



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

DIRECCIÓN DE CARRERA: AGROINDUSTRIAS

**INFORME DE TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIA LA OBTENCIÓN
DE TÍTULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

MODALIDAD: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA:

**EFFECTOS DE LA FERMENTACIÓN LÁCTICA DEL
LACTOSUERO Y ALCOHÓLICA DEL MUCÍLAGO DE CACAO EN
LA CONCENTRACIÓN FINAL DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA**

AUTORES:

**HÉCTOR ANÍBAL ESPINOZA VACA
ESNAIDER FABIÁN MENDIETA GARCÍA**

TUTOR:

ING. FERNANDO ZAMBRANO RUEDAS, Mg.

CALCETA, NOVIEMBRE 2018

DERECHOS DE AUTORÍA

HÉCTOR ANÍBAL ESPINOZA VACA Y ESNAIDER FABIÁN MENDIETA GARCÍA declaramos bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentando para ningún grado de calificación profesional y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedemos nuestros derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí MFL, según lo establecido por la ley de propiedad intelectual y su reglamento.

HÉCTOR ANÍBAL ESPINOZA VACA

ESNAIDER FABIÁN MENDIETA GARCÍA

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

ING. JOSÉ FERNANDO ZAMBRANO RUEDAS, certifica haber tutelado el trabajo de titulación **EFFECTO DE LA FERMENTACIÓN LÁCTICA DEL LACTOSUERO Y ALCOHÓLICA DEL MUCÍLAGO DE CACAO EN LA CONCENTRACIÓN FINAL DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA**, que ha sido desarrollada por **HÉCTOR ANÍBAL ESPINOZA VACA Y ESNAIDER FABIÁN MENDIETA GARCÍA**, previa la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, de acuerdo **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López

ING. FERNANDO ZAMBRANO RUEDAS, Mg.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el trabajo de titulación **EFFECTO DE LA FERMENTACIÓN LÁCTICA DEL LACTOSUERO Y ALCOHÓLICA DEL MUCÍLAGO DE CACAO EN LA CONCENTRACIÓN FINAL DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA**, que ha sido propuesto, desarrollado por **HÉCTOR ANÍBAL ESPÍNOZA VACA Y ESNAIDER FABIÁN MENDIETA GARCÍA**, previa la obtención del título de **INGENIERO AGROINDUSTRIAL**, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

ING. RICARDO R. MONTESDEOCA PARRAGA. Mg
MIEMBRO

ING. DAVID W. MOREIRA VERA. Mg.
MIEMBRO

ING. EDITH M. MOREIRA CHICA Mg.
PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que nos dio la oportunidad de crecer como ser humano a través de una educación superior de calidad en la cual hemos forjado los conocimientos profesionales día a día;

A Dios por darnos salud y fortaleza,

A nuestros padres por ser nuestros guías, por el apoyo y la confianza que día a día nos brindan para alcanzar el éxito profesional,

A nuestro tutor Ingeniero Fernando Zambrano Ruedas por su ayuda en el tutelado en este proceso y

A nuestra facilitadora Ingeniera Katerine Loor por ser parte de nuestro proceso convirtiéndose en nuestra guía en la elaboración de la tesis.

DEDICATORIA

Sabemos lo que suele pasar, haces un proyecto, una tesis en mi caso, los demás la abren solo por la dedicatoria y descubren que, una vez más los autores han dedicado su trabajo.

Esto es para ustedes y por ustedes.

Dios, por supuesto que tú eres el primero en mi lista, porque decía alguien apreciado para mí, de hecho lo cantaba todo el tiempo y decía “todo te lo debo a Tí”, así de sencillo.

A mi Madre, mujer invaluable para mí, gracias por las atenciones de cada mañana, por las preocupaciones y por los regaños para que yo sea exactamente esa persona de la cual te sientas orgullosa.

A mi Padre, invaluable de igual forma, gracias por tu apoyo incondicional y por ayudarme a cumplir este sueño que también es tuyo y por darme tu nombre, créeme, me ha servido.

A los amigos que he hecho en mi etapa universitaria, gracias muchachos por permitirme hacerles bullying, no me burlaba de ustedes, nos reíamos juntos, a las tasas de café, el azúcar y los trabajos complicados de ciertos maestros que siempre nos mantuvieron en fraternidad, despiertos y risueños y claro, no podía olvidar a mi compañero de tesis.

Y por último pero no menos importante, dedicado a lo constantemente nuevo, a la duda metódica diaria de no saber qué hacer en ocasiones, al carácter desafiante, la risa incomparable, los sentimientos visibles, él “no se” constante, a la complejidad y todas su manías (encantadoras todas), en fin, dedicado a María Rosa Manzaba, con lo que tú ya sabes y por lo que probablemente sabrás.

Y como dice Gustavo Cerati, “GRACIAS TOTALES”.

HÉCTOR ANÍBAL ESPINOZA VACA

DEDICATORIA

A Dios por la salud y por permitirme llegar a este momento tan importante en mi formación profesional. A mis padres por su apoyo incondicional quienes me impulsaron día a día con su sabiduría y ejemplo de superación, quienes fueron muy importantes para alcanzar este objetivo, a mis amigos y compañeros que de una u otra manera me apoyaron para poder llegar hasta donde me encuentro ahora.

ESNAIDER FABIÁN MENDIETA GARCÍA

CONTENIDO GENERAL

| | |
|---|-------------|
| DERECHOS DE AUTORÍA | ii |
| CERTIFICACIÓN DEL TUTOR | iii |
| APROBACIÓN DEL TRIBUNAL..... | iv |
| AGRADECIMIENTO | v |
| DEDICATORIA..... | vi |
| DEDICATORIA..... | vii |
| CONTENIDO GENERAL..... | viii |
| CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS | x |
| CONTENIDO DE FIGURAS..... | xi |
| RESUMEN | xii |
| PALABRAS CLAVE | xii |
| ABSTRACT..... | xiii |
| KEYWORDS..... | xiii |
| CAPÍTULO I. ANTECEDENTES..... | 1 |
| 1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA..... | 1 |
| 1.2. JUSTIFICACIÓN..... | 3 |
| 1.3. OBJETIVOS | 4 |
| 1.3.1. OBJETIVO GENERAL..... | 4 |
| 1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 4 |
| 1.4. HIPÓTESIS | 4 |
| CAPITULO II. MARCO TEÓRICO..... | 5 |
| 2.1. LACTOSUERO | 5 |
| 2.1.2. COMPOSICIÓN DEL SUERO DE LECHE DULCE..... | 6 |
| 2.2. LEVADURAS UTILIZADAS EN UNA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA. | 6 |
| 2.3. PROCESOS FERMENTATIVOS..... | 6 |
| 2.3.1. TIPOS DE ENZIMAS UTILIZADAS EN LA HIDRÓLISIS DE LACTOSA | 7 |
| 2.3.2. ENZIMA HA-LACTASE..... | 7 |
| 2.3.2.1. DOSIS ESTIMADA DE LACTASA HA LACTASE 5200 | 7 |
| 2.4. CLASIFICACIÓN DE LAS BEBIDAS DE LACTOSUERO | 8 |
| 2.5. BEBIDAS FERMENTADAS | 9 |
| 2.6. MUCÍLAGO DE CACAO | 9 |
| 2.6.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL MUCÍLAGO DE CACAO..... | 9 |
| 2.6.1.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MUCÍLAGO DE CACAO | 10 |

| | |
|---|-----------|
| 2.7. BEBIDA ALCOHÓLICA..... | 10 |
| 2.7.1. CLASIFICACIÓN DE LAS BEBIDAS ALCOHÓLICAS..... | 11 |
| 2.7.2. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA | 11 |
| 2.7.3. PROPIEDADES GENERALES DE LOS ALCOHOLES | 13 |
| 2.7.3.1. ALCOHOLES SUPERIORES | 13 |
| 2.7.3.2. ALCOHOLES PRIMARIOS SECUNDARIOS Y TERCEARIOS..... | 14 |
| 2.7.3.3. OXIDACIÓN DE ALCOHOLES | 14 |
| 2.8. CONDICIONES NECESARIAS PARA LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA | 15 |
| 2.8.1. TEMPERATURA..... | 15 |
| 2.8.1.2. AIREACIÓN..... | 15 |
| 2.8.1.3. PH | 15 |
| 2.9. BEBIDA ALCOHÓLICA MIXTA | 16 |
| 2.10. NUTRIENTES ACTIVADORES UTILIZADOS EN LAS FERMENTACIONES ALCOHÓLICAS | 16 |
| 2.10.1. SULFATO DE AMONIO | 17 |
| 2.10.2. DOSIS UTILIZADAS DE SULFATO DE AMONIO | 17 |
| 2.10.3. METABISULFITO DE SODIO..... | 17 |
| 2.10.4. EL METABISULFITO DE POTASIO | 17 |
| 2.10.5. BICARBONATO DE SODIO..... | 17 |
| 2.11. SACCHAROMYCES CEREVISIAE..... | 18 |
| 2.11.1. SAFALE US 05..... | 18 |
| 2.12. REQUISITOS FISICOQUÍMICOS MICROBIOLÓGICO DE UNA BEBIDA | 19 |
| 2.12.1. REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS..... | 20 |
| CAPITULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO..... | 21 |
| 3.1. UBICACIÓN | 21 |
| 3.2. DURACIÓN..... | 21 |
| 3.3. MÉTODOS Y TÉCNICAS | 22 |
| 3.3.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS | 26 |
| 3.3.6 TÉCNICAS..... | 26 |
| 3.3.7. EVALUACIÓN SENSORIAL | 27 |
| 3.4. TRATAMIENTOS EN ESTUDIO | 27 |
| 3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL | 28 |
| 3.6. UNIDAD EXPERIMENTAL | 28 |
| 3.7. VARIABLES A MEDIR..... | 29 |
| 3.8. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO..... | 30 |
| 3.8.1. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO PARA EL LACTOSUERO DULCE..... | 31 |
| 3.8.2. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO PARA EL MUCÍLAGO DE CACAO | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 3.8.3. DESCRIPCIÓN DE LA MEZCLA DE LAS DOS MATERIAS PRIMAS | 32 |
| 3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 33 |
| CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 35 |
| 4.1. PARAMETROS FISICOQUÍMICOS DEL MUCÍLAGO DE CACAO..... | 35 |
| 4.2. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL LACTOSUERO DULCE | 36 |
| 4.3. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA Y CORRECCIÓN DE LOS MOSTOS COMBINADOS (LACTOSUERO DULCE – MUCÍLAGO DE CACAO) POST – FERMENTACIÓN | 37 |
| 4.4. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LAS VARIABLES (temperatura, pH, Acidez, ° Brix) EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN | 38 |
| 4.5. EVALUACIÓN DEL pH PARA LOS TRATAMIENTOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN | 40 |
| 4.6. EVALUACIÓN DE LA ACIDEZ TITULABLE DE LOS TRATAMIENTOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO | 41 |
| 4.7. EVALUACIÓN DEL ° BRUX EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN..... | 42 |
| 4.8. EVALUACIÓN DEL MEJOR TRATAMIENTO POST – FERMENTACIÓN | 43 |
| 4.9. ACIDEZ TITULABLE (PRUEBA NO PARAMÉTRICA)..... | 44 |
| 4.10. pH, ° BRUX, DENSIDAD y °GL (ANOVA) | 45 |
| 4.11. EVALUACIÓN SENSORIAL DE LA BEBIDA ALCOHÓLICA A PARTIR DE LACTOSUERO DULCE Y MUCÍLAGO DE CACAO..... | 47 |
| CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 49 |
| 5.1. CONCLUSIONES | 49 |
| 5.2. RECOMENDACIONES | 49 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 51 |
| ANEXOS | 55 |

CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS

| | |
|--|----|
| Cuadro 2. 1. Composición del suero de leche dulce..... | 6 |
| Cuadro 2. 2. Dosis estimada de HA Lactase 5200 | 8 |
| Cuadro 2. 3. Características fisicoquímicas del mucilago de cacao | 10 |
| Cuadro 2.4.Composicion química del mucilago de cacao | 10 |
| Cuadro 2. 5.Requisitos fisicoquímicos microbiológicos de una bebida alcohólica | 19 |
| Cuadro 2 6. Requisitos microbiológicos de una bebida alcohólica | 20 |
| Cuadro 3 1. Métodos y técnicas..... | 22 |
| Cuadro 3 2. Método y técnicas de caracterización fisicoquímica del mucilago de cacao variedad CCN51 | 23 |
| Cuadro 3 3. Método y técnicas utilizadas para caracterizar los diferentes tratamientos | 24 |
| Cuadro 3 4. Método y técnicas utilizadas para la evaluación fisicoquímica de la bebida alcohólica en función del tiempo de fermentación (60 horas)..... | 24 |

| | |
|--|----|
| Cuadro 3 5. Método y técnicas utilizadas para caracterizar los tratamientos una vez culminada la fermentación..... | 25 |
| Cuadro 3 6. Tratamientos en estudio..... | 27 |
| Cuadro 3 7. Composición de la unidad experimental | 29 |
| Cuadro 3 8. Diagrama de proceso de la bebida alcohólica | 30 |
| Cuadro 4 1. Parámetros fisicoquímicos del mucílago de cacao..... | 35 |
| Cuadro 4 2. Parámetros fisicoquímicos del lactosuero dulce | 36 |
| Cuadro 4 3. Caracterización fisicoquímica de los mostos a fermentar..... | 37 |
| Cuadro 4 4. Tratamientos (mostos) corregidos con bicarbonato de sodio | 38 |
| Cuadro 4 5. Evaluación de la temperatura de fermentación para los tratamientos | 39 |
| Cuadro 4 6. Evaluación de pH en función del tiempo de fermentación para todos los tratamientos | 40 |
| Cuadro 4 7. Evaluación de pH para los tratamientos en función del tiempo de fermentación | 41 |
| Cuadro 4 8. Evaluación de lo °Brix en función del tiempo de fermentación | 42 |
| Cuadro 4 9. Características fisicoquímicas finales de los tratamientos..... | 43 |
| Cuadro 4 10. Organización de resultados de la categoría de preferencia usando la prueba de basker ... | 48 |
| Cuadro 4 11. Resultados de significancia entre tratamientos mediante la prueba de Basker..... | 48 |

CONTENIDO DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Grafico 1. Representación de la temperatura de fermentación para cada tratamiento en función del tiempo de fermentación | 39 |
| Grafico 2. Evaluación del pH para los tratamientos en función del tiempo de fermentación | 41 |
| Grafico 3. Evaluación de la acidez para los tratamientos en función del tiempo de fermentación | 42 |
| Grafico 4. Evaluación del °Brix para los tratamientos..... | 43 |

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se aprovechó el lactosuero dulce, proveniente de la elaboración de queso criollo y mucílago de cacao de la variedad CCN 51, como un mosto combinado entre estas dos materias primas para la obtención de una bebida alcohólica. Por los sólidos presentes en el lactosuero dulce fue necesario aplicar una filtración por gravedad, en un ambiente frío mediante papel filtro con la finalidad de reducir el % inicial de grasa presente en esta materia prima, minimizar las reacciones enzimáticas y de acidificación producida por los lípidos. Para que la fermentación fuera expresamente alcohólica se hidrolizó el lactosuero con una enzima (lactasa) Ha-5200. Se realizaron pruebas preliminares donde los resultados demostraron que era necesario una corrección de los mostos con bicarbonato de sodio en relación del 0,3%. Se establecieron tres tratamientos donde la materia mucilagosa proveniente del cacao CCN51 estuvo en mayor relación para los tres tratamientos en estudio, donde quedaron establecidos de la siguiente manera, T₁ (10% lactosuero dulce – 90% mucílago de cacao); T₂ (20% lactosuero dulce – 80% mucílago de cacao); T₃ (30% lactosuero dulce – 70% mucílago de cacao). Mediante control de propiedades fisicoquímicas tales como: Temperatura, pH, acidez titulable y °Brix se estableció que el tiempo de fermentación para los mostos fue de 60 horas. Se utilizó un diseño DCA de tres tratamientos con cinco réplicas. Los resultados obtenidos determinaron al T₁ como mejor tratamiento corroborado con reportes bibliográficos, asimismo se enmarcó como el mejor tratamiento en la evaluación sensorial como el más preferido.

PALABRAS CLAVE

Propiedades fisicoquímicas, mosto combinado, reacción enzimática, relación, evaluación sensorial

ABSTRACT

In this research work sweet whey was taken advantage, from the criollo cheese produced by cocoa mucilage of the CCN 51 variety, as a must combined between these two raw materials to obtain an alcoholic beverage. For the solids present in the sweet whey it was necessary to apply a filtration by gravity, in a cold environment using filter paper in order to reduce the initial% of fat present in this raw material, minimize the enzymatic reactions and acidification produced by the lipids . For the fermentation to be expressly alcoholic, the whey was hydrolyzed with an enzyme (lactase) Ha-5200. Preliminary tests were carried out where the results showed that a correction of the musts with sodium bicarbonate in relation to 0.3% was necessary. Three treatments were established where the mucilagous matter from cocoa CCN51 was in greater ratio for the three treatments under study, where they were established as follows, T1 (10% sweet whey - 90% cocoa mucilage); T2 (20% sweet whey - 80% cocoa mucilage); T3 (30% sweet whey - 70% cocoa mucilage). By controlling physicochemical properties such as: Temperature, pH, titratable acidity and ° Brix it was established that the fermentation time for the musts was 60 hours. A DCA design of three treatments with five replicates were used. The results obtained determined T1 as the best treatment corroborated with bibliographic reports, also framed as the best treatment in sensory evaluation as the most preferred.

KEYWORDS

Physicochemical properties, combined must, enzymatic reaction, ratio, sensory evaluation.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Uno de los subproductos más generados a nivel mundial producto de la transformación agroindustrial, es el lactosuero, generándose aproximadamente un 90% de masa total de la leche utilizada. El mismo retiene cerca de 55% del total de sólidos totales de la leche (Rodriguez & Aldo, 2017). Por su parte Guerron (2015), indica que la producción diaria de lactosuero en Ecuador es de 1.202.850 kg.

El Censo Agropecuario del INEC (2013), revela que la provincia más productora de leche en Ecuador es Manabí, con una cantidad de 2.521.845 litros/día. Un estudio realizado por esta misma entidad, demostró que el 70% de esta producción es destinada a la elaboración de queso, del que se obtiene aproximadamente 1.765.291 litros/día de lactosuero.

Guerron (2015), declara que el lactosuero obtenido después de la elaboración de quesos, aproximadamente 53% se utiliza en alimentación de animales, fortificar bebidas y el 47% restante es descargado en suelos, drenajes y cuerpos de agua, tornándose un serio problema para el medio ambiente. Callejas, y otros (2012), manifiestan que algunas alternativas de utilización de este residuo han sido propuestas, pero son pocas las empresas que han logrado su aprovechamiento.

Por otra parte, otro de los subproductos generados en gran medida por la actividad agroindustrial, específicamente por la agrícola, es el mucílago del cacao variedad CCN51, atendiendo a que este producto tiene gran importancia dentro de la economía del país, por las exportaciones y materia prima para industrias locales de fabricación de chocolate y sus derivados

Ecuador exporta alrededor del 65% de la producción total de cacao fino de aroma en el mundo. De esta producción se desperdicia alrededor de 70 litros por tonelada de este subproducto (mucilaginoso). El volumen total de exudado es considerable y hasta ahora se le ha encontrado poco uso práctico (Vallejo, y otros, 2016).

A partir del marco de referencia anterior, Saval (2012), manifiesta que los residuos agroindustriales como estos (mucílago de cacao y lactosuero) son materiales en estado sólido, líquidos y semilíquidos que ya no son utilidad para el proceso que los generó, pero que son susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor económico como lo son las bebidas fermentadas.

El proceso biotecnológico fermentativo del lactosuero genera productos para el sector agroindustrial como proteína unicelular, galactosidasa, ácido acético, láctico y bebidas alcohólicas (Padin & Diaz, 2009). Así mismo Vallejo, y otros (2016), mencionan que parte de este mucílago pulpa es utilizado para la producción de bebidas alcohólicas y ácido acético a nivel artesanal.

Entonces, el problema al que se enfrenta la sociedad hoy en día frente al desperdicio de estos residuos agroindustriales es que no existe un claro aprovechamiento e industrializado debido al desconocimiento por parte de grandes, medianos y pequeños productores que son los que generan estos residuos, producto de la actividad agroindustrial, además que falta capacidad tecnológica y recursos económicos para darles un destino final. Por lo antes expresado se aclara que ya existen investigaciones referentes a estos residuos, especialmente del lactosuero, generándose a raíz de estas, productos de gran valor biológico tales como: bebidas fortificadas, proteínas aisladas, suplementos, producción de etanol entre otros, sin embargo estos productos son originados con la ayuda de una gran tecnología que abarca un gran costo, dejando de lado la idea de poder aprovecharlo por parte de quienes lo generan. Por otro lado, el mucílago de cacao no está altamente estudiado como un residuo, al que se le pueda dar una transformación que no valla más allá del ácido acético (vinagre) o una que otra bebida alcohólica artesanal. Existe investigación científica que demuestra las propiedades físicas y químicas de estos dos residuos y de lo que se podría obtener de éstos pero hasta el momento no se ha incursionado en la utilización de estas dos materias primas como un mosto para la obtención de una bebida alcohólica en la que se pueda aprovechar las propiedades combinadas de éstos dos residuos y que no requiera de una gran tecnología para poder llevar a cabo esta transformación.

En vista de lo antes expuesto y atendiendo la disponibilidad y poco uso de estos subproductos por parte de quienes lo generan, se plantea el siguiente problema científico

¿Será posible evaluar los efectos del mosto combinado de la fermentación láctica del lactosuero dulce y alcohólica del mucílago de cacao en la concentración final de una bebida alcohólica?

1.2. JUSTIFICACIÓN

La presente investigación tiene como objetivo aprovechar el lactosuero dulce y el mucílago de cacao, para la obtención de una bebida alcohólica, como alternativa de consumo para quienes gustan de disfrutar de una bebida; tomando en cuenta que el producto será procesado utilizando técnicas y métodos apropiados para la obtención de un producto de calidad.

La calidad de una bebida alcohólica depende en gran parte, de la utilización de las técnicas de fermentación idóneas para tal fin, en vista de que existen varios tipos de fermentación. Se pretende utilizar lactosuero dulce y mucílago de cacao como un solo mosto, se espera combinar las técnicas de fermentación láctica y alcohólica a las que atienden estos residuos agroindustriales con el fin de conseguir esta calidad única que caracteriza a una bebida alcohólica.

Con esto, se procura aportar en la generación de mayores ingresos para quienes producen estos subproductos de la actividad agroindustrial y por tanto a disminuir la contaminación ambiental. Además, con esta alternativa de producción se dinamizará la actividad económica con la generación de fuentes de trabajo a la sociedad.

Con el aprovechamiento de estos subproductos se espera lograr un producto innovador que genere un impacto científico para el desarrollo de futuras investigaciones al que se le puede evaluar las propiedades fisicoquímicas y organolépticas, elaborado en base a las normas legales de la (NTE INEN 2802).

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar los efectos de la fermentación láctica del lactosuero dulce y alcohólica del mucílago de cacao en el mosto combinado respecto a la concentración final de una bebida alcohólica.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las características fisicoquímicas del mucílago de cacao, lactosuero dulce y mosto combinado.
- Evaluar el comportamiento de la fermentación mediante seguimiento de consumo de sustrato.
- Establecer la mejor relación (lactosuero dulce – mucílago de cacao) mediante características fisicoquímicas post - fermentación.

1.4. HIPÓTESIS

La fermentación del mosto combinado mucílago de cacao y lactosuero dulce influye en la concentración final de la bebida alcohólica.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. LACTOSUERO

El lactosuero o suero de leche se define como un producto lácteo obtenido de la separación del coagulo de la leche, de la crema o de la leche semidescremada durante la fabricación del queso, mediante la acción ácida o de enzimas del tipo del cuajo (renina, enzima digestiva de los rumiantes) que rompen el sistema coloidal de la leche en dos fracciones: 1). Una fracción sólida, compuesta principalmente por proteínas insolubles y lípidos, las cuales en su proceso de precipitación arrastran y atrapa minoritariamente algunos de los constituyentes hidrosolubles. 2) una fracción líquida, correspondiente al lactosuero en cuyo interior se encuentran suspendidos todos los otros componentes nutricionales que no fueron integrados a la coagulación de la caseína. De esta forma, se encuentran en el lactosuero partículas suspendidas solubles y no solubles (Poveda E. , 2013). Por otra parte es un líquido translucido verde obtenido de la leche después de la precipitación de la caseína (Parra, 2009).

2.1.1. PROPIEDADES NUTRICIONALES

El lactosuero representa una rica y variada mezcla de proteínas secretadas que poseen amplio rango de propiedades químicas, físicas y funcionales (Araujo, Monsalve, & Quintero, 2013). La composición nutricional del lactosuero puede variar considerablemente dependiendo de las características de la leche utilizada para la elaboración del queso, el tipo de queso producido y del proceso de tecnología empleado en la elaboración del queso, existen dos tipos de suero dulce y ácido. Cuando se produce a partir de acción enzimática y contiene más lactosa es suero dulce, y el suero ácido, aquel que se obtiene por acción ácida, con mayor concentración de proteínas, así mismo en cuanto a minerales, el lactosuero puede contener aproximadamente el 90% del calcio, potasio, fósforo, sodio y magnesio presente en la leche, haciendo que este subproducto posea propiedades funcionales que son atribuidas a la fracción de

estos compuestos, las mismas que son usadas como ingrediente para varios propósitos en la industria alimenticia (Poveda E. , 2013).

2.1.2. COMPOSICIÓN DEL SUERO DE LECHE DULCE

En el cuadro 2.1.2. INTI (2013), menciona la composición del suero de leche dulce.

Cuadro 2. 1. Composición del suero de leche dulce

| COMPOSICIÓN DEL SUERO DE LECHE DULCE | | | | | | |
|--------------------------------------|------------------|--------------|-------------|-------------|------|------------|
| Lactosuero dulce | Materia seca (%) | Proteína (%) | Cenizas (%) | Lactosa (%) | pH | Acidez (%) |
| | 6,70 | 0,61 | 0,52 | 4,99 | 6,10 | 0,1-0,2 |

Fuente: (INTI, 2013)

2.2. LEVADURAS UTILIZADAS EN UNA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.

El procesamiento biotecnológico fermentativo del lactosuero para la obtención de diversos productos como bebidas se utilizan *Saccharomyces cerevisiae*, *Serratia marcescens*, *Candida pelliculosa*, *Lactobaacillus helvetius*, *Streptococcus thermophilus*, *Kluyveromyces fragilis* y/o *Kluyveromyces marxianus* (Padín & Diaz, 2009).

2.3. PROCESOS FERMENTATIVOS

Para llevar a cabo los procesos de obtención de diversos productos basados en la fermentación del lactosuero es conveniente realizar un fraccionamiento previo total o parcial, con el fin de extraer y/o concentrar los componentes que han de ser utilizados como sustrato. El fraccionamiento convierte al lactosuero en una materia prima útil, logrando un lactosuero desproteínizado, desmineralizados y con altas concentraciones de lactosa (Ramirez, 2011).

2.3.1. TIPOS DE ENZIMAS UTILIZADAS EN LA HIDRÓLISIS DE LACTOSA

La lactosa es el principal azúcar encontrado en la leche y en los sueros de quesería y su proceso por hidrólisis es necesario desde distintos puntos de vista. Esta hidrólisis tiene lugar principalmente por acción de enzimas actividad β galactosidasa (Paris, 2009).

Las fuentes comerciales de β -galactosidasa (lactasas) microbianas incluyen a las especies de levaduras *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* y *Candida kefir*, las cuales son utilizadas en la hidrólisis de la lactosa en leche por tener un pH óptimo adecuado para este propósito. Por otra parte, las lactasas obtenidas de los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* tiene un pH óptimo ácido por lo cual más bien se utilizan en la hidrólisis de lactosa en suero para obtener los jarabes dulces de suero (García & Gomez, 1996).

2.3.2. ENZIMA HA-LACTASE

Es una solución líquida estandarizada neutra de β -galactosidasa (lactasa) producida por fermentación sumergida sobre un sustrato vegetal con una cepa seleccionada de la levadura *Kluyveromyces lactis*, que se mantiene bajo condiciones controladas y no está presente en el producto final. Hidroliza la lactosa, produciendo una mezcla de glucosa y galactosa (Intriago & Vera, 2017). Sánchez y otros (2015), manifiesta que la dosis a utilizar de lactasa puede estar comprendida entre 2,9 ml a 4,4ml/l con una temperatura de reacción a 40°C durante 1 hora de reposo, con un grado de hidrolisis del 80%.

2.3.2.1. DOSIS ESTIMADA DE LACTASA HA LACTASE 5200

Se puede obtener el grado de hidrólisis deseado utilizando la combinación correcta de temperatura, tiempo y dosis durante la reacción. La temperatura óptima de Ha-Lactasa está entre 35-45°C. A temperaturas superiores a 50°C la enzima es desnaturalizada (CHR HANSEN, 2014):

Cuadro 2. 2. Dosis estimada de Ha Lactase 5200

| Dosis de HA Lactase (ml/l) | Tiempo de reacción (h) | Temperatura de reacción (°C) | Grado de hidrólisis (%) |
|----------------------------|------------------------|------------------------------|-------------------------|
| 0,2 – 0,4 | 1 | 40 | 20 |
| 0,9 – 1.4 | 1 | 40 | 50 |
| 2,9 – 4,3 | 1 | 40 | 80 |

Fuente: (CHR HANSEN) citado por (Intriago & Vera, 2017)

2.4. CLASIFICACIÓN DE LAS BEBIDAS DE LACTOSUERO

El suero ha sido utilizado como la materia prima principal en la elaboración de bebidas fermentadas con una acidez final del 0,54 % de ácido láctico con buena aceptabilidad por parte de los consumidores (Rodríguez & Aldo, 2017).

Bebidas límpidas: dulces, aromatizadas, no alcohólicas, gaseosas o no, obtenidas a partir del lactosuero desproteínizado. Puede reducirse la adición de azúcar mediante hidrólisis de la lactosa.

Bebidas proteinizadas, en forma de leche, tras homogenización con la nata, o en forma de mezclas de zumo e frutas o de legumbres. Están poco extendidas

Bebidas alcohólicas: en cervecería se ensaya la introducción del lactosuero hidrolizado en el mosto. Puede hacerse un vino de lactosuero, con o sin adición de azúcar, con o sin adición de aromas (Endara, 2002). Conti, y otros (2012), mencionan que las bacterias ácido lácticas (BAL) son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria como cultivos iniciadores y/o adjuntos en la elaboración de diversos productos fermentados.

Se han realizado diversos trabajos con el fin de convertir al lactosuero, generalmente dulce, en una bebida apta para consumo humano. Especies ácido lácticas termófilas y mesófilas del tipo: *Acetobacter aceti*, *Brettanomyces bruxelensis*, *Candida kefir*, *Gluconobacter oxydans ssp*, *Gluconoacetobacter xylinus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus casei*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. Kefir*, *Leu-conostoc mesonteroides*, *Saccharomyces cere-visiae*, *Streptococcus salivarius*, y *Sc. lactis*, *Sc. lactis ssp*, se han empleado para obtener bebida láctea saborizadas, tipo refresco, bebida agria tipo “kombucha”, bebida fermentada y bebida alcohólica de 11,46±0,81 °GL y de 35.4% v/v etanol. El

limitante, al transformar al lactosuero en una bebida, es del tipo sensorial, provocando una reducción en su consumo (Ramirez, 2011).

2.5. BEBIDAS FERMENTADAS

Casas y otros (2015), menciona las principales bebidas fermentadas que a continuación se detallan:

Cerveza, el vino, la sidra, el ron, el wihisky, el tequila, el sotol.

En general, las bebidas fermentadas pueden alcanzar en promedio una concentración de alcohol que oscila entre 3.5° y 14% (v/v), mientras que las destiladas alcanzan una concentración de 35% a 55% (v/v). En ambos tipos de bebidas pueden intervenir diferentes géneros de levaduras.

2.6. MUCÍLAGO DE CACAO

López (2013), menciona que cada fruto contiene entre 30 y 40 semillas, que una vez secas y fermentadas se convierten en cacao en grano. Las semillas son de color marrón rojizo exteriormente y están cubiertas de una pulpa blanca y dulce. Goya (2013), describe que el mucílago es una sustancia viscosa, generalmente hialina, que contiene el cacao. Está conformado por polisacáridos celulósicos que contienen el mismo número de azúcares que las gomas y pectinas. Los mucílagos se suelen confundir con las gomas y pectinas, diferenciándose de estas sólo en las propiedades físicas. Así mismo Ortiz & Álvarez (2015), la pulpa mucilaginososa está compuesta por células esponjosas parenquimatosas, que contienen células de savia ricas en azúcares (10-13%), pentosas (2-3%), ácido cítrico (1-2%) y sales (8-10%).

2.6.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL MUCÍLAGO DE CACAO

En el cuadro 2.3 se muestra la composición del mucílago de cacao de la variedad CCN 51

Cuadro 2. 3. Características fisicoquímicas del mucilago de cacao

| PARÁMETROS | CACAO CCN 51 |
|-----------------|--------------|
| Acidez (%) | 0,91 |
| pH | 3,87 |
| °Brix (%) | 16 |
| Densidad (g/ml) | 1,076 |
| Humedad (%) | 80,5 |
| Proteína (%) | 0,38 |

Fuente: Vallejo, y otros (2016).

2.6.1.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MUCÍLAGO DE CACAO

Cuadro 2.4 Ortiz & Álvarez muestran la composición del mucílago de cacao.

Cuadro 2.4. Composición química del mucilago de cacao

| COMPOSICIÓN | %p/p (base húmeda) |
|---------------|--------------------|
| Agua | 79,2- 84,2 |
| Proteína | 0,09 – 0,11 |
| Azúcares | 12,50 – 15,9 |
| Glucosa | 11,6- 15,32 |
| Pectinas | 0,9 – 1,19 |
| Ácido cítrico | 0,77 – 1,52 |
| Cenizas | 0,40 – 0,50 |

Fuente: Vallejo, y otros (2016).

2.7. BEBIDA ALCOHÓLICA

Se engloban bajo el término de bebidas alcohólicas todas aquellas que contienen alcohol etílico o etanol en su composición, siendo diversas las fuentes vegetales, e incluso animales, a partir de las cuales se obtienen, así como los sistemas de elaboración empleados. Se elaboran a partir de líquidos azucarados sometidos a fermentación alcohólica por adición de levaduras que, en anaerobiosis, van a metabolizar los azúcares sencillos dando CO₂ y etanol (Astiasarán & Martínez, 2003).

Mientras que López (2013), menciona que las bebidas alcohólicas son bebidas que contienen etanol (alcohol etílico). La cantidad de alcohol de un licor u otra

bebida alcohólica se mide bien por el volumen de alcohol que contenga o bien por su grado de alcohol.

2.7.1. CLASIFICACIÓN DE LAS BEBIDAS ALCOHÓLICAS

Bebida Alcohólica Fermentada.- Obtenida a partir de mostos fermentados y no ha sido sometida a destilación.

Bebida Alcohólica Destilada.- Obtenida por destilación y/o rectificación de mostos fermentados, procesados adecuadamente (Aimaretti, Ybalo, Escorcía, & Codevilla, 2012).

2.7.2. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

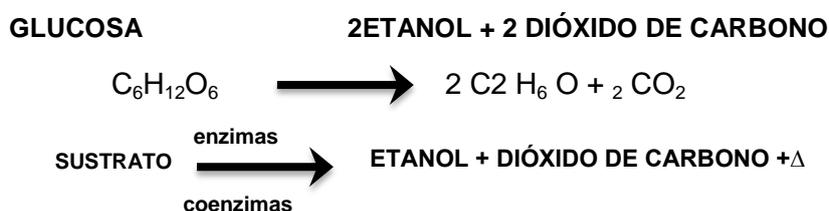
La fermentación alcohólica es llevada a cabo principalmente por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que es la levadura corriente del pan o la cerveza, quien convierte un 90% del azúcar en cantidades equimoleculares de alcohol y CO₂ (Vasquez & Dacosta, 2007). López (2013), manifiesta que esta levadura sigue un metabolismo fermentativo cuando está en condiciones anaerobias, pero cuando hay oxígeno hace una respiración aerobia y no produce alcohol.

Suarez, y otros (2016), manifiesta que es una levadura heterótrofa, que obtiene la energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa, las levaduras son seleccionadas atendiendo a criterios de mejora técnica en aspectos como concentración alcohólica, cantidad de azúcar mientras que Reyes, y otros (2000), mencionan que la fermentación puede caracterizarse como un proceso de hidrólisis o alcohólica, en condiciones anaeróbicas, donde intervienen microorganismos como levaduras, que transforman el azúcar de la pulpa en alcohol y anhídrido carbónico, a la vez que comienza a elevarse la temperatura.

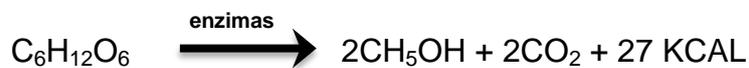
Wacher (2011), menciona el consorcio de levaduras que consume el oxígeno, creando un ambiente anaerobio que favorece el desarrollo de bacterias

lácticas. Con un ambiente aerobio y menos ácido debido al consumo de ácido cítrico se favorece el desarrollo de bacterias acéticas.

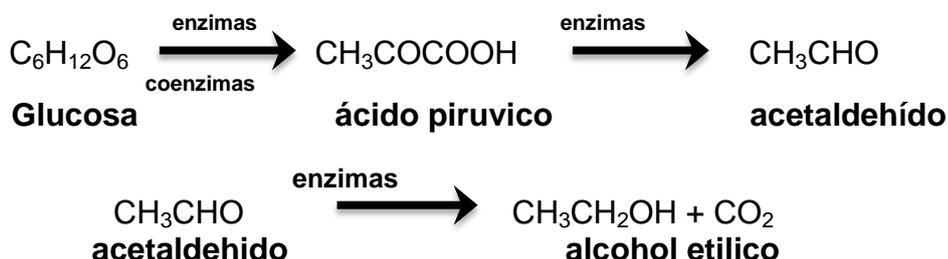
Aimaretti, y otros (2012), manifiestan que la fermentación puede definirse como un proceso de biotransformación en el que se llevan a cabo cambios químicos en un sustrato orgánico por la acción de enzimas sintetizadas por microorganismos conocidos como catalizadores bioquímicos o biocatalizadores, en este caso, capaces de convertir las hexosas del mosto en etanol cuando las condiciones son anaeróbicas, tal y como se indica en la siguiente reacción



También hacen referencia a que se puede definir a la fermentación alcohólica como el resultado del catabolismo anaeróbico de la célula. El sustrato es rico en azúcares que son tomados por la célula para su desdoblamiento. La manera más simple de representar el proceso es:



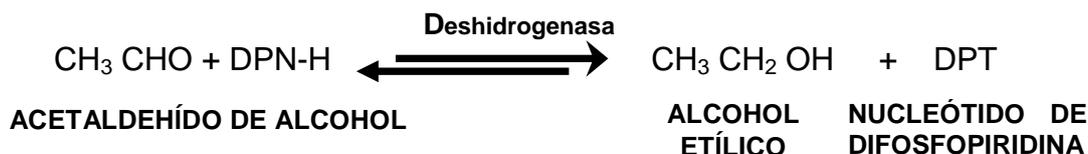
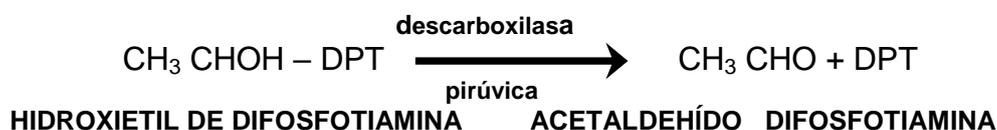
En realidad, este proceso es muy complejo, en él intervienen 51 enzimas y 3 sistemas coenzimáticos. El enlace entre la glucosa y los productos finales, etanol y dióxido de carbono, es el ácido pirúvico:



Aimaretti, y otros (2012), además menciona que en la transformación de la glucosa a ácido pirúvico interviene todo un conjunto de enzimas que Embden Meyerhot denominaron glucólisis; y por actuar el ácido fosfórico en la fosforilación. En su conjunto, el proceso recibe el nombre de glicólisis con

fosforilación o vía de ciclo de Embden Meyerhof, como más comúnmente se le conoce.

Luego, el desdoblamiento del ácido pirúvico, formado por glucólisis, hasta etanol y dióxido de carbono, ocurre como sigue:



2.7.3. PROPIEDADES GENERALES DE LOS ALCOHOLES

Los alcoholes son líquidos incoloros de baja masa molecular y de olor característico, solubles en el agua en proporción variable y menos densa que ella. Al aumentar la masa molecular, aumentan sus puntos de fusión y ebullición, pudiendo ser sólidos a temperatura ambiente por ejemplo el pentaeritritol funde a 260 °C (Cabrera, 2012).

2.7.3.1. ALCOHOLES SUPERIORES

En la fermentación alcohólica, junto con el etanol, muchos compuestos denominados minoritarios son producidos. En la producción de algunas bebidas destiladas, estos compuestos se consideran impurezas y su concentración puede ser lo suficientemente elevada como para rendir un desagradable sabor y olor penetrante en el producto, así como aportar una

sensación de aspereza al paladar (Alvarez, Valdés, García, Porto, & Hernandez, 2005).

Los alcoholes superiores son producidos por las levaduras durante la fermentación alcohólica, ya sea catabólicamente (Vía Erlich) mediante la conversión de la cadena de aminoácidos relacionados estructuralmente presentes en el medio o de novo a partir de cetoácidos; en este caso, las levaduras emplean en parte, la misma vía biosintética usada en la formación de los aminoácidos correspondientes (Alvarez, Valdés, García, Porto, & Hernandez, 2005).

2.7.3.2. ALCOHOLES PRIMARIOS SECUNDARIOS Y TERCEARIOS

López (2013) menciona los tipos de alcoholes presentes en una fermentación que a continuación se detalla:

ALCOHOL PRIMARIO: los alcoholes primarios reaccionan muy lentamente. Como no pueden formar carbocationes, el alcohol primario activado permanece en solución hasta que es atacado por el ión cloruro. Con un alcohol primario, la reacción puede tomar desde treinta minutos hasta varios días.

ALCOHOL SECUNDARIO: los alcoholes secundarios tardan menos tiempo, entre 5 y 20 minutos, porque los carbocationes secundarios son menos estables que el terciario.

ALCOHOL TERCIARIO: los alcoholes terciarios reaccionan casi instantáneamente, porque forman carbocationes terciarios relativamente estables.

2.7.3.3. OXIDACIÓN DE ALCOHOLES

ALCOHOL PRIMARIO: se utiliza la Piridina (Py) para detener la reacción en el aldehído $\text{CrO}_3 / \text{H}^+$ se denomina reactivo de Jones, y se obtiene un ácido carboxílico (López, 2013)

ALCOHOL SECUNDARIO: se obtiene una cetona + agua (López, 2013).

ALCOHOL TERCIARIO: si bien se resisten a ser oxidados con oxidantes suaves, si se utiliza uno enérgico como lo es el permanganato de potasio, los alcoholes

terciarios se oxidan dando como productos una cetona con un número menos de átomos de carbono, y se libera metano (López, 2013).

2.8. CONDICIONES NECESARIAS PARA LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

2.8.1. TEMPERATURA

Las levaduras son microorganismos mesófilos, esto hace que la fermentación pueda tener lugar en un rango de temperaturas desde los 13-14°C hasta los 33-35°C. Dentro de este intervalo, cuanto mayor sea la temperatura mayor será la velocidad del proceso fermentativo siendo también mayor la proporción de productos secundarios. Sin embargo, a menor temperatura es más fácil conseguir un mayor grado alcohólico, ya que parece que las altas temperaturas que hacen fermentar más rápido a las levaduras llegan a agotarlas antes. La temperatura más adecuada para realizar la fermentación alcohólica se sitúa entre los 18-23°C y es la que se emplea generalmente en la elaboración de vinos blancos (Collado, 2001).

2.8.1.2. AIREACIÓN

Una aireación sumamente excesiva es totalmente absurda ya que, entre otras consecuencias, no obtendríamos alcohol sino agua y anhídrido carbónico. Debido a que las levaduras, cuando viven en condiciones aeróbicas, no utilizan los azúcares por vía fermentativa sino oxidativa, para obtener con ello mucha más energía (Collado, 2001).

2.8.1.3. PH

Una aireación sumamente excesiva es totalmente absurda ya que, entre otras consecuencias, no obtendríamos alcohol sino agua y anhídrido carbónico., menos para la de las bacterias, prefiriendo convivir con valores más elevados. Cuanto menor es el pH peor lo tendrán las levaduras para fermentar, aunque más protegido se encuentra el vino ante posibles ataques bacterianos (Collado, 2001).

2.9. BEBIDA ALCOHÓLICA MIXTA

Bebida obtenida por la mezcla de una o más bebidas alcohólicas o alcohol etílico rectificado neutro o extra neutro de origen agrícola o destilados alcohólicos simples o sus mezclas, con otras bebidas, o productos de origen vegetal o animal o aditivos alimentarios permitidos. Puede ser gasificada. Se podrá utilizar la denominación “crema” para aquellos productos que contengan materias primas lácteas, sus derivados, sustitutos lácteos o más de 250 g/L de azúcares (NTE INEN 2802, 2015).

2.10. NUTRIENTES ACTIVADORES UTILIZADOS EN LAS FERMENTACIONES ALCOHÓLICAS

Las levaduras fermentativas necesitan los azúcares para su catabolismo, es decir para obtener la energía necesaria para sus procesos vitales pero además necesitan otros substratos para su óptimo desarrollo. El crecimiento de la levadura, bajo la limitación de ciertos nutrientes como nitrógeno, carbono, azufre, potasio, fósforo u otros elementos, sobre produce determinados metabolitos o enzimas (Marcillo & Meza, 2010).

Los zumos de la mayor parte de la fruta son relativamente deficientes en compuestos nitrogenados, por lo que antes de iniciar la fermentación de este tipo de mosto, se le añaden nutrientes, como fosfato di amónico, sulfato de amonio, cloruro amónico, sulfato amónico o carbonato amónico (Marcillo & Meza, 2010).

Las sales de amonio se consideran la forma nitrogenada que mejor se asimila por las levaduras durante el proceso de fermentación. La solución de cloruro de amonio (NH_4Cl) como ácido débil reacciona con concentrados de ácidos para formar cloruro de hidrógeno y con bases fuertes para formar amoníaco (Miyares, y otros, 2015).

2.10.1. SULFATO DE AMONIO

El sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ está compuesto por el anión sulfato y el catión amonio; éste presenta buena estabilidad química. Estas sales se utilizan en las fermentaciones para suplementar las cantidades deficitarias de nitrógeno y estabilizar el pH del medio de cultivo.

El ion amonio es un compuesto químico que forma parte del ciclo del nitrógeno. Este componente en exceso, ejerce un efecto perjudicial en el proceso fermentativo, ya que inhibe el crecimiento microbiano (Miyares, y otros, 2015).

2.10.2. DOSIS UTILIZADAS DE SULFATO DE AMONIO

Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck) 1mg/mL. 0,24 g/L (Blanco, Quicazán, & Cuenca, 2012).

Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1-0,3 gr/Lt (Marcillo & Meza, 2010).

Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck) 1mg/mL (Miyares, y otros, 2015).

2.10.3. METABISULFITO DE SODIO

Antioxidante en la preparación de vegetales y jugos de frutas. (Marcillo & Meza, 2010).

2.10.4. EL METABISULFITO DE POTASIO

El metabisulfito de potasio es un conservante de alimentos. Los fabricantes de vinos también utilizan para preservar los vinos embotellados es un polvo blanco y cristalino que tiene un fuerte olor a sulfuro es un fuerte antioxidante que protege el color y el sabor (Goya, 2013).

2.10.5. BICARBONATO DE SODIO

El bicarbonato de sodio (también llamado carbonato sódico o hidrogenocarbonato de sodio o carbonato ácido de sodio) es un compuesto sólido cristalino de color blanco muy soluble en agua, con un ligero sabor alcalino parecido al del carbonato de sodio, Se usa a menudo para aumentar el pH (Goya, 2013).

2.11. SACCHAROMYCES CEREVISIAE.

Saccharomyces cerevisiae, es una levadura que constituye el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad; su nombre deriva del vocablo Saccharo (azúcar), myces (hongo) y *cerevisiae* (cerveza). Es una levadura heterótrofa, que obtiene la energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa. Puede aislarse con facilidad en plantas y tierra, así como del tracto gastrointestinal y genital humano. Es un producto del proceso de producción de alcohol, que a su vez constituye una valiosa fuente de proteínas y vitaminas para la alimentación animal (Suárez, Garrido, & Guevara, 2016).

Se destaca que en la formulación de piensos para aves y cerdos se emplea la levadura de recuperación de la fermentación alcohólica, por ser un componente rico en proteínas. El uso más extendido está enmarcado en la panificación y en las industrias de fabricación de cerveza, vinos y alcohol. La levadura inactivada por temperatura se usa como fuente de nutrimentos en alimentación animal y humana, tanto en forma de levadura íntegra como a partir de sus derivados (Suárez, Garrido, & Guevara, 2016).

Esta levadura es una de las especies considerada como microorganismo GRAS, por lo que ha sido aprobada para su uso como aditivo alimentario. Se ha aseverado que la crema de levadura *S. cerevisiae* concentrada, alcanza valores de materia seca (MS) de 18-20 % y un contenido de proteína bruta (PB) de 32-36 % sobre base seca. Por otro lado, algunos autores sostienen que la composición promedio de proteína verdadera es de 40,20 %, mientras que otros, registraron valores algo inferiores en el entorno de 39 % (Suárez, Garrido, & Guevara, 2016).

2.11.1. SAFALE US 05

Levadura ale americana aptas para cervezas con equilibrio con bajo contenido de diacetilo que permite obtener productos limpios (Fermentis, 2016) Tiene la característica de forman una espuma estable y firme y puede mantenerse en suspensión durante la fase de fermentación. Esta levadura trabaja desde una

temperatura de 12°C a 25°C y a una temperatura ideal de 15-22°C (Fermentis, 2016). La dosis ideal es de 0.5 - 0.8 kg/m³. Las especificaciones que debe cumplir la levadura para poder ser utilizada como materia prima en la elaboración de la cerveza se describe en la ficha técnica entregada por el proveedor (**ver anexo 24**). El extracto seco se encuentra comprendido entre 94.0- 96.5%, un número mayor de 6.0x10¹² / kg células viables y un conteo menor a 1.0x10⁶ ufc/L de bacterias acéticas, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y levaduras silvestres no pertenecientes a las *Saccharomyces* (Fermentis, 2016)

2.12. REQUISITOS FISICOQUÍMICOS MICROBIOLÓGICO DE UNA BEBIDA

Bebidas alcohólicas mixtas y los aperitivos deben tener una apariencia homogénea, en caso de mostrar una ligera separación de sus componentes luego de agitarse, deben recuperar fácilmente su apariencia.

Los cocteles o bebidas alcohólicas mixtas y los aperitivos deben cumplir con los requisitos físicos y químicos indicados en el cuadro 2.5.

Cuadro 2. 5.Requisitos fisicoquímicos microbiológicos de una bebida alcohólica

| Requisitos | Unidad | Mínimo | Máximo | Método de ensayo |
|-------------------------------|-----------------------|--------|--------|------------------|
| Alcohol, fracción volumétrica | % | 0,5 | 50,0 | NTE INEN 340 |
| Furfural | mg/100cm ³ | - | 10 | NTE INEN 2014 |
| Metanol | mg/100cm ³ | - | 10 | NTE INEN 2014 |
| Alcoholes superiores | mg/100cm ³ | - | 250 | NTE INEN 2014 |

Fuente: (NTE INEN 2802, 2015)

2.12.1. REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS

Según la norma NTE INEN 2802 (2015). Los cocteles o bebidas alcohólicas mixtas y los aperitivos deben cumplir con los requisitos en el Cuadro 2.6.

Cuadro 2 6. Requisitos microbiológicos de una bebida alcohólica

| Requisitos | Unidad | Máximo | Método de ensayo |
|--------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| Mohos y levaduras | UFC/mL | 10 | NTE INEN 1529-10 |
| Salmonella | mg/100cm ³ | Ausencia en 25 mL | NTE INEN 1529- 15 |

Fuente: (NTE INEN 2802, 2015)

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

Las primeras etapas de la investigación correspondiente a la obtención de las materias primas se llevó a cabo en el taller de frutas y hortalizas del área agroindustrial, mientras que la etapa referente a la consecución de la investigación se desarrolló en los laboratorios de Bromatología y Química de la Escuela Superior Politécnica de Manabí Manuel Félix López, ubicado en el sitio el Limón de la ciudad de Calceta, cabecera cantonal del cantón Bolívar de la provincia de Manabí, que geográficamente se encuentra situada entre las siguientes coordenadas: “0°49’27” Latitud sur, “80°10’47.2” Longitud oeste y una Altitud de 15 msnm (Eart, 2016).

3.2. DURACIÓN

Este trabajo de investigación tuvo una duración de 9 meses a partir de la aprobación del proyecto de trabajo de titulación, considerando los plazos en los cuales se realizó las actividades de la investigación.

3.3. MÉTODOS Y TÉCNICAS

A continuación se detallan los métodos y técnicas de análisis empleados que permitieron llevar a cabo la investigación ya antes planteada.

3.3.1. MÉTODOS Y TÉCNICAS FÍSICOQUÍMICOS UTILIZADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DEL LACTOSUERO DULCE

Cuadro 3 1. Métodos y técnicas de evaluación fisicoquímica para el lactosuero dulce

| ANÁLISIS (lactosuero dulce) | UNIDAD | DESCRIPCIÓN | MÉTODO DE ENSAYO |
|--------------------------------|-----------------------|--|----------------------------|
| ACIDEZ | % De fracción de masa | Se determinó en base a la neutralización de los ácidos presentes en el lactosuero dulce expresado como ácido láctico mediante la técnica de rutina correspondiente a una titulación con una solución volumétrica patrón de hidróxido de sodio en presencia de fenolftaleína como indicador. (modificado) | NTE INEN 13 |
| pH | ---- | Se basó en la utilización de un pH meter (medidor de pH) milwaukee, provisto de un electrodo sensible al ion hidrógeno | AOC OFFICIAL METHOD 973.41 |
| DENSIDAD | g/mL | Se utilizó un método instrumental utilizando un picnómetro, diseñado para medir y comparar las densidades, con la utilización de fórmula. | NTE INEN 11 |
| SÓLIDOS NO GRASOS | % Fracción de masa | Se Basó en la utilización del método gravimétrico | NTE INEN 09) |
| MATERIA GRASA | % Fracción de masa | Se basó en la separación mediante acidificación y centrifugación, la materia grasa contenida en el producto analizado, posteriormente determinar el contenido de grasa mediante lectura directa en un butirómetro estandarizado. | NTE INEN 12 |
| CENIZAS | % Fracción de masa | Basado en la desecación por evaporización de una cantidad de suero lácteo y se pesa el residuo, correspondiente a los sólidos totales del lactosuero. | NTE INEN 14 |

Fuente: Elaborado por los investigadores

3.3.2. MÉTODOS Y TÉCNICAS FÍSICOQUÍMICOS UTILIZADOS EN CARACTERIZACIÓN DEL MUCÍLAGO DE CACAO VARIEDAD CCN51

Cuadro 3 2. Método y técnicas de caracterización fisicoquímica del mucilago de cacao variedad CCN51

| ANÁLISIS (MUCÍLAGO DE CACAO CCN51) | UNIDAD | DESCRIPCIÓN | MÉTODO DE ENSAYO |
|------------------------------------|-----------------------|--|--------------------------|
| ACIDEZ | % De fracción de masa | Se determinó en base a la neutralización de los ácidos presentes en el mucilago de cacao expresado como ácido cítrico mediante la técnica de rutina correspondiente una titulación con una solución volumétrica patrón de hidróxido de sodio en presencia de fenolftaleína como indicador. | NTE INEN 1091.2013 |
| pH | ---- | Basado en la utilización de un pH meter (medidor de pH) milwaukee, provisto de un electrodo sensible al ion hidrógeno | NTE INEN O38 |
| DENSIDAD | g/mL | Basado en la utilización de un método instrumental utilizando un picnómetro, diseñado para medir y comparar las densidades, con la utilización de formula. | MÉTODO PICNÓMETRO |
| ° BRIX | % | Basado en la utilización de un refractómetro digital que miden el cociente total de sacarosa disuelta en un líquido. | NTE INEN 0273.2012 |
| CENIZA | % | Basado en la desecación por evaporización inicialmente de una cantidad de materia prima (mucilago de cacao) para posteriormente llevar a calcinar el restante de la materia prima mediante diferencia de pesos conocer el residuo restante correspondiente a las cenizas de la materia prima | NTE INEN 14 (modificado) |
| HUMEDAD | % | Basado en el secado de una pequeña muestra, este mide el porcentaje de agua por la pérdida de peso del producto, es decir, se mide su peso antes y después del secado. | NTE INEN 1091.2013 |

Fuente: Elaborado por los investigadores

3.3.3. MÉTODOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAR EL MOSTO POST- FERMENTACIÓN

Cuadro 3 3. Método y técnicas utilizadas para caracterizar los diferentes tratamientos

| ANÁLISIS (MOSTO) | UNIDAD | DESCRIPCIÓN | MÉTODO DE ENSAYO |
|------------------|-----------------------|---|--|
| ACIDEZ | % De fracción de masa | Se determinará en base a la neutralización de los ácidos presentes en el mosto expresado como una combinación de ácido láctico, aportado por el lactosuero y ácido cítrico aportado por el mucilago de cacao variedad CCN51, determinado mediante la técnica de rutina correspondiente una titulación con una solución volumétrica patrón de hidróxido de sodio en presencia de fenolftaleína como indicador. | NTE INEN – ISO 750 – 2013 (MODIFICADO) |
| pH | ---- | Basado en la utilización de un pH meter (medidor de pH) milwaukee, provisto de un electrodo sensible al ion hidrógeno | AOAC OFFICIAL METHOD 973.41 (MODIFICADO) |
| DENSIDAD | g/mL | Basado en la utilización de un método instrumental utilizando un picnómetro, diseñado para medir y comparar las densidades, con la utilización de fórmula. | NTE INEN 11 (MODIFICADO) |
| °Brix | % | Basado en la utilización de un refractómetro digital que miden el cociente total de sacarosa disuelta en un líquido. | AOAC 2012 - 983.17 (Codex Stan 247:2005 (Modificado) |

Fuente: Elaborado por los investigadores

3.3.4. MÉTODOS DE EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA EN LA FERMENTACIÓN

Cuadro 3 4. Método y técnicas utilizadas para la evaluación fisicoquímica de la bebida alcohólica en función del tiempo de fermentación (60 horas)

| ANÁLISIS (MOSTO – EN FERMENTACIÓN) | UNIDAD | DESCRIPCIÓN | MÉTODO DE ENSAYO |
|-------------------------------------|-----------------------|---|--|
| ACIDEZ | % De fracción de masa | Se determinó en base a la neutralización de los ácidos presentes en el mosto expresado como una combinación de ácido láctico, aportado por el lactosuero y ácido cítrico aportado por el mucilago de cacao variedad CCN51, determinado mediante la técnica de rutina correspondiente una titulación con una solución volumétrica patrón de hidróxido de sodio en presencia de fenolftaleína como indicador. | NTE INEN – ISO 750 – 2013 (MODIFICADO) |
| pH | ---- | Basado en la utilización de un pH meter (medidor de pH) milwaukee, provisto de un electrodo sensible al ion hidrógeno | AOAC OFFICIAL METHOD 973.41 (MODIFICADO) |
| ° BRIX | % | Basado en la utilización de un refractómetro digital que miden el cociente total de sacarosa disuelta en un líquido. | AOAC 2012 - 983.17 (Codex Stan 247:2005 (Modificado) |

Fuente: Elaborado por los investigadores

3.3.5. DETERMINACIÓN DE LA MEJOR RELACIÓN (LACTOSUERO DULCE – MUCÍLAGO)

Se determinó las características fisicoquímicas de los tratamientos correspondientes a una mezcla de lactosuero dulce y mucílago de cacao de la variedad CCN51. Una vez culminada la fermentación, con la finalidad de saber las propiedades finales, y en base a investigaciones preliminares, determinar cuál tratamiento presenta las características físicas y químicas inherentes a una bebida alcohólica.

Para llevar a cabo la caracterización de los tratamientos en estudio ya antes mencionado se utilizó los siguientes métodos fisicoquímicos descritos en el cuadro 3.5.

Cuadro 3 5. Método y técnicas utilizadas para caracterizar los tratamientos una vez culminada la fermentación

| ANÁLISIS (MOSTO FERMENTADO) | UNIDAD | DESCRIPCIÓN | MÉTODO DE ENSAYO |
|------------------------------|-----------------------|---|--|
| ACIDEZ | % De fracción de masa | Se determinó en base a la neutralización de los ácidos presentes en el mosto expresado como una combinación de ácido láctico, aportado por el lactosuero y ácido cítrico aportado por el mucilago de cacao variedad CCN51, determinado mediante la técnica de rutina correspondiente una titulación con una solución volumétrica patrón de hidróxido de sodio en presencia de fenolftaleína como indicador. | NTE INEN – ISO 750 – 2013 (MODIFICADO) |
| pH | ---- | Basado en la utilización de un pH meter (medidor de pH) milwaukee, provisto de un electrodo sensible al ion hidrógeno | AOC OFICIAL METHOD 973.41 (MODIFICADO) |
| ° BRIX | % | Basado en la utilización de un refractómetro digital que miden el cociente total de sacarosa disuelta en un líquido. | AOAC 2012 - 983.17 (Codex Stan 247:2005 (Modificado) |
| DENSIDAD | g/mL | Basado en la utilización de un método instrumental utilizando un picnómetro, diseñado para medir y comparar las densidades, con la utilización de formula. | MÉTODO PICNÓMETRO |
| ° ALCOHÓLICO | °GL | Basado en una destilación simple de la bebida alcohólica hasta obtener un líquido hidroalcoholico para posteriormente utilizar un método instrumental (alcoholímetro de Gay – Lussac) | NTE INEN 0340 |

Fuente: Elaborado por los investigadores

3.3.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS

- **Método descriptivo:** Se utilizó este método en la evaluación del comportamiento de la fermentación. El mismo permitió recoger, organizar, resumir, presentar, analizar y generalizar los resultados de las observaciones de los análisis efectuados. Este método implica la recopilación y presentación sistemática de datos para dar una idea clara de una determinada situación (Nateras, 2005).

Para poder analizar los datos obtenidos respecto a las propiedades fisicoquímicas de los tratamientos, los cuales se tomaron en función del tiempo de fermentación (60 horas), se utilizaron diagramas estadísticos elaborados en Microsoft Office Excel 2013, para representar de forma sistemática los datos de la fermentación para cada tratamiento, correspondiente a pH, Acidez y °Brix.

Esta evaluación se realizó durante 60 horas, las 6 primeras horas de fermentación se evaluó en un patrón de dos horas y los siguientes datos se tomaron en la hora 12, de ahí en más se evaluó cada 12 horas hasta la hora 48 para posteriormente tomar dato a las 8 horas correspondiente a la hora 56 para después finalizar cada dos horas es decir 58 y 60 posteriormente.

3.3.6 TÉCNICAS

3.3.6.1. TÉCNICAS PARA ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS A LA BEBIDA ALCOHÓLICA

- Con la finalidad de conocer la carga microbiana y como control de calidad de la bebida alcohólica se determinó el contenido de microorganismos patógenos como Salmonella, para lo cual, se utilizó el método descrito en la norma NTE INEN 2802 (2015), conocido como método de detección; y para determinación de mohos y levadura se realizó mediante recuento en placas descrito en la misma norma. Esto se llevó a cabo una vez culminada la fermentación y todo lo que comprende el proceso en sí para cada uno de los tratamientos

3.3.7. EVALUACIÓN SENSORIAL

Para la determinación sensorial se utilizó la prueba de Basker la cual permite identificar entre varios productos evaluados cual es preferido entre un grupo de panelistas.

Para aquello, se utilizó 30 panelistas a quienes se les entrego 3 muestras diferentes con una codificación a una temperatura entre 22 y 25°C. La prueba consistió en identificar el mejor tratamiento según la percepción de cada uno, categorizado en escala del 1 al 3 cuál fue el mejor de los tratamientos. Esta evaluación tuvo lugar en horas de la mañana entre las 9:30 y 10:00am.

En esta prueba se obtuvo la suma del orden de preferencia de cada producto y la suma de cada panelista (esta última para corroborar que no hay error de digitación (debe forzarse un orden a cada producto, no se admiten empates).

3.4. TRATAMIENTOS EN ESTUDIO

Se estudió el efecto que produce en mosto combinado la fermentación láctica del lactosuero y alcohólica del mucílago de cacao variedad CCN51. Para esto se realizaron combinaciones de lactosuero y mucílago, la cual fue evaluada en función del tiempo de fermentación para poder evidenciar su comportamiento en la obtención de una bebida alcohólica. Se plantearon 3 tratamientos con 5 réplicas cada uno. El cuadro 3.6 se muestran lo ya antes mencionado.

Cuadro 3 6. Tratamientos en estudio

| TRATAMIENTOS | % DE LACTOSUERO DULCE | % DE MUCÍLAGO |
|--------------|-----------------------|---------------|
| T1 | 10 | 90 |
| T2 | 20 | 80 |
| T3 | 30 | 70 |

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

En relación del principio único o bien múltiple para los diseños, esta investigación fue de tipo experimental y se acogió a un diseño completamente al azar (DCA) en donde se confrontaron la varianza de los tratamientos y la varianza del error y se determinó si la primera fue lo suficientemente alta según la distribución F y como ya se manifestó, por cada tratamiento se plantearon 5 repeticiones.

Se utilizó un diseño dónde:

$$Y_{y} = \mu + \tau_i + \xi_{ij}$$

$i = 1, 2, 3, \dots, t$ tratamientos o grupos

$j = 1, 2, 3, \dots, r$ repeticiones u observaciones

$Y_y - \mu =$ Fuente de variación total

$\tau_i =$ Fuente de variación por efecto de tratamiento

$\xi_{ij} =$ Fuente de variación del Error Experimental

| VARIACIÓN | gl |
|--------------|----|
| TOTAL | 14 |
| TRATAMIENTOS | 2 |
| ERROR | 12 |

3.6. UNIDAD EXPERIMENTAL

La investigación consta de tres relaciones entre mucílago de cacao variedad CCN51 y lactosuero dulce, cada relación estuvo formulada en base a 700ml por cada tratamiento donde se planteó 5 réplicas por cada uno de estos dando como resultado un total de 15 unidades experimentales.

Se utilizaron otras 11 réplicas por cada tratamiento para poder llevar a cabo la evaluación en función del tiempo, las cuales se fueron descartando según se realizaban los análisis, correspondientes a temperatura, pH, acidez y °Brix, esto se realizó con la finalidad de disminuir el error de los análisis fisicoquímicos

Cuadro 3 7. Composición de la unidad experimental

| MATERIA PRIMA | TRATAMIENTOS | | | | | |
|---|--------------|-----------|------|-----------|------|-----------|
| | T1 | | T2 | | T3 | |
| | % | peso - ml | % | peso - ml | % | peso - ml |
| Lactosuero dulce | 10 | 70 ml | 20 | 140 ml | 30 | 210 ml |
| Mucílago | 90 | 630 ml | 80 | 560 ml | 70 | 490 ml |
| Levadura | 0,1 | 0,7g | 0,1 | 0,7g | 0,1 | 0,7g |
| Bicarbonato (Na) - Regulador de pH (acidez) | 0,3 | 2,1g | 0,3 | 2,1g | 0,3 | 2,1g |
| Nutriente (Sulfato de amonio) | 0,02 | 0,14g | 0,02 | 0,14g | 0,02 | 0,14g |
| DESPUÉS DE CULMINADA LA FERMENTACIÓN | | | | | | |
| Metabisulfito de sodio | 0,1 | 0,7 g | 0,1 | 0,7 g | 0,1 | 0,7 g |

Fuente: Elaboración de los investigadores

3.7. VARIABLES A MEDIR

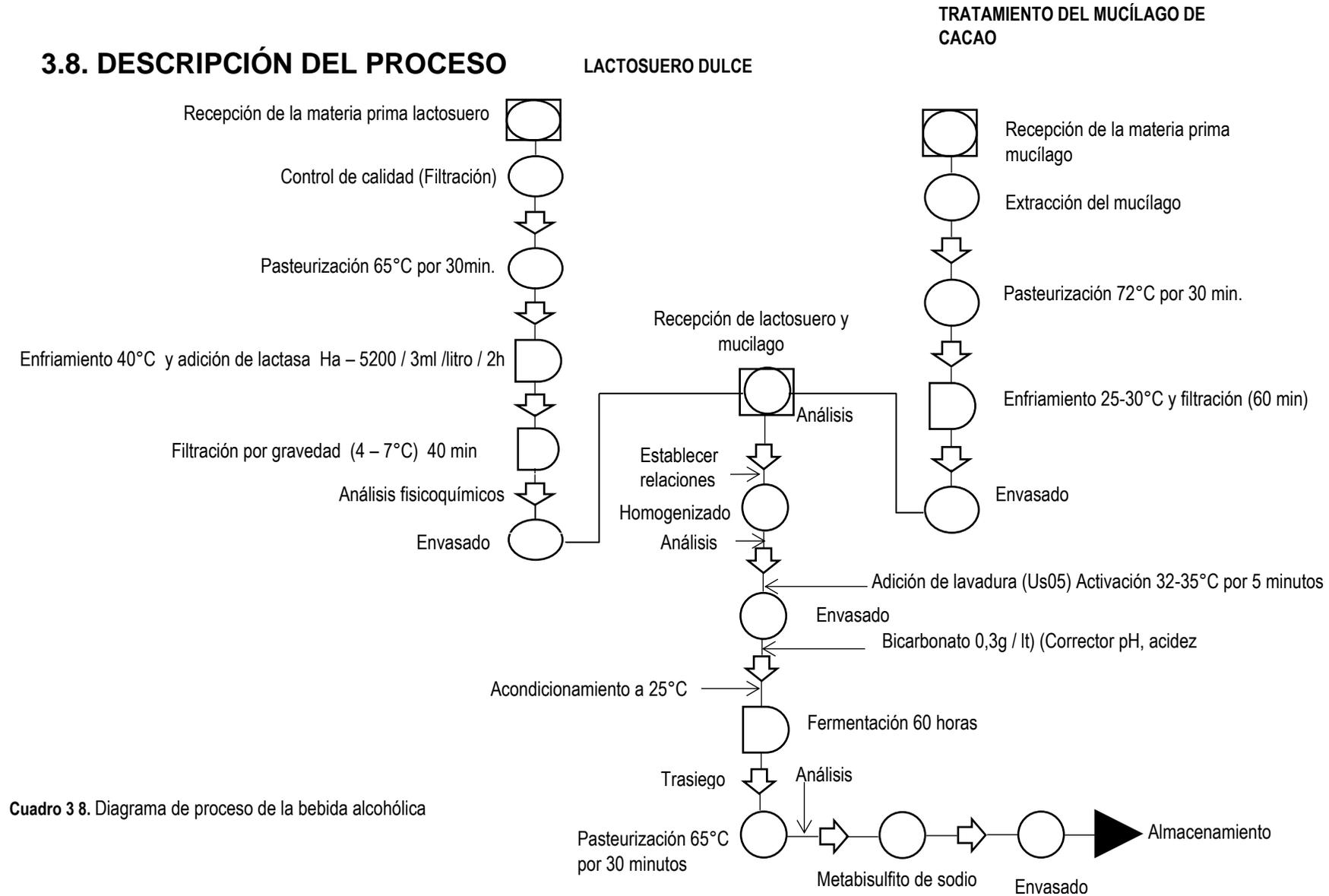
3.7.1. INDEPENDIENTE:

- Fermentación alcohólica (mucílago)
- Fermentación láctica (lactosuero).

3.7.2. DEPENDIENTE:

- Concentración final de la bebida (pH, acidez, °Brix, grado alcohólico)

3.8. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO



Cuadro 3 8. Diagrama de proceso de la bebida alcohólica

3.8.1. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO PARA EL LACTOSUERO DULCE

Recepción: En esta etapa el lactosuero se depositó en envases de vidrio esterilizados.

Filtración y control de calidad: Obtenido el lactosuero se filtró en un tamiz de #35 para eliminar residuos de cuajada y se realizó una inspección de la calidad de esta materia prima basada en parámetros organolépticos.

Pasteurización: Con el propósito de inactivar las cargas microbianas del lactosuero se pasteurizó a una temperatura de 65°C por 30 minutos.

Enfriamiento: Se realizó con la finalidad de producir un choque térmico que garantice la inocuidad del lactosuero.

Adición de lactasa: Se adicionó 3ml de lactasa Ha – 5200 por litro de lactosuero dulce con la finalidad de hidrolizar la lactosa del mismo a una temperatura de 40°C durante 2 horas para llevar a cabo este proceso de desdoblamiento, de acuerdo a las especificaciones donde solo vario el tiempo de hidrólisis.

Filtración: Se realizó con la finalidad de que los residuos restantes quedarán asentados en el fondo y realizar una nueva filtración para obtener un líquido homogéneo sin partículas ajenas a este a una temperatura de refrigeración (4 – 7°C).

Envasado: Una vez listo el lactosuero dulce, este fue envasado en recipientes de vidrio

3.8.2. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO PARA EL MUCÍLAGO DE CACAO

Recepción: Se recolecto las mazorcas de cacao y se seleccionaron aquellas que estuvieran en buen estado de madurez, libre de mohos y demás cuerpos extraños.

Extracción del mucílago: Empleando un cuchillo, se realizó corte transversales se separa manualmente la cascara de almendras mucilaginosas unidas a la placenta. Se utilizó el método mecánico de expresión para obtener el máximo rendimiento de este material mucilagoso. Para ello se utilizó tela para ejercer expresión de sobre las almendras y obtener el mucilago

Pasteurización: Se lo realizó con el propósito de inactivar las cargas microbianas del mucílago de cacao a temperaturas de 72°C por 30 minutos

Enfriamiento: Se realizó esta operación con la finalidad de enfriar el mucílago a una temperatura comprendida entre 25 -30°C para proceder a realizar análisis posteriores.

Envasado: Una vez listo el mucílago, fue envasado en envases de vidrio previamente esterilizados.

3.8.3. DESCRIPCIÓN DE LA MEZCLA DE LAS DOS MATERIAS PRIMAS

Análisis: Los análisis pertinentes a las materias primas de lactosuero: (°Brix, pH, acidez, densidad, cenizas, materia grasa) y mucílago de cacao (°Brix, pH, acidez, densidad, cenizas, humedad).

Homogenizado: Se procedió a establecer las relaciones para homogenizar las materias primas para de esta forma obtener una mejor distribución de estas, además, con la finalidad de airar la sustancia, proceso necesario para la fermentación, ya que posterior a esto se realizó los análisis fisicoquímicos tales como °Brix, acidez, Ph, densidad.

Adición de la levadura: La adición de la levadura (Us-05) se adicionó en relación de 0,1% en relación a la cantidad de mosto a una temperatura entre 32 -35 °C.

Envasado: Una vez mezcladas las dos materias primas se depositó en envases de vidrios esterilizados de un litro para su posterior acondicionamiento, adición de nutriente y (sulfato de amonio).

Fermentación: Para este proceso se estableció el tiempo de 60 horas, tiempo en el cual se monitoreo el mosto para evaluar su comportamiento mediante parámetros fisicoquímicos.

Trasiego: Se realizó esta operación para separar los sólidos sedimentados una vez culminada la fermentación.

Pasteurización: Una vez culminada la fermentación se pasteurizó a 65°C a 30 minutos, la bebida alcohólica con el fin de frenar la fermentación.

Análisis: Se realizaron análisis fisicoquímicos para determinar las características fisicoquímicas de los tratamientos en cuestión.

Sulfitado: Esta operación se la realizó con la finalidad de darle más inocuidad a la bebida y asegurar su calidad sin que se presente alteraciones causadas por microorganismos.

Envasado: Una vez lista la bebida fue depositada en envases de vidrio para su posterior almacenamiento.

Almacenamiento: Estos se los almacenará en temperatura ambiente a 25°C.

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Como se indicó antes, los datos obtenidos en la evaluación se representó por medias gráficas desarrolladas en el programa Microsoft Office Excel 2013 así como los resultados obtenidos en la evaluación sensorial de los tratamientos.

Para el análisis estadístico de las variables en estudio se realizará las siguientes pruebas en el programa IBM SPSS Statistics 21:

- A todas las variables en estudio se les efectuará las siguientes pruebas: de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad (Levene), si las variables cumplen con todos los parámetros indicados anteriormente, para ello se procede a realizar las pruebas que se indica a continuación, caso contrario se realizará la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

- Análisis de varianza (ANOVA): Se lo efectuará con el propósito de establecer la diferencia significativa estadística para los tratamientos de todas las variables en estudios.
- Prueba de diferencias honestamente significativa de Tukey (HSD): Se realizará para establecer la diferencia significativa entre tratamientos, lo cual permitirá determinar la magnitud entre ellos. Se analizará al 5% de probabilidad del error, de acuerdo a los grados de libertad (g) del error experimental.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PARAMETROS FISICOQUÍMICOS DEL MUCÍLAGO DE CACAO

En el cuadro 4.1 se presentan los parámetros fisicoquímicos del mucílago de cacao variedad CCN51 obtenidos por los autores de esta investigación. Estos valores son comparados con datos reportados en otras tres investigaciones de estudios similares.

En el cuadro mencionado anteriormente se ilustran valores de diferentes parámetros analíticos, en donde se puede apreciar que los valores obtenidos en gran medida se encuentran dentro de lo establecido por otros investigadores, sin embargo, se puede observar diferencias minúsculas en ciertas propiedades fisicoquímicas.

Estas variaciones de las propiedades fisicoquímicas se pueden ver influenciadas por diversos factores que van desde la procedencia hasta labores posteriores a la cosecha del cacao variedad CCN51. Generalmente se ven más influenciadas por el estado de madurez, así, al cosechar cacao antes de que este alcance su madurez optima se obtendrá un mayor rendimiento de mucílago, sin embargo, este presentara propiedades fisicoquímicas más acidas y así mismo más astringencia que además, derivarían una concentraciones de azúcares más bajas de las se podría obtener si estuviera en estado de madurez optima (Quimbíta, Rodríguez, & Vera, 2013)

Cuadro 4 1. Parámetros fisicoquímicos del mucílago de cacao.

| CARACTERIZACIÓN DEL MUCÍLAGO DE CACAO CCN51 | | | | | |
|---|-------|------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| ANÁLISIS | UNID | RESULTADOS | REPORTES DE OTRAS INVESTIGACIONES | | |
| | | | (Hernández & Rojas, 2011) | (Quimbíta, Rodríguez, & Vera, 2013) | Vallejo, y otros (2016) |
| pH | ----- | 3,97 | 3,95 - 4,15 | 3,17 - 3,33 | 3,87 |
| Acidez titulable | % | 1,09 | 0,85 - 1,030 | 1,00 - 1,10 | 0,91 |
| Densidad | g/ml | 1,079 | ----- | 1,048 - 1,050 | 1,076 |
| ° Brix | % | 18,2 | 16 - 18 | 15,6 - 17,8 | 16 |
| Humedad | % | 81,3 | (Arteaga, 2013) reporta 77, 34 | ----- | 80,5 |
| Cenizas | % | 1,54 | (Arteaga, 2013) reporta 2, 91 | ----- | ----- |

Fuente: Lab. Bromatología ESPAM MFL

4.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL LACTOSUERO DULCE

En el cuadro 4.2 se muestran los datos de los parámetros fisicoquímicos del lactosuero dulce, los cuales son comparados con otros reportes. Es importante mencionar que se realizó una doble filtración requerida para esta investigación, para eliminar restos (partículas de cuajada) ajenos del lactosuero dulce, posterior a esto, se procedió a realizar los análisis fisicoquímicos que se muestran en el siguiente cuadro, una vez culminado estos análisis se procedió a realizar una segunda filtración para poder eliminar las partículas más pequeñas con la ayuda de un filtro en escalera por gravedad a temperatura de refrigeración (4 – 7) °C utilizando papel filtro. Esto con la finalidad de evitar cambios fisicoquímicos y además para poder reducir el % inicial de grasa del lactosuero dulce requerido para poder llevar a cabo la fermentación y así evitar los problemas de lipólisis (enranciamiento de las grasas). Es importante mencionar que este lactosuero dulce una vez filtrado fue hidrolizado con lactasa Ha – 5200 con una dosificación de 3 ml por litro y un tiempo de acción de 2 horas a 40° C. Estas especificaciones se encuentran dentro de lo establecido según la ficha técnica (**ver anexo 24**) a excepción del tiempo, el cual se planteó para esta investigación (2 h).

En el cuadro 4.2 se puede observar que los resultados obtenidos en la caracterización del lactosuero dulce, coinciden favorablemente con lo establecido por las normas NTE INEN 2594 (2011) mientras que la densidad, parámetro fisicoquímico que no reporta la norma ya antes mencionada, se encuentra dentro de lo establecido por Hernández y otros (2012)

Cuadro 4 2. Parámetros fisicoquímicos del lactosuero dulce

| CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL LACTOSUERO DULCE | | | | REPORTES DE OTRAS INVESTIGACIONES |
|--|-------|-------------------|----------------------------|--|
| ANÁLISIS | UNID | SUERO SIN FILTRAR | SUERO FILTRADO HIDROLIZADO | NTE INEN 2594 (2011) |
| pH | ----- | 6,72 | 6, 53 | 6,4 – 6,8 |
| Acidez titulable | % | 0,04 | 0,05 | 0,1 – 0,16 |
| Densidad | g/ml | 1,024 | 1,008 | Hernández y otros (2012), reportan 1,026 |
| Brix | % | 7,5 | 6,3 | ----- |
| Cenizas | % | 0,57 | 0,43 | 0,7 máx. |
| Materia grasa | % | 0,28 | 0,12 | 0,3 máx. |

Fuente: Elaboración de los investigadores

Es importante recalcar que Poveda (2013), indica que las propiedades fisicoquímicas del lactosuero dulce se pueden ver afectadas según la composición inicial de la leche utilizada y procesos posteriores a la derivación del lactosuero dulce.

4.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y CORRECCIÓN DE LOS MOSTOS COMBINADOS (LACTOSUERO DULCE – MUCÍLAGO DE CACAO) POST – FERMENTACIÓN

En el cuadro 4.3 se muestra la caracterización fisicoquímica de cada uno de los mostos (tratamientos) una vez realizadas las combinaciones respectivas para cada uno, así, el T₁ (10% de lactosuero dulce y 90% de mucílago) T₂ (20% lactosuero dulce y 80% de mucílago de cacao) y T₃ (30% de lactosuero dulce y 70% de mucílago de cacao).

Los valores de pH que se muestran en el cuadro antes mencionado de los tratamientos una vez realizadas las mezclas, resaltan valores que según Cabrera (2012), son normales e idóneos para llevar a cabo una fermentación alcohólica debido a que los valores del pH para un mosto pueden estar comprendidos entre 3,1 y 4,0 aunque esta medida se vio ligeramente superada en todos los tratamientos debido a las combinaciones entre el lactosuero dulce y mucílago de cacao variedad CCN51.

Sin embargo Carrillo y León (2006), indican que un pH idóneo para llevar a cabo una fermentación alcohólica también puede estar comprendido hasta 5 y en vista de lo que se presenta en el cuadro 4.3 los tratamientos están por debajo de esta media, lo que indica que éstos aún siguen siendo ácidos e idóneos para asegurar la fermentación netamente de las levaduras y evitar la proliferación de agentes patógenos.

Cuadro 4 3. Caracterización fisicoquímica de los mostos a fermentar

| CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LOS TRATAMIENTOS | | | | |
|---|---------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| ANÁLISIS | UNIDAD | T1 (10% s. - 90% M.) | T2 (20%S. - 80% M.) | T3 (30% S. - 70% M.) |
| pH | ----- | 4,07 | 4,12 | 4,25 |
| Acidez | % | 1,12 | 1,07 | 0,98 |
| Densidad | g/ml | 1,078 | 1,074 | 1,067 |
| °Brix | % | 17,2 | 16,2 | 15,2 |

Fuente: Elaboración de los investigadores

Es importante mencionar que esta condición ácida de los mostos, fue otorgada mayoritariamente por el mucílago de cacao CCN51, el cual obtuvo un pH de 3,97 parámetro que se encuentra dentro de lo establecido para esta variedad (Hernández & Rojas, 2011).

En ensayos preliminares a la investigación, se evidenció que los descensos del pH tendían a ser bruscos, a tal forma que la acción de las levaduras se detenía y el éxito de la fermentación se veía afectado, razón por la que se utilizó un regulador de acidez (bicarbonato de sodio). Las cantidades que se utilizaron de bicarbonato de sodio para corregir los mostos respecto a las propiedades fisicoquímicas pH y acidez titulable, sin alterar las demás propiedades, fue del 0,3%, dosis que está dentro de las relaciones utilizadas por Goya (2013), el cual manejó cantidades comprendidas entre 0,1 y 0,3% en su investigación respecto a fermentación alcohólica utilizando como mosto, mucílago de cacao. En el cuadro 4.4 se puede observar que los parámetros fisicoquímicos correspondientes a pH y acidez cambiaron en relación a los obtenidos inicialmente en el cuadro 4.3 una vez adicionado el bicarbonato de sodio.

Cuadro 4 4. Tratamientos (mostos) corregidos con bicarbonato de sodio

| CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS DE LOS TRATAMIENTOS CORREGIDOS CON BICARBONATO | | | | |
|--|--------|----------------------|---------------------|----------------------|
| ANÁLISIS | UNIDAD | T1 (10% s. - 90% M.) | T2 (20%S. - 80% M.) | T3 (30% S. - 70% M.) |
| pH | | 4,63 | 4,77 | 5,12 |
| Acidez | % | 0,71 | 0,64 | 0,59 |
| Densidad | g/ml | 1,078 | 1,074 | 1,067 |
| °Brix | % | 17,2 | 16,2 | 15,2 |

Fuente: Elaboración de los investigadores

4.4. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LAS VARIABLES (temperatura, pH, Acidez, ° Brix) EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN

A continuación se presenta el cambio de las variables más influyentes en la fermentación. En los datos expuestos se observa que el tiempo necesario en que se llevó a cabo la fermentación fue de 60 horas, debido que, al cabo de este tiempo se pudo apreciar una estabilidad de los °Brix, lo que da a conocer que el proceso catabólico (fermentación) de las levaduras llega a su etapa final.

En el cuadro 4.5 se presenta la evaluación de la temperatura para cada uno de los tratamientos. Es importante mencionar que la temperatura de fermentación fue controlada mediante estufa a 25°C, a pesar de lo antes manifestado, los fenómenos como la exotérmica relacionados con esta variable son más difíciles de apreciar debido a la temperatura ejercida por la estufa, sin embargo, estos cambios son inevitables y se presentan en menores rangos.

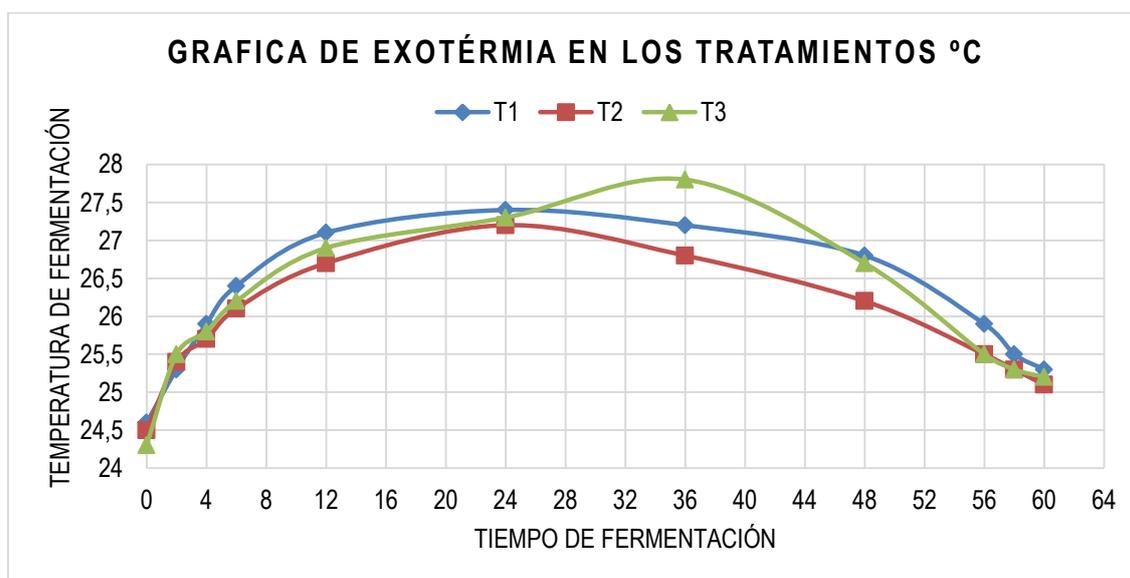
Esta evaluación inició cada dos horas hasta llegar a la hora 6, en vista de que los cambios fisicoquímicos en una fermentación como la exotérmica se dan en las primeras horas.

Cuadro 4 5. Evaluación de la temperatura de fermentación para los tratamientos

| TEMPERATURA ° C | | | |
|-----------------|------|------|------|
| | T1 | T2 | T3 |
| 0 | 24,6 | 24,5 | 24,3 |
| 2 | 25,3 | 25,4 | 25,5 |
| 4 | 25,9 | 25,7 | 25,8 |
| 6 | 26,4 | 26,1 | 26,2 |
| 12 | 27,1 | 26,7 | 26,9 |
| 24 | 27,4 | 27,2 | 27,3 |
| 36 | 27,2 | 26,8 | 27,8 |
| 48 | 26,8 | 26,2 | 26,7 |
| 56 | 25,9 | 25,5 | 25,5 |
| 58 | 25,5 | 25,3 | 25,3 |
| 60 | 25,3 | 25,1 | 25,2 |

Fuente: Elaboración de los investigadores

Grafico 1. Representación de la temperatura de fermentación para cada tratamiento en función del tiempo de fermentación



Este fenómeno se puede ver reflejado en las primeras horas, debido al incremento de la temperatura, variable que empieza a disminuir a medida que transcurre el tiempo de fermentación. Estos cambios también se ven influenciados en gran medida por parámetros como pH y acidez los cuales afectan el rendimiento de las levaduras, lo que disminuye la exotérmica según lo manifiesta Carrillo y León (2006).

4.5. EVALUACIÓN DEL pH PARA LOS TRATAMIENTOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN

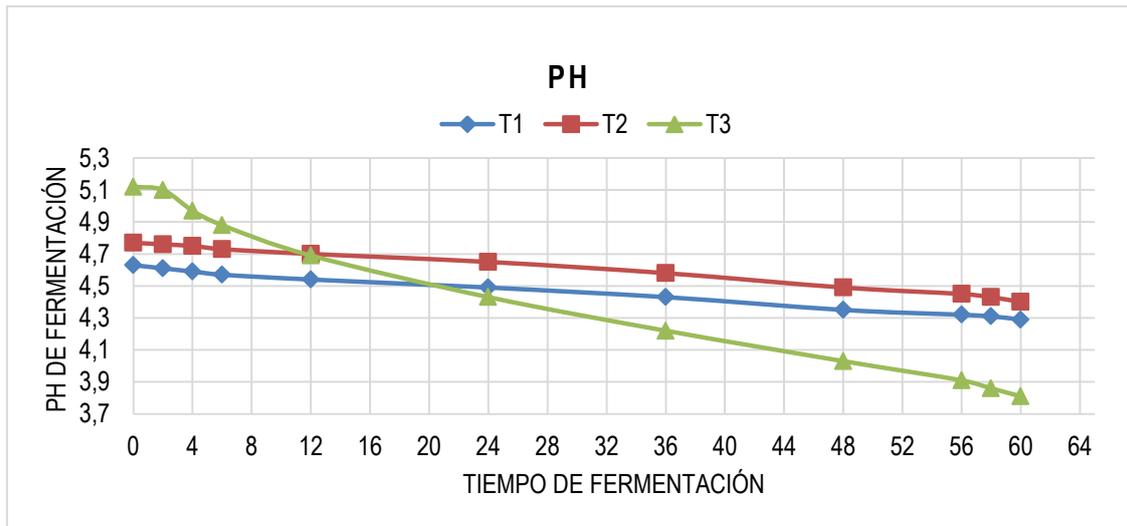
A continuación en el cuadro 4.6 se puede apreciar las variaciones de pH en función del tiempo de fermentación (60 h) para cada uno de los tratamientos. Según Acevedo y otros (2013), manifiesta que debido a la composición nutricional del lactosuero dulce y a la composición lipídica presente en este, ocurren cambios enzimáticos que se pueden apreciar trascurridas las primeras 8 horas hasta las 24 horas, según la composición, haciendo énfasis en el porcentaje de grasa, lo que deriva a una lipólisis que causa acidificación.

Como se puede apreciar en los datos obtenidos y presentados a continuación, los problemas enzimáticos se vieron enmarcados en el T₃. En vista de la dependencia que existe entre el pH y la acidez, estos datos se pueden interpretar de igual forma para la acidez titulable.

Cuadro 4 6. . Evaluación de pH en función del tiempo de fermentación para todos los tratamientos

| Tiempo (Hora) | pH | | |
|---------------|------|------|------|
| | T1 | T2 | T3 |
| 0 | 4,63 | 4,77 | 5,12 |
| 2 | 4,61 | 4,76 | 5,1 |
| 4 | 4,59 | 4,75 | 4,97 |
| 6 | 4,57 | 4,73 | 4,88 |
| 12 | 4,54 | 4,7 | 4,69 |
| 24 | 4,49 | 4,65 | 4,43 |
| 36 | 4,43 | 4,58 | 4,22 |
| 48 | 4,35 | 4,49 | 4,03 |
| 56 | 4,32 | 4,45 | 3,91 |
| 58 | 4,31 | 4,43 | 3,86 |
| 60 | 4,29 | 4,4 | 3,81 |

Fuente: Elaboración de los investigadores

Grafico 2. Evaluación del pH para los tratamientos en función del tiempo de fermentación

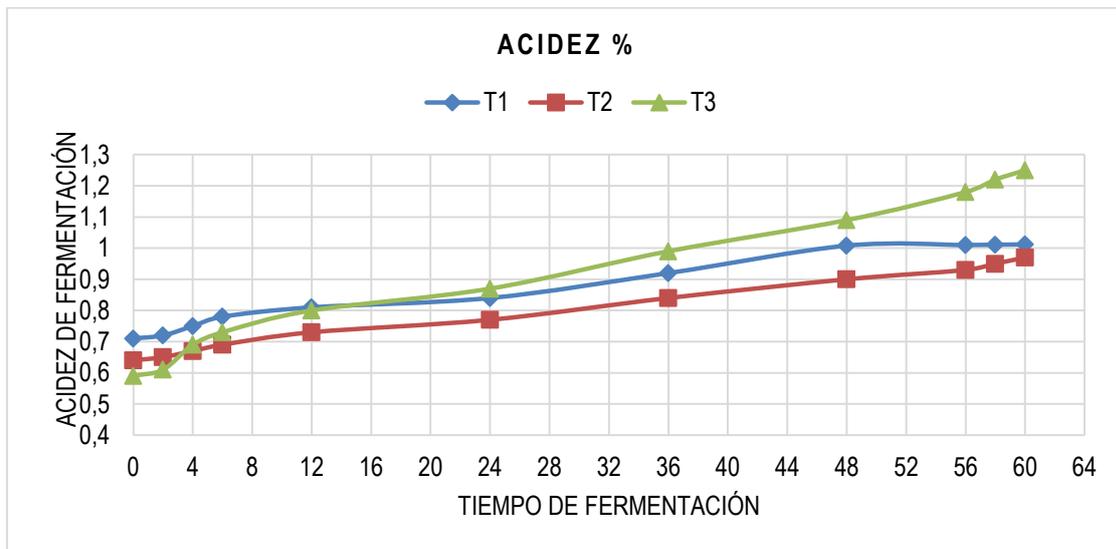
4.6. EVALUACIÓN DE LA ACIDEZ TITULABLE DE LOS TRATAMIENTOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

Cuadro 4 7. Evaluación de % de acidez para los tratamientos en función del tiempo de fermentación

| Tiempo (Hora) | T1 (%) | T2 (%) | T3 (%) |
|---------------|--------|--------|--------|
| 0 | 0,71 | 0,64 | 0,59 |
| 2 | 0,72 | 0,65 | 0,61 |
| 4 | 0,75 | 0,67 | 0,69 |
| 6 | 0,78 | 0,69 | 0,73 |
| 12 | 0,81 | 0,73 | 0,8 |
| 24 | 0,84 | 0,77 | 0,87 |
| 36 | 0,92 | 0,84 | 0,99 |
| 48 | 1,008 | 0,9 | 1,09 |
| 56 | 1,01 | 0,93 | 1,18 |
| 58 | 1,011 | 0,95 | 1,22 |
| 60 | 1,012 | 0,97 | 1,25 |

Fuente: Elaboración de los investigadores

Grafico 3. Evaluación del % acidez para los tratamientos en función del tiempo de fermentación

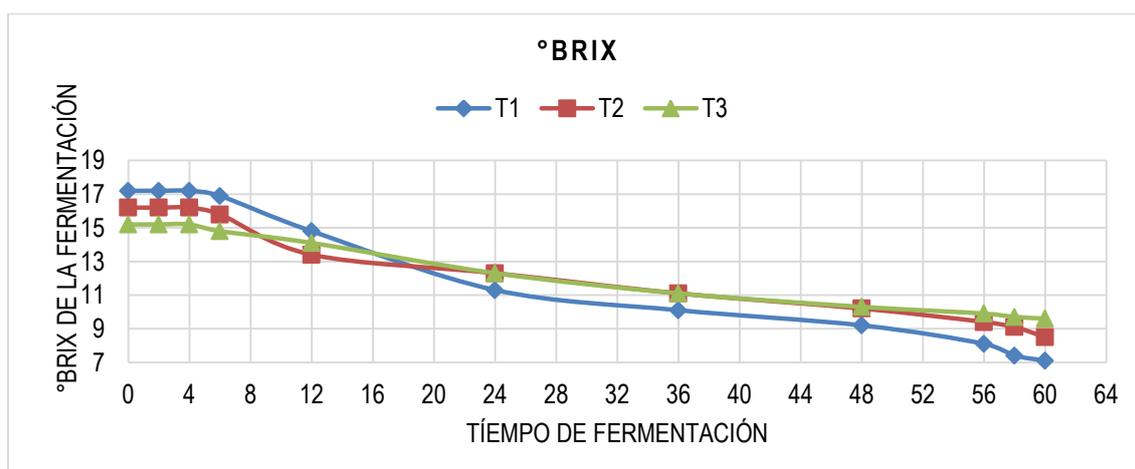


4.7. EVALUACIÓN DEL ° BRIX EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN

Cuadro 4 8. Evaluación de lo °Brix en función del tiempo de fermentación

| Tiempo (Hora) | °BRIX | | |
|---------------|-------|------|------|
| | T1 | T2 | T3 |
| 0 | 17,2 | 16,2 | 15,2 |
| 2 | 17,2 | 16,2 | 15,2 |
| 4 | 17,2 | 16,2 | 15,2 |
| 6 | 16,9 | 15,8 | 14,8 |
| 12 | 14,8 | 13,4 | 14,1 |
| 24 | 11,3 | 12,3 | 12,3 |
| 36 | 10,1 | 11,1 | 11,1 |
| 48 | 9,2 | 10,2 | 10,3 |
| 56 | 8,1 | 9,4 | 9,9 |
| 58 | 7,4 | 9,1 | 9,7 |
| 60 | 7,1 | 8,5 | 9,6 |

Fuente: Elaboración de los investigadores

Grafico 4. Evaluación del °Brix para los tratamientos

4.8. EVALUACIÓN DEL MEJOR TRATAMIENTO POST – FERMENTACIÓN

Los resultados fisicoquímicos de los tratamientos post- fermentación se detallan en el cuadro 4.9 donde se presentan los valores correspondientes a cada análisis efectuado por tratamiento como caracterización final, determinando una media de las cinco réplicas para cada tratamiento.

Cuadro 4 9. Características fisicoquímicas finales de los tratamientos

| CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LOS TRATAMIENTOS | | | | |
|--|--------|----------------------|---------------------|----------------------|
| ANÁLISIS | UNIDAD | T1 (10% S. - 90% M.) | T2 (20%S. - 80% M.) | T3 (30% S. - 70% M.) |
| pH | ----- | 4,29 | 4,40 | 3,81 |
| Acidez | % | 1,012 | 0,97 | 1,25 |
| Densidad | g/ml | 1,008 | 1,011 | 1,012 |
| °Brix | % | 7,1 | 8,5 | 9,61 |
| ° Alcohólico | °GL | 36,5 | 32,3 | 28 |

Fuente: Elaboración de los investigadores

Para comprobar la distribución normal de los datos obtenidos se procedió a realizar los supuestos del ANOVA (Normalidad y Homogeneidad), en donde las variables en manifiesto, pH, acidez, densidad, °Brix y °GL cumplen los supuestos correspondientes a normalidad (**ver anexo 13**). Estos resultados fueron analizados mediante el test de shapiro wilk debido a que los datos analizados fueron inferiores a 50. Cumpliéndose la prueba de normalidad, se procedió a realizar la prueba de homogeneidad de varianza, en donde la

variable correspondiente a acidez titulable no supera la restricción correspondiente a significancia, esto debido a que el valor es menor a 0,05 (**Ver anexo 14**), lo cual dio pauta para proceder a realizar pruebas no paramétricas. Por otra parte, lo que respecta a las demás variables en estudio, tales como pH, °Brix, densidad y °GI que si cumplieron la restricción es decir su significancia fue mayor a 0,05 se procedió a realizar ANOVA para estas variables.

4.9. ACIDEZ TITULABLE (PRUEBA NO PARAMÉTRICA)

Como se mencionó anteriormente, la variable acidez no superó la significancia de 0,05 para todos los tratamientos, por lo cual se procedió a evaluar estos datos mediante una prueba no paramétrica utilizando un test estadístico conocido como Kruskal – Wallis de muestras independientes, que da a conocer si un grupo de datos proviene de la misma población. Por lo antes mencionado, los resultados obtenidos una vez se aplicó el test estadístico, indicó que la acidez es diferente entre las categorías de tratamientos, en vista de que se rechaza la hipótesis nula (**Ver anexo 15**) y se acepta la hipótesis alternativa la cual demanda que al menos uno de los tratamientos respecto a esta variable (acidez) es diferente. Así, el T₁ (10% de lactosuero dulce – 90% de mucílago de cacao), obtuvo un valor final de 1,02% mientras que el T₂ (20% de lactosuero dulce – 80% de mucílago de cacao) presentó una acidez final de 0,97% y finalmente el T₃ (30% de lactosuero dulce – 70% mucílago de cacao), una acidez titulable de 1,25%. Similares datos obtuvo Carrillo y León (2006), quienes utilizaron mucílago de cacao para obtener una bebida alcohólica, determinado un valor final de 1,06% respecto a acidez titulable.

En la misma línea, en un estudio sobre la obtención de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao López (2013), reportó datos de 0,43% sin embargo, cabe mencionar que en esta investigación no se utilizó correctores de acidez, razón por la cual se reporta un valor más bajo, así mismo, se reportaron datos de 0,84% por Quimbita y otros (2013). Como se puede evidenciar, los valores reportados por estos investigadores se encuentran dentro de lo establecido a excepción del T₃ (30% de lactosuero dulce – 70% mucílago de cacao), tratamiento que sobrepasó ligeramente la media reportada por estos

investigadores. Es importante mencionar que la acidez titulable se ve afectada por las relaciones de lactosuero dulce utilizadas en los tratamientos. El porcentaje de grasa presentado inicialmente por el lactosuero filtrado, el cual fue de 0,12% (inició una alteración lipolítica) (escisión enzimática de la grasa presente en el lactosuero) o bien conocido como enranciamiento de las grasas. Esta alteración presentó más acidificación en los mostos, especialmente en el T₃ (30% de lactosuero dulce – 70% de mucílago de cacao) como ya se mencionó, seguido del T₁ (10% lactosuero dulce – 90% mucílago de cacao) y finalmente el T₂ (20% de lactosuero dulce – 80% mucílago de cacao) en orden decreciente. Es importante aclarar que la acidez titulable del T₁ fue más alta que la del T₂ debido a que esta, fue otorgada mayoritariamente por el mucílago de cacao sin alteraciones sensoriales. Por lo expuestos con anterioridad, se pudo ratificar por las propiedades organolépticas como olor y sabor presentadas en el T₂ y T₃ lo que se puede entender con lo que manifiesta Acevedo y otros (2013), respecto a que la lipólisis en el lactosuero dulce se puede presentar al cabo de 8 a 12 horas, mientras que Simancas y otros (2010), indicó en una investigación referente a lactosuero dulce que éstos problemas de lipólisis se presenta al cabo 24 horas. En la misma línea Cueto (2007), manifiesta que la lipólisis en el lactosuero dulce viene acompañada por una proteólisis que contribuye a un mal sabor y olor a rancio que está en función del porcentaje de grasa. En vista de las alteraciones que se presentan en el lactosuero dulce, éstas se vieron disminuidas en gran medida debido a la corrección de los mostos utilizando bicarbonato de sodio.

Estos autores mencionan la relación directa que hay entre el pH y la acidez, es decir, si el pH sube en relación a la neutralidad, la acidez baja y si por lo contrario el pH baja es decir se torna ácido, la acidez sube.

4.10. pH, ° BRIX, DENSIDAD y °GL (ANOVA)

En base a los datos obtenidos en la prueba de homogeneidad donde las variables en manifiesto superaron la restricción de 0,05 se realizó el ANOVA, el cual indicó que entre estas variables pH, °Brix, densidad, y °GL, si existe diferencia estadística debido a que la significancia es menor 0,05 (**Ver anexo 16**), para lo cual se procedió a evaluar los tratamientos mediante la

comparación de medias, aplicando una prueba estadística de Tukey, la cual realiza un análisis honestamente significativo ya que es una de las pruebas más estrictas.

Para los datos de pH la prueba de Tukey categoriza a los tratamientos de forma ascendente, así el T₃ (30% lactosuero dulce y 70% de mucílago de cacao) lo categorizó como el primer tratamiento con un valor promedio de 3,81 mientras que el T₁ (10% lactosuero dulce y 90% de mucílago de cacao) lo enmarcó en segundo lugar con un valor promedio de 4,29 y por último el T₂ (20% lactosuero dulce y 80% mucílago de cacao) con un pH promedio de 4,4 (**ver anexo 17**). Hoyos y otros (2010), en un estudio respecto a la elaboración de una bebida alcohólica reportan datos finales de pH correspondientes a 3,67 mientras que en una investigación de iguales índoles Carrillo y León (2006), obtuvieron un pH de 3,51 por su parte López (2013), en su investigación referente a la elaboración de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao reportó un pH final de 4,1. A pesar de la corrección que se realizó con bicarbonato de sodio para cada uno de los mostos, se pudo observar que el descenso de esta variable en estudio para el T₃, fue más notorio en relación al T₁ y el T₂. Esto debido a la lipólisis de las grasas del lactosuero que al estar en mayor proporción en el T₃ provocó un descenso de pH y por ende el aumento de la acidez titulable como se menciona anteriormente. Razón por la cual el mejor pH se presentó en el T₁ debido a que no se presentaron alteraciones organolépticas causadas por esta alteración (lipólisis).

Lo que respecta al °Brix la prueba de Tukey los categorizó de forma ascendente debido a la diferencia existente entre los tratamientos en estudio. Así T₁ se enmarcó en primer lugar con valor de 7,10 °Brix en comparación con el T₂ y el T₃ que los categorizó en un mismo subconjunto, con valores promedios de 8,5 °Brix para el T₁ y 9,61 para el T₃ respectivamente (**ver anexo 18**). Los °Brix presentados inicialmente por los tratamientos presentan una concentración de azúcares cerca de la media planteada por Carrillo y León (2006), quienes según indican que mostos con altos porcentajes de azúcares producen mejores propiedades sensoriales. Sin embargo, hacen énfasis que en si estos azúcares llegaran a estar por encima del 35% la actividad de las levaduras se ve afectada por la excesiva concentración de sólidos solubles.

Seguidamente con las pruebas de Tukey para la variable densidad, el T₁ se categorizó como el primer tratamiento en orden ascendente, con un valor promedio de 1,008 g/ml, mientras que el T₃ y el T₂ se enmarcan en la misma categoría en ese respectivo orden, con valores de 1,012 g/ml y 1,013 g/ml respectivamente (**ver anexo 19**). Estos valores en la fermentación, estuvieron en dependencia de los sólidos solubles °Brix ya que a medida avanzaba el proceso catabólico de las levaduras esta variable fue descendiendo.

Para los datos correspondientes a °GI el test de Tukey categoriza al tratamiento T₃ en orden ascendente en primer lugar, con un valor de 28,1 °GI y al T₂ como segundo tratamiento con un valor de 32,3 °GI y por último el T₁ con un valor de 36,5 °GI (**ver anexo 20**) López (2013), en su investigación referente a la fermentación alcohólica de mucílago de cacao, reportó un °GI de 36 por su parte Carrillo y León (2006), indican que el contenido de alcohol así como su graduación están en dependencia directa con el porcentaje de azúcares y el tipo de levadura. Para esta investigación se utilizó un fermento (levadura) de alto poder fermentativo conocido comercialmente como levadura leo filicida US 05, lo que derivó a una graduación de alcohol como las que se obtuvieron en la fermentación para cada uno de los tratamientos. La graduación de alcohol presente en los mostos, también estuvo en dependencia del nutriente (sulfato de amonio) utilizado, debido a que una investigación referente a fermentación alcohólica de mucílago de cacao, demostró que este nutriente, incrementa la velocidad de reacción y el grado alcohólico es mayor (Quimbita, Rodríguez, & Vera, 2013). Las diferencias entre los tratamientos respecto a la producción de alcohol estuvo en dependencia del pH y acidez, variables que determinaron el desempeño de las levaduras como ya se lo mencionó anteriormente, el cual se vio afectado por las concentraciones de azúcares y por las alteraciones de lipólisis presentadas en el T₂ y T₃.

4.11. EVALUACIÓN SENSORIAL DE LA BEBIDA ALCOHÓLICA A PARTIR DE LACTOSUERO DULCE Y MUCÍLAGO DE CACAO

Una vez realizada la prueba sensorial (**ver anexo 21**), los datos obtenidos y analizados fueron sometidos a un ordenamiento lógico estadístico en Microsoft Excel 2013, en donde de acuerdo a lo que ameritaba el estudio en cuestión, se

aplicó la prueba de Basker la cual permite identificar cual de entre varios productos, en este caso tratamientos es preferido entre un grupo de panelistas. Se asumieron tres categorías, 1,2,3, siendo el 1 la categoría de mayor agrado, seguida del 2 y 3 como la de más desagrado (**ver anexo 22**). De acuerdo al número de panelistas y número de productos se definió el valor crítico utilizado, se llevó a cabo la captación con 30 panelistas para 3 productos, es decir el valor crítico fue de 18,2 (**ver anexo 23**).

Como se puede apreciar en el cuadro 4.10 el T_1 es diferente al T_2 y al T_3 . Considerando lo antes expuesto, se obtuvo como resultado que en esta categoría de preferencia, las relaciones de lactosuero dulce y mucílago de cacao si infirieron cuadro 4.11 en las propiedades sensoriales finales de la fermentación alcohólica debido a que los valores obtenidos en la prueba son mayores a 18,2.

Cuadro 4 10. Organización de resultados de la categoría de preferencia usando la prueba de basker

| Producto | Producto | T1 | T2 | T3 |
|-----------|---------------------------|----|-----|-----|
| | Suma de categorías | 40 | 59 | 83 |
| T1 | 40 | 0 | -19 | -43 |
| T2 | 59 | 19 | 0 | -24 |
| T3 | 83 | 43 | 24 | 0 |

Cuadro 4 11. Resultados de significancia entre tratamientos mediante la prueba de Basker

| PRODUCTOS | | T1 | T2 | T3 |
|-----------|----|----|----|----|
| | | 40 | 59 | 83 |
| T1 | 40 | NS | * | * |
| T2 | 59 | * | NS | * |
| T3 | 83 | * | * | NS |

NS no difieren a valores de la tabla de Basker (18,2)

* Difieren a valores mayores al de la tabla de Basker (18,2)

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Las características fisicoquímicas que presentaron las materias primas (lactosuero dulce y mucílago de cacao) estuvieron dentro de los rangos establecidos al igual que en combinación para cada tratamiento, sin embargo fue necesario realizar una corrección con bicarbonato de sodio para estabilizar la variable fisicoquímica pH y acidez y asegurar la estabilidad de la levadura.
- Al cabo de 60 horas de fermentación y mediante la evaluación realizada a cada tratamiento mediante parámetros fisicoquímicos como pH, acidez y °Brix, se comprobó que el T₃ (30% de lactosuero y 70% de mucílago de cacao) presentó descensos de pH mayores en comparación a los demás tratamientos debido a la acidificación que provocó el lactosuero en todo el mosto debido a problemas de lipólisis causados por el contenido de grasa de este subproducto (lactosuero).
- El tratamiento T₁ (10% de lactosuero – 90% de mucílago) presentó las mejores propiedades fisicoquímicas y la mejor aceptabilidad por parte de los catadores, debido a la concentración menor de lactosuero que este poseía, la cual no fue lo suficientemente alta como provocar alteraciones en la bebida.

5.2. RECOMENDACIONES

- Para la elaboración de la bebida alcohólica se debe tener en cuenta factores como el pH, acidez, durante la fermentación ya que son variables que determinan en gran medida el fracaso o éxito en la elaboración bebidas alcohólicas.

- Controlar el tiempo de fermentación es de suma importancia en productos como estos, en hacerlo asegura que la fermentación sea netamente alcohólica y no ocurra otro tipo de fermentación como la maloláctica que deriva a la fermentación acética.
- Para evitar alteraciones como la lipólisis presentada en el lactosuero dulce, se debe realizar una descremación al lactosuero dulce, para evitar problemas que deriven alteraciones indeseables al producto final.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, D., Guzmán, L., & Rodríguez, A. (2013). Cinética de la fermentación en la producción de suero costeño . *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación* , 429 - 430.
- Aimaretti, N., Ybalo, C., Escorcía, M., & Codevilla, A. (28 de JUNIO de 2012). Revalorización de Descarte Agroindustriales para la Obtención de Bioetanol. *INVENIO - UCEL*, 142.
- Alvarez, X., Valdés, I., García, R., Porto, O., & Hernandez, L. H. (2005). Reducción de alcoholes superiores mediante fermentación con mutantes de *Saccharomyces*. *ICIDCA*, 16.
- Araujo, A., Monsalve, L., & Quintero, A. (Julio de 2013). Aprovechamiento del lactosuero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de contaminación ambiental. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4(2), 4.
- Arteaga, Y. (2013). Estudio del desperdicio del mucilago de cacao en el cantón naranjal (provincia del guayas). *Revista ECA Sinergia* , 54.
- Astiasarán, I., & Martínez, J. (2003). *Alimentos Composición y Propiedades*. Madrid: Interamericana de España, S.A.U.
- Blanco, A., Quicazán, M., & Cuenca, M. (2012). Efecto de algunas fuentes de nitrógeno en la fermentación alcohólica . *VITAE* , 235.
- Cabrera, F. (04 de 02 de 2012). INGENIERO . *BEBIDAS FERMENTADAS* . Bogota, Colombia .
- Callejas, J., Prieto, F., Marmolejo, Y., Reyes, V., & Bustos, E. (2 de Agosto de 2012). Depuración por electrocoagulación en un lactosuero: Cinética del proceso. *Tecnología Química, XXXII*(2).
- Carrillo, A., & Leon, A. (2006). Ingeniero Químico . *Desarrollo experimental del proceso para la obtención de una bebida fermentada a partir del mucilago de cacao* . Bucaramanga , Col.
- Casas, A., Aguilar, C., De la Garza, H., Morlett, J., Montet, D., & Rodríguez, R. (2015). Importancia de las levaduras no- *Saccharomyces* durante la fermentación de bebidas alcohólicas . *Investigación y ciencia de la universidad autónoma de aguascalientes* , 74.
- CHR HANSEN. (2014). HA LACTASE 5200.
- Collado, Q. (27 de Noviembre de 2001). *Verema*. Obtenido de <https://www.verema.com/articulos/500449-levaduras-fermentacion-alcoholica-ii>
- Conti, J., Ceriani, M., & Juliarena, M. (2012). Perfil Proteico y Peptídico de una base Fluida para Bebidas Funcionales obtenida por Fermentación de Lactosuero. *Información Tecnológica*, 23(2), 2.

- Cueto, C., García, D., & Garcés, F. C. (2007). Preliminary studies on the microbiological characterization of lactic acid bacteria in suero costeño, a Colombian traditional fermented milk product. *Revista Latinoam Microbiol*, 12 - 18.
- Eart, G. (Febrero de 2016). *Ubicación geográfica de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López*. Bolívar, Manabí, Ecuador.
- Endara, F. (Diciembre de 2002). Ingeniero en Agroindustria. *Elaboración de una bebida a partir del suero de queso y leche decremada con sabor a mango*. Honduras.
- Fermentis. (2016). *Usafale US 05*.
- García, G., & Gomez, L. (1996). Usos de β -galactosidasas microbianas para reducir el contenido de lactosa en leche y productos lácteos. *CENIDSP (Centro de Información para decisiones en Salud Pública)*, 1.
- GOYA, J. (2013). INGENIERA EN INDUSTRIAS PECUARIAS. "Obtención de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao, mediante fermentación anaerobia en diferentes niveles de inoculación". Quevedo, Manabí, Ecuador.
- Guerrón, P. (2015). Ingeniero Químico. *Obtención de contrado proteico mediante tecnología de membranas a partir de suero lácteo de cabra*, 15- 16. Quito, Ecuador.
- Hernández, J., García, F., Reyes, V., Marmolejo, Y., & Méndez, M. (2012). Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fósforo. *Revista Acta Universitaria*, vol, 22, 14.
- Hernández, R., & Rojas, P. (2011). Ingeniero Químico. *Estudio de mucílago de cacao (Theobroma cacao L.) Con fines de aprovechamiento industrial y artesanal, en barlovento, estado miranda*. Caracas, Venezuela.
- Hoyos, J., Urbano, F., Villada, H., Mosquera, S., & Nvia, D. (2010). Determinación de parámetros fermentativos para la formulación y obtención de vino de naranja (*Citrus sinensis*). *Revista Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 31 - 32.
- INEC. (2013). *Censo Agropecuario*. Manabí.
- INTI. (2013). *Calidad de suero*.
- Intriago, R., & Vera, P. (Junio de 2017). Ingeniero Agroindustrial. *Efecto de dosis de lactasa y sacarosa como edulcorante en la obtención de una bebida isotónica a partir de lactosuero dulce*. Calceta, Manabí, Ecuador.
- Lopez, J. (2013). Ingeniero Agroindustrial. *Obtención de una bebida alcohólica a partir de la fermentación de mucílago de cacao (Theobroma cacao L.) en la planta de frutas y hortalizas de la Universidad Estatal de Bolívar*. Guaranda, Bolívar, Ecuador.

- Marcillo, M., & Meza, R. (2010). Ingeniero Agroindustrial . "Vino a partir "del mucílago de cacao (*theobroma cacao l*) en los laboratorios de la ESPAM - MFL". Calceta , Manabí - Bolivar , Ecuador .
- Miyares, M., Torres, D., Padrón, S., Valdés, J., Dias, M., & Bonilla, R. (2015). Aplicación del reactivo de Neesler en la cuantificación de amonio para las fermentaciones de productos biotecnológicos. *Vaccimonitor*, 24, 33.
- Nateras, M. (15 de Febrero de 2005). La importancia del metodo de investigación. *Espacios públicos*, 8(15), 3-4.
- NTE INEN 2594 (Norma Técnica Ecuatoriana). (2011). *Suero de leche líquido. Requisitos*. Quito, Pichincha, Ecuador.
- NTE INEN 2802. (10 de 2015). Norma Tecnica Ecuatoriana. *Bebidas alcoholicas. Cocteles o bebidas alcohólicas mixtasy los aperitivos. Requisitos*. Quito, Quito, Ecuador.
- Ortiz, K., & Alvarez, R. (2015). Efecto del vertimiento de subproductos del beneficio de cacao (*Theobroma cacao L*). sobre algunas propiedades químicas y biológicas en los suelos de una finca cacaotera, municipio de Yaguara (Huila Colombia). *SciELO*, 3-6.
- Padin, C., & Diaz, M. (Diciembre de 2009). Fermentación alcohólica del lactosuero por *Kluyveromyces marxianus* y solventes orgánicos como extractantes. *Revista Venezonala Microbiología*, 29(2), 1-2.
- Paris, X. (2009). Tesis Doctoral. *Obtención de expolisacaridos de interés industrial a partir del lactosuero y permeatos*. Granada, España.
- Parra, R. (16 de Abriyel de 2009). Lactosuero importancia en los alimentos. *Redalyc*, 62(1), 3.
- Poveda, E. (Diciembre de 2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista chilena de nutrición*, 40(4), 1-2.
- Quimbita, F., Rodriguez, P., & Vera, E. (2013). Uso del exudado y placenta del cacao para la obtención de subproductos. *Revista Tecnológica ESPOL*, vol, 26, 13.
- Ramirez, J. (15 de Diciembre de 2011). Aprovechamiento Industrial de lactosuero mediante procesos fermentativos. *Revista Especializada en Ingenieria de procesos en alimentos y biomateriales*, 6, 3-5.
- Reyes, H., Vivas, J., & Romero, A. (2000). *studylib.es*. Obtenido de *studylib.es*: <http://studylib.es/doc/701503/la-calidad-del-cacao--ii.-cosecha-y-fermentación>
- Rodriguez, D., & Aldo, H. (Abril de 2017). Desarrollo de una bebida fermentada de suero con la adición de jugo de Aloe vera y pulpa de fruta. *Tecnologica Quimica*, 37(1), 2-3.
- Sánchez, C., Rosales, M., & Bustamante, A. (Noviembre de 2015). Modelo de hidrólisis de lactosa para fermentación láctica en una base probiótica y simbiótica. *Revista Tecnológica Espol*, 28(3), 6.

- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. *Biotecnología*, 16(2), 2.
- Simancas, M., Arteaga, M., Pérez, Y., Soto, M., & Salcedo, J. (2010). Characterization and study of spontaneous fermentation of fermented milk product (suero costeño), produced in Montaria. *Revista MVZ Córdoba*, 1944 - 1953.
- Suárez, C., Garrido, N., & Guevara, C. (2016). Levadura *Saccharomyces Cerevisiae* y la producción de alcohol. *ICIDCA (Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar)*, 21 - 23.
- Vallejo, C., Ocampo, R., Morales, W., Soria, R., Vera, J., & Baren, C. (25 de Abril de 2016). Utilización del mucílago de cacao, tipo nacional y trinitario, en la obtención de una jalea. *ESPAM CIENCIA*, 7(1), 1-2.
- Vasquez, H., & Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Redalyc*, 5-8.
- Wacher, M. (2011). Chocolate y microorganismos. *Revista Digital Universitaria UNAM*, 4-6.

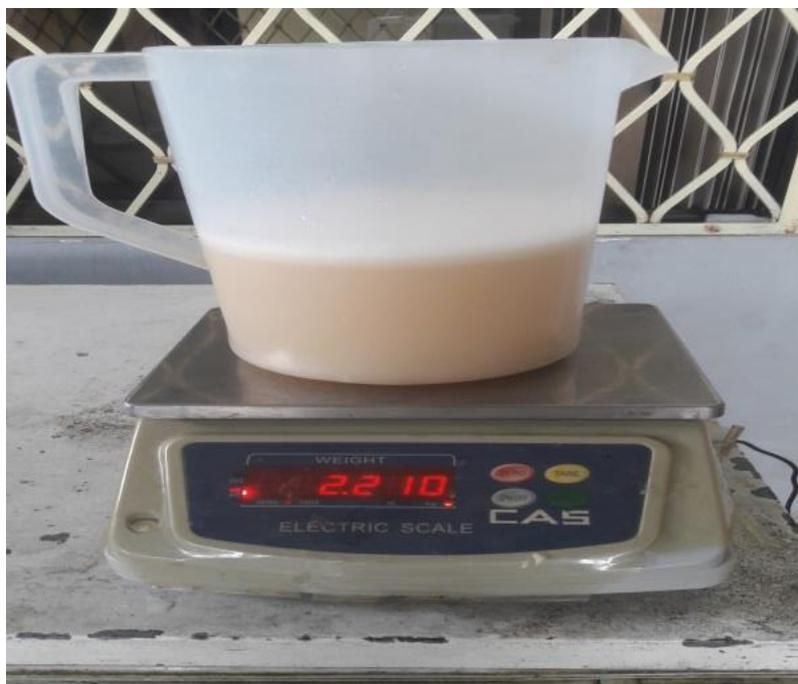
ANEXOS

Anexo 1



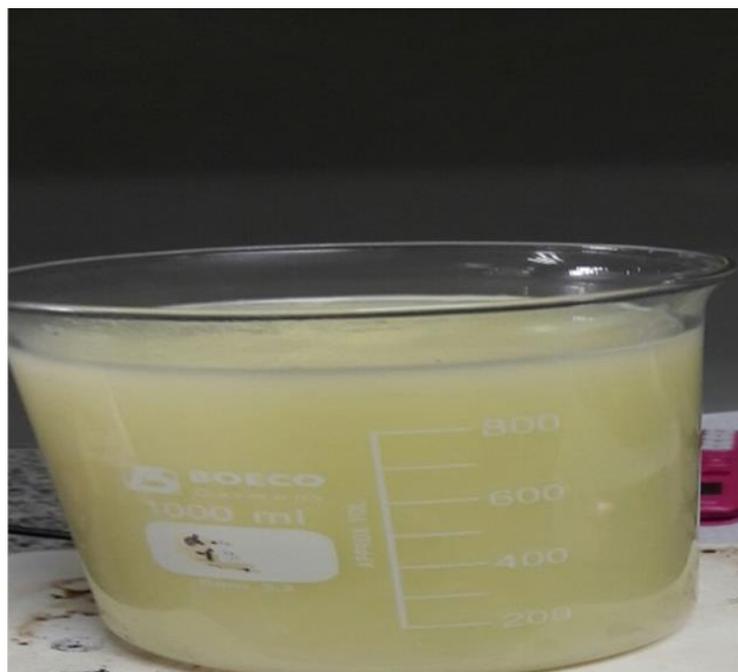
Clasificación de las mazorcas de cacao variedad CCN51 por su estado de madurez

Anexo 2



Obtención del mucílago de cacao variedad CCN51

Anexo 3



Obtención del lactosuero dulce

Anexo 4



Caracterización fisicoquímica del mucílago de cacao y lactosuero dulce

Anexo 5



Filtración para reducir el porcentaje de grasa en el lactosuero dulce

Anexo 6



Caracterización de mostos combinados (tratamientos)

Anexo 7



Evaluación del pH para los tratamientos (tiempo de fermentación)

Anexo 8



Evaluación del % de acidez para los tratamientos (tiempo de fermentación)

Anexo 9



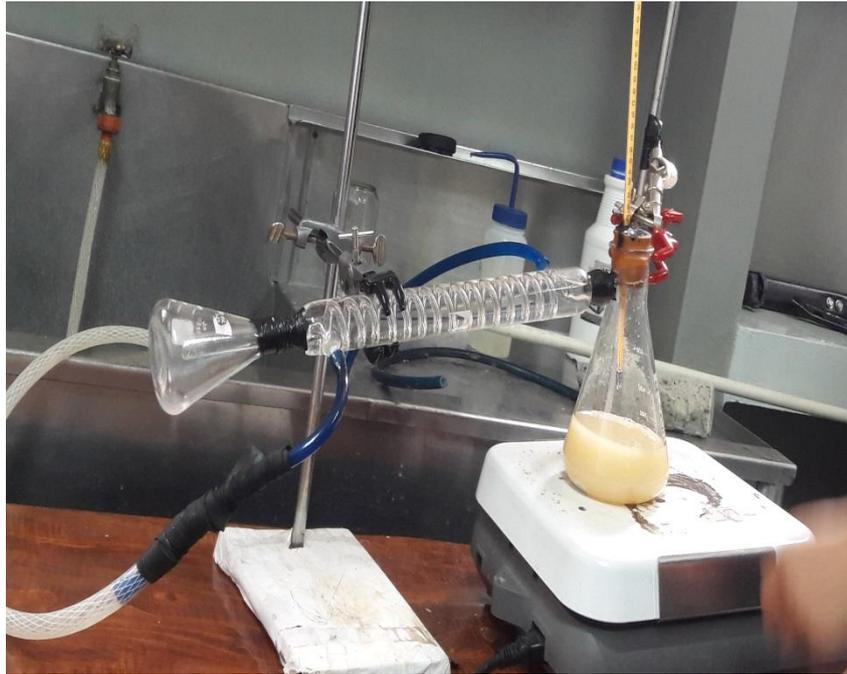
Evaluación del °Brix para los tratamientos (Tiempo de fermentación)

Anexo 10



Caracterización de los tratamientos post-fermentación

Anexo 11



Destilación de la bebida fermentada para medir °GI

Anexo 12



Medición de los °GI

Anexo 13

| | Tratamiento | Shapiro-Wilk | | |
|----------|---------------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. |
| pH | Tratamiento 1 | ,881 | 5 | ,314 |
| | Tratamiento 2 | ,883 | 5 | ,325 |
| | Tratamiento 3 | ,883 | 5 | ,325 |
| Acidez | Tratamiento 1 | ,881 | 5 | ,314 |
| | Tratamiento 2 | ,810 | 5 | ,097 |
| | Tratamiento 3 | ,779 | 5 | ,054 |
| °Brix | Tratamiento 1 | ,881 | 5 | ,314 |
| | Tratamiento 2 | ,881 | 5 | ,314 |
| | Tratamiento 3 | ,902 | 5 | ,421 |
| Densidad | Tratamiento 1 | ,914 | 5 | ,492 |
| | Tratamiento 2 | ,902 | 5 | ,421 |
| | Tratamiento 3 | ,956 | 5 | ,777 |
| °GL | Tratamiento 1 | ,821 | 5 | ,119 |
| | Tratamiento 2 | ,881 | 5 | ,314 |
| | Tratamiento 3 | ,956 | 5 | ,777 |

Anexo 14

| | Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
|----------|--------------------------|-----|-----|------|
| pH | ,365 | 2 | 12 | ,701 |
| Acidez | 6,289 | 2 | 12 | ,014 |
| °Brix | 1,105 | 2 | 12 | ,363 |
| Densidad | ,017 | 2 | 12 | ,984 |
| °GL | ,480 | 2 | 12 | ,630 |

Anexo 15

Prueba de Kruskal-Wallis para la variable de acidez

Resumen de prueba de hipótesis

| | Hipótesis nula | Test | Sig. | Decisión |
|----------|--|--|------|-----------------------------|
| 1 | La distribución de Acidez es la misma entre las categorías de Tratamiento. | Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes | ,002 | Rechazar la hipótesis nula. |

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Anexo 16

ANOVA para las variables con restricción superior a 0,05

| | | gl | Suma de cuadrados | Media cuadrática | F | Sig. |
|----------|-------------|----|-------------------|------------------|-----------|------|
| | Total | 14 | ,987 | | | |
| pH | Tratamiento | 2 | ,987 | ,493 | 8707,176 | ,000 |
| | Error | 12 | ,001 | ,000 | | |
| | Total | 14 | 15,822 | | | |
| °Brix | Tratamiento | 2 | 15,820 | 7,910 | 76550,000 | ,000 |
| | Error | 12 | ,001 | ,000 | | |
| | Total | 14 | ,000 | | | |
| Densidad | Tratamiento | 2 | ,000 | ,000 | 15,710 | ,000 |
| | Error | 12 | ,000 | ,000 | | |
| | Total | 14 | 182,400 | | | |
| °GL | Tratamiento | 2 | 176,400 | 88,200 | 176,400 | ,000 |
| | Error | 12 | 6,000 | ,500 | | |

Anexo 17

Prueba de Tukey para la variable pH

HSD de Tukey^a

| Tratamiento | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | |
|---------------|---|------------------------------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| Tratamiento 3 | 5 | 3,8100 | | |
| Tratamiento 1 | 5 | | 4,2920 | |
| Tratamiento 2 | 5 | | | 4,4000 |
| Sig. | | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Anexo 18

Prueba de Tukey para la variable °Brix

HSD de Tukey^a

| Tratamiento | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | |
|---------------|---|------------------------------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| Tratamiento 1 | 5 | 7,1020 | | |
| Tratamiento 2 | 5 | | 8,5020 | |
| Tratamiento 3 | 5 | | | 9,6120 |
| Sig. | | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Anexo 19

Prueba de Tukey para la variable densidad

HSD de Tukey^a

| Tratamiento | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | |
|---------------|---|------------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| Tratamiento 1 | 5 | 1,00860 | |
| Tratamiento 3 | 5 | | 1,01280 |
| Tratamiento 2 | 5 | | 1,01320 |
| Sig. | | 1,000 | ,900 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Anexo 20

Prueba de Tukey para la variable °GL

HSD de Tukey^a

| Tratamiento | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | |
|---------------|---|------------------------------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| Tratamiento 3 | 5 | 28,100 | | |
| Tratamiento 2 | 5 | | 32,300 | |
| Tratamiento 1 | 5 | | | 36,500 |
| Sig. | | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Anexo 21

Ficha de evaluación sensorial de las bebidas alcohólicas (tratamientos)



ESPAMMFL
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA
AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LÓPEZ

BEBIDA ALCOHÓLICA DE MUCÍLAGO DE CACAO Y LACTOSUERO DULCE

Frente a usted se encuentran tres muestras de bebidas alcohólicas a base de mucílago de cacao y lactosuero dulce en diferentes relaciones. Estas se presentan para su degustación, ordénelas de manera creciente según su aceptación.

Nota: después de degustar una muestra enjuagar la boca con agua.

Menos

Códigos



Más

COMENTARIOS:

MUCHAS GRACIAS!

Anexo 22

Interpretación de los resultados mediante la prueba de Basker (Categorización)

BEBIDA ALCOHÓLICA

| PANELISTAS | PRODUCTOS | | | TOTAL |
|---------------------------|---|---|---|------------|
| | T1 (10% LACTOSUERO DULCE-90% MUCÍLAGO DE CACAO) | T2 (20% LACTOSUERO DULCE-80% MUCÍLAGO DE CACAO) | T3 (30% LACTOSUERO DULCE-70% MUCÍLAGO DE CACAO) | |
| 1 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 2 | 1 | 3 | 2 | 6 |
| 3 | 2 | 3 | 3 | 8 |
| 4 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 5 | 1 | 3 | 2 | 6 |
| 6 | 2 | 1 | 3 | 6 |
| 7 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 8 | 2 | 1 | 3 | 6 |
| 9 | 1 | 3 | 2 | 6 |
| 10 | 2 | 1 | 3 | 6 |
| 11 | 2 | 1 | 3 | 6 |
| 12 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 13 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 14 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 15 | 2 | 1 | 3 | 6 |
| 16 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 17 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 18 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 19 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 20 | 1 | 3 | 2 | 6 |
| 21 | 2 | 1 | 3 | 6 |
| 22 | 2 | 1 | 3 | 6 |
| 23 | 1 | 3 | 2 | 6 |
| 24 | 2 | 1 | 3 | 6 |
| 25 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 26 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 27 | 1 | 3 | 2 | 6 |
| 28 | 2 | 1 | 3 | 6 |
| 29 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 30 | 1 | 3 | 2 | 6 |
| Suma de categorías | 40 | 59 | 83 | 182 |

Anexo 23

| Número de panelistas | Número de productos | | | | | | | | |
|----------------------|---------------------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 20 | 8.8 | 14.8 | 21.0 | 27.3 | 33.7 | 40.3 | 47 | 53.7 | 60.6 |
| 21 | 9.0 | 15.2 | 21.5 | 28.0 | 34.6 | 41.3 | 48.1 | 55.1 | 62.1 |
| 22 | 9.2 | 15.5 | 22.0 | 28.6 | 35.4 | 42.3 | 49.2 | 56.4 | 63.5 |
| 23 | 9.4 | 15.9 | 22.5 | 29.3 | 36.2 | 43.2 | 50.3 | 57.6 | 65.0 |
| 24 | 9.6 | 16.2 | 23.0 | 29.3 | 36.9 | 44.1 | 51.4 | 58.9 | 66.4 |
| 25 | 9.8 | 16.6 | 23.5 | 29.9 | 37.7 | 45.0 | 52.5 | 60.1 | 67.7 |
| 26 | 10.0 | 16.9 | 23.9 | 30.5 | 38.4 | 45.9 | 53.5 | 61.3 | 69.1 |
| 27 | 10.2 | 17.2 | 24.4 | 31.1 | 39.2 | 46.8 | 54.6 | 62.4 | 70.4 |
| 28 | 10.4 | 17.5 | 24.8 | 31.7 | 39.9 | 47.7 | 55.6 | 63.6 | 71.7 |
| 29 | 10.6 | 17.8 | 25.3 | 32.3 | 40.6 | 48.5 | 56.5 | 64.7 | 72.9 |
| 30 | 10.7 | 18.2 | 25.7 | 32.8 | 41.3 | 49.3 | 57.5 | 65.8 | 74.2 |
| 31 | 10.9 | 18.5 | 26.1 | 33.4 | 42.0 | 50.2 | 59.4 | 66.9 | 75.4 |
| 32 | 11.1 | 18.7 | 26.5 | 34.0 | 42.6 | 51.0 | 60.3 | 60.3 | 76.6 |
| 33 | 11.3 | 19.0 | 26.9 | 35.0 | 43.3 | 51.7 | 61.2 | 69.0 | 77.8 |
| 34 | 11.4 | 19.3 | 27.3 | 35.6 | 44.0 | 52.5 | 62.1 | 70.1 | 79.0 |
| 35 | 11.6 | 19.6 | 27.7 | 36.1 | 44.6 | 53.3 | 63 | 71.1 | 80.1 |
| 36 | 11.8 | 19.9 | 28.1 | 36.6 | 45.2 | 54.0 | 63.9 | 72.1 | 81.3 |
| 37 | 11.9 | 20.2 | 28.5 | 37.1 | 45.9 | 54.8 | 64.7 | 73.1 | 82.4 |
| 38 | 12.1 | 20.4 | 28.9 | 37.6 | 46.5 | 55.5 | 67.2 | 74.1 | 83.5 |
| 39 | 12.2 | 20.7 | 29.3 | 38.1 | 47.1 | 56.3 | 65.6 | 75.0 | 84.6 |
| 40 | 12.4 | 21.0 | 29.7 | 38.6 | 47.7 | 57.0 | 66.4 | 76.0 | 85.7 |
| 41 | 12.6 | 21.2 | 30.0 | 39.1 | 48.3 | 57.7 | 67.2 | 76.9 | 86.7 |
| 42 | 12.7 | 21.5 | 30.4 | 39.5 | 48.9 | 58.4 | 68 | 77.9 | 87.8 |
| 43 | 12.9 | 21.7 | 30.8 | 40.0 | 49.4 | 59.1 | 68.8 | 78.8 | 88.8 |
| 44 | 13.0 | 22.0 | 31.1 | 40.5 | 50.0 | 59.8 | 69.6 | 79.7 | 89.9 |
| 45 | 13.1 | 22.2 | 31.5 | 40.9 | 50.6 | 60.4 | 70.4 | 80.6 | 90.9 |
| 46 | 13.3 | 22.5 | 31.8 | 41.4 | 51.1 | 61.1 | 71.2 | 81.5 | 91.9 |
| 47 | 13.4 | 22.7 | 32.2 | 41.8 | 51.7 | 61.8 | 72 | 82.4 | 92.1 |
| 48 | 13.6 | 23.0 | 32.5 | 42.3 | 52.2 | 62.4 | 72.7 | 83.2 | 93.8 |
| 49 | 13.7 | 23.2 | 32.8 | 42.7 | 52.8 | 63.1 | 73.5 | 84.1 | 94.8 |
| 50 | 13.9 | 23.4 | 33.2 | 43.1 | 53.3 | 63.7 | 74.2 | 85.0 | 95.8 |
| 55 | 14.5 | 24.6 | 34.8 | 45.2 | 55.9 | 66.8 | 77.9 | 89.1 | 100.5 |
| 60 | 15.2 | 25.7 | 36.3 | 47.3 | 58.4 | 69.8 | 81.3 | 93.1 | 104.9 |
| 65 | 15.8 | 26.7 | 37.8 | 49.2 | 60.8 | 72.6 | 84.6 | 96.9 | 109.2 |
| 70 | 16.4 | 27.7 | 39.2 | 51.0 | 63.1 | 75.4 | 87.8 | 100.5 | 113.3 |
| 80 | 17.5 | 29.6 | 42.0 | 54.6 | 67.4 | 80.6 | 93.9 | 107.5 | 121.2 |
| 90 | 18.6 | 31.4 | 44.5 | 57.9 | 71.5 | 85.5 | 99.6 | 114.0 | 128.5 |
| 100 | 19.6 | 33.1 | 46.9 | 61.0 | 75.4 | 90.1 | 105 | 120.1 | 135.5 |
| 110 | 20.6 | 34.8 | 49.2 | 64.0 | 79.1 | 94.5 | 110.1 | 126.0 | 142.1 |
| 120 | 21.5 | 36.3 | 51.4 | 66.8 | 82.6 | 98.7 | 115 | 131.6 | 148.4 |

Anexo 24

LACTASA

DOSIFICACIÓN Para 5200 NLU

La dosificación de la enzima depende del producto a fabricar, el grado de hidrólisis deseado y las condiciones del proceso.

Las dosificaciones estimadas que se dan a continuación están calculadas para un contenido del 5 % de la lactosa en leche o suero, que es el contenido normal de lactosa de la leche.

Para concentraciones más elevadas de lactosa se debe aumentar la cantidad de Lactasa proporcionalmente.

DOSIFICACIONES ESTIMADAS

| Dosificación (ml / l) 5200 NLU | Tiempo de reacción (horas) | Temperatura de reacción °C | Grado de hidrólisis % |
|--|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| 0,11 - 0,19 | 10 | 5 | 20 |
| 0,4 - 0,08 | 24 | 5 | 20 |
| 0,19 - 0,35 | 1 | 30 | 20 |
| 0,04 - 0,08 | 4 | 30 | 20 |
| 0,08 - 0,15 | 1 | 40 | 20 |
| 0,05 - 0,1 | 4 | 40 | 20 |
| 0,38 - 0,61 | 10 | 5 | 50 |
| 0,19 - 0,27 | 24 | 5 | 50 |
| 0,80 - 1,19 | 1 | 30 | 50 |
| 0,19 - 0,30 | 4 | 30 | 50 |
| 0,35 - 0,54 | 1 | 40 | 50 |
| 0,08 - 0,15 | 4 | 40 | 50 |
| 1,35 - 2,07 | 10 | 5 | 80 |
| 0,6 - 0,84 | 24 | 5 | 80 |
| 2,65 - 4,0 | 1 | 30 | 80 |
| 0,65 - 1,0 | 4 | 30 | 80 |
| 1,12 - 1,7 | 1 | 40 | 80 |
| 0,27 - 0,42 | 4 | 40 | 80 |

Anexo 25



| REPORTE DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS | | | |
|------------------------------------|---|-------------------|---|
| CLIENTES | ESPINOZA, H y MENDIETA, E. | C.I: | 1316870912 1310743198 |
| DIRECCIÓN | Calceta | Nº DE ANÁLISIS | 35 |
| TELÉFONO | 0987220535 | FECHA RECIBIDO | 19/06/2018 |
| NOMBRE DE LA MUESTRA | 1 muestra de lactosuero dulce (entero y filtrado); 1 de mucílago de cacao variedad CNN51 | FECHA DE ANÁLISIS | INICIO: 19/06/2018 FINAL: 23/06/2018 |
| CANTIDAD RECIBIDA | 100 ml de lactosuero dulce entero; 100 ml de lactosuero dulce hidrolizado; 100 ml de mucílago de cacao variedad CCN51 | FECHA DE MUESTREO | 19/06/2018 |
| OBJETIVO DEL MUESTREO | Análisis fisicoquímicos | FECHA DE REPORTE | 21/06/2018 |
| OBSERVACIONES | Los laboratoristas que realizan los análisis son responsables | | |

RESULTADOS DE CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

| MUCÍLAGO DE CACAO VARIEDAD CCN51 | | |
|----------------------------------|-------|------------|
| ANÁLISIS | UNID | RESULTADOS |
| pH | ----- | 3,97 |
| Acidez titulable (ácido cítrico) | % | 1,09 |
| Densidad | g/ml | 1,079 |
| ° Brix | % | 18,2 |
| Humedad | % | 81,3 |
| Cenizas | % | 1,54 |

| LACTOSUERO DULCE ENTERO E HIDROLIZADO | | | |
|---------------------------------------|-------|-------------------------|----------------------------|
| ANÁLISIS | UNID | LACTOSUERO DULCE ENTERO | SUERO FILTRADO HIDROLIZADO |
| pH | ----- | 6,72 | 6,53 |
| Acidez titulable (ácido láctico) | % | 0,04 | 0,05 |
| Densidad | g/ml | 1,024 | 1,008 |
| Brix | % | 7,5 | 7,3 |
| Cenizas | % | 0,57 | 0,43 |
| Materia grasa | % | 0,28 | 0,12 |

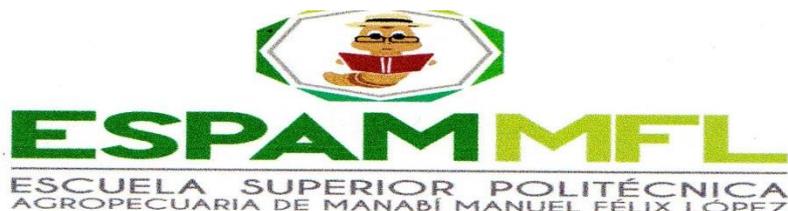
ANALISTA: Jorge Teca

ANALISTA DEL LAB. DE BROMATOLOGÍA



LABORATORIOS DE BROMATOLOGÍA DEL ÁREA AGROPECUARIA DE MANABÍ

Anexo 26



| REPORTE DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS | | | |
|------------------------------------|---|-------------------|---|
| CLIENTES | ESPINOZA, H y MENDIETA, E. | C.I: | 1316870912 1310743198 |
| DIRECCIÓN | Calceta | N° DE ANÁLISIS | 36 |
| TELÉFONO | 0987220535 | FECHA RECIBIDO | 19/06/2018 |
| NOMBRE DE LA MUESTRA | Muestras (3) de relaciones de lactosuero dulce y mucilago de cacao CCN51 | FECHA DE ANÁLISIS | INICIO: 19/06/2018 FINAL: 23/06/2018 |
| CANTIDAD RECIBIDA | 100 ml de mosto combinado por cada tratamiento. T1(10% L.S - 90% M); T2 (20% L.S - 80% M); T3 (20% L.S - 80% M) | FECHA DE MUESTREO | 19/06/2018 |
| OBJETIVO DEL MUESTREO | Análisis fisicoquímicos | FECHA DE REPORTE | 21/06/2018 |
| OBSERVACIONES | Los laboratoristas que realizan los análisis son responsables | | |

RESULTADOS DE CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS TRATAMIENTOS

| CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICA DE LOS TRATAMIENTOS | | | | |
|---|--------|----------------------|---------------------|----------------------|
| ANÁLISIS | UNIDAD | T1 (10% s. - 90% M.) | T2 (20%S. - 80% M.) | T3 (30% S. - 70% M.) |
| pH | ----- | 4,07 | 4,12 | 4,25 |
| Acidez (á. C -á. L) | % | 1,12 | 1,07 | 0,98 |
| Densidad | g/ml | 1,078 | 1,074 | 1,067 |
| °Brix | % | 17,2 | 16,2 | 15,2 |

| CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LOS TRATAMIENTOS CORREGIDOS CON BICARBONATO DE SODIO | | | | |
|--|--------|----------------------|---------------------|----------------------|
| ANÁLISIS | UNIDAD | T1 (10% s. - 90% M.) | T2 (20%S. - 80% M.) | T3 (30% S. - 70% M.) |
| pH | | 4,63 | 4,77 | 5,12 |
| Acidez (á. C -á. L) | % | 0,71 | 0,64 | 0,59 |
| Densidad | g/ml | 1,078 | 1,074 | 1,067 |
| °Brix | % | 17,2 | 16,2 | 15,2 |

ANALISTA: Jorge Teca Vergada
ANALISTA DEL LAB. DE BROMATOLOGÍA



LABORATORIOS DE BROMATOLOGÍA DEL ÁREA AGROPECUARIA DE LA ESPAM MFL

Anexo 27



| REPORTE DE ANÁLISIS FISIQUÍMICOS | | | |
|----------------------------------|--|-------------------|---|
| CLIENTES | ESPINOZA, H y MENDIETA, E. | C.I: | 1316870912 1310743198 |
| DIRECCIÓN | Calceta | N° DE ANÁLISIS | 37 |
| TELÉFONO | 0987220535 | FECHA RECIBIDO | 19/06/2018 |
| NOMBRE DE LA MUESTRA | Muestras (3) de relaciones de lactosuero dulce y mucilago de cacao CCN51 (bebidas alcohólicas) | FECHA DE ANÁLISIS | INICIO: 19/06/2018 FINAL: 25/06/2018 |
| CANTIDAD RECIBIDA | 100 ml de bebida alcohólica por cada tratamiento. T1 (10% L.S – 90% M); T2 (20% L.S – 80% M); T3 (20% L.S – 80% M) | FECHA DE MUESTREO | 25/06/2018 |
| OBJETIVO DEL MUESTREO | Análisis fisicoquímicos | FECHA DE REPORTE | 27/06/2018 |
| OBSERVACIONES | Los laboristas que realizan los análisis son responsables | | |

RESULTADOS DE CARACTERIZACIÓN FINAL DE BEBIDA ALCOHÓLICA A PARTIR DE LACTOSUERO DULCE Y MUCÍLAGO DE CACAO VARIEDAD CCN51

| CARACTERÍSTICAS FISIQUÍMICAS FINALES DE LOS TRATAMIENTOS | | | | |
|--|--------|----------------------|----------------------|----------------------|
| ANÁLISIS | UNIDAD | T1 (10% S. - 90% M.) | T2 (20% S. - 80% M.) | T3 (30% S. - 70% M.) |
| pH | ----- | 4,29 | 4,4 | 3,81 |
| Acidez (á. C - á. L) | % | 1,012 | 0,97 | 1,25 |
| Densidad | g/ml | 1,008 | 1,011 | 1,012 |
| °Brix | % | 7,1 | 8,5 | 9,61 |
| ° Alcohólico | °GL | 36,5 | 32,3 | 28 |


 Analista Jorge Teca Del
 ANALISTA DEL LAB. DE BROMATOLOGÍA



LABORATORIOS DE BROMATOLOGÍA DEL ÁREA AGROINDUSTRIAL DE LA ESPAM MFL

Anexo 28

REPÚBLICA DEL ECUADOR


ESPAMMFL

 ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA
 AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LÓPEZ
 Ley 2006 - 49 Suplemento R.O. 298 - 23 - 06 - 2006
 CALCETA - ECUADOR

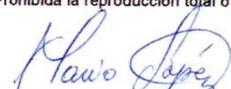

| REPORTE DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO | | Página 1 de 1 | |
|------------------------------------|---|----------------------------|-----------------|
| CLIENTES: | Espinoza Vaca Héctor Aníbal Mendieta García Esneider Fabián | Nº de análisis: | 6 |
| DIRECCIÓN: | Campus Politécnico El Limón | | |
| TÉLEFONO: | 0987220535 | Fecha de recibido: | 07/08/2018 |
| NOMBRE DE LA MUESTRA: | BEBIDA ALCOHÓLICA, ELABORADA A PARTIR DE LACTOSUERO Y MUCILAGO DE CACAO | Fecha de análisis: | 07/08/2018 |
| CANTIDAD RECIBIDA: | 3 | Fecha de reporte: | 13/08/2018 |
| TIPO DE ENVASE: | Recipiente de vidrio de 250 ml de capacidad | Fecha de muestreo: | 07/08/2018 |
| OBSERVACIONES: | El laboratorio no se responsabiliza por la recolección y el traslado de las muestras. | Método de muestreo: | NTE INEN 1529-2 |
| OBJETIVO DEL MUESTREO: | Control de calidad | Responsables del muestreo: | Investigadores |

| IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA | PRUEBAS SOLICITADAS | UNIDAD | RESULTADOS | MÉTODO DE ENSAYO |
|----------------------------------|---------------------|----------|-------------------------|------------------|
| T ₁ BEBIDA ALCOHÓLICA | Mohos y Levaduras | UP/ml | * ≤ 1,0x10 ¹ | NTE INEN 1529-10 |
| | Salmonella sp. | UFC/25ml | Ausencia | NTE INEN 1529-15 |
| T ₂ BEBIDA ALCOHÓLICA | Mohos y Levaduras | UP/ml | * ≤ 1,0x10 ¹ | NTE INEN 1529-10 |
| | Salmonella sp. | UFC/25ml | Ausencia | NTE INEN 1529-15 |
| T ₃ BEBIDA ALCOHÓLICA | Mohos y Levaduras | UP/ml | * ≤ 1,0x10 ¹ | NTE INEN 1529-10 |
| | Salmonella sp. | UFC/25ml | Ausencia | NTE INEN 1529-15 |

* < 1,0x10¹ = En dos serie de (2) placas examinadas no contienen unidades propagadoras de colonias (UP)

Nota:

Resultados validos únicamente para las muestras analizadas. No para otros productos de la misma procedencia. Prohibida la reproducción total o parcial de este informe.


 Ing. Mario López Vera.

COORDINADOR (E) LAB. DE MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL ÁREA AGROINDUSTRIAL


 ICINAS CENTRALES:
 de agosto No. 82 y Granda Centeno

www.espam.edu.ec
rectorado@espam.edu.ec

 CAMPUS POLITÉCNICO CALCETA
 Sitio El Limón