

1-1-2016

Evaluación de la licuefacción e hidrólisis enzimática como tratamientos para incrementar el rendimiento alcohólico en la fermentación de chontaduro (*Bactris gasipaes*)

Deisy Alexandra García Barrero
Universidad de La Salle, Bogotá

Jenny Marcela Valderrama Quiroga
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos

Citación recomendada

García Barrero, D. A., & Valderrama Quiroga, J. M. (2016). Evaluación de la licuefacción e hidrólisis enzimática como tratamientos para incrementar el rendimiento alcohólico en la fermentación de chontaduro (*Bactris gasipaes*). Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/68

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Facultad de Ingeniería at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Ingeniería de Alimentos by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

Universidad de La Salle
Facultad de ingeniería
Programa de ingeniería de alimentos

**Evaluación de la licuefacción e hidrólisis enzimática como
tratamientos para incrementar el rendimiento alcohólico en la
fermentación de chontaduro (*Bactris gasipaes*)**

Autoras: Deisy Alexandra García Barrero
Jenny Marcela Valderrama Quiroga

Dirigido por: Ing. Ángela María Otálvaro Álvarez

Bogotá D.C

2016

Dedicamos este proyecto a nuestras familias y amigos quienes han estado junto a nosotras en todo momento, con su apoyo, comprensión y disposición de escucha cuando fue necesario. También a todos quienes estuvieron prestos a colaborarnos en el proceso de experimentación y redacción del proyecto.

AGRADECIMIENTOS

“Cuánto más se eleva un hombre, más pequeño les parece a los que no saben volar” Friedrich Nietzsche

Agradezco a mis padres Paula y Antonio, por su amor, confianza, ternura, sabiduría, apoyo y guía en cada momento de mi vida. Ellos me ayudaron a creer en mí y a entender que desfallecer no es una opción por más dura que parezca la prueba, a despertar siempre con la mejor energía, a sortear cada momento de mi vida.

A mis hermanos Andrea y Rodrigo, por sus consejos, amor, lecciones y guía que durante estos años fueron esenciales para continuar en este camino.

A mis sobrinos Emiliano, Silvana, Natalia y Antonio, quienes con su amor y ternura, le dieron a mi vida un nuevo sentido, una nueva razón para sonreír y seguir luchando por alcanzar cada uno de mis sueños, son lo más lindo que pudo llegar a mi mundo, los amo.

A mi maravillosa compañera de tesis Marcela quien confió en mí, en este proyecto y que con paciencia dio lo mejor para que saliera adelante, pues a pesar de los percances que se nos presentaron, siempre mostró su entrega y compromiso.

A la Ingeniera Ángela Otálvaro, quién acepto guiarnos durante este proceso, dándonos su apoyo incondicional.

A mi familia en especial a mi tía Nieves y a Julio, que desde pequeña me han cuidado como a otra hija y han estado siempre presentes apoyándome durante estos años con mucho amor.

A mis primos en especial a Melissa, por su apoyo durante cada uno de estos años, sus consejos, su cariño me ayudaron cuando más lo necesitaba.

A mis amigos en especial a Ivonne, Leandro y María Alejandra, por estar a mi lado en cada reto y dificultad que se presentó en el camino, dándome sus voces de aliento.

Finalmente gracias a Dios y esas personas amadas que ya están en el cielo, porque nos dieron la paciencia, la energía y el entendimiento para saber sortear cada imprevisto y así lograr culminar esta etapa.

DEISY ALEXANDRA GARCÍA BARRERO

“La mente que se abre a una nueva idea nunca vuelve a su tamaño original.”

Albert Einstein

Al finalizar un trabajo extenso y con algunas dificultades, es inevitable no dimensionar que hubiese sido de esto, sin la participación y apoyo de personas e instituciones que permitieron la feliz culminación de nuestra tesis de grado. Por tal motivo es un placer mencionarlas y exaltarlas brevemente en este espacio.

Comienzo por la Ingeniera Ángela Otálvaro, quien aceptó dirigir, orientar y participar en nuestra idea de tesis de pregrado.

A mí querida compañera de trabajo Alexandra García, quien compartió conmigo durante este proceso y me recalcó el valor de la paciencia en los momentos que fueron realmente necesarios.

A mis padres Esperanza Quiroga y Jorge Valderrama, por el apoyo y llamados de atención desde el día en que emprendí la carrera, que hoy hacen de mí una persona capaz y responsable.

A Carlos Rodríguez, por el aliento y ánimo que a diario me dio para terminar de manera exitosa cada etapa de este proyecto.

A mi amigo Iván Naranjo por su ayuda, apoyo y compañía durante todo el proceso de experimentación.

A PROENZIMAS S.A. en Cali, por facilitarnos las principales herramientas de trabajo para la elaboración del proyecto.

Por último, pero no menos importante a Dios, porque nos dio la sabiduría espiritual para llevar con calma y responsabilidad lo planteado desde un principio, y permitió a cada una de las personas que ya nombre estar ahí como pilares para el desarrollo de este proyecto

JENNY MARCELA VALDERRAMA QUIROGA

RESUMEN

El chontaduro (*Bactris gasipaes*) perteneciente a la familia de las Palmáceas, se caracteriza por tener propiedades nutricionales, al ser buena fuente de proteínas, aceites, vitaminas liposolubles y minerales indispensables. Sin embargo, son pocos los productos y los procesos desarrollados para su industrialización. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la licuefacción y la hidrólisis enzimática para incrementar el rendimiento alcohólico en la fermentación de harina de chontaduro (*Bactris gasipaes*) con *Saccharomyces cerevisiae*. Su desarrollo se llevó a cabo en tres fases, la primera incluyó la adecuación de la materia prima, obtención de la harina y la caracterización de ambas. La segunda fase fue la hidrólisis enzimática de la harina, incluyendo su licuefacción y posterior sacarificación con alfa-amilasa y glucoamilasa. En esta fase se variaron la concentración de las enzimas y el tiempo, con el fin de establecer las condiciones que permitían alcanzar la mayor concentración de azúcares reductores previo a la fermentación. La fase tres correspondió a la fermentación del hidrolizado y de un patrón sin hidrólisis al que se adicionó sacarosa al 15% p/v. Esta fase se llevó a cabo durante 192 h. Como resultado se estableció que las condiciones de las hidrólisis que permitían obtener la mayor concentración de azúcares reductores fueron 30 min y una concentración 0,30% y 0,005% para alfa-amilasa y glucoamilasa respectivamente. Respecto a la fermentación, cuando éstas terminaron los fermentos se filtraron y pasteurizaron y se destilaron. A los destilados se les midió el contenido de alcohol, obteniendo para la muestra sin hidrolizar un valor de 0,6°GL y para la muestra hidrolizada de 2,6°GL, confirmando el efecto de la licuefacción y la hidrólisis sobre la obtención de alcohol. Paralelo a las fermentaciones evaluadas se dejó una muestra del hidrolizada fermentando durante 30 días, ésta alcanzó una concentración de alcohol de 5,5°GL.

CONTENIDO

RESUMEN.....	5
CONTENIDO.....	6
LISTA DE ANEXOS	10
GLOSARIO.....	11
ABREVIATURAS	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
OBJETIVOS.....	14
1. MARCO DE REFERENCIA.....	15
1.1 TAXONOMÍA DEL CHONTADURO	15
1.1.1 Cultivo	15
1.1.2 Producción de chontaduro en Colombia.....	16
1.1.3 Poscosecha.....	17
1.2 ASPECTOS NUTRICIONALES DEL CHONTADURO	17
1.3 USOS DEL CHONTADURO EN LA ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA ARTESANAL	18
1.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES.....	18
1.5 PARÁMETROS GENERALES DE LA FERMENTACIÓN.....	19
1.6 ESTADO DEL ARTE.....	20
1.7 MARCO LEGAL	21
2. METODOLOGÍA	23
2.1 OBTENCIÓN DE LA HARINA DE CHONTADURO	23
2.1.1 Caracterización de la fruta y de la harina obtenida	25
2.2 LICUEFACCIÓN E HIDRÓLISIS DE LA HARINA DE CHONTADURO	26
2.2.1 Licuefacción de la harina.....	26
2.2.2 Hidrólisis enzimática	27
2.2.3 Diseño experimental de la hidrólisis enzimática	28
2.2.4 Eficiencia del proceso de licuefacción e hidrólisis enzimática.	30
2.3 FERMENTACIÓN.....	31

2.4	DESTILACIÓN	31
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
3.1	ADECUACIÓN DE LA HARINA	33
3.2	LICUEFACCIÓN E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	36
3.3	FERMENTACIÓN.....	40
3.4	DESTILACIÓN Y CONTENIDO ALCOHÓLICO	45
	RECOMENDACIONES	50
	REFERENCIAS	52
	ANEXOS.....	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Bactris gasipaes</i> _____	15
Tabla 2. Composición química del chontaduro por 100 g en base húmeda _____	17
Tabla 3. Diseño experimental para la hidrólisis enzimática con α – amilasa _____	28
Tabla 4. Diseño experimental para la hidrólisis enzimática con glucoamilasa _____	29
Tabla 5. Peso en gramos (g) del chontaduro adecuado y de la harina _____	34
Tabla 6. Resultados de caracterización de fruta y harina _____	34
Tabla 7. Resultados ANOVA para la enzima α – amilasa _____	37
Tabla 8. Resultados ANOVA para la enzima glucoamilasa _____	39
Tabla 9. Ecuaciones de la recta para actividad antioxidante y carotenos totales de cada muestra _____	43
Tabla 10. Caracterización de los productos finales. _____	44
Tabla 11. Datos de agrupación para los grados de alcohol _____	45
Tabla 12. Caracterización de producto fermentado durante treinta días _____	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pesaje de chontaduro	23
Figura 2. Escaldado del chontaduro	24
Figura 3. Harina de chontaduro envasada	24
Figura 4. Equipo BUCHI para destilación de muestras	32
Figura 5. Tratamiento estadístico de datos para la enzima α - amilasa.....	36
Figura 6. Tratamiento estadístico de datos para la enzima glucoamilasa	38
Figura 7. Contenido de azúcares reductores (mg/mL) durante la fermentación	41
Figura 8. Relación del pH vs. días de fermentación.....	42
Figura 9. Relación de actividad antioxidante (mg eq Trolox/g) y carotenos totales ($\mu\text{g/g}$) vs. días de fermentación	43
Figura 10. Producto final con hidrólisis y producto final sin hidrólisis	44

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Ficha técnica de enzima α – amilasa	57
Anexo 2. Ficha técnica de glucoamilasa	59
Anexo 3. Tabla de corrección del grado alcohólico volumétrico para referirlo a 15°C	61
Anexo 4. Curvas de calibración para actividad antioxidante	62
Anexo 5. Curva de calibración para azúcares reductores totales	64
Anexo 6. Datos de concentración de azúcares reductores (mg/mL) durante la hidrólisis enzimática con alfa-amilasa (HT-1000)	65
Anexo 7. Datos de concentración de azúcares reductores (mg/mL) durante la hidrólisis enzimática con glucoamilasa (GA-300L)	65

GLOSARIO

Alfa amilasa. Enzima que hidroliza polisacáridos como el almidón, liberando glucosa y maltosa. Es sensible a una acidez elevada, por lo tanto se inactiva a un pH entre 3,3 y 4,5, trabajando óptimamente en un rango entre 5,0 y 8,0; es resistente a temperaturas superiores a 60°C, siendo 70°C la óptima para su actividad.

Fermentación alcohólica. Proceso anaeróbico realizado por levaduras y algunas clases de bacterias. Estos microorganismos transforman el azúcar en alcohol etílico y dióxido de carbono.

Glucoamilasa. Enzima con actividad desramificadora, capaz de hidrolizar el almidón completamente en glucosa. Trabaja en un rango de pH de 4,5 a 6,5 y a una temperatura entre 50°C y 65°C.

Grado alcohólico o alcoholimétrico. Es el porcentaje en volumen de alcohol etílico a 20°C contenido en 100cm³ de una bebida alcohólica.

Licuefacción. Es el primer paso en la producción de glucosa y consiste en calentar una solución que contenga almidón para gelatinizarlo.

Sacarificación. Procedimiento mediante el cual los almidones y materias celulósicas se hidrolizan y convierten en azúcares fermentables.

Saccharomyces cerevisiae. Es una levadura unicelular que se alimenta de sustratos ricos en azúcares. Es ampliamente usado en alimentos, típicamente en la elaboración de pan y de bebidas fermentadas

ABREVIATURAS

°GL: grados Gay Lussac

ABS: absorbancia

a_w: actividad de agua

BS: base seca

mg eq/ g: miligramos equivalentes / gramos

NTC: Norma Técnica Colombiana

DPPH: 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo

SC: suma de cuadrados

MC: media cuadrática

Valor F: valor estadístico de la prueba de Fisher

Valor P: valor de significancia

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El poco aprovechamiento industrial del chontaduro es consecuencia de varios factores como el desconocimiento sobre el comportamiento del fruto y el bajo desarrollo tecnológico asociado a su industrialización. En ese sentido, se han incrementado las pérdidas en poscosecha de este fruto alcanzando el 30% de la producción, haciendo necesario el desarrollo de investigaciones que permitan reducirlas (Serrano, 2011). Una de las alternativas para la industrialización del chontaduro es la obtención de bebidas alcohólicas. Sin embargo, el bajo contenido de azúcares reductores en el fruto, que oscila entre 1,76 y 2 g por cada 100 g (Sotero, 1996), hace que ésta sea difícil de fermentar, ya que no hay disponibilidad suficiente de sustrato, haciendo necesario involucrar etapas como la licuefacción de la harina y su hidrólisis enzimática, para obtener un mayor contenido de alcohol en un proceso fermentativo. Por esta razón se genera la siguiente pregunta de investigación:

¿Es posible incrementar el rendimiento alcohólico en la fermentación de harina de chontaduro (*Bactris gasipaes*) al modificar el proceso convencional, incluyendo una etapa de licuefacción de la harina previa a la hidrólisis enzimática?

La justificación del proyecto se basa en la oportunidad de aprovechar el chontaduro como una nueva fuente para la obtención de una posible bebida fermentada y en la necesidad de reducir las pérdidas de este producto, que según datos de estudios realizados por la Asociación hortofrutícola de Colombia (ASOHOFrucol) y el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, son del 30% (Moreno, 2006). De esta manera, se abriría un espacio al desarrollo de un producto con atributos que lo hagan tan atractivo como lo es el fruto, aprovechando la versatilidad que tiene, en cuanto a las formas de consumo y al posible maridaje que se le podría dar a la bebida. Elementos que es importante considerar si se piensa que la producción de chontaduro a nivel nacional es alta, alcanzando una extensión de áreas cultivadas de alrededor de 9.507 ha y su aprovechamiento a nivel industrial es muy bajo, dado que el consumo de este se da generalmente solo como fruto, aunque artesanalmente se ha encontrado una variedad considerable de productos, como conservas, chips, harina, etc.

En cuanto a las limitantes del trabajo, la materia prima se seleccionó de acuerdo a su color porque éste es indicativo del grado de madurez del fruto, sin tener en cuenta factores tales como la cantidad de sólidos solubles. En ese sentido se buscó trabajar con aquellos frutos que tuvieran color rojo, para garantizar que estuvieran maduros.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de los pre-tratamientos de licuefacción e hidrólisis enzimática sobre el rendimiento alcohólico obtenido en la fermentación de harina de chontaduro con *Saccharomyces cerevisiae*

Objetivos Específicos

- Caracterizar la harina de chontaduro incluyendo su contenido de carotenos totales y su actividad antioxidante.
- Establecer las condiciones de licuefacción e hidrólisis de la harina de chontaduro obteniendo el mayor contenido de azúcares previo a la fermentación.
- Evaluar los productos de la fermentación de los hidrolizados de la harina de chontaduro en cuanto a su contenido de azúcares reductores, alcohol y componentes bioactivos (carotenoides).

1. MARCO DE REFERENCIA

1.1 TAXONOMÍA DEL CHONTADURO

El chontaduro (*Bactris gasipaes*), pertenece a la familia de las Palmáceas; su clasificación se ha dado bajo dos diferentes nombres genéricos: *Bactris gasipaes* y *Guilielma*; en la tabla 1 se observa su taxonomía.

Tabla 1. Taxonomía de *Bactris gasipaes*

Nombre científico	<i>Bactris gasipaes</i>
Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Arecales
Familia	Areaceae
Género	Bactris
Epíteto específico	<i>Gasipaes</i>
Autor epíteto específico	Kunth
Determinador	Bernal, R.
Fecha determinación	1993

Fuente: Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia (2009).

A esta especie se le atribuyen más de 200 nombres comunes en diferentes regiones y grupos indígenas de América Latina. En Latinoamérica algunos de los nombres con los cuales se identifica son: cachipay, chichagui, chonta, chontadura, chontaduro, chontaduro amarillo, chontaduro colorado, pichiguao, pipire, pirijao, pupunha, tenga, pijuayo, pejibaye, casipaes, pijibay, pijiguao, macana, macanilla, periguao, tembé, tembé de castilla, pixbae, piba, peachpalm y pewa (Mora, 1999).

1.1.1 Cultivo

El chontaduro es propio de áreas tropicales y es adaptable en zonas con alta precipitación pluvial y temperatura media, en rangos de altitud de 100 a 800 m.s.n.m.; en términos generales, este fruto se da en la mayoría de suelos y topografías, excepto en áreas inundables o en suelos compactos, en donde se puede presentar caída prematura de los frutos y/o tamaño pequeño de los mismos (CORPOICA, 1996). Para el cultivo de esta palma, se deben tener en cuenta los siguientes parámetros:

- Suelo: se adapta bien a los suelos ácidos, necesita buena profundidad y un buen drenaje de agua.
- Temperatura: tiene buena adaptación a zonas cálidas con temperaturas medias entre 26 y 28°C.
- Humedad relativa: soporta elevadas concentraciones de humedad atmosférica (>80%) durante periodos prolongados.
- Propagación: es por semilla sexual, se realiza utilizando frutos grandes o medianos, que son sembrados en bolsa de plástico sin sustrato o en germinadores de aserrín.

La realización del cultivo, comienza con la siembra de la semilla en vivero; esta debe estar acostada para facilitar que la raíz alcance el suelo y debe estar enterrada a una profundidad de 2 cm y muy bien cubiertas. Durante los primeros días, después de la germinación, es necesario regar diariamente, si el ambiente es muy seco, hay que hacerlo dos veces al día. Es importante revisar el cultivo una vez a la semana para detectar plagas o enfermedades.

El cultivo de chontaduro puede desarrollarse junto a otros, como el frijol de árbol y el maíz, siendo una buena alternativa para controlar la maleza durante los primeros años de la plantación. La cosecha del racimo se efectúa cuando inicia la maduración o cambio de color de los frutos; en dicha etapa, predominan los colores rojos, amarillo y formas matizadas de ambos colores o con verde. El fruto es perecedero, iniciando su proceso de descomposición después de 3 a 4 días de cosechado si no se cocina o no se somete a un proceso adecuado de almacenamiento o transformación.

En cuanto a la clasificación del fruto de chontaduro, es difícil de realizar por su condición alógama, presentando variabilidad en todos los cultivos, por lo tanto, ésta se basa en la distribución geográfica y el peso promedio del fruto. Por la distribución geográfica: se clasifica en orientales o amazónicos con razas situados al oriente de los andes; son generalmente de tallo suave, con pocas espinas y con escaso sistema radicular. Las occidentales, con razas localizadas o cultivadas al occidente de los andes. Por el tamaño de los frutos: se clasifican en microcarpas (frutos con peso menor a 20 g), mesocarpas (entre 21 y 70 g) y macrocarpas (peso superior a 70 g) (UNAD, 2010).

1.1.2 Producción de chontaduro en Colombia

Según la Secretaría de Agricultura de departamento del Chocó, entre los años 2007 y 2011, se evidenció que los mayores productores de chontaduro en Colombia son: Valle del Cauca con un promedio de 3.490 ha por año, seguido por el departamento del Cauca con 1.736 ha y Putumayo con 1.302 ha; se espera que estos valores no hayan decrecido en los últimos cuatro años (Hidalgo, 2011). A partir de esta información, se podría tomar como referencia el chontaduro producido en el Valle del Cauca, ya que por su gran área de cultivo, la producción que tiene es cercana a las

50.000 t/año, de la cual se podría destinar una parte para aprovechar en la elaboración de un nuevo producto, trayendo un posible beneficio económico a mediano y/o largo plazo.

1.1.3 Poscosecha

Según Silva (2014), los frutos de chontaduro pueden conservarse de diez días a dos semanas después de su cosecha, situación que ha derivado en investigaciones para determinar mejores técnicas que ayuden a conservar el fruto; por ejemplo, se ha observado que el producto puede durar dos meses, si se le aplica un escaldado y un recubrimiento con una solución salina al 10 o 20%. Otra forma de conservación que ha sido empleada, es la refrigeración entre 5 y 6°C durante treinta días, manteniendo una humedad relativa entre el 70 y el 75%.

1.2 ASPECTOS NUTRICIONALES DEL CHONTADURO

Uno de los motivos principales por los cuales este producto se escoge como la materia prima del proyecto, es debido a su contenido nutricional. El chontaduro es una buena fuente de proteínas, aceites, vitaminas liposolubles y minerales indispensables, convirtiéndolo así en un producto beneficioso para la salud (Hernández, 2009). En ese sentido, se espera que el producto desarrollado no solo deleite al consumidor, sino que conserve propiedades que lo haga nutricionalmente aceptable. A continuación, se presenta la tabla 2, con la composición química del chontaduro.

Tabla 2. Composición química del chontaduro por 100 g en base húmeda

Componente	g	Componente	mg
Humedad	12	Vitamina B2	0,3
Proteína	3,8	Vitamina C	62,6
Grasa	8,9	Niacina	2,5
Minerales	1,3	Hierro	6,1
Fibra cruda	2,1	Calcio	10,9
Carbohidratos	72,1	Sodio	2,7
Vitamina B1	0,1	Potasio	162,8
		Magnesio	11,7
		Zinc	2,1
Energía (cal)	413,5	Vitamina A (µg eq)	1,2

Fuente: Blanco, Montero, Fernández, Mora (1992).

Según el artículo de Rojas, Pérez, Bustos y Vaillant (2011), en la pulpa cruda del chontaduro se detectaron nueve carotenoides y después de su cocción, estos pasaron a catorce, cinco de los

cuales aparecen como producto de la isomerización de los carotenoides existentes en la pulpa. El carotenoide más importante es el β -caroteno, que en la pulpa cruda tiene una concentración de $96 \pm 1,7$ mg eq/ g base húmeda, que se reduce luego de la cocción y secado a $33,3 \pm 1$ mg β -caroteno/ base húmeda (Rojas, 2011).

Sin embargo, se ha demostrado en algunos casos que la concentración de carotenoides a menudo aumenta durante el tratamiento térmico, pero si este es muy prolongado puede ocasionar pérdidas. Otros factores que también influyen en la degradación de los carotenoides son la luz, los metales, el oxígeno y los ácidos orgánicos, ya que estos promueven la isomerización de estos compuestos (Rodríguez, 2001).

1.3 USOS DEL CHONTADURO EN LA ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA ARTESANAL

Según el artículo Mesa y Galeano (2013), los frutos de palmas usados para la alimentación humana corresponden a 56 especies de las cuales, 45 se emplean para consumo directo. Dentro de éstas se encuentra el *Bactris gasipaes* (chontaduro), con la que se realizan además conservas y bebidas fermentadas como la chicha. Para la producción de una bebida fermentada artesanal como la chicha, se encontró una metodología que incluía la cocción del fruto completo por 3 o 4 h, antes de retirar la cascará y la pepa, seguida por el rayado de la pulpa y la cocción de esta mezclada con azúcar por 2 h antes de su fermentación que se extendía por 5 h (Sotero, García y Lessi, 1996).

1.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES

Cuando se desea fermentar almidones, como es el caso de la harina de chontaduro, es necesario realizar su conversión en glucosa para que ésta pueda ser asimilada por las levaduras de una mejor manera. Para la hidrólisis del almidón, se realiza un proceso de homogenización del sustrato, luego de su caracterización; seguida por la licuefacción de la amilosa por calentamiento. Posterior a la licuefacción se inicia la hidrólisis por adición de una amilasa y se finaliza con la adición de glucoamilasa. Es necesario considerar que para cada enzima deben emplearse condiciones de tiempo, temperatura y agitación diferentes. De otro lado, vale la pena mencionar que el seguimiento de la conversión de azúcares reductores se realiza mediante el registro de éstos al término de cada etapa (Silva, 2014).

La α -amilasa cataliza la hidrólisis de la cadena lineal (amilosa) y la ramificada (amilopectina) del almidón, rompiendo enlaces α -1,4, para formar una mezcla de dextrinas, por ello se la conoce como enzima dextrinogénica, con poca producción de maltosa. La α -amilasa comercial es

sensible a una acidez elevada y se vuelve inactiva a pH 3,3 o menor; el pH óptimo de acción está en el rango 5-7 y es resistente al calor, pues a 70°C conserva un 70 % de su actividad (Silva, 2014).

La glucoamilasa actúa en la reacción de hidrólisis de cadenas de polisacáridos rompiendo los enlaces 1,4-alfa-D-glucosa los cuales son encontrados de forma residual en las cadenas después que éstas fuesen digeridas por alfa y beta amilasas, el producto final obtenido luego del tratamiento con ésta, es la glucosa. La mayor actividad de esta enzima se encuentra entre un pH de 4 a 5,5 y en temperaturas de 55 a 65°C (Navarro, 2009).

1.5 PARÁMETROS GENERALES DE LA FERMENTACIÓN

Para la elaboración de bebidas alcohólicas es necesario considerar las condiciones de crecimiento de las levaduras empleadas, siendo de importancia, la temperatura de fermentación, que oscila entre 22°C y 27°C, el pH que debe estar entre 3,0 y 3,50, la actividad de agua (a_w) que debe mantenerse en un valor entre 0,70-0,99 y la presión que aumenta debido a la generación de gases por la fermentación, disminuyendo la actividad celular y haciendo necesario el control de CO₂ dentro del sistema (Cáceres, Reyna y Klotz, 2002).

Dentro de lo microorganismos más empleados en la fermentación alcohólica se encuentran:

- *Zymomonas mobilis*: considerada una alternativa para producción de etanol a gran escala, esta bacteria presenta ventajas como una mayor capacidad de fermentación de azúcar, mayor producción de etanol, una menor producción de biomasa y una mayor tolerancia al etanol. Estas características se deben a que puede realizar un metabolismo anaeróbico de la glucosa a través de la producción de acetaldehído que es convertido en etanol y dióxido de carbono. En comparación con la *Saccharomyces cerevisiae*, esta bacteria implica dos enzimas: piruvato carboxilasa que convierte el piruvato en acetaldehído y CO₂; y la alcohol-deshidrogenasa que convierte el acetaldehído en etanol, permitiendo producir alcohol hasta en un 12% a una velocidad el doble de rápida. Es importante controlar el pH durante la fermentación, debido a que esta bacteria está determinada por la acidez, evitando crecer a un pH inferior a 3,75 siendo el óptimo de 3,90 (Instituto Valenciano de Microbiología, 2015).
- *Saccharomyces cerevisiae*: es la levadura más utilizada en estos procesos, fermentando eficientemente los azúcares reductores de seis carbonos (Sotero, 1996). Son microorganismos muy usados en microbiología industrial para la elaboración de bebidas fermentadas y pan; durante la fermentación con esta levadura se origina dióxido de carbono que se evidencia en las pequeñas burbujas que se forman en el producto y etanol que se identifica por el aroma característico. Es importante controlar la temperatura

(máximo 35°C) y el pH (entre 4 y 6) de la fermentación, debido a que estos parámetros son los que permiten acelerar o ralentizar el proceso fermentativo (Ferrer, 2004).

1.6 ESTADO DEL ARTE

En el trabajo realizado por Andrade, Pantoja y Maeda (2003), se presenta un método para obtener una bebida fermentada a partir de chontaduro. En este trabajo la materia prima, fue seleccionada (por estado físico y madurez) y lavada para posteriormente ser dividida en dos partes, una para determinación de la composición química y su posterior hidrólisis ácida. La otra parte de la materia prima, fue sometida a un tratamiento con vapor de agua ($\pm 140^{\circ}\text{C}$) durante 5 min, para ser usada posteriormente en la preparación de una bebida. La materia previamente congelada se cocinó durante 2 h y 30 min, a una temperatura de $\pm 100^{\circ}\text{C}$, se trituró, obteniendo así la pulpa. Tres porciones de 1 kg fueron esterilizadas (autoclave a 120°C durante 15 min) y se añadieron 4 L de jarabe de sacarosa (con concentración suficiente para obtener 12% de alcohol). Cada una se inoculó con levadura *S. cerevisiae* (activa) a una concentración de 1%. El proceso de fermentación se llevó a cabo durante 7 días a una temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, donde se realizó control de temperatura, humedad, pH, acidez total, sólidos solubles, producción de alcohol, total de carotenoides, almidón y azúcares reductores, cada 24 h. Se realizó una decantación, filtración y envasado en botella de vidrio. La fermentación se terminó con la pasteurización (85°C durante 6min) y choque térmico. Los resultados obtenidos después de 168 h de tratamiento fueron pH de 3,62, acidez titulable de 0,43%, azúcares reductores de 1,07%, carotenoides totales de 2,18 (mg/100g), sólidos solubles ($^{\circ}\text{Brix}$) de 6,66, porcentaje de humedad de 88,68% y un porcentaje de alcohol de 12,47%, de donde ellos concluyeron que un aumento de la cantidad de agua en proporción con la cantidad de pulpa, en el mosto logra contribuir al rendimiento de la bebida.

En otro trabajo realizado por Sotero, García y Lessi en 1996, se realizó una bebida fermentada a partir de Pijuayo (*Bactris gasipaes*), en este caso los frutos obtenidos como materia prima, se lavaron, se sometieron durante 2 h de cocción ($100^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) con el objetivo de gelatinizar el almidón, luego se pelaron y despeparon, y se llevaron a un molino de granos manual, obteniendo una masa viscosa, que posteriormente se mezcló con sacarosa (proporción 37% y 50%). Después de esta adecuación, se procedió a realizar una fermentación por acción de las levaduras propias del fruto, durante seis días a temperatura ambiente (30°C). Pasado el tiempo de fermentación la masa se diluyó en una proporción 1:2 con agua tratada, a la cual se le adicionó azúcar blanca refinada en diferentes proporciones (hasta 15%), se realizó una decantación y filtración a la bebida diluida y ésta se dejó reposar por aproximadamente 2h, para sedimentar los sólidos presentes, posteriormente se filtró con tela para eliminar fibras y residuos sólidos y se embotelló (cierre hermético), antes de su pasteurización (autoclave 100°C , por 15 min). Finalmente se enfrió el producto en agua a 70°C y se almacenó a temperatura ambiente. El producto final obtenido contaba con las siguientes características: acidez titulable de 2,3 %, acidez total de

2,4%, acidez fija de 1,6%, carbohidratos totales 27%, azúcares reductores 2,4%, azúcares no reductores 6,2%, almidón 18,4%, alcohol % vol 1,5, °Brix 18 y densidad de 1,1 g/cm³.

En el estudio llevado a cabo por Silva (2014), acerca de la producción de una bebida fermentada no destilada a partir de chontaduro, se evaluó la hidrólisis enzimática-fermentación, hidrólisis ácida-fermentación y fermentación de la harina, para dos tipos diferentes de chontaduro. En el primer método se adicionaron dos tipos de enzima a diferentes concentraciones la primera enzima fue α -amilasa en concentraciones de 1, 1,5 y 2% a temperatura y pH constantes y un tiempo de reacción diferente para cada una de las concentraciones de la enzima. La segunda enzima que se adicionó fue glucoamilasa en las mismas concentraciones que α -amilasa, se manejaron temperaturas, pH y tiempos de reacción constantes y la fermentación se llevó a cabo con *Saccharomyces cerevisiae*. En el segundo método, se utilizó ácido cítrico a cuatro diferentes concentraciones y con temperaturas constantes, y para el tercer método, al sustrato se le adicionaron tres diferentes soluciones de sacarosa las cuales estaban al 15, 17 y 20% (p/p). La fermentación se evaluó con y sin adición de levaduras, a dos pH diferentes los cuales fueron 4,5 y 5,7. Durante el desarrollo de este proyecto se evaluaron los efectos de la variación de las concentraciones de las enzimas durante el proceso de hidrólisis enzimática, de igual manera se llevó a cabo un proceso ácido previo al momento de la fermentación, donde se evaluó también la adición de diferentes concentraciones de sacarosa en el mosto de la bebida a fermentar. Los resultados obtenidos para el sustrato de chontaduro rojo posterior al proceso de hidrólisis enzimática mostraron que para la enzima alfa-amilasa la concentración de azúcares reductores dio un valor promedio de 16,76 °Brix y para el caso de la enzima glucoamilasa se obtuvo un valor promedio de 20,30 °Brix, observándose claramente como durante el proceso de sacarificación se dio un aumento notable de la concentración de azúcares reductores en la muestra y un pH promedio de 5,26; para el sustrato del chontaduro amarillo, los datos obtenidos para la concentración de azúcares reductores con la enzima alfa-amilasa 18,02 °Brix y para glucoamilasa con un valor de 23,12 °Brix. En cuanto a los datos obtenidos después del proceso de fermentación para ambos sustratos, obtuvieron que, para el sustrato de chontaduro rojo, el valor de la concentración de azúcares reductores después del proceso de fermentación se estableció en un promedio de 8,16 °Brix con un valor de pH de 4,19 y un contenido de alcohol de 8,93°G.L.

1.7 MARCO LEGAL

- **Ley 9 de 1979.** Expedida el 24 de enero de 1979 por el Congreso de la República de Colombia, presenta el Código Sanitario Nacional que en el Título V denominado “Alimentos”, establece el manejo de alimentos durante el proceso de producción de bebidas incluyendo bebidas alcohólicas. En ésta se encuentran especificaciones de las áreas de trabajo, material, utensilios, elaboración, proceso y expendio, de igual manera se establecen las condiciones laborales, el papel de las personas implicadas directamente en

la manipulación de producto y de los dueños de cada empresa, durante los procesos de producción.

- **Norma Técnica Colombiana NTC 440.** Establece los métodos de ensayo para determinar las características de productos alimenticios, incluyendo equipos y materiales, procedimientos y cálculos correspondientes. Los métodos aquí especificados son: determinación de peso y volumen neto, determinación de peso escurrido o drenado, determinación de acidez (acidez titulable y acidez iónica – pH), determinación de sólidos (sólidos disueltos – método refractométrico y sólidos en suspensión), determinación del contenido de azúcares reductores – método Lane Eynon, determinación de contenido de ácido ascórbico, determinación del contenido de cobre – método volumétrico, determinación del contenido de plomo, determinación del contenido de arsénico – método de Gutzelt, determinación del contenido de aceite esencial, determinación del contenido de partículas negras y determinación del contenido de mohos (ICONTEC, 2015).
- **Norma Técnica Colombiana NTC 5113.** Bebidas alcohólicas Métodos para determinar el contenido de alcohol. En esta norma se explican cuatro métodos, detallando el fundamento, equipos y procedimiento. Los protocolos explicados son: método por destilación y determinación directa del contenido alcohólico destilado; método por destilación y estimación del contenido alcohólico por determinación de la densidad relativa; determinación del contenido de alcohol a partir del índice de refracción y determinación de la densidad con densímetro digital (ICONTEC, 2013).

2. METODOLOGÍA

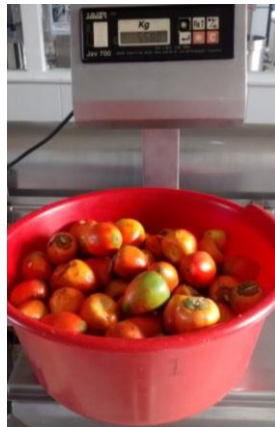
Esta investigación se realizó en la Planta Piloto de Frutas y Hortalizas en la Sede Norte, en la Planta Piloto de Cereales y en el Laboratorio de Biotecnología ubicados en la Sede La Candelaria de La Universidad de La Salle. El desarrollo de esta investigación se dio cumpliendo con tres fases diferentes: obtención de la harina de chontaduro, licuefacción e hidrólisis de la harina y fermentación. A continuación se explican éstas fases.

2.1 OBTENCIÓN DE LA HARINA DE CHONTADURO

Para el proceso de obtención de la harina de chontaduro, se realizaron las siguientes actividades:

- **Compra y selección de la materia prima.** El chontaduro se compró en la Plaza de Mercado Distrital del Restrepo en Bogotá D.C., seleccionando los frutos según el color de la cáscara, es decir se buscó que esta fuese roja y que además los frutos tuviera una morfología ovalada y sin ningún tipo de daños mecánicos o microbiológicos.
- **Pesaje, lavado y desinfección.** La fruta fue pesada, lavada con agua potable y desinfectada en una solución de hipoclorito a 200 ppm durante 5 min en inmersión; posteriormente se realizó otro lavado con agua potable antes de continuar su procesamiento (Figura 1).

Figura 1. Pesaje de chontaduro



- **Escaldado y choque térmico.** El escaldado se realizó en agua a 92°C por 30 min seguido por un choque térmico, con el fin de evitar el crecimiento de microorganismos termófilos, desactivar enzimas y evitar la degradación de la textura del fruto (Figura 2).

Figura 2. Escaldado del chontaduro



- **Pelado, recuperación de la pulpa y corte.** Una vez fría la fruta, se retiró la cáscara y la pepa y se cortó la pulpa en cubos de 1 cm aproximadamente con ayuda de un cuchillo de acero, para luego disponerla en una bandeja de malla para retirar humedad.
- **Secado.** Se realizó en un secador de bandejas a 60°C por 6 h, pues según Godoy *et al.* (2006) éstas son las condiciones óptimas para la obtención de una harina que mantenga las características de olor, color y sabor propias del producto original, aún después de que éste ha sufrido la eliminación de parte de su humedad.
- **Molienda y tamizado.** Para la obtención de la harina, se molió la pulpa seca en un molino pulverizador a 220 V con malla de 0,8 mm y se tamizó durante 5 min en mallas de 20, 40 y 60 μm .
- **Almacenamiento.** La harina se almacenó en bolsas plásticas perfectamente selladas, con capacidad de 500 g durante 12 h aproximadamente, en refrigeración (0-4°C) hasta su utilización (Figura 3).

Figura 3. Harina de chontaduro envasada



2.1.1 Caracterización de la fruta y de la harina obtenida

Para la caracterización de las materias primas se llevaron a cabo pruebas de pH, azúcares reductores, carotenos totales y actividad antioxidante en el chontaduro fresco y en la harina, siguiendo los protocolos descritos a continuación.

- **Acidez iónica (pH).** Para ambos productos, se tomaron 10 g de cada muestra, se diluyeron en 10 mL de agua destilada y se hizo la medida con un potenciómetro con electrodos de vidrio (NTC 440, 1971). Este parámetro es importante tenerlo en cuenta antes, durante y después del proceso de fermentación, debido a que un aumento o disminución de éste puede afectar el color, aroma y sabor del fermento, además del crecimiento y desarrollo de la levadura durante el proceso (Fernández, 2008).
- **Sólidos solubles (°Brix).** Para ambos productos, se tomaron 10 g de cada muestra, se diluyeron en 10 mL de agua destilada y se dispuso una gota en un refractómetro de escala de 0 a 30 °Brix (NTC 440, 2015).
- **Azúcares reductores por el método de Miller.** El contenido de azúcares se midió por espectrofotometría, empleando el reactivo ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS), basándose en la intensidad del color (amarillo), es decir, que dicha intensidad es proporcional a la concentración de azúcares reductores en la muestra (Muñoz y Vega, 2014).

Para las mediciones se tomaron 500 µL de cada muestra y se les adicionó 500 µL de reactivo DNS en tubos de ensayo, para el blanco, en vez de colocar muestra se utilizó agua destilada. Luego los tubos se colocaron en agua a ebullición durante 5 min. Terminado este tiempo, se les adicionó 1 mL de agua destilada y luego se mantuvieron en oscuridad sumergidos en agua fría por 10 min; pasado este tiempo se realizó la lectura de ABS a 540 nm.

Para la curva de calibración se utilizó un patrón preparado con 0,0648 g de glucosa diluidos en 100 mL de agua destilada. De esta solución se tomaron volúmenes de 0-500 µl en tubos de ensayo; los volúmenes se completaron con agua destilada. Y se realizó el mismo procedimiento descrito para las muestras.

- **Carotenos totales.** El contenido de carotenos se determinó siguiendo el protocolo de extracción CAR-LCH-001. Para ello, se tomaron 5 g de cada muestra y se colocaron en tubos Falcon a los cuales se añadió 10 mL de éter de petróleo y 10 mL de acetona, antes de llevarlos a centrifugación por 10 min a 3000 r.p.m. Finalizado el tiempo, se retira la fase etérea con una pipeta y se repite el procedimiento nuevamente. Al producto de la extracción se agregaron 10 mL de agua destilada y se llevó nuevamente a centrifugación

por 10 min a 3000 r.p.m.; al terminar, se extrajo y desecho el agua y se repitió este procedimiento. Para medir la absorbancia, se empleó un espectrofotómetro a 450 nm, utilizando como blanco el éter de petróleo. La concentración de carotenos se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{carotenos totales } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{A \times V_{\text{final}} (\text{ml}) \times 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times \text{peso de la muestra} (\text{g}) \times 100}$$

Donde,

A: absorbancia a 450 nm

10^6 : constante de conversión de unidades ($\mu\text{g/g}$)

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$: coeficiente de absorción de β – caroteno en éter de petróleo = 2592

- **Actividad antioxidante por el método de DPPH.** El método de DPPH, es un ensayo que se basa en la transferencia de electrones, ya que involucra una reacción redox, con el oxidante como indicador del punto final de la reacción (Tovar del Rio, 2013). El contenido de antioxidantes se midió por espectrofotometría a 517 nm, empleando el DPPH, basado en que dicho reactivo tiene un electrón desapareado de color azul – violeta, que puede decolorarse a amarillo por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante (Ramos Llica, Castañeda Castañeda e Ibañez Vásquez, 2008).

Para las muestras, se tomaron 40 mg que se diluyeron en 100 mL de etanol, de cada dilución se toma 500 μL y se colocaron a un tubo de ensayo; después se agregaron 2 mL de solución de DPPH y se dejaron en reposo y oscuridad por 30 min. Luego se midió la absorbancia a 517 nm. Para la curva de calibración se adicionó en tubos de ensayo volúmenes de 0 – 500 μL de una solución de Trolox a una concentración conocida de 34,7903 mg/L y se completó su volumen con agua destilada. Luego se añadió el reactivo DPPH y se continuó con el proceso como fue descrito para las muestras.

2.2 LICUEFACCIÓN E HIDRÓLISIS DE LA HARINA DE CHONTADURO

2.2.1 Licuefacción de la harina

Este proceso se realizó en 9 Erlenmeyers de 250 mL por triplicado, empleando la harina previamente obtenida y almacenada que se diluyó al 20% en peso en agua (20 g de harina en 100 mL de agua) para cada uno de los ensayos. En éste las mezclas se sometieron a baño María hasta que alcanzaron $72 \pm 2^\circ\text{C}$, manteniendo esta temperatura por 10 min (Sotero, 1996).

2.2.2 Hidrólisis enzimática

- **Sacarificación con α – amilasa HT – 1000.** A las mezclas obtenidas después de la licuefacción, se les disminuyó la temperatura a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ y se midió y ajustó el pH de ser necesario con HCl (1N) o NaOH (1N) según correspondiera hasta que alcanzara el rango entre 6,0 – 8,0, que es el óptimo de acción de la enzima α -amilasa HT – 1000. Se emplearon tres concentraciones diferentes de la enzima, que se seleccionaron considerando las recomendaciones de la ficha técnica de PROENZIMAS (Anexo 1), siendo estas de 0,25%, 0,30% y 0,35% en relación al peso de la harina. Igualmente, la hidrólisis se evaluó en tres tiempos diferentes (15, 30 y 60 min) y para cada tiempo y concentración el muestro se realizó por triplicado.

Para las hidrólisis, las mezclas se sometieron una vez más al baño María hasta que la temperatura subió a $70\pm 2^{\circ}\text{C}$, en ese momento se agregó la enzima α -amilasa y a partir de ahí se empezaron a cronometrar los tiempos. Terminada la sacarificación, se enfriaron las mezclas y se midió el pH. La enzima se desactivó empleando HCl (1N) llevando el hidrolizado a un pH de $4,5\pm 0,05$ y manteniéndolo así por 10 min aproximadamente (Anexo 1); según Ballesteros, Batista, Cepeda y Tobón (2008), la inactivación de la enzima alfa-amilasa se da en rangos de 4,5 y 5,0.

Para evaluar el resultado de la hidrólisis, se midió el contenido azúcares fermentables por triplicado empleando la metodología de Miller descrita con anterioridad; en este caso se usó para la medición una muestra de una dilución de 1mL de hidrolizado en 150 mL de agua destilada.

- **Sacarificación con glucoamilasa *Naturalzyme* GA 300 L.** Para evaluar la hidrólisis con esta enzima se repitió el proceso de licuefacción y sacarificación con α -amilasa empleando la concentración y tiempo que permitieron alcanzar la mayor concentración de azúcares fermentables en la etapa anterior. Luego, usando este hidrolizado como sustrato, se procedió a realizar la sacarificación con glucoamilasa *Naturalzyme* GA 300 L.

En ese sentido, fue necesario ajustar de nuevo el pH de las muestras entre 6,0 – 7,0 que es rango óptimo de trabajo de la glucoamilasa empleando NaOH (1N), y ajustando la temperatura a $55\pm 2^{\circ}\text{C}$ con ayuda del baño María. Para esta sacarificación, también se trabajaron tres concentraciones diferentes de la enzima (0,003, 0,005 y 0,007%v/v) teniendo en cuenta los rangos recomendados en la ficha técnica de PROENZIMAS (Anexo 2) y tres tiempos diferentes (15, 30 y 45 min). Terminada la sacarificación, se enfriaron las mezclas, se midió el pH y se desactivó la enzima con HCl (1N) disminuyendo el pH del hidrolizado hasta $3,5\pm 0,02$. Para caracterizar el hidrolizado se midió el contenido de azúcares fermentables por triplicado, siguiendo el mismo protocolo empleado en la primera sacarificación.

2.2.3 Diseño experimental de la hidrólisis enzimática

Para este diseño experimental, se manipularon dos variables para cada sacarificación que fueron la concentración de enzima y tiempo de hidrólisis, con el fin de observar su efecto sobre la concentración de azúcares reductores.

Para la primera hidrólisis se varió la concentración de α – amilasa en 0,25, 0,3 y 0,35% y el tiempo en 15, 30 y 60 min, dando lugar a 9 tratamientos que fueron evaluados por triplicado, para determinar cuál de ellos permitía alcanzar la mayor concentración de azúcares reductores y así utilizar estas condiciones para la evaluación de la segunda hidrólisis. En la tabla 3 se muestra un resumen de los tratamientos evaluados.

Tabla 3. Diseño experimental para la hidrólisis enzimática con α – amilasa

Evaluación de la Sacarificación con α – amilasa	
T1	$C_{1a} - t_1$
T2	$C_{1a} - t_2$
T3	$C_{1a} - t_3$
T4	$C_{2a} - t_1$
T5	$C_{2a} - t_2$
T6	$C_{2a} - t_3$
T7	$C_{3a} - t_1$
T8	$C_{3a} - t_2$
T9	$C_{3a} - t_3$

Donde:

T_n: Tratamiento

C_{na}: Concentración de enzima α – amilasa (C_{1a}: 0,25%; C_{2a}: 0,30%; C_{3a}: 0,35%)

t_n: Tiempo de trabajo de las enzimas (t₁: 15 min; t₂: 30 min; t₃: 45 min)

El análisis de estos datos se desarrolló mediante un ANOVA al 95% de nivel de significancia para establecer el efecto de las variables y su interacción sobre la variable de respuesta que como ya se mencionó corresponde a la concentración de azúcares reductores. Y también serviría para

seleccionar el tratamiento que permitía alcanzar la mayor concentración de azúcares que sería utilizado para continuar el proceso con la etapa de hidrólisis con glucoamilasa.

Para la segunda hidrólisis se varió la concentración de glucoamilasa en 0,003, 0,005 y 0,007% y el tiempo en 15, 30 y 60 min, dando lugar a 9 tratamientos que fueron evaluados por triplicado, para determinar cuál de ellos permitía alcanzar la mayor concentración de azúcares reductores y así utilizar estas condiciones para la evaluación de la segunda hidrólisis. En la tabla 4 se muestra un resumen de los tratamientos evaluados.

Tabla 4. Diseño experimental para la hidrólisis enzimática con glucoamilasa

Evaluación de la Sacarificación con glucoamilasa	
T1	$C_{1g} - t_1$
T2	$C_{1g} - t_2$
T3	$C_{1g} - t_3$
T4	$C_{2g} - t_1$
T5	$C_{2g} - t_2$
T6	$C_{2g} - t_3$
T7	$C_{3g} - t_1$
T8	$C_{3g} - t_2$
T9	$C_{3g} - t_3$

Donde:

Tn: Tratamiento

C_{ng} : Concentración de enzima glucoamilasa (C_{1g} : 0,003%; C_{2g} : 0,005%; C_{3g} : 0,007%)

t_n : Tiempo de trabajo de trabajo de las enzimas (t_1 : 15 min; t_2 : 30 min; t_3 : 45 min)

El análisis de estos datos se desarrolló mediante un ANOVA al 95% de nivel de significancia para establecer el efecto de las variables y su interacción sobre la variable de respuesta que como ya se mencionó corresponde a la concentración de azúcares reductores. Y para seleccionar el tratamiento que permitía alcanzar la mayor concentración de azúcares que sería utilizado para continuar el proceso con la etapa de fermentación.

2.2.4 Eficiencia del proceso de licuefacción e hidrólisis enzimática.

Al finalizar la hidrólisis enzimática y una vez escogidos los tratamientos que permitieron alcanzar la mayor concentración de azúcares, se determinó la eficiencia del proceso de hidrólisis respecto al contenido total de carbohidratos reportado por Blanco *et al.* (1992) que fue 72,1 g por cada 100 g base húmeda, y respecto al contenido de azúcares obtenido en la caracterización de la harina.

- **Eficiencia respecto al contenido de carbohidratos totales del fruto**

$$\text{Eficiencia} = \text{AR}_f \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \times \frac{100 \text{ mL de H}_2\text{O}}{20 \text{ g de harina}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{100 \text{ g de producto}}{72,1 \text{ g de CHO}} \times 100$$

Donde,

AR_f: Concentración de azúcares reductores más alta, obtenida después de finalizar la hidrólisis enzimática.

- **Incremento en el contenido de azúcares en la harina de chontaduro con el proceso de hidrólisis.** Para este cálculo fue necesario pasar la concentración de azúcares reductores más alta de las obtenidas luego de la hidrólisis de base húmeda a base seca (B.S). Para ello se tuvo en cuenta que se emplearon 20 g de harina y que esta tenía una humedad de 12%:

$$\text{AR}_f \left(\frac{\text{mg}}{\text{g BS}} \right) = \text{AR}_f \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \times \left(\frac{100 \text{ mL de H}_2\text{O}}{20 \text{ g de harina} \times (0,88)} \right)$$

Donde,

AR_f: Concentración de azúcares reductores más alta, obtenida después de finalizar la hidrólisis enzimática.

0,88: Factor de conversión de base húmeda a base seca.

Una vez teniendo la concentración expresada en base seca, se procedió a calcular el % de incremento de la concentración de azúcares luego de la hidrólisis:

$$\% \text{Eficiencia} = \frac{\text{AR}_f \left(\frac{\text{mg}}{\text{g BS}} \right) - \text{AR}_H \left(\frac{\text{mg}}{\text{g BS}} \right)}{\text{AR}_H \left(\frac{\text{mg}}{\text{g BS}} \right)}$$

Donde,

$AR_f \left(\frac{\text{mg}}{\text{g BS}} \right)$: Concentración de azúcares reductores más alta, obtenida después de finalizar de la hidrólisis enzimática expresado en base seca.

$AR_H \left(\frac{\text{mg}}{\text{g BS}} \right)$: Concentración de azúcares reductores de la harina de chontaduro sin hidrolizar.

2.3 FERMENTACIÓN

Luego de obtener las condiciones de las dos hidrólisis que permitían alcanzar el mayor contenido de azúcares reductores, se procedió a emplearlas para obtener el hidrolizado que sería sometido a fermentación. Para contrastar estos resultados, se trabajó con una muestra control que correspondió a una mezcla de harina sin hidrolizar y agua en una concentración del 20% p/p (200 g de harina en 1L de agua), con adición de sacarosa del 15% p/p

Ambos tratamientos fueron evaluados empleando como unidades experimentales 1L de solución. Como inóculo se adicionaron 0,4 g *Saccharomyces cerevisiae* que se activaron en 50 mL de cada medio y se llevó una temperatura de 30°C hasta que se evidenció la presencia de espuma, después se añadió el inóculo a la unidad de fermentación (frascos Schott), dejándolo por 8 días a temperatura entre 19 – 20°C, en condiciones de anaerobiosis. Durante estos días se realizaron pruebas de pH, sólidos solubles (°Brix), azúcares reductores (técnica de Miller), actividad antioxidante por DPPH y carotenos totales siguiendo los protocolos descritos con anterioridad.

Terminada la fermentación se realizó un filtrado a presión manual del fermento con un lienzo, se pasteurizó a 65°C durante 15 min y se hizo un choque térmico con agua fría. Posteriormente se realizó filtración y pasteurización de los productos obtenidos, se les midió azúcares reductores, capacidad antioxidante y carotenos totales; también se realizó una destilación para medir el contenido de alcohol. Para comparar estadísticamente este último parámetro, se realizó una prueba de Dunnett, con el fin de verificar si el producto obtenido por tratamiento enzimático presentaba diferencias significativas frente al producto obtenido a partir de la harina sin hidrolizar adicionada con sacarosa.

2.4 DESTILACIÓN

Para establecer el grado alcohólico de la muestra sin hidrolisis y de la muestra con hidrolisis, luego de la fermentación, se emplearon 100 mL de cada muestra, que se colocaron en un tubo de destilación con 10 mL de óxido de calcio y se ubicaron en el equipo de destilación BUCHI. Se dejó destilar por 4 min y se recibió el destilado (aproximadamente 150 mL) en un Erlenmeyer con 10 mL de agua destilada. Se repitió este procedimiento 2 veces más, pasando por el equipo el destilado obtenido.

El destilado se transvasó a una probeta de 100 mL donde se midió la temperatura y los grados Gay Lussac (°GL), con un alcoholímetro calibrado a 15°C. Las lecturas se corrigieron según la temperatura de referencia del alcoholímetro, con ayuda de la tabla de correcciones que da el volumen a 15°C.

Figura 4. Equipo BUCHI para destilación de muestras



Luego de establecer el contenido de alcohol en los destilados obtenidos a partir de las muestras fermentadas, los datos se sometieron a un tratamiento estadístico con la prueba de Dunnett, que ayudó a determinar si entre la muestra patrón y la muestra a evaluar, existía diferencia significativa en la producción de alcohol.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ADECUACIÓN DE LA HARINA

Para el proceso de adecuación del fruto, que incluye su escaldado, pelado, recuperación de la pulpa, corte y secado, se empleó materia prima en buen estado mecánico y microbiológico. Ésta se sometió inicialmente a un escaldado por 30 min a 95°C, debido a que estas condiciones facilitan la remoción de la cáscara en la etapa de pelado, debido a que suaviza la fruta por el ablandamiento de tejidos que se produce (Godoy *et al* 2006).

La cantidad de pulpa obtenida correspondió al 78,5% del peso inicial del chontaduro entero y después de la molienda y tamizado, se estimó una cantidad de harina correspondiente al 42,11% respecto al peso del fruto entero; la disminución de los porcentajes, se debe a los residuos producidos después de la adecuación, es decir el retiro de cascara y pepas, además de las pérdidas de material en la molienda, tamizado y envasado, y a la pérdida de humedad del producto en el secado (tabla 5). En el trabajo elaborado por Segovia (2015) durante el proceso de adecuación y obtención de únicamente la pulpa de chontaduro, él obtuvo un rendimiento de aproximadamente 70%; mientras que en el trabajo presentado por Godoy *et al* (2006) durante el proceso de obtención de harina de chontaduro, los rendimientos de pulpa fueron del 52,3% y para la harina se tuvo un rendimiento del 25,4%, teniendo en cuenta la pérdida de agua que se dio durante el proceso de secado.

La diferencia en los rendimientos en la obtención de la pulpa se debe al estado del fruto, debido a que Godoy *et al* (2006) especifican que usaron materia prima de segunda y tercera categoría, es decir, frutos que presentaban daños mecánicos y que comercialmente no eran aceptados, por tal motivo el rendimiento en solo la pulpa es menor en comparación con el obtenido en este trabajo y en lo reportado por Segovia (2015), que en el proceso de selección evitó el empleo de productos con alguna alteración, al igual que se realizó en este proyecto, por eso se presentan rendimientos cercanos o superiores al 70% influyendo en la cantidad de harina de obtenida.

Se aclara que la humedad calculada para el fruto entero fue del 53,2% y la humedad registrada para la harina obtenida fue del 12%. Esto concuerda con lo reportado por Godoy *et al*, debido a que presentan datos de humedad para el fruto que varía entre 49,21% hasta 59,36% y para la harina entre 9% y 12%. Por otro lado, Segovia (2015) estableció una humedad para el fruto de 56,78%, igualmente cercana al valor determinado.

Tabla 5. Peso en gramos (g) del chontaduro adecuado y de la harina

	Fruto entero	Pulpa	Harina
Peso en g	5.795	4.550	2.440
Rendimientos	100%	78,5%	42,11%

En cuanto a la caracterización del fruto y de la harina, se obtuvieron los resultados expuestos en la tabla 6, teniendo en cuenta que, para azúcares reductores, actividad antioxidante y carotenos totales, se expone el promedio de los triplicados hechos para cada uno.

Tabla 6. Resultados de caracterización de fruta y harina

Pruebas	Fruta	Harina	Disminución (%)
Sólidos Solubles (°Brix)	2,3±0,1	2,2±0,1	4,30
pH	6,32±0,02	6,31±0,02	0,15
Contenido de azúcares reductores (mg/g BS)	1,41±0,03	1,25±0,07	11,35
Actividad antioxidante (mg eq Trolox/g)	142,11±1,5	80,74±0,7	43,18
Carotenos totales (µg/g)	26,27±0,472	23,76±0,923	7,60

El contenido de sólidos solubles (°Brix), en frutos como el chontaduro además de azúcares, incluye otros compuestos solubles en agua tales como, ácidos, vitamina C, aminoácidos y algunas pectinas (Daza, Rodríguez y Mosquera, 2015). Sin embargo, estos sólidos presentes no son significativamente altos, ya que los frutos de variedad roja tienen un contenido mínimo de 2,5 °Brix y máximo de 6 °Brix, dependiendo del grado de madurez del fruto. Teniendo en cuenta esto, se infiere que el fruto rojo empleado para este proyecto se encontraba levemente por debajo del estado óptimo de madurez, presentando un contenido de sólidos de 2,3 °Brix, concentración inferior a la descrita por Silva (2014), que empleó en su trabajo frutos de variedad roja con sólidos iniciales que varían entre 4,25 y 5 °Brix. Este factor pudo ser influyente en la obtención de azúcares reductores.

En relación a otra variedad de chontaduro, por ejemplo, la amarilla, según Daza, Rodríguez y Mosquera (2015), el contenido de sólidos solubles puede variar entre 2,3 y 6,2 °Brix, esto significa que entre variedades no hay una diferencia significativa en el contenido de sólidos solubles.

El contenido de azúcares reductores en el chontaduro rojo en fresco, según el CIAT (2002), varía entre el 0,8% y el 5,1%, mientras que la harina de chontaduro maneja un rango que va de 1,2% a 3% según Castillo (2006). Estos valores dependen de la madurez del fruto, dado que a mayor grado de madurez mayor será la cantidad de azúcares reductores presentes. Partiendo de esto, para el producto en fresco que se trabajó se obtuvo un valor de azúcares reductores de $1,41 \pm 0,03$ mg/g en base seca, lo que equivale a 0,71%, que al igual que los sólidos solubles, se encuentra levemente por debajo del rango reportado en bibliografía. Por otro lado, se observó una disminución en el contenido de azúcares reductores en la harina del 11,35%, que puede deberse a que los tratamientos térmicos a los que se sometió el producto para obtenerla pudieron alterar la concentración inicial de azúcares reductores, por lo tanto para la harina se obtuvo un contenido de $1,25 \pm 0,07$ mg/g en base seca lo que equivale a un 0,63%, valor por debajo de lo señalado por Castillo (2006).

El pH en el fruto de chontaduro se ve influenciado por la concentración de ácidos orgánicos en especial en la etapa de poscosecha, que hacen que éste disminuya progresivamente con el paso del tiempo (Daza, Rodríguez y Mosquera, 2015); por tal motivo no se estima un rango de pH óptimo para comercializar o trabajar el fruto. No obstante, los frutos trabajados presentaron pH de 6,32 que en comparación con los utilizados por Silva (2014) en su investigación (pH: 5,8 - 6,0) resultó ligeramente superior, mientras que comparados con lo obtenido por Daza, Rodríguez y Mosquera (2015), para la variedad de chontaduro rojo, quienes obtuvieron valores entre 6,8 y 7,0 de pH, resultan inferiores, posiblemente esta variación se encuentra asociada al nivel de madurez de los frutos empleados en los trabajos.

Según Castillo (2006), los procesos térmicos son considerados causantes de pérdidas en la actividad antioxidante de los alimentos como lo demuestra en su trabajo en donde las muestras de chontaduro que caracterizó (en crudo y procesadas), presentaron disminuciones en esta actividad luego de estos procesos. De ese modo, el fruto fresco en su trabajo presentó una actividad de 142,1 mg eq Trolox/g $\pm 1,5$ y después de someterse a una adecuación en donde se aplicó calor debido al escaldado y al secado, obtuvo una actividad antioxidante de 80,74 mg eq Trolox/g $\pm 0,7$.

La medición del contenido de carotenos totales es vital debido a que el chontaduro es fuente importante de β -caroteno, necesario para la formación de vitamina A. Según Rojas, Perez, Bustos y Vaillant (2011), los tratamientos térmicos tienen efecto sobre la disponibilidad de este compuesto, debido a que disminuyen el contenido de carotenos levemente, porque el calor promueve una isomerización del β -caroteno provocando un cambio en el color de los productos. Esto coincide con lo obtenido y observado en la adecuación de la harina, ya que el fruto fresco

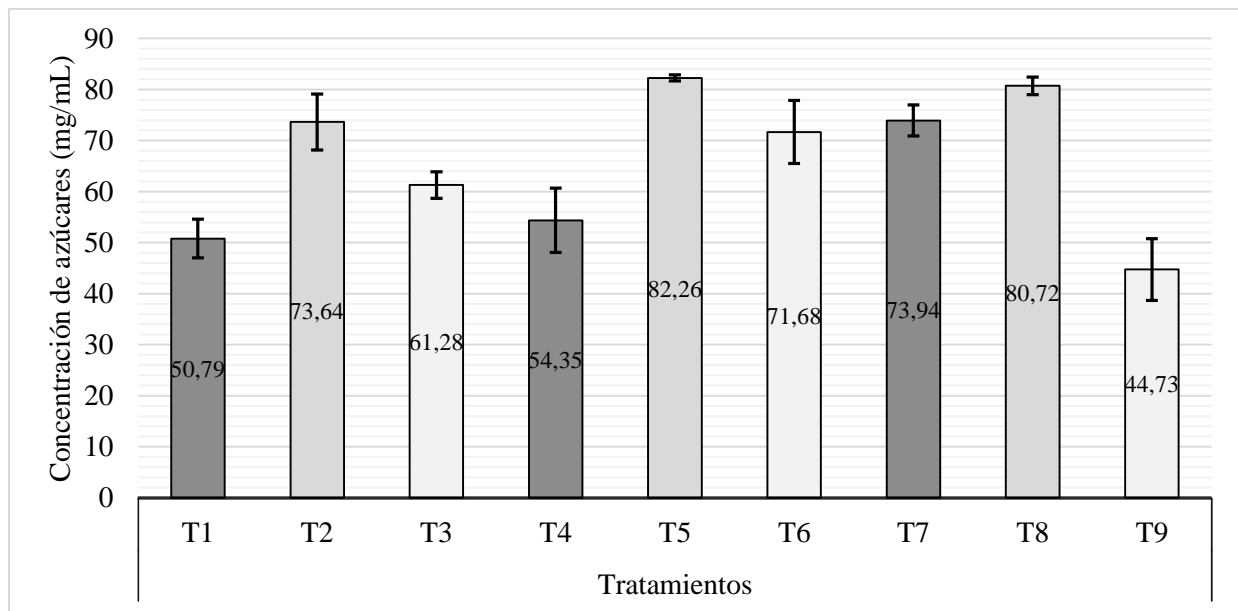
arrojó un contenido de 26,27 $\mu\text{g/g}$ de harina en base seca y después de someterse a escaldado (92°C por 30 min) y secado (60°C por 6 h), el contenido de carotenos disminuyó a 23,76 $\mu\text{g/g}$ BS.

3.2 LICUEFACCIÓN E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

El proceso de licuefacción tiene como objetivo gelatinizar el almidón que tiene la muestra de harina empleando calor, para facilitar el rompimiento de las cadenas de amilosa y amilopectina liberando la glucosa. En esta etapa, se evidenció visualmente que las muestras aumentaron notoriamente su viscosidad y se mantuvieron así, hasta que se agregó la enzima α – amilasa HT – 1000. Esto se debe a que ésta tiene la facultad de hidrolizar rápidamente las uniones alfa D-1,4 de los enlaces glucosídicos del almidón para producir dextrinas solubles y reducir la viscosidad del almidón gelatinizado (Carrascal, 2005).

Los resultados de la cuantificación de azúcares reductores luego de la hidrólisis enzimática con α - amilasa HT – 1000 para los diferentes tratamientos evaluados variando el tiempo y la concentración de la enzima se condensan en la figura 5.

Figura 5. Tratamiento estadístico de datos para la enzima α - amilasa



Observando la figura 5, se deduce que la combinación de las variables de tiempo y concentración de α – amilasa, correspondiente al tratamiento cinco (30 min y 0,3% de enzima), permite alcanzar la mayor concentración de azúcares reductores que es en promedio de $82,26 \pm 0,621$ mg/mL, mientras que el tratamiento que dio lugar a la menor cantidad de azúcares reductores fue el número nueve (60 min y 0,35% de enzima), con un contenido de azúcares reductores de $44,73 \pm 6,056$ mg/mL en promedio; esto se atribuye al tiempo de exposición de la enzima al proceso de hidrólisis. Estos resultados coinciden con lo mencionado por Silva (2014), quien en la hidrólisis de la harina empleó un tiempo de acción de 55 – 60 min para ambos tipos de chontaduro (rojo y

amarillo), observando que la producción de azúcares reductores fue menor a tiempos superiores a 45 min, probablemente debido al inicio de otros procesos metabólicos de transformación de los azúcares producidos inicialmente.

Del ANOVA realizado se observa que al nivel de significancia que se trabajó (95%), no se presentan diferencias significativas en cuanto a la producción de azúcares reductores debido a las variaciones de tiempo y concentración de enzima evaluadas en los tratamientos. Respecto a la interacción entre estas variables, ésta si presentó un efecto significativo sobre la variable de respuesta analizada. Esto se puede evidenciar en la tabla 7.

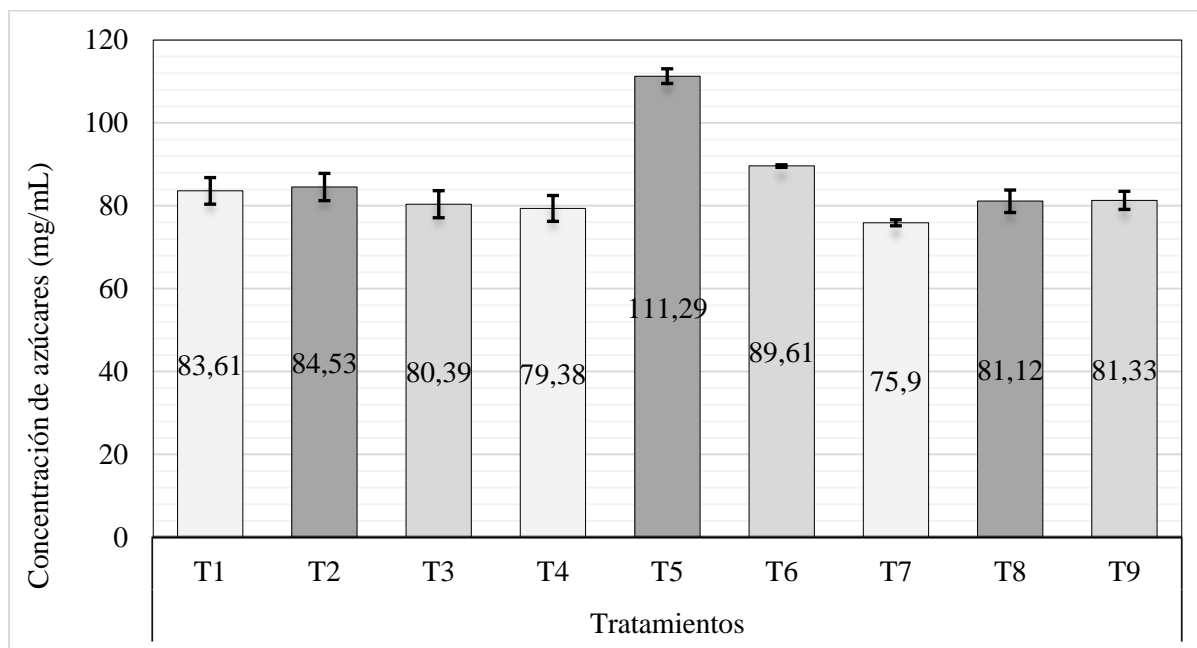
Tabla 7. Resultados ANOVA para la enzima α – amilasa

Condición	SC Ajust	MC Ajust	Valor F	Valor P
Concentración (%)	0,001122	0,001122	0,17	0,389 >0,05
Tiempo (min)	0,005082	0,005082	0,77	0,684 > 0,05
Tiempo (min) * Concentración (%)	0,052828	0,052828	8	0,01 < 0,05

Con esta información se estableció que el tratamiento que combina un tiempo de 30 min y una concentración de enzima α – amilasa de 0,3% fue el mejor para la obtención de azúcares reductores en esta fase. Se resalta también los beneficios en cuanto a costos entre T5 y T8, debido a que con menor cantidad de enzima se obtuvo una mayor contenido de azúcares.

Continuando con el proceso de hidrólisis, se realiza la sacarificación con glucoamilasa que pretende de igual manera liberar azúcares reductores. Para llevar a cabo esta etapa se tuvo que repetir el proceso de licuefacción y la sacarificación con α -amilasa empleado la concentración y tiempo que permitieron alcanzar la mayor concentración de azúcares reductores en la etapa anterior (0,3% y 30 min). Este hidrolizado se empleó como sustrato para la glucoamilasa *Naturalzyme* GA 300 L y con éste se evaluaron los tratamientos correspondientes a las variaciones de tiempo y concentración de enzima para establecer las condiciones que permitieron seguir aumentando el contenido de azúcares reductores. En la figura 6, se presentan los resultados obtenidos en esta etapa.

Figura 6. Tratamiento estadístico de datos para la enzima glucoamilasa



En la figura 6, se puede observar el efecto de las variables que fueron estudiadas (tiempo y concentración de glucoamilasa) sobre la variable de respuesta, es decir sobre la concentración de azúcares reductores. El valor más alto fue el obtenido para la concentración de 0,005% y el tiempo de 30 min, correspondiente al tratamiento catorce, que tuvo en promedio una concentración de azúcares reductores de $111,29 \pm 1,8$ mg/mL.

En lo reportado en el trabajo de Silva (2014), se muestra un aumento considerable entre la cantidad inicial de azúcares reductores y la cantidad obtenida después de realizada la hidrólisis enzimática con las dos enzimas, como sucedió en las muestras que en este estudio se evaluaron, mostrando el efecto favorable del uso de enzimas como glucoamilasa en la producción de azúcares reductores.

Otros autores como Rueda y Molina (2012), quienes evaluaron condiciones para la producción de jarabe de glucosa haciendo uso de la enzima glucoamilasa, indicaron que un tiempo de 30 min era ideal para incrementar la actividad enzimática, mientras que a tiempos de 45 min ésta disminuía. De igual forma al evaluar los datos obtenidos para la concentración escogida y según lo dicho por Tolan y Foody (citados en Córdoba y Molina, 2014), aunque a mayor concentración de enzima el proceso de hidrólisis es más rápido, existe un límite superior en cuanto a la conversión de materiales lignocelulósicos, dado que en este punto la accesibilidad de la enzima a la celulosa es limitada, por tal motivo a pesar de que se usen altos volúmenes de enzima, los rendimientos no presentarán un aumento, tal cual se pudo observar en la muestra evaluada.

Del ANOVA realizado y presentado en la tabla 8, se observa que las variables estudiadas (concentración y tiempo) y su interacción en los niveles estudiados no afectan la obtención de azúcares reductores, ya que para los tres casos los valores de P fueron mayores a 0,05.

Tabla 8. Resultados ANOVA para la enzima glucoamilasa

Condición	SC Ajust	MC Ajust	Valor F	Valor P
Concentración (%)	0,01792	0,017918	2,31	0,134 > 0,05
Tiempo (min)	0,01869	0,018687	2,41	0,142 > 0,05
Tiempo (min) * Concentración (%)	0,01610	0,01697	2,07	0,163 > 0,05

Con la información presentada en la figura 6 y los datos obtenidos del tratamiento estadístico realizados, se estableció que el tratamiento con una concentración de enzima glucoamilasa de 0,005 % y un tiempo de 30 min, fue el mejor para la obtención de azúcares reductores en esta fase.

- **Eficiencia de proceso de licuefacción e hidrólisis enzimática.**

Teniendo en cuenta la concentración de azúcares reductores más alta, obtenida al finalizar la hidrólisis enzimática ($111,29 \pm 1,8$ mg/mL), y la concentración obtenida para azúcares reductores en la harina de chontaduro ($1,25 \pm 0,07$ mg/g BS), se realizaron los cálculos mencionados en la metodología obteniendo en los resultados una eficiencia en la hidrólisis del 77,17% respecto al contenido de carbohidratos totales reportados por Blanco *et al.* (1992) para el fruto, y un incremento del 504,86% de la concentración de azúcares reductores luego de la hidrólisis respecto al contenido inicial de estos en la harina empleada, demostrando el efecto que tienen los procesos de licuefacción e hidrólisis enzimática.

- **Eficiencia respecto al contenido de carbohidratos totales del fruto.**

$$\% \text{Eficiencia} = 111,29 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times \frac{100 \text{ mL de H}_2\text{O}}{20 \text{ g de harina}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{100 \text{ g de producto}}{72,1 \text{ g de CHO}} \times 100 = 77,17\%$$

- **Incremento en el contenido de azúcares en la harina de chontaduro con el proceso de hidrólisis.**

$$\text{AR}_f \left(\frac{\text{mg}}{\text{g BS}} \right) = 111,29 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times \left(\frac{100 \text{ mL de H}_2\text{O}}{20 \text{ g de harina} \times (0,88)} \right) = 632,33 \frac{\text{mg}}{\text{g BS}}$$

$$\% \text{Incremento} = \frac{632,33 \left(\frac{\text{mg}}{\text{g BS}} \right) - 1,25 \left(\frac{\text{mg}}{\text{g BS}} \right)}{1,25 \left(\frac{\text{mg}}{\text{g BS}} \right)} = 504,86\%$$

3.3 FERMENTACIÓN

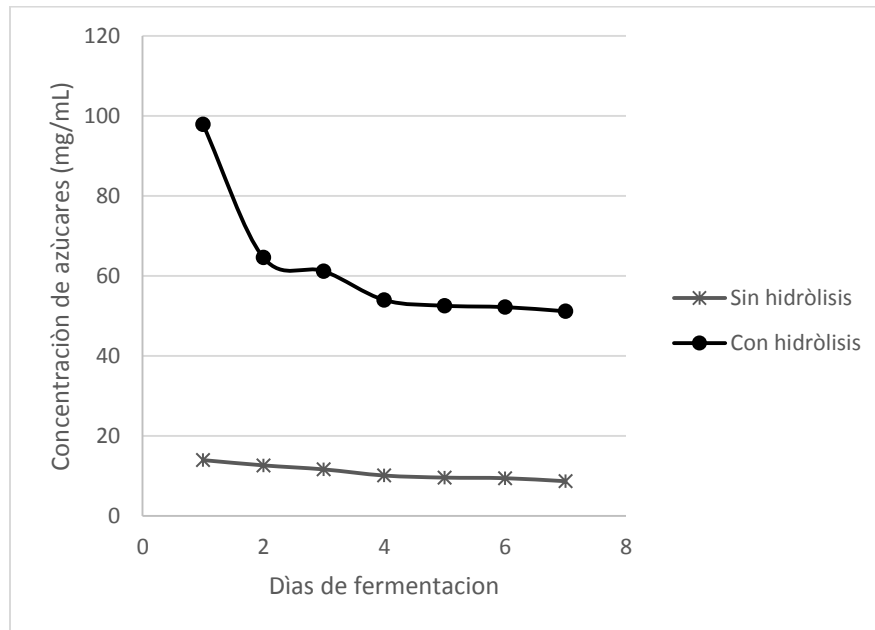
Para la etapa de la fermentación se emplearon 2 mezclas con 200 g de harina en 1 L de agua; una muestra correspondió al uso de harina sin hidrolizar y una adición de sacarosa al 15% y la otra fue obtenida aplicando los pre tratamientos de licuefacción e hidrólisis, teniendo en cuenta las mejores condiciones de hidólisis obtenidas en la fase anterior (para α – amilasa un tiempo de 30 min y una concentración de 0,3% y para glucoamilasa un tiempo de 30 min y una concentración de 0,05%).

Esta etapa de fermentación duró 8 días, durante los cuales se hicieron pruebas de contenido de azúcares reductores, sólidos solubles, pH, actividad antioxidante y carotenos totales, tal y como lo sugiere Sotero (1996). A continuación se presenta un resumen de las observaciones realizadas durante este tiempo.

- **Contenido de azúcares reductores.** Como se esperaba durante los días de fermentación, ocurrió una disminución de los azúcares debido a la acción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (figura 7), ya que esta se encarga de consumirlos para generar energía, producir etanol y dióxido de carbono (Gilces y Veloz, 2006). Se observó también, que la muestra con hidrólisis, llegó a un contenido final de azúcares reductores considerablemente más alto (51,2 mg/mL) que el alcanzado con la muestra sin hidrolizar (8,7 mg/mL), esto se atribuye a la concentración inicial de azúcares reductores que fue mucho mayor para la muestra hidrolizadas que para la muestra sin hidrolizar.

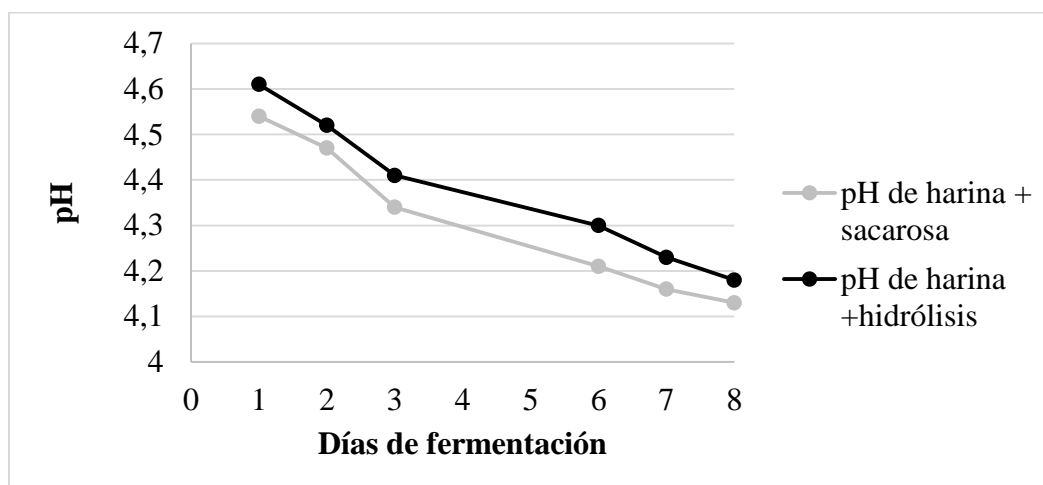
Hay que tener en cuenta que en la fermentación no se alcanzó estabilidad para el contenido de azúcares reductores, debido a que no hubo agotamiento de sustrato en ambas muestras, es decir, los azúcares reductores presentes no alcanzaron a ser consumidos en su totalidad, infiriendo que el proceso de fermentación no había culminado. Esto se puede comparar con lo señalado por algunos investigadores, acerca del proceso de fermentación, al sugerir que éste tiene las siguientes etapas: etapa inicial, contacto de la levadura con el mosto, multiplicación de las células con poder fermentativo y producción moderada de dióxido de carbono; puede demorar aproximadamente entre 4 y 6 h. Continuando se encuentra la etapa en que la levadura se alimenta de los azúcares reductores presentes en el medio y se da la formación de etanol, esto suele durar entre cinco y diez días. Por último, ésta la etapa estacionaria donde la actividad fermentativa y el metabolismo de la levadura comienzan a descender (Sotero, García y Lessi, 1996; Gilces y Veloz, 2006).

Figura 7. Contenido de azúcares reductores (mg/mL) durante la fermentación



- **Acidez iónica – pH.** Durante la fermentación se evidenció una disminución del pH para ambas muestras, esto debido a la presencia de ácidos orgánicos que pueden estar presentes naturalmente en el chontaduro o que surgieron de la degradación del almidón en las muestras (Rojas, Ugalde y Aguirre, 1998), comportamiento que se puede apreciar en la figura 8. Los valores para ambos fermentos son muy similares, ya que para la muestra con hidrólisis se registra un pH inicial de 4,61 y un final de 4,18 y para la muestra sin hidrólisis un inicial de 4,54 y un final de 4,13; comparando con otros autores, por ejemplo Sotero, García y Lessi (1996), quienes registran un pH inicial de 5,2 y uno final de 4,0 luego de 6 días de fermentación, los valores fueron inferiores, sin embargo esto puede estar asociado con la adición que ellos hicieron de sacarosa (37%), ya que esta pudo influenciar la formación de ácidos que se generan durante el proceso fermentativo, al propiciar que las células de las levaduras tomaran los nitrógenos de los aminoácidos, haciendo que estos pierden su carácter anfótero, trayendo como consecuencia una disminución mayor del pH (Garzón y Londoño, 2009).

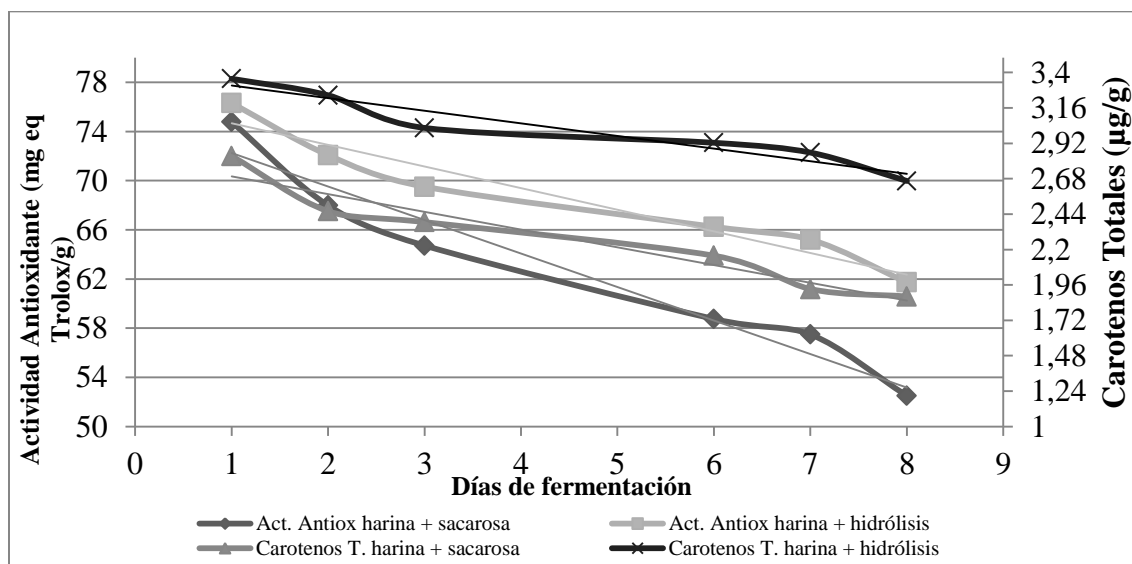
Figura 8. Relación del pH vs. días de fermentación



- **Actividad antioxidante y contenido de carotenos totales.** El contenido de carotenoides está estrechamente relacionado con la actividad antioxidante, debido a que los carotenos cumplen un papel importante en la protección del cuerpo contra enfermedades asociadas al estrés oxidativo, ya que estos tienen la capacidad de eliminar radicales libres. Según Jatunov, Quesada, Díaz, y Murillo (2010), el β - caroteno posiblemente es el responsable de la actividad antioxidante en el chontaduro, debido a que, según estudios, es el caroteno más representativo en este fruto y, además el comportamiento de este respecto a la actividad antioxidante es muy similar. Esto se puede corroborar en la figura 9, donde se relaciona el comportamiento de los carotenos y la actividad antioxidante en los ocho días de fermentación para ambas muestras; es evidente que, para la muestra sin hidrólisis, el contenido inicial de carotenos es más bajo (2,8341 $\mu\text{g/g}$) y disminuye más rápido a lo largo de la fermentación, lo mismo ocurre con la actividad antioxidante (74,7917 mg eq Trolox/g) en comparación con el hidrolizado.

Esta diferencia entre tratamientos, puede estar influenciada por el proceso de hidrólisis, porque según Benavides y Pozo (2008), las enzimas no llevan a cabo reacciones desfavorables, es decir, no modifican químicamente ningún aspecto del producto, debido a que al unirse al sustrato regulan muchas reacciones químicas. Esto significa que las enzimas además de contribuir a la producción de azúcares reductores, podrían ralentizar procesos de degradación en colaboración con la anaerobiosis en la que se realiza todo el proceso de fermentación.

Figura 9. Relación de actividad antioxidante (mg eq Trolox/g) y carotenos totales (µg/g) vs. días de fermentación



El comportamiento dependiente y decreciente entre actividad antioxidante y carotenos totales respecto al tiempo se evidencia con los valores de factor de correlación entre estas variables (R^2) para ambas muestras (tabla 9), esto quiere decir que el tiempo de fermentación se relaciona estrechamente con la disminución de estas variables para las dos muestras. La influencia de los tratamientos térmicos y la fermentación en la disminución de carotenos y actividad antioxidante se debe a que estos compuestos son lábiles y por lo tanto se pueden modificar estructuralmente a lo largo del tiempo y bajo la acción de la temperatura (Meléndez, Vicario y Heredia, 2004).

Tabla 9. Ecuaciones de la recta para actividad antioxidante y carotenos totales de cada muestra

Pruebas	Ecuación	R^2
Actividad antioxidante (harina + sacarosa)	$Y = -2,7276x + 74,982$	$R^2 = 0,950$
Carotenos totales (harina + sacarosa)	$Y = -0,1203x + 2,8168$	$R^2 = 0,932$
Actividad antioxidante (harina + hidrólisis)	$Y = -1,762x + 76,448$	$R^2 = 0,943$
Carotenos totales (harina + hidrólisis)	$Y = -0,085x + 3,3971$	$R^2 = 0,929$

La importancia de medir estos dos parámetros radica en los beneficios que traería al consumidor la posible retención de los carotenos en un producto sometido a licuefacción, hidrolisis y fermentación, como valor agregado al producto generado. Igualmente, las observaciones

realizadas dejan abierta la posibilidad de buscar condiciones de proceso que permitan disminuir las pérdidas actividad antioxidante y el contenido de β – carotenos con el fin de hacer más atractivo el producto final.

A continuación, se presenta el producto de la fermentación obtenido con el sustrato hidrolizado y con el sustrato sin hidrolizar. Se observa en la figura 10 que el sustrato hidrolizado presenta una coloración más oscura que el sustrato sin hidrolizar, posiblemente atribuida a la presencia de una mayor concentración de azúcares reductores, favoreciendo reacción de Maillard tal como lo explica Hernández (2009), pues la sacarosa como azúcar no reductor no presenta este tipo de reacción a menos que previamente sea hidrolizada, obteniendo sus correspondientes monosacáridos. Esta coloración, también se atribuye a una mayor concentración de carotenos (ya que estos presentan una coloración amarilla intensa).

Figura 10. Producto final con hidrólisis y producto final sin hidrólisis



Para finalizar, en la tabla 10 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en la caracterización de los productos finales es decir, luego de filtrar y pasteurizar:

Tabla 10. Caracterización de los productos finales.

Pruebas	Muestra harina + sacarosa	Muestra harina + hidrólisis
Contenido de azúcares reductores (mg/mL)	8,7±4,00	51,16±6,4
pH	4,12±0,17	4,17±0,17
Actividad antioxidante (mg eq Trolox/g)	50,83±2,30	61,18±0,50
Carotenos totales (µg/g)	1,86±0,16	2,59±0,22

En cuanto a la cantidad de azúcares reductores, de igual manera se observó que el proceso de hidrólisis enzimática permitió que en la muestra que fue hidrolizada, se lograra mantener un valor mayor, dado al efecto ya explicado que las enzimas tienen sobre las reacciones de degradación en la muestra (Benavides y Pozo, 2008).

Las mediciones de pH que se registran para una bebida fermentada destilada se encuentran en un rango de 3,09 a 3,45, siendo estos menores a los obtenidos en esta investigación. Sin embargo Silva (2014) sugirió valores levemente mayores para este parámetro, por ejemplo para las muestras provenientes de chontaduro rojo fermentadas con adición de sacarosa obtuvo en promedio un valor de pH para el producto final de 4,01 y para las muestras fermentadas luego de hidrólisis y sin adición de sacarosa registró un promedio final de 4,19.

Respecto a la actividad antioxidante en las bebidas fermentadas, en general ésta depende del contenido y combinación de polifenoles o de otros compuestos antioxidantes como vitamina C y E y carotenoides. Por ejemplo, para vinos blancos la actividad antioxidante varía entre 0,48 y 0,83mM eq Trolox/L y para los vinos tintos entre 3,95 y 11,49 mM eq Trolox/L; estas marcadas diferencias se atribuyen al contenido de flavonoides y antocianos que tiene cada producto, siendo para los vinos tintos mayor que para los vinos blancos (0,935 mM eq Trolox/L y 0,555 mM eq Trolox/L respectivamente (Fernández, Villaño, Troncoso, y García, 2006). Teniendo en cuenta esto, y en relación a lo obtenido en esta investigación, se corrobora la dependencia que existe en el contenido de carotenos y la actividad antioxidante, ya que para la muestra con harina hidrolizada se evidencian valores más altos de ambos parámetros que para la muestra con adición de una solución de sacarosa y esto se debe a la acción de la hidrólisis, como ya fue mencionado en análisis anteriores.

3.4 DESTILACIÓN Y CONTENIDO ALCOHÓLICO

En la tabla 11, se aprecia que existen diferencias significativas en cuanto al contenido de alcohol en los destilados expresado como °GL, pues la muestra hidrolizada se diferenció de la muestra con adición de sacarosa sin hidrólisis que se tomó como patrón o control, siendo la muestra con hidrólisis la que mayor cantidad de alcohol produjo.

Tabla 11. Datos de agrupación para los grados de alcohol

Factor	N	Media (%Vol de alcohol)	Agrupación
1 (control)	3	0,63	A
2	3	2,57	

Silva (2014), utilizando harina de chontaduro de la variedad roja sin hidrolizar y una adición de sacarosa de 15%, alcanzó un contenido de alcohol máximo 3,77°GL, mientras que con una muestra hidrolizada de la misma harina (2% de α – amilasa y 2% de glucoamilasa) alcanzó un

contenido de alcohol de 8,93 °GL luego de un mes de fermentación y realizando la medición del contenido de alcohol (°GL) sin hacer destilación. Esto puede sugerir que el contenido de alcohol en los tratamientos evaluados en este trabajo podría incrementarse si la fermentación se prolongara hasta alcanzar un mes.

En ese sentido, adicional a lo planteado en la metodología, se decidió prolongar la fermentación durante treinta días con el fin de evaluar la variación en la concentración de alcohol del fermento obtenido a partir del hidrolizado después de este tiempo (tabla 12). Se observó que el contenido de alcohol alcanzado fue de 5,5°G.L incrementando significativamente. En cuanto a la cantidad de azúcares reductores finales de la muestra trabajada, se obtuvo un valor de 8,11±0,15 mg/mL, indicando un mayor aprovechamiento del sustrato disponible y comparado con lo obtenido por Silva (2014), el valor coincide en el rango citado en ese trabajo que fue entre 8 y 8,5 mg/mL.

Tabla 12. Caracterización de producto fermentado durante treinta días

Pruebas	Muestra harina + hidrólisis
Contenido de azúcares reductores (mg/mL)	8,11±0,15
pH	2,82±0,17
Actividad antioxidante (mg eq Trolox/g)	48,06±4,8
Carotenos totales (µg/g)	1,09±0,11

Como aclaración acerca de los resultados vale la pena mencionar que a diferencia de la investigación propuesta en el estudio de Silva (2014), en este trabajo de grado se caracterizó la materia prima (fruta y harina) y los fermentos en cuanto a pH, carotenos totales y actividad antioxidante, además adicionar el procesos de licuefacción a la harina de chontaduro como etapa previa a la hidrólisis enzimática, con el fin de promover la conversión de almidones en azúcares para luego transformarlos en etanol. Además, las enzimas trabajadas en este proyecto de grado para la hidrólisis fueron diferentes, pues se emplearon las del proveedor PROENZIMAS: alfa amilasa en polvo (HT – 1000) y glucoamilasa líquida (GA 300 L), ambas provenientes de una cepa de *Aspergillus niger*, con actividad enzimática de 1'000.000 MWU/g y de 300 GAU/mL respectivamente, mientras que las empleadas por la autora antes mencionada tenían una actividad de 480 KNU para alfa-amilasa y 120 KNU para glucoamilasa. En cuanto a las condiciones de trabajo, las enzimas empleadas por Silva (2014) manejan temperaturas de acción más bajas, por

ejemplo, la α – amilasa trabaja a temperaturas de 40 a 60°C y a pH de 7 a 10 y la glucoamilasa maneja una temperatura óptima de 62°C y un pH entre 3,8 y 4,5.

CONCLUSIONES

- En la adecuación de la fruta para obtener la harina, se evidencia una disminución leve de todos los parámetros evaluados, teniendo en el caso de sólidos solubles un valor en la fruta de 2,3°Brix y un dato en la harina de 2,2 °Brix; para pH en la fruta se contó con un valor inicial de 6,32 y en la harina de 6,31. En cuanto a azúcares reductores el valor en la fruta fue de 1,41 mg/g BS y en la harina de 1,25 mg/g BS; para actividad antioxidante en la fruta se obtuvo 142,11 mg eq Trolox/g y en la harina de 80,74 mg eq Trolox/g y finalmente carotenos totales en la fruta se obtuvo 26,27 µg/g y en la harina 23,76 µg/g.
- Las concentraciones de enzimas y tiempos de proceso que permitieron alcanzar la máxima concentración de azúcares reductores luego de la etapa de hidrólisis y licuefacción fueron: 0,3% para alfa-amilasa y 0,005% para glucoamilasa, en combinación con un tiempo de hidrólisis de 30 min. Pues a pesar de que la variable de respuesta (concentración de azúcares reductores) en la mayor parte de los casos no se vio afectada significativamente por los factores estudiados (concentración y tiempo) si se pudieron apreciar algunas tendencias a partir de los datos registrados que permitieron establecer las condiciones antes definidas.
- Al caracterizar la fruta se registraron valores de 2,3°Bx y 1,41 mg de azúcares reductores/g BS, sugiriendo que quizás su estado de madurez no era el ideal. Esta situación pudo ser un factor influyente para la fermentación con la harina sin hidrolizar debido a la baja disponibilidad de estos azúcares para el proceso que se traduce en una baja producción de alcohol.
- En cuanto a las concentraciones evaluadas para alfa-amilasa y glucoamilasa, éstas se seleccionaron considerando lo recomendado en las fichas técnicas de ambas enzimas. Sin embargo se observó que a las concentraciones más altas de enzima y los tiempos de duración de la hidrólisis más largos dentro de los evaluados, se alcanzaron los menores contenidos de azúcares reductores (tiempos de 60 min y concentraciones de alfa-amilasa de 0,35% y glucoamilasa de 0,007%).
- Los pre-tratamientos realizados a la harina de chontaduro (licuefacción e hidrólisis enzimática), permitieron aumentar el contenido de azúcares reductores en el sustrato utilizado para la fermentación lo que se tradujo en un aumento en el contenido de alcohol alcanzado después de ésta. Para el sustrato hidrolizado este fue de 2,5°GL luego de destilación, en comparación con el sustrato no hidrolizado adicionado con sacarosa que alcanzó 0,6°GL.

- En cuanto al proceso de fermentación, se estableció que un tiempo de 8 días no es suficiente para transformar por completo los sustratos, haciendo que la producción de alcohol sea baja a comparación de una fermentación realizada durante un tiempo superior (30 días).
- El fermento obtenido al final del proceso, aunque no contaba con un volumen de alcohol alto (2,56 °GL), si presentaba una concentración de carotenos ($2,59 \pm 0,22 \mu\text{g/g}$) y una actividad antioxidante ($61,18 \pm 0,50 \text{ mg eq troloz/g}$) que es necesario destacar debido a los beneficios que presentaría a la salud humana de los consumidores.
- La producción de este tipo de fermentos con chontaduro, puede generar mayores oportunidades a quienes lo cultivan en el país, permitiendo disminuir perdidas poscosecha, generando mayores posibilidades para diversificar las ventas y aprovechando un producto nacional más allá de sus usos tradicionales.

RECOMENDACIONES

- Emplear chontaduro variedad roja que tenga sólidos solubles en la fruta entre 4,5 y 5 °Brix, para contar con una mayor concentración de azúcares reductores desde el inicio y obtener un producto con más contenido de alcohol.
- Hacer una comparación experimental con más variedades de chontaduro con el fin de validar si el comportamiento de todos los parámetros evaluados es similar y estandarizar con que variedad se puede obtener un mayor contenido de alcohol.
- Evaluar concentraciones y tiempos de hidrólisis (menores a 45 min) diferentes en la hidrólisis enzimática, para realizar una optimización del procesos de producción de azúcares reductores que favorezca la obtención de alcohol en la etapa posterior de fermentación.
- Realizar pruebas de colorimetría para corroborar la degradación de los β -carotenos durante los días de fermentación y durante el almacenamiento del producto.
- Realizar el proceso de experimentación por un período superior a un mes, con un muestreo a diario, con el fin de verificar más ampliamente el comportamiento de las variables estudiadas y para dar tiempo a un mayor aprovechamiento del sustrato disponible.
- Realizar el proceso de fermentación en cámaras de fermentación con un ajuste de temperatura constante y anaerobiosis completa, para estandarizar el proceso.
- Llevar a cabo un proceso desengrasado de la harina, de modo tal que se obtenga una cantidad mayor de azúcares fermentables durante el proceso de hidrólisis.
- Considerando los beneficios del consumo de chontaduro, asociados a sus componentes bioactivos (carotenos), sería interesante estudiar qué pasa con estos compuestos antes, durante y después de la fermentación para completar el conocimiento sobre el aporte nutricional y funcional que el producto obtenido pudiera tener.
- Realizar un control de crecimiento de biomasa (levadura) durante el proceso de fermentación, para incluir el comportamiento cinético en relación sustrato-producto.

- Llevar a cabo un análisis sensorial con el fin de caracterizar mejor el producto y poderlo catalogar como una bebida fermentada.

REFERENCIAS

- Acuña, H. (2009). Evaluación del comportamiento de tres enzimas comerciales en la fermentación y clarificación de mosto del fruto de corozo *Bactris minor* para obtener vino de fruta (Tesis de Pregrado). Universidad de la Salle. Bogotá. Recuperada de <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/16047/T43.09%20A93e.pdf?sequence=2&isAllowed=y>.
- Andrade, S., Pantoja, L., y Maeda, R. (2003). Melhoría do rendimento e do processo de obtenção da bebida alcoólica de pupunha (*Bactris gasipaes Kunth*). *Food Science and Technology (Campinas)*, 23(0), 34-38. Recuperado de <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612003000400007>
- Beltrán Mondragón, A. D., y Herreño Telléz, L. A. (15 de Enero de 2010). Aplicación de la enzima alfa-amilasa comercial BAN°480 a la harina de arroz de la variedad fedearroz 50 para la elaboración de una bebida vegetal. Universidad de la Salle. Bogotá. Recuperado de <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/15599/T43.10%20B419a.pdf?sequence=1>.
- Benavides, I. M., y Pozo, M. A. (2008). Elaboración de una bebida alcohólica destilada (Vodka) a partir de tres variedades de papa (*Solanum tuberosum*) utilizando dos tipos de enzima (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica del Norte. Ibarra. Recuperada de <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/327/1/03%20AGI%20226%20TESIS.pdf>.
- Benítez, R., Ibarz, A., y Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 42(2), 227-236. Recuperado en 04 de noviembre de 2016, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572008000200008&lng=es&tlng=es.
- Blanco, E., Montero, M., Fernandez, M. y Mora, J. (1992). Pejibaye palm fruit contribution to human nutrition. *Revista Principes*, 36(2), 66-69. Recuperado de <http://www.palms.org/principes/1992/vol36n2p66-69.pdf>
- Castillo, E. M. (Enero de 2006). Caracterización química de la harina de un fruto del Amazonas (*Bactris gasipaes*) crudo y procesado (Tesis de Pregrado). Universidad Simón Bolívar. Caracas. Recuperado de <http://159.90.80.55/tesis/000130476.pdf>.
- Carrascal, F. (2005). Obtención de dextrinas de alta solubilidad y mínima retrogradación a partir de almidón industrial de yuca (Tesis de Pregrado). Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. Recuperado de <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/457/2/116245.pdf>

- Centro Internacional de Agricultura Tropical. (2002). *CIAT*. Recuperado de [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/ULTIMO%20CHONTADURO%20\[Compatibility%20Model\].pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/ULTIMO%20CHONTADURO%20[Compatibility%20Model].pdf).
- Córdoba Perez, M., y Mólina Córdoba , M. (2014). Determinación del efecto de la concentración de la celulosa, celobiasa y de NaOH en la hidrólisis para la producción de etanol a partir del rastrojo de la piña. *Portal de Resvistas Académicas*. 24(2), 35-49.
- Daza, J. A., Rodriguez, J. L., y Mosquera, S. A. (Julio - Diciembre de 2015). Cambios fisiológicos, texturales y fisicoquímicos de dos variedades de chontaduro (*Bactris gasipaes*) en poscosecha. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(2), 67-75.
- Dumont, A., Raynal , C., Raginel , F., Ortiz-Julien, A., Suarez, C., y Heras , J. (2012). Capacidad de las levaduras enológicas de consumir fructosa. Recuperado de http://www.enoreports.com/pdf/caracter_fructofilo.pdf.
- Durango Ballesteros , E., Batista Jiménez, A., Cepeda Jiménez , I., y Tobón Guzman, H. A. (Junio de 2008). Producción de enzima amilasa microbiana mediante fermentación en sustrato líquido (Tesis de Pregrado). Universidad Pontificia Bolivariana. Montería. Recuperada de <http://es.slideshare.net/ojji/produccion-de-enzima-amilasa-microbiana-m-2>.
- Fajardo, E., y Sarmiento, S. (Agosto de 2007). Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae* (Tesis de Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Recuperada de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis26.pdf>.
- Fernandez , L. (2004). Efectos sobre la maduración y conservación de los frutos. Recuperado de <http://www.biblioteca.org.ar/libros/210851.pdf>.
- Fernández-Pachón, M^a Soledad, Villaño, Débora, Troncoso, Ana M^a, y García-Parrilla, M^a Carmen. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56(2), 110-122. Recuperado en 03 de noviembre de 2016, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222006000200002&lng=es&tlng=es.
- Fernández P. (2008, 29 de febrero). El pH en el vino. [web log post]. Recuperado de <http://www.vix.com/es/imj/gourmet/2008/02/29/el-ph-en-el-vino>
- Ferrer, Xavier (2004). Els llevats/Las Levaduras. Recuperado de <http://www.cuinant.com/elllevat1.htm>.

- Garzón Castaño, S. C., y Hernández Londoño, C. (Noviembre de 2009). Estudio comparativo para la producción de etanol entre *saccharomyces cerevisiae* silvestre, *saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *candida utilis* ATCC 9950 (Tesis de Pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira. Recuperada de <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/1689/66182g245.pdf;jsessionid=71E2EF4A02AF126F3BCD4755C02A4D08?sequence=1>.
- Gilces Farías, P. E., y Veloz Pinto, P. S. (s.f de s.f de 2006). Estudio del uso de los nutrientes para la levadura en fermentación con el propósito de mejorar la producción del alcohol etílico (Tesis de Pregrado). Universidad de Guayaquil, Guayaquil. Recuperada de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/737/1/975.pdf>.
- Godoy, S., Motta, E., Forero, C., Díaz, D., y Luna, G. (27 de Febrero de 2006). Estandarización de harina de chontaduro para fortalecer su cadena productiva en el departameteo del Cauca. *Revista Biotecnología*. 4(1), 105-111.
- Gonzales, L., Muñoz, P., y Valls, V. (2001). Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo. *Cerveza y salud*. 26-37.
- Instituto Valenciano de Microbiología, IVAMI (2015). *Zymomonas mobilis* en bebidas (cerveza, sidra y otras bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación) – Cultivo y detección molecular por PCR. Recuperado de <http://www.ivami.com/microbiologia-de-alimentos/648-zymomonas-mobilis-i-en-bebidas-cerveza-sidra-y-otras-bebidas-alcoholicas-obtenidas-por-fermentacion-cultivo-y-deteccion-molecular-por-pcr>
- Jatunov, S., Quesada, S., Díaz, C., y Murillo, E. (2010). Carotenoid composition and antioxidant activity of the raw and boiled fruit mesocarp of six varieties of *Bactris gasipaes*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 60(1), 99-104.
- Juri Awad , S., y Lienqueo Contreras, M. (Enero de 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 de Pregrado). Universidad de Chile. Santiago de Chile. Recuperada de http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2011/cf-juri_sa/pdfAmont/cf-juri_sa.pdf.
- Leighton, F., y Urquiaga, I. (3 de Diciembre de 1999). Los componentes del vino y sus efectos beneficiosos para la salud humana. Pontificia Universidad Católica de Chile., Santiago de Chile. Recuperado de <http://www.bio.puc.cl/vinsalud/publica/componentes.doc>
- Melendez, A., Vicario, I., y Heredia, F. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 54(2), 209-215.

Norma Técnica Colombiana 440. Productos alimenticios - Métodos de ensayo. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Bogotá, Colombia. (17 de febrero de 1971).

PROENZIMAS S.A. (2016). Ficha Técnica HT - 1000. Cali, Colombia.

Rojas, A., Ugalde, H., y Aguirre, D. (1998). Efecto de la adición de fruto de pejibaye (*Bactris gasipaes*) sobre las características nutricionales del ensilaje de pasto gigante (*Pennisetum purpureum*). *Agronomía Costarricense*, 22(2), 145 - 151.

Rojas, C., Perez, A., Bustos, J., y Vaillant, F. (2011). Identification and quantification of carotenoids by HPLC-DAD during the process of peach palm (*Bactris gasipaes H.B.K.*) flour. *Food Research International*, 44-7, 2377-2384.

Rueda Rojas, L. J., y Molina Velasco, D. R. (2012). Determinación de los parámetros cinéticos del extracto enzimático nativo de *Aspergillus spp.* para la producción de jarabes de glucosa (Tesis de Pregrado). Universidad Industrial de Santander Bucaramanga. Recuperada de <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/474/2/145149.pdf>.

Segovia Paredes, J. L. (Enero de 2015). Obtención de una bebida saborizada a partir de chontaduro (*Bactris gasipaes*) (Tesis de Pregrado). Escuela Politécnica Nacional. Quito. Recuperada de <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/9058/3/CD-6044.pdf>.

Silva, L. (2014). *Obtención de una bebida de bajo contenido alcohólico mediante hidrólisis y fermentación semi-sólida del chontaduro* (Tesis de Pregrado). Universidad Central de Ecuador. Quito. Recuperada de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/2778/1/T-UCE-0017-67.pdf>. Cita en el texto (Silva, 2014).

Sotero, V., García, D., y Lessi, E. (1996). Bebida fermentada a partir de pijuayo (*Bactris gasipaes H.B.K.*) parámetros y evaluación. *Folia Amazónica*, 8(1), 5 - 18.

Tovar del Río, J. (2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABST de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera (Tesis de Pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia. Recuperada de <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/3636/54763T736.pdf;jsessionid=390E440C0AD369C716A8478AE017C8F3?sequence=1>.

Universidad de Navarra. (ca. 2005). Concepto y expresión matemática del crecimiento bacteriano [Publicación de Google+]. Recuperado de <http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema%2002.pdf>. Cita en el texto: (Universidad de Navarra, 2005)

Universidad de Zaragoza. (07 de Febrero de 2014). Destilación [Publicación de Google+]. Recuperado de <http://ocw.unizar.es/ocw/ciencias-experimentales/tecnicas-basicas-de->

[laboratorio-quimico/teoria/Destilacion_teoría.pdf](#). Cita en el texto: (Universidad de Zaragoza, 2014).

Vega, D. F. (20 de Enero de 2011). Elaboración y control de vino de frutas de arazá (*Eugenia stipitata subsp. sororia*) (Tesis de Mestría). Centro de Estudios Superiores de la Industria Farmacéutica. Madrid, España.

ANEXOS

Anexo 1. Ficha técnica de enzima α – amilasa

FICHA TECNICA

Almidones

HT 1000 ©

Amilasa para Modificación de almidones

HT – 1000 es una nueva enzima alfa amilasa termoestable en polvo, de la familia de las carbohidrasas, obtenida por fermentación controlada de una Cepa especial que produce enzima de alta estabilidad y cumple con las especificaciones de Codex Alimentario (FCC), FDA y JECFA, para preparaciones enzimáticas grado alimenticio.

Esta enzima hidroliza rápidamente las uniones alfa D-1,4 de los enlaces glucosídicos del almidón para producir dextrinas solubles y reducir la viscosidad del almidón gelatinizado.

Efecto del pH

El rango efectivo de pH está entre 6,0 y 8, 0

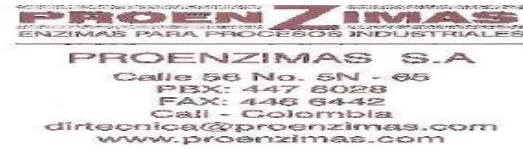
El pH óptimo de trabajo es 6,5

Efecto de la Temperatura

El rango efectivo de temperatura de trabajo para la HT – 1000 está entre 50 ° C y 90 ° C. La temperatura óptima de operación es de 70 ° C. La enzima muestra buen desempeño en niveles de temperatura inferiores a los óptimos señalados.

Propiedades Físicas

Forma	Polvo seco.
Color	Habano a ligeramente tostado.
Olor	Tenue Típico a fermentación
Sp. gr.	1,1 a 1,2 g. / ml.
Solubilidad	La porción enzimática es soluble en agua.
Actividad	1'000.000 MWU / g. + / - 5 %



La turbiedad que se presenta al diluir la enzima en agua, antes de la aplicación, se debe a las características del vehículo en el que se ha soportado.

USOS

HT – 1000 es un producto especialmente desarrollado para mejorar el proceso de reducción de viscosidad de soluciones y / o preparaciones con almidones de diferentes orígenes, lo cual permite un mejor desempeño de procesos de concentración, filtración, operaciones de secado, etc.

Se recomiendan las siguientes condiciones para el nivel de uso en el tratamiento de preparaciones con un 30 – 35 % de almidón en base seca, aclarando que la dosificación de enzima dependerá de las características finales requeridas de viscosidad del producto, del grado de modificación deseado y de las condiciones de proceso en general.

La preparación con base en almidones, debe ser previamente gelatinizada, sometiéndola a calentamiento previo, para que la enzima trabaje eficientemente. Una vez gelatinizados los almidones se debe adicionar entre 0,25 % y 0,35 % de enzima HT – 1000, en relación con el peso de almidón seco.

En procesos de Panificación, producción de galletas, biscochos y cereales precocidos e instantáneos, el nivel de uso, dependerá del tipo de harina que se va a manejar y del grado de transformación que se requiera para cada aplicación en particular.

Inactivación.

Para inactivar la enzima, es necesario llevarla a condiciones fuera de los rangos de temperatura y / o pH o una combinación de estos parámetros, por ejemplo la enzima se puede calentar hasta 100 ° C durante aproximadamente 10 minutos, reducir a 4,5 -5,0 o elevar a 8,0 el nivel de pH.

Almacenamiento y Manejo

La enzima HT– 1000 debe almacenarse en lugares frescos y secos a temperatura 25 ° C, en cuyo caso se puede disminuir la actividad enzimática máximo un 10 % en seis meses.

Para conservar mejor el producto por períodos largos, lo más conveniente es almacenarlo bajo refrigeración (5 ° C)

Anexo 2. Ficha técnica de glucoamilasa

FICHA TECNICA

Aplicación en Alimentos

Naturalzyme GA 300 L ©



Procesamiento de almidones, Jarabes y frutas

El almidón es un polímero de alto peso molecular con unidades de glucosa, unidas por enlaces glucosídicos, presente en cereales y frutas en forma natural.

Generalmente el almidón contiene un 15 a un 25 % de amilosa y entre un 75 a 85 % en amilopectina, constituyentes naturales de los almidones.

Bajo hidrólisis parcial, la molécula de almidón se rompe en un amplio espectro de oligosacáridos de bajo y alto peso molecular. La hidrólisis enzimática completa del almidón produce D – Glucosa con altos rendimientos.

La enzima Glucoamilasa (amiloglucosidasa) Naturalzyme GA 300 L, (amiloglucosidasa) tiene acción dextrinizante y sacarificante, haciendo posible hidrolizar almidón, amilosa, amilopectina y una gran variedad de oligosacáridos, obteniéndose rendimientos cuantitativos del 95 % al 97 %.

Propiedades

Enzima	Glucoamilasa
Actividad	300 AGU / ml
Forma	Líquido
Olor	Libre de olores desagradables
Color	Ambar
Solubilidad	Completamente soluble en agua

Actividad Enzimática

Naturalzyme GA-300L, tiene una actividad NLT 300 AGU / ml

Una unidad NG es la cantidad de enzima que liberará 1 gramo de dextrosa en una hora, bajo las condiciones del ensayo.

Mayor dosificación de enzima disminuirá el tiempo de proceso.

Dosificación

La cantidad de Naturalzyme GA-300L necesaria para dextrinizar y sacarificar el almidón, dependerá del contenido de almidón.

En términos generales, adicionando 50 a 70 ml. de Naturalzyme GA-300L por cada 1000 Kilos de pulpa, se observará total ausencia de almidón en 60-90 minutos a una temperatura de proceso entre 25 y 45 ° C. A menor temperatura de proceso se necesitará aumentar la cantidad de enzima.

Aplicación en Alimentos

Producción de cerveza

La producción de alcohol disminuye en las últimas etapas de la fermentación a menos que sea continuamente alimentada con azúcares fermentables. Naturalzyme GA 300L convertirá las dextrinas no fermentables en azúcares fermentables, incrementando el rendimiento de alcohol y reduciendo la concentración de carbohidratos en la cerveza. Naturalzyme GA 300L puede ser utilizada para alcanzar un alto grado de atenuación en la producción de cerveza de bajo tenor de carbohidratos y calorías.

Para optimizar el uso, recomendamos ensayar en proceso distintos niveles de dosificación que permitan definir la dosis entre 3,0 y 7,5 ml de Naturalzyme GA 300 L por cada 100 litros de medio de fermentador para producir cerveza de bajo nivel calórico.

Presentación

Se presentan en garrafas hasta por 20 kilos netos.

Otras presentaciones están disponibles a solicitud de nuestros clientes.

Almacenamiento

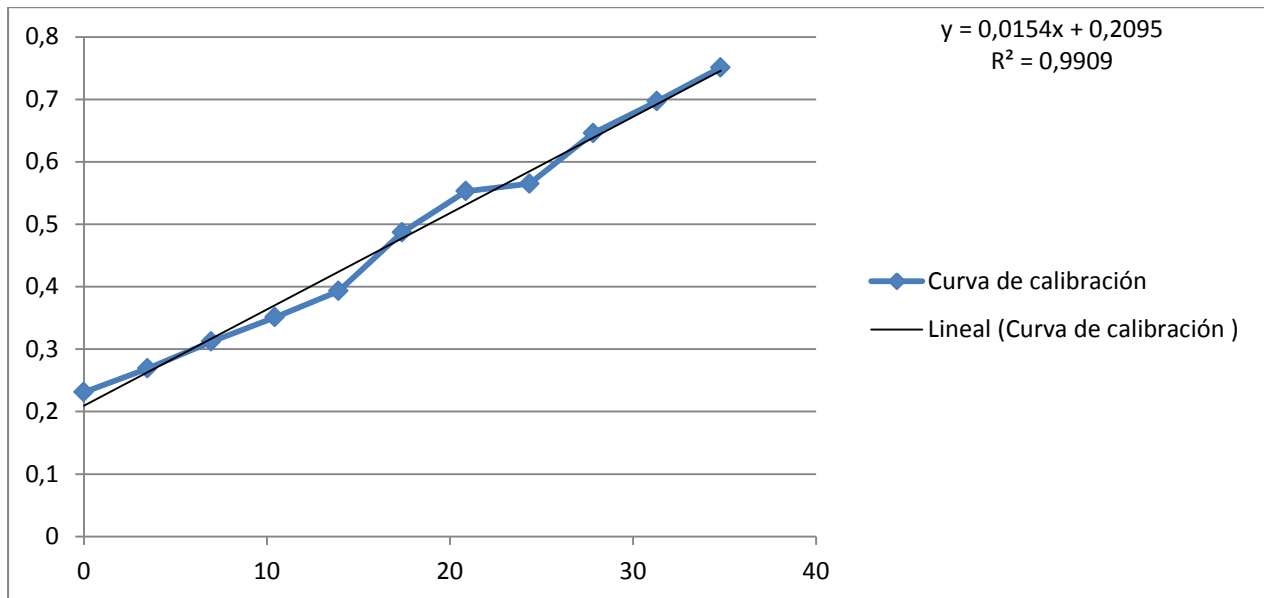
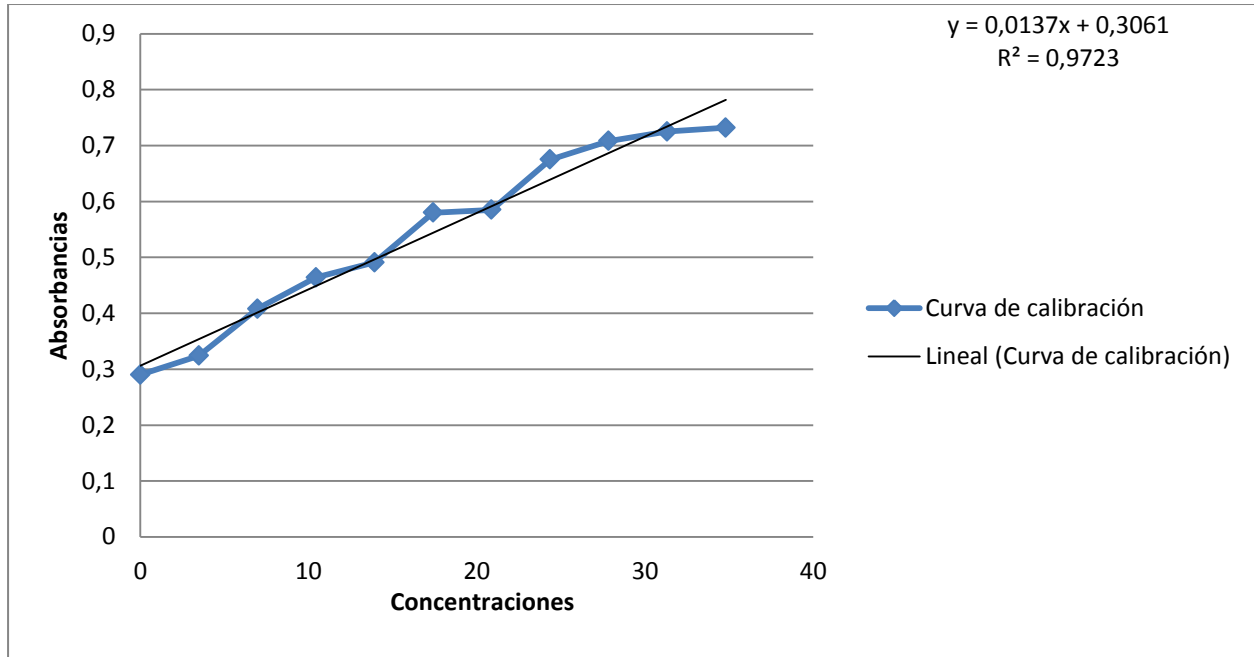
En un sitio fresco y seco (25° C), la pérdida de actividad es menor al 10% en 6 meses. Almacenamiento bajo refrigeración (5° C), preserva la actividad.

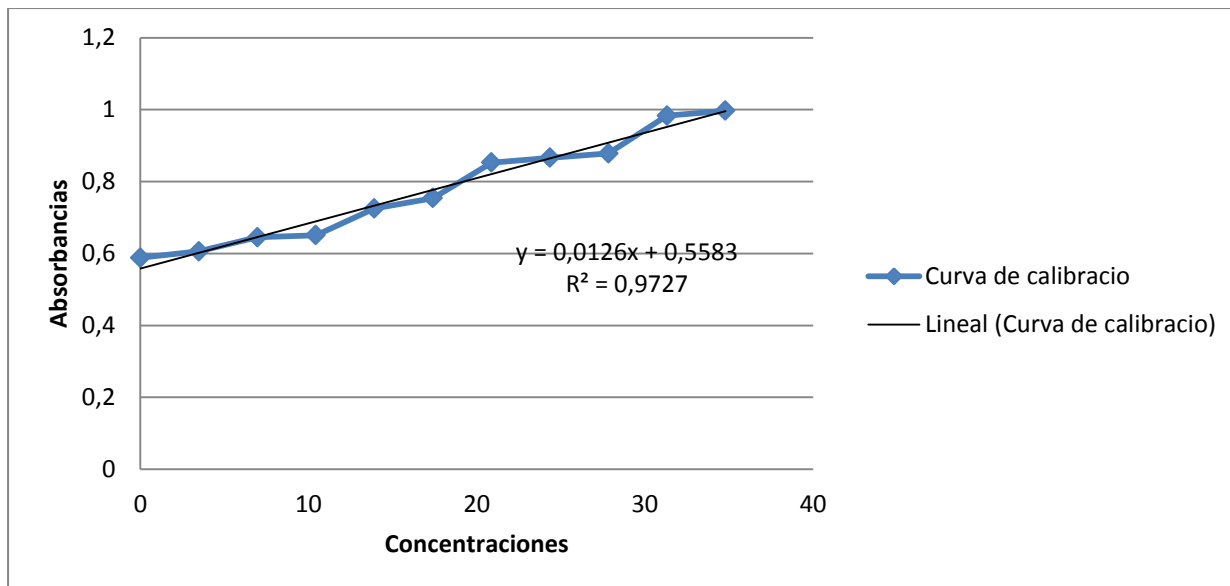
Anexo 3. Tabla de corrección del grado alcohólico volumétrico para referirlo a 15°C

Grado aparente señalado por el alcoholímetro

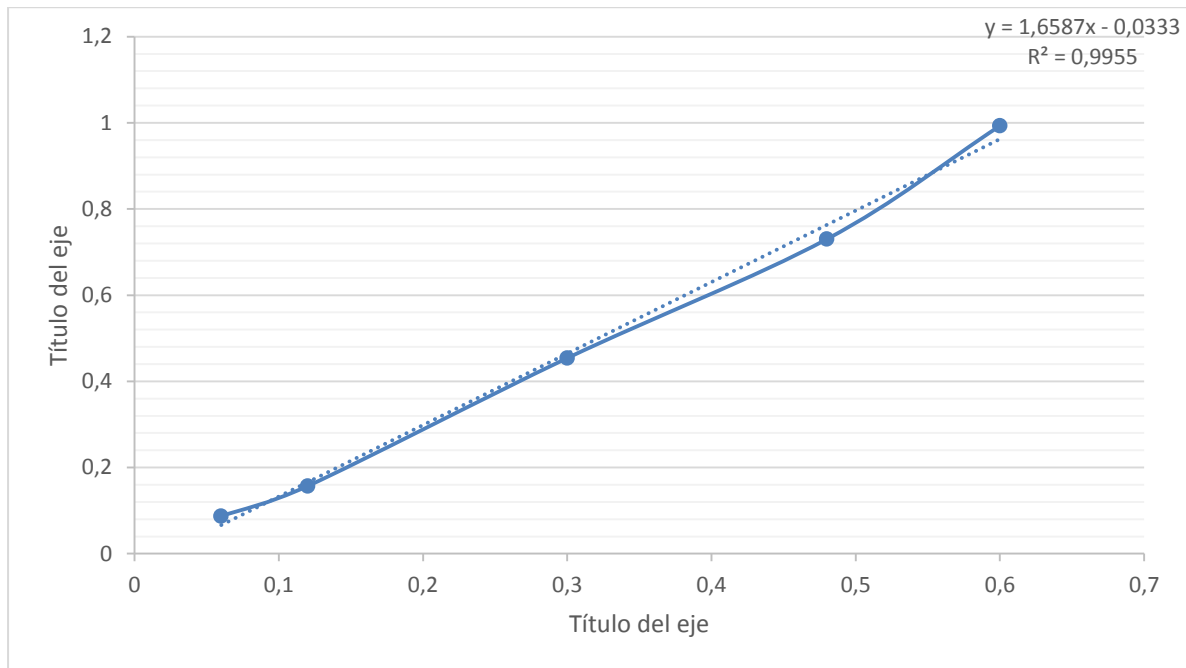
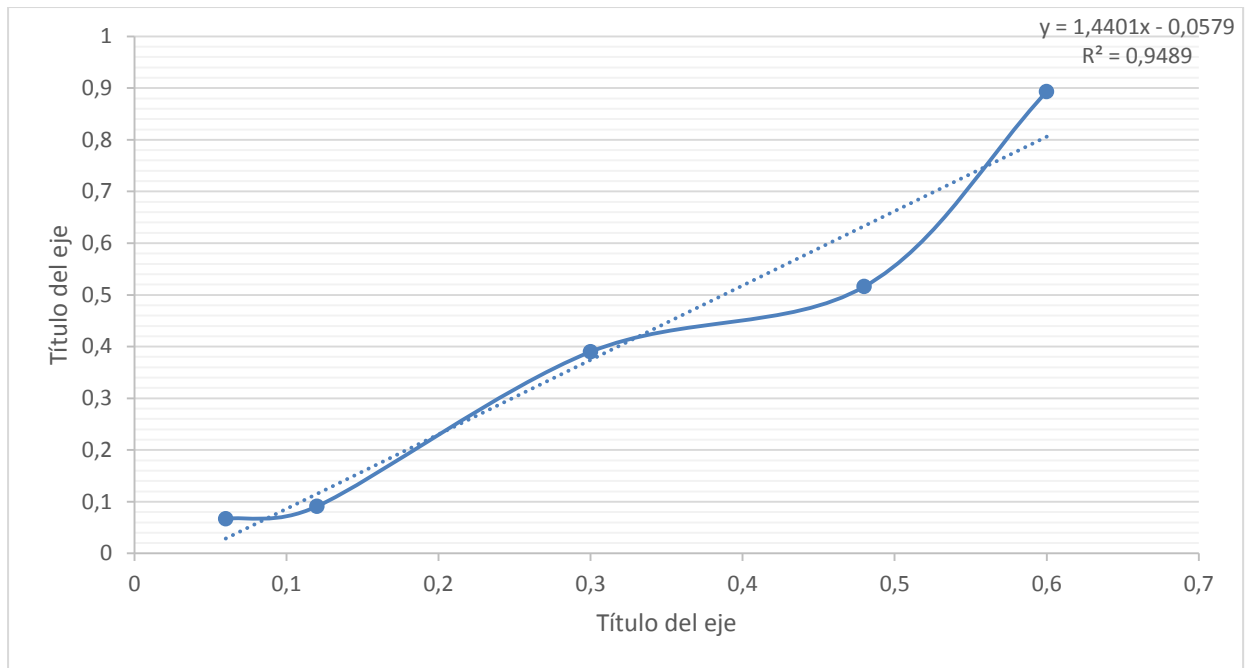
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
	Grado real a la temperatura normal																								
10°	1,4	2,4	3,4	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	10,6	11,7	12,7	13,8	14,9	16,0	17,0	18,1	19,2	20,2	21,3	22,4	23,5	24,6	25,7	26,8
11°	1,3	2,4	3,4	4,4	5,4	6,4	7,4	8,4	9,4	10,5	11,6	12,6	13,6	14,7	15,8	16,8	17,9	19,0	20,0	21,0	22,1	23,2	24,3	25,4	26,5
12°	1,2	2,3	3,3	4,3	5,3	6,3	7,3	8,3	9,3	10,4	11,5	12,5	13,5	14,6	15,6	16,6	17,6	18,7	19,7	20,7	21,8	22,9	24,0	25,1	26,1
13°	1,2	2,2	3,2	4,2	5,2	6,2	7,2	8,2	9,2	10,3	11,4	12,4	13,4	14,4	15,4	16,4	17,4	18,5	19,5	20,5	21,5	22,6	23,6	24,7	25,7
14°	1,1	2,1	3,1	4,1	5,1	6,1	7,1	8,1	9,1	10,2	11,2	12,2	13,2	14,2	15,2	16,2	17,2	18,2	19,2	20,2	21,2	22,3	23,3	24,3	25,3
15°	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0	13,0	14,0	15,0	16,0	17,0	18,0	19,0	20,0	21,0	22,0	23,0	24,0	25,0
16°	0,9	1,9	2,9	3,9	4,9	5,9	6,9	7,9	8,9	9,9	10,9	11,9	12,9	13,9	14,9	15,9	16,8	17,8	18,7	19,7	20,7	21,7	22,7	23,7	24,7
17°	0,8	1,8	2,8	3,8	4,8	5,8	6,8	7,8	8,8	9,8	10,8	11,7	12,7	13,7	14,7	15,6	16,6	17,5	18,4	19,4	20,4	21,4	22,4	23,4	24,4
18°	0,7	1,7	2,7	3,7	4,7	5,7	6,7	7,7	8,7	9,7	10,7	11,6	12,5	13,5	14,5	15,4	16,3	17,3	18,2	19,1	20,1	21,1	22,0	23,0	24,0
19°	0,6	1,6	2,6	3,6	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	10,5	11,4	12,4	13,3	14,3	15,2	16,1	17,0	17,9	18,8	19,8	20,8	21,7	22,7	23,6
20°	0,5	1,5	2,4	3,4	4,4	5,4	6,4	7,3	8,3	9,3	10,3	11,2	12,2	13,1	14,0	14,8	15,8	16,7	17,6	18,5	19,5	20,5	21,4	22,4	23,3
21°	0,4	1,4	2,3	3,3	4,3	5,2	6,2	7,1	8,1	9,1	10,1	11,0	11,9	12,8	13,7	14,6	15,5	16,4	17,3	18,2	19,1	20,1	21,1	22,1	23,0
22°	0,3	1,3	2,2	3,2	4,1	5,1	6,1	7,0	7,9	8,9	9,9	10,8	11,7	12,6	13,5	14,4	15,3	16,2	17,0	17,9	18,8	19,8	20,7	21,7	22,6
23°	0,1	1,1	2,1	3,1	4,0	4,9	5,9	6,8	7,8	8,7	9,7	10,6	11,5	12,4	13,3	14,1	15,0	15,9	16,7	17,6	18,5	19,5	20,4	21,4	22,3
24°		1,0	1,9	2,9	3,8	4,8	5,8	6,7	7,6	8,5	9,5	10,4	11,3	12,2	13,1	13,9	14,8	15,7	16,5	17,4	18,3	19,2	20,1	21,1	21,9
25°		0,8	1,7	2,7	3,6	4,6	5,5	6,5	7,4	8,3	9,3	10,2	11,1	12,0	12,8	13,6	14,5	15,4	16,2	17,1	18,0	18,9	19,8	20,7	21,6

Anexo 4. Curvas de calibración para actividad antioxidante





Anexo 5. Curva de calibración para azúcares reductores totales



Anexo 6. Datos de concentración de azúcares reductores (mg/mL) durante la hidrólisis enzimática con alfa-amilasa (HT-1000)

	Concentración 0,25% de enzima			Concentración 0,30% de enzima			Concentración 0,35% de enzima		
15 min	0,317	0,366	0,333	0,340	0,435	0,336	0,478	0,484	0,516
30 min	0,511	0,513	0,449	0,546	0,553	0,546	0,536	0,551	0,528
60 min	0,405	0,393	0,428	0,448	0,461	0,525	0,268	0,268	0,358

Anexo 7. Datos de concentración de azúcares reductores (mg/mL) durante la hidrólisis enzimática con glucoamilasa (GA-300L)

	Concentración 0,003% de enzima			Concentración 0,005% de enzima			Concentración 0,007% de enzima		
15 min	0,578	0,536	0,546	0,546	0,506	0,535	0,438	0,404	0,382
30 min	0,508	0,601	0,582	0,755	0,732	0,739	0,570	0,502	0,550
60 min	0,515	0,534	0,558	0,595	0,598	0,599	0,550	0,525	0,551