



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
COMISIÓN ORGANIZADORA

**RESOLUCIÓN DE COMISIÓN ORGANIZADORA
N° 646-2017-UNAM**

Moquegua, 27 de Noviembre de 2017

VISTOS, el Informe N° 0293-2017-EPIA/VIPAC/UNAM de 20 de Noviembre 2017, Oficio N° 456-2017-VIPAC-CO/UNAM de 21 de Noviembre 2017, Informe N° 148-2017-EEP-UNAM de 15 de Noviembre 2017, Acuerdo de Sesión Ordinaria de Comisión Organizadora del 27 de Noviembre 2017, y;

CONSIDERANDO:

Que, el párrafo cuarto del artículo 18° de la Constitución Política del Estado, concordante con el artículo 8° de la Ley N° 30220, Ley Universitaria, reconoce la autonomía universitaria, en el marco normativo, de gobierno, académico, administrativo y económico, que guarda concordancia con los artículos 6°, 7°, 8°, 9° y 10° del Estatuto Universitario;

Que, el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Moquegua, aprobado con Resolución de Comisión Organizadora N° 190-2016-UNAM de 05 de Agosto de 2016, establece en el Artículo 12°, que el proyecto de tesis es un trabajo de investigación individual que presentan los estudiantes del último año académico, egresados o bachilleres al Director de la Escuela Profesional, con la finalidad de resolver un problema objeto de estudio, asimismo, precisa en el Artículo 15° que todo proyecto de tesis debe tener un asesor, quien deberá ser docente ordinario de la Escuela Profesional o en forma facultativa un docente contratado en la especialidad en el área que se investiga. El jurado dictaminador del proyecto, será designado por el Comité Asesor y el Director de la Escuela Profesional, el mismo que estará compuesto por tres miembros elegidos entre los docentes ordinarios y/o contratados, conforme se indica en los artículos 18°, 19° y 20° del precitado Reglamento.

Que, mediante Informe N° 0293-2017-EPIA/VIPAC/UNAM de 20 de Noviembre 2017, el Director de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, solicita a Vicepresidencia Académica la aprobación del proyecto de tesis denominado: "APROVECHAMIENTO DEL ORUJO DE UVA (vitis vinífera L.) PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL POR VÍA HIDROLISIS ALCALINA Y ENZIMÁTICA EN EL VALLE DE MOQUEGUA", presentado por el Bachiller Hosin Humiri Huaraya, el mismo que fue declarado apto según acta de aprobación de proyecto de tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial de fecha 15 de Noviembre de 2017, solicitando se emita el acto resolutorio.

Que, con Oficio N° 456-2017-VIPAC-CO/UNAM de 21 de Noviembre de 2017, la Dra. María Elena Echevarría Jaime, Vicepresidenta Académica de la Universidad Nacional de Moquegua, solicita al Dr. Washington Zeballos Gámez Presidente de la Comisión Organizadora – UNAM, la emisión de acto resolutorio de reconocimiento de aprobación de proyecto de tesis, así como la designación de asesor y miembros del jurado dictaminador, conforme se precisa en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Moquegua.

Que, en Sesión Ordinaria de Comisión Organizadora del 27 de Noviembre 2017, se acordó por UNANIMIDAD, Aprobar el Proyecto de Tesis en referencia presentado por el Bachiller Hosin Humiri Huaraya, asimismo se acordó designar como Asesor de Tesis al Dr. Rene German Sosa Vilca y a los miembros del jurado dictaminador de la Escuela Profesional de Ingeniería de Agroindustrial de la UNAM, encargados de evaluar el trabajo de investigación, conforme a la propuesta remitida.

Por las consideraciones precedentes y en uso de las atribuciones que le concede la Ley Universitaria N° 30220, el Estatuto de la Universidad Nacional de Moquegua y lo acordado en Sesión Ordinaria de Comisión Organizadora del 27 de Noviembre 2017.

SE RESUELVE:

ARTÍCULO PRIMERO.- APROBAR, el Proyecto de Tesis denominado: "APROVECHAMIENTO DEL ORUJO DE UVA (vitis vinífera L.) PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL POR VÍA HIDROLISIS ALCALINA Y ENZIMÁTICA EN EL VALLE DE MOQUEGUA" el Bachiller HOSIN HUMIRI HUARAYA, conforme a lo expuesto a la parte considerativa de la presente resolución.

ARTÍCULO SEGUNDO.- DESIGNAR, al Asesor Principal de Tesis al Dr. Rene German Sosa Vilca, aprobado en el artículo primero de la presente resolución.





UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
COMISIÓN ORGANIZADORA

**RESOLUCIÓN DE COMISIÓN ORGANIZADORA
N° 646-2017-UNAM**

ARTÍCULO TERCERO.- DESIGNAR, al Jurado Revisor y Dictaminador del Proyecto de Tesis: "APROVECHAMIENTO DEL ORUJO DE UVA (*vitis vinifera* L.) PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL POR VÍA HIDROLISIS ALCALINA Y ENZIMÁTICA EN EL VALLE DE MOQUEGUA", presentado por el Bachiller, HOSIN HUMIR HUARAYA, conforme al siguiente detalle:

➤	Mg. ELIAS ESCOBEDO PACHECO	:	PRESIDENTE
➤	Mg. CESAR AUGUSTO NAPA ALMEYDA	:	PRIMER MIEMBRO
➤	Ing. JERONIMO MARTIN SARCO BURGOS	:	SEGUNDO MIEMBRO

ARTÍCULO CUARTO.- ENCARGAR, a los profesionales designados el cumplimiento de lo establecido en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Moquegua, asimismo, Vicepresidencia Académica deberá adoptar las acciones académicas necesarias, para el cumplimiento de la presente resolución.

Regístrese, Comuníquese, Publíquese y Archívese.



[Handwritten Signature]
DR. WASHINGTON ZEBALLOS GÁMEZ
PRESIDENTE



[Handwritten Signature]
ABOG. GUILLERMO S. KUONG CORNEJO
SECRETARIO GENERAL

Presidencia
VIPAC
VIPJ
EPJM
Interesado
Arch. (2)



PÉRÚ

UNAM

Universidad Nacional de Moquegua

VIPAC

Vicepresidencia Académica

EPIA

Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial



FOLIO N°

005

"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

INFORME N° 293-2017-EPIA/VIPAC/UNAM

A : DRA. MARIA ELENA ECHEVARRIA JAIME
Vicepresidenta Académica - UNAM

DE : Ing. M.Sc. MARIO ROGER COTACALLAPA SUCAPUCA
Director de la Escuela Profesional de INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

ASUNTO : Aprobación de Proyecto de Tesis, Ratificación de Asesor, Jurado Dictaminador y Revisor.

REFERENCIA : INFORME N° 148-2017-EEP-UNAM

FECHA : Moquegua, 20 de noviembre del 2017



Es grato dirigirme a usted, con la finalidad de saludarla cordialmente, y a su vez hacer de su conocimiento que en atención al documento de la referencia, presentado por el Mg. Elías Escobedo Pacheco tiene a bien informar a esta dirección que con fecha 15 de noviembre del 2017 se declara APTO el Proyecto de Tesis denominado "APROVECHAMIENTO DEL ORUJO DE UVA (*Vitis vinifera* L.) PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL POR VÍA HIDRÓLISIS ALCALINA Y ENZIMÁTICA EN EL VALLE DE MOQUEGUA", presentado por la Bachiller HOSIN HUMIRI HUARAYA; Para lo cual se adjunta un (01) ejemplar del Proyecto de Tesis Aprobado.

En tal sentido y en amparo del Reglamento de Grados y Títulos de la UNAM, según se indica en su art. 30° se inscribe el Proyecto de Tesis en el Registro de Trabajos de Tesis de la Escuela y se notifica al Tesista sobre la aprobación del referido proyecto.

Por lo mismo, solicito a usted que mediante su despacho se realice el trámite correspondiente para la emisión del acto resolutivo según se precisa:

Artículo Primero: Aprobar el Proyecto de Tesis denominado: "APROVECHAMIENTO DEL ORUJO DE UVA (*Vitis vinifera* L.) PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL POR VÍA HIDRÓLISIS ALCALINA Y ENZIMÁTICA EN EL VALLE DE MOQUEGUA", presentado por la Bachiller HOSIN HUMIRI HUARAYA.

Artículo Segundo: Ratificación de Asesor de Proyecto de Tesis:

- Asesor : Dr. Rene German Sosa Vilca

Artículo Tercero: Ratificación de Jurado Dictaminador y Revisor, según el siguiente detalle:

- Presidente : Mg. Elías Escobedo Pacheco
- Primer Miembro : Mg. Cesar Augusto Napa Almeyda
- Segundo Miembro : Ing. Jerónimo Martin Sarco Burgos

Es todo cuanto informo a usted, para su conocimiento y acciones necesarias.

Atentamente,

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

.....
Ing. M. Sc. MARIO ROGER COTACALLAPA SUCAPUCA
DIRECTOR

MRCS/DEPIA.
SCO/Sec.
C.C.: ARCHIVO





Universidad Nacional de Moquegua
Vicepresidencia Académica

"Año del Buen Servicio al Ciudadano"



OFICIO N° 456 -2017-VIPAC-CO/UNAM

SEÑOR:

Dr. WASHINGTON ZEBALLOS GAMEZ
PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ORGANIZADORA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

Presente.-

ASUNTO : PROYECTO DE TESIS, RATIFICACION DE ASESOR, JURADO DICTAMINADOR Y REVISOR

REFERENCIA : INFORME N° 293-2017-EPIA/VIPAC/UNAM

Mediante el presente es grato dirigirme a usted, para saludarlo cordialmente y a la vez manifestarle que visto el documento de la referencia, presentado por el Ing. MSc. MARIO ROGER COTACALLAPA SUCAPUCA Director de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, solicita la Aprobación del Proyecto del Tesis denominado "APROVECHAMIENTO DEL ORUJO DE UVA (Vitis vinifera L.) PARA LA OBTENCION DE ETANOL POR VIA HIDROLOLISIS ALCALINA Y ENZIMATICA EN EL VALLE DE MOQUEGUA", según detallo:

Ratificación de Asesor de Proyecto de Tesis:

- Asesor : Dr. Rene German Sosa Vilca

3.- Ratificar de Jurado Dictaminador y Revisor:

- Presidente : Mg. Elías Escobedo Pacheco
- Primer Miembro : Mg. Cesar Augusto Napa Almeyda
- Segundo Miembro : Ing. Jerónimo Martín Sarco Burgos

Por lo expuesto, solicito a través de vuestro despacho la aprobación mediante acto resolutivo del Proyecto de Tesis, Ratificación de Asesor y Ratificación de jurado dictaminador y revisor.

Agradeciendo la atención al presente, hago propicia la ocasión para reiterarle los sentimientos de mi especial consideración y estima personal.

Atentamente,

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
M. Elena Escobedo Pacheco
Dra. MARIA ELENA ESCOBEDO PACHECO
VICEPRESIDENTA ACADÉMICA



MEEI/VIPAC
MASM/Sec.
C.c./Archivo.

Moquegua, Prolongación Calle Ancash S/N Telefax 053 – 461227 053 – 463514 Anexo (202) 053-461471

www.unam.edu.pe

Vice_presidencia@unam.edu.pe

INFORME N° 148-2017-EEP-UNAM

A : MSc. MARIO ROGER COTACALLAPA SUCAPUCA
 Director de la E.P. Ingeniería Agroindustrial

DE : Mg. ELÍAS ESCOBEDO PACHECO
 Docente Ordinario

ASUNTO : DICTAMEN PROYECTO DE TESIS

FECHA : Moquegua, 15 de noviembre del 2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL	
RECIBIDO	
17 NOV 2017	
Hora: 11:12a	N° de Reg: 1053
Firma: 	Folio: 04+04

Es grato dirigirme a usted para saludarlo cordialmente y en cumplimiento al artículo 26° del Reglamento de Grados y Títulos de la UNAM, se informa que el Proyecto de Tesis presentado por la Tesista HOSIN HUMIRE HUARAYA ha sido declarado APTO por el Jurado dictaminador y se hace alcance del Proyecto aprobado en tres ejemplares.

Es cuanto se informa.

Atentamente.



 Mg. ELÍAS ESCOBEDO PACHECO
 Presidente del Jurado

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Pase a: *Secretaría*

Para: *Informe YIPAC*

Fecha: 17 NOV 2017

VºBº 

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL**

FICHA DE EVALUACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS

Esta ficha deberá se llenada por el jurado dictaminador y revisor del Proyecto de Investigación, en una reunión conjunta con todos sus miembros y después de haber compatibilizado sus sugerencias:

TITULO DEL PROYECTO : *Aporedoamiento de onayo de uva (vitis vinifera L.) para la obtención de etanol por vía hidrólisis alcalina, enzimática y fermentación simultánea del valle de Moquegua.*

AUTOR : *Hosni Humiri Huaraya*
 DIRECTOR :
 ASESOR : *Dr. René Germán Soza Velca.*

1. ¿El título tentativo refleja el problema objeto de estudio? SI (.....) NO (.....)
 Se sugiere... *mejoras*
2. ¿El problema de estudio concuerda con las líneas, programas y áreas de investigación de la EPIA? SI () NO (.....)
 Se sugiere.....
3. ¿El problema de estudio ayuda al conocimiento y/o solución de los problemas que aquejan a la realidad nacional y/o regional? SI () NO (.....)
 Se sugiere.....
4. ¿El planteamiento del problema objeto de estudio tiene sustento teórico y precisa con claridad lo que se sugiere investigar? SI () NO (.....)
 Se sugiere... *mejoras*
5. ¿Se expone como antecedentes los resultados o avances de estudios anteriores relacionados con el problema objeto de investigación? SI () NO (.....)
 Se sugiere... *mejoras*

6. ¿Los objetivos están elaborados de acuerdo con el problema objeto de estudio?
 SI (X) NO (....)
 Se sugiere.....
7. ¿Se precisa en los objetivos los logros que se espera alcanzar? SI (X) NO (....)
 Se sugiere..... *precisar un poco más*
8. ¿En el marco teórico expone suficientemente las teorías que sirven de sustento y explicación al problema objeto de investigación? SI (X) NO (....)
 Se sugiere.....
9. ¿Se ha revisado la suficiente bibliografía para la elaboración del marco teórico?
 SI (X) NO (....)
 Se debe incluir además los siguientes conceptos *mejoras*
10. ¿Se incluyen todos los conceptos que intervienen en la investigación? SI (X) NO (....)
 Se debe incluir además los siguientes conceptos
11. ¿Los conceptos están adecuadamente definidos? SI (X) NO (....)
 Se debe incluir además los siguientes conceptos
12. LAS HIPÓTESIS:
 a) ¿Tienen relación y responden al problema formulado)
 SI (X) NO (....) Se deben de:
13. Método de la Investigación:
 a) ¿Cuál es el tipo de investigación a ser desarrollada en el proyecto?
 - Investigación Básica o Pura (....)
 - Investigación aplicada (X)

SEÑOR DIRECTOR DE LA EPIA:

En mérito a la evaluación del proyecto, el jurado lo declara:

A) APTO (X)

Por tanto debe ser inscrito en el Libro de Proyectos de Investigación de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial.

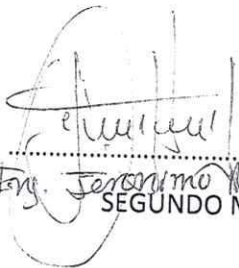
B) NO APTO (.....)

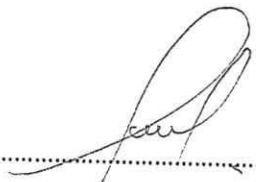
Por tanto, el Tesista debe de corregir las observaciones efectuadas por el Jurado Dictaminador y Revisor en el Presente formato y presentarlo oportunamente para una nueva revisión y evaluación.

Moquegua C.U. a los 15 días del mes de noviembre del 2017


.....
Elias Escobedo Padua
PRESIDENTE


.....
PRIMER MIEMBRO
Msc. César Nape Almeyda


.....
Ing. Jeronimo M. Sarco Burgos
SEGUNDO MIEMBRO


.....
DIRECTOR O ASESOR DE TESIS
Fernando S. Corbalán


.....
Mosin Humini Huaraya
TESISTA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

APROVECHAMIENTO DEL ORUJO DE UVA (*Vitis vinífera*
L.) PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL POR VÍA
HIDRÓLISIS ALCALINA Y ENZIMÁTICA EN EL VALLE DE
MOQUEGUA

PROYECTO DE TESIS

PRESENTADO POR:

HOSIN HUMIRI HUARAYA

ASESOR:

Sc. D. RENE GERMAN SOSA VILCA

Para obtener el Título Profesional de:

INGENIERA AGROINDUSTRIAL

MOQUEGUA – PERU

2017


Elias Escobedo Pacheco


César Augusto Napa Almeyda
ING. AGROINDUSTRIAL
CIP. 124241


Dna. Rene German Sosa Vilca

Jerónimo Martín Sarco Burgos
ING. AGROINDUSTRIAL
CIP. N° 121340

INDICE

I.	PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.1.	DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA	3
1.2.	FORMULACION DEL PROBLEMA.....	4
1.2.1.	Interrogante General.....	4
1.2.2.	Interrogantes específicas.....	4
1.3.	JUSTIFICACION E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACION	4
1.4.	OBJETIVOS	5
1.4.1.	Objetivo General.....	5
1.4.2.	Objetivos específicos.....	5
1.5.	HIPOTESIS	5
1.5.1.	Hipótesis General	5
1.5.2.	Hipótesis específica.....	5
II.	MARCO TEORICO	6
2.1.	ANTECEDENTES DEL ESTUDIO	6
2.2.	BASES DEL ESTUDIO.....	8
2.2.1.	Uva.....	8
2.2.2.	Orujo de uva.....	11
2.2.3.	Etanol	13
2.2.4.	Producción de bioetanol	13
2.2.5.	Fermentación alcohólica.....	14
2.2.6.	Mecanismo de reacción y balance energético	15
2.2.7.	Limitaciones del proceso	17
2.2.8.	Destilación.....	19
2.2.9.	Técnicas de hidrólisis para la obtención de etanol.....	20
2.3.	DEFINICION DE TERMINOS	27
III.	MARCO METODOLOGICO	29
3.1.	Lugar de ejecución	29

3.2.	Tipo, diseño y nivel de investigación.....	29
3.3.	Operacionalización de variables	30
3.4.	MATERIALES Y EQUIPOS.....	31
3.4.1.	Materia prima e insumos.....	31
3.4.2.	Materiales.....	31
3.4.3.	Equipos	31
3.4.4.	Reactivos.....	32
3.4.5.	Insumos.....	32
3.5.	Población y/o muestra de estudio.....	32
3.6.	Metodología experimental.....	33
3.6.1.	Metodología a seguir para la hidrólisis alcalina	33
3.6.2.	Metodología a seguir por vía hidrolisis enzimática	36
3.6.3.	Métodos de análisis.....	38
3.7.	Diseño experimental o métodos y técnicas para la presentación y análisis de datos	39
IV.	ASPECTOS ADMINISTRATIVOS	42
4.1.	Cronograma de actividades	42
4.1.	Recursos	43
4.2.	Bienes y servicios.....	43
4.1.	Fuentes y financiamiento	46
V.	BIBLIOGRAFIA.....	47
VI.	ANEXOS.....	51
6.1.	Anexo 1: determinación de pH.....	52
6.2.	Anexo 2: determinación de grados Brix	53
6.3.	Anexo 3: determinación del grado alcohólico.....	54
6.4.	Anexo 4: Determinación de etanol por método densimétrico.	54
6.5.	Anexo 5. Determinación de alcoholes por cromatografía de gases.....	55

I. PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

Actualmente es posible desarrollar nuevas fuentes de energía o combustible para satisfacer las necesidades de la sociedad, a través de diversos productos de interés. El aprovechamiento de los residuos agroindustriales puede ayudar en la disposición final de los residuos que ya no pueden ser reutilizados de manera que esto permite evitar que se conviertan en contaminantes de suelos, agua subterránea y así mismo da un impulso en la concientización de un medio ambiente más limpio mediante la producción de biocombustible etanol.

La región de Moquegua cuenta con una gran tradición vitivinícola, según la Dirección Regional Agraria de Moquegua (DRAM., 2015), la producción de uva es cerca de 5,245.1 Tn por año, el 35% es destinado para la elaboración de vino, 41% destinado para la elaboración de pisco, 18% es la producción de uva de mesa, y el 8% destinado para el consumo familiar. Por tanto, en el proceso de elaboración del vino y piscos se genera como principal residuo es el orujo de uva que representa el 15% del peso de la uva (Saéñz, 1992). El orujo es la materia orgánica prensada que queda como desecho o subproducto a partir de la extracción del mosto de uva que está conformada por el hollejo (piel de la uva), las semillas y dependiendo del productor, el escobajo. Por lo cual esto se ha reutilizado tradicionalmente en diferentes procesos como en la obtención de licores mediante destilación como un aguardiente de orujo de uva, fertilizante, alimento para animales, obtención de compuestos de interés como extraer colorantes naturales, taninos del hollejo de uva, aceites de las pepitas de uva, etc (Aimaretti., Ybalo., Escorcia., & Codevilla, 2012)

La industria vitivinícola produce una gran cantidad de residuos orgánicos actualmente poco aprovechados. El orujo de uva generado después del proceso

de elaboración de vino se desecha directamente en los suelos de los mismos viñedos del valle de la Región de Moquegua. El orujo de uva por tener elevado contenido en materia orgánica, potasio y baja salinidad es utilizado en la producción de sustratos para la agricultura (Paradelo., Moldes., Gonzalez., & Barral., 2002).

1.2. FORMULACION DEL PROBLEMA

1.2.1. Interrogante General

¿Cuál es el efecto de Temperatura y pH en la obtención de etanol a partir de orujo de uva (*Vitis vinifera L.*) por vía hidrólisis alcalina e hidrólisis enzimática?

1.2.2. Interrogantes específicas

¿Cuál es la temperatura y pH óptimo para la obtención de etanol a partir de orujo de uva (*Vitis vinifera L.*) por vía hidrólisis alcalina?

¿Cuál es la temperatura y pH óptimo para la obtención de etanol a partir de orujo de uva (*Vitis vinifera L.*) por vía hidrólisis enzimática?

¿Cuál de las vías de hidrolisis es las más adecuada para la obtención de etanol a partir de orujo de uva (*Vitis vinifera L.*)?

1.3. JUSTIFICACION E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACION

La producción de biocombustibles a partir de residuos agroindustriales es una alternativa válida ante la necesidad de sustituir con costos apropiados, los combustibles de origen fósil, para combatir el cambio climático, mejorar el empleo rural e implica desafíos para el desarrollo sostenible, tanto a nivel mundial como nacional. Es por ello que el orujo de uva, es uno de los residuos agroindustriales que existen en la región de Moquegua el cual puede ser utilizado para obtener etanol. El etanol es el biocombustible más utilizado en el sector transporte en todo el mundo (Ballesteros., 2003).

La producción de etanol sobre diversos sub productos, residuos agroindustriales o del mismo orujo de uva , no se ha encontrado estudios tratados mediante la vía hidrólisis alcalina que es un proceso que es tratado con NaOH en donde se sumerge el material a tratar, produciendo un hinchamiento de la biomasa, teniendo lugar a reacciones como solvatación y saponificación lo que hace más accesible para enzimas y bacterias dando lugar a la hidrolisis mediante una degradación y

descomposición de polisacáridos con rompimiento de radicales finales (Fengel y Weneger., 1984), la hidrólisis enzimática hace que se obtenga una solución de azúcares fermentables que contiene principalmente glucosa (Sanchez & Cardona, 2005). Un estudio realizado en orujo de uva para obtener etanol aportaría beneficios, tanto económicos como medioambientales en la Región de Moquegua; Por ello se da una alternativa para aprovechar el orujo de uva para la obtención de etanol mediante vía hidrólisis alcalina e hidrólisis enzimática en el valle de Moquegua.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo General

Aprovechar el orujo de uva (*Vitis vinífera L.*) para obtener etanol por vía hidrólisis alcalina e hidrólisis enzimática en el valle de Moquegua.

1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar los parámetros fisicoquímicos (pH, Temperatura) óptimos para el proceso de hidrólisis alcalina.
- Determinar los parámetros fisicoquímicos (pH, Temperatura) óptimos para el proceso de hidrólisis enzimática.
- Determinar el rendimiento de etanol obtenido por medio de los dos procesos.

1.5. HIPOTESIS

1.5.1. Hipótesis General

Si afecta la Temperatura y pH para obtener etanol a partir de orujo de uva por vía hidrólisis alcalina e hidrólisis enzimática en el valle de Moquegua.

1.5.2. Hipótesis específica

- Los parámetros de Temperatura y pH óptimos son factores determinantes para el proceso de obtención de etanol por vía hidrólisis alcalina.
- Los parámetros de Temperatura y pH son factores determinantes para el proceso de obtención de etanol por vía hidrólisis enzimática.
- El proceso por vía hidrólisis enzimática influye en el rendimiento de obtención de etanol a partir de orujo de uva.

II. MARCO TEORICO

2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

En el presente trabajo de investigación titulado "Producción de Bio-etanol por fermentación en estado sólido, sobre orujos de uva y de remolacha azucarera". La fermentación en estado sólido (FES) es una tecnología que permite transformar los residuos agroindustriales en numerosos bio-productos de alto valor, entre ellos, etanol. En el presente trabajo se reporta la obtención de etanol a escala de laboratorio, mediante la fermentación en estado sólido (FES) de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, sobre orujos de uva y de remolacha azucarera. Las condiciones iniciales del medio de cultivo fueron: azúcares 16.5% (p/p); pH 4.5; humedad 68%(p/p). Los cultivos fueron inoculados con 10^8 células/gramo de orujo y se incubaron en ambiente anaeróbico, a 28°C, durante 96 horas. Los resultados obtenidos muestran para la fermentación en estado sólido (FES), las máximas concentraciones de etanol a las 48 horas, y rendimientos superiores al 80%, en bases al consumo de azúcares fermentables. Estos rendimientos se superan los encontrados en cultivos sumergidos, generan alentadoras expectativas sobre el empleo de las FES para obtener alcohol combustible (Rodriguez, Toro, & Vazquez, 2009).

Piñeros (2005) menciona en el siguiente trabajo de investigación con nombre "Evaluación de la producción de etanol a partir de cascarilla de arroz pretratada con NaOCl, mediante hidrólisis y fermentación simultánea", el objetivo de este trabajo es evaluar la obtención de etanol desde la cascarilla de arroz por medio de un proceso de hidrólisis y fermentación simultánea, que se realiza sobre cascarilla de arroz pretratada con NaOCl en un proceso de delignificación química, por tanto a medida que se avanza en la búsqueda de tecnologías más limpias, se ha presentado interés a la degradación y el aprovechamiento de residuos en donde se logró obtener etanol (2.87 g/100 g de cascarilla de arroz) a partir de cascarilla

de arroz delignificada parcialmente con NaOCl, tratamiento que favorece el acceso de las enzimas a la celulosa presente en el material. Teniendo en cuenta, que el rendimiento obtenido fue 9,57% de valor teórico. Para mejorarlo, en el futuro se recomienda utilizar enzimas con actividad β -glucosidasa, con el fin de aumentar la cantidad de glucosa disponible.

Mejia, *et al* (2009) evalúan la producción de etanol en un trabajo de investigación titulado "Hidrólisis y fermentación alcohólica simultánea del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica L.*) Utilizando levaduras *Saccharomyces cerevisiae spp* y cepa recombinante RH 218". Mediante tratamientos preliminares de hidrólisis y fermentación se seleccionaron las siguientes condiciones de trabajo: hidrólisis térmica a 98°C por una hora, hidrólisis enzimática mediante la aplicación de enzima Celluclast 1.5 L; aplicación de 3% de levadura y tiempo de fermentación de cinco días, monitoreando las variables pH, °Brix, fibra residual, biomasa, azúcares reductores y etanol. La levadura comercial marca A, presentó el menor contenido de etanol (0.58%) y el más alto contenido de azúcares reductores (1,93 mg de azúcar/g de materia seca) y la levadura recombinante RH 218 presentó un contenido de alcohol de 0,76% y azúcares reductores de 1,38 mg de azúcar/g de materia seca.

En el presente trabajo titulado "Obtención de etanol por vía fermentativa a partir de cascavas de piña (*Ananas comosus*) evaluando dos de sus principales variables pH y grados Brix usando como microorganismo productor *saccharomyces cerevisiae*. Para la obtención de etanol por vía fermentativa se evaluaron dos de sus principales variables involucradas en el proceso fermentativo con el fin de encontrar cuales son las condiciones óptimas de mayor producción, el proceso fermentativo se realizó utilizando un desecho agrícola como lo son las cáscaras de piña *Ananas comosus* variedad Golden y como microorganismo productor se utilizó *Saccharomyces cerevisiae*, la temperatura a la que se llevó a cabo el proceso fue a 30° +/- 5 ya que fue la temperatura ambiente. Las variables que se evaluaron en diferentes condiciones fueron los Grados Brix a 25, 20.5, 21.0, 18.5, 14.5, 4, y el pH 3, 4, 5, 6, con esto se determinó cuáles eran las condiciones óptimas de mayor producción de etanol, dando como resultado que; los Grados Brix óptimos son 20 aproximadamente y el pH es 4 con un tiempo de fermentación de 72 horas ya que con estas condiciones se obtiene el mayor

rendimiento, y el grado alcohólico del etanol obtenido fue el 50%, la parte experimental se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y la identificación del etanol fue en Laboratorios VIJOSA. Con esta investigación se demuestra que este procedimiento es sencillo, de bajo costo, de fácil implementación, y se pueden obtener buenos rendimientos de etanol, el cual es muy útil en diferentes áreas tanto farmacéutica como alimenticia, por lo tanto se recomienda implementar dicho proceso para aprovechar los desechos orgánicos ricos en carbohidratos y con esto aumentar la economía del país (Duarte & Torres, 2012).

Espinosa (2013) investiga en la obtención de etanol a partir del excedente orgánico del banano variedad Musa Paradisiaca, mediante hidrólisis alcalina, hidrólisis enzimática y posterior fermentación. El residuo biomásico se sometió a hidrólisis alcalina con NaOH a tres concentraciones: 1,5; 2 y 2,5 mol/L, y a tres temperaturas: 50, 70 y 90 °C en un determinado tiempo para provocar la exposición y libre acceso a la celulosa. Para la hidrólisis enzimática que se realiza a continuación se descartaron varias muestras por pérdida excesiva de celulosa y las restantes se hidrolizaron usando enzimas Celulasas a tres concentraciones: 1,5; 2 y 3% p/p y a tres pH: 5; 5,5 y 6. Los azúcares reductores obtenidos se fermentaron usando *Saccharomyces cerevisiae* para obtener alcohol etílico. Se concluyó que las mejores condiciones corresponden a una concentración de hidróxido de sodio de 2 mol/L, temperatura de 70 °C, concentración de enzima del 2 % y pH 5, a las cuales se obtiene un rendimiento de etanol del 39,36%.

2.2. BASES DEL ESTUDIO

2.2.1. Uva

La uva (*Vitis vinífera L.*), es una de las especies más utilizadas por las antiguas civilizaciones que poblaron la Tierra. De todos los compuestos con principios activos descubiertos en la vid, indudablemente los compuestos polifenólicos han despertado el mayor interés desde el punto de vista de la investigación farmacológica en relación con sus propiedades protectoras del sistema cardiovascular (Mantell, Rodriguez, & de la Ossa, 2003).

Las uvas son elementos esenciales por el cual se elabora finalmente el vino. La uva (*Vitis vinífera L.*), que produce el vino pertenece a la familia biológica conocida

como vitaceae, que son una clasificación de plantas con tendencia a trepar por las superficies fijas. Esta familia posee once géneros diferentes, pero tan sólo la vitis es interesante como fruta vitivinícola. Dentro del género vitis existen 60 especies, pero tan sólo la vinífera es la que proporciona vino (de origen indoeuropeo) (Casares, 2010).

2.2.1.1. Producción de uva en la región de Moquegua

Tabla 1. Estructura de las variedades de uva en la región de Moquegua.

Producción de uva	5,245.1 Tn
Destinado para vinos	35%
Destinado para la producción de pisco	41%
Para mesa	18%
Para consumo familiar	8%

Fuente: (DRAM., 2015)

El valle de Moquegua, con una altitud promedio a 1200 m.s.n.m., es de clima muy especial para el cultivo de la vid, pues es seco, sano, muy soleado, con temperaturas moderadas y frío invernal suficiente para permitir el "agoste" de las viñas, favoreciendo que la vid pierda todo su follaje y entre en estado de latencia, del que sale en primavera con los primeros riegos y después de la poda. El valle de Moquegua mantiene una tradición vitivinícola de más de 4 siglos. Factores adversos provocaron la debacle de la floreciente economía del valle, basada en el cultivo de la vid y producción de vinos y aguardientes de mucho renombre y cotización hasta fines del siglo XIX. Se comenta que fueron 3 las causas principales de esta debacle: el terremoto de 1868 que destruyó casi toda la ciudad, y que se ha repetido con igual o mayor fuerza el 23 de junio de 2001; la guerra del Pacífico, durante la cual fueron saqueadas las bodegas y la filoxera, un insecto que ataca a la vid hasta matarla, que se introdujo de Europa al Perú precisamente por Moquegua. En los últimos años se está reconstituyendo el viñedo utilizando plantas resistentes a la filoxera (Huertas, 2004).

2.2.1.2. Composición química de la uva

La planta de vid posee frutos (uvas) clasificados botánicamente como "bayas", las cuales se organizan o agrupan en un conjunto o "racimo" a través de un órgano

herbáceo o leñoso conocido como “raspón o escobajo”. A su vez, cada baya se encuentra unida al escobajo por medio del “pedicelo”, por el cual ingresan los vasos conductores que suministran el agua y nutrientes a la misma. Las bayas están constituidas por un grupo de tejidos (pericarpio) que rodea y protege las semillas. El pericarpio se divide en exocarpo (hollejo o piel), mesocarpo (pulpa) y endocarpo (tejido que recubre el receptáculo de las semillas). El hollejo comprende una región heterogénea formada hacia el exterior por una cutícula, recubierta de una capa cerosa o pruina, y hacia el interior por una epidermis (zona compuesta por 2 capas de células alargadas en posición tangencial) y una hipodermis (zona compuesta por 6 a 8 capas de células inicialmente rectangulares y luego poligonales). La pulpa es la parte más voluminosa de la baya y se compone de 25-30 capas de células poligonales grandes, de paredes celulares muy delgadas; y finalmente, las semillas están formadas desde el exterior hacia el interior por una cutícula, una epidermis, y 3 tegumentos que rodean el albumen y el embrión (Ribereau - Gayon, *et al* 2006).

En las uvas cosechadas con madurez tecnológica, el peso fresco de los racimos está representado aproximadamente por el 2-8% de escobajos, 5-20% de hollejos, 1-6% de semillas y 74- 90% de pulpa y jugo. Los componentes químicos que conforman las bayas son principalmente agua, azúcares, elementos minerales, ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados, lípidos, sustancias odorantes y compuestos fenólicos (Boulton., Bisson., & Singleton., 2002).

El agua es el componente químico mayoritario de la uva madura (75-85%), y actúa como solvente de diversos compuestos químicos (volátiles y no-volátiles) que son conducidos hacia la misma principalmente a través del floema (Keller et al., 2006). Aproximadamente el 99% del agua presente en las bayas es absorbida por las raíces desde el suelo, por lo tanto la disponibilidad de agua en el mismo afectará significativamente el crecimiento de la planta y el desarrollo de las bayas (Conde et al., 2007).

Los azúcares representan normalmente más del 90% de los sólidos solubles totales en bayas maduras, se acumulan principalmente en las células de la pulpa en concentraciones comprendidas entre 150 y 300 g/L, y constituyen la principal fuente de carbono utilizada por las levaduras durante la fermentación alcohólica.

En la mayoría de los cultivares de *Vitis vinifera*, el 95-99% de estos azúcares se presentan bajo la forma de hexosas, especialmente glucosa y fructosa, y el resto se compone fundamentalmente de sacarosa, y algunas pentosas (arabinosa, ramnosa, ribosa, xilosa, maltosa y rafinosa, entre otros) (Boulton et al., 2002; Keller, 2010). Las flores y uvas inmaduras pueden contener algo de almidón, debido a su actividad fotosintética, pero el azúcar se importa hacia las bayas en desarrollo en forma de sacarosa a través del floema, la cual se hidroliza por acción de enzimas invertasas en sus correspondientes hexosas. Adicionalmente, las bayas contienen polisacáridos, principalmente insolubles, en las paredes celulares del hollejo y otros tejidos resistentes, los cuales se componen de celulosa y pectinas con pequeñas cantidades de hemicelulosa (xiloglucanos) (Vidal et al., 2001). Las cadenas de celulosa poseen moléculas de glucosa unidas a las mismas; mientras que las pectinas y hemicelulosas también contienen otros azúcares como arabinosa, xilosa, galactosa, manosa y ramnosa, así como los ácidos glucurónico y galacturónico (Vidal et al., 2001; Doco et al., 2003).

2.2.2. Orujo de uva

El orujo de uva es el residuo sólido obtenido tras la extracción del zumo de la uva y constituye el principal subproducto del proceso de elaboración del vino (Soto, Moure, Domiguez, & Parajó, 2008), (Rice, 1976). Uno de los principales problemas de las bodegas y las destilerías es la generación de grandes cantidades de este residuo en cortos periodos de tiempo al año. Además, el orujo de uva presenta algunas características contaminantes como son un bajo pH y un alto contenido en sustancias fenólicas fitotóxicas y antibacterianas, que dificultan su degradación biológica (Bustamante, y otros, 2008)

El orujo de uva está formado por la piel, las semillas y el raspón, constituyendo un 15% del peso de la uva procesada (Saénz, 1992) y tiene un contenido de humedad del 65%. Su composición química es bastante compleja: alcoholes, ácidos, aldehídos, ésteres, polifenoles, sustancias minerales, azúcares, etc. (Ruberto, Renda, Amico, & Tringali, 2008), (Bonilla, Mayene, Merida, & Mulina, 1999), (Mantell, Rodriguez, & de la Ossa, 2003). En su composición incluye carbohidratos, fibra, grasas, proteínas y sales minerales. El principal componente de la fibra es la lignina, seguida de hemicelulosa, celulosa y pectina (Díaz, Caro, de Ory, & Blandino, 2007).

2.2.2.1. Composición química de los orujos

Los orujos son los residuos sólidos, desechos del proceso de vinificación y que están compuestos por semillas y hollejos. Tienen una riqueza cualitativa y cuantitativa en constituyentes fenólicos, que comprenden sobre todo los ácidos fenólicos, los antocianos, que son pigmentos rojos, (Ferreira, Sellés, & Valenzuela, 2002), los flavonoles, pigmentos amarillos, y los flavanos 3-oles o catequinas son incoloras (Flanzy, 2000).

Los hollejos de uva corresponden a entre un 7-12% del peso total de la baya y se componen principalmente de agua (78-80%), ácidos orgánicos (0,8-1,6%), taninos (0,4-3%), antocianos (0-0,5%), compuestos nitrogenados (1,5-2%), minerales (1,5-2%), ceras (1-2%), sustancias aromáticas (Soto, Moure, Domiguez, & Parajó, 2008).

Las semillas de la baya corresponden a hasta un 6% del peso total y están compuestas principalmente de agua (25-45%), compuestos glucídicos (34-36%), taninos (4-10%), compuestos nitrogenados (4-6,5%), minerales (2-4%), lípidos (13-20%) (Cabanis *et al.*, citado por Flanzy, 2000).

En el hollejo de las uvas tintas se encuentran diferentes sustancias antioxidantes, como las flavonas (que están también presentes en otros alimentos como el té, las cebollas, las manzanas). La mayoría de las sustancias beneficiosas se acumulan en el hollejo de la uva, por tanto, en los vinos tintos bien macerados y pigmentados (Zooecklein, Fugelsang, & Gump, 2001).

a. La pared celular y los enzimas

Las paredes celulares de las células de los hollejos forman una barrera frente a la difusión de los constituyentes deseados de la piel, que son los antocianos, taninos y otros polifenoles (Lecas & Brillouet, 1994; Pellerin & Cabanis, 2000; Vidal, *et al* 2001). El estudio de la estructura y degradación de la pared celular de la piel de la uva podría constituir un elemento fundamental para el control de las extracciones y maceraciones en vinificación. Además, el reblandecimiento de la baya se acompaña de la aparición de actividades enzimáticas que son las responsables de la degradación de la pared celular, fenómeno que contribuye a

facilitar la extracción de la materia colorante en la vinificación (Amrani Joutei & Glories, 1995).

La mayor composición de azúcares se encuentra en los raspones. Este residuo no sufre ningún proceso de fermentación alcohólica. Por el contrario las lías son las que menos azúcares tienen en su composición; las lías se extraen cuando ha finalizado la fermentación alcohólica en el caso de la vinificación de los vinos blancos, y al final de la fermentación maloláctica en los tintos. Las Hemicelulosas están presentes principalmente en las lías, las Celulosas en los orujos y la lignina en los raspones. La fracciones que forman la fibra alimenticia se encuentra en mayor medida en las lías, siendo más abundante en la variedad blanca que en la tinta (Rubio., Carmona., & Igartuburu., 2000).

2.2.3. Etanol

El etanol es un producto químico obtenido de la fermentación de los azúcares que se encuentran en la materia vegetal con alto contenido de carbohidratos, tales como caña de azúcar, cebada, trigo, maíz, frutas, papas, madera, residuos forestales, entre otros, con el uso de microorganismos etanológicos, especialmente levaduras. Este proceso comprende una serie de reacciones bioquímicas, catalizadas por enzimas, que transforman los azúcares presentes en etanol, dióxido de carbono y energía (Cardona Alzate, Sanchez Toro, & M.I, 2005).

2.2.4. Producción de bioetanol

El bioetanol se produce por la fermentación de los azúcares contenidos en la materia orgánica de las plantas. En este proceso se obtiene el alcohol hidratado, con un contenido aproximado del 5% de agua, que tras ser deshidratado se puede utilizar como combustible. El bioetanol mezclado con la gasolina produce un biocombustible de alto poder energético con características muy similares a la gasolina pero con una importante reducción de las emisiones contaminantes en los motores tradicionales de combustión. El etanol se usa en mezclas con la gasolina en concentraciones del 5 o el 10%, E5 y E10 respectivamente, que no requieren modificaciones en los motores actuales (Ballesteros., 2003).

2.2.4.1. Bioetanol de primera y segunda generación

El bioetanol de primera generación se obtiene mediante la fermentación de azúcares procedentes de diferentes vegetales (maíz, remolacha, cebada). El problema es que esas materias primas sirven para alimentar a las personas. El uso del bioetanol como combustible ha crecido en los últimos años en Europa, Estados Unidos, Brasil y Canadá, lo que ha repercutido en el precio de algunos alimentos (Sanchez R. e., 2010)

La producción mundial total de bioetanol aumentó de 2001 a 2009 un 430%, con una tasa anual de crecimiento superior al 17%. El éxito en el uso del bioetanol se debe al aumento en el precio de los combustibles fósiles y a las ayudas gubernamentales que ha recibido en países como Brasil y Estados Unidos. Se ha conseguido incrementar la seguridad en el suministro doméstico de combustibles, reducir la emisión de gases de efecto invernadero y ayudar a las industrias y a las comunidades rurales (Sanchez R. e., 2010).

Sin embargo, como decimos, la producción de esta primera generación de bioetanol encarece algunos alimentos. Además, también puede hacer desaparecer ecosistemas naturales. Para evitar estos inconvenientes se están realizando investigaciones para otras fuentes naturales alternativas para elaborar los llamados biocombustibles de segunda generación (Duarte & Torres, 2012).

Se llama biocombustibles de segunda generación a los que se obtienen de otras fuentes naturales alternativas, como lo es, la biomasa lignocelulósica, es decir, un componente esencial de la madera que incluye residuos forestales y agroindustriales como serrines, restos de molienda y de la fabricación de papel, etc., puede ser una de las más adecuadas. La producción de etanol a partir de este tipo de biomasa presenta algunas ventajas medioambientales respecto de la producción de etanol por fermentación de azúcares. Sin embargo, el grado de comercialización de este etanol de segunda generación es todavía lento (Espinosa, 2013).

2.2.5. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica (denominada también como fermentación del etanol o incluso fermentación etílica) es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire (oxígeno - O₂), originado por la actividad de algunos

microorganismos que procesan los hidratos de carbono (por regla general azúcares: como pueden ser por ejemplo la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el almidón, etc.) para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol (cuya fórmula química es: $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$), dióxido de carbono (CO_2) en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico (Owen & Ward., 1991).

La fermentación alcohólica tiene como finalidad biológica proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos unicelulares (levaduras) en ausencia de oxígeno para ello disocian las moléculas de glucosa y obtienen la energía necesaria para sobrevivir, produciendo el alcohol y CO_2 como desechos consecuencia de la fermentación (Amarin, 2011).

La finalidad de la fermentación etílica (desde una perspectiva microbiana) es la obtención de energía para la supervivencia de los organismos unicelulares anaeróbicos (Ferreyra & Schwab, 2009).

2.2.6. Mecanismo de reacción y balance energético

En el caso concreto de la fermentación alcohólica, al descomponerse la glucosa en alcohol etílico y dióxido de carbono, se desprende sólo un 7,33% de la energía susceptible de recuperación (Ferreyra & Schwab, 2009). (Vázquez & Da costa, 2007)

La fermentación alcohólica es una reacción exotérmica (la energía libre de Gibbs-entalpía libre, de la reacción de fermentación etílica muestra un valor de ΔG de $-234,6\text{kJ mol}^{-1}$ en un entorno de acidez neutra pH igual a 7) que va acompañada de la liberación de moléculas energéticas (ATP) —energía materialmente comprometida— puestas a disposición de las levaduras; se trata de energía en una forma, en una «moneda» que pueda «gastar» el organismo. Esta forma no es el calor, pues con calor nada puede hacer el organismo; el calor es la forma de energía realmente «libre», y el organismo «lo deja deslizarse entre los dedos», se desprende de él, lo irradia, como «excreción», como desecho, como una especie de sobrante de energía que se elimina lo mismo que las excreciones materiales (Santamaria, Lopez, & Garcia Escudero, 1995).

El ATP (trifosfato de adenosina), sin embargo, juega el papel de intermediario y sirve en todas partes para la acumulación de energía, pues para su formación se requiere relativamente poca energía. En otras palabras: si, por ejemplo, en el transcurso de una síntesis bioquímica de una sustancia importante para el organismo, debe superarse una etapa que solo es posible mediante el consumo de energía, entra en función el ATP, y entonces la etapa que requiere energía se “acopla” con la rotura del ATP que lo suministra cada enlace energético en una molécula de ATP corresponde a unas 10.000 cal/mol. Las levaduras se sirven igualmente de las sustancias nitrogenadas (nitrógeno amoniacal y aminoácidos), presentes en el mosto, para la síntesis de sus proteínas. Se debe considerar que el etanol va aumentando de concentración durante el proceso de fermentación y debido a que es un compuesto tóxico, cuando su concentración alcanza aproximadamente un 12% de volumen las levaduras tienden a morir. Esta es una de las razones fundamentales por las que las bebidas alcohólicas (no destiladas) no alcanzan valores superiores a los 20% de concentración de etanol (Vázquez & Da costa, 2007).

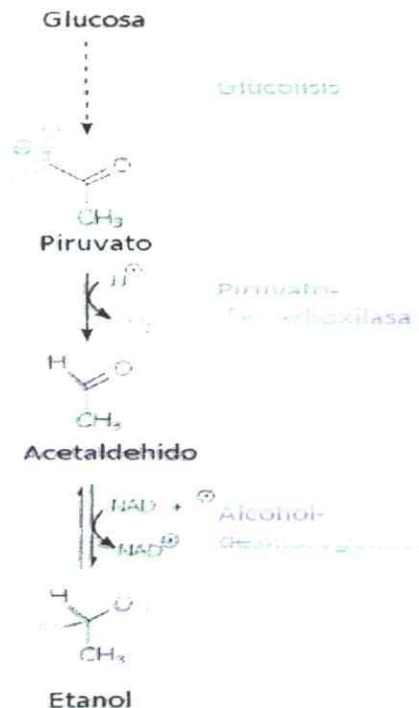


Figura 1. Mecanismo de la reacción de la fermentación alcohólica

Fuente: Ferreyra & Schvab, (2009)

2.2.7. Limitaciones del proceso

La determinación de los factores que limitan la glicólisis fermentativa del etanol son complejos debido a la interrelación existente y a la naturaleza de los parámetros intervinientes durante el proceso de fermentación. Algunos de ellos se deben tener en cuenta en la fermentación alcohólica industrial (Owen & Ward., 1991). En las limitaciones que surgen durante el proceso se pueden enumerar algunos de los más importantes como son:

2.2.7.1. Concentración de etanol resultante.

Una de las principales limitaciones del proceso, es la resistencia de las levaduras a las concentraciones de etanol (alcohol) que se llegan a producir durante la fermentación, algunos microorganismos como el *saccharomyces cerevisiae* pueden llegar a soportar hasta el 20% de concentración en volumen (Lopez. & Molina., 2004).

2.2.7.2. Acidez del sustrato

El pH es un factor limitante en el proceso de la fermentación ya que las levaduras se encuentran afectadas claramente por el ambiente, bien sea alcalino o ácido. Por regla general el funcionamiento de las levaduras está en un rango que va aproximadamente desde 3.5 a 5.5 de pH. Los procesos industriales procuran mantener los niveles óptimos de acidez durante la fermentación usualmente mediante el empleo de disoluciones tampón. Los ácidos de algunas frutas (ácido tartárico, málico) limitan a veces este proceso (Lopez. & Molina., 2004).

2.2.7.3. Contacto con el aire

Una intervención de oxígeno (por mínima que sea) en el proceso lo detiene por completo (es el denominado Efecto Pasteur). Esta es la razón por la que los recipientes fermentadores se cierran herméticamente (Owen & Ward., 1991).

2.2.7.4. La temperatura

El proceso de fermentación es exotérmico, y las levaduras tienen un régimen de funcionamiento en unos rangos de temperatura óptimos, se debe entender además que las levaduras son seres mesófilos. Si se expone cualquier levadura a una temperatura cercana o superior a 55 °C por un tiempo de 5 minutos se

produce su muerte. La mayoría cumple su misión a temperaturas de 30 °C (Owen & Ward., 1991).

2.2.7.5. Selección del microorganismo fermentador

El éxito o fracaso de un proceso fermentativo comienza con el microorganismo utilizado, en la elección del mismo se deberían tener en cuenta ciertos criterios generales que se indican a continuación según Owen & Ward., (1991) define los siguiente:

- La cepa a utilizar debe ser genéticamente estable.
- Su velocidad de crecimiento debería ser alta.
- La cepa debe estar libre de contaminantes, incluidos fagos.
- Sus requerimientos nutricionales deberían ser satisfechos a partir de medios de cultivo de costo reducido.
- Debe ser de fácil conservación por largos períodos de tiempo, sin pérdida de sus características particulares.
- Debería llevar a cabo el proceso fermentativo completo en un tiempo corto.

2.2.7.6. El oxígeno en el proceso de fermentación

También es posible clasificar las fermentaciones con base en la presencia o ausencia de oxígeno molecular durante el proceso (Owen & Ward., 1991). De acuerdo con esta división, los procesos se denominan:

- Fermentación aerobia. El aceptor final de electrones es el oxígeno; es imprescindible su presencia para el desarrollo del microorganismo y la producción del compuesto deseado. En este tipo de procesos, se produce fundamentalmente biomasa, dióxido de carbono y agua (Owen & Ward., 1991).
- Fermentación anaerobia. El proceso de producción del metabolito de interés se desarrolla en ausencia de oxígeno; los productos finales son sustancias orgánicas, por ejemplo, ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético, butanol, etanol y acetona. Sin embargo, en la mayoría de las fermentaciones anaeróbicas, se requiere un poco de oxígeno al inicio del



proceso para favorecer el crecimiento y la reproducción del microorganismo (Owen & Ward., 1991).

2.2.7.7. Selección del equipo fermentador

Un biorreactor es un recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo. En algunos casos, un biorreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. Este proceso puede ser aeróbico o anaerobio. Estos biorreactores son comúnmente cilíndricos, variando en tamaño desde algunos mililitros hasta metros cúbicos y son usualmente fabricados en acero inoxidable. (Amarin, 2011).

Un biorreactor puede ser también un dispositivo o sistema empleado para hacer crecer células o tejidos en operaciones de cultivo. Estos dispositivos se encuentran en desarrollo para su uso en ingeniería de tejidos. En términos generales, un biorreactor busca mantener ciertas condiciones ambientales propicias (pH, temperatura, concentración de oxígeno, etc.) al organismo o sustancia química que se cultiva (Jorgensen & Federico, 1990).

2.2.8. Destilación

La destilación es el proceso que se utiliza para llevar a cabo la separación de diferentes líquidos, que se encuentran disueltos en líquidos, o incluso gases de una mezcla, gracias al aprovechamiento de los diversos puntos de ebullición de cada sustancia partícipe, mediante la vaporización y la condensación. Los puntos de ebullición de las sustancias son una propiedad de tipo intensiva, lo que significa que no cambia en función de la masa o el volumen de las sustancias, aunque sí de la presión. En química, se llama destilación simple o destilación sencilla a un tipo de destilación donde los vapores producidos son inmediatamente canalizados hacia un condensador, el cual los refresca y condensa de modo que el destilado no resulta puro. Su composición será idéntica a la composición de los vapores a la presión y temperatura dados (Ferreira, Sellés, & Valenzuela, 2002).

La destilación sencilla, se usa para separar aquellos líquidos cuyos puntos de ebullición difieren extraordinariamente (en más de 80°C aproximadamente) o para separar líquidos de sólidos no volátiles. Para éstos casos, las presiones de los componentes del vapor normalmente son suficientemente diferentes de modo que

la ley de Raoult puede descartarse debido a la insignificante contribución del componente menos volátil. En este caso, el destilado puede ser suficientemente puro para el propósito buscado (Chapin, Prida, & Suarez, 2004).

2.2.9. Técnicas de hidrólisis para la obtención de etanol

La hidrólisis es un tipo de reacción química en la que una molécula de agua, con fórmula H_2O , reacciona con una molécula de una sustancia AB, en la que A y B representan átomos o grupos de átomos. En la reacción, la molécula de agua se descompone en los fragmentos H^+ y OH^- , y la molécula AB se descompone en A y B. A continuación, estos fragmentos se unen proporcionando los productos finales. A este tipo de reacción se le conoce a menudo como doble descomposición o intercambio. De interés especial es la hidrólisis de diversas sales que originan disoluciones ácidas o básicas. En química orgánica, una reacción de hidratación es una adición de agua o sus elementos H y OH a una especie química (Machuca Boris, 2009).

2.2.9.1. Hidrólisis alcalina

Es la adición de bases diluidas a la biomasa y su eficiencia depende del contenido de lignina de los materiales. El hidróxido de sodio diluido produce un hinchamiento, permitiendo un incremento en el área de superficie interna reduciendo el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, causando la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos. El mecanismo de la hidrólisis alcalina de la biomasa parece estar basada en la saponificación de los enlaces ésteres intramoleculares que unen los xilanos de la hemicelulosa y otros componentes, como por ejemplo la lignina u otros componentes de la hemicelulosa. La efectividad de este pre tratamiento depende del contenido de lignina del material a tratar (Hoyos & Perez, 2005).

La literatura reporta que la digestibilidad de las maderas duras tratadas con NaOH aumenta de un 14% a un 55% con una remoción de lignina del 24-55%, con un contenido inicial del 20%. Para maderas blandas (contenido de lignina mayor al 26%) el método no es tan efectivo. La disolución de la lignina empieza con la ruptura de los enlaces α -arileter y arilgliceron- β -arileter, fragmentando la lignina (Hoyos & Perez, 2005).

La ruptura de los enlaces comienza con la protonación de grupos hidroxilo o éter en el carbono α de un monómero dando lugar a la formación del correspondiente ácido conjugado, esta especie puede progresar la ruptura de los enlaces α y β o condensarse en otros monómeros.

Se conocen tres mecanismos según la progresión del ácido conjugado:

- a) En el equilibrio ion oxonio de estructura quinónica correspondiente, cuya estabilidad supone la ruptura irreversible del enlace α -arileter. Además al presentar un exceso de carga en el carbono α pueden experimentar una adición nucleofílica de una molécula de agua o alcohol.
- b) También puede ocurrir una sustitución nucleofílica por una molécula de agua o alcohol que produzca la ruptura del enlace.
- c) O incluso el ácido conjugado puede romperse directamente por el enlace α -arileter y formar una carbonación.

A. Factores que afectan la hidrólisis alcalina

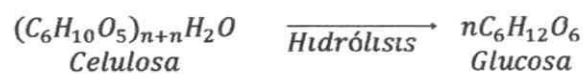
El modelado de la hidrólisis de un polímero es complicado, los factores que intervienen están estrechamente relacionados con los materiales lignocelulósicos como lo es tamaño, forma de partículas, y el tipo de estructura si es proveniente de maderas blandas o duras, de la misma manera intervienen las condiciones de la extracción, así la concentración del álcali, la temperatura, el tiempo, la agitación, se debe tener especial cuidado con la cantidad de material, el contacto interracial, la interferencia con otros compuestos (Hoyos & Perez, 2005).

2.2.9.2. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de la celulosa consiste en tres pasos: absorción de las enzimas celulasas en la superficie de la celulosa, la degradación de la celulosa a azúcares fermentables o glucosa y la desorción de las celulasas. La degradación enzimática de materiales celulósicos, es estimulada por la perspectiva de que esta investigación contribuiría al desarrollo en gran escala a procesos de conversión que beneficiarían a la humanidad en una forma sustancial (Talebniya, Karakashev, & Angelidaki., 2010).

La sacarificación de los materiales celulósicos, utilizando las enzimas celulasas, no presentan el problema de la formación de productos indeseables como los que se presentan en las otras formas de hidrólisis (ácida, básica, etc.). En la actualidad los estudios de hidrólisis se están orientando a la utilización de enzimas para la sacarificación de subproductos celulósicos por las ventajas del proceso que ofrecen (Machado, 2010).

La hidrólisis completa de la celulosa consiste en el rompimiento de los enlaces entre moléculas de glucosa, a cada unidad se añade una molécula de agua, produciéndose el azúcar glucosa. La reacción es:



a. Cinética enzimática

La actividad de una enzima se determina a partir de la concentración de la enzima, la concentración del sustrato y su disponibilidad, la concentración de los cofactores y/o los efectores alostéricos, la presencia, concentración y tipo de inhibidores, y la fuerza iónica, el pH y la temperatura del medio (Caraton, 2010).

La cinética enzimática estudia la forma en que estos parámetros influyen en la actividad enzimática, proporcionando un conocimiento de la reacción en estudio y permitiendo su control.

Para un único sustrato (S) y un único producto (P) se puede aplicar el siguiente esquema de reacción.



Cuando la concentración del sustrato [S], es mucha mayor que la de la enzima [E], la velocidad de reacción es de orden cero respecto a los reactantes, es decir, depende solamente de la concentración de enzima presente. Por tanto la velocidad de reacción es esencialmente constante hasta que haya reaccionado casi todo el sustrato, momento en que pasa a depender de la concentración de sustrato existente y es de primer orden con respecto a la concentración de sustrato (Caraton, 2010).

b. Enzimas

Las enzimas son una gran y única clase de moléculas proteicas que actúan como catalizadores biológicos, al catalizar todas las reacciones del metabolismo celular, y proporcionar los medios para que se realicen funciones complejas tales como la síntesis de material genético, de polímeros estructurales y de otras sustancias. Las enzimas consisten en cadenas de L-aminoácidos unidos covalentemente en una secuencia definida, denominada estructura primaria, y enrollados en forma compleja, en una estructura zwitteriónica y con un centro activo, formado por relativamente pocos aminoácidos que son los responsables directos de la unión con el sustrato y que catalizan la reacción característica de cada tipo particular de enzima (Chandraj, 2001).

Como todos los catalizadores, las enzimas funcionan disminuyendo la energía de activación de una reacción, de forma que se acelera sustancialmente la tasa de reacción. Las enzimas no alteran el balance energético de las reacciones en que intervienen, ni modifican, el equilibrio de la reacción, pero consiguen acelerar el proceso incluso millones de veces. Una reacción que se produce bajo el control de una enzima, o de un catalizador en general, alcanza el equilibrio mucho más rápido que la correspondiente reacción no catalizada. Al igual que ocurre con otros catalizadores, las enzimas no son consumidas por las reacciones que catalizan, ni alteran su equilibrio químico. Sin embargo, las enzimas difieren de otros catalizadores por ser más específicas (Jorgensen & Federico, 1990).

La actividad de las enzimas puede ser afectada por otras moléculas. Los inhibidores enzimáticos son moléculas que disminuyen o impiden la actividad de las enzimas, mientras que los activadores son moléculas que incrementan dicha actividad. Igualmente, la actividad es afectada por la temperatura, el pH, la concentración de la propia enzima y del sustrato, y otros factores físico-químicos (Espinosa, 2013).

c. Cofactores

No todas las enzimas son capaces de actuar solas, y muchas requieren de la presencia de cofactores no proteicos para que su actividad catalítica se manifieste. Tales cofactores, que son en realidad sustratos porque experimentan una

transformación química durante la reacción, incluyen desde iones metálicos simples hasta moléculas orgánicas (Chandraj, 2001).

d. Centro activo

Casi todas las enzimas son mucho más grandes que los sustratos sobre los que actúan, y solo una pequeña parte de la enzima (alrededor de tres a cuatro aminoácidos) está directamente involucrada en la catálisis. La región que contiene estos residuos encargados de catalizar la reacción es denominada centro activo. El sitio o centro activo es la zona de la enzima a la que se une el sustrato para ser catalizado. La estructura tridimensional de éste es lo que determina la especificidad de las enzimas. En el sitio activo sólo puede entrar un determinado sustrato (ni siquiera sus isómeros) (Espinosa, 2013).

e. Enzimas celulasas

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas en los seres vivos. Como catalizadores, las enzimas actúan en pequeña cantidad. No llevan a cabo reacciones que sean energéticamente desfavorables, no modifican el sentido de los equilibrios químicos, sino que aceleran su consecución. Las condiciones de uso de la hidrólisis enzimática son suaves (pH 4,8 y temperatura entre 45-50 °C) (Chandraj, 2001).

Las enzimas celulasas son proteínas derivadas de los procesos naturales de fermentación, capaces de degradar la celulosa. En realidad una enzima de celulasas es una mezcla de diversos componentes enzimáticos, formando lo que se denomina un "complejo enzimático", que actúa de forma sinérgica en la degradación de la celulosa (Chandraj, 2001). Este complejo enzimático está formado por tres tipos de enzimas:

- Endoglucanasas: estas atacan las regiones internas de baja cristalinidad en las fibras de celulosa, creando cadenas libres de enlaces.
- Exoglucanasas o celobiohidrasas: degradan las moléculas por la eliminación de unidades de celobiosa desde los extremos de las cadenas.
- β -glucosidasas: hidrolizan celobiosa para producir glucosa.



Este complejo de proteínas de origen enzimático, en conjunto logra la degradación de la celulosa (polímero de alta complejidad), en monómeros de baja complejidad como la glucosa, con el fin de metabolizarla y cumplir así con funciones vitales (Chapin, Prida, & Suarez, 2004).

En adición a los tres grupos principales de enzimas celulasas, existen también un número de enzimas auxiliares que atacan la hemicelulosa, tales como glucuronidasas, acetilesterasas, xilanasas, β -xilosidasas, galactomannanasas (Chandraj, 2001).

f. Actividad enzimática

Debido a que se necesita muy bajas concentraciones de enzima para catalizar una reacción, su determinación directa es difícil, por consiguiente la efectividad de una enzima se evalúa generalmente, siguiendo la desaparición del sustrato o la aparición de un producto formado en la reacción. La reacción catalizada enzimáticamente se desarrolla bajo condiciones cuidadosamente controladas, sacándose muestras para control a intervalos de tiempo apropiados. Para el caso de las enzimas celulosas se expresa la actividad de las enzimas en unidades que se basan en la conversión de una cantidad arbitraria de sustrato, en un lapso definido de tiempo y con una cantidad determinada de enzima. Se tienen técnicas estandarizadas a condiciones definidas de pH, temperatura y concentraciones de sustrato (Caraton, 2010).

g. Factores que afectan la actividad enzimática

La actividad enzimática puede ser alterada por factores físicos o químicos y por ello las enzimas actúan dentro de un intervalo óptimo de temperatura y pH fuera de la cual su actividad disminuye según Owen & Ward., (1991) menciona lo siguiente:

- Efecto del pH

La actividad de las enzimas depende mucho de la concentración de iones hidrogeno del medio, ya que esto afecta el grado de ionización de los aminoácidos del sitio activo, del sustrato, o del complejo enzima sustrato; todo esto llega a influir en la afinidad que tenga la enzima por el sustrato. En los casos en que los

sustratos no son ionizables (la mayoría de los hidratos de carbono y de los lípidos), los grupos iónicos de las enzimas son los únicos afectados por el pH.

Por esta razón, todas las enzimas presentan una máxima actividad catalítica a un cierto valor óptimo de pH, en un intervalo de 5 a 8, aun cuando existen excepciones muy importantes, como es el caso de la pepsina del estómago, que tiene un pH óptimo de 1,8. En la Figura 2 se observa que los valores extremos de pH causan la inactivación de enzimas ya que se induce su desnaturalización.

La inhibición de las reacciones enzimáticas y del crecimiento microbiano en ocasiones se llega a efectuar, si el producto lo permite, por una reducción de pH, mediante la adición de los diferentes ácidos disponibles como aditivos; por lo tanto, si se desea la acción de alguna de las enzimas y el alimento lo permite, se acondicionan el pH y la temperatura para obtener una máxima actividad catalítica.

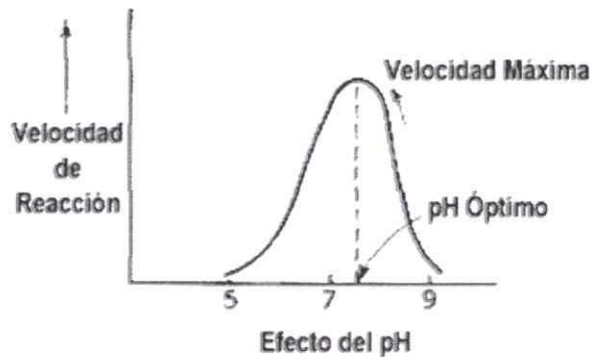
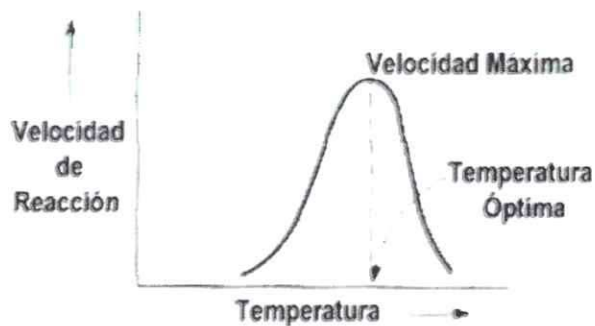


Figura 2. Efecto de pH en la actividad enzimática

Fuente: Santamaria, Lopez, & Garcia Escudero, (1995).

- Efecto de la temperatura

Como sucede con la mayoría de las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones enzimáticas aumenta con la temperatura, pero sólo en el intervalo en que la enzima sea estable y retenga su capacidad catalítica; en casos extremos, cuando se incrementa mucho la temperatura, se favorece la desnaturalización y consecuentemente esta proteína pierde su capacidad catalizadora. Por esta razón, cada enzima tiene un intervalo de temperatura en el cual se logra la mayor actividad; la mayoría tiene una temperatura óptima entre 30 y 45 °C, y se inactiva a más de 55 °C (Figura 3) (Santamaria, Lopez, & Garcia Escudero, 1995).



Efecto de la Temperatura

Figura 3. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática

Fuente: Santamaria, Lopez, & Garcia Escudero, (1995).

2.3. DEFINICION DE TERMINOS

Orujo: está formada por semillas y hollejos (piel y pulpa), principal residuo de la industria del vino.

Enzima: Proteína soluble producida por las células del organismo, que favorece y regula las reacciones químicas en los seres vivos

Hidrólisis: Formación de un ácido y una base a partir de una sal por interacción con el agua.

Hidrólisis alcalina: es un proceso que se realiza con agua y temperaturas para acelerar el proceso de agrega Hidróxido de sodio el cual es un agente activo para descomponer material biológico.

Hidrólisis enzimática: la hidrólisis que se produce mediante un grupo de enzimas llamadas hidrolasas. Estas enzimas ejercen un efecto catalítico hidrolizante, es decir, producen la ruptura de enlaces por agua.

Bioetanol: Es un combustible que se genera mediante la descomposición por vía anaerobia de desechos orgánicos.

Grado alcohólico: Es la expresión en grados del número de volúmenes de alcohol contenidos en cien volúmenes del producto, medidos a la temperatura de 20° C.

Aeróbico: Organismo capaz de desarrollarse en la presencia de oxígeno para favorecer sus necesidades metabólicas así como su crecimiento (Amerine & Ought, 1965).

Anaeróbico: Organismo que funciona sin la intervención de oxígeno es decir no usa el oxígeno en la respiración y cuyo crecimiento puede ser inhibido por este, es primordial para la síntesis de metabolitos generalmente secundarios (Jorgensen & Federico, 1990).

Fermentación: catabolismo anaeróbico en el que un compuesto orgánico sirve al mismo tiempo como donador y como aceptor de electrones y en el que el ATP se produce por fosforilación a nivel de sustrato (Jorgensen & Federico, 1990).

Bioreactor: Es un recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo. En algunos casos, un bioreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos.

pH: Valor negativo del logaritmo de la concentración de iones Hidrogeno (H+) en una solución (Jorgensen & Federico, 1990).

Grados Brix: medida objetiva de la concentración de azúcares disueltos en un producto y de la idea del nivel de dulzura del mismo.

Sustrato: medio o sustancia que contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo de un microorganismo con el fin de favorecer la formación de metabolitos de interés industrial (Jorgensen & Federico, 1990).

Celluclast: celluclast (Novozymes) celulasa, obtenido a partir del *Trichoderma reesei*, donde ayuda a romper la celulosa en glucosa, celobiosa y polímeros de glucosa.

III. MARCO METODOLOGICO

3.1. Lugar de ejecución

El presente proyecto se realizará la parte experimental en las instalaciones de la Universidad Nacional de Moquegua, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial en el laboratorio de ingeniería de procesos, en el laboratorio de química y la determinación de alcoholes se realizara por cromatografía de gases en el laboratorio de química de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

3.2. Tipo, diseño y nivel de investigación

TIPO DE INVESTIGACIÓN	Aplicada, cuantitativa
DISEÑO	Experimental
NIVEL DE INVESTIGACIÓN	Teórico – Práctico
MÉTODOS	Descriptivo, Deductivo, inductivo, Analítico y Comparativo



3.3. Operacionalización de variables

Tabla 2. Operación de variables

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPOTESIS	VARIABLE DE ESTUDIO	VARIABLE DE RESPUESTA
¿Cuál es el efecto de Temperatura y pH en la obtención de etanol a partir de orujo de uva (<i>Vitis vinifera</i> L.) por vía hidrólisis alcalina e hidrólisis enzimática?	Aprovechar el orujo de uva (<i>Vitis vinifera</i> L.) para la obtención de etanol por vía hidrólisis alcalina e hidrólisis enzimática	Si afecta la temperatura y pH en la obtención de etanol a partir de orujo de uva por vía hidrólisis alcalina e hidrólisis enzimática.	Durante el proceso de obtención de etanol:	-Vía adecuada para la obtención de etanol
¿Cuál es la temperatura y pH óptimo para la obtención de etanol a partir de orujo de uva (<i>Vitis vinifera</i> L.) por vía hidrólisis alcalina?	Determinar los parámetros fisicoquímicos (pH, Temperatura) óptimo para el proceso de hidrólisis alcalina.	Los parámetros de T° y pH son factores determinantes para la obtención de etanol por vía hidrólisis alcalina.	TEMPERATURA: T ₁ : 50°C T ₂ : 60°C	-Rendimiento (%) -Grado alcohólico (%)
¿Cuál es la temperatura y pH óptimo para la obtención de etanol a partir de orujo de uva (<i>Vitis vinifera</i> L.) por vía hidrólisis enzimática?	Determinar los parámetros fisicoquímicos (pH, Temperatura) óptimo para el proceso de hidrólisis enzimática	Los parámetros de temperatura y pH son factores determinantes para la obtención de etanol por vía hidrólisis enzimática.	Potencial de hidrogeno pH ₁ : 5 pH ₂ : 6	-Alcoholes superiores (metanol, Propanol)
¿Cuál de las vías de hidrólisis permite obtener mayor rendimiento de etanol obtenido del orujo de uva?	Determinar el rendimiento de etanol obtenido por medio de los dos procesos. (<i>Vitis vinifera</i> L.) En la obtención de etanol.	El proceso por vía hidrólisis enzimática permite obtener mayor rendimiento de obtención de etanol.		

3.4. MATERIALES Y EQUIPOS

3.4.1. Materia prima e insumos

Para el estudio se trabajará con 300 kg de orujo de uva procedente de la bodega "El Mocho" ubicado en a 5 km de la ciudad de Moquegua.

3.4.2. Materiales

- Probetas de 500ml, 250ml, 150ml, 100ml.
- Tubos de ensayo
- Vidrio de reloj
- Vasos de precipitados de 200 ml, 100 ml, 50 ml.
- Matraz Erlenmeyer de 250ml, 1000ml.
- Probetas
- Pipetas volumétricas
- Envases con tapa

3.4.3. Equipos

- pH- metro
- Termómetro digital (-10 a 100°C)
- Balanza analítica digital (rango 0 – 100g)
- Baño térmico
- Alcoholímetro (0 – 100%)
- Hidrómetro
- Mostímetro
- Refractómetro
- Centrífuga
- Equipo de destilación de laboratorio.



- Incubadora de laboratorio
- Bioreactor capacidad 10L de acero inoxidable.

3.4.4. Reactivos

- Solución de NaOH normalizada (0.5 molar).
- Solución de Ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 5 % p/v
- Solución de Carbonato de calcio ($CaCO_3$) al 5 % p/v
- Solución buffer o tampón pH: 4; 7; 10.

3.4.5. Insumos

- Enzimas celulasas celluclast (1.5 p/p con sustrato)
- Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

3.5. Población y/o muestra de estudio

Para esta investigación se tomará como muestra de estudio el orujo de uva obtenido del excedente residual de la bodega "El Mocho" de la región Moquegua.



3.6. Metodología experimental

3.6.1. Metodología a seguir para la hidrólisis alcalina

En la figura 4 se detalla la metodología a seguir para la obtención de etanol por vía hidrólisis alcalina.

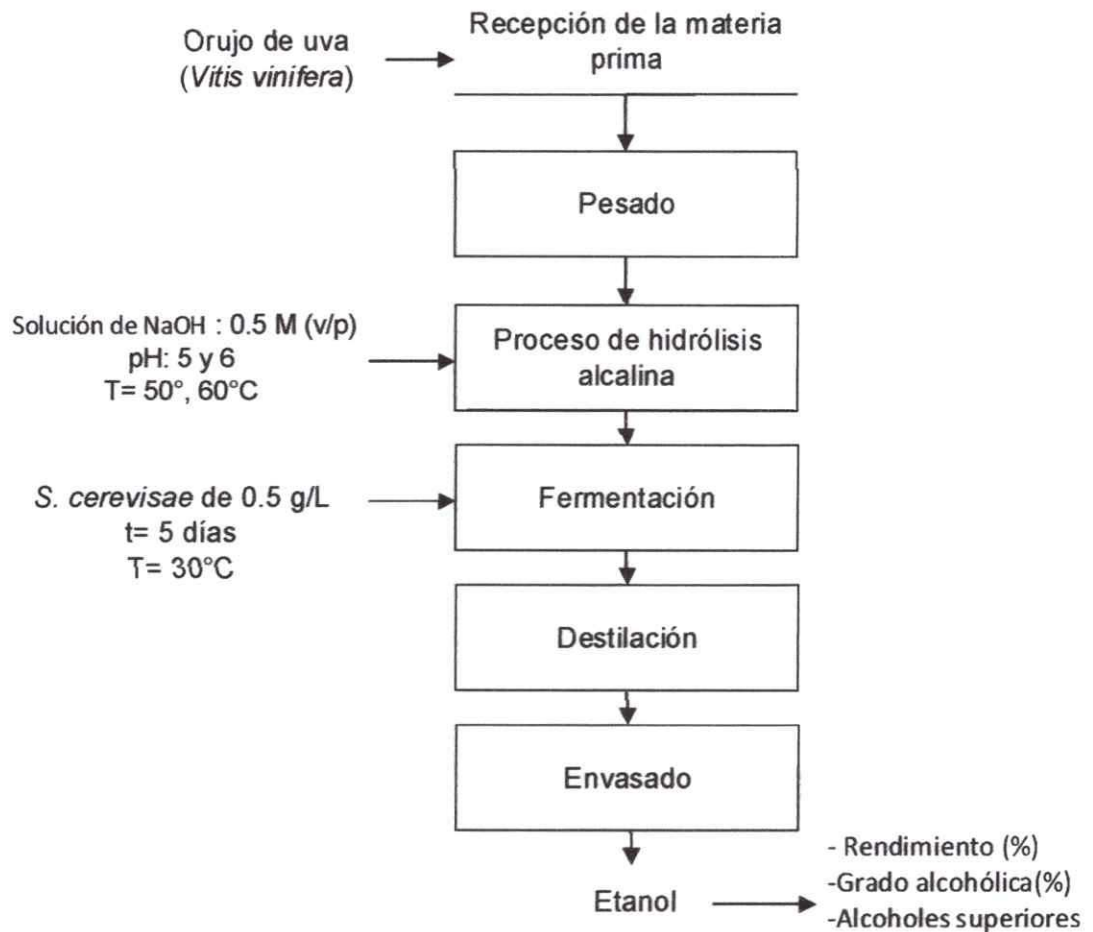


Figura 4. Metodología a seguir para la obtención de etanol a partir de orujo de uva por vía hidrólisis alcalina.

Fuente: Elaboración Propia (2017).

3.6.1.1. Descripción de la metodología para la obtención de etanol por vía hidrólisis alcalina

a. Recepción de la materia prima (orujo de uva)

El orujo de uva se obtendrá de la bodega el "Mocho" de la región de Moquegua, se recepcionarán en jabs de plástico.

b. Pesado

El pesado se realizara con el fin de conocer la materia prima exacta para el proceso de obtención de etanol.

c. Proceso de hidrólisis alcalina

Se prepara una solución de NaOH 0,5 molar (v/p), y se agrega a la muestra a tratarse y posteriormente se somete a calentamiento continuo a 50°C por 24 horas, se repite el procedimiento a temperatura de 60°C por 24 horas, esto hace que produzca un hinchamiento de la biomasa, teniendo lugar reacciones como solvatación y saponificación.

d. Fermentación

- Medir el pH de las soluciones, que han pasado por el tratamiento de hidrólisis alcalina y adecuar a la prueba a realizarse
- Medir el volumen de muestra y colocarlo dentro del tanque de fermentación.
- Tomar aproximadamente 20 ml de muestra y ponerla dentro de la incubadora.
- Pesar la levadura en la balanza analítica de tal manera que esta sea 0.5 de levadura *Saccharomyces cerevisiae* por cada Litro de material fermentable
- Poner la levadura dentro de los 20 ml de solución, agitar suavemente y poner en la incubadora por media hora. Al igual que el resto de la solución para que también alcance la temperatura deseada.
- Adicionar los 20 ml de la solución en la muestra a tratarse y llevar a un Bioreactor para su posterior fermentación.

- Controlar el pH y los grados Brix con el refractómetro. Si el pH baja adicionar CaCO_3 para regularizar según la metodología.
- Una vez realizada todo el procedimiento para la fermentación se deja fermentar a una temperatura de 30°C para lograr un buen desarrollo de *S.cerevisiae*. Este proceso dura 5 días, periodo normal en el cual se realiza agitación manual durante 5 minutos cada día.

e. Destilación

Se utilizara destilador de laboratorio para lo cual es necesario establecer la temperatura de ebullición del etanol que presenta cada equipo y comparar el punto de ebullición teórico del etanol.

Una vez determinada la temperatura de ebullición se destila cada una de las pruebas experimentales y se recolecta el alcohol en envases herméticos para su posterior análisis.



3.6.2. Metodología a seguir por vía hidrólisis enzimática

En la figura 5 se detalla la metodología a seguir para la obtención de etanol por vía hidrólisis enzimática.

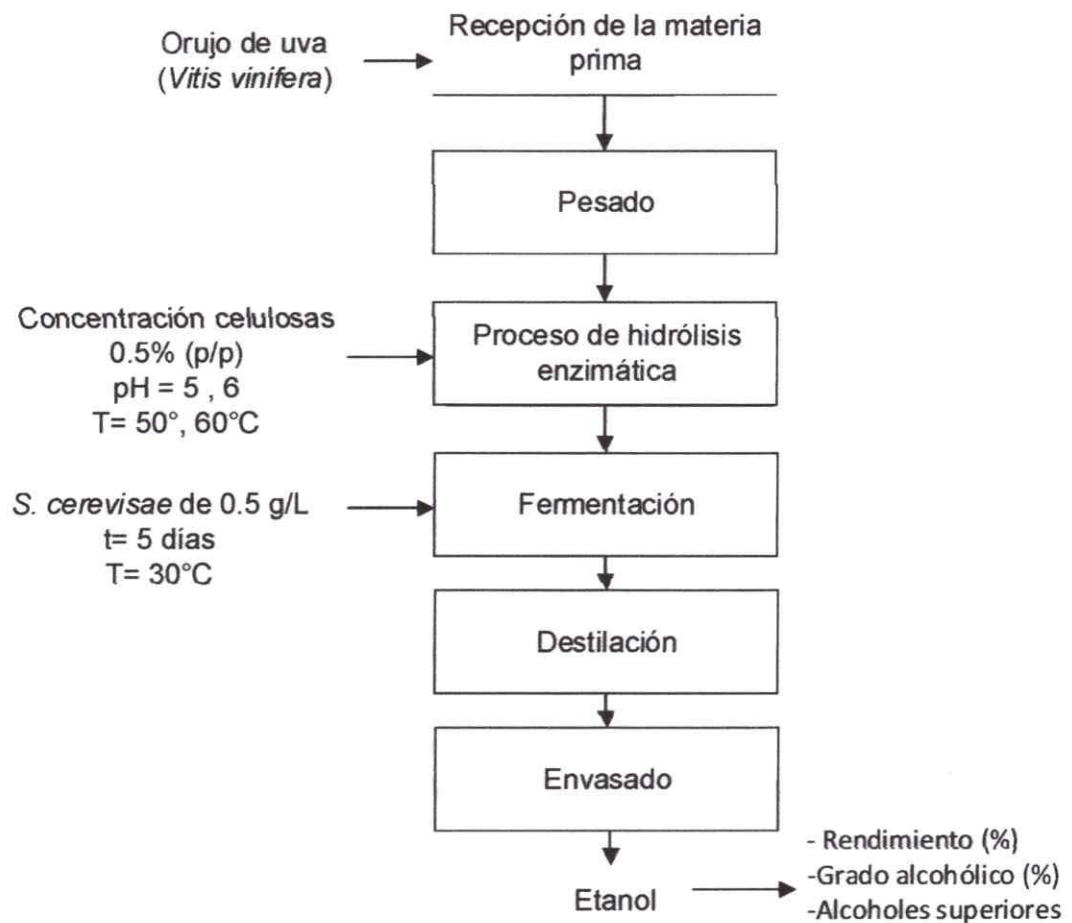


Figura 5. Metodología a seguir para la obtención de etanol a partir de orujo de uva por vía hidrólisis enzimática.

Fuente: Elaboración Propia (2017).

3.6.2.1. Descripción del procedimiento para la obtención de etanol a partir de orujo de uva por vía hidrólisis enzimática

a. Recepción de la materia prima (orujo de uva)

El orujo de uva se obtendrá de la bodega el "Mocho" de la región de Moquegua, se recepcionarán en jabas de plástico.

b. Pesado

El pesado se realizara con el fin de conocer la materia prima exacta para el proceso de obtención de etanol.

c. Proceso para la hidrolisis enzimática

La fracción sólida resultante del proceso de pre-tratamiento para el orujo de uva a las condiciones óptimas, se hidrolizaran con enzimas celulasas comerciales. La reacción de hidrólisis se llevara a cabo en las siguientes condiciones: agitación mecánica 450 rpm, 48 h, 50°C y pH 5 y 6. El ajuste del pH se utilizara con Hidróxido de sodio y ácido clorhídrico. El dosaje de enzimas utilizado será 0,5% en peso del sustrato seco de la enzima celulolasas celluclast. Se utilizara un exceso de enzimas para evitar cualquier limitación de esta variable.

d. Fermentación

- Medir el pH, que han pasado por el tratamiento enzimático y adecuar a la prueba a realizarse.
- Medir el volumen de muestra y colocarlo dentro del bioreactor para su posterior fermentación.
- Pesar la levadura en la balanza analítica de tal manera que esta sea 0.5 de levadura *Saccharomyces cerevisae* por cada Litro de material fermentable
- Poner la levadura dentro de los 20 ml de solución fermentable, agitar suavemente y poner en la incubadora por media hora. Al igual que el resto de la solución para que también alcance la temperatura deseada.

- Adicionar los 20 ml de la solución en la muestra a tratarse y llevar al bioreactor para que siga su fermentación.
- Controlar el pH, si el pH baja adicionar una solución CaCO_3 al 5% p/v, si el pH es alto bajar con una solución ácido sulfúrico H_2SO_4 al 5% p/v.
- Una vez realizada todo el procedimiento para la fermentación se deja fermentar a una temperatura de 30°C para lograr un buen desarrollo de la levadura *S.cerevisiae*. Este proceso dura 5 días, periodo normal en el cual se realiza agitación manual durante 5 minutos cada día.

e. Destilación

Se utilizara destilador de laboratorio para lo cual es necesario establecer la temperatura de ebullición del etanol que presenta cada equipo y comparar el punto de ebullición teórico del etanol.

Una vez determinada la temperatura de ebullición se destila cada una de las unidades experimentales y se recolecta el alcohol en envases herméticos para su posterior análisis.

3.6.3. Métodos de análisis

3.6.3.1. Determinación de pH

El pH se determinara mediante el pH – metro de acuerdo al procedimiento ver **Anexo 1**.

3.6.3.2. Determinación del grado °Brix

La determinación de los grados °Brix se realizara mediante la lectura del refractómetro según el procedimiento ver **Anexo 2**.

3.6.3.3. Determinación de grado alcohólico

Para la lectura del grado alcohólico de la muestra obtenida por destilación es de la siguiente manera ver **Anexo 3**.

3.6.3.4. Determinación de alcohol etílico

Se pueden aplicar varios métodos para determinar el contenido de etanol. Debido a que existe a la diferencia de densidades entre el agua y etanol. Ver **Anexo 4**.

3.6.3.5. Determinación del rendimiento

Para determinar el rendimiento será de acuerdo a la cantidad de alcohol obtenido sobre la cantidad de orujo utilizado

$$R = \frac{\text{Alcohol obtenido (g)}}{\text{Residuo (g)}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1.}$$

De acuerdo al rendimiento teórico es de 1g de glucosa es de 0.51g de etanol y 0.49 de CO₂. Sin embargo en la práctica, aproximadamente el 10% de la glucosa se transforma en biomasa y el rendimiento de etanol y CO₂ alcanzando el 90% del valor teórico (Ertola. & Yantorno., 2003).

3.6.3.6. Determinación de alcoholes por cromatografía de gases

La cromatografía de gases se puede aplicar a gases y cualquier compuestos que pueda ser volatilizado o convertido en un derivado volátil; la cromatografía de gases tiene amplia aplicación, en las industrias se enfoca principalmente a evaluar la pureza de los reactantes y productos de reacción o bien a monitorear la secuencia de la reacción, para los fabricantes de reactivos químicos su aplicación para la determinación de la pureza es los más importante (Skoog, Holler, & Nieman, 2001)

La cromatografía de gases es una técnica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatografía. La evaluación se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna (Rouessa & Rouessac, 2003). Ver Anexo 5.

3.7. Diseño experimental o métodos y técnicas para la presentación y análisis de datos

En el presente estudio se utilizara un análisis estadístico por Diseño completamente al azar (D.C.A.), para ver si existe relación o no entre dos variables que forman una población de datos. En base a esta relación se pueden comparar varias muestras y determinar factores limitativos, cuyo diseño estadístico en la siguiente, y la estructura del diseño se presenta en el Cuadro.

El modelo aditivo lineal para un DCA es la siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij}$$

Ecuación 2.

Donde:

- Y_{ij} : es el valor o rendimiento observado en el i-ésimo tratamiento, j-ésimo repetición.
- μ : es el efecto de la media general
- τ_i : es el efecto de i-ésimo tratamiento
- e_{ij} : es el efecto del error experimental en el i-ésimo tratamiento, j-ésima repetición.

Tabla 3. Estructura del diseño experimental para la optimización

Variable independiente				Variable dependiente
Variedad	Método	Temperaturas	pH	Parámetros a evaluar
Orujo de Uva	HA	T1	pH1	- Rendimiento (%) - Grado alcohólico (%) - Rendimiento de etanol -Alcoholes superiores (metanol, propanol)
			pH2	
		T2	pH1	
			pH2	
	HE	T1	pH1	
			pH2	
		T2	pH1	
			pH2	

Fuente: Elaboración Propia (2017).

HA: Hidrolisis alcalina

HE: Hidrolisis enzimática

T₁: Temperatura de exposición a 50°C

T₂: Temperatura de exposición a 60°C

pH₁: 5

pH₂: 6

De acuerdo a la tabla 3, se realizará un arreglo factorial de $2 \times 2 \times 2$ realizado por vía de hidrolisis alcalina y enzimática para la obtención de etanol, después del arreglo factorial, cuyo modelo estadístico se detalla en la ecuación 1, se evaluará los resultados mediante el análisis de la Prueba de Tukey al 5%. El diseño del ANOVA será con un nivel de confianza del 95% mediante un software estadístico Statgraphics Plus Profesional 7.0.



4.1. Recursos

RECURSOS HUMANOS	HORAS/DIA
Tesista	1
Asesor	1
Analista	1

4.2. Bienes y servicios



Tabla 5. Presupuesto detallado del proyecto de tesis

Ítem	NOMBRE ACTIVIDAD	UNIDAD	CANTIDAD	COSTO UNITARIO S/.	COSTO TOTAL S/.	SUB TOTAL S/.
1	PASAJES Y VIATICOS					
1.1	Hospedaje, alimentación, movilidad local	día	2	S/. 320.00	S/. 640.00	
1.2	Pasaje interdepartamental	día	4	S/. 180.00	S/. 720.00	S/. 1,560.00
1.3	Declaración jurada	día	4	S/. 50.00	S/. 200.00	
2	SUBCONTRATOS					
2.1	Especialista en definición, interpretación	Unid	1	S/. 2,000.00	S/. 2,000.00	
2.2	Capitación	Unid	1	S/. 2,000.00	S/. 2,000.00	S/. 4,000.00
3	EQUIPOS Y MATERIALES					
3.1	Bioreactor capacidad 10L de acero inox.	unid	1	S/. 9,190.00	S/. 9,190.00	
3.2	Tubos de ensayo	Unid	10	S/. 30.00	S/. 300.00	S/. 9,490.00
4	MATERIAL FUNGIBLE					
4.1	Materia prima - orujo de uva	Kg	800	S/. 1.30	S/. 1,040.00	
4.2	Recipientes de fermentación de plástico 10L	Unid	24	S/. 11.67	S/. 280.00	
4.3	Insumos	Unid	1	S/. 280.00	S/. 280.00	S/. 2,000.00
4.4	Reactivos	Unid	1	S/. 400.00	S/. 400.00	
5	PROGRAMAS INFORMATICOS Y BIBLIOGRAFIA					
5.1	Adquisición de software para el Análisis de datos	Unid	1	S/. 2,000.00	S/. 2,000.00	S/. 2,000.00
6	GASTOS GENERALES					
6.1	Sustentación y obtención de Título	Unid	1	S/. 800.00	S/. 800.00	
6.2	Útiles de oficina y fotocopias	Unid	1	S/. 150.00	S/. 150.00	S/. 950.00
	TOTAL					S/. 20,000.00

Tabla 6. Cronograma de ejecución presupuestal del proyecto de tesis

Ítem	NOMBRE ACTIVIDAD	Junio		Julio		Agosto		Septiembre		Octubre		Noviembre		Diciembre		Total	
		S/.	S/.	S/.	S/.	S/.	S/.	S/.	S/.	S/.	S/.	S/.	S/.	S/.	S/.	S/.	S/.
1	PASAJES Y VIATICOS																
1.1	Hospedaje, alimentación, movilidad local	S/.	S/.														S/.
1.2	Pasajes		S/.						S/.								S/.
1.3	Declaración Jurada		S/.						S/.								S/.
2	SUBCONTRATOS																
2.1	Especialista en definición, interpretación						S/.										S/.
2.2	Capitación				S/.												S/.
3	EQUIPOS Y MATERIALES																
3.1	Bioreactor capacidad 50L de acero inox.		S/.														S/.
3.2	Tubos de ensayo		S/.														S/.
4	MATERIAL FUNGIBLE																
4.1	Materia prima - orujo de uva				S/.												S/.
4.2	Recipientes de fermentación de plástico 10 litros de capacidad				S/.												S/.
4.3	Insumos				S/.												S/.
4.4	Reactivos				S/.												S/.
5	PROGRAMAS INFORMATICOS Y BIBLIOGRAFIA																
5.1	Adquisición de software para el Análisis de datos									S/.							S/.
6	GASTOS GENERALES																
6.1	Sustentación y obtención de Título									S/.							S/.
6.2	Materiales de Oficina				S/.					S/.							S/.
	TOTAL																S/.

4.1. Fuentes y financiamiento

Tabla 7. Presupuesto detallado del proyecto de tesis

PRESUPUESTO DETALLADO DEL PROYECTO DE TESIS			
GASTOS DE PROYECTO DE TESIS	Financiando por UNAM	Financiamiento Propio	
VIATICOS	S/. 1,560.00		
SUBCONTRATOS	S/. 4,000.00		
EQUIPO	S/. 9,490.00		
MATERIAL FUNGIBLE	S/. 2,000.00		
PROGRAMAS INFORMATICOS	S/. 2,000.00		
GASTOS GENERALES	S/. 950.00		
PASAJES Y ALIMENTACION		S/. 1,000.00	
GASTOS DE TITULACION		S/. 1,000.00	
OTROS GASTOS		S/. 1,000.00	
FINANCIADO AL 100%	87%	13%	
SUB TOTAL	S/. 20,000.00	S/. 3,000.00	
TOTAL DE GASTOS DEL PROYECTO DE TESIS		S/. 23,000.00	

V. BIBLIOGRAFIA

- Aimaretti, N., Ybalo., C., Escorcía., M., & Codevilla, A. (2012). *Revalorización de descartes agroindustriales para la obtención de bioetanol*. Argentina.
- Amarin. (2011). *La fermentación alcohólica. como se produce y aplicaciones*.
- Amerine, M., & Ought, C. (1965). *Análisis de Vinos y Mostos*. España: Ed. Acribia Zaragoza.
- Amrani Joutei, K., & Glories, Y. (1995). *Tanins et anthocyanes: localisation dans la baie de raisin et mode d'extraction*. *Revue Francaise d'o Enologie*.
- ASTM D-1152. (s.f.). *Standard Specofication for Methanol (Methyl Alcohol) especificación Estandar para Metanol (Alcohol Metílico)*. Estados Unidos de América.
- Ballesteros., P. M. (2003). *Biocombustibles líquidos*. España.
- Bonilla, F., Mayene, M., Merida, J., & Mulina, M. (1999). *Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidant*. *Food Chemistry*, 66, 209–215.
- Boulton., B., Bisson., L., & Singleton., V. (2002). *Viticultura para elaboradores de vino. En Teoría y Práctica de la Elaboración del Vino*. España.
- Bustamante, M., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., & Pérez-Murcia, M. (2008). *Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry*. *Waste Management*, 28, 2, 372-380.
- Caraton, C. (2010). *Producción de etanol a partir de residuos provenientes del cultivo de café*. Colombia: Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia.
- Cardona Alzate, C., Sanchez Toro, O. J., & M.I, M. R. (2005). *Producción de etanol carburante: material lignocelulísico una nueva alternativa*. *Rev. Eidenar*.
- Chandraj, K. (2001). *Bacterial Alcoholic fermentation*. *Concise Encyclopedia of bioresource*.
- Chapin, G., Prida, J., & Suarez, E. (2004). *Avances en la producción de Bioetanol a partir de Residuos Lignocelulosicos*.
- Colina, A. (2000). *Obtención de Fuentes Alternativas de Energía*. España: Universidad Salamanca.
- Díaz, A., Caro, I., de Ory, I., & Blandino, A. (2007). *Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolitic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace*. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 3, 302-306.

- DRAM., D. R. (2015). *Estadística Agricultura 2015*. Moquegua.
- Duarte, S. Y., & Torres, C. E. (2012). *Obtención de etanol por vía fermentativa a partir de cascaras de Ananas comosus (Pña) evaluando dos de sus principales variables (pH y grados Brix) Usando como Microorganismo productor Saccharomyces cerevisiae*. San Salvador, El Salvador, Centroamerica: Tesis para optar al grado de Licenciatura en química y farmacia.
- Ertola., O., & Yantomo., C. (2003). *Microbiología industrial*. Madrid. Pag 43-53: McGraw-Hill.
- Espinosa, C. F. (2013). *Obtención de etanol mediante hidrólisis alcalina, enzimática y fermentación a partir del excedente orgánico del banano variedad Musa paradisiaca*. Ecuador: Universidad Central del Ecuador, Carrera de Ingeniería Química.
- Fengel y Weneger. (1984). *Wood - chemistry, ultrastructure reactions*. Berlin and New York.
- Ferreira, R., Sellés, G., & Valenzuela, J. (2002). *Para modificar cualidades del vino*. Tierra adentro 42: 13-15.
- Ferreira, M., & Schwab, M. d. (2009). *Fermentación alcohólica de jugo de naranja con S. cerevisiae*. Docencia y Tecnología Universidad de la planta Argentina.
- Flanzy, C. (2000). *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Madrid: Ediciones; Ediciones Mundi-Prensa. 783 p.
- Hoyos, L., & Perez, Y. (2005). *Pretratamiento del Material Lignocelulósico de la planta de banano y su fruto para la producción de jarabe*. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellin.
- Huertas, V. L. (2004). *Historia de la producción de vinos y piscos en el Perú*. Revista Universum Vol. 19. n °2.
- Jorgensen, S., & Federico, t. K. (1990). *Microbiología de las fermentaciones industriales*. Madrid España: Editorial limusa.
- Lecas, M., & Brillouet, J. (1994). *Cell wall composition of grape berry skins Phytochemistry*. 35: 1241 - 1243.
- Lopez., A., & Molina., M. (2004). *Estudio comparativo de la producción de etanol vía fermentativa utilizando cuatro sustratos preparados a partir de banano maduro*. Costa Rica.
- Machado, C. (2010). *situación de los Biocombustibles de 2da y 3ra Generación en America Latina y Caribe*. La Habana.
- Machuca Boris, H. F. (2009). *Sensor virtual adaptable de concentración de etanol para fermentaciones industriales*. Santa Clara, Cuba.

- Mantell, C., Rodriguez, M., & de la Ossa, E. (2003). *A screening analysis of the high-pressure extraction of anthocyanins from red grape pomace with carbon dioxide and cosolvent*. *Engineering in Life Science*, 3, 38–42.
- Marcilla., A. J. (1967). *Tratado práctico de viticultura y enología españolas*. vol. 2.
- Masson., L. (1997). *Métodos analíticos para la determinación de humedad, alcohol, energía, materia grasa y colesterol en alimentos*. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación.
- Mejia, L. F., Alban, D. C., Murcia, N., cuervo, R., & Duran., J. (2009). Hidrólisis y Fermentación alcohólica simulatnea (HFS) del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica L*) utilizando levaduras *Saccharomyces cerevisiae* spp y cepa recombinante RH 218*. *Revista Científica Guillermo de Ockham.*, Vol. 7, N°2 pp 51- 64.
- Owen, P., & Ward. (1991). *Bioteconología de la fermentación*. Zaragoza España: Editorial acribia S.A.
- Paradelo., R., Moldes., A., Gonzalez., D., & Barral., M. (2002). *Evualuación de compost y vermicompost dde orujo agotado de uva como componentes de sustratos*. España.
- Pejó, M. (2010). *Bioetanol de paja de trigo: Estrategias de integración de las etapas de proceso*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Pellerin, P., & Cabanis, J. (2000). *Los Glúcidos. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Madrid pp 66- 96.: Flanzzy C. (Ed.) AMW Ediciones.
- Peña Niera, A. (2001). *Análisis Químico del vino*. Santiago 28p: Universidad de Chile .
- Piñeros, Y. A. (2005). *Evaluación de la producción de Etanol a partir de cascarilla de arroz pretratada con NaOCL, mediante hidrólisis y fermentación simultaneas*. Universidad Jorge Tadeo Lozano, Programa Ingeniería de Alimentos.
- Regodón, M. J. (2007). *Obtención y caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la elaboración estandarizada de vinos de calidad*. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.
- Ribereau - Gayon, P., y., G., A., M., & D., D. (2006). *The Grape and its Maturation. En Handbook of Enology, The Microbiology of Wine and Vinifications.*, 2da Edición.
- Rice, A. (1976). *Solid waste generation and by-product recovery potential from winery residues*. *American journal of Enolgy Viticulture*, 27, 21-26.
- Rodriguez, L., Toro, M., & Vazquez, F. (2009). *Producción de bio-etanol por fermentación en estado solido, sobre orujo de uva y de remolacha azucarera*. San Juan, Argentina: Instituto de Biotecnología, Facultad de Ingeniería- UNSJ.
- Rouessa, F., & Rouessac, A. (2003). *Análisis Químico : Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*. España Pág. 60-73.: Ed. Mc GRAW HILL.

- Ruberto, G., Renda, A., Amico, V., & Tringali, C. (2008). *Volatile components of grape pomaces from different cultivars of Sicilian Vitis vinifera L.* Bioresource Technology, 99, 2, 260-268.
- Rubio., E., Carmona., Y., & Igartuburu., J. (2000). *Estudio de la composición de los residuos de vinificación con fines alimenticios.* Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Cadiz.
- Saéñz, C. (1992). *Aprovechamiento se subproductos de la industria alimentaria.* Chile : Alimentos 17 (3): 57 - 61.
- Sanchez, C., & Cardona, C. (2005). *Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas.* Interciencia.
- Sanchez, R. e. (2010). *Producción de Bioetanol a partir de Subproductos Agroindustriales Lignocelulosicos.* Revista Tumbaga.
- Santamaria, P., Lopez, R., & Garcia Escudero, E. (1995). *Influencia de la Temperatura en la fermentación alcohólica.* España.
- Skoog, D., Holler, F., & Nieman, T. (2001). *Principios de Análisis instrumental.* España: Ed. Me GRAW HILL.
- Soto, M., Moure, A., Domiguez, H., & Parajó, J. (2008). *Charcoal adsorption of phenolic compounds present in distilled grape pomace.* Journal of Food Engineering, 84, 1, 156-163.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). *"Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. A review".* Bioresource Tecnol 83: 1-11.
- Talebnia, F., Karakashev, D., & Angelidaki., I. (2010). *Producción of bioetanol from wheat straw. an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation.* Technol.
- Vázquez, H., & Da costa, O. (2007). *Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas.* Ingeniería Investigación y Tecnología Mexico Distrito Federal.
- Vidal, S., Williams, P., O'Neill, M., & Pellerin, P. (2001). *Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I. Tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides.* Carbohydrate Polymers.
- Zooecklein, B., Fugelsang, K., & Gump, B. y. (2001). *Análisis y producción de vinos.* Edición Acribia. 613 p.

VI. ANEXOS

Paul

6.1. Anexo 1: determinación de pH

Las medidas electrométricas del pH han sustituido grandemente los otros métodos, aun cuando en el AOAC todavía se incluyen métodos calorimétricos para pan y otros productos de cereales. El pH presente en el alimento será el resultado de los sistemas amortiguadores naturales que predominen en el mismo. Los sistemas amortiguadores (o "buffers") son mezclas de ácidos (o bases) débiles y sus sales. La "capacidad buffer" se ha definido como la resistencia al cambio de pH que muestra una solución cuando se le somete a ganancia o pérdida de ácido o álcali:

Calentar y calibrar el medidor de pH (pHmetro) de acuerdo a las instrucciones del aparato.

Los electrodos deben mantenerse sumergidos en agua destilada y lavarse cuidadosamente, antes y después de usar, con agua destilada (secar el exceso sin frotar el electrodo).

Para la calibración usar soluciones buffer pH 7 y 4. 4. Agitar la muestra después de la lectura y repetirla hasta que dos lecturas coincidan cercanamente

Cálculos: Usando constante de disociación del ácido predominante de su muestra, calcule el pH teórico de la misma. Comparar el valor teórico con el obtenido experimentalmente



6.2. Anexo 2: determinación de grados Brix

Los grados Brix proporcionan una medida objetiva de la concentración de azúcares disueltos en un producto y de la idea del nivel de dulzura del mismo. Los grados Brix se miden usando el refractómetro o brixómetro.

El refractómetro es un equipo que proporciona una lectura del índice de refracción de una muestra líquida a la vez da el valor de los grados Brix que la muestra presenta. El refractómetro consta de 2 prismas un primario y secundario en este colocamos la muestra, posee un ocular donde el analista observa la lectura. Además cuenta con un termómetro digital para poder tomar la lectura de la temperatura a la cual se hace el análisis, para que posteriormente podamos hacer la corrección según la ecuación del índice de refracción real con la por una diferencia de temperaturas a la cual el equipo esta calibrado.

$$n_{Dreal} = n_{Dt} \pm F_d$$

n_{Dreal} = índice de refracción real

n_{Dt} = índice de refracción tomado a la temperatura a la cual registra el termómetro digital.

F_d = factor de diferencia según la siguiente ecuación

Ecuación para calcular el factor de diferencia:

$$F_d = |T_c + T_a| \times 0.004$$

Donde:

T_c = temperatura de calibración del refractómetro

T_a = temperatura a la cual se hace la lectura de la muestra en el refractómetro.

0.004 = constante refractométrica de error de incerteza

El signo \pm de la primera ecuación indica una suma cuando la temperatura a las cual se hace la lectura de la muestra en el refractómetro es menor a las temperatura de calibración del refractómetro.

Después de haber calculado el índice de refracción real podemos calcular también determinar los grados Brix reales de la muestra, esta determinación se lleva a cabo en el refractómetro directamente.

6.3. Anexo 3: determinación del grado alcohólico

Colocar la muestra de alcohol etílico en una probeta de 100 ml, o un cilindro de volumen adecuado para poder colocar el alcoholímetro junto con la muestra de etanol.

Sumergir el alcoholímetro verificando que esté limpio y seco dentro de la probeta que contiene la muestra.

Verificar que el líquido muestra cubra por completo el alcoholímetro.

Realizar la lectura y anotar el valor del grado alcohólico de la muestra.

6.4. Anexo 4: Determinación de etanol por método densimétrico.

Debido a la diferencia de densidades entre el agua y el etanol, se puede determinar el contenido de alcohol a través de la medida de su densidad; cuanto más elevado sea el contenido en etanol de una bebida más baja será su densidad (Sierra,). Éste se basa en la determinación de la densidad de una solución hidroalcohólica obtenida previamente por destilación. Para medir la densidad se utiliza un equipo especial, el más usado es el hidrómetro (hidrometría) pero existen otros como el alcoholímetro.

Hidrometría: El contenido de etanol se puede medir en el destilado a partir de un volumen de la muestra exactamente medido. Los azúcares reductores no son destilables, interfieren el SO₂ y el ácido acético, por esta razón las muestras deben neutralizarse antes de la destilación. La determinación se efectúa por medio de un hidrómetro calibrado y se registra la temperatura. El porcentaje de etanol en volumen se obtiene de tablas específicas. También se puede determinar el porcentaje de etanol en volumen con hidrómetros que miden el peso específico y consultar posteriormente las tablas pertinentes (Masson., 1997).

6.5. Anexo 5. Determinación de alcoholes por cromatografía de gases

Según NTP 211.035 2003 bebidas alcohólicas método de ensayo determinación de metanol y congéneres de bebidas alcohólicas y en alcohol etílico empleado en su elaboración, mediante cromatografía de gases.

Para el análisis cromatográfico de gases se utiliza estándares para preparar el mix con 3 diferentes % (Metanol, Etanol y Propanol) 100µL/50 ml donde se llega a identificar los componentes principales en el vino y el alcohol.

- Determinación de algunos componentes para cromatografía.

La determinación de la composición cualitativa y cuantitativa del alcohol se efectúa por cromatografía de gases, empleando para el efecto un cromatografía de gases equipado.

1) Metanol

El metanol es considerado como un contenido en las bebidas alcohólicas se tolera un límite máximo de 20mg/100ml de alcohol anhidrido en la cabeza para la legislación brasileña. Esto es proveniente de la actividad del metabolismo de *saccharomyces* por la actividad de enzimas pépticas

2) Alcoholes superiores

Durante la fermentación alcohólica, las levaduras producen etanol, u otros alcoholes con más de dos carbonos en su cadena, llamados alcoholes superiores. Estos alcoholes de interés en la cachaza, vino, cerveza deben de ser cuantificados como alcoholes

La producción de estos alcoholes durante la fermentación alcohólica se ve influenciando principalmente por la condiciones del medio. Entre ellas las concentraciones de azúcares, pH. El contenido de fuente de nitrógeno disponible, temperatura de fermentación, aeración y tipo de levadura.

- Procedimiento para obtener la curva de calibración de alcoholes por cromatografía de gases

Condiciones de operación de equipos para la determinación y cuantificar alcoholes

Gases	Aire Helio Hidrogeno
Columna	Restec-07248, staliwax – DA 30 meter, 0.25mm ID, 0.5 umdf
Horno	T° inicial 55°C.....Tiempo T° inicial 3 min T° final 120°C.....Tiempo T° final 2 min Velocidad de calentamiento 10°C/min
Detector (FID)	Temperatura a 200°C Presión de hidrogeno 40ml/min Presión del aire 399ml/min Presión de helio 30ml/min
Inyector (Split)	Temperatura a 200°C Split radio 300 Velocidad lineal 32.9 cmm/sec
Duración de método	11.5 min
Volumen de inyección	1.0µl
Patrones	Etanol, metanol y propanol de grasa cromatografía

- Estabilizar la línea base antes de realizar los análisis de la curva de calibración
- Preparar las concentraciones de la curva de calibración del patrón etanol 0.2%, 0.6%, 1.0% y 1.4% de concentración y enrasar con agua ultra pura.

Nota: los patrones deberán estar refrigerados a fin de evitar que se volatilicen

- Añadir los viales del equipo aproximadamente 1 ml de las concentraciones preparadas.
- Programar e inyectar
- Obtención de cromatogramas.

Determinación de algunos componentes para cromatografía

La determinación de la composición cualitativa y cuantitativa del alcohol se efectúa por cromatografía de gases, empleando para el efecto un cromatografía de gases equipado.

Para la identificación de los compuestos se procede en primer lugar a buscar las condiciones para una óptima separación y luego se inyectan una serie de estándares en idénticas condiciones, comparándose después los tiempos de retención con los de la muestra problema. En el análisis de cromatografía que se observa mediante las gráficas que se realizara.

La cromatografía de gases es la mejor y más confiable vía para obtener la composición real de una mezcla estos datos pueden ser de gran utilidad debido a que se pueden calcular diferentes propiedades de la mezcla partiendo de las propiedades de cada componente.

El cromatografo de gases se caracteriza por ser una técnica de separación que tiene incorporando un sistema de detección generalmente continuo (tipo on-line), ya que realiza tanto la separación como la determinación cualitativa y cuantitativa de los solutos.

Tabla 8. Propiedades del etanol como combustible

Propiedades	Gasolina	Etanol	Metanol
Poder calórico (Kcal/L)	7540	5070	3800
%octano	100	51,5	68
Relación estequiometria masa aire/combustible	15.1	9,1	6,45
Calor latente e evaporación, del combustible en 1 Nm3 (Kcal)	6,7	28,8	52,9
Presión de vapor a 34,9°C	0,1	1,9	3,8

Fuente: Normas Brasileiras.

Tabla 9. Especificaciones de calidad para etanol

Característica	Unidades	Valores
Apariencia	-	Libre de partículas suspendidas y precipitadas (claro y brillante)
Acidez total	mg/l	30 máximos
Contenido alcohólico	% volumen	0.996 (99.6) mínimo
Contenido de metanol	% volumen	0.005 (0.5) máximo
Color	-	Incoloro
Conductividad eléctrica	$\mu\text{S/m}$	500 máximo
Contenido de cobre	mg/kg	0.07 máximo
Hierro max.	mg/kg	5 máximo
Sodio max.	mg/kg	2 máximo.

Fuente: ASTM D-1152.