque lo alteran y hacen desagradable, pero son absolutamente inocuos para la salud humana. Es importante que conozcamos las enfermedades más frecuentes y sobre todo su manifestación en el vino. Picadura acética o avinagramiento: Producida por una bacteria acética del genero Acetobacter muy abundante en las vendimias podridas.

Se detecta porque se forma una película traslucida en la superficie del vino. La bacteria provoca una rápida disminución del alcohol y del azúcar, produce ácido acético (el del vinagre) y acetato de etilo dándole al vino un desagradable sabor ha picado. Se puede evitar esta enfermedad manteniendo los vinos al abrigo del aire. El consumidor dice generalmente que el vino esta picado o avinagrado. Flores del vino: se llama a un fenómeno especial que forma una película en la superficie de los vinos jóvenes si están en contacto con el aire. Se evita manteniendo siempre los recipientes que contienen el vino, llenos hasta arriba, cosa que debe hacerse siempre. Vuelta: El vino que padece esta enfermedad se vuelve grasoso, con aroma y sabor muy agradable. Se enturbia y pierde su color. La enfermedad se produce por bacterias que atacan al acido tartárico del vino. Pierde parte de su acidez fija y le aumenta la acidez volátil.

Grasa o Ahilado: El vino se vuelve denso y viscoso (sordo, se altera el sonido) y fluye como si fuera aceite. Se produce disminución de azúcar y aumento de acidez. La produce una cocobacteria del genero Leuconostoc.

Amargor: se produce por fermentación láctica del glicerol por ataque bacteriano, dando lugar a una sustancia muy amarga llamada acroleína. Esta sustancia, al combinarse con los polifenoles del vino, le transfiere el sabor amargo.

Picadura Láctica: Descomposición del azúcar en ácido láctico y ácido acético.

Fermentación Manítica: Se da sobre todo en zonas calidas y generalmente durante la fermentación. Aumenta mucho la temperatura del depósito, eso hace que se mueran los fermentos útiles y sean sustituidos por bacterias que afectan el azúcar. El vino resultante es lechoso y tiene un raro sabor agridulce con fondos de cacahuates y moho. (MIJARES, 2000).

Quiebras: Se llaman así los trastornos de origen químico que se pueden producir en los vinos.

Son muy visibles para el consumidor, porque enturbian el vino y le produce esas precipitaciones en botella de diversos tipos (posos cristalinos, masas uniformes, etc.) a los que el consumidor siempre les llama: la química del vino. Sin entrar en estudio químico profundo, vamos a intentar, por la importancia que tienen, llegar al menos a conocerlas de la forma más clara. El nombre de quiebras es directa traducción del francés (casse) y se llaman así porque se quiebran el color y/o la limpidez, etc., o al menos se quiebra el equilibrio.

Precipitaciones Cristalinas: Hay un tipo de quiebras que lo producen y se ve, es una precipitación, generalmente en el fondo de la botella, de tipo pulverulento cristalino, blanca o de color rojo, según el tipo de vino. No tiene mayor importancia y, por supuesto esos cristalitos son totalmente naturales e inofensivos. (MIJARES, 2000).

Quiebra Férrica: Los mostos y los vinos tiene una gran capacidad de corrosión, que afecta a los metales que por cualquier causa se ponen en contacto con ellos (maquinas, pasteurizadores, depósitos, etc.). Cuando el contenido en hierro sobrepasa a ciertos límites, al combinarse con determinados constituyentes del vino puede provocar insolubilizaciones y enturbiamientos que alteran el color y la limpidez. El enturbiamiento se produce al contacto con el aire, cuando el oxígeno se disuelve con el vino. El hierro, bajo la acción del oxígeno da lugar a dos grupos de compuestos poco solubles, que precipitan con cierta facilidad,

quebrando la limpidez del vino, ocasionando las quiebras blancas, azules y negras, llamadas así por el color del precipitado.

La Quiebra Blanca: Es característica aunque no exclusiva, de los vinos blancos con poco contenido en polifenoles. Los vinos afectados se presentan opalescentes, y luego se enturbian con insolubilizaciones blanquecinas que, poco a poco, van descantando con formación de precipitado. La quiebra azul es producida por la insolubilización del hierro férrico con las materias colorantes produce depósitos negros que dan lugar a la quiebra negra.

Quiebra Cuprosa: Se da en vinos blancos embotellados y se debe a la presencia de exceso de cobre. El vino, conservado en depósitos, se embotella limpio y, al cabo de unos meses, principalmente en verano, empieza a presentar un enturbiamiento lechoso que se deposita lentamente. Este accidente desaparece cuando la botella se abre y el vino se airea. En este enturbiamiento intervienen diversos factores cierto contenido en cobre y en anhídrido sulfuroso libre, y la ausencia de oxígeno. Se ve favorecido por la luz solar la agitación y elevación de la temperatura. (MIJARES, 2000).

Quiebra Proteica: El vino contiene prótidos que, bajo la acción de distintos factores, se insolubilizan y producen enturbiamientos. La insolubilización de estos prótidos puede ser consecuencia de un aumento de la temperatura, de la adición de sustancias tánica o bien de la adición de ácidos minerales.

Quiebra Oxidasica: Los vinos cuando se ponen en contacto con el aire. Sufren un cambio de color que se manifiesta de distinta forma según se produzca en tintos o en blancos. En los vinos blancos, el color toma un tono amarillo-pardo. La estabilización se realiza mediante el empleo del anhídrido sulfuroso. En los vinos afectados por esta quiebra, el remedio más eficaz es su calentamiento, seguido de filtración y tratamiento con anhídrido sulfuroso. Después de todo lo que hemos explicado, se entenderá. (MIJARES, 2000).

- Que hay que seguir la evolución del vino y vigilarla
- Que no basta con conseguir que el vino este límpido hay que mantener esta limpidez.
- Que el vino, como todo ser vivo necesita cuidados y remedios aplicados con conocimientos y racionalidad.

1.3.3. Cromatografía líquida de alta eficacia

La Cromatografía líquida de alta eficacia o High performance liquid chromatography (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. También se la denomina a veces Cromatografía líquida de alta presión o High pressure liquid chromatography (HPLC), aunque esta terminología se considera antigua y está en desuso. El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

7.1.1. Principal En la HPLC isocrática el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos. Una mejora introducida a la técnica de HPLC descrita es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente. Un gradiente normal en una cromatografía de fase reversa puede empezar a un 5% de acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta un 50% en 25 minutos. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. En el ejemplo, utilizando un gradiente agua/acetonitrilo los compuestos más

hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo. A menudo, hace falta realizar una serie de pruebas previas por tal de optimizar el gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos.

1.4. ARAZA (*Eugenia stipitata*)

Es un árbol de 12-15 m de altura y follaje disperso. La floración y las ramas nuevas presentan abundante pubescentia, distribuida uniformemente, la cara inferior de las hojas presenta pelos duros de 0.5 mm de largo (McVaugh, 1958; Villachica et al., 1996).

La hoja es simple, entera, opuesta, subsésil y peninervada; la lámina es ovalada o elíptica, mide entre 3.5-9,5 cm de ancho y 8-18 cm de largo; el peciolo mide 3 mm de largo; la base es atenuada, obtusa o subcordada; el ápice es acuminado; las dos caras poseen glándulas; los 6-10 pares de nervaduras secundarias son evidentes en las dos caras. (McVaugh, 1958)

La floración es un pequeño racimo axilar, que contiene 1-10 flores pediceladas, pero sin flor terminal; la flor es diperiantada, heteroclamídea, hermafrodita y polistemone; el pedúnculo mide 10-20 mm de largo presentando dos bractéolas lineales de 1-2 mm de largo en la parte media o debajo; el disco es cuadrangular, piloso mide 4 mm de ancho; los sépalos son redondeados, mide 4-6 mm de ancho y 4-5 mm de largo; los pétalos son ovalados, blancos, miden 4 mm de ancho y 10 mm de largo; el número de estambres es de 100-150; el gineceo es tetracarpelar y sincárpico; el estilete es glabro de 7-8,5 mm de largo; el ovario es inferior, tetralocular, con 5-8 óvulos anatropos en cada lóculo, organizados en dos hileras verticales; la placentación es axial (McVaugh, 1956; 1958 Quevedo, 1995). El fruto es una baya esférica achatada que mide 3-5 cm de largo y 4-7 cm de diámetro, pesa entre 20-50g; el epicarpio es áspero y pubescente; la pulpa es poco aromática y ácida. Las semillas son numerosas (Pinedo et al., 1981; Villachica et al., 1996).

1.4.1. Composición de los Frutos

El fruto maduro de *Eugenia stipitata* subsp. Sororia ejerce gran atracción sobre el consumidor, debido al alto rendimiento en pulpa, y representa una fuente potencial de materia prima para la agroindustria. La pulpa constituye la parte carnosa y comestible del fruto. La relación entre pulpa y residuos (cascara y semillas), en peso, es una característica importante para la agroindustria, ya que una elevada relación pulpa/residuos implica un mayor rendimiento en el procesamiento agroindustrial, teniendo en cuenta la elaboración de productos provenientes del despulso del fruto.

Figura 1. Fruto de Arazá (*Eugenia stipitata*)



Fuente: Pinedo, 1982.

1.5. MICROORGANISMO UTILIZADO EN LA FERMENTACION ALCOHOLICA

1.5.1. Saccharomyces cerevisiae

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto que ha sido ampliamente estudiado dada su importancia en la industria pastelera y vitivinícola así como por su capacidad de producir etanol.

Este microorganismo muestra 5 fases de crecimiento bien definidas cuando es cultivado en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: la fase lag, la fase logarítmica, el

cambio diáuxico, la fase postdiáuxica y la fase estacionaria. La fase log es un periodo de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse. Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo del que se produce etanol. Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el cambio diáuxico, un periodo breve de tiempo en el cual no hay división, y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. En la fase postdiáuxica las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica e incrementan su resistencia al estrés gradualmente; en tanto que la fase estacionaria se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular (BELTZER JP, 1986).

1.5.1.1. Morfología

Hongo levaduriforme que presenta células alargadas a elipsoidales con gemaciones o blastoconidios multilaterales (de 3-10 x 4,5-1 μm). Ascosporas con hasta cuatro ascosporas esféricas o elipsoides y de pared lisa en su interior.

Las colonias en agar glucosado de Sabouraud son cremosas, blandas y glabras como las formadas por *Cándida* sp.

1.5.1.2. Clasificación Científica

Reino: Fungí

División: Ascomycota

Clase: Hemiascomycetes

Orden: Sacaromicetales

Familia: Saccharomycetaceae

Género: *Saccharomyces*

Especie: *S cerevisiae*

Nombre Binominal: *Saccharomyces cerevisiae*

1.5.1.3. Metabolismo

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* desarrolla dos tipos de metabolismo que son metabolismo oxidativo y metabolismo fermentativo. Pero solo produce etanol en condiciones de crecimiento anaerobio (fermentativo). Por consiguiente, y en general al preparar un cultivo industrial debemos saber (metabolismo oxidativo) en qué condiciones metabólicas se produce lo que nos interesa fabricar (metabolismo fermentativo), controlar la fermentación para que se produzca en esas condiciones deseados (Microbiología, s.f.).

2. METODOLOGÍA

2.1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN

La investigación se realizó en la provincia de El Oro, Cantón Machala, Universidad Técnica de Machala, Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud. Ubicada en la Avenida Panamericana Km 5.1/2 Vía Pasaje.

Con coordenadas:

Latitud: 3° 17 07 19''

Longitud: 79° 54 46.17

Figura 1: Fotografía de la Universidad Técnica de Machala



Fuente: Utmach, 2015.

2.1.1. Tipo de Investigación

El tipo de investigación desarrollada implicó dos etapas: la primera documental o bibliográfica, puesto que se requiere una revisión previa en tesis., proyectos de factibilidad, sitios en internet, experiencias en proyectos similares, entre otros; que permitió conocer distintas teorías o conceptualizaciones y criterios de diferentes autores sobre el tema investigado, de modo que sustentó y favoreció el desarrollo de la presente investigación.

En una segunda etapa se aplicó investigación experimental, de tal manera se alcanzó los objetivos de predicción y de control en relación con la hipótesis puesta en el estudio; por lo tanto la investigación requirió el uso de laboratorios para efectuar dicha propuesta, ya que en efecto se debió analizar las causas y efectos de las variables de estudio. (Montgomery, 1996)

2.1.2. Diseño de Experimental de la Investigación

El diseño de la investigación fue carácter descriptivo (describe situaciones porque observamos y definimos el tratamiento que resulte estadísticamente significativo en la obtención de vino a partir de arazá (*Eugenia stipitata*), de manera experimental. Se realizó (27) veintisiete fermentaciones, correspondientes a un diseño experimental al azar, resultantes de considerar dos factores [(relación agua/fruta y concentración del inocuo) y tres niveles para cada factor].

El modelo estadístico es un experimento factorial 3*3 completamente al azar en condiciones de temperatura ambiente de la ciudad de Machala (28-30 °C), en donde por cada factor se multiplica por tres niveles evaluados dando así un total de 9 tratamientos. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones dando un total de veintisiete. Fermentaciones, como se detalla en la Tabla1.

Tabla 1: Combinación factorial del experimento

Relación fruta/agua (Factor A)	Concentración de Enzima g/l (Factor B)		
	[E]1= 1 g/L	[E]2= 1,5 g/L	[E]3= 2g/L
S1= 1:1	R1I1	R1I2	R1I3
S2= 2:1	R2I1	R2I2	R2I3
S3= 3:1	R3I1	R3I2	R3I3

*Se aplicó 3 g/L de *Saccharomyces cereviceae* en todas las fermentaciones

Fuente: Gadway, 2015.

Factor A = Concentración de enzima (Papaína)

Factor B = Concentración de enzima (g/L)

$R_n [E]_n$ = Unidades de Color

Descripción de los factores

S1 = Concentración de levadura 1 g/L

S2= Concentración de levadura 2 g/L

S3= Concentración de levadura 3 g/L

[E]1 = Concentración de enzima 1 g/L

[E]2 = Concentración de enzimas 1,5 g/L

[E]3 = Concentración de enzimas 2 g/L

2.1.3. Proceso de Elaboración del Vino de Arazá (*Eugenia stipitata*)

La elaboración del vino fue un proceso complejo que consto de varias etapas. Luego de cosechar la fruta, y hasta antes de clarificado, el proceso duro 72 horas como mínimo. Luego del embotellado es conveniente dejar que el vino se añeje el mayor tiempo posible.

2.1.3.1. Preparación del Mosto

Selección

Las carambolas se cosecharon luego de cuatro meses y una semana, para que contengan la máxima cantidad de azúcares. Las frutas seleccionadas fueron sanas sin hongos ni picaduras, para que el vino no se malogre.

Pesado

Se realizó esta operación para determinar el rendimiento de la fruta y realizar la respectiva formulación dilución de la pulpa.

Pulpeado

Se realizó la extracción del líquido azucarado y otras sustancias contenidas en las carambolas, y se eliminaron semillas.

Corrección del Mosto

La corrección del mosto se la realiza con la adición de azúcar blanca, ya que la investigación consistió en variar la proporción del agua fruta (p/p). La fórmula empleada es la siguiente:

Formula de ajuste de °Brix en los mostos que fueron fermentados:

$$\text{Cantidad de azúcar} = \frac{\text{Pulpa diluida } (^{\circ}\text{Brix final} - \text{Brix inicial})}{100 - ^{\circ}\text{Brix final}}$$

Ventajas de la corrección del mosto al inicio de la fermentación:

Se obtuvo un vino con suficiente grado alcohólico, con lo que se redujo el riesgo que se avinagre.

Fermentación Alcohólica

En la fermentación que duró 72 horas el mosto se enturbio, se calentó y sus azúcares se transformaron en etanol y CO₂. En esta etapa se le realizó la adición de levadura de cerveza liofilizada de la marca comercial LEVAPAN (*Saccharomyces cerevisiae*), como agentes fermentadores, la fermentación se acelera, es más limpia y proporciona bouques más puros. Además se formó la máxima cantidad de alcohol y se generaron agradables fragancias, durante esta etapa se controló la disminución de los azúcares y el incremento de los grados alcohólicos.

Acondicionamiento del vino

Este proceso se lo realizó cuando los °Brix del mosto llegaron a cero lo cual nos garantizó una buena conservación del vino.

Transcurridas las 72 horas de la fermentación se procede al descube, que consistió en separar el vino de los residuos de levadura y sólidos precipitados en el fondo del fermentador utilizando un colador, para luego complementar la filtración con tela. (Lienzo estéril).

El control del proceso de la fermentación de mosto se lo realizó midiendo la concentración de sólidos solubles al inicio de la fermentación para saber con cuántos °Brix se parte, y cada 12 horas se midió los °Brix del mosto (ver anexo 5) y los °G.L, durante 72 horas que duró la fermentación alcohólica. Las muestras tomadas fueron inmediatamente centrifugadas, y el líquido sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de sólidos solubles y evidenciar que la fermentación se lleve a cabo. La fermentación se la realizó a temperatura

ambiente (22-30 °C), para lo cual se realizara el control de los °Brix del mosto y el incremento de los grados de Alcohol del mismo.

Trasiego

El vino formo un depósito en el fondo del recipiente llamado localmente “almidón” que por ser más pesado se acumuló en el fondo.

Por eso es conveniente separar estos residuos haciendo los trasiegos a su respectivo tiempo con algodón estéril, se evitó en lo posible el contacto con el aire en el primer trasiego.

Envasado

El envasado se lo realizo en botellas de vidrio de 1000 mililitros de capacidad previamente esterilizadas, dejando un 10% de su volumen como espacio de cabeza, para el sellado se utilizó corcho de madera el cual permitió la salida del gas carbónico y que no se ingrese oxígeno al vino.

Maduración

El vino clarificado se deja en reposo, para que se desarrollen aromas y sabores especiales. El tiempo de maduración recomendable es de 3 a 4 meses. Durante este proceso se llevara a cabo análisis de °Brix, pH, Acidez Total y extracto seco cada 15 días durante el periodo a que dure esta etapa de maduración.

2.2. METODOS ANALITICOS UTILIZADOS EN LA CARACTERIZACION DE LA MATERIA PRIMA Y EN EL CONTROL DE CALIDAD DEL VINO DE ARAZA *(Eugenia stipitata)*

2.2.1. Análisis bromatológico

Las determinaciones que se realiza más frecuentemente para conocer la composición de los alimentos incluyen la determinación de humedad, cenizas, fibra cruda, acidez, pH y carbohidratos como azúcares reductores.

2.2.1.1. Humedad. Método por secado de estufa

Para esta prueba de 5 a 10 gr de muestra en capsula previamente a peso constante; la capsula se coloca en la estufa de aire por 2 horas a 110 °C. Transcurrido este tiempo es transferida al desecador, se deja enfriar a temperatura ambiente y se pesa (A.O.S.C, Oficial Methods of Analysis Chemists, 1990). Este procedimiento se realiza por triplicado.

La determinación de humedad se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P - P1}{P2} * 100$$

Dónde:

P= Peso del recipiente con la muestra húmeda, en gramos.

P1=Peso del recipiente con la muestra seca, en gramos

P2=Peso de la muestra, en gramos

2.2.1.2. Sólidos Totales

Se pesaron de 5 a 10 g de muestra en una cápsula de porcelana, puesta previamente a peso constante, posteriormente se introduce en una estufa de aire a una temperatura de 110 °C por 2 h. Transcurrido este tiempo se transfiere al desecador, dejándose enfriar a temperatura

ambiente para registrar su peso en balanza analítica (A.O.A.C., Official Methods of Analysis Chemists., 1990)

$$\% \text{ Sólidos Totales} = 100 - \text{humedad}$$

2.2.1.3. Sólidos Solubles Totales

Se expresaron con °Brix, esta determinación se realizó con un refractómetro de mano marca ATAGO a 25 °C. Se colocó una gota de jugo de carambola en el refractómetro previa calibración del equipo con agua destilada, posteriormente se midieron los °Brix.

2.2.1.4. Cenizas .Método de Cenizas Totales

Para esta determinación se utiliza un crisol tarado, a peso constante, donde se colocan 3 g de muestra, a continuación empleando un mechero la muestra se calcina, enseguida se pasa a la mufla por 2 horas a 500 °C (ver anexo 11), una vez concluido el tiempo, se pasa al desecador para que enfríe y cuando está a temperatura ambiente se pesa (A.O.A.C., Official Methods of Analysis Chemists., 1990).

Cálculos:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{P1 - P2}{P} * 100$$

Dónde:

P = Peso de la muestra, en gramos

P1=Peso del crisol más la muestra, en gramos.

P2= Peso del crisol más cenizas, en gramos.

2.2.1.5. Acidez Total

Para esta determinación se utilizaron 10 ml de jugo se transfieren a un matraz y se aforan a 100 ml, empleando agua destilada hervida y fría. Por otro lado en un matraz Erlenmeyer se

toma unas 30 alícuota de 25 ml, que se tituló con hidróxido de sodio 0.1 N; usando como indicador 3 gotas de fenolftaleína.

$$\% \text{ Acidez} = \frac{\text{ml de solución} (\text{m.e. del ácido}) (\text{N de NaOH}) * 100}{\text{Muestra}}$$

Muestra

m.e. ácido cítrico = 0.064

m.e. ácido málico = 0.067

m.e. ácido tartárico = 0.075

2.2.1.6. pH

Para la medición de pH se utilizó un potenciómetro digital (HACH), previa calibración del potenciómetro, se enjuagó el electrodo con agua destilada y se secó cuidadosamente, posteriormente el electrodo se introdujo en la muestra y se leyó el pH.

2.2.1.7. Determinación de Azúcares Reductores

La determinación de azúcares reductores totales (glucosa) fue llevada a cabo mediante el método de ácido 3,5- dinitrosalicílico por espectrofotometría UV visible con glucosa como estándar (ver anexo 10), el cual se basa en la reducción del ácido 3-5 dinitrosalicílico a 2 amino 5 nitro salicílico por la acción de azúcares reductores (ácido galacturónico) el cual forma un color naranja de una intensidad proporcional a los grupos reductores que reacciona y que presenta una máxima absorción a una longitud de onda de 540 nm.

Para la cuantificación de los azúcares reductores se realizó una curva de calibración con glucosa grado analítico, calculándose la recta de mejor ajuste por el método de los cuadrados cuya ecuación es $y = 5,391x - 0,039$; y el coeficiente de correlación de $R^2 = 0,997$. (Miller, 1986).

2.2.1.8. Determinación de Etanol

Las concentraciones de etanol en el fermentado del hidrolizado se analizaron utilizando el Cromatógrafo de gases FULI 9790 II, patrones etanol con tiempo de retención de 1,300 min respectivamente, utilizando una columna FULI Carbohydrates Ca, con agua como eluyente, temperatura de 90 °C, volumen de muestra de 10 µl, flujo de 0,5 ml / min, presión en la columna de 1.070 +10 psi y sistema de detección de índice de refracción (A.O.A.C).

2.2.MATERIALES

2.2.1. Recursos Empleados

La presente investigación empleo recursos humanos y físicos, los que a continuación se detalla.

2.2.2. Recursos Físicos

2.2.2.1. Materiales de Laboratorio Análisis.

- Cromatógrafo de gases FULI 9790 II
- Espectrofotómetro UV visible marca HACH, modelo DR3900
- Multiparametro (pH/ISE/CONDUCTIVIDAD/DO) TIPO ORION STAR A 329 digital.
- Cubetas o blísteres
- Una estufa marca Boeco, determinación de humedad.
- Refractómetro, determinación de grados °Brix.
- Alcoholímetro, determinación de los grados alcohólicos.
- Vasos de precipitado de 250ml de capacidad
- Balanza analítica marca Zhimadzu
- Basculas de 100 kilogramos de capacidad
- Agitador magnético

2.2.2.2. Materiales de Procesamiento.

- Despulpador
- Tamices
- Fermentador
- Tanques de almacenamiento

- Mangueras para trasiego
- Papel filtro Whatman # 40

2.2.2.3. Sustancias y reactivos

- Levadura
- Azúcar (blanca)
- Reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico)
- Glucosa en polvo (C₆H₁₂O₆)
- Agua purificada
- Meta bisulfito de sodio
- Sorbato de potasio
- Ácido ascórbico

2.2.2.4. Varios

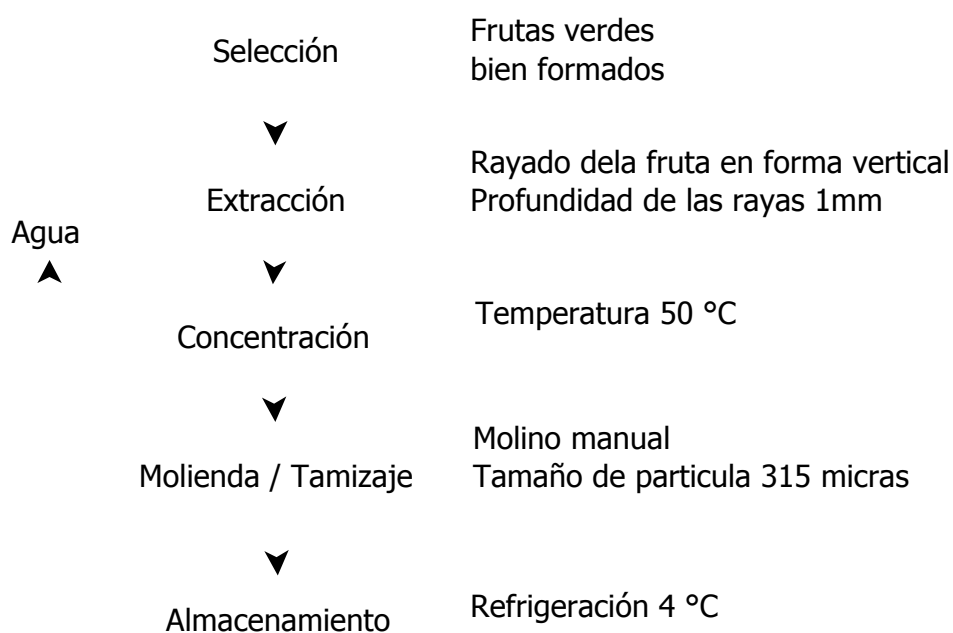
- Hojas de papel bond
- Computador
- Software estadístico SPSS, Origin 50 y Statgraphics
- Impresora
- Bolígrafos

3. RESULTADOS

3.1. OBTENCIÓN DE LA ENZIMA PAPAÍNA PARA SU APLICACIÓN EN EL VINO DE ARAZÁ COMO AGENTE CLARIFICANTE

La obtención de la enzima papaína se la realizó mediante la extracción desde los frutos de papaya completamente verdes y desarrollados, sin ser desprendidos de la planta y mediante procesos físicos se realizó su purificación, tal como se describe a continuación en la figura 2.

Figura 2. Diagrama de flujo de la obtención y purificación de la enzima



Fuente: Gadvay, 2015.

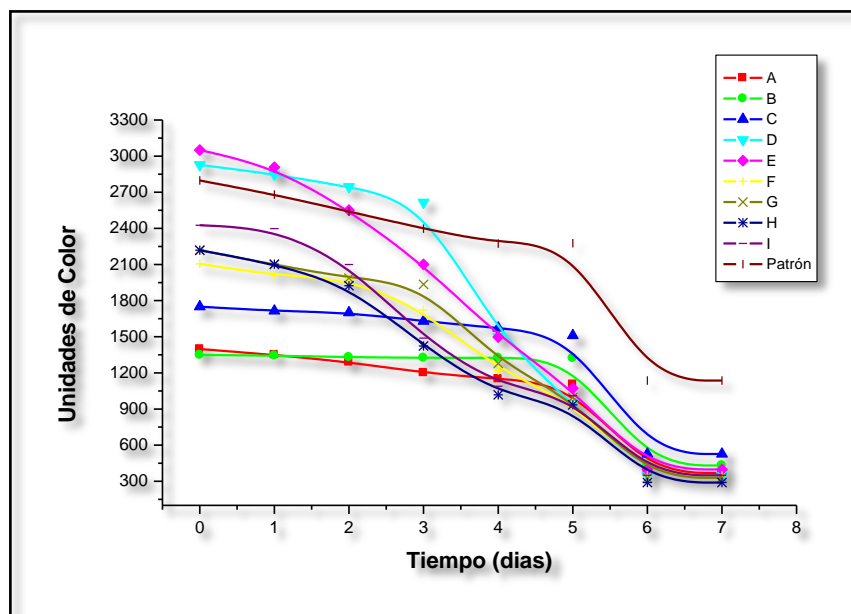
Como se puede apreciar en la figura 2, el proceso físico de obtención de la enzima papaína consiste en 5 etapas, la primera etapa consiste en seleccionar la planta de papaya que tenga los frutos completamente verdes y bien formados, la segunda etapa es la extracción del látex el cual contiene el metabolito de interés (papaína), en la tercera etapa se reduce el contenido de agua hasta un 10 % , una vez seco el látex se realiza la pulverización mediante molienda y

posterior tamizado para obtener partículas homogéneas y la última etapa es la refrigeración hasta el momento del uso de la enzima.

3.2. ACCIÓN CLARIFICANTE DE LA PAPAÍNA EN EL VINO DE ARAZÁ

La clarificación del vino de arazá consistió en la adición de la enzima papaína como clarificante, seguida de una constante agitación del vino para realizar una buena homogenización. Se midió inicialmente las unidades de color del vino para determinar el efecto clarificante de la enzima adicionada. A continuación en la figura 3 se muestra la disminución de las unidades de color durante los siete días de clarificación del vino de arazá.

Figura 3. Disminución de las unidades de color durante la clarificación del vino

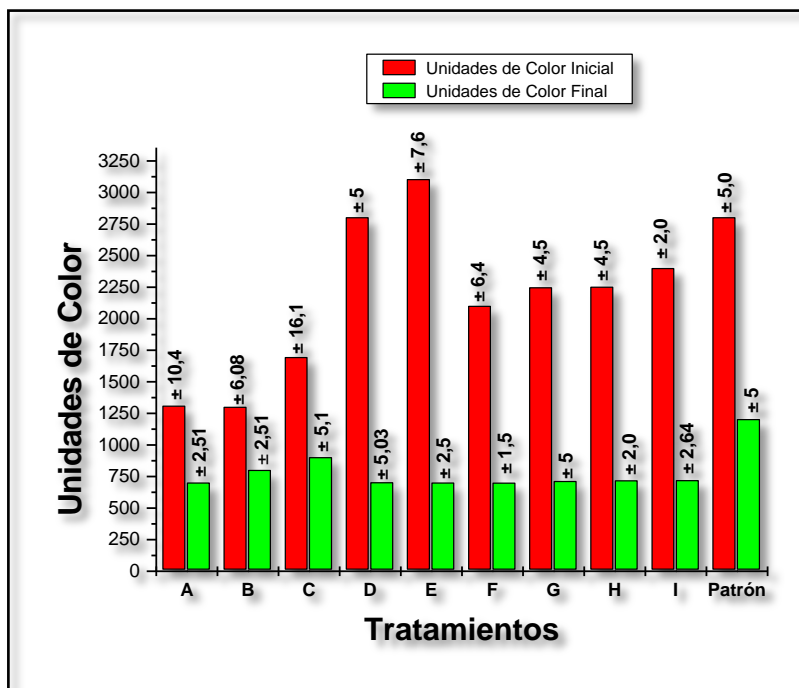


Fuente: Gadway, 2015.

Como se puede ver en la figura 3 disminuye las unidades de color en todos los tratamientos inclusive en el patrón, en el tratamiento E (2 partes de fruta: 1 parte de agua y 1,5 g/L de enzima) se consigue reducir la mayor cantidad de unidades de color del vino (2404), lo cual nos indica que a mayor concentración de enzima, mayor sólidos en suspensión hidrolizados. A continuación en la figura 4 se muestra los valores iniciales y

finales de las unidades de color en los 9 tratamientos estudiados e inclusive la muestra patrón.

Figura 4. Unidades de color final e inicial del experimento



Fuente: Gadway, 2015.

Como se puede apreciar en la figura 4 en todos los tratamientos e inclusive en la muestra patrón se reducen las unidades de color durante los 7 días de clarificación del vino.

3.2.1. Análisis Estadístico de la acción Clarificante de la Enzima

El análisis de varianza se lo realizo con la finalidad de determinar si existe influencia en la adición de enzimas proteolíticas para la remoción de sólidos en suspensión en el vino de arazá. A continuación en la tabla 2 se muestra el análisis de varianza de los 9 tratamientos estudiados.

Tabla 2. Análisis de varianza de los 9 tratamientos estudiados

Fuente	Media	Varianza	N
A = 1 fruta:1agua; 1 g/L Enzima	46,43	0,06	3
B = 1 fruta:1agua; 1,5 g/L Enzima	38,42	0,02	3
C = 1 fruta:1agua; 2 g/L Enzima	46,72	0,18	3
D = 2 fruta:1agua; 1g/L Enzima	74,85	0,02	3
E = 2 fruta:1agua; 1,5 g/L Enzima	77,38	0,00	3
F = 2 fruta:1agua; 2 g/L Enzima	66,63	0,01	3
G = 3 fruta:1agua; 1g/L Enzima	68,22	0,07	3
H = 3 fruta:1agua; 1,5 g/L Enzima	68,03	0,02	3
I = 3 fruta:1agua; 2 g/L Enzima	69,95	0,01	3
Patrón = 2 fruta:1agua	57,04	0,01	3
F = 13989,16			
$p = 0$			

Fuente: Gadvay, 2015.

Como nos indica la tabla 2 si existe diferencia significativa entre los 9 tratamientos estudiados, el tratamiento E, alcanza en 77,38 % el más alto porcentaje de remoción de unidades de color en el vino de arazá, El tratamiento A y C alcanzan valores estadísticamente iguales dentro de los tratamientos donde la relación fruta: agua es 1:1 y el tratamiento G y H, también alcanzan valores estadísticamente igual en las formulaciones con relación fruta: agua es 3:1.

3.2.1.1. Prueba de Tukey

La prueba de Tukey o comparación múltiple se la realizo para determinar que tratamientos en los que existe diferencia significativa y aquellos que son iguales estadísticamente. A continuación en la tabla 3 se muestran los resultados dela prueba de Tukey.

Tabla 3. Prueba de Tukey

Contraste	Diferencia	±Limites
Patrón -TA	*10,6078	0,56
Patrón -TB	*18,6122	0,56
Patrón -TC	*10,3178	0,56
Patrón -TD	*-17,8186	0,56
Patrón -TE	*-20,346	0,56
Patrón -TF	*-9,59355	0,56
Patrón -TG	*-11,1813	0,56
Patrón -TH	*-10,9911	0,56
Patrón -T I	*-12,9099	0,56

*Diferencia significativa

Fuente: Gadvay, 2015.

Como nos indica la tabla 3 todos los 9 tratamientos estudiados difieren de la muestra patrón, es decir si influye la adición de enzima (papaína) en el proceso de clarificación del vino de arazá.

3.2.1.2. Prueba de Hipótesis

Tamaño de la muestra = 30

95,0 % de confianza

Hipótesis nula: media = 0,5

Alternativa: no es igual

Computarizada estadístico Chi-cuadrado = 116,0

P-valor = 0,0104376

Rechazar la hipótesis nula para alfa = 0,05.

Las dos hipótesis a ensayar son:

Hipótesis nula: $\mu = 0,5$

Hipótesis alternativa: $\mu \neq 0,5$

Dada una muestra de 30 observaciones, con una desviación estándar de 1,0, el estadístico Chi-cuadrado calculado es igual a 116. Al ser el valor de p para la prueba es inferior a 0,05, la hipótesis nula es rechazada al nivel de confianza 95,0%. En conclusión se acepta la hipótesis alternativa.

3.3. CARACTERIZACIÓN CROMATOGRAFÍA DEL VINO DE ARAZÁ OBTENIDO.

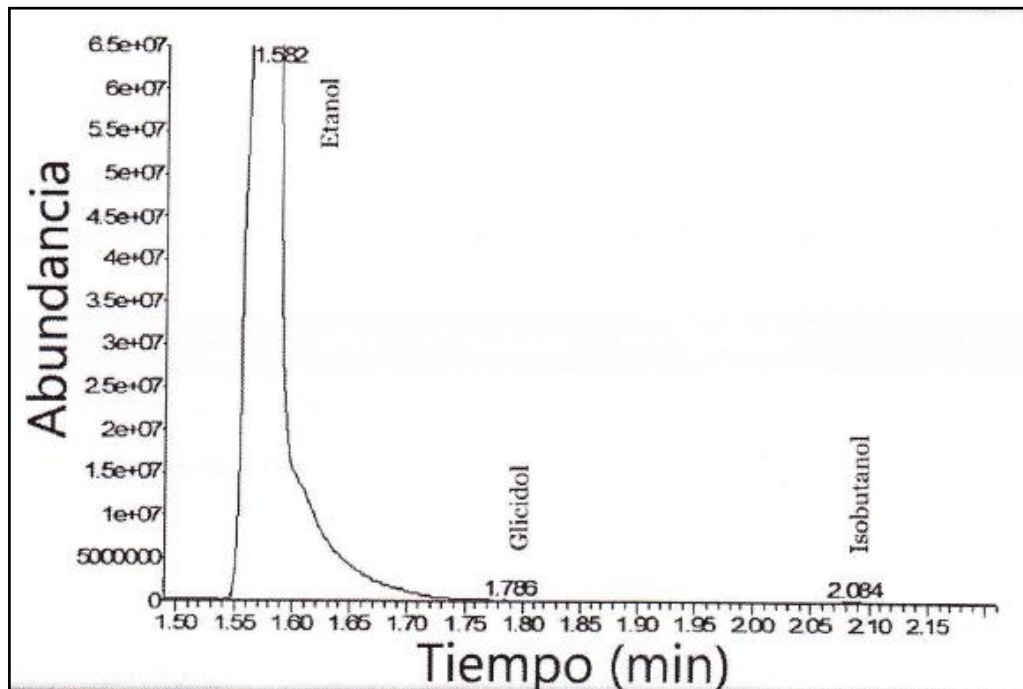
Este procedimiento se lo realizo para determinar si existe la presencia que compuestos tóxicos en el vino, tales como el metanol. A continuación en la tabla 4 se presentan los compuestos identificados de la muestra analizada mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.

Tabla 4. Compuestos identificados en el vino de arazá

Tiempo de retención (min)	Compuesto	%
1,582	Etanol	8
1,786	Glicerol	0,21
2,082	Isobutanol	0,01

Fuente: CIBE-ESPOL, 2015.

Figura 5. Cromatograma del vino de arazá obtenido



Fuente: CIBE-ESPOL, 2015.

Como se puede apreciar en la figura 5, el componente mayoritario, presente en el vino de arazá es el etanol en una concentración del 8 % v/v, mientras que el glicerol 0,21 % y el isobutanol en un 0,01%, lo cual demuestra que en el vino de arazá utilizando enzimas para su clarificación nos e han formado metanol que le dé la condición de no apto para el consumo humano.

4. CONCLUSIONES

- La obtención y purificación de la enzima involucro un proceso físico el consistió en 5 etapas, la primera etapa consiste en seleccionar la planta de papaya que tenga los frutos completamente verdes y bien formados, la segunda etapa es la extracción del látex el cual contiene el metabolito de interés (papaína), en la tercera etapa se reduce el contenido de agua hasta un 10 % , una vez seco el látex se realiza la pulverización mediante molienda y posterior tamizado para obtener partículas homogéneas y la última etapa es la refrigeración hasta el momento del uso de la enzima.
- Al adicionar enzima papaína en el vino de arazá se pudo observar la disminución de las unidades de color durante siete días que duro el proceso de clarificado, en el tratamiento E (2 partes de fruta: 1 parte de agua y 1,5 g/L de enzima) se consigue reducir la mayor cantidad de unidades de color del vino, la cual disminuyo desde 3106 a 702,6, mediante el análisis de varianza se pudo determinar que si existió diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los 9 tratamientos estudiados, la prueba de Tukey determino que todos los tratamientos difieren del patrón, por lo cual se concluye que si existe influencia en la adición de enzima para la clarificación del vino, a mayor concentración de enzima, mayor sólidos en suspensión hidrolizados.
- Mediante cromatografía de gases acoplado amasas se pudo determinar que el componente mayoritario, presente en el vino de arazá es el etanol en una concentración del 8 % v/v, mientras que el glicerol 0,21 % y el isobutanol en un 0,01 %, lo cual demuestra que en el vino de arazá utilizando enzima papaína para su clarificación, es apto para el consumo humano ya que no existe la presencia de metanol.

5. RECOMENDACIONES

Se recomienda extraer el látex de papaya en la horas de la mañana específicamente de 5 a 9 am, a esta hora se logra obtener la mayor cantidad de látex ya que al salir el sol la planta se deshidrata y no es posible obtener el metabolito de interés.

Realizar el rayado de las papayas verdes y bien formadas a una profundidad de 1 mm a profundidades mayores se obtiene látex con mayor concentración de agua que sale de la pulpa de la fruta.

Antes de adicionar la enzima pulverizada en el mosto, mezclarla con azúcar, para facilitar su solubilidad y mejor distribución dentro del fermentador.

6. BIBLIOGRAFIA

1. A.O.A.C. (1990). Official Methods of Analysis Chemists.319
2. A.O.A.C. (s.f.). Método por cromatografía de gases, usando estándar interno. En O.METHOD (984.14), Alcohol en vinos.
3. Ariansen, E. (2009). Enología Práctica: Conocimiento y elaboración de 11 vino. Mundi-PRENSA.
4. Beltzer JP, C. L. (15 DE APR DE 1986). Structure of yeast LEU4. The 5 flanking region contains features that predict two modes of control and two productive translation starts.J BIOL Chem, 5160-5167.
5. Bryce, R. (2000). Manual Práctico de Enología. Zaragoza: Acribia.
6. Centro Regional para la Competitividad Empresarial (2008). Estudio de Mercado de la Papaya.
7. Colquichagua, D. & Franco, E. (1998). Vino de Frutas. Intermediate Technology Development Group, 32.
8. Deaconess., B.I. (2009). Enzimas Proteolíticas. Medical Center.
9. Icontec. (1999). Frutas Frescas: Uchuva. Especificaciones. En Normas técnicas colombianas NNT 4580. Colombia.
10. Konemann, V., & Bonner, S. (1999). Guía Completa de Alimentos. Alemania: Pags.129
11. Lee, S. (1995). International SURVEY ON dietary Fiber. Ena.R. Analysis.
12. Microbiologia, I. (s.f.).www.unavarra.es/genmic/micind-2-2-htm.
13. Mijares, M. I. (2000). Vino de la cepa a la copal. Barcelona-España: Mundi-Prensa.

14. Miller, P.y. (1986). Chnages in equine metabolic due to exercise fatigue, AM.J.VET.RES.7.
15. Monografias.com. (2009). Biotecnología. Biotec.
16. Montgomery, D. (1996). Probalidad y estadística aplicadas a la ingeniería. Mc Graw-Hill.
17. Pascal, D.-B.D.-L.-R.-G. (20039. Tratado de Enología: Tomo 1. Microbiología el Vino- Vinificaciones II. Buenos Aires: Hemisferio Sur.
18. Ribereaw, J. (1989). Tratado de Enología: Ciencias y Técnicas del vino. Buenos Aires- Argentina: Hemisferio Sur.
19. Vogt, C. (1985). El Vino Obtención, Elaboración y análisis.
20. Wales, J. (2009).El Vino. Wikipedia.

ANEXOS

Anexo 1: Obtención de látex de papaya para la purificación de la papaína



Anexo 2: Recolección del látex



Anexo 3: Recolección de los frutos de arazá



Anexo 4: Selección de los frutos de arazá



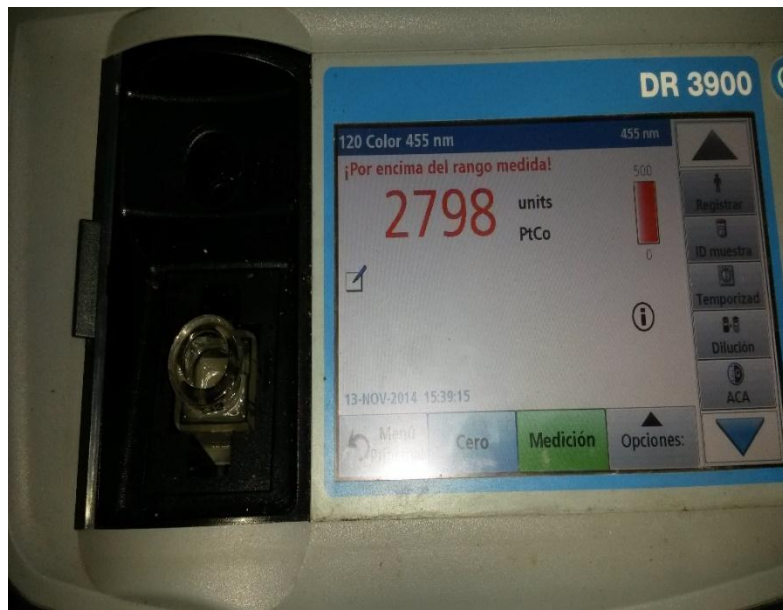
Anexo 5: Montaje de los fermentadores



Anexo 6: Medición de los °Brix del mosto



Anexo 7: Medición de las unidades de color del vino



Anexo 8: Determinación de etanol mediante cromatografía de gases acoplado a masas (1)



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOTECNOLÓGICAS DEL ECUADOR

INFORME FINAL

Guayaquil, 23 de Marzo de 2015

1. Condiciones de análisis

En la Tabla 1 se detallan las condiciones existentes en el laboratorio durante el desarrollo del análisis.

Temperatura (°C)	21.9
Humedad (%)	52.7

2. Resultados

2.1 Perfil Cromatográfico

La asignación de las estructuras se efectuó por comparación de los espectros de masas de los compuestos con los de las bibliotecas del equipo (Willey novena edición y NIST 2011), seleccionando aquellos con más del 90 % de significancia. En la tabla 2 se presentan los compuestos identificados de la muestra analizada mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.

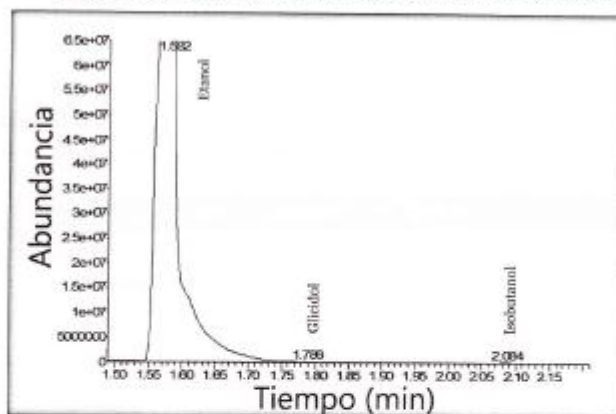
Tiempo de retención (min)	Compuesto
1,582	Etanol
1,786	Glicidol
2,082	Isobutanol

En la figura 1 se presenta el cromatograma de la muestra B016-14, donde se observan los picos referentes a los alcoholes.

Anexo 9: Determinación de etanol mediante cromatografía de gases acoplado a masas (2)



Figura 1. Cromatograma analítico gaseoso de la muestra B016-14



3. Observaciones

- Los resultados emitidos en este informe, corresponden únicamente a la muestra recibida por el laboratorio.
- Este reporte no debe ser reproducido parcial o totalmente, excepto con la aprobación escrita por parte del laboratorio.

Atentamente,


Patricia Manzano Santana, Ph.D.

Jefe de Investigación
Laboratorio de Bioproductos
CIBE - ESPOL



ESPOL-CIBE

Visto