

**DESARROLLO EXPERIMENTAL DEL PROCESO PARA LA OBTENCION DE
UNA BEBIDA FERMENTADA A PARTIR DEL MUCILAGO DEL CACAO**

**ADRIANA LUCIA CARRILLO HORMAZA
AYDA KARINA LEON AYALA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE FISICOQUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA
2006**

**DESARROLLO EXPERIMENTAL DEL PROCESO PARA LA OBTENCION DE
UNA BEBIDA FERMENTADA A PARTIR DEL MUCILAGO DEL CACAO**

**ADRIANA LUCIA CARRILLO HORMAZA
AYDA KARINA LEON AYALA**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de
Ingeniero Químico

Director
LEONARDO ACEVEDO DUARTE
Ph.D. Ingeniero Químico

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE FISICOQUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA
2006**

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	8
1. CONCEPTOS TEÓRICOS	10
1.1 GENERALIDADES DEL CACAO	10
1.1.1 Usos del mucílago	11
1.2 LEVADURAS	11
1.2.1 Fisiología del crecimiento y acción de las levaduras	12
1.3 FERMENTACIÓN	13
1.3.1 Variables que intervienen en el proceso	14
1.4 VINOS	15
1.4.1 Etapas en la obtención de vinos	15
1.4.2 Composición química de los vinos	16
1.4.3 Defectos y enfermedades en los vinos	18
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	19
2.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	20
2.2 SELECCIÓN DE LAS ETAPAS E IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIABLES DEL PROCESO	20
2.2.1 Obtención del jugo	20
2.2.2 Filtración	22
2.2.3 Obtención del mosto	22
2.2.4 Preparación del inóculo	22

2.2.5	Fermentación	23
2.2.6	Centrifugación	23
2.2.7	Envasado	23
2.2.8	Pasteurización	24
2.2.9	Añejamiento	24
2.3	ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LAS VARIABLES CON EL TIEMPO	24
2.4	ENSAYOS PARA ENCONTRAR LOS VALORES ÓPTIMOS DE LAS VARIABLES DENTRO DE LA REGIÓN EXPERIMENTAL	24
2.4.1	Ensayos a diferentes temperaturas de reacción	25
2.4.2	Ensayos a diferentes concentraciones iniciales de sustrato	26
2.4.3	Ensayos a diferentes concentraciones iniciales de microorganismos	26
2.4.4	Diseño factorial 2^k	27
2.5	OBTENCIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ETAPA DE FERMENTACIÓN Y DEL PROCESO	27
2.6	CONTROL DE CALIDAD Y ANÁLISIS DE LA BEBIDA OBTENIDA	28
2.6.1	Análisis fisicoquímico	28
2.6.2	Análisis microbiológico	28
2.6.3	Análisis organoléptico	29
2.6.4	Análisis de composición química	29
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	30
3.1	CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	30
3.2	ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LAS VARIABLES CON EL TIEMPO	31

3.3	ENSAYOS PARA ENCONTRAR LOS VALORES ÓPTIMOS DE LAS VARIABLES	31
3.3.1	Experimentos de factor único	31
3.3.2	Diseño factorial 2^k	34
3.4	OBTENCIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ETAPA DE FERMENTACIÓN Y DEL PROCESO	35
3.5	CONTROL DE CALIDAD DEL VINO Y ANÁLISIS DE LA BEBIDA OBTENIDA	36
3.5.1	Análisis fisicoquímico	37
3.5.2	Análisis organoléptico	38
3.5.3	Análisis microbiológico	40
3.5.4	Análisis de composición química	40
4.	CONCLUSIONES	41
5.	RECOMENDACIONES	42
	BIBLIOGRAFIA	43

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición química de la semilla y el mucílago sin fermentar	11
Tabla 2. Composición elemental de la biomasa de <i>Sacharomyces</i>	12
Tabla 3. Matriz del diseño factorial	27
Tabla 4. Comportamiento de las variables con el tiempo durante la fermentación	31
Tabla 5. Selección de la mejor temperatura de reacción	32
Tabla 6. Determinación de la influencia de los nutrientes	32
Tabla 7. Nutrientes presentes en el jugo y requeridos por las levaduras	32
Tabla 8. Selección del tipo de azúcar más conveniente	32
Tabla 9. Selección de la mejor concentración de azúcar inicial en el mosto	33
Tabla 10. Selección de la concentración inicial de microorganismos	33
Tabla 11. Resultados del diseño factorial 2^3	34
Tabla 12. Parámetros de las corrientes a lo largo del proceso	35
Tabla 13. Balance de masa del proceso	36
Tabla 14. Puntos críticos a controlar en el proceso	36
Tabla 15. Contrastes y efectos en el diseño factorial 2^3	48
Tabla 16. Análisis de varianza	48
Tabla 17. Valores predichos, observados y residuales	50

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Árbol y fruto del cacao	10
Figura 2. Montaje utilizado para la fermentación	26
Figura 3. Evaluación del sabor del vino	38
Figura 4. Evaluación del aroma del vino	38
Figura 5. Evaluación del color del vino	39
Figura 6. Evaluación de la apariencia del vino	39
Figura 7. Gráfica de los residuales contra los valores predichos	50

LISTA DE DIAGRAMAS

	pág.
Diagrama 1. Metodología experimental	19
Diagrama 2. Etapas en la obtención del vino de cacao	21
Diagrama 3. Esquema del proceso para la obtención de vino a partir de cacao	28

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Encuesta de aceptación del vino	45
Anexo B. Análisis fisicoquímico del jugo obtenido del mucílago	46
Anexo C. Análisis de varianza y tratamiento matemático para obtener un modelo que represente los datos obtenidos en el diseño factorial	48
Anexo D. Análisis fisicoquímico del vino obtenido	51
Anexo E. Análisis microbiológico del vino obtenido	52
Anexo F. Análisis de composición química del vino obtenido	54

TITULO: DESARROLLO EXPERIMENTAL DEL PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA FERMENTADA A PARTIR DEL MUCÍLAGO DEL CACAO*

CARRILLO HORMAZA A. L., LEÓN AYALA A. K.**

Palabras claves

Cacao, mucílago, bebida fermentada, subproducto del cacao, fermentación.

Resumen

El presente trabajo de investigación tiene por objeto la obtención de un subproducto a partir del mucílago del cacao (bebida fermentada), con el fin de aprovechar este residuo generado en la obtención del chocolate, del cual solo es utilizado una pequeña fracción en el desarrollo de los precursores del aroma del cacao durante la fermentación de las semillas. Por lo anterior, se ha tenido la iniciativa de industrializar el mucílago del cacao en Santander implementando nuevos procesos, a través de los cuales se logre dar un valor agregado al proceso de elaboración del chocolate y un beneficio económico al cultivador.

Para obtener la bebida fermentada se llevaron a cabo seis etapas principales: caracterización de la materia prima, identificación y selección de las etapas y variables del proceso, estudio del comportamiento de las variables con el tiempo, determinación de los valores óptimos de las variables identificadas, obtención del rendimiento de la etapa de fermentación y del proceso y finalmente se realizó el control de calidad y análisis de la bebida obtenida.

Al llevar a cabo esta metodología experimental se obtuvo un producto que presentó las características organolépticas, microbiológicas y de composición química necesarias para ser una bebida con un alto nivel de aceptación y apta para el consumo. Además los parámetros fisicoquímicos y la composición química se encontraron dentro de las especificaciones requeridas por la Norma Técnica Colombiana 708 para Bebidas Alcohólicas-Vinos de frutas. Adicionalmente se obtuvo un rendimiento experimental del proceso expresado como g vino/g jugo significativamente alto, lo cual representa un aprovechamiento de gran parte de la materia prima, contribuyendo así a la posibilidad de industrializar el mismo.

* Tesis de grado

** Facultad de Fisicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química, Ph.D. Leonardo Acevedo Duarte

TITLE: EXPERIMENTAL DEVELOPMENT OF THE PROCESS TO OBTAIN A FERMENTED DRINK FROM THE COCOA MUCILAGE*

CARRILLO HORMAZA A. L., LEÓN AYALA A. K.**

Key words

Cocoa, mucilage, fermented drink, cocoa sub.-product, fermentation.

Abstract

The present research work have the intention to obtain a sub-product from the cocoa mucilage (fermented drinking), with the finality to take advantage of this remainder generated in the chocolate obtaining, of which only is used a small fraction in the development of cocoa aroma precursors during the fermentation of the seeds. By the previous thing, has had the iniciative to industrialize the cocoa mucilage in Santander, using new processes through which manage to give an aggregate value to the process of elaboration of the chocolate and an economic benefit to the cocoa cultivator.

To obtain the fermented drink were carried out six main steps: raw material characterization, identification and selection of steps and variables of the process, study of variable behavior in function with time, determination of optimum values for identified variable, obtention of fermentation step and process performance and finally was made the quality control and the obtained drinking analysis.

When we realized this methodology, the product obtained presents organoleptics, microbiological characteristics and chemical composition, necessary to be a high quality drinking with high acceptation levels. Moreover the physic-chemical parameters and the chemical composition were according to the Colombian Technical Norm 708 for Alcoholic Drinking-Wine fruit. Additional, it was obtained a high experimental performance expressed as (grams of wine) / (grams of juice), which represents an advantage for the raw material, what makes feasible the industrialization of the mentioned process.

* Undergraduated thesis

** Faculty of Physic-chemical , School of chemical engineering, Ph.D. Leonardo Acevedo Duarte

INTRODUCCIÓN

Los procesos agrícolas e industriales del cacao generan desechos que en la actualidad tienen poca o ninguna utilización, siendo aprovechado y comercializado solo el 10% del peso total de la producción. Entre estos desechos se encuentra el mucílago o pulpa, del cual solo es utilizada una pequeña fracción en el desarrollo de los precursores del aroma del cacao durante la fermentación de la semilla.

Por lo anterior, actualmente en Colombia se adelantan investigaciones con el fin de darle un valor agregado al proceso de elaboración del chocolate y un beneficio económico al cultivador, aprovechando las propiedades del exceso de mucílago. Este exceso ya ha sido utilizado en diferentes países como Brasil, Malasia, Cuba, Ghana y Costa Rica, para producir mermelada, alcohol, vinagre, nata y pulpa procesada, entre otros.

En respuesta a la situación planteada, se ha tenido la iniciativa de industrializar el mucílago del cacao en Santander implementando nuevos procesos, entre los cuales se encuentra el desarrollo experimental de una bebida fermentada, objeto principal del presente trabajo de investigación. En el primer capítulo del mismo se encuentran resumidos los conceptos teóricos utilizados, posteriormente se describe la metodología llevada a cabo en el desarrollo del proyecto y finalmente se presentan los resultados obtenidos, así como la discusión de los mismos, las conclusiones y recomendaciones.

Es así como al llevar a cabo las etapas necesarias para la obtención de un vino a las condiciones más favorables encontradas en el desarrollo de la experimentación, se obtuvo una bebida que cumplió con las especificaciones organolépticas, físicas, fisicoquímicas, microbiológicas y de composición química requeridas para ser un producto apto para el consumo y de buena aceptación.

Además se dio origen a la posibilidad de industrializar el proceso desarrollado, con la ventaja de presentar un rendimiento significativamente alto y de utilizar una materia prima generada como residuo en la obtención de otro producto.

CONCEPTOS TEÓRICOS

En el presente capítulo se resumen los conceptos básicos utilizados en el desarrollo experimental para la obtención de una bebida fermentada a partir del mucílago del cacao.

1.1 GENERALIDADES DEL CACAO

El cacao es una fruta de origen tropical con la que principalmente se produce chocolate. Se cultiva en más del 50% de los departamentos del país siendo Santander el principal cultivador y se clasifica en tres grupos: criollo, amazónico y subtipos colombianos, los cuales son un cruce de criollo y amazónico, que dan lugar a cuatro subgrupos de híbridos: angoleta, cundeamor, amelonado y calabacillo.

El árbol de cacao mide de 2 a 3 metros y tiene frutos de color pardo rojizo, amarillo, morado o café de unos 28 cm de longitud, aproximadamente. En la figura 1 se ilustran el árbol y el fruto del cacao.

Figura 1. Árbol y fruto del cacao



En el fruto se distinguen tres partes: cáscara, semilla (caracterizada por su sabor amargo y color púrpura o café) y la pulpa o mucílago, removida durante la

fermentación de las semillas en el proceso de obtención del chocolate. En la tabla 1 se presenta la composición química de la semilla y el mucílago.^{6,17}

Tabla 1. Composición química de la semilla y el mucílago sin fermentar¹⁸

Sustancia	Mucílago (%)	Semilla (%)
Agua	84,5	32,5
Glucosa	11,60 - 15,32	-
Grasa	-	48-50
Proteína	0,6	0,9
Polifenoles	-	5,5
Pentosas	2,7	5,0
Almidón	-	5,0
Celulosa	-	2,5
Sacarosa	0,7	2,5
Theobromina	-	2,5
Sales	0,8	2,5
Ácidos	0,7	1,0

La maduración del cacao toma aproximadamente entre 140 y 205 días post polinización. En mazorcas sobre maduras, la cantidad de pulpa es menor y el contenido de azúcares decrece.¹

1.1.1 Usos del mucílago. Durante la fermentación la pulpa provee el sustrato a los microorganismos que son esenciales para el desarrollo de los precursores del aroma del chocolate, aunque esta es fundamental para este proceso existe más de la necesaria, siendo posible eliminar más del 50% sin afectar la fermentación. Este exceso de pulpa ha sido utilizado en diferentes países como Brasil y Costa Rica, para producir bebidas alcohólicas, mermelada, jalea, alcohol, vinagre, jugo, néctar y pulpa procesada.⁸

1.2 LEVADURAS

Son microorganismos unicelulares compuestas por 65 a 70% de agua y 30 a 35% de materia seca constituida por 35% de carbohidratos, 50% de sustancias proteicas , alrededor del 5% de grasas y del 1 al 10% de cenizas (fósforo y

potasio). Según las vías tomadas, las levaduras pueden ser aerobias estrictas y aero anaerobias facultativas, las cuales se dividen en: levaduras que prefieren un metabolismo fermentativo incluso en presencia de oxígeno consumiendo como máximo un 10% de glucosa por vía oxidativa (*Sacharomyces Cerevisiae*) y levaduras que prefieren un metabolismo respiratorio si hay oxígeno.^{9,13}

En fermentaciones la de mayor importancia es la *Sacharomyces* y en general las de mayor interés desde el punto de vista industrial son las *Saccharomyces* (nombre genérico) ya que presentan las siguientes características:

- Velocidad de fermentación
- Resistencia al alcohol: la actividad no debe verse afectada a concentraciones entre 8% y 9% de alcohol v/v, encontrándose actividad hasta un 12%. *
- Resistencia y rendimiento: deben ser resistentes a la acidez que generalmente presentan los mostos cuando se desean combatir posibles infecciones y a las variaciones de temperatura que se presentan durante la fermentación. Además la relación entre alcohol producido y azúcar fermentable debe ser elevada.¹⁶

1.2.1 Fisiología del crecimiento y acción de las levaduras. La tabla 2 proporciona los elementos que constituyen la biomasa de *Sacharomyces*. Además de estos elementos el medio debe suministrar un entorno adecuado (humedad, temperatura y pH) para favorecer su crecimiento.

Tabla 2. Composición elemental de la biomasa de *Sacharomyces*¹³

Elementos	Cantidad(g/100 g de materia seca)
Potasio	2,2
Fósforo	1,6
Azufre	$300 \cdot 10^{-3}$
Magnesio	$270 \cdot 10^{-3}$
Calcio	$50 \cdot 10^{-3}$

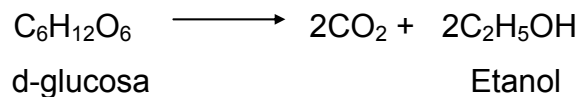
* La tolerancia de las levaduras al alcohol decrece cuando aumenta la temperatura.⁵

Las levaduras contienen dos clases de enzimas: endoenzimas y exoenzimas. Estas últimas son de acción catalítica y únicamente en presencia de ellas se produce la descomposición del azúcar. La enzima capaz de producir la fermentación alcohólica, se denomina zymasa o alcoholasa.⁹

1.3 FERMENTACIÓN

Existen diferentes tipos de fermentación como la alcohólica, acética, acetona-butanol, ácido cítrica y fermentación de la lactosa a ácido láctico, entre otras.

La fermentación alcohólica se define como un proceso biológico, en el cual un azúcar fermentable es transformado en alcohol etílico y CO₂, mediante la acción de bacterias (*Zymomonas lindneri*), o levaduras. Generalmente se usa *Saccharomyces cerevisiae* la cual convierte un 90% del azúcar en cantidades equimolares de alcohol y dióxido de carbono. Teóricamente de 100 gramos de glucosa se obtiene 48,90% de CO₂ y 51,10% de alcohol etílico.^{9,10}



Las levaduras durante su desarrollo en medio azucarado, producen además del etanol y CO₂ compuestos que influyen en las características organolépticas de los productos fermentados. Estos compuestos pueden ser: alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas, compuestos azufrados y ácidos orgánicos.¹³

Las materias primas utilizadas en la fermentación pueden ser amiláceas, celulósicas y materias azucaradas. Estas últimas comprenden cualquier fruta, siendo las de mayor porcentaje de azúcar: cacao (12,5-15,9), piña (11,9-15), cereza (11,6-15), uva (11,5-15) y manzana (10-12). Las desventajas de las frutas radican en el costo relativamente elevado y su naturaleza putrescible.¹⁶

1.3.1 Variables que intervienen en el proceso

- Concentración de azúcar: el máximo contenido de alcohol se obtiene con mostos del 25-35% de azúcar, sin embargo esto depende del tipo de levadura y de la temperatura. Los mostos muy azucarados inhiben el desarrollo de la levadura debido a la elevada concentración de alcohol producido.¹⁶
- pH del mosto: el pH óptimo se encuentra entre 4 y 5, el cual es lo suficientemente bajo para inhibir el desarrollo de muchos tipos de bacterias (para *Saccharomyces cerevisiae* entre 4,2 y 4,8). Si el pH se eleva a la región alcalina, cambia el curso de la fermentación y se produce glicerol y ácido acético, además de alcohol y dióxido de carbono.^{7,11, 3}
- Oxígeno: aunque la producción de etanol no requiere oxígeno, es necesaria una gran cantidad al inicio de la fermentación para la reproducción de las levaduras.
- Temperatura: el rango óptimo de temperatura se encuentra entre los 25-28°C. A temperaturas por encima de los 35°C el alcohol se evapora rápidamente y aumenta el desarrollo bacteriano, ocasionando la muerte de las levaduras.
- Tiempo: la fermentación finaliza generalmente alrededor de 60 horas o menos, dependiendo de los demás factores. Esto ocurre cuando la concentración de azúcar se encuentra alrededor del 2% o cuando la actividad de la levadura ha disminuido en forma visible.^{9, 3}
- Dióxido de carbono: el efecto del CO₂ en la fermentación es a menudo negativo ya que con un contenido aproximado de 15g/l de CO₂ se detiene el crecimiento de la levadura.²

1.4 VINOS

A pesar de que el término vino es riguroso para las bebidas fermentadas a partir de la uva (vid), en Colombia también se utiliza este término para bebidas obtenidas por fermentación de otras frutas.

1.4.1 Etapas en la obtención de vinos

- Preparación del mosto: una vez extraído el jugo de la fruta seleccionada, de ser necesario se le debe ajustar su pH, contenido de azúcar, acidez y nutrientes para que se lleve a cabo una óptima fermentación. Además de esto es importante la adecuada esterilización del mosto la cual puede ser física (acción del calor, frío o por ultrafiltros), o química (anhídrido sulfuroso o metabisulfito de sodio o de potasio). Sin embargo cuando los alimentos se conservan por adición de SO₂ o bisulfitos, estas sustancias se combinan lentamente con los azúcares disminuyendo su acción conservadora.^{12, 4,14}
- Fermentación del mosto: se distinguen tres fases, en la primera ocurre la multiplicación de las levaduras, en la segunda (fermentación tumultuosa) el mosto se agita y enturbia, forma burbujas, y su temperatura aumenta. En la tercera el azúcar se ha transformado en gran parte en alcohol, disminuye la turbulencia, desciende la temperatura, el líquido se aclara, su densidad baja y su sabor inicialmente dulce, pasa a ser el característico del vino.⁷
- Trasiego: consiste en separar el vino claro de los sólidos precipitados. El contacto de estos con el vino es perjudicial por contener microorganismos que aunque inactivos pueden reanudar su actividad y contaminarlo de sabores y olores desagradables con la posible formación de H₂S.
- Clarificación, filtración y centrifugación: la clarificación consiste en adicionar al

vino turbio una sustancia capaz de coagular y flocular las partículas en suspensión y los gérmenes patógenos. Las otras dos etapas se realizan posteriormente con el fin de eliminar los sólidos aún presentes, brindándole al vino limpieza, brillo, transparencia y liberándolo de contaminaciones.¹⁴

- **Pasteurización:** es la exposición del vino a la acción esterilizante del calor. Las oxidasas y los gérmenes patógenos del mismo se destruyen a 75°C durante dos minutos ó a 60°C durante 30 minutos. Se debe elegir la menor temperatura eficaz ya que temperaturas elevadas pueden alterar la composición del vino. Una vez pasteurizado se debe conservar en recipientes esterilizados ya que corre el riesgo de volver a contaminarse.^{14, 5}
- **Maduración:** en esta fase se mejoran las características organolépticas del vino a través de cambios químicos, biológicos, físicos y fisicoquímicos. El vino embotellado seguirá su proceso de añejamiento mientras no se abra.^{7, 14}

1.4.2 Composición química de los vinos. La composición química del vino varía en el curso de su existencia encontrándose en términos generales las siguientes sustancias:

- **Agua:** es el componente en mayor proporción y actúa como disolvente de los demás. Un exceso acuoso en el vino es una dificultad para su conservación.
- **Alcohol etílico:** es el segundo de los componentes cuantitativos del vino oscilando del 8 al 18%. Una concentración alcohólica suficiente impide el desarrollo de gérmenes patógenos en el vino.
- **Esteres:** los más importantes son el acetato de etilo, de isoamilo y de propilo formados por esterificación durante la fermentación y el añejamiento.

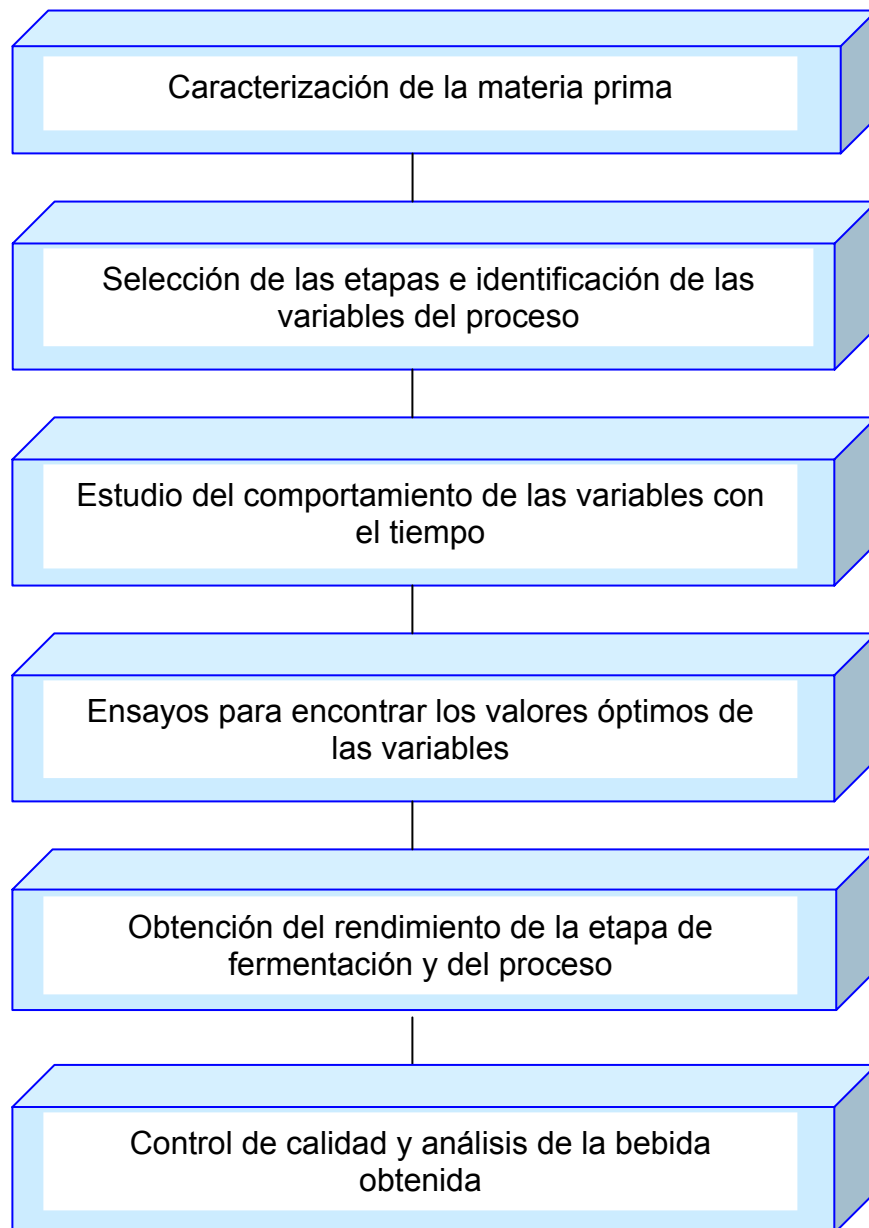
- Alcohol metílico: se origina principalmente por la acción de la enzima pectinmetilesterasa (PME) sobre las pectinas del mosto. Se admiten contenidos hasta de 200 - 300 mg/l en el vino.
- Glicerina: se origina por la descomposición de los azúcares durante la fermentación lenta. Proporciona al vino suavidad encontrándose entre 1-12g/l en función del contenido de etanol.
- Alcoholes superiores: la producción de alcoholes superiores en la fermentación se debe a la desaminación y descarboxilación de determinados aminoácidos. El amílico es el que aparece de manera mas abundante, otros son el enántico, propílico, butílico, isobutanol, 2 metil-1butanol, 3 metil-1-butanol y fenil etanol.
- Ácidos: se hallan en forma de ácidos libres o de sales ácidas y pueden proceder del mosto (cítrico, málico, tartárico y bitartratos), de la fermentación alcohólica y otras sucesivas (láctico, succínico, carbónico, acético α -cetoglutárico, isobutírico e isovalérico). Un pH bajo favorece la estabilización del color, sabor y la conservación del vino.
- Aldehídos y Cetonas: se consideran defectos en las bebidas si la cantidad es elevada. El acetaldehído es cuantitativamente el más importante. Entre las cetonas se encuentran dicetonas, hidroxicetona y 2-3 butanodiona (diacetilo).
- Materias pépticas y minerales: Las materias pépticas son sustancias de carácter mucilaginoso, que se hallan en los vinos en forma de suspensión coloidal. La sobremaduración del fruto incrementa las cantidades presentes en los mostos y después en los vinos, dificultando su natural clarificación. De las materias minerales el potasio es el más abundante. El calcio, sodio, magnesio y hierro se encuentran en dosis variables. El cloro se encuentra en forma de cloruros y el fósforo aparece en forma de fosfato ácido de sodio.^{13, 14}

1.4.3 Defectos y enfermedades en los vinos. En las distintas fases de su elaboración, los vinos están propensos al desarrollo de anomalías que pueden inhabilitarlos para su consumo las cuales pueden originarse por sustancias minerales y enzimas (defectos) o por distintas especies de microorganismos (enfermedades). A continuación se indican las causas y los efectos de dichas anomalías y el tratamiento adecuado para combatirlas.

- Hierro: produce un limo gris en los vinos tintos y un precipitado blanco en los blancos. Se recomienda no utilizar recipientes de hierro o adicionar 0,1% de ácido cítrico. Su tratamiento consiste en la adición de taninos.
- Enzima peroxidasa: ocasiona turbidez parda en los vinos blancos y precipitación del color en los vinos tintos. Puede evitarse con adición de anhídrido sulfuroso o pasteurización a 80°C.
- Candida Mycoderma “flor del vino”: actúa sobre el alcohol y ácidos orgánicos, formando una película en la superficie. Se debe evitar el contacto con oxígeno.
- Acetobacter aceti, Acetobacter oxydans: actúan sobre el alcohol y la glucosa causando avinagramiento y sabor agrídulce. Se debe evitar el contacto con oxígeno. Se trata mediante pasteurización y filtración estéril.
- Levaduras silvestres: atacan el mosto ocasionando bajo contenido de alcohol, aumento de acidez volátil, sabores desagradables y enturbiamiento. Se evita mediante la adición de anhídrido y pasteurización del mosto.
- Bacterias lácticas: actúan sobre la glucosa y fructosa causando acidez volátil, turbidez, liberación de CO₂, sabor desagradable y distorsión del color. Se corrige con pasteurización y con la adición de anhídrido sulfuroso o taninos¹⁴.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En el presente capítulo se expone la metodología experimental llevada a cabo durante el desarrollo del proyecto con el fin de alcanzar los objetivos propuestos. Esta metodología se resume en el diagrama de bloques 1.



2.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Se identificó la variedad y se seleccionó el grado de madurez de las mazorcas que proporcionara las características más adecuadas para el desarrollo del proceso.

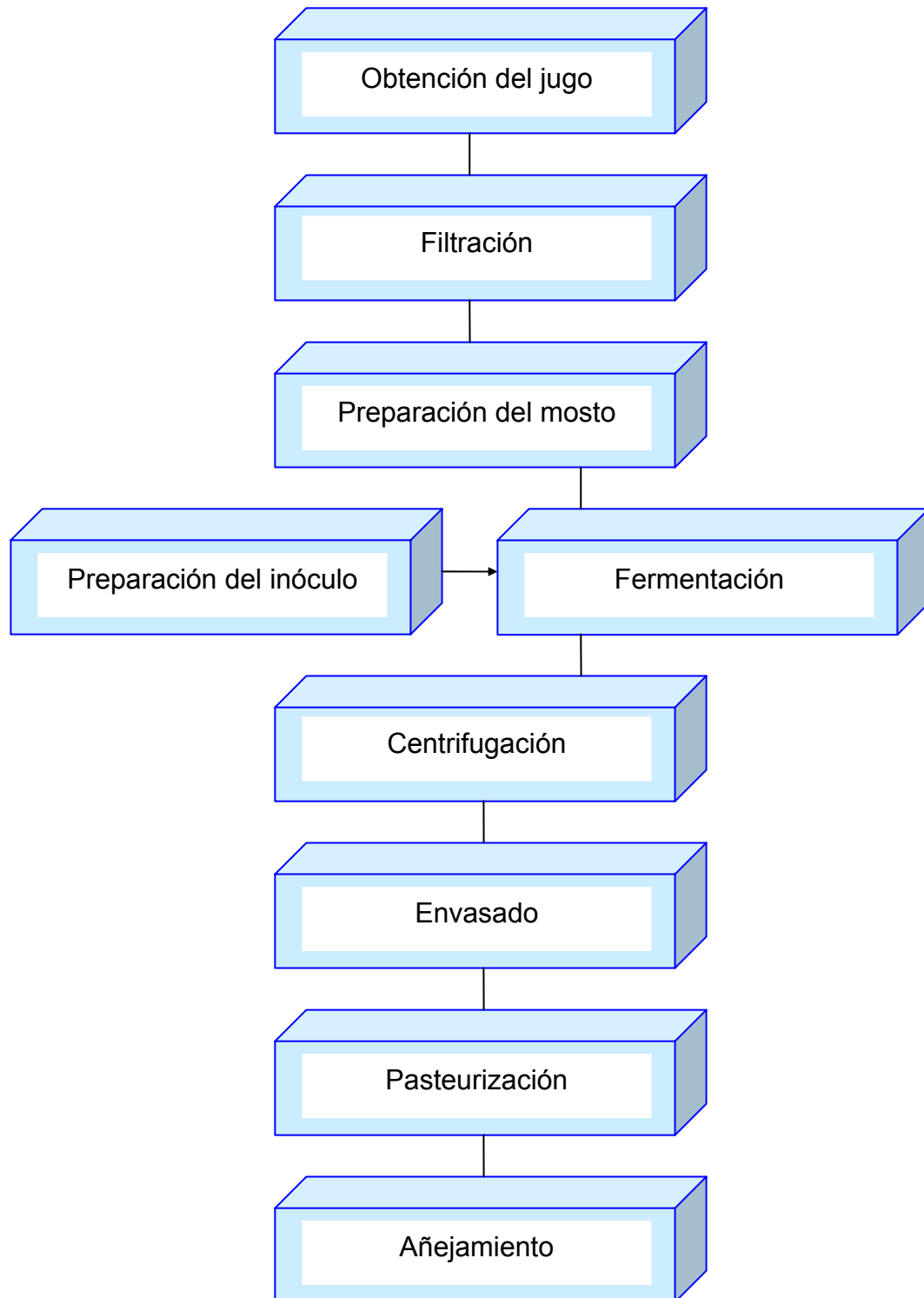
Al jugo extraído a partir del mucílago se le determinaron los grados brix (medida del porcentaje de azúcares), pH, y densidad. Este fue analizado fisicoquímicamente en el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos C.I.C.T.A de la UIS, con el fin de identificar y cuantificar sus principales constituyentes, siendo el contenido de azúcar el más importante por ser el sustrato de las levaduras durante la fermentación. Además se cuantificó proteína, magnesio, potasio y fósforo, con el objetivo de proporcionar a la levadura los nutrientes necesarios para favorecer su crecimiento y acción fermentativa. Estos análisis se realizaron en el Laboratorio Químico de Consultas Industriales (Escuela de Química de la UIS).

2.2 SELECCIÓN DE LAS ETAPAS E IDENTIFICACION DE LAS VARIABLES DEL PROCESO

De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada sobre elaboración de vinos se definieron las etapas necesarias en el proceso, las cuales se presentan en el diagrama de bloques 2.

2.2.1 Obtención del jugo. Después de lavar y abrir las mazorcas, se separaron las semillas rodeadas por el mucílago a partir del cual se extrajo manualmente el jugo presente en el mismo. En esta operación se utilizó un recipiente metálico de acero inoxidable, provisto de una malla con aberturas de 0,1mm de tal forma que el jugo escurriera en el recipiente al aplicar presión a los granos.

Diagrama de bloques 2. Etapas en la obtención del vino de cacao



Esta etapa se realizó lo más rápido posible y siguiendo todas las normas de higiene para evitar la oxidación del jugo y la contaminación por microorganismos, respectivamente. El tiempo de extracción del jugo de 50 mazorcas contando con dos operarios fue aproximadamente una hora.

2.2.2 Filtración. El jugo extraído se filtró con la ayuda de una malla previamente esterilizada, con el fin de retirarle los sólidos suspendidos provenientes de la pulpa, buscando obtener un mosto homogéneo en la siguiente etapa.

2.2.3 Preparación del mosto. Se determinaron los grados brix del jugo y según el ensayo a realizar se ajustó dicho valor con la adición de agua previamente pasteurizada, sacarosa (azúcar refinada) o melaza, obteniendo siempre 400 ml de mosto. Los grados brix se midieron utilizando un refractómetro (marca Fischer Scientific) calibrado y a 20°C.

Una vez ajustados los grados Brix, se midió el pH del jugo obtenido y se llevó a 4,5 (valor recomendado por la literatura) con la adición de bicarbonato de sodio. Para la medición del pH se utilizó un potenciómetro previamente calibrado a la temperatura del lugar de trabajo.

2.2.4 Preparación del inóculo. Se tomaron 200 ml del mosto obtenido y se adicionaron la levadura y los nutrientes necesarios para su crecimiento en las siguientes cantidades: 5 g/l de levadura (*Sacharomyces Cerevisiae*), 0,190 g/l de cloruro de potasio, 1,718g/l de cloruro de amonio, 0,065 g/l de sulfato de magnesio y 0,018g/l de dihidrogenofosfato de potasio¹³. Luego de mezclar los nutrientes, la levadura y el mosto, se llevo a cabo la aireación durante dos horas usando una bomba de acuario, con el fin de iniciar la actividad fermentativa de las levaduras.

2.2.5 Fermentación. Una vez finalizada la inoculación, se mezcló el mosto activo con los 200 ml restantes y se agregó 200 ppm de bisulfito de sodio para esterilizar el mosto. Posteriormente se cargó el reactor en el cual se llevo a cabo la fermentación en condiciones anaerobias hasta que los grados brix se estabilizaran con el tiempo y no se observara un desprendimiento apreciable de CO₂.

El reactor de vidrio utilizado tenía una capacidad de un litro y se encontraba sellado herméticamente para evitar la entrada de aire; además contaba con un termómetro, un tomamuestra, una salida para el CO₂ y un agitador magnético. El reactor estaba ubicado sobre una placa de agitación que proporcionaba 150 rpm garantizando una agitación moderada.

En esta etapa, las variables a manipular fueron la temperatura de reacción, la concentración inicial del sustrato y la concentración de levadura, ya que el pH y la concentración de nutrientes se fijaron en los valores recomendados por la literatura.

2.2.6 Centrifugación. Una vez terminada la fermentación se envasó el contenido del reactor en recipientes de vidrio esterilizados los cuales se refrigeraron durante 24 horas con el fin de favorecer la precipitación de los sólidos suspendidos y obtener un líquido claro. Este líquido posteriormente se centrifugó en una centrífuga de pie (modelo S-25, marca MLW) a 4000 rpm durante 15 minutos para retirar los sólidos de menor tamaño aun presentes.

2.2.7 Envasado. Esta etapa se llevo a cabo en envases de vidrio de 500 ml sometidos previamente a una esterilización física y química. Los envases se sellaron herméticamente para evitar la contaminación de su contenido por el contacto con aire.

2.2.8 Pasteurización. La pasteurización se llevo a cabo sumergiendo los envases en un baño de agua a 60°C durante 30 minutos seguido de un enfriamiento rápido en un recipiente provisto de una mezcla hielo-agua. El enfriamiento se llevo a cabo por 15 minutos, garantizando una disminución de la temperatura por debajo de los 15°C, logrando así un choque térmico lo suficientemente fuerte para destruir los microorganismos presentes.

2.2.9 Añejamiento. En esta etapa se añejó el vino obtenido mediante dos procedimientos. En el primero se almacenó el producto en un refrigerador durante 30 días y al cabo de este tiempo se realizó una evaluación sensorial y microbiológica. En el segundo procedimiento el producto se mantuvo en un ambiente fresco y libre del contacto directo con los rayos del sol durante 30 días, al finalizar este tiempo se realizó el análisis microbiológico.

2.3 ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LAS VARIABLES CON EL TIEMPO

Se llevaron a cabo las etapas de obtención del jugo, filtración, preparación del mosto, preparación del inculo y fermentación, realizando un seguimiento en esta última del comportamiento de la temperatura, grados brix y pH con el tiempo.

La fermentación se efectuó tomando datos cada 12 horas y la temperatura fue registrada en la etapa inicial cada 2 horas para observar que tan exotérmica era la reacción. Las condiciones en las que se inició la reacción fueron: volumen 500 ml, 25,8°C, 15,4 grados brix (correspondientes al jugo extraído), 2,5 g de levadura, pH 4,5 y 0,1g de bisulfito de sodio.

2.4 ENSAYOS PARA ENCONTRAR LOS VALORES ÓPTIMOS DE LAS VARIABLES DENTRO DE LA REGION EXPERIMENTAL

En esta fase del diseño experimental, inicialmente se realizaron pruebas a diferentes temperaturas de reacción, concentración inicial de sustrato y

concentración inicial de microorganismos. Los ensayos se hicieron a distintos valores de dichas variables manteniendo las demás constantes, es decir experimentos de factor único.

Posteriormente se efectuó un diseño factorial 2^k con el fin de obtener los valores óptimos dentro de la región experimental seleccionada a partir de la literatura, ya que este método permite tener en cuenta las interacciones existentes entre los factores. Los valores óptimos de las variables manipuladas fueron aquellos que permitieron obtener el mayor % de etanol.

Con el fin de determinar el contenido de etanol del vino producido en las diferentes pruebas, se tomó una parte una vez terminada la etapa de pasteurización y se realizó una destilación al vacío. El vino restante se sometió a añejamiento.

En la destilación se utilizaron 70 ml y se trabajó a 60°C y 175 mbar de presión de vacío. Una vez finalizada se midieron el volumen, la densidad y la temperatura del destilado obtenido con el fin de determinar el porcentaje de etanol.

2.4.1 Ensayos a diferentes temperaturas de reacción. Los ensayos se realizaron en un intervalo de temperatura entre 26-35°C, llevando a cabo cuatro pruebas cada tres grados centígrados. Para mantener la temperatura constante se utilizó un baño termostataado digital. En la figura 2 se ilustra el montaje descrito.

El pH, volumen, concentración inicial de levadura y nutrientes fueron los mencionados en las etapas de preparación del mosto y del inóculo, respectivamente. Los grados Brix se ajustaron en 15 para los cuatro casos. Al finalizar cada una de las fermentaciones se determinó el contenido de etanol, el cual permitió escoger la temperatura más adecuada para la reacción.

Figura 2. Montaje utilizado para la fermentación



2.4.2 Ensayos a diferentes concentraciones iniciales de sustrato. Inicialmente se comprobó la influencia de los nutrientes durante la fermentación efectuando una prueba con nutrientes y otra sin estos a 18° Brix (utilizando sacarosa) en los dos casos. Posteriormente se realizó una prueba usando sacarosa y otra usando melaza con el fin de elegir el tipo de azúcar más favorable y finalmente se llevaron a cabo seis pruebas a 10, 14, 18, 21,24 y 27 grados brix utilizando el azúcar seleccionado para ajustar los mismos. Las pruebas se realizaron a la mejor temperatura encontrada en el numeral 2.4.1 y a las demás condiciones mencionadas en el mismo.

2.4.3 Ensayos a diferentes concentraciones iniciales de microorganismos. Teniendo en cuenta la cantidad de microorganismos que inhibe la reacción ($80.000.000 \text{ microorganismos/cm}^3$, en un gramo existen alrededor de $10.000.000.000^7$), se llevaron a cabo 5 experimentos con 1,9g/l, 3,8g/l, 5,0g/l, 5,7g/l y 7,6g/l de levadura. La temperatura y la concentración inicial de sustrato fueron las seleccionadas en los ensayos anteriores, el pH y el volumen corresponden a los utilizados en los numerales 2.4.1 y 2.4.2.

Una vez terminadas las pruebas se les determinó el porcentaje de etanol encontrando así el mejor valor de la concentración inicial de microorganismos. De esta forma se obtuvieron los mejores valores para las tres variables manipuladas.

2.4.4 Diseño factorial 2^k . Se realizaron 8 experimentos en la forma indicada en la tabla 3, teniendo como variable de respuesta la concentración de etanol en el producto fermentado. Los niveles de las variables fueron: temperatura de reacción (26 - 35°C), concentración de levadura inicial (1,9 - 5,0 g/l) y concentración de sustrato inicial (10 - 18 °Brix).

Tabla 3. Matriz del diseño factorial

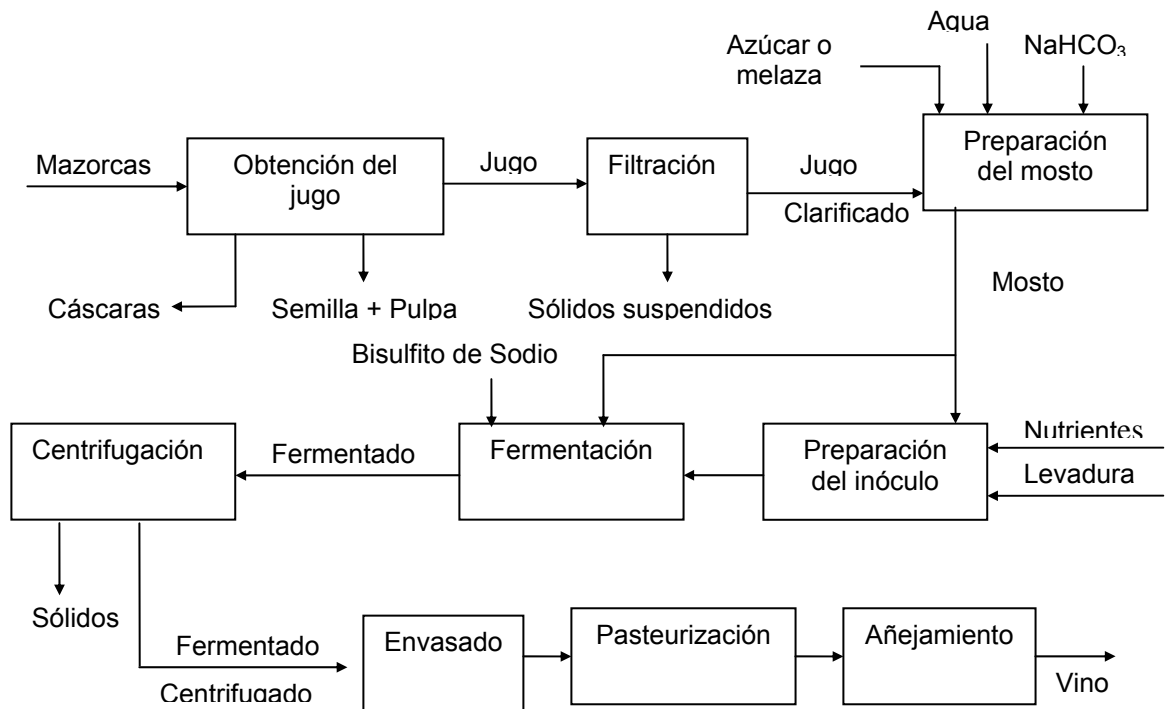
Experimentos	Niveles de las variables		
	A	B	C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

En donde A corresponde a la temperatura, B a la concentración de levadura inicial, C a la concentración de sustrato inicial, (-) al nivel inferior y (+) al nivel superior de cada una de las variables.

2.5 OBTENCIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ETAPA DE FERMENTACIÓN Y DEL PROCESO

Buscando obtener el rendimiento experimental del proceso expresado como g vino/g mazorcas y el de la fermentación como g etanol/g glucosa, se realizaron mediciones de las corrientes en cada etapa con el fin de realizar los balances de masa correspondientes. En el diagrama 3 se puede observar el esquema del proceso con las corrientes de cada etapa.

Diagrama 3. Esquema del proceso para la obtención de vino a partir de cacao.



2.6 CONTROL DE CALIDAD Y ANÁLISIS DE LA BEBIDA OBTENIDA

Con el propósito de garantizar la calidad del vino se identificaron los puntos críticos del proceso aplicando las acciones preventivas-correctivas necesarias y por último se realizaron análisis de tipo organoléptico, químico, fisicoquímico y microbiológico al producto obtenido con las mejores condiciones.

2.6.1 Análisis Fisicoquímico. Al vino se le determinaron los parámetros fisicoquímicos más influyentes en la calidad del mismo: pH, densidad, acidez volátil y grados Brix.

2.6.2 Análisis microbiológico. Se efectuó un análisis microbiológico a las dos muestras obtenidas en los diferentes métodos de añejamiento buscando conocer

la calidad microbiológica del vino. Tanto este análisis como el anterior se llevaron a cabo en el laboratorio Bacteriológico de Alimentos Dra. Yadira Campillo Orozco.

2.6.3 Análisis organoléptico. Para determinar el grado de aceptación del vino obtenido se realizó una encuesta a 50 personas en la cual se evaluaron las siguientes características: sabor, color, aroma, y apariencia. El formato de la encuesta realizada se encuentra en el anexo A.

2.6.4 Análisis de composición química. Con el fin de determinar la composición química de la bebida fermentada se realizó un análisis mediante cromatografía de gases de alta resolución con detector selectivo de masas en el laboratorio de Cromatografía de la UIS.

Para efectuar éste análisis se destilaron 70 ml del vino obtenido usando un baño de aceite, hasta lograr separar los azúcares presentes para evitar la formación de emulsiones durante la extracción líquido – líquido a realizarse. Posteriormente se tomaron 30 ml del destilado y se realizaron tres extracciones líquido-líquido consecutivas utilizando 5 ml de diclorometano como solvente en cada una de ellas, buscando separar los compuestos orgánicos del agua presente en la muestra, ya que la columna del cromatógrafo no admite sustancias acuosas. Los extractos recogidos se concentraron hasta obtener 1ml realizando una evaporación suave del solvente (utilizando nitrógeno). Finalmente se inyectó 1µl al equipo y se procedió al análisis.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

A lo largo de este capítulo se presentan los resultados de la caracterización de la materia prima y de las diferentes pruebas que permitieron escoger los valores óptimos de las variables más influyentes. Además se reporta el rendimiento experimental obtenido tanto de la etapa de fermentación como del proceso, así como el resultado de los análisis fisicoquímico, microbiológico, organoléptico y de composición química y el control de calidad necesario para obtener una bebida que cumpla con las normas correspondientes y que tenga un alto nivel de aceptación entre los consumidores.

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

La materia prima que se utilizó fue traída del municipio de Rionegro (Santander) procedente de la finca “Villa del Socorro”. Pertenece a la variedad híbrida del subtipo angoleta, cundeamor y amelonado, presentaba un color amarillo-rojizo y un grado de madurez medio. Las mazorcas se seleccionaron con este grado de madurez ya que su contenido de mucílago y de azúcar era superior, favoreciendo así el proceso de fermentación. Además de los anteriores criterios se tuvo en cuenta su estado sanitario ya que el empleo de frutas en descomposición conduce a productos no aptos para el consumo

El jugo extraído presentaba un pH de 3,47, una densidad de 1,037g/cm³ y 14 grados Brix. En el anexo B se presentan los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados al jugo, en los cuales se observa un alto contenido de glucosa lo que favorece la fermentación.

3.2 ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LAS VARIABLES CON EL TIEMPO

En la tabla 4 se muestra el cambio con el tiempo de las variables influyentes en la fermentación. En los datos obtenidos se observa que el tiempo necesario para la fermentación es aproximadamente de 48 horas, ya que al cabo de este se estabilizan los grados brix, lo que indica que la reacción se ha detenido casi completamente. Además se observa que la reacción es inicialmente exotérmica presentándose una disminución en la temperatura con el paso del tiempo, debido a que la actividad de las levaduras decrece con la formación de etanol. El pH disminuye como era de esperarse por la transformación del azúcar en etanol.

Tabla 4. Comportamiento de las variables con el tiempo durante la fermentación

Horas transcurridas	Temperatura (°C)	Grados Brix	pH
0	25,8	15,4	4,5
2	28,6	-	-
4	30,4	-	-
6	31,5	-	-
12	31,5	11	4,23
24	28,7	7	4,1
36	29,4	6	4,03
44	28,2	6	3,85
48	29,3	5	3,54
52	29,1	5	3,52
56	29	5	3,51

3.3 ENSAYOS PARA ENCONTRAR LOS VALORES ÓPTIMOS DE LAS VARIABLES

3.3.1 Experimentos de factor único

- Ensayos a diferentes temperaturas de reacción

De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 5, se escogió como temperatura de reacción 26°C, a la cual se efectuaron los ensayos posteriores.

Tabla 5. Selección de la mejor temperatura de reacción.

Temperatura de reacción	% Etanol	% Etanol (replica)	Promedio
26	7,100	6,517	6,809
29	6,410	6,322	6,366
32	5,800	5,356	5,578
35	5,649	5,265	5,457

- Ensayos a diferentes concentraciones iniciales de sustrato

Tabla No. 6 Determinación de la influencia de los nutrientes.

Pruebas con sacarosa (18°Brix)			
	% Etanol	% Etanol (Réplica)	Promedio
Con nutrientes	6,073	5,947	6,010
Sin nutrientes	6,092	5,978	6,035

Como se observa en la tabla 6, la influencia de los nutrientes es despreciable, por lo que se decidió no utilizarlos durante la inoculación. Esto se debe a que el jugo obtenido del mucílago fresco cuenta con las cantidades necesarias de nutrientes para el crecimiento y acción de las levaduras como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Nutrientes presentes en el jugo y requeridos por las levaduras.*

Nutriente	Cantidad requerida por la levadura(g)	Cantidad presente en el jugo(g)
Potasio	0,044	0,271
Fósforo	0,032	0,024
Magnesio	0,005	0,023
Nitrógeno	0,180	0,634

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos utilizando dos tipos de azúcar a una concentración inicial de 18°Brix.

Tabla 8. Selección del tipo de azúcar más conveniente.

Azúcar	% Etanol	% Etanol (replica)	Promedio
Sacarosa	6,092	5,978	6,035
Melaza	8,950	9,277	9,114

* Los valores reportados en la tabla fueron calculados para 2g de levadura y 400 ml de jugo

Al analizar estos datos se observa que la melaza es el tipo de azúcar más favorable para ajustar los grados Brix del mosto ya que permite obtener un mayor porcentaje de etanol, por lo cual se realizaron pruebas a diferentes concentraciones obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Selección de la mejor concentración inicial de azúcar en el mosto.

Concentración (°brix)	% Etanol	% Etanol (replica)	Promedio
10	4,026	4, 259	4,142
14	5,017	5,285	5,151
18	8,950	9,277	9,114
21	8,282	8,328	8,305
24	8,254	8,301	8,278
27	8,302	8,142	8,222

Según estos resultados, se escogió como mejor concentración inicial de azúcar la correspondiente a 18° Brix. Además se observa que a concentraciones superiores el porcentaje de etanol producido no varía significativamente y es menor al obtenido a 18°Brix. Esto puede deberse a la inhibición de las levaduras por el etanol producido ya que en los mostos mas azucarados el etanol se produce a una mayor velocidad inactivando las levaduras.

- Ensayos a diferentes concentraciones iniciales de microorganismos

Tabla 10. Selección de la concentración inicial de microorganismos

CONCENTRACION MICROORGANISMOS (g/l)	% ETANOL	% ETANOL (Replica)	PROMEDIO
1,9	6,639	6,478	6,558
3,8	6,829	6,712	6,771
5,0	8,950	9,277	9,114
5,7	6,123	6,289	6,206
7,6	6,080	5,987	6,034

Como se observa, la mejor concentración inicial de levadura corresponde a 5g/l. A concentraciones menores la dilución retarda el tiempo de fermentación y a concentraciones superiores se presenta inhibición.

3.3.2 Diseño factorial 2^k. En la tabla 11 se muestran los resultados del diseño factorial 2³ en donde los factores y sus niveles son:

A: Temperatura (26 -35°C)

B: Concentración de levadura inicial (1,9 - 5 g/l)

C: Concentración de sustrato inicial (10 -18° Brix)

Tabla 11. Resultados del diseño factorial 2³

Exp.	Nivel variables			% Etanol	%Etanol (réplica)	Promedio
	A	B	C			
1	-	-	-	3,947	3,583	3,765
2	+	-	-	4,402	4,704	4,553
3	-	+	-	4,026	4,259	4,142
4	+	+	-	6,270	5,861	6,065
5	-	-	+	6,143	6,536	6,340
6	+	-	+	4,018	4,260	4,139
7	-	+	+	8,950	9,277	9,114
8	+	+	+	6,816	7,159	6,987

De acuerdo a lo anterior, las mejores condiciones para llevar a cabo la fermentación son 26° C, 5g/l de levadura y una concentración inicial de azúcar de 18° Brix y según el análisis de varianza realizado se encontró que los efectos más significativos (en su respectivo orden) son: concentración de sustrato inicial (x₃), concentración de levadura inicial (x₂), temperatura (x₁), interacción concentración de sustrato inicial-temperatura e interacción concentración de levadura inicial - concentración de sustrato inicial, luego el efecto concentración de levadura inicial - temperatura y el efecto triple de la interacción de las variables son despreciables.

Los datos se ajustaron al siguiente modelo obtenido por regresión lineal múltiple:

$$y = 5,6381 - 0,2021x_1 + 0,9389x_2 + 1,0069x_3 - 0,8799x_1x_3 + 0,4666x_2x_3^*$$

* Las variables se encuentran normalizadas

Con $R^2 = 0,9863$ lo cual indica que el modelo explica bien la variabilidad presente en los datos dentro de la región experimental. En el anexo C se encuentra el análisis de varianza y el tratamiento matemático realizado para determinar la importancia de los efectos y el modelo al cual se ajustaron los datos obtenidos.

3.4 OBTENCIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA ETAPA DE FERMENTACIÓN Y DEL PROCESO

Con el fin de realizar los balances de masa se midieron los parámetros reportados en la tabla 12.

Tabla 12. Parámetros de las corrientes a lo largo del proceso

Corriente	Densidad (g/cm³)	Volumen(cm³)
Jugo	1,080	409
Jugo clarificado	1,037	380
Mosto	1,060	400
Fermentado	1,071	398
Fermentado centrifugado	0,990	372
Vino	1,0172	362

El balance de masa en cada etapa se muestra en la tabla 13. Las mediciones de las corrientes se efectuaron durante la prueba realizada a las mejores condiciones encontradas dentro del intervalo de experimentación.

Los 400 ml de mosto utilizados en la fermentación contienen 74,760g de azúcar de los cuales teóricamente deberían obtenerse 34,382g de etanol, sin embargo experimentalmente se obtuvieron 25,901g de etanol. Esta diferencia pudo ser ocasionada por la presencia de otros azúcares (diferentes a glucosa en el mosto), los cuales son más difíciles de convertir en etanol. Luego el rendimiento de la etapa de fermentación expresado como g Etanol/g Azúcar es 34,6458% y el rendimiento del proceso expresado como g vino/g jugo es 83,374%

Tabla 13. Balance de masa del proceso

Etapa	Corriente de entrada	Corriente de salida
Obtención del jugo	Mazorcas: 20 mazorcas 16056g	Cáscaras: 12644,1g
		Semilla y pulpa: 2970,18g
		Jugo: 441,72 g
Filtración	Jugo: 441,72 g	Sólidos suspendidos: 48,12 g
		Jugo clarificado: 394,06 g
Preparación del mosto	Jugo clarificado: 394,06 g	Mosto 1: 212 g Mosto 2: 212 g
	Melaza: 29,172 g	
	NaHCO ₃ : 0,768 g	
Preparación del inóculo	Mosto 1: 212 g	Inóculo: 214 g
	Levadura: 2 g	
Fermentación	Inóculo: 214 g	Fermentado: 426,08 g
	Mosto 2: 212 g	
	Bisulfito de sodio: 0,08 g	
Centrifugación	Fermentado: 426,08 g	Sólidos: 57,8 g
		Fermentado centrifugado: 368,28 g
Envasado, pasteurizado y añejamiento	Fermentado centrifugado: 368,28 g	Vino: 368,28g

3.5 CONTROL DE CALIDAD DEL VINO Y ANALISIS DE LA BEBIDA OBTENIDA

En la tabla 14 se identifican los puntos críticos a controlar en las diferentes etapas del proceso, los peligros de contaminación y las posibles acciones preventivas y correctivas en cada una de ellas.

Tabla 14. Puntos críticos a controlar en el proceso

Puntos críticos de control (pcc)	Peligros	Acciones preventivas y/o correctivas
Selección de la materia prima	Deterioro por microorganismos de la materia prima	Rechazar la materia prima que no presente un estado fitosanitario adecuado
Transporte de la materia prima	Variaciones en el sabor y cambios en la composición de ácidos y azúcares en el mucílago	Transportar la materia prima inmediatamente después del corte de la misma
Higiene de los operarios, equipos y materiales a utilizar	Contaminación por microorganismos	El operario debe cumplir con las normas de higiene básicas en la preparación

		de alimentos y bebidas. El sitio de trabajo, materiales y equipos deben ser esterilizados.
Lavado de la materia prima	Contaminación del mucílago por microorganismos o suciedad presentes en la cáscara de la fruta	Realizar un lavado adecuado de la materia prima
Despulpado	Oxidación de la pulpa por contacto con el aire	Exponer la pulpa el menor tiempo posible al contacto con el medio.
Preparación del mosto	Contaminación por microorganismos presentes en el ambiente	Esterilización del mosto física y/o química
Fermentación	Cambio del curso de la fermentación por contacto con aire, inactivación de las levaduras por aumento excesivo de la temperatura y/o exceso de CO ₂ , y homogenización insuficiente de la mezcla reaccionante.	Asegurar la hermeticidad del reactor, controlar la temperatura y adecuar al reactor una salida para el CO ₂ , y proporcionar una agitación moderada y constante.
Centrifugación	Contacto del vino con microorganismos que aunque inactivos pueden reanudar su actividad y contaminarlo de sabores y olores desagradables con la posible formación de H ₂ S.	Adecuada relación tiempo-rpm que permita eliminar los microorganismos y sólidos aun presentes.
Pasteurización	Desarrollo de alguna actividad microbiana posterior.	Elección de una relación temperatura-tiempo eficaz en la cual no se afecten las propiedades del vino.
Envasado	Oxidación de los componentes del vino y contaminación por microorganismos	Envasado en condiciones herméticas y asépticas.
Añejamiento	Ambiente no apto para favorecer las reacciones que mejoran las cualidades del producto.	Control del oxígeno, temperatura y humedad del ambiente.

3.5.1 Análisis Físicoquímico. El producto final presentó 6°Brix, además en el anexo D se muestran los resultados del análisis físicoquímico efectuado en el cual se observa que el vino cumple satisfactoriamente con la norma ICONTEC 708 para pH y acidez volátil.

3.5.2 Análisis organoléptico. La encuesta realizada permitió evaluar las siguientes características del vino:

- Sabor: como se observa en la figura 3 el vino presentó un sabor agradable, además la mayor parte de los encuestados lo caracterizaron como un vino seco y amargo y no fue asociado al sabor de alguna fruta en particular.

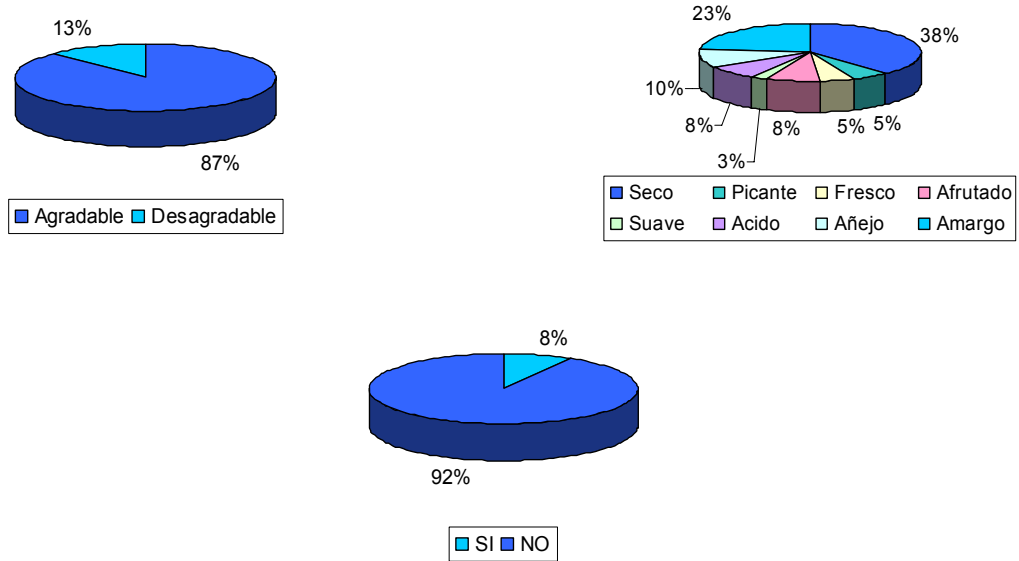


Figura 3. Evaluación del sabor del vino

- Aroma: el aroma del vino fue descrito como agradable y suave como se muestra en la figura 4.



Figura4. Evaluación del aroma del vino

- Color: La figura 5 señala que el color característico del vino es terracota. Es importante aclarar que aunque el color del mucílago es blanco perlado, el vino tomó la coloración mencionada debido a la melaza utilizada en el proceso de obtención del mosto.

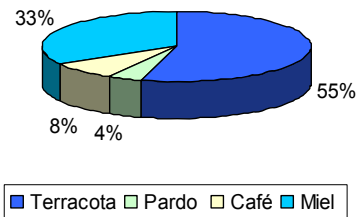


Figura 5. Evaluación del color del vino

- Apariencia: como se ilustra en la figura 6, el vino es un producto de apariencia agradable, ya que presenta una buena consistencia y no se observan en el partículas extrañas.

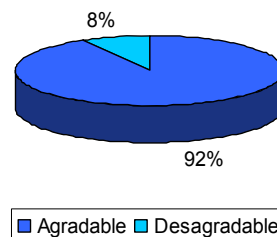


Figura 6. Evaluación de la apariencia del vino

Según los resultados de la encuesta realizada y de acuerdo a la clasificación de los vinos según la Norma Técnica Colombiana 293 puede decirse que el producto obtenido es un vino tinto, seco, no espumoso y no fortificado por tener un contenido de etanol entre el 8 -18%.

3.5.3 Análisis Microbiológico. Como se observa en el anexo D, las dos muestras analizadas cumplen con las especificaciones microbiológicas según las Autoridades Sanitarias para “Bebidas Alcohólicas (Cocteles)”. La aparición de algunos mohos y levaduras en la muestra no refrigerada pudo ocasionarse por deficiencias en la etapa de separación de los sólidos presentes en los cuales se encuentran los microorganismos que deterioran la calidad microbiológica del vino, viéndose favorecida la multiplicación de estos por la temperatura a la cual se añejo la muestra.

3.5.4 Análisis de composición química. En el anexo F se presenta la composición química del extracto obtenido del vino al separar el agua presente mediante la extracción líquido-líquido realizada. Es importante destacar que todos los compuestos identificados en el análisis (etanol, alcoholes superiores, y esterés) corresponden a algunos de los compuestos que teóricamente podrían estar presentes en un vino. Sin embargo existen otros compuestos no observados en los resultados que favorecen las características organolépticas del vino, los cuales podrían desarrollarse con el paso del tiempo. Además no se encontraron sustancias indeseables tales como, metanol, aldehídos y cetonas, lo que indica que el producto final presenta una composición química dentro de los parámetros establecidos en la norma ICONTEC 708.

4. CONCLUSIONES

- Se desarrolló experimentalmente un proceso aprovechando un desecho generado en la industria del cacao, mediante el cual se logra dar un valor agregado al mismo y ofrecer una nueva alternativa que represente un beneficio económico para el cultivador.
- Con el presente trabajo de investigación se obtuvo un vino a partir del mucílago del cacao, el cual presentó las características organolépticas, microbiológicas y de composición química necesarias para obtener un alto nivel de aceptación y ser un producto apto para el consumo. Además los parámetros fisicoquímicos y la composición química del mismo se encontraron dentro de las especificaciones requeridas por la Norma Técnica Colombiana 708 para Bebidas Alcohólicas-Vinos de frutas.
- En la etapa de preparación del mosto, se utilizó melaza como el tipo de azúcar más conveniente para aumentar los grados brix del mismo y no sacarosa, ya que esta última es un disacárido lo cual dificultaba la acción fermentativa de las levaduras por requerir un desdoblamiento inicial de sus moléculas. Además se prescindió del uso de los nutrientes ya que el jugo obtenido a partir del mucílago proporcionaba los elementos necesarios para el crecimiento y acción de las levaduras.
- Al llevar a cabo la metodología propuesta en este proyecto se obtuvo un rendimiento experimental expresado como g vino/g jugo significativamente alto, lo cual representa un aprovechamiento de gran parte de la materia prima, contribuyendo así a la posibilidad de industrializar el proceso.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio técnico-económico que evalúe la factibilidad de llevar a cabo el proceso industrialmente, teniendo en cuenta que la principal materia prima corresponde a un desecho generado en la actualidad en la obtención del chocolate.
- Incorporar al proceso desarrollado en esta investigación, el uso de una máquina desmucilagadora en la etapa de obtención del jugo, buscando disminuir las posibles fuentes de contaminación del producto final y aumentar el rendimiento del proceso.
- Implementar un sistema en las fincas cultivadoras de cacao, a través del cual sea posible recoger en condiciones asépticas el mucílago que se pierde en la etapa de fermentación de los granos.

BIBLIOGRAFIA

1. ACUÑA AFANADOR, Carolina y PEREZ MARTINEZ, Leyla Patricia. Disminución del tiempo de fermentación de Theobroma cacao por bioestimulación con microbiota nativa. Bucaramanga, 2000. Trabajo de maestría (Microbiología Industrial). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología.
2. AMERINE, M.A.; BERG, H. W. and CRUESS, W.V. Technology of wine making. 2 Ed. Westport, Connecticut : The AVI publishing, 1967.
3. BONETT MANOSALVA, Aidaly y BADILLO BONILLA, Carlos Eduardo. Obtención de alcohol etílico a partir de la yuca. Bucaramanga, 1979. Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química.
4. BRAVERMAN, J.B.S. and KOPELMAN, J. The mechanism of the interaction of SO₂ with certain sugars, J. Sci. Food Agr., 4 (1953) 540
5. CATE, Samuel and GORDON, Cecil. Industrial microbiology. 3 Ed. New York : McGrawHill, 1959.
6. Disponible en Internet: <http://www.venezuelatuya.com/cocina/cacao.htm>
7. DUARTE SAAVEDRA, Janeth Josefa y ORTIZ GELVEZ, Alix Teresa. Estudio técnico-económico para la producción de vino de piña. Bucaramanga, 1987. Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química.
8. FEDERACION NACIONAL DE CACAOTEROS. Cultivo de cacao. Bogotá : FEDECACAO, 1988.
9. GARASSINI, Luis A. Microbiología tecnológica. 1 Ed. Caracas : Ediciones de la biblioteca, 1964.
10. GARCIA, Ignacio Rodrigo. Bacteriología. 4 Ed. Barcelona : Gustavo Gil
11. GOLDBLITH S. A. Introducción a la bioquímica de los alimentos. 1 Ed. Barcelona : Omega, 1967.

12. HAEHN, Hugo. Bioquímica de las fermentaciones industriales. Madrid : Aguilar, 1956.
13. LEVEAU, J.Y. Y BOUYX, M. Microbiología industrial : Los microorganismos de interés industrial. Zaragoza : Acribia, 2000.
14. MERCADO DITTA, Juan A. Bebidas Fermentadas. Bogotá : Unisur, 1995.
15. MONTGOMERY, Douglas C. Design and Analysis of experiments. 5 Ed. Arizona : John Wiley & Sons, 2001.
16. PALACIO LLAMES, Hernan. Fabricación del alcohol. Barcelona : Salvat, 1956.
17. RAMIREZ NIÑO, Miguel Angel y GUTIERREZ PORTILLA Julio Cesar. Caracterización y cuantificación de las principales proteínas presentes en los granos de cacao (*Theobroma cacao* L.). Bucaramanga, 2000. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
18. URBANSK, J.J. Chocolate flavor : Origins and descriptions the effects of process and bean source. s.i. : s.n., 1992. p. 69-80.

ANEXO A

Encuesta grado de aceptación del vino

1. El sabor del vino es:

- | | | | | |
|--------------|----------|------------|-----------|-------------|
| a. Agradable | b. Seco | c. Picante | d. Fresco | e. Afrutado |
| f. Suave | g. Ácido | h. Amargo | i. Dulce | j. Añejo |

Otro(s) _____

2. El sabor del vino es característico a alguna fruta que usted conoce?

No _____ Si _____ Cual? _____

3. El aroma del vino es:

- a. Agradable
- b. Desagradable
- c. Intenso
- d. Suave
- e. Etfílico

4. El color del vino es:


- a. Terracota
- b. Pardo
- c. Café
- d. Amarillo ocre
- e. Miel

5. La apariencia del vino es:

- a. Agradable
- b. Desagradable

ANEXO B

Análisis fisicoquímico del jugo obtenido del mucílago

	CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS -CICTA-	REPORTE DE RESULTADOS DE ENSAYO	F-5.10-01	
			Fecha: 30-07-2004	Versión: 1
			Autorizó: Aidé Perea	Página 1 de 1

INFORME DE RESULTADOS

FECHA: Mayo 27 de 2005

DATOS DEL CLIENTE

NOMBRE/EMPRESA: Leonardo Acevedo – Proyecto Cacao

DIRECCIÓN: Universidad Industrial de Santander

TELEFONO: 6340000

DATOS GENERALES

PRODUCTO: Mucílago de cacao

DESCRIPCION: Mucílago de cacao

CÓDIGO: M060

FECHA DE RECEPCIÓN: Mayo 19 de 2005


MUESTREO: Muestra traída al laboratorio

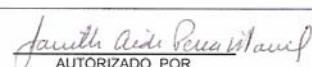
ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO MUESTRA	MÉTODO DE ANÁLISIS
Humedad	%	84,55	Gravimétrico
Ceniza	%	0,31	Gravimétrico
Proteína	%	0,48	Kjeldalk
Grasa	%	0,04	Gravimétrico
Fibra	%	0,09	Gravimétrico
E.N.N.	%	14,53	-
Valor calórico	Kcal/100gr	60,32	-
Acidez	% Ácido cítrico	0,95	Volumétrico

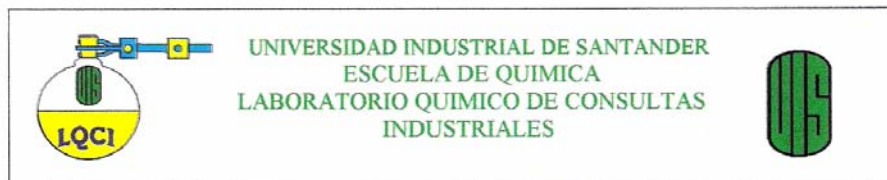
E.N.N. Extracto no nitrogenado

OBSERVACIONES:


 REALIZADO POR


 AUTORIZADO POR

NOTA: ESTE INFORME DE RESULTADOS CORRESPONDE ÚNICAMENTE A LAS MUESTRAS ANALIZADAS, NO PUEDEN SER NI PARCIAL NI TOTALMENTE REPRODUCIDOS SIN LA APROBACIÓN DEL LABORATORIO.



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
 ESCUELA DE QUIMICA
 LABORATORIO QUIMICO DE CONSULTAS
 INDUSTRIALES

REPORTE DE RESULTADOS

FECHA: Diciembre 19 de 2005 SOLICITUD No 194
 NOMBRE DEL SOLICITANTE: Leonardo Acevedo
 No DE MUESTRAS: 1
 MUESTRAS TOMADAS POR: El Solicitante
 FECHA DE LLEGADA AL LABORATORIO: Diciembre 5 de 2005

RESULTADOS ANALISIS FISICOQUIMICO

Muestra Identificada como:

Jugo de Mucllago de Cacao

PARAMETRO	RESULTADOS	METODO
Proteína (%)	0.26	Titrimétrico - Kjeldahl
Magnesio (mg Mg/L)	56.8	Absorción Atómica
Potasio (mg K/L)	678.8	Absorción Atómica
Fósforo (mg P/L)	59.5	Espectrofotométrico



Luz Yleana Vargas Fiallo
 Directora Laboratorio Químico
 de Consultas Industriales
 Matrícula Profesional PQ.1144

NOTA: En caso de ser copia del resultado original se realizará la siguiente aclaración. COPIA DE RESULTADO ORIGINAL.

Ciudad Universitaria - Edificio Camilo Torres / Laboratorio 222
 Apartado Aereo 0678 - Conmutador : 6344000 Ext. 2465. Directo : 6349009
 Telefax : 6349009
 E-mail : Labquimco@yahoo.es
 Bucaramanga - Colombia

ANEXO C

Análisis de varianza y tratamiento matemático para obtener un modelo que represente los datos obtenidos en el diseño factorial

Con el fin de determinar los efectos de mayor importancia se realizó un análisis de varianza, en el cual se planteó la siguiente hipótesis para cada efecto:

Hipótesis nula: Efecto = 0

Hipótesis alternativa: Efecto \neq 0

Tabla 15. Contrastes y efectos en el diseño factorial 2^3

	CONTRASTES	EFFECTOS
A	-3,231	-0,403
B	15,025	1,878
C	16,107	2,013
AB	2,419	0,302
AC	-14,075	-1,759
BC	7,465	0,933
ABC	-2,121	-0,265

Tabla 16. Análisis de varianza

	SC	GL	CM	F_o	Criterio rechazo
Efecto A	0,65246006	1	0,6524600625	11,82446693	$F > F_o^A$
Efecto B	14,10941406	1	14,10941406	255,7034669	$F > F_o^B$
Efecto C	16,21471556	1	16,21471556	293,8576306	$F > F_o^C$
Efecto AB	0,36572256	1	0,36572256	6,627952525	$F > F_o^{AB}$
Efecto AC	12,38160156	1	12,38160156	224,3904978	$F > F_o^{AC}$
Efecto BC	3,482889063	1	3,482889063	63,12004203	$F > F_o^{BC}$
Efecto ABC	0,2811650625	1	0,2811650625	5,095525652	$F > F_o^{ABC}$
Error	0,4414305125	8	0,05517881406		
Total	47,92939844	15	3,195293229		

Para un nivel de confianza del 97,5% se lee de la tabla de puntos porcentuales de la distribución F, un valor de F igual a 7,57. Al aplicar el criterio de rechazo se rechaza la hipótesis nula para los efectos A, B, C, AC, y BC lo que indica que estos son altamente significativos.

Una vez encontrados los efectos de mayor importancia se plantea el siguiente modelo de regresión lineal múltiple:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 + \beta_5 x_5$$

En donde:

$$x_4 = x_1 x_3 \quad x_5 = x_2 x_3$$

Expresando el modelo en forma matricial $y = x\beta + \varepsilon$, se tiene:

$$\begin{pmatrix} 3,765 \\ 4,553 \\ 4,142 \\ 6,065 \\ 6,34 \\ 4,139 \\ 9,114 \\ 6,987 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & 1 \\ 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & 1 & -1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & 1 & -1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \beta_2 \\ \beta_3 \\ \beta_4 \\ \beta_5 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \varepsilon_3 \\ \varepsilon_4 \\ \varepsilon_5 \\ \varepsilon_6 \end{pmatrix}$$

A partir de lo anterior se obtiene $\hat{\beta} = (x'x)^{-1} x'y$

Después de obtener el modelo se calculó el coeficiente de determinación de la siguiente forma:

$$R^2 = 1 - \frac{SC_E}{S_{yy}}$$

Donde:

$$SC_E = y'y - \hat{\beta}'x'y = 0,32340897$$

$$S_{yy} = y'y - \frac{(\sum_{i=1}^n y_i)^2}{n} = 23,74788087$$

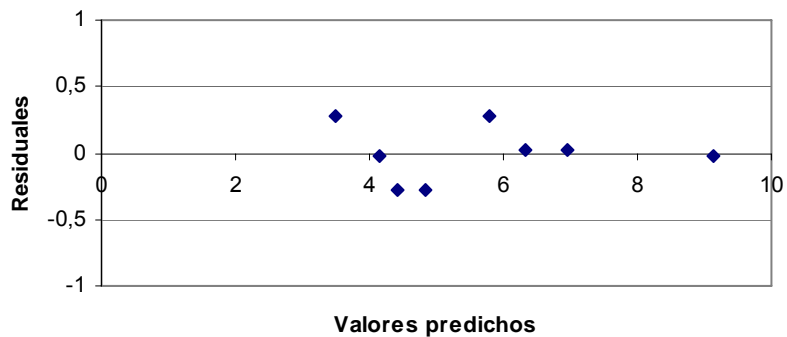
Esto corresponde a la suma de cuadrados del error y a la suma de cuadrados totales respectivamente. Con el fin de verificar la calidad de ajuste del modelo encontrado se calcularon los residuales que se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Valores predichos, observados y residuales

\hat{y}_i	y_i	$e_i = y_i - \hat{y}_i$
3,481	3,765	0,284
4,837	4,553	-0,284
4,426	4,142	-0,284
5,782	6,065	0,283
6,32	6,34	0,02
4,158	4,139	-0,019
9,131	9,114	-0,017
6,969	6,987	0,018

En la figura 7 no se observa una tendencia creciente de los residuales con los valores predichos lo que indica un buen ajuste de los datos.

Figura 7. Gráfica de los residuales contra los valores predichos



ANEXO D

Análisis fisicoquímico del vino obtenido



**LABORATORIO
BACTERIOLOGICO
DE ALIMENTOS**
Dra Yadira Campillo Orozco
Aprobación M.S.P. Res. 01320 de 1986

ANALISIS FISICOQUIMICOS

<p>INFORME ANALISIS DE MUESTRA No. SOLICITANTE FECHA DE LLEGADA OBJETO DEL ANÁLISIS OBSERVACIONES</p>	<p>VINO DE CACAO 13512 Sr. Leonardo Acevedo 7 de diciembre de 2005 Conocer la calidad fisicoquímica</p>
---	---

RESULTADOS

PARÁMETRO	RESULTADO	LIMITE PERMITIDO	UNIDADES	TÉCNICA
PH	3.62	-----	----	POTENCIOMETRICA
DENSIDAD	1.0172	----	g/ml	GRAVIMETRICA
ACIDEZ VOLATIL	1.06	Máx 1.6	Mg/LAC TARTARICO	VOLUMETRICO

"Válido únicamente para la muestra analizada"

OBSERVACIONES:

Ninguna.

LABORATORIO BACTERIOLOGICO
de ALIMENTOS



YADIRA CAMPILLO OROZCO
Jefe de Laboratorio

ANEXO E

Análisis microbiológico del vino obtenido



**LABORATORIO
BACTERIOLOGICO
DE ALIMENTOS**
Dra Yadira Campillo Orozco
Aprobación M.S.P. Res. 01320 de 1986

IDENTIFICACION DE LA MUESTRA

Muestra No 13448
Muestra VINO DE CACAO N° 2
Solicitante Sr Leonardo Acevedo
Fecha de llegada 6 de diciembre de 2005
Objeto del Análisis Conocer la calidad microbiologica
Lugar de Recolección PRODUCTOS M & M
Observaciones (La muestra fue mantenida en refrigeración desde el momento de su elaboración)
FP: 6 Nov

ANALISIS Y RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

PARAMETRO	RESULTADO	UNIDADES	*LIMITE
Recuento Total de Bacterias Mesofilicas	2	ufc/cc	1000
Número más Probable de Coliformes Totales	Menos de 3	mic/cc	Menos de 3
Número más Probable de Coliformes Fecales	Menos de 3	mic/cc	Menos de 3
Recuento de <i>Stafilococo coagulasa positiva</i>	Menos de 100	ufc/cc	Menos de 100
<i>Salmonella</i>	Negativa	En 25cc	Negativa
Recuento de Hongos y Levaduras	0	ufc/cc	Menos de 10

*Limite Permitido por las Autoridades Sanitarias para "Bebidas Alcoholicas (Cocteles)"

Conclusiones y Observaciones

MUESTRA MICROBIOLOGICAMENTE SATISFACTORIA Y APTA PARA EL CONSUMO HUMANO.

LABORATORIO BACTERIOLOGICO
de ALIMENTOS

Dra. Yadira Campillo Orozco
Bacterióloga



**LABORATORIO
BACTERIOLOGICO
DE ALIMENTOS**
Dra Yadira Campillo Orozco
Aprobación M.S.P. Res. 01320 de 1986

IDENTIFICACION DE LA MUESTRA

Muestra No 13447
Muestra VINO DE CACAO N° 1
Solicitante Sr Leonardo Acevedo
Fecha de llegada 6 de diciembre de 2005
Objeto del Análisis Conocer la calidad microbiológica
Lugar de Recolección Muestra traída al Laboratorio
Observaciones (La muestra fue mantenida a temperatura ambiente desde el momento de su elaboración)
FP: 6 Nov/05

ANALISIS Y RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

PARAMETRO	RESULTADO	UNIDADES	*LIMITE
Recuento Total de Bacterias Mesofilicas	900	ufc/cc	1000
Número más Probable de Coliformes Totales	Menos de 3	mic/cc	Menos de 3
Número más Probable de Coliformes Fecales	Menos de 3	mic/cc	Menos de 3
Recuento de <i>Stafilococo coagulasa positiva</i>	Menos de 100	ufc/cc	Menos de 100
<i>Salmonella</i>	Negativa	En 25cc	Negativa
Recuento de Mohos y Levaduras	5	ufc/cc	Menos de 10

*Limite Permitido por las Autoridades Sanitarias para "Bebidas Alcoholicas (Cocteles)"

Conclusiones y Observaciones


MICROBIOLOGICAMENTE LA MUESTRA PRESENTA RECUESTO DE MOHOS Y LEVADURAS PERO SE ENCUENTRA DENTRO DEL LIMITE MAXIMO PERMITIDO POR LO CUAL ES APTA PARA EL CONSUMO HUMANO.

LABORATORIO BACTERIOLOGICO
DE ALIMENTOS

Dra. Yadira Campillo Orozco
Bacterióloga

ANEXO F

Análisis de composición química

	LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER CIUDADELA UNIVERSITARIA, CARRERA 27, CALLE 9 EDIFICIO CAMILO TORRES	LC-IRA
INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS		

3.2 PARÁMETROS ANALÍTICOS

HRGC-MSD Modelo: Agilent Technologies 5890 Plus (Palo Alto, California, USA)

acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Tech. 5973

Horno Temperatura inicial: 40°C tiempo inicial: 5 min
 a 6 °C/min hasta 150 °C durante 2 min
 a 10 °C/min hasta 250 °C durante 15 min

Columna Longitud (m) 30 d.i (mm): 0.25

Fase: 5%-Fenil-poli(dimetilsiloxano) Espesor(μm): 0.10

Velocidad del gas de arrastre: 1 mL/min (70 °C)

Presión de entrada de columna: 200 kPa

Inyector Manual: ---- Automático: Agilent 7683

Split: 30 *Splitless*: ---- Relación *split*: 31:1

Temperatura (° C): 250

Gases *Carrier*: Helio (99.995%)

Analizador Emisión (mA): 35.0 Ion Focus (V): 90.0

Repeller (V): 25.03 *Ent. Lens* (V): 19.58

Energía de e⁻ (eV): 69.9 Multiplicador (V): 2071

Vel. de barrido (scan/seg): 6.22 Filamento *off* (min): 1.5

Rango de masas (u.m.a.s): 40-4050


Fte iones Temperatura (° C): 230 Presión (torr): 3.2 x 10⁻⁵ (N₂)

Línea de transferencia (° C): 285

Modo *Full scan*: X *SIM*: -----

PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DE LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS.
 LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA.

Carrera 27 – Calle 9, Ciudad Universitaria, Edificio Camilo Torres: 202-204, Teléfono: (0X7)6344000 Ext. 2471. Línea directa (0X7) 645 6737. Fax (0X7) 6358210. Celular (315)879 3865. Bucaramanga, Colombia.
 e-mail: elena@tucan.us.edu.co. rene@tucan.us.edu.co

	LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER CIUDADELA UNIVERSITARIA, CARRERA 27 , CALLE 9 EDIFICIO CAMILO TORRES	LC-IRA
	INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS	

4. RESULTADOS

El análisis de la muestra se realizó por GC-MS (Columna DB-5, 30 m), empleando el modo *full scan*. Los compuestos aislados en la muestra se identificaron con base en sus espectros de masas. En la **Tabla 1**, se reportan la identificación y la cantidad relativa (%) de los componentes encontrados en la muestra bajo estudio.

Tabla 1. Identificación por GC-MS y cantidad relativa (%) de los compuestos presentes en la muestra, enviada por el profesor Leonardo Acevedo.

t_R , min	Compuestos	Cantidad relativa, %
		Extracto de cacao
1.30	Etanol	30.73
1.72	N.I.	1.20
1.82	Acetato de etilo	2.61
1.93	2-Metil-1-propanol	5.26
3.33	3-Metil-1-butanol	31.90
3.41	2-Metil-1-butanol	7.51
15.74	Bencenoetanol	18.73
33.60	Éster etílico del ácido hexadecanoico	0.88
35.45	Éster etílico del ácido 9-octadecenoico	1.18

N.I.: No identificado

De acuerdo con el análisis realizado por GC-MS (*full scan*), en la muestra "Extracto de cacao", se identificaron como componentes principales los siguientes alcoholes: etanol, 3-metil-1-butanol, bencenoetanol, 2-metil-1-butanol y 2-metil-1-propanol y, en pequeñas cantidades, los siguientes ésteres: acetato de etilo, éster etílico del ácido hexadecanoico y éster etílico del ácido 9-octadecenoico.

PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DE LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS.
LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA.

Carrera 27 – Calle 9, Ciudad Universitaria, Edificio Camilo Torres: 202-204, Teléfono: (0X7)6344000 Ext. 2471. Línea directa (0X7) 645 6737. Fax (0X7) 6358210. Celular (315)879 3865. Bucaramanga, Colombia.
e-mail: glena@tucan.uis.edu.co, renez@tucan.uis.edu.co

