

Efecto de la temperatura y el pH en la fermentación del mosto de *Agave cocui*

Iván Leal Granadillo, Giuseppe Tarantino Rodríguez,
Rómulo Hernández Motzezak, Héctor Morán Guillén

Laboratorio de Análisis Químico, Centro de investigaciones en Ciencias Básicas y
Departamento de Química, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Coro,
estado Falcón, Venezuela.

E-mail: ialealg@gmail.com

Resumen

El *Agave cocui*, es la materia prima para la producción artesanal del licor denominado Cocuy Pecayero. Una de las operaciones básicas en la elaboración de esta bebida es la fermentación, la cual es realizada por los productores sin un control de sus variables. La presente investigación comprendió el estudio del efecto de la temperatura y el pH sobre el proceso de la fermentación mediante el consumo de azúcares y la producción de etanol. Se estudiaron procesos de fermentación controlada a las temperaturas de 27, 31,33, 35 y 37°C, manteniendo el pH constante. Seguidamente se evaluó el proceso fermentativo a pH 3, 4 y 5, manteniendo la temperatura constante. Los resultados encontrados indican que la temperatura y el pH óptimos de fermentación fueron de 33°C y 4, respectivamente. En estas condiciones se obtuvo una concentración de etanol de 7,42 % después de 52,5 horas de fermentación lo que corresponde a una productividad de etanol de 1,14 g/L.h, y un porcentaje de rendimiento de 81,5%.

Palabras clave: fermentación, *Agave cocui*, azúcares, etanol.

The Effect of Temperature and pH on *Agave cocui* Juice Fermentation

Abstract

Agave cocui is the raw material for the artisan production of liquor called *Cocuy Pecayero*. One of the basic operations in preparing this drink is fermentation, carried out by producers without a control of variables. This research included a study of the effects of temperature and pH on the fermentation process according to sugar consumption and ethanol production. Fermentations controlled at temperatures of 27, 31.33, 35 and 37° C, keeping the pH constant, were studied. Then, the fermentation process was evaluated at pH 3, 4 and 5, keeping the temperature constant. Results indicate that the optimum fermentation temperature was 33°C and optimum pH was 4. Under these conditions, an ethanol concentration of 7.42% was obtained after 52.5 hours of fermentation, which corresponds to a productivity of 1.14 g ethanol/L.h. and a yield percentage of 81.5%.

Keywords: fermentation, *Agave cocui*, sugars, ethanol.

Introducción

El Cocuy Pecayero, es una bebida alcohólica que se obtiene por destilación y rectificación artesanal de mostos preparados a partir de las cabezas maduras (corno central) de la planta *Agave cocui* Trelease previamente hidrolizados o cocidos y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras naturales o cultivadas, su nombre es debido a que este es producido en la población de Pecaya municipio Sucre del estado Falcón, Venezuela [8, 17]. Es elaborado en varias etapas, la primera incluye el corte de la planta el cual se realiza cuando la planta tiene entre 7 y 10 años. Seguidamente, el corno central o piña de la planta es cocido en un horno de piedra construido en el suelo, durante 72 a 120 horas y una vez horneadas, las piñas son trituradas en cubas de madera que posteriormente son lavadas, prensadas y filtradas.

El jugo obtenido se fermenta durante 4 ó 5 días en toneles de plástico o de metal para finalmente ser destilado en un alambique artesanal que está constituido por un calderín, un rectificador y un condensador [11, 17]. Condiciones similares a la de la obtención del mezcal [3, 6, 13]. En los últimos años se han realizado una serie de investigaciones [4, 9, 10, 19] con el fin de estudiar el proceso de elaboración artesanal del Cocuy Pecayero a los fines de optimizarlo y de establecer el control de calidad de la bebida y de

esta manera legalizar su producción y comercialización. El proceso de fermentación se realiza sin un control sobre las variables que pueden afectar directamente la calidad de la fermentación. Son varios los factores que afectan el proceso de fermentación por lo que el tiempo de fermentación y la calidad de la bebida artesanal suelen ser muy variable [4]. Entre los factores que afectan el proceso de fermentación están: la temperatura, la concentración de sustrato, el pH, la concentración de nutrientes entre otros [1, 2, 5, 15, 16]. La temperatura de fermentación no solo afecta el tiempo del proceso y la concentración final de etanol sino que puede afectar también las propiedades organolépticas de la bebida [12]. Estos factores pueden controlarse para influir positivamente sobre la calidad de la bebida y sobre el rendimiento del proceso.

El objetivo principal de esta investigación fue estudiar la influencia de la temperatura y el pH en el proceso de fermentación controlado del mosto de *Agave cocui*, mediante el seguimiento del consumo de azúcares y la producción etanol.

Materiales y métodos

Las muestras de mosto fresco de *Agave cocui* se tomaron directamente en la Población de Pecaya, Municipio Sucre del estado Falcón a partir del mosto obtenido arte-

sanalmente a partir de plantaciones naturales, siempre de un mismo productor. Las características fisicoquímicas del mosto han sido estudiadas anteriormente [4]. En cada muestreo se tomaron cantidades suficientes de mosto inmediatamente después de ser obtenido por el proceso artesanal. Las muestras de mosto se envasaron y se transportaron al laboratorio en cavas con hielo, luego se refrigeraron a temperatura menor a 10°C. Al día siguiente de la toma de muestra se procedió a estudiar el proceso fermentativo.

Para realizar los estudios de fermentación se utilizó un Bioreactor marca Bioflo 110 el cual posee agitador, bombas de líquidos, rotámetro, válvulas para agua de enfriamiento, así como sensores de temperatura, agitación, flujo de aire, pH-metro, oxígeno disuelto y el efecto antiespumante. Por la parte lateral dispone de un dispensador de muestras con vial de recolección. Todo controlado automáticamente. Las fermentaciones se realizaron durante unas 75 horas con microorganismos naturales en el mosto. El volumen de mosto utilizado para la fermentación en cada experimento fue de 2L.

Para el seguimiento del proceso se tomaron alícuotas de 60mL para la determinación de azúcares totales, biomasa y etanol. Para determinar la temperatura óptima de fermentación se realizaron experimentos de fermentación a cinco temperaturas diferentes manteniendo el pH constante. Las temperaturas ensayadas fueron: 27°C, 31°C, 33°C, 35°C y 37°C. El pH óptimo se determinó manteniendo constante la temperatura y evaluando el proceso fermentativo a valores de pH de 3, 4 y 5. La productividad del proceso se evaluó mediante la expresión:

$$\text{Productividad} = \frac{\text{concentración de etanol (g/L)}}{\text{Tiempo de fermentación (h)}} \quad [18]$$

El rendimiento se calculó en base a la concentración teórica de etanol que se obtendría según la ecuación:



Métodos de análisis

Para cada una de las alícuotas recolectadas se determinaron azúcares totales, biomasa y etanol. Los azúcares fueron determinados por el método de colorimétrico de fenol-sulfúrico de Dubois [7]. La biomasa fue determinada por pesada luego de filtrar 5mL de mosto fermentado con un filtro millipore de 0,45µm, previamente pesado. La biomasa se obtuvo por diferencia de peso luego de secar el filtrado a 40°C durante 17h. El etanol se determinó mediante cromatografía de gases, usando un equipo Agilent Technologies 6890 con una columna capilar Polyethylene

Glycol Agilent HP-Innowax cuyas dimensiones son 30m × 250µm × 0,25µm y detector de ionización a la llama (FID). El gas de arrastre fue nitrógeno a un flujo de 11,1 mL/min, la temperatura de inyección fue de 250°C y al del detector fue de 300°C. El programa del horno fue el siguiente: temperatura inicial 45°C la cual se mantuvo por 6 min; aumento gradual de calentamiento a 7°C/min hasta 120°C, permaneciendo constante a esta temperatura por 1 min. El volumen de inyección fue de 1µL.

Resultados y discusión

El proceso de fermentación del mosto de *Agave cocui* producido en la población de Pecaya, se realiza de forma artesanal, sin un control de las variables que influyen sobre éste por lo que la temperatura de fermentación varía durante el proceso puesto que se realiza en condiciones ambientales. En un estudio anterior se determinó que la temperatura ambiente varió entre 23,3 y 31,1°C en la fermentación del mosto de *Agave cocui* en condiciones de la producción artesanal de la bebida, sin control de este parámetro. Esto afecta el tiempo de fermentación y la concentración de etanol obtenido [4]. Otro factor no controlado es el pH por lo que en esta investigación se pretende encontrar los valores óptimos para estos dos parámetros, midiendo la concentración de azúcares consumidos y la concentración de etanol producida.

Determinación de la temperatura óptima mediante el consumo de azúcares

En la Figura 1 se presenta el consumo de sustrato a las temperaturas ensayadas, durante el proceso de fermentación.

A 27°C, la fermentación produjo un consumo de azúcar del 93,4 % al disminuir la concentración de azúcares totales de 18,39 a 1,21% para un tiempo de fermentación de 75 horas comenzándose a estabilizar después de las 62 h. A 31°C se encontró una disminución en la concentración de azúcares de 97,1% para un tiempo total de fermentación de 75 h, observándose que a partir de las 55 h se ralentizaba el proceso fermentativo. A 33°C se determinó un consumo de azúcar del 92,8% para un tiempo de fermentación de 51,5h (Figura 1). Puede notarse que para esta temperatura, se promovió un consumo de sustrato rápido al principio del proceso, esto se evidencia en la pendiente que describe la curva del consumo del sustrato inicial.

La fermentación a temperatura de 33°C comenzó a estabilizar pasadas las 32 h, produciendo el mayor consumo de sustrato en el menor tiempo. Para el proceso de fermentación realizado a 35°C, se encontró que la concentra-

ción de azúcar disminuyó desde 17,36 hasta 0,43%, lo que corresponde a un consumo de 97,5% pero en un tiempo de 74,5 h. Por último, se obtuvo un consumo de azúcar de 93,0% a los 74,7 h a la temperatura de 37°C (Figura 1). Los resultados obtenidos indican que la temperatura óptima de fermentación del mosto de *Agave cocui* se encuentra en el intervalo comprendido entre 31 y 37°C. En un estudio reciente [14] se encontró como temperatura óptima 32°C al comparar dos cepas comerciales de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de etanol.

Determinación de la temperatura óptima mediante la producción de etanol

Con la finalidad de obtener la temperatura más apropiada para el proceso fermentativo del mosto de *Agave cocui* se determinaron las concentraciones de etanol que se produjeron en el transcurso de la fermentación alcohólica para cada una de las temperaturas probadas (Figura 2).

Se calculó también la productividad en etanol para cada temperatura. Como se observa en la Figura 2 para la temperatura de 33°C, se obtuvo la mayor concentración de etanol en comparación con las otras temperaturas (Tabla 1), con una productividad de 1,44 g/L.h. Similarmente para esta temperatura se obtuvo el mayor rendimiento, lo que indica que hubo una buena conversión de sustrato en etanol.

Determinación del pH óptimo de la fermentación

En la Figura 3 se muestra el consumo de azúcar a temperatura de 33°C para los valores de pH 3, 4 y 5 en la fermentación controlada del mosto de *Agave cocui*. La fermentación a pH = 4, resultó ser la óptima. Como se puede observar en la Figura 3, el consumo de sustrato para este valor de pH es significativamente más alto.

De la misma manera que para el caso de la temperatura óptima se determinaron las concentraciones de etanol para las fermentaciones realizadas a los tres valores de pH

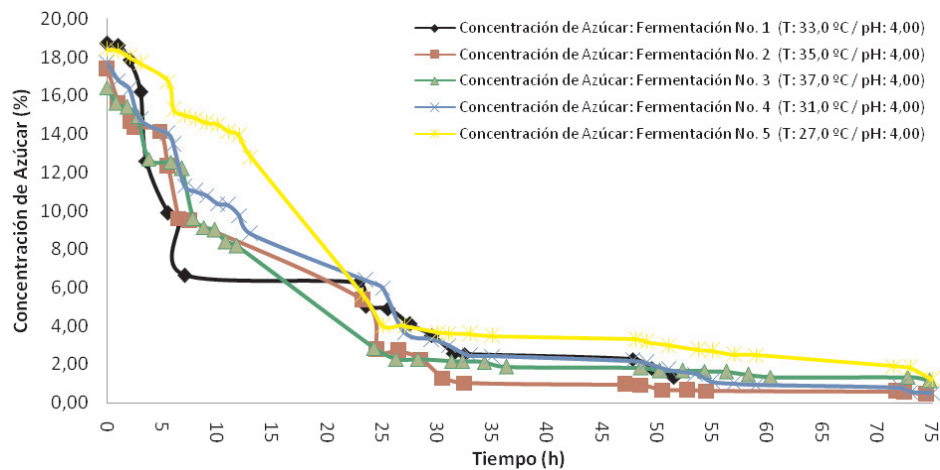


Figura 1. Consumo del sustrato a pH = 4, durante el tiempo de fermentación de mosto de *Agave cocui* a las temperaturas de 27, 31, 33, 35 y 37°C.

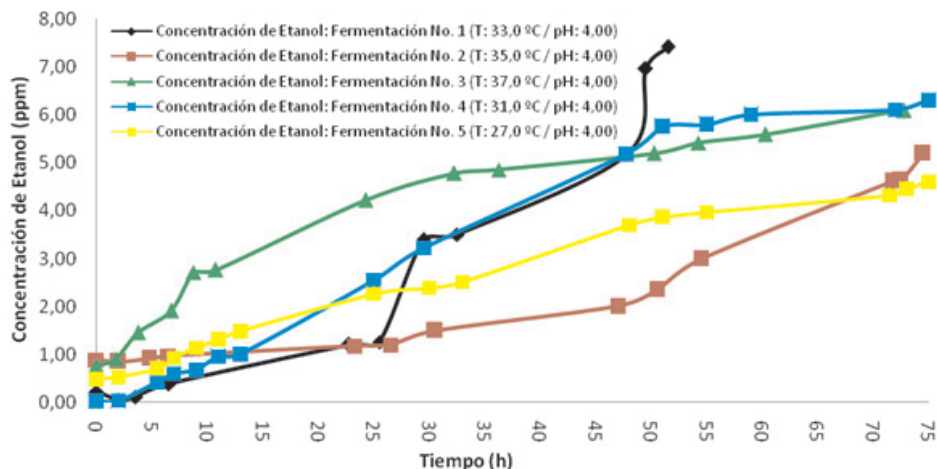


Figura 2. Producción de etanol a pH = 4, durante el tiempo de fermentación de mosto de *Agave cocui* a las temperaturas de 27, 31, 33, 35 y 37°C.

probados. En la Figura 4 se muestra como fue la producción de etanol durante el tiempo de fermentación. Como se observa en las figuras, las fermentaciones a pH 3 y 5 produjeron las menores concentraciones de etanol, mientras que la fermentación a pH 4 produjo la mayor concentración de etanol en menor tiempo.

El nivel de acidez o basicidad que contenga el medio que contendrán las levaduras que promoverán la produc-

ción de alcohol, determinará el nivel de consumo de sustrato, así como la velocidad de fermentación. La actividad de las levaduras disminuye cuando se encuentra a niveles de pH bajos. Por lo que en un pH óptimo es donde el metabolismo de las levaduras es satisfactorio para promover un buen consumo del sustrato. Según varias investigaciones el pH óptimo para el crecimiento de las levaduras en la fermentación alcohólica oscila en el rango de 3 y 5 [3, 18].

Tabla 1. Concentración de etanol, productividad y rendimiento para procesos fermentativos del mosto de *Agave cocui* a pH 4 y a las temperaturas de 27, 31, 33, 35, y 37°C.

Temperatura (°C)	Tiempo Fermentación (h)	Concentración etanol (%)	Productividad (g/L.h)	Rendimiento %
27	75	4,60	0,61	50,5
31	75	6,30	0,84	69,2
33	51,5	7,42	1,44	81,5
35	74,5	5,20	0,70	57%
37	72,5	6,10	0,84	67%

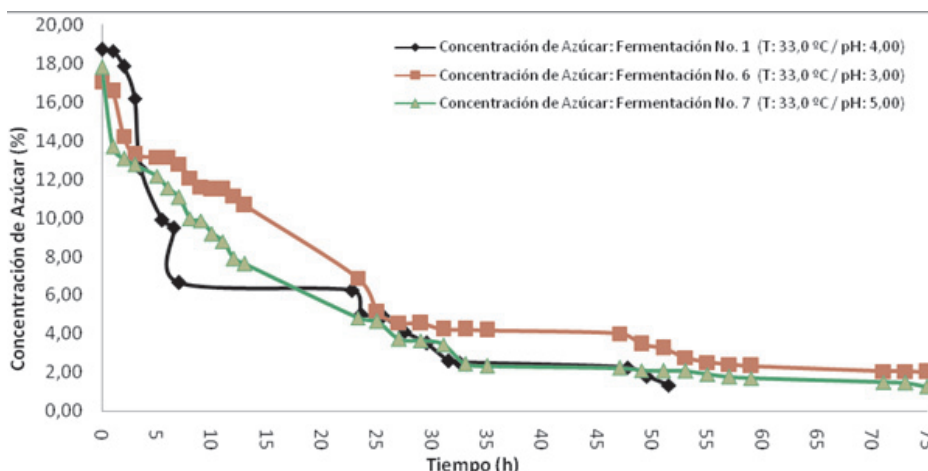


Figura 3. Consumo del sustrato a la temperatura de 33°C en la fermentación de mosto de *Agave cocui* a pH 3,4 y 5.

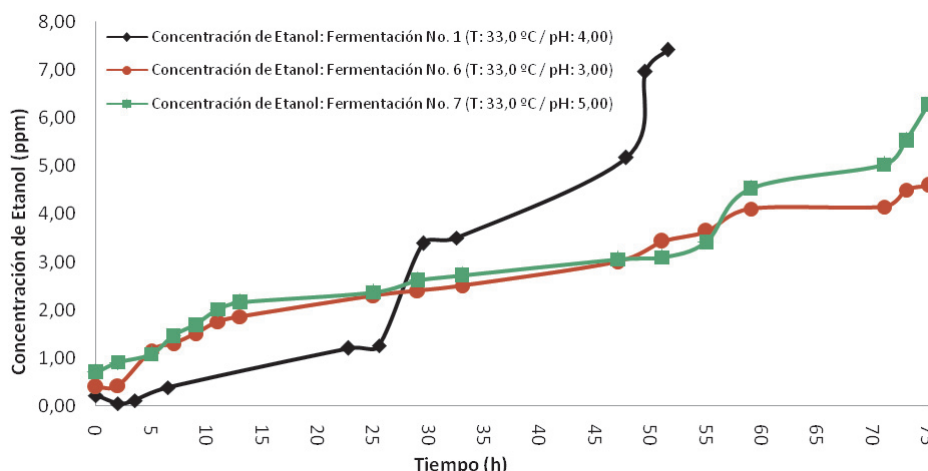


Figura 4. Producción de etanol a la temperatura de 33°C en la fermentación de mosto de *Agave cocui* a pH 3,4 y 5.

Tabla 2. Concentración de etanol, productividad y rendimiento para procesos fermentativos del mosto de *Agave cocui* a las temperaturas 33°C y a pH 3,4 y 5.

pH	Tiempo Fermentación (h)	Concentración etanol (%)	Productividad (g/L.h)	Rendimiento (%)
3	75	4,59	0,61	50,4
4	51,5	7,42	1,44	81,5
5	75	6,28	0,84	69,0

Adicionalmente, en este intervalo de pH, se elimina la competencia por el azúcar y los nutrientes por parte de las bacterias.

En la Tabla 2 se comparan los resultados obtenidos para las fermentaciones realizadas a pH 3, 4 y 5.

Al evaluarse el proceso de fermentación artesanal en condiciones ambientales tal cual lo realizan los productores de cocui pecayero se obtuvo para dos procesos fermentativos concentración de etanol de 7,85 y 5,50% para la para 93 y 107 horas de fermentación, respectivamente [4].

Para estos dos mismos procesos las productividades encontradas fueron 0,84 y 0,51 g/L.h. Los rendimientos respectivos para estos dos procesos fermentativos fueron 86,9% y 67,8%. En el presente estudio la concentración de etanol encontrada, aunque ligeramente inferior, se obtiene en un tiempo mucho menor (51,5h) por lo que la productividad de proceso con temperatura y pH controlados es superior (1,44g/L.h).

Conclusiones

Se obtuvo como parámetros óptimos para el proceso de fermentación controlada del mosto de *Agave cocui* una temperatura de 33°C y un pH de 4, con estos valores se observó el mayor consumo de azúcares y la mayor producción de etanol en un tiempo menor al del proceso realizado en condiciones ambientales por los productores de cocui.

Agradecimientos

Giuseppe Tarantino, agradece a FUNDACITE por el financiamiento otorgado a su trabajo de grado. Iván Leal G. agradece a FONACIT por el financiamiento del proyecto codificado como S1 20010011063.

Referencias

[1] AGU, R.; BRINGHURST, T.; BROSNAN, J.; JACK, F. (2008). Effect of Process Conditions on Alcohol Yield of Wheat, Maize, and others Cereals. **J. Inst. Brew.** 114:39-44.

[2] ARRIZON, J.; GSCHAEDLER, A. (2002). Increasing fermentation efficiency at high sugar concentration by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of tequila fermentation process. **Can. J. Microbiol.** 48:965-970.

[3] CEDEÑO, M. (1995). Tequila production. **Crit. Rev. Biotechnol.** 15:1-11.

[4] CHIRINO, M.; MORÁN, H.; BARRERA, W.; LEAL, I. (2008). Evaluación del proceso artesanal de fermentación del mosto del *Agave Cocui* a través de la determinación de parámetros fisicoquímicos. **Multiciencias.** 8(3): 259-266.

[5] CIATEJ (2004). **Ciencia y Tecnología del Tequila. Avances y Perspectivas.** Guadalajara. Pp. 63-120.

[6] DE LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, L.; BARBA DE LA ROSA, A.; ESCALANTE-MINAKA P.; LÓPEZ M. (2006). Characterization of Volatile Compounds of Mezcal, an Ethnic Alcoholic Beverage Obtained from *Agave salmiana*. **J. Agric. Food Chem.** 54 1337-1341.

[7] DUBOIS, M.; GILLES, A.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F. (1956). Colorometric methods for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** 28:350-356.

[8] GONZALEZ, C. (2001). Noticia Histórica sobre el Cocuy (*Agave cocui*) en Falcón. **Croizatia** 2(3): 173-176.

[9] LEAL, I.; MIQUILENA, R.; MORÁN, H. (2007). Evaluación del proceso de destilación artesanal del cocuy de Peca-ya a partir de la composición de volátiles mayoritarios. **Multiciencias.** 7(2): 181-187

[10] LEAL GRANADILLO, I.; MEDINA J.; MORÁN GUILLÉN, H.; JAIMES MAVARE, L. (2011). Evaluación de la diferencia en la composición de volátiles mayoritarios entre cocuy de agave y licor fraudulento comercializado como cocuy. **Multiciencias.** 11(4):339-344.

[11] LEAL GRANADILLO I.; MADRID DÍAZ M.; RANGEL MOLLEDA M.; MARTINEZ BRACHO C.; MORAN GUILLÉN H. (2011). Implementación de una columna empacada para la disminución del furfural en el proceso de destilación de Cocuy Pecayero. **Rev. Téc. Ing. Uni. Zulia.** 34(1):22-30.

[12] LIU D.; ZHANG H.; XU B.; TAN J. (2014). Influence of fermentation temperature and source of enzymes on enological characteristics of rice wine **Journal of the Institute of Brewing.** 120, (3): 231-237.

- [13] MOLINA GUERRERO, J. A.; BOTELLO-ÁLVAREZ, J. E.; ESTRADA-BALTAZAR, A.; NAVARRETE-BOLAÑOS, J. L.; JIMÉNEZ-ISLAS, H.; CÁRDENAS-MANRÍQUEZ, M.; RICO-MARTÍNEZ, M. (2007). Compuestos Volátiles en el Mezcal. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**. 6(1):41-50.
- [14] MUKHTAR K.; ASGHER M.; AFGHAN, S.; HUSSAIN K.; ZIA-UL-HUSSNAIN S. (2010). Comparative Study on Two Commercial Strains of *Saccharomyces cerevisiae* for optimum Ethanol Production on Industrial Scale. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2010: 5-10.
- [15] NOFEMELE, Z.; SHUKLA, P.; TRUSSLER, A.; PERMAUL, K.; SING, S. (2012). Improvement of ethanol production from sugarcane molasses through enhanced nutrient supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Brew. Distilling**. 32(2):29-35.
- [16] SHULER, M; KARGI, F. (2001). **Bioprocess Engineering. Basic Concepts**. New Jersey: Prentice Hall. Pp. 162.
- [17] VENTURA, J. (2001). Caracterización del Proceso de Producción Artesanal de Cocuy Pecayero. Tesis de grado. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Venezuela.
- [18] [18] WARD, O. (1991). **Biología de las Fermentaciones**. Editorial Acribia, Zaragoza, España. Pp. 136.
- [19] YEGRES, F.; FERNÁNDEZ, G.; PADÍN, C.; ROVERO, L.; RICHARD, N. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* en la fabricación del licor de Cocuy. **Rev. Soc. Ven. Microbiología**. 23:51-54.
-