

Clarificación de una Bebida Alcohólica a Base de Merey (*Anacardium occidentale L.*) a Partir de un Concentrado Enzimático

Carlos Alvarado Almarza, Celeste Fernández González, Alexandra Jiménez Lucena y Johana Paucar Baque

Laboratorio de Biotecnología Industrial (LABIOT). Centro de Investigaciones Químicas (CIQ).
Facultad de Ingeniería. Universidad de Carabobo. Valencia. Estado Carabobo. Venezuela
E-mail: c_alvarado_almarza@yahoo.es ; calvarado@uc.edu.ve

RESUMEN

La presente investigación consistió en la clarificación de una bebida alcohólica a base de Merey (*Anacardium occidentale L.*), mediante la adición de concentrados de enzimas pectinolíticas, uno extraído de guayaba y otro de Papaya. La bebida alcohólica se preparó según las normas COVENIN y Codex Stand 247 (2005), a base de Merey amarillo mediante fermentación durante 96 h con *Saccharomyces cerevisiae*. Se emplearon 3 kg del pseudofruto del Merey para obtener 800 ml de vino. La efectividad del concentrado enzimático se evaluó con un diseño factorial mixto 2x4x4, se midió la absorbancia en el vino antes y después de la adición del concentrado, y se observó disminución en la intensidad del color. Luego, se aplicó una encuesta valorativa sumatoria y se obtuvo para el brillo y limpidez una preferencia de 64% en el vino clarificado. Se formuló la bebida alcohólica clarificada y se realizó una evaluación sensorial hedónica.

Palabras Clave: Clarificación, enzimas pectinolíticas, Merey, Papaya, concentrado enzimático.

ABSTRACT

This research consisted of clarification of an alcoholic beverage made from cashew (*Anacardium occidentale L.*) using an pectic enzyme concentrates; first of them extracted from guava and papaya another. The beverage was prepared according to Codex Stand 247 (2005) and COVENIN standards-based yellow cashew by fermentation for 96 h using *Saccharomyces cerevisiae*. A three (3) kg of pseudofruit were used to obtain 800 ml of wine. The effectiveness of the enzyme concentrate was evaluated using a mixed factorial experimental design 2x4x4, and the absorbance was measured in the wine before and after addition of concentrated, and observed decrease in color intensity. Then a summation valuation survey was applied and obtained for the brightness and clarity of a preference 64% for wine clarified. Alcoholic beverage clarified was formulated and a hedonic sensory evaluation was conducted.

Keywords: Clarification, pectic enzymes, cashew, papaya, concentrated enzyme.

INTRODUCCIÓN

Las bebidas alcohólicas tienen su origen en la fermentación alcohólica. Este, es un proceso anaeróbico que genera etanol y desprende grandes cantidades de dióxido de carbono, debido a la acción de las levaduras que, en ausencia de aire, oxidan la glucosa y otros azúcares (Ezeronye, 2004).

La clarificación de los vinos es una práctica muy antigua realizada en Enología. Los fines que se persiguen con la clarificación son, en un principio, acelerar la eliminación de materias que enturbian la bebida alcohólica por un procedimiento más rápido que el de sedimentación y trasiego. Existen diversos clarificantes proteicos y/o enzimáticos de origen vegetal y animal (Acosta, 2014). Los clarificantes enzimáticos a base de enzimas pectinolíticas han tomado gran importancia por su rápido efecto. Las enzimas pectinolíticas corresponden a una mezcla de dos o más tipos de enzimas que en combinación hidrolizan a las pectinas.

Las pectinas son heteropolímeros conformados por tres tipos de estructuras que pueden variar en sus proporciones: homogalacturonanos, ramnogalacturonanos I y ramnogalacturonanos II, el primero conformado por residuos de galactopiranosilurónico unidos por enlaces (1→4) en donde algunos grupos carboxilos se encuentran metil esterificados y dependiendo de la especie vegetal pueden estar O-acetilados en los carbonos 2 y 3 (Thakur *et al.*, 1997; Ridley *et al.*, 2001; Willats *et al.*, 2006). Los ramnogalacturonanos I están constituidos por una cadena principal de dos

disacáridos repetidos [→4) – ácido α -D-galactopiranosilurónico (1→2)- α -L-ramnopiranosil (1→] con aproximadamente 20 a 80% de las moléculas de la ramnosa unidas por enlaces (1→4) a cadenas de oligosacáridos ácidos y neutros, formados principalmente por arabanos, galactanos o arabinogalactanos y en menos escala por ácido D-glucurónico. Y los ramnogalacturonanos II representan un grupo de polisacáridos con cadenas laterales complejas unidas a la cadena principal de α -D-galactopiranosilurónico (Ridley *et al.*, 2001).

Las enzimas pectinolíticas están conformadas por tres tipos: pectinesterasas, poligalacturonasas y pectinliasas. Las pectinesterasas hidrolizan los grupos carboxilo esterificados del carbono 6 de las moléculas de α -D-galactopiranosilurónico y liberan metanol, las poligalacturonasas hidrolizan los enlaces glicosídicos de la cadena principal de las pectinas α -D-galactopiranosilurónico restos de α -D-galactopiranosilurónico, y las pectinliasas hidrolizan de forma desproporcionada los enlaces glicosídicos de la cadena principal generando dos tipos de restos de α -D-galactopiranosilurónico, una saturada con extremo terminal –OH y otra insaturada (Nagodawhitana & Reed, 1993). Las enzimaspectinolíticas son aplicadas al mosto antes de la fermentación para coagular coloides con el propósito de obtener un vino clarificado (Nagodawhitana & Reed, 1993; Whitaker, 1994).

La fase visual es una etapa de gran importancia en la calidad de los productos alimenticios y las bebidas alcohólicas no son ajenas a esta situación, ya que propiedades

sensoriales como el brillo, transparencia, entre otros, se ven afectadas por las partículas en suspensión propias del procesamiento del mosto, y por tanto es necesario el uso de clarificantes para disminuir el efecto de las mismas. Otro aspecto importante a estudiar es la turbidez del vino, igualmente es significativo el color o la cromaticidad de la bebida alcohólica y en el caso de los vinos blancos son esencialmente relevantes las reacciones de pardeamiento ya que son las que condicionan el color que varía desde amarillo pálido hasta tonos marrones.

En la presente investigación, se preparó una bebida alcohólica a base de Mery (*Anacardium occidentale L.*), mediante fermentación sumergida con la levadura *S. cerevisiae*, ya que en estudios previos demostró ser la idónea para consumir todos los azúcares fermentables, y por tanto asegurar el proceso. El clarificante utilizado se preparó a base de enzimas pectinolíticas de frutas de procedencia nacional: guayaba y papaya, empleando un diseño factorial mixto 2x4x4 y finalmente se realizó la evaluación sensorial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del concentrado enzimático

La guayaba y la papaya fueron compradas en un mercado local, se lavaron, pelaron y retiraron las semillas. Se procesaron dos porciones por separado de cada pulpa de 30 g y luego se conservaron a 4 °C (Flores, 2004). Luego se colocaron en un embudo con doble capa de papel de filtro; se realizaron 4 lavados con 5 mL de acetona a -20 °C con el fin de

eliminar los fenoles (Espinal, 2010; Torres *et al.*, 2006).

Posteriormente, se procedió a la extracción del concentrado enzimático, mediante la agitación de la muestra resultante de la etapa anterior, con la adición controlada de 30 mL de solución extractora de (NaCl) 1.5 M. Luego se reajustó el pH a 7.8 con hidróxido de sodio (NaOH) 1.5 M.

La mezcla se centrifugó a 7000 rpm (5911.2 xg) durante 45 min. El sobrenadante obtenido se filtró con papel Whatman N°5 prepesado y se separó en dos partes iguales, una se dejó intacta y la segunda se precipitó con sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄], un 30% de saturación; en seguida se centrifugó a 7000 rpm (5911.2 xg) durante 45 min. Se transvasó el sobrenadante y se recuperó el extracto enzimático parcialmente purificado (Flores, 2004; Mondal *et al.*, 2009; Ashurst, 2005).

Las cantidades empleadas de sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄] para la extracción del concentrado enzimático se indican en la Tabla 1, donde además se reflejan las cantidades de materia prima necesarias para la preparación del concentrado enzimático de guayaba y papaya respectivamente.

Tabla 1. Formulación de los concentrados

Fuente	Cantidad (g)	Acetona (ml)	Sulfato de Amonio (g)	Cantidad de concentrado (ml)
Guayaba	30	20	4.1	18.5
Papaya	30	20	4.5	20

Preparación de la bebida alcohólica a base de merey

Para obtener un (1) litro de mosto se trataron (3) tres kilogramos de fruto a los cuales se les removió la nuez, y el pseudofruto recolectado se colocó en remojo con agua potable para eliminar la suciedad que pudieran tener debido al proceso de recolección. Posteriormente se realizó una inmersión del pseudofruto ya limpio en solución salina al 1% para reducir su astringencia y se esterilizaron en autoclave a 1.5 psig y 121°C durante 15 min (Mohanty *et al.*, 2006).

Luego, el pseudofruto ya esterilizado se procesó en un extractor de jugo y el bagazo obtenido se filtró y prensó a fin de obtener la mayor cantidad posible. Se ajustaron los sólidos solubles con azúcar comercial a 30°Brix y el pH se ajustó a 4 con ácido cítrico al 10%. El mosto se esterilizó a 1.5 psi durante 15 min y se agregaron 0.2 g/l de metabisulfito de sodio, 1 g/l de sulfato de amonio y 1 g/l de fosfato de potasio (Torres *et al.* 2006).

Para preparar el inóculo se inocularon 10 g de levadura fresca comercial *Levapan* en 50 ml de caldo nutritivo en un matraz de 100 ml. Se incubó a temperatura ambiente (28 °C) a 150 rpm durante 24 h. Posteriormente se tomaron 15 ml del cultivo iniciador de levadura y se diluyeron hasta 50 ml con solución isotónica al 0.85% p/v (Araujo *et al.*, 2011).

El proceso de fermentación se realizó en matraces de 250 ml conteniendo 50 ml del mosto y 5% del inóculo en incubación orbital a 150 rpm (2.7 xg) durante 96 h (4 días). Una vez

cumplido el tiempo de fermentación estipulado se eliminó la levadura por separación sólido-líquido facilitada por su deposición mediante refrigeración a 4 °C durante 24 h, y posterior centrifugación a 6000 rpm (4342.9 xg) durante 30 min y finalmente filtraron. La pasteurización se realizó en un autoclave a 100°C por 10 min y luego se enfrió a 4°C durante 30 min (Araujo *et al.*, 2011).

Determinación de taninos en el pseudofruto

Se determinó la cantidad de taninos siguiendo la metodología expuesta por Mohanty *et al.* (2005) en la cual se colocaron 10 g del pseudofruto en 100 ml de etanol al 96% durante un aproximado de 16 h, luego se añadió sulfato de sodio anhidro y se filtró. Este filtrado se secó hasta peso constante en estufa a 105 °C. La cantidad de taninos fue expresada en mg por cada 100 ml de solución salina al 1%.

Evaluación de los concentrados enzimáticos en el proceso de clarificación de la bebida

Se realizó un diseño experimental factorial mixto 2x4x4 por triplicado para un total de 96 experimentos para evaluar el concentrado enzimático de guayaba y papaya. Se tomaron las muestras obtenidas de la fermentación y se les agregó el concentrado enzimático de guayaba y papaya variando sus cantidades y el tiempo de actuación (Tabla 2). Las muestras resultantes de cada interacción se colocaron en vasos de precipitado de 100 ml y se agitaron durante un tiempo de 10 min.

Artículos

Tabla 2. Diseño experimental para evaluar los concentrados enzimáticos en la clarificación de la bebida alcohólica de Merrey

Factor	Nivel		Variable de respuesta
	Variable normal	Variable codificada	
Variedad	Papaya	(-1)	Absorbancia (adim)
	Guayaba	(+1)	
Volumen de clarificante	0 mL	(-1)	
	5 mL	(-0.33)	
	15 mL	(+0.33)	
	25 mL	(+1)	
Tiempo	0 h	(-1)	
	24 h	(-0.33)	
	48 h	(+0.33)	
	72 h	(+1)	

Se caracterizó la bebida alcohólica con el clarificante mediante la determinación del grado alcohólico (COVENIN 3042-93), sólidos solubles (COVENIN 924-83), pH (COVENIN 1315-79), acidez titulable (COVENIN 3286-97 y COVENIN 1151) y densidad, además de la medición de la absorbancia empleando un espectrofotómetro UV con una longitud de onda de 420 nm.

Selección del concentrado enzimático más adecuado para clarificar la bebida alcohólica a base de Merrey

Se revisaron diversas normas COVENIN 3340-3342 y el CODEX ALIMENTARIUS (CODEX STAN 247, 2005) para la elaboración de vinos, las cuales establecen las

características esenciales que deben tener los componentes de una bebida alcohólica a base de frutas, así como las particularidades de dicho producto.

La norma general del CODEX para zumos (jugos) y néctares de fruta (Codex Stan 247, 2005) indica que el nivel de °Brix requerido para el mosto debe encontrarse en un rango entre 12 y 40. Como proceso de selección, además de la caracterización y el estudio de la absorbancia, se realizó una encuesta a escala valorativa sumatoria preliminar a 20 personas, para elegir el de mayor preferencia por el panel encuestado.

Determinación de actividad enzimática

La medición de actividad enzimática de la pectin-esterasa se realizó mediante la técnica del pH estático reportada por Argai & López-Malo (1996). Se tomó una alícuota de concentrado enzimático igual a $(10,00 \pm 0.05)$ mL y se mezclaron con una solución de pectina cítrica al 1% en NaCl 1 M ajustando el pH a 7.8 tras la adición de cada gota de pectina; utilizando para esto una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2.07 M. Seguidamente se midió el pH y se tituló cada muestra con solución de NaOH 0.0004 N. Los resultados se expresaron en unidades de pectin-esterasa (UPE) por ml.

La unidad de pectin-esterasa (UPE) fue definida como el número de mili equivalentes de éster hidrolizados por minuto y mililitro de muestra, a pH 7.8 y se expresó en UPE/ mL (Flores, 2004).

$$\frac{UPE}{mL} = \frac{v * N}{t * a} * 10^6 \quad (1)$$

Donde:

v: volumen gastado de NaOH empleado para titular (ml)

N: normalidad de NaOH (eq/l)

t: tiempo de agitación (min)

a: alícuota (ml)

Evaluación sensorial de las características del producto obtenido después del proceso de clarificación

Para el análisis de las propiedades sensoriales finales se procedió a realizar una evaluación a escala valorativa sumatoria para una población de 50 individuos, en edades comprendidas entre 18 a 70 años, con el

objetivo de clasificar de forma discriminatoria y descriptiva la bebida alcohólica clarificada a base de merey (*Anacardium occidentale L.*) (Desrosier, 1977).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación del concentrado enzimático

La eliminación fenólica se lleva a cabo dado que puede inducir la inactivación de las enzimas, entre ellas la enzima de interés, pectinasas; al formarse polifenolxidasas y/o entrar en contacto las mismas ya presentes en tejidos con las enzimas generando una oxidación o pardeamiento que caracteriza la inhibición de la actividad enzimática (Nagodawhitana & Reed, 1993; Mondal *et al.*, 2009). Una vez obtenida la muestra de fruta sin fenoles se adicionó cloruro de sodio (NaCl) 1.5 M a fin de solubilizar las proteínas, es decir, las enzimas y luego la muestra fue centrifugada con la finalidad de separar totalmente la pulpa de las fase acuosa.

Preparación de la bebida alcohólica a base de Merey

El Merey se presenta en dos especies: una roja y otra amarilla. En esta investigación se empleó Merey amarillo. Se realizó la caracterización fisicoquímica, en donde los resultados obtenidos a la 5ta semana indican que la especie amarilla alcanzó mayor grado de madurez. Su relación sólidos solubles azúcares/acidez es más alta lo que brinda

condiciones óptimas para la fermentación (Tabla 3).

Tabla 3. Tiempo de maduración del Merey

Variedad	Grado de madurez (Adim)
Merey rojo	10.75
Merey amarillo	16.90

Luego del tratamiento inicial de la fruta según Mohanty *et al.* (2006), se realizó la inmersión de la misma en solución salina al 1%, esto con la finalidad de reducir la cantidad de taninos presentes en el Merey (Yahaya *et al.*, 2010). Después del tratamiento los taninos disminuyeron en un 61.76 %, pasando de 1020 a 630 mg/100 ml.

Los taninos representan la medida indirecta de la astringencia, que no es más que una sensación que corresponde al grado de pérdida de lubricación de la cavidad bucal, dando de esta forma, una sensación de aspereza y sequedad. Sin embargo, no se eliminan en su totalidad ya que estos presentan propiedades medicinales tales como: antidiarreicos, antioxidantes, antiinflamatorios y antisépticos (Mohanty *et al.*, 2006; Guerrero *et al.*, 2008). La cantidad de vino obtenida por cada 3 kg de merey amarillo fue de aproximadamente 800 ml.

Evaluación del concentrado enzimático en el proceso de clarificación de la bebida a partir de un diseño experimental a escala de laboratorio

La bebida alcohólica empleada para evaluar la clarificación con el concentrado enzimático se obtuvo a partir del Merey amarillo (*Anacardium occidentale L.*), porque es una fruta de producción nacional y además el concentrado enzimático de papaya y guayaba.

A través de un diseño experimental factorial utilizando como factores la concentración del clarificante y el tiempo de la clarificación se evalúa la efectividad del concentrado enzimático. El modelo empleado es la Metodología de Superficies de Respuesta (RSM) que no es más que un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo, según Gutiérrez & De la Vara (2008)

En la presente investigación después de la fermentación, la bebida alcohólica contiene partículas en suspensión, surgiendo la necesidad de clarificarlo mediante la adición de un producto clarificante capaz de coagularse con los elementos sólidos que lo enturbian y de producir grumos que sedimenten las partículas que producen la turbidez, arrastrándolas al fondo para clarificar el vino. Para evaluar el comportamiento del clarificante se aplicó dicha metodología de superficie de respuesta con un diseño experimental de 2^2 preparando muestra de vino de 50 ml variando la cantidad de concentrado enzimático y el tiempo de actuación del mismo, estudiando así la respuesta de absorbancia del vino.

Los valores obtenidos de absorbancia con el concentrado enzimático de papaya son menores a los del concentrado enzimático de

guayaba, tal como se indica en las Figuras 1 y 2. Estos resultados son congruentes para un espectro de absorción de un vino blanco según reporta Ribéreau-Gayon (2003).

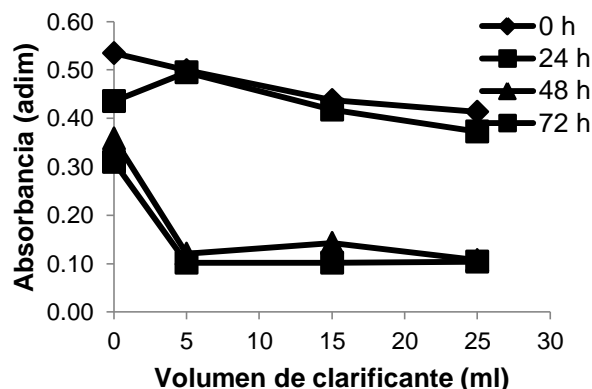


Fig. 1. Variación de la Absorbancia (a 420 nm) en función del tiempo del vino clarificado con concentrado enzimático de papaya

Esta diferencia entre ambos clarificantes se debe a que la actividad enzimática de la papaya (5.333 UPE/mL) es mayor a la de la guayaba (1.333 UPE/ml). Así mismo, a medida que aumenta el tiempo de incubación con respecto al aumento de la concentración enzimática, la absorbancia del vino clarificado disminuyó en todos los tratamientos (Figura 1). Esto se debe a la acción de la enzima al hidrolizar la pectina que puede llegar a suponer el 50% de la sustancia coloidal (González-San José *et al.*, 2013), además la hidrólisis facilita la precipitación de proteínas, polímeros fenólicos y en menor medida de ácidos urónicos, mejorando de esta manera el brillo y la luminosidad del producto final. Este efecto se incrementa con el tiempo de actuación para el caso de la papaya y se mantiene con el volumen de clarificante empleado.

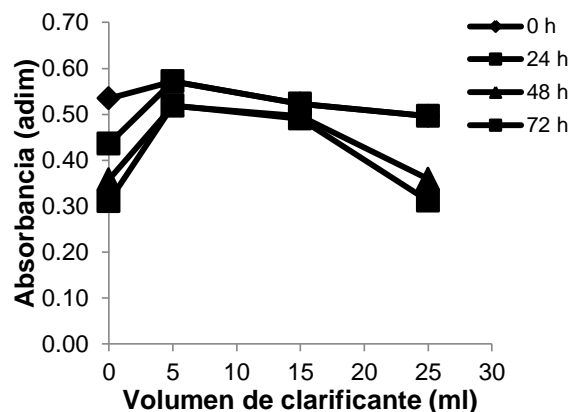


Fig. 2. Variación de la Absorbancia (a 420 nm) en función del tiempo del vino clarificado con concentrado enzimático de guayaba

En el caso de guayaba (Figura 2) se observó un aumento inicial de la absorbancia a volumen bajo de 5 ml y luego una disminución. Esto puede atribuirse a la baja concentración de enzimas pectinolíticas en la guayaba.

Lo anterior hace suponer que a menor

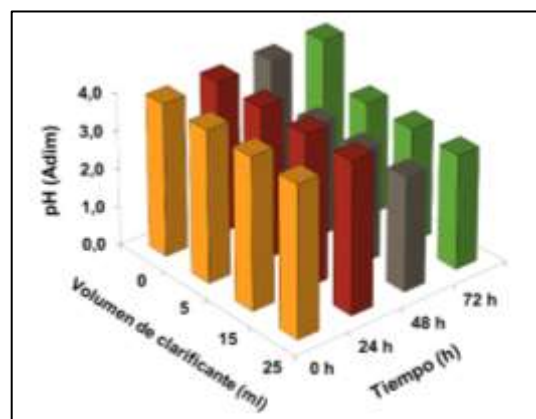


Fig. 3. Variación del pH en el tiempo del vino clarificado con concentrado enzimático de papaya

concentración de enzimas pectinolíticas se requiere mayor cantidad de concentrado, pero al mismo tiempo al emplear una baja cantidad del mismo se traduce en un aumento de la

absorbancia debido a que no se ha iniciado aún la hidrólisis enzimática de las pectinas.

A medida que aumenta el tiempo de incubación, el pH disminuye, y esta reducción está asociada a la labor catalizadora de la enzima sobre la pectina (Figura 3); esto se debe, a que la pectin-esterasa al hidrolizar los enlaces éster metílico (COOCH_3), libera metanol (CH_3OH) de los grupos carboxilos esterificados y transforma la pectina metoxilada en pectina de bajo metoxilo (Espinal, 2010). En la Figura 4,

igualmente se aprecia la variación de los sólidos solubles para diferentes tiempos de actuación del clarificante de papaya en la bebida alcohólica a base de merey. La disminución de los sólidos solubles es favorable, ya que representa la reducción de los sólidos suspendidos por acción de la enzima.

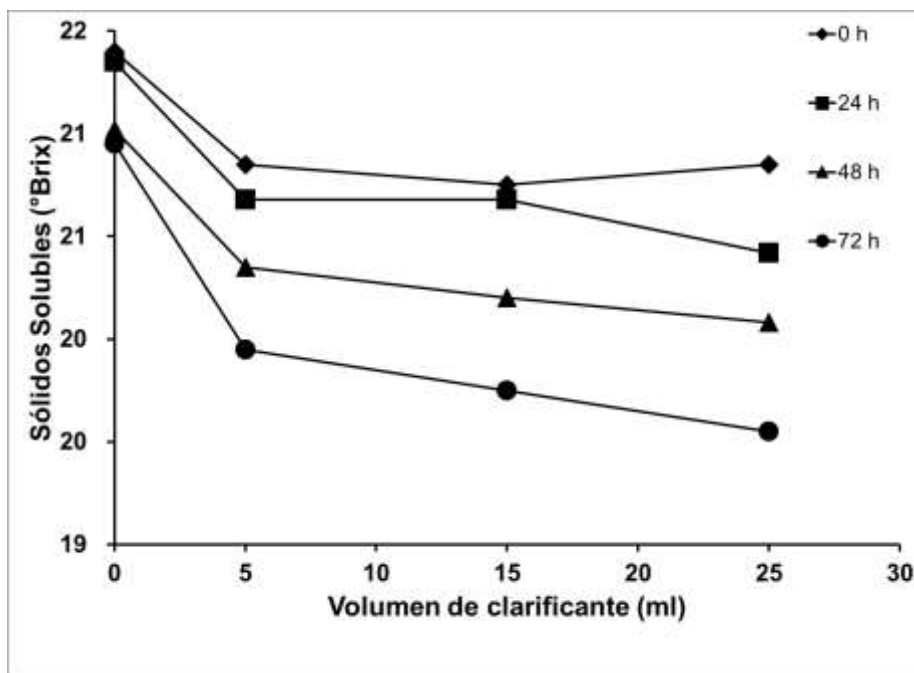


Fig. 4. Variación de los sólidos solubles en el tiempo para el vino clarificado con concentrado enzimático de papaya

En la Figura 5 se muestra el diagrama de Pareto para la variable respuesta: absorbancia, y los factores evaluados: tiempo, volumen de clarificante y variedad de fruta, como resultado de la validación estadística con un ajuste del 77.0865 % del modelo según el estadístico R-cuadrada ajustada, en la cual se observa que los tres factores tienen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre ellas más sus interacciones. De

igual manera se comprobaron los supuestos de normalidad de los datos, independencia y varianza constante para estadística paramétrica. Por otro lado, las superficies de respuesta, para las dos variedades papaya y guayaba se indican en las Figuras 6 y 7 se puede apreciar que a medida que aumenta el tiempo de incubación, la absorbancia disminuye con una tendencia a permanecer constante en el tiempo para las

Artículos

últimas horas de actuación, y a pesar de existir ligeros aumentos para volúmenes entre 15 y 25 ml la tendencia a clarificar vuelve a presentarse luego de 72 h de actuación del mismo. En la

Tabla 4 se muestra el análisis de varianza con los estadísticos desglosados.

Las Variables Volumen y Tiempo según Tabla 2.

Tabla 4. Análisis de varianza para absorbancia.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Variedad	0.0527728	1	0.0527728	10.19	0.0020
B:Volumen Clarificante	0.0784693	1	0.0784693	15.15	0.0002
C:Tiempo	0.332761	1	0.332761	64.26	0.0000
AB	0.0434855	1	0.0434855	8.40	0.0048
AC	0.0219945	1	0.0219945	4.25	0.0424
BB	0.0242948	1	0.0242948	4.69	0.0331
BC	0.0001882	1	0.0001882	0.04	0.8493
CC	0.00303718	1	0.00303718	0.59	0.4459
bloques	0.0072595	2	0.00362975	0.70	0.4989
Error total	0.440128	85	0.00517798		
Total (corr.)	2.14681	95			

R-cuadrada = 79.4985 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 77.0865 por ciento

Error estándar del est. = 0.0719581

Error absoluto medio = 0.0565532

Estadístico Durbin-Watson = 0.658179 (P=0.0000)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.665934

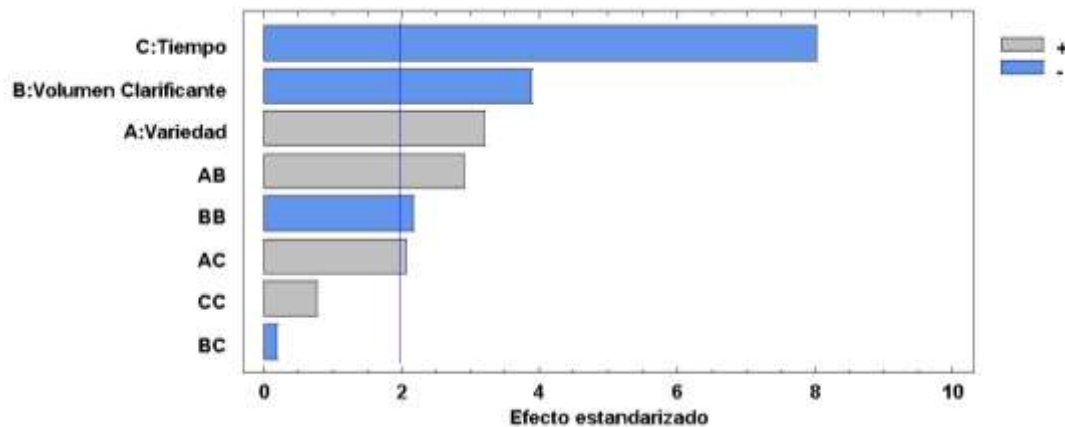


Fig. 5. Diagrama de Pareto para la absorbancia

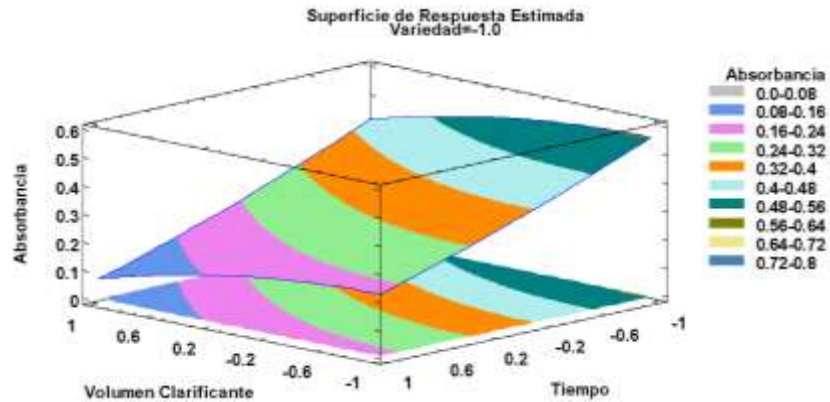


Fig. 6. Superficie de respuesta de los niveles de volumen de clarificante y tiempo para papaya.

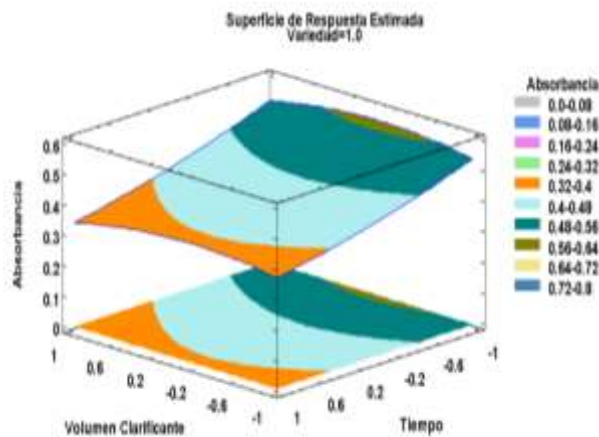


Fig. 7. Superficie de respuesta de los niveles de volumen de clarificante y tiempo para guayaba.

Selección del concentrado enzimático más adecuado para clarificar la bebida alcohólica a base de merey

Comparando los valores obtenidos de absorbancia, se puede apreciar en la Figura 1 que para el clarificante de guayaba hay un aumento súbito al adicionar el primer volumen de clarificante, esto debido a que el concentrado enzimático posee físicamente un color más

oscuro provocando que al adicionarse al vino, este se torne de igual color y aumente la absorbancia medida en el espectrofotómetro UV. Sin embargo, al agregar más clarificante este comienza a disminuir, debido al tiempo de actuación y reposo al que estuvo sometido, lo que se traduce en una despectinización (Cerreti *et al.*, 2016; Pinelo *et al.*, 2010).

Caso contrario ocurre con el de papaya, que tiene un color más claro y al adicionarse al vino, la absorbancia disminuye en los primeros volúmenes de clarificante con el aumento de la concentración de la enzima. Lo cual es una ventaja ya que las medidas son favorables indicando mejoras en la apariencia de la bebida alcohólica. Sin embargo, para el volumen final aumenta la absorbancia, lo que parece indicar que el clarificante en exceso pierde actividad enzimática posiblemente por desnaturalización proteica, y por tanto no continúa la hidrólisis de las cadenas de pectinas. Este hecho puede deberse a una subida de temperatura ocasionada en la manipulación de las muestras o por otros efectos que aún se desconocen y que hay que estudiar en futuras investigaciones.

Artículos

Una muestra de la bebida alcohólica con ambos clarificantes se puede apreciar en la Figura 8.



Fig. 8. Bebida alcohólica a base de merey con clarificante (a) Papaya, (b) Guayaba

Para la selección del volumen de clarificante se emplearon tres muestras como se observa en la Tabla 5, además la aplicación de una prueba de degustación a una población de 20 personas inexpertas para verificar la preferencia del vino clarificado después de 72 h de actuación.

Tabla 5. Muestras empleadas para la selección del volumen de clarificante.

Fruta	Muestra	Volumen de vino (ml)	Volumen de clarificante (ml)
Papaya	A	50	5
	B	50	15
	C	50	25

El modelo de encuesta utilizado fue el de Escala Valorativa Sumatoria, dando como resultado que con una ponderación promedio de 13.9, siendo 15.0 la máxima puntuación total para la escala de valoración, la muestra B fue escogida como la preferida. Los valores de la caracterización para la muestra B fueron los siguientes: pH igual a 3; sólidos solubles 20.1796 °BRIX; acidez titulable 4.864 g (ácido tartárico)/l; grado alcohólico 12.7; densidad 1.2698 g/ml y absorbancia 0.10129. Así mismo, el comportamiento del concentrado enzimático de papaya, empleado como clarificante en una bebida alcohólica a base de merey, presenta una tendencia aceptable en los resultados obtenidos; en comparación con estudios realizados por diversos autores para mejorar la

aparición de vinos blancos utilizando clarificantes comerciales y/o convencionales (Fugelsang & Edwards, 2007). Luego de aplicar la encuesta, se concluyó que el mejor sabor del vino se logró al agregar 5 mL de concentrado enzimático de papaya para lograr la clarificación.

Finalmente, para preparar 300 ml de bebida alcohólica clarificada a base de merey, se emplearon 30 ml de concentrado enzimático de papaya, y se pasteurizó a una temperatura de 100°C a una presión de 1.5 psi y seguidamente se sometió a un enfriamiento súbito a 4°C.

Evaluación sensorial de las características del producto obtenido en el proceso de clarificación

La prueba hedónica aplicada en la presente investigación fue analítica de tipo discriminativa

por el método de diferenciación, empleando la técnica pareada, que consiste en evaluar simultáneamente dos muestras, con el objetivo de determinar si existe diferencia perceptible entre ellas. En este caso, una muestra con clarificante de papaya y otra sin clarificante. Para desarrollar este procedimiento se aplicó la encuesta a un total de 50 personas no entrenadas. Las características evaluadas en la prueba hedónica son: brillo y limpidez, aroma, color, sabor y aceptabilidad.

Se pudo constatar que el vino clarificado con concentrado enzimático de papaya obtuvo un porcentaje de 52% y el vino sin clarificar 36%; es decir, que en comparación con otros vinos frutales, éste es aprobado por la mayoría de los degustadores generando expectativas a futuro para la comercialización de vinos clarificados con concentrados enzimáticos obtenidos a partir de frutas de procedencia nacional.

CONCLUSIONES

La bebida alcohólica obtenida empleando un concentrado enzimático de papaya, se encuentra dentro de los rangos establecidos por las normas COVENIN empleadas para la caracterización. Los valores de sólidos solubles, pH, acidez titulable, grados alcohólicos y densidad obtenidos para el vino clarificado fueron aceptables comparados con estudios realizados por otros autores. Las mediciones de absorbancia demuestran que la bebida alcohólica a base de Merey con clarificante de papaya cumple con el espectro de absorbancia de un vino blanco, para ello fue necesario un tiempo de actuación de 72 h del clarificante

enzimático con un valor de absorbancia de 0.10129. El brillo y limpidez tuvo una preferencia de 53% en el vino clarificado respecto al vino sin clarificar. La aceptabilidad en general tuvo un 73% de aprobación en el vino clarificado, generando así una expectativa de comercialización a futuro.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al personal del Laboratorio de Biotecnología Industrial (LABIOT) y al Centro de Investigaciones Químicas (C.I.Q) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo, por colaborar con el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

- Acosta D (2014) Elaboración y control de calidad de vino de feijoa (*Acca sellowiana berg*), a partir de frutos con corteza y sin ella. Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Ecuador.
- Araujo S, Ferraz C, Silveira J, Narain N & Souza R. (2011) Biotechnological process for obtaining new fermented products from cashew apple fruit by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 38 (9):1161-9.
- Argaiz A & López-Malo, A. (1996) Kinetics of first change on flavour, cooked flavour development and pectinesterase inactivation on mango and papaya nectars and purees. *Rev Esp Cien Tec Ali.* 35 (1): 92-100.

Artículos

- Arrázola G, Núñez M & Osorio J (2013) Clarificación de jugo de la manzana de marañón (*Anacardium occidentale* L.) por tratamiento enzimático. *Rev MVZ Cordoba*. 18 (1): 3722-3730.
- Ashurst P (2005) Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices. Second Edition. Blackwell Publishing, United Kingdom. ISBN: 1-4051-2286-2.
- Cerreti M, Liburdi K, Benucci I & Esti M (2016) The effect of pectinase and protease treatment on turbidity and on haze active molecules in pomegranate juice. *LWT-Food Sci Technol*. 73: 326-333.
- Codex Alimentarius (2005) Norma general del Codex para zumos (jugos) y néctares de frutas (CODEX STAN 247-2005).
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) (1977) Frutas y sus derivados. Determinación de la acidez. Norma 1151.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) (1979) Alimentos. Determinación de pH. Norma 1315.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) (1981) Néctares y frutas. Consideraciones generales. Norma 1031.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) (1983) Determinación de sólidos solubles. Norma 924.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) (1997) Vino y sus derivados. Determinación de la Acidez total. Norma 3286.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) (1997) Vino y sus derivados. Requisitos. Norma 3342.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). (1993) Bebidas alcohólicas. Determinación del grado alcohólico. Norma 3042.
- Desrosier N (1977) Elements of Food Technology. Avi Pub Co. USA. ISBN-10: 0870552457. ISBN-13: 978-0870552458
- Espinal M (2010) Capacidad antioxidante y ablandamiento de la guayaba Palmira. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- Ezeronye O (2004) Nutrient utilization profile of *Saccharomyces cerevisiae* from palm wine in tropical fruit fermentation. *A Van Leeuw J Microb*. 86: 235-240.
- Flores E (2004) Desarrollo de una Bebida Funcional de Maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). Tesis de Maestría. Universidad de las Américas Puebla. México.
- Fugelsang K & Edwards C (2007) Wine microbiology. Segunda edición. Editorial Springer Science Business Media, LLC. USA. pp. 115-137. ISBN-13: 978-0387333410. ISBN-10: 038733341X.
- González-San José M, Izcara E, Pérez-Magariño S & Reilla I (2013) Efecto del uso de enzimas pectinolíticas sobre los aspectos tecnológicos y visuales de mostos e vinos. X Congreso Brasileño de Viticultura y Enología, Universidad de Burgos. España.
- Guerrero R, Lugo L, Marín M, Beltrán O, León G & Rincón F (2008) Caracterización fisicoquímica del fruto y pseudofruto del Merey *Anacardium occidentale* L. (Merey) en condiciones de secado. *Rev Fac Agron LUZ*. 25: 81-94.

- Gutierrez H & De la Vara R (2008). Análisis y Diseño de Experimentos. Mc Graw Hill. México. ISBN-10: 970-10-6526-3. ISBN-13: 978-970-10-6526-6.
- Mohanty S, Ray P, Swain MR & Ray RC (2006) Fermentation of cashew (*Anacardium occidentale L.*) "Apple" into wine. *J Food Process Pres.* 30: 314–322.
- Mondal K, Malhotra SP, Jain V & Singh R (2009) Partial purification and characterization of pectinmethylesterase from ripening guava (*Psidium guajava L.*) fruits. *Acta Physiol Plant.* Haryana, India. 31: 81–87.
- Nagodawhitana T & Reed G (1993) Enzymes in Food Processing. Third Edition. Food Science and Technology. International series. pp. 7-67/363-392.
- Pinelo M, Zeuner B & Meyer A (2010) Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food Bioprod Process.* 88 (2-3): 259–265.
- Ribéreau-Gayon P (2003) Tratado de Enología. Volumen II. Química del Vino. Estabilización y Tratamientos. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. ISBN: 9789505045716.
- Ridley BL, O'Neil MA & Mohnen D. (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide – related signaling. *Phytochemistry.* 57 (6): 929-967.
- Thakur BR, Singh RK & Handa AK (1997) Chemistry and uses of pectin – A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 37 (1): 47-73.
- Torres A, Da Silva M, Barros W, Swarnakar R & Honorato L (2006) Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale L.*). *Quim. Nova* 29 (3): 489-492. Brazil.
- Whitaker J (1994) Principles of enzymology for the food sciences. Second Edition. Marcel Dekker. Inc. Davis, California. pp. 426-435. ISBN 0824791487.
- Willats WG, Knox JP & Mikkelsen JD (2006) Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci Tech.* 17: 97-104.
- Yahaya L, Aliyu O, Hammed L & Aroyeun S (2010) La variación en las características fisicoquímicas del manzano del anacardo (*Anacardium occidentale L.*) en maduración. *Brit Food J.* 112: 93–

