



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

**“FERMENTACIÓN DE MALTA EMPLEANDO UN SISTEMA SEMICONTINUO
EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE CERVEZA”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTA:
ANABEL SÁNCHEZ MIGUEL

DIRECTOR:
M.C. VANIA SHUHUA ROBLES GONZÁLEZ

HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA, FEBRERO 2011

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de los laboratorios de Ciencias Químico-Biológicas e Hidrología de la Universidad Tecnológica de la Mixteca.

DEDICATORIAS

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño.

A mis padres que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias por todo papá y mamá, por su comprensión, por haberme dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño. Por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor, por todo esto y más les agradezco de todo corazón el que estén a mi lado.

A mi hermana y mis hermanos que me han acompañado en el transcurso de la vida. Porque juntos hemos pasado momentos maravillosos que han marcado y dejado huella en mi corazón. Por todos esos bellos momentos y los no tan bellos, Gracias.

A Uri, por ser parte esencial en mi vida. Por hacerme sonreír aún en los momentos más difíciles, por brindarme tu cariño, amor sincero y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres y mi familia porque sin su apoyo y confianza no hubiese logrado concluir este proyecto.

Al M.C. Vania S. Robles González quien con sus conocimientos y experiencias me ha guiado en el transcurso del proyecto de tesis. Gracias por su amistad y por hacer de las horas del laboratorio un gusto.

A mis sinodales que con sus conocimientos y correcciones hechas al trabajo han contribuido al fortalecimiento de este proyecto.

A todos los profesores que en su momento me dieron clases, por dejar en mí parte de su conocimiento y contribuir en mi formación profesional y personal.

A Sandy, por ser mi amiga incondicional durante toda la carrera. Porque hemos compartido momentos felices y amargos pero es parte de nuestra amistad y no lo cambiaría por nada, gracias.

A Uri, por el inmenso cariño y apoyo brindado durante este proyecto. Por estar a mi lado en los momentos de trabajo más pesado.

A los técnicos de los diferentes laboratorios, que siempre estuvieron dispuestos a apoyarme con material para la realización del proyecto.

RESUMEN

La fermentación alcohólica es un conjunto de transformaciones bioquímicas en las que ciertas levaduras se encargan de transformar el mosto, compuesto principalmente por hidratos de carbono, en un líquido con determinado contenido alcohólico y dióxido de carbono. La fermentación de malta de cebada durante el proceso de elaboración de cerveza es una de las etapas más estudiadas para conseguir mejoras del producto final, ya que se pueden controlar los tiempos y condiciones de operación. Dicha etapa se puede llevar a cabo en un sistema continuo o por lote. El proceso continuo ha existido desde principios del siglo XX y ofrece las ventajas de alto rendimiento y elevada productividad volumétrica. Sin embargo, estos beneficios no llegan a compensar las desventajas debidas a la mayor complejidad para la instalación y manejo de estos procesos, en comparación con los sistemas de fermentación por lote (tradicional). El presente trabajo se desarrolló con la finalidad de implementar un sistema de fermentación semicontinuo de malta cervecera, el cual combina la productividad volumétrica alta típica de los sistemas continuos y la facilidad de operación de los sistemas por lote. Para las fermentaciones se empleó levadura *Saccharomyces cerevisiae* que fue sometida a una previa aclimatación en mosto de cebada. En este trabajo se estudiaron 3 tiempos de retención hidráulica (TRH): 5, 4 y 3 días. Cada TRH fue operado por un periodo de 25 días. Para el TRH de 5 días se obtuvo una productividad volumétrica (r) mayor en 20.2% respecto a la “ r ” del sistema por lote. Al emplear un TRH de 4 días la “ r ” fue mayor en 50.2% en comparación al sistema por lote y para un TRH de 3 días la “ r ” superó en 100.4% a la “ r ” del sistema por lote.

INDICE GENERAL

	Pág.
Resumen	V
Índice de tablas	IX
Índice de figuras	XI
Lista de abreviaturas	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
2.1 La cerveza y sus componentes	3
2.1.1 Ingredientes de la cerveza	5
2.1.2 El papel de <i>Saccharomyces</i>	6
2.2 Proceso de elaboración de cerveza	7
2.2.1 Preparación de la malta	8
2.2.2 Producción del mosto	8
2.2.3 Fermentación	10
2.2.4 Procesamiento final	11
2.3 Evaluación química de la cerveza	11
2.4 La fermentación alcohólica en la elaboración de cerveza	12
2.5 Sistema de fermentación	15
2.5.1 Sistema de operación por lote	15
2.5.1.1 Ventajas	20
2.5.1.2 Desventajas	20
2.5.2 Sistema de operación en continuo	20
2.5.2.1 Ventajas	23
2.5.2.2 Desventajas	24

2.5.3 Sistema de operación semicontinuo	24
2.5.3.1 Ventajas	25
2.5.3.2 Desventajas	26
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos específicos	27
5. METODOLOGÍA	28
5.1 Plan de trabajo	29
5.2 Obtención de la cepa <i>S. cerevisiae</i> con capacidad de producción de alcohol	29
(i) Activación de la levadura comercial	30
(ii) Aislamiento de <i>S. cerevisiae</i>	30
(iii) Mantenimiento de <i>S. cerevisiae</i>	33
(iv) Aclimatación de <i>S. cerevisiae</i> a un medio de mosto de cebada	33
5.3 Obtención del mosto de fermentación	39
5.4 Fermentación mediante el sistema semicontinuo	43
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
6.1 Obtención de la cepa <i>S. cerevisiae</i> con capacidad de producción de alcohol	46
(i) Activación de la levadura comercial	46
(ii) Aislamiento de <i>S. cerevisiae</i>	47
(iii) Mantenimiento de <i>S. cerevisiae</i>	48
(iv) Aclimatación de <i>S. cerevisiae</i> a un medio de mosto de cebada	48
6.2 Obtención del mosto de fermentación	50
6.3 Fermentación mediante sistema semicontinuo	53
7. CONCLUSIONES	61
8. PERSPECTIVAS	62

9. REFERENCIAS	63
9.1 Otras fuentes consultadas	68
APÉNDICE	69

ÍNDICE DE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Tipos de cerveza y características organolépticas.	4
Tabla 2. Reactivos utilizados en la experimentación.	28
Tabla 3. Composición elemental de un microorganismo.	34
Tabla 4. Materias primas empleadas para el medio de cultivo sintético y su relación con respecto a la Glucosa como fuente de carbono.	35
Tabla 5. Formulación del medio de cultivo sintético balanceado (Medio A) para un volumen de 500 mL.	35
Tabla 6. Condiciones de operación para la Fase 1 de aclimatación de <i>S. cerevisiae</i> al medio de mosto de cebada (fermentación semicontinua).	36
Tabla 7. Formulación del mosto de cebada (Medio B).	37
Tabla 8. Porcentajes empleados de medio A y B en la aclimatación de la levadura a mosto de cebada.	39
Tabla 9. Formulaciones de mosto para fermentación.	40
Tabla 10. Condiciones de operación de los sistemas semicontinuos para diferentes TRH's.	43
Tabla 11. Pendientes obtenidas al aplicar regresión por mínimos cuadrados a diferentes rangos de datos de biomasa en un sistema semicontinuo en función del TRH.	55
Tabla 12. Pendientes obtenidas al aplicar regresión por mínimos cuadrados a diferentes rangos de datos de azúcares reductores en un sistema semicontinuo en función del TRH.	57
Tabla 13. Pendientes obtenidas al aplicar regresión por mínimos	57

cuadrados a diferentes rangos de datos de concentración de alcohol en un sistema semicontinuo en función del TRH.

Tabla 14. Productividades volumétricas en sistema semicontinuo y por lote. 59

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. a) Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en agar dextrosa sabouraud y Levadura <i>S. cerevisiae</i> en: b) Microscopia de contraste de fases x580 aumentos y c) Microscopía electrónica de barrido, x7040 aumentos.	6
Figura 2. Proceso de elaboración de cerveza.	7
Figura 3. Seguimiento de reacciones para obtener etanol a partir de glucosa.	14
Figura 4. Operación del sistema de fermentación por lote.	16
Figura 5. Curva de crecimiento de la levadura.	17
Figura 6. Operación del sistema de fermentación en continuo.	21
Figura 7. Operación del sistema de fermentación semicontinuo.	25
Figura 8. Plan de trabajo general.	29
Figura 9. Diagrama descriptivo del aislamiento de <i>S. cerevisiae</i> .	32
Figura 10. Procedimiento para la obtención del mosto de cebada.	38
Figura 11. Observación en fresco de levadura <i>S. cerevisiae</i> libre de contaminación microbiológica a partir de colonias en placa de agar dextrosa sabouraud.	47
Figura 12. Cinética de concentración de alcohol en medio sintético balanceado para la activación de <i>S. cerevisiae</i> usando un sistema semicontinuo.	48
Figura 13. Cinética de producción de alcohol en la sustitución de medio A por medio B en un sistema por lote.	49
Figura 14. Cinética de consumo de azúcares reductores en sistema de fermentación por lote para diferentes formulaciones de mosto	50

	de cebada.	
Figura 15.	Porcentaje de consumo de azúcares (η_{Azu}) en un sistema de fermentación por lote, para las diferentes formulaciones de mosto de cebada.	51
Figura 16.	Cinética de producción de alcohol en un sistema de fermentación por lote para las diferentes formulaciones de mosto de cebada.	52
Figura 17.	Cinética de producción de biomasa usando un sistema semicontinuo para diferentes TRH's.	54
Figura 18.	Cinética de consumo de azúcares y concentración de alcohol en un sistema semicontinuo para diferentes TRH's.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas

AT	Ácido tartárico
ADS	Agar dextrosa sabouraud al 4%
APD	Agar papa dextrosa
CA	Caldo ácido
CGS	Caldo glucosa sabouraud al 2%
MP	Materia prima
RMD	Rango múltiple de Duncan
TRH	Tiempo de retención hidráulico
UFC	Unidades formadoras de colonia

Nomenclatura

$[C/E]_c$	Concentración del elemento en la célula
$[C/E]_{mc}$	Concentración del elemento en el medio de cultivo
X	Concentración de microorganismos (biomasa)
P	Concentración de producto
S	Concentración de sustrato
S_a	Concentración del sustrato de alimentación
FD	Factor de dilución
F	Flujo
Q	Flujo de alimentación
G	Gasto del estándar de glucosa
G'	Gasto de mosto fermentado
r	Productividad volumétrica

E/MP	Relación elemento-materia prima
T	Temperatura
t	Tiempo
TE	Titulación del estándar de glucosa
uA	Unidades de absorbancia
D	Velocidad de dilución
q_s	Velocidad específica de consumo de sustrato
q_p	Velocidad específica de formación de producto
V	Volumen
V_{op}	Volumen de operación

Letras griegas

η_{Azu}	Porcentaje de consumo de azúcares
μ	Velocidad específica de crecimiento celular

1. INTRODUCCIÓN

La producción de cerveza, debido a su larga historia, es considerada generalmente como un típico ejemplo de biotecnología tradicional. A pesar de que pueden existir variaciones en su elaboración dependiendo del tipo específico de cerveza, el proceso completo consiste básicamente de cuatro etapas: 1) malteado, basado en la germinación de la cebada; 2) producción del mosto cervecero, consiste en la extracción e hidrólisis de componentes de la cebada malteada seguido del hervido con la adición de lúpulo; 3) fermentación, se divide en fermentación primaria o principal y maduración y 4) procesamiento final, involucra las etapas de filtración, estabilización y embotellado (Linko *et al.*, 1998).

La etapa más lenta del proceso es la fermentación, donde células de levadura en suspensión fermentan el mosto en reactores por lote, sin agitación externa. La fermentación primaria dura aproximadamente siete días y la maduración puede tomar de una a varias semanas (Willaert y Nedovic, 2006).

La fermentación primaria de cerveza en un sistema continuo proporciona una serie de ventajas frente a la fermentación en un sistema por lote: reducción en el tamaño de los equipos, obtención de un producto con características uniformes y principalmente una significativa disminución del tiempo necesario

para la elaboración del producto (Virkajärvi *et al.*, 2002). Sin embargo, el fracaso de la explotación de los fermentadores continuos en la industria cervecera deriva de la mayor complejidad para su instalación y manejo (Varnan y Sutherland, 1997), así como de la dificultad de lograr el equilibrio correcto de los compuestos sensoriales (Brányik *et al.*, 2008; Dragone *et al.*, 2007). Generalmente se tiene una concentración mayor de diacetilo (2,3-butanodiona, que tiene un fuerte sabor a mantequilla) comparado con los sistemas por lote, al finalizar la maduración la 2,3-butanodioana se reduce a acetoína y a 2,3-butanodiol los cuales tienen aún sabores relativamente altos (Brányik *et al.*, 2008).

Por lo anterior, en este trabajo se implementó un sistema de fermentación semicontinuo que incluye las ventajas de los 2 métodos de fermentación mencionados. Para ello como primer paso se obtuvo una cepa de levadura capaz de emplear el mosto de cebada como fuente de carbono con la consecuente producción de alcohol. Posteriormente se ensayaron 4 formulaciones de mosto de cebada para determinar la más viable para el estudio. Por último se estudió la fermentación semicontinua para diferentes tiempos de retención hidráulico (TRH) mediante el seguimiento del consumo de azúcares reductores, la generación de biomasa y la producción de alcohol.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 La cerveza y sus componentes

La cerveza es una bebida alcohólica no destilada que se obtiene de la fermentación de un mosto elaborado a partir de malta de cebada, con o sin la adición de otros cereales no malteados (adjuntos). La mezcla de estos cereales con agua se transforma en azúcares mediante la digestión enzimática. Posteriormente se agrega a la mezcla el lúpulo y/o sus derivados y finalmente es sometida a un proceso de cocción (López *et al.*, 2002; IICA, 1999; Vincent *et al.*, 2006).

Existen dos tipos básicos de cerveza: ale y lager. Dentro de cada uno de estos tipos básicos existen subtipos con diferentes características que tienen una nomenclatura variable. En la Tabla 1 se presentan algunos nombres registrados en la literatura (López *et al.*, 2002).

Tabla 1. Tipos de cerveza y características organolépticas.

Tipo de cerveza	Subtipos de cerveza
Ale	<p>Pale ale. Es clara, con un alto contenido de lúpulo, es seca y muy amarga.</p> <p>Brown ale. Es oscura, contiene poco lúpulo y es dulce.</p> <p>Bitter. Es clara con un alto contenido de lúpulo y con mucho cuerpo.</p> <p>Mild ale. Es semioscura, de sabor dulce, poco densa y amarga.</p> <p>Stout o Porter. Es muy oscura, con mucho cuerpo, alto contenido de lúpulo, amarga, dulce o seca.</p>
Lager	<p>Pilsener, Hell o Pale. Es clara, con alto contenido de lúpulo, seca y con poco cuerpo.</p> <p>Dortmunder. Tiene características parecidas a la Pilsener pero con un menor contenido de lúpulo y sabor más suave.</p> <p>Munich, Donkel o Dark. Es oscura, de sabor intenso, aromática, con bajo contenido de lúpulo, amargor ligero, dulce y con mucho cuerpo.</p> <p>Bock, Marzen o Marzenbier. Tiene características parecidas a la Munich, pero con mayor contenido de alcohol.</p>

2.1.1 Ingredientes de la cerveza. Para la elaboración de cerveza se requiere de las siguientes materias primas: (i) agua, (ii) malta y (iii) lúpulo.

(i) Agua. El agua empleada en la fabricación de la cerveza es el componente mayoritario y de acuerdo a la NOM-142-SSA1-1995 debe ser potable y podrá utilizarse agua destilada o desmineralizada.

(ii) Malta. La malta es un cereal en etapa temprana de germinación, cuyo proceso de germinación ha sido controlado y detenido mediante la aplicación de secado. Aunque existen maltas de diferentes cereales, el término normalmente se refiere a la malta de cebada (López *et al.*, 2002). La malta contiene las enzimas necesarias para hidrolizar los hidratos de carbono complejos, proceso necesario para la obtención del mosto (Hernández y Sastre, 1999; López *et al.*, 2002; Vincent *et al.*, 2006).

(iii) Lúpulo. El lúpulo se obtiene a partir de los conos maduros de la flor femenina de la planta *Humulus lupulus* y se agrega al mosto como extracto o productos secados (en polvo o en pastillas) en dosis que varían en función del sabor y aroma final deseados para la cerveza (López *et al.*, 2002; Posse, 1993).

2.1.2 El papel de *Saccharomyces*. En la elaboración de cerveza se utilizan principalmente dos especies de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* (cerveza tipo “ale”) y *Saccharomyces carlsbergensis* conocida también como *Saccharomyces uvarum* o *pastorianus* (cerveza tipo “lager”). *Saccharomyces* se encarga de fermentar los azúcares como: glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y maltotriosa presentes en el mosto y en ausencia de oxígeno produce como productos principales etanol y CO₂ (Varnan y Sutherland, 1997).

S. cerevisiae es un hongo levaduriforme que presenta células alargadas, globosas ó elipsoidales, pudiendo encontrarse en agrupaciones de dos, en cadenas cortas, racimos o bien sin agruparse. “La apariencia de las colonias es muy diversa: de color crema a ligeramente café, de lisas a rugosas, en ocasiones sectorizadas y brillantes u opacas” (López *et al.*, 2002), Figura 1. Esta levadura crece de forma óptima a pH’s ácidos (Calaveras, 2004; García, 2005).

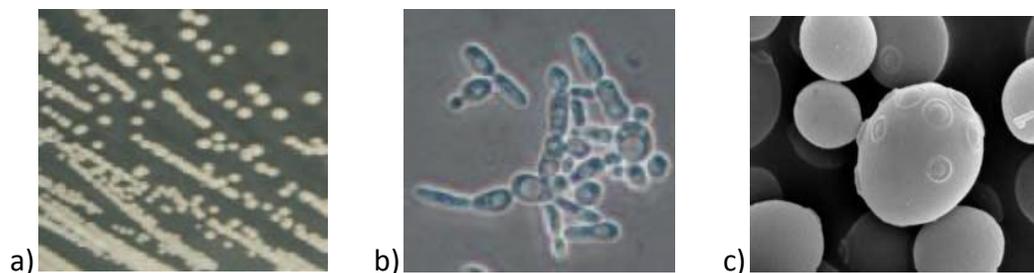


Figura 1. a) Crecimiento de *S. cerevisiae* en agar dextrosa sabouraud y Levadura *S. cerevisiae* en: b) Microscopia de contraste de fases x580 aumentos y c) Microscopía electrónica de barrido, x7040 aumentos (Bial-Aristegui, 2002).

2.2 Proceso de elaboración de cerveza

Para obtener cerveza deben considerarse 4 etapas principales (Hernández y Sastre, 1999):

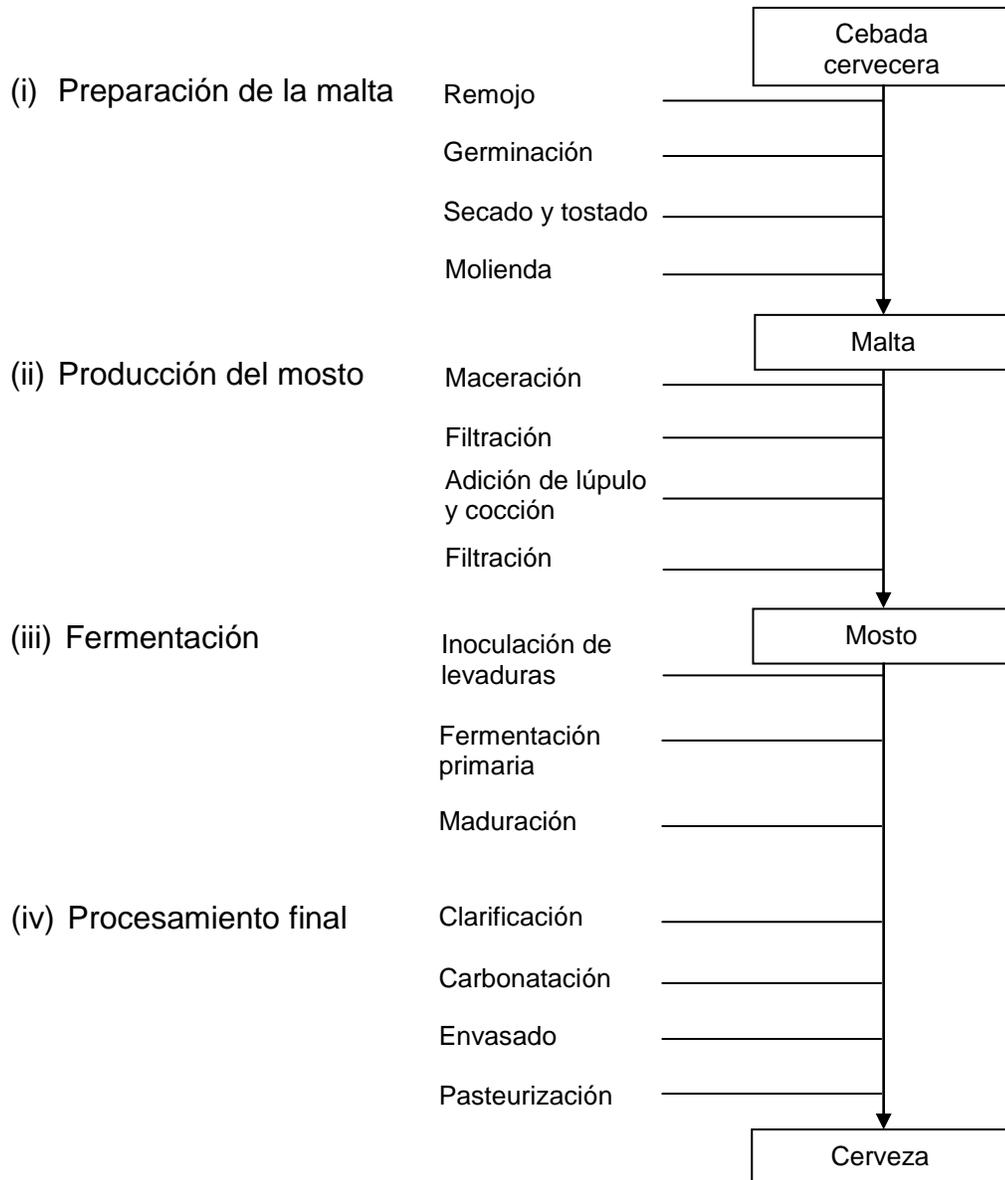


Figura 2. Proceso de elaboración de cerveza.

2.2.1 Preparación de la malta. Tiene como objetivo obtener un polvo rico en enzimas. Para hacer esto, el grano de cebada tiene que ser puesto a germinar a una temperatura de 10 a 16 °C, una humedad de 42 a 46 % y un tiempo de 60 horas. Después, la cebada germinada se seca usando aire caliente iniciando con un calentamiento suave hasta alcanzar la temperatura final dependiendo de las características que se deseen en la malta. Normalmente las temperaturas de secado para maltas lager son de 55 a 70 °C y de 60 a 95 °C para maltas ale. Finalmente se realiza la fragmentación de los granos tostados para obtener la malta en polvo (López *et al.*, 2002; Varnan y Sutherland, 1997).

2.2.2 Producción del mosto. La malta ya molida se mezcla con agua y en ocasiones se adicionan entre un 10 y 20% de otros tipos de granos no germinados, tales como el arroz o el maíz, que proporcionan un sabor más ligero.

La mezcla se calienta gradualmente hasta una temperatura de 48 °C por aproximadamente 20 minutos, en la que se activan principalmente las proteasas, las β -glucanasas y la β -amilasa. Se continúa el calentamiento progresivo por etapas a temperaturas de 60 °C por 30 minutos y posteriormente a 72 °C por 30 minutos más, estas temperaturas corresponden a las temperaturas de activación de las amilasas (López *et al.*, 2002). La solución se filtra y al líquido obtenido se le añade el lúpulo. Finalmente la solución se somete a ebullición por una hora para obtener el mosto.

Las proteasas hidrolizan las proteínas de la malta, dando como resultado la formación de péptidos y aminoácidos, que más adelante, durante la fermentación servirán como nutrientes para la levadura. Las β -glucanasas hidrolizan los glucanos presentes en la cebada; la degradación de estos polímeros es importante para disminuir la viscosidad del mosto. La β -amilasa hidroliza la amilosa y la amilopectina originando maltosa y dextrinas. Las amilasas que se activan entre 60 y 70 °C hidrolizan los enlaces $\alpha(1 - 4)$ de la amilosa y la amilopectina en diferentes puntos del polímero sin acercarse a los puntos de ramificación y a los extremos de la cadena (Vincent *et al.*, 2006).

Al llevarse la cocción del mosto se cubren 7 objetivos tecnológicos (Varnan y Sutherland, 1997):

- (i) Concentración de sólidos en el mosto.
- (ii) Extracción de los componentes del lúpulo.
- (iii) Inactivación de las enzimas de la malta.
- (iv) Esterilización del mosto.
- (v) Eliminación de compuestos volátiles indeseables.
- (vi) Formación de los compuestos responsables del aroma, sabor y color de la cerveza mediante reacciones de Maillard.
- (vii) Coagulación de proteínas y favorecimiento de la reacción entre taninos y proteínas para la formación de compuestos insolubles que precipitan clarificando así el producto.

Después de enfriar y filtrar la solución se obtiene un mosto equilibrado compuesto principalmente por carbohidratos fermentables, aminoácidos y minerales. El mosto sirve como sustrato para el crecimiento de las levaduras y en la producción de etanol. Así mismo es fuente de precursores de aroma y sabor (Varnan y Sutherland, 1997).

2.2.3 Fermentación. En la elaboración industrial de cerveza se emplean dos clases diferentes de fermentación: (i) fermentación alta, aplicada a la elaboración de cerveza tipo “ale”. Durante esta fermentación las levaduras forman un aglomerado que flota en el líquido o pueden flocular a inicios de la fermentación y hundirse el líquido. (ii) fermentación baja, aplicada a la elaboración de cerveza tipo “lager”. En este tipo de fermentación las levaduras floculan al finalizar la etapa, en aglomerados que se hunden en el líquido (Varnan y Sutherland, 1997). Estas fermentaciones operan bajo condiciones de tiempo y temperatura diferentes, sin embargo en ambas la fermentación se lleva a cabo en dos pasos (Linko *et al.*, 1998): la fermentación primaria llamada simplemente “fermentación” y la fermentación secundaria ó “maduración”. En este trabajo se utiliza el término fermentación para la etapa de fermentación primaria.

Durante la fermentación el mosto se somete a temperaturas que van desde 15 a 22 °C para cervezas “ale” y desde 7 a 15 °C para cervezas “lager”. En esta etapa las levaduras metabolizan los carbohidratos del mosto para la generación de etanol y CO₂ predominantemente.

El proceso de maduración consiste en someter al mosto fermentado a bajas temperaturas que van desde 4 a 10 °C por un tiempo de 5 a 10 días. La maduración proporciona a la cerveza sus características finales de olor, color, sabor y brillantez (Hernández, 2003; López *et al.*, 2002; Varnan y Sutherland, 1997).

2.2.4 Procesamiento final. Una vez concluida la maduración, la cerveza es clarificada, carbonatada, envasada y pasteurizada para su embalaje y distribución.

2.3 Evaluación química de la cerveza

Antes de poder determinar la composición química de la cerveza se debe preparar la muestra eliminando el dióxido de carbono presente y llevarla a una temperatura que va de 20 a 25 °C. Si se tiene presencia de material suspendido, deberá eliminarse por filtración (AOAC, 1997).

Según la AOAC las características físicas y químicas importantes para determinar en la cerveza son: color, gravedad específica, viscosidad, concentración de alcohol, etanol, glicerol, pH, azúcares reductores, diacetilo, almidón, proteína, nitrógeno, dióxido de carbono, amargor, minerales residuales y alcoholes superiores.

2.4 La fermentación alcohólica en la elaboración de cerveza

La etapa de fermentación en la elaboración de cerveza generalmente dura una semana a una temperatura de 20 °C (Stanier *et al.*, 1996; Vincent *et al.*, 2006). Durante este proceso el mosto es transformado en un líquido con determinado contenido de alcohol etílico. Al inicio de la fermentación, la levadura comienza su proceso de reproducción. El desarrollo de esta etapa depende de la disponibilidad de oxígeno, fuentes de nitrógeno y de algunos otros nutrientes. Cuando el oxígeno es consumido la reproducción celular se detiene y comienza el proceso anaerobio en el que la glucosa se transforma en etanol y CO₂ (Hernández, 2003; Pares y Juárez, 1997). Las levaduras son las responsables de esta transformación, siendo *S. cerevisiae* la especie de levadura más frecuentemente usada en la industria cervecera (Varnan y Sutherland, 1997).

El balance global de la fermentación se representa mediante la siguiente ecuación química (Vásquez y Dacosta, 2007):



A pesar de la simplicidad de esta ecuación, la secuencia de transformaciones para degradar a una molécula de glucosa hasta dos moléculas de etanol y dos moléculas de dióxido de carbono es un proceso complejo que involucra 2 etapas: (1) la formación en anaerobiosis de 2

moléculas de piruvato a través de la ruta metabólica de Embden-Meyerhof (glucólisis) y (2) la descarboxilación del piruvato en anaerobiosis para dar lugar a dos moléculas de acetaldehído que se reducen a etanol (Hernández, 2003; Varnan y Sutherland, 1997), Figura 3.

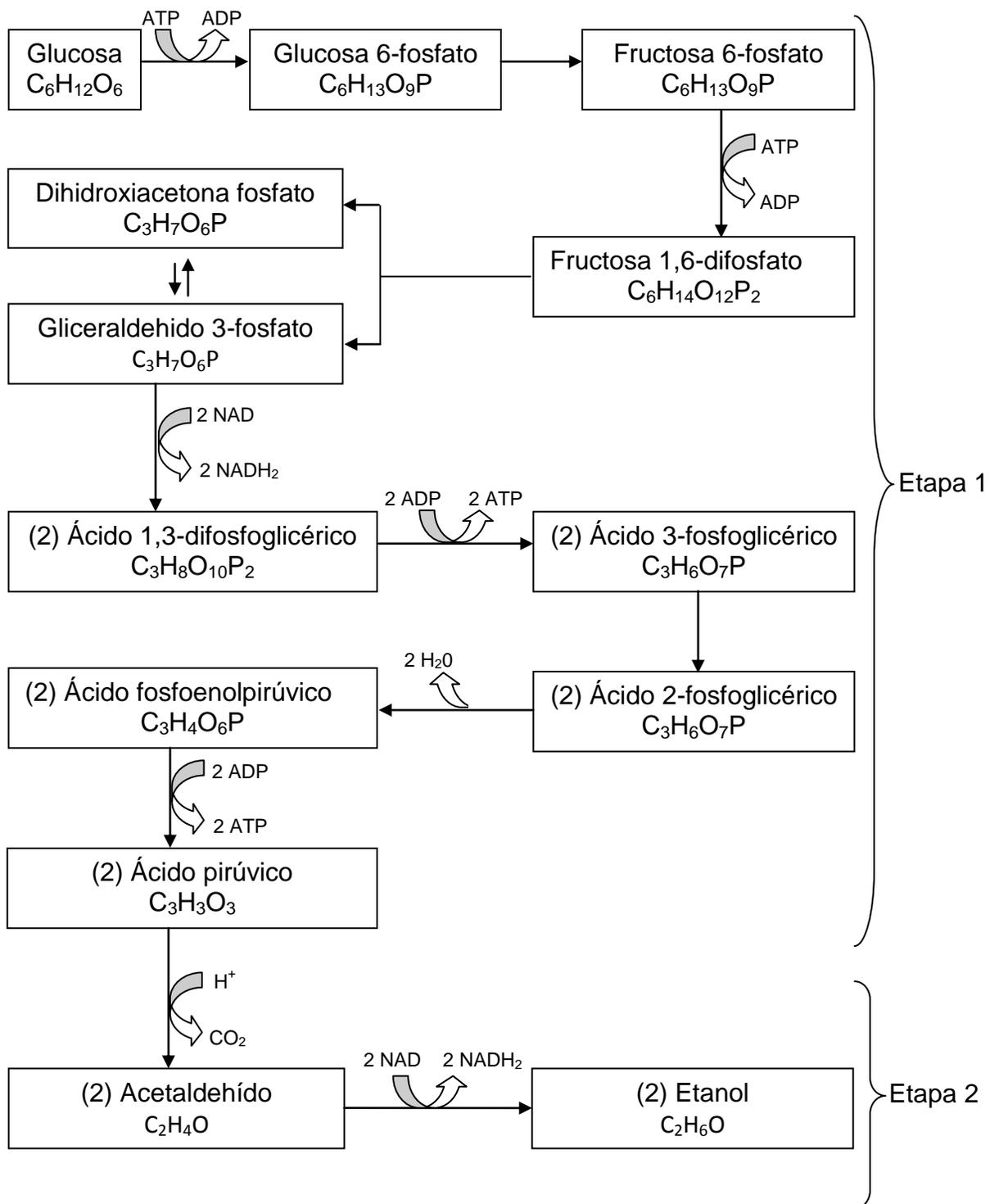


Figura 3. Seguimiento de reacciones para obtener etanol a partir de glucosa.

2.5 Sistemas de fermentación

Un sistema fermentativo se define como el volumen de reacción limitado por un contenedor físico (biorreactor). Donde se lleva a cabo la degradación biológica anaerobia de moléculas orgánicas mediante la acción de ciertas enzimas que actúan directamente o como componentes de ciertas bacterias y levaduras.

El biorreactor más simple es el matraz erlenmeyer (Hernández, 2003; Ruíz *et al.*, 2007). En base a su alimentación, los biorreactores se pueden operar en: continuo, semicontinuo, lote y lote alimentado. En el presente trabajo solo se estudiarán los tres primeros por ser de interés en esta investigación.

2.5.1 Sistema de operación por lote. En el sistema de fermentación por lote inicialmente se añade al biorreactor una solución rica en nutrientes (concentración de sustrato, S_0) la cual se inocula con microorganismos (concentración de biomasa, X) que producen un determinado producto de interés (concentración de producto, P). A medida que procede la fermentación se tiene un estado no estacionario de los componentes del sistema (S , X y P) (Hernández, 2003). La multiplicación celular cesa por limitación de nutrientes y/o acumulación de productos tóxicos de excreción celular. Una vez que se ha alcanzado el nivel deseado de fermentación (S , X , P), el biorreactor se vacía, se lava, se esteriliza y el proceso se repite. Los cambios en los componentes del medio de fermentación dentro del biorreactor producen a su vez cambios en el

metabolismo celular (Harvey y Douglas, 1997; Gummadi, 2007). La ilustración del sistema es mostrado en la Figura 4.

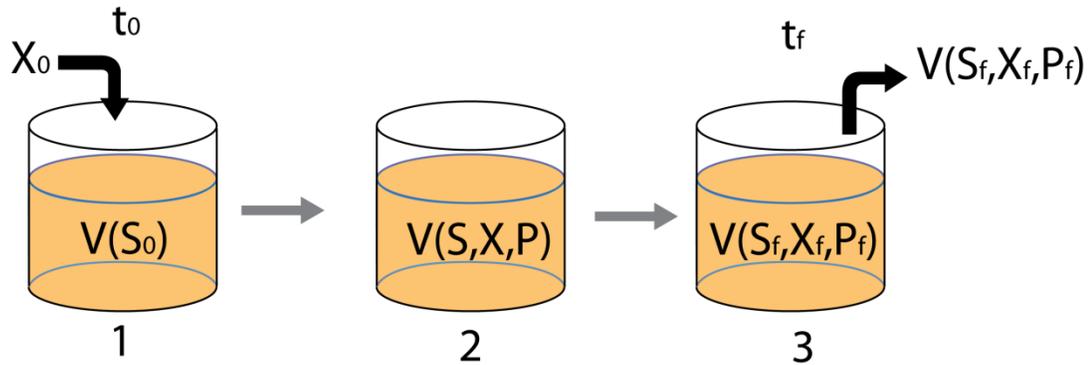


Figura 4. Operación del sistema de fermentación por lote.

El comportamiento del crecimiento de la levadura en el tiempo se representa por una curva de crecimiento (Figura 5), la cual consiste en cuatro fases (Hernández, 2003):

- (i) Fase lag. Representa el periodo de adaptación de la levadura a las nuevas condiciones nutricionales y ambientales. En esta fase no existe aumento en el número de células debido a que la levadura utiliza la energía disponible para sintetizar las enzimas que requiere para su desarrollo en el nuevo medio.
- (ii) Fase logarítmica o exponencial. En esta fase las células se multiplican de manera exponencial. La velocidad de crecimiento puede ser cuantificado con base al número de células que se producen por unidad de tiempo. La fase termina cuando los

nutrientes se agotan, las condiciones ambientales se modifican ó cuando la célula produce metabolitos tóxicos que inhiben su reproducción.

- (iii) Fase estacionaria. En esta fase la velocidad de crecimiento de la levadura es igual a la velocidad de muerte. Una vez que se obtiene la máxima concentración de células, la producción de etanol disminuye.
- (iv) Fase de muerte. Es la fase en la que el número de muertes es mayor al número de nuevas células formadas. Esta fase continúa hasta que la población disminuye a una pequeña fracción de células resistentes o hasta que todas las células mueren.

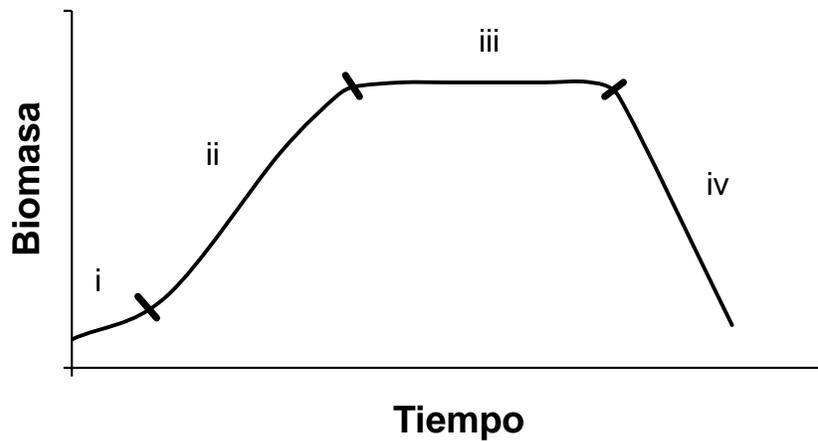


Figura 5. Curva de crecimiento de la levadura.

El balance global de materiales en el sistema por lote se muestra a continuación (Galíndez y Ruiz, 1994):

Balance de biomasa

$$\text{Acumulación} = \text{Entrada} - \text{Salida} + \text{Crecimiento neto}$$

$$V \left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{acumulación}} = 0 - 0 + V \left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{crecimiento}} \quad [2]$$

Definiendo:

$$\frac{dX}{dt} \left(\frac{1}{X} \right) = \mu \quad [3]$$

Y dividiendo entre V se tiene:

$$\left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{acumulación}} = \left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{crecimiento}} = \mu X \quad [4]$$

Donde:

V = volumen del medio en el biorreactor,

X = concentración de microorganismos (biomasa),

t = tiempo y

μ = velocidad específica de crecimiento celular.

Balance de sustrato

$$\text{Acumulación} = \text{Entrada} - \text{Salida} - \text{Consumo}$$

$$V \left(\frac{dS}{dt} \right)_{\text{acumulación}} = 0 - 0 - V \left(\frac{dS}{dt} \right)_{\text{consumo}} \quad [5]$$

Definiendo:

$$\frac{dS}{dt} \left(\frac{1}{X} \right) = q_s \quad [6]$$

Y dividiendo entre V se tiene:

$$\left(\frac{dS}{dt}\right)_{\text{acumulación}} = -\left(\frac{dS}{dt}\right)_{\text{consumo}} = -q_S X \quad [7]$$

Donde:

S = concentración de sustrato y

q_S = velocidad específica de consumo de sustrato.

Balance de producto

Acumulación = Entrada – Salida + Síntesis neta

$$V\left(\frac{dP}{dt}\right)_{\text{acumulación}} = 0 - 0 + V\left(\frac{dP}{dt}\right)_{\text{síntesis}} \quad [8]$$

Definiendo:

$$\frac{dP}{dt} \left(\frac{1}{X}\right) = q_P \quad [9]$$

Y dividiendo entre V se tiene:

$$\left(\frac{dP}{dt}\right)_{\text{acumulación}} = \left(\frac{dP}{dt}\right)_{\text{síntesis}} = q_P X \quad [10]$$

Donde:

P = concentración de producto y

q_P = velocidad específica de formación de producto.

El sistema por lote de fermentación es el más empleado en la industria cervecera.

2.5.1.1 Ventajas. Dentro de las principales ventajas de un proceso por lote se tienen: bajo riesgo de contaminación, flexibilidad operacional cuando el fermentador se utiliza para distintos productos, manejo eficiente entre lote y lote y costos de operación bajos (Gummadi, 2007; Nielsen *et al.*, 2003; Rao, 2005).

2.5.1.2 Desventajas. Las principales desventajas de este modo de operación son tiempos muertos largos que se presentan al momento de vaciar, limpiar y esterilizar el biorreactor para la siguiente fermentación; adicionalmente, este proceso requiere de mucha mano de obra. Dado que se trata de un proceso no estacionario requiere de un mayor cuidado por parte de los operadores. Por otra parte el control y optimización del proceso se vuelven complejos y existe el riesgo de mayor variabilidad entre lotes (Atkinson, 2008; Nielsen *et al.*, 2003; Riet y Tramper, 1991).

2.5.2 Sistema de operación en continuo. En el sistema de fermentación continuo se añade al biorreactor una solución rica en nutrientes (S_0) la cual se inocula con microorganismos (X_0). Una vez inoculado el biorreactor se comienza a suministrar un flujo continuo de alimentación $F(S_a)$. En los sistemas continuos, el flujo de salida (efluente) del biorreactor es igual al flujo de entrada Figura 6.

El flujo de alimentación $F(S_a)$ está compuesto por los nutrientes del medio de cultivo o sustrato, mientras que el efluente $F(S_f, X_f, P_f)$ contiene el sustrato residual, la biomasa, así como los productos de fermentación (Zeng *et al.*, 2001).

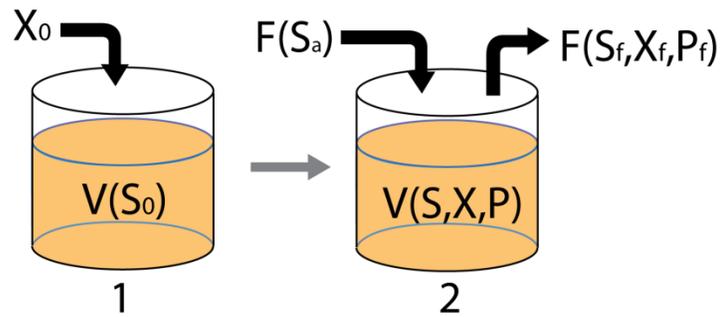


Figura 6. Operación del sistema de fermentación en continuo.

Si se tiene un mezclado homogéneo en el biorreactor, las condiciones son uniformes y esporádicamente se alcanza el estado estacionario (estado de equilibrio dinámico) (Atkinson, 2008). El estado estacionario se define como una condición de estabilidad en la que varios factores permanecen constantes a través del tiempo, entre ellos el volumen de operación y las concentraciones de biomasa, de sustrato y de producto (Hernández, 2003).

El balance global de materiales en sistemas continuos es el siguiente (Galíndez y Ruiz, 1994):

Balance de biomasa

$$\text{Acumulación} = \text{Entrada} - \text{Salida} + \text{Crecimiento neto}$$

$$V \left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{acumulación}} = 0 - FX + V \left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{crecimiento}} \quad [11]$$

$$\left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{acumulación}} = -\frac{FX}{V} + \left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{crecimiento}} \quad [12]$$

Definiendo:

$$\frac{F}{V} = D \quad [13]$$

Se tiene que:

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_{\text{acumulación}} = -DX + \left(\frac{dX}{dt}\right)_{\text{crecimiento}} \quad [14]$$

$$\text{Dado que } \left(\frac{dX}{dt}\right)_{\text{crecimiento}} = \mu X \quad [15]$$

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_{\text{acumulación}} = -DX + \mu X = X(\mu - D) \quad [16]$$

Donde:

F = flujo y

D = velocidad de dilución.

En estado de equilibrio dinámico, los valores de cada una de las velocidades de acumulación se hacen cero por lo que se tiene que:

$$0 = X(\mu - D) \quad [17]$$

$$\mu = D \quad [18]$$

Balance de sustrato

Acumulación = Entrada – Salida – Consumo

$$V \left(\frac{dS}{dt}\right)_{\text{acumulación}} = FS_a - FS - V \left(\frac{dS}{dt}\right)_{\text{consumo}} \quad [19]$$

$$\left(\frac{dS}{dt}\right)_{\text{acumulación}} = DS_a - DS - \left(\frac{dS}{dt}\right)_{\text{consumo}} \quad [20]$$

$$\left(\frac{dS}{dt}\right)_{\text{acumulación}} = D(S_a - S) - \left(\frac{dS}{dt}\right)_{\text{consumo}} \quad [21]$$

Dado que:

$$\left(\frac{dS}{dt}\right)_{\text{consumo}} = q_S X \quad [22]$$

$$\left(\frac{dS}{dt}\right)_{\text{acumulación}} = D(S_a - S) - q_S X \quad [23]$$

Donde:

S_a = concentración del sustrato de alimentación.

Balance de productos

Acumulación = Entrada – Salida + Síntesis neta

$$V \left(\frac{dP}{dt}\right)_{\text{acumulación}} = 0 - FP + V \left(\frac{dP}{dt}\right)_{\text{síntesis}} \quad [24]$$

$$\left(\frac{dP}{dt}\right)_{\text{acumulación}} = -DP + \left(\frac{dP}{dt}\right)_{\text{síntesis}} \quad [25]$$

Dado que:

$$\left(\frac{dP}{dt}\right)_{\text{síntesis}} = q_P X \quad [26]$$

$$\left(\frac{dP}{dt}\right)_{\text{acumulación}} = -DP + q_P X = q_P X - DP \quad [27]$$

2.5.2.1 Ventajas. En la práctica, el sistema continuo provee una pequeña fluctuación de nutrientes, metabolitos y biomasa (Zeng *et al.*, 2001). El método de fermentación permite a los microorganismos crecer en condiciones de estado estacionario en el que el crecimiento ocurre a una velocidad constante. Se logra mantener un estado fisiológico estable en el que se mantiene a la población microbiana en un estado de máxima productividad siempre y cuando los TRH's a los que se opere el sistema no sean mayores a

la velocidad específica de crecimiento (Hernández, 2003; Galíndez y Ruíz, 1994).

2.5.2.2 Desventajas. Puede presentarse contaminación en la alimentación continua del reactor o durante la operación. Esto obligaría a parar el proceso, desechar el producto y a volver a alcanzar el estado estacionario, lo cual puede tomar varias semanas. Otro problema de estos sistemas es que las levaduras pueden mutar a variedades no productoras de etanol (Van Balken, 1997). El proceso continuo requiere costos de inversión y operación elevados, además de que es inflexible cuando se trata de fermentar diferentes productos (López *et al.*, 2002; Varnan y Sutherland, 1997).

Las mutaciones se manifiestan espontáneamente como alteraciones tanto en niveles morfológicos como bioquímicos. Durante la fermentación en sistema continuo, las levaduras de cerveza presentan mutación entre 0.5 y 5% de los cuales aproximadamente el 50% de células mutadas surgen después de nueve meses de operación. El almacenamiento prolongado, la falta de nutrientes y el estrés por etanol son factores que aumentan la aparición de mutaciones (Brányik *et al.*, 2008).

2.5.3 Sistema de operación semicontinuo. Se añade al biorreactor una solución rica en nutrientes (S_0) la cual se inocula con microorganismos (X_0). Una vez inoculado el biorreactor se tiene un comportamiento similar al sistema por lote en el cual se permite un tiempo de crecimiento celular y de formación

del producto (paso 2, Figura 7), a este tiempo se le conoce como tiempo de retención hidráulico (TRH). Después de transcurrido este tiempo cierto volumen del medio de cultivo se extrae del biorreactor “purga” $V_{\text{purga}}(S_f, X_f, P_f)$ y se sustituye por el mismo volumen de medio nutritivo fresco, $V_{\text{alimentación}}(S_0)$. El proceso de purga y alimentación (recambio de medio) se realiza periódicamente a intervalos de tiempo constantes. En el nuevo medio de fermentación las levaduras continúan su crecimiento, así como la formación de productos (Laing y Helm, 1981; Victores *et al.*, 2008).

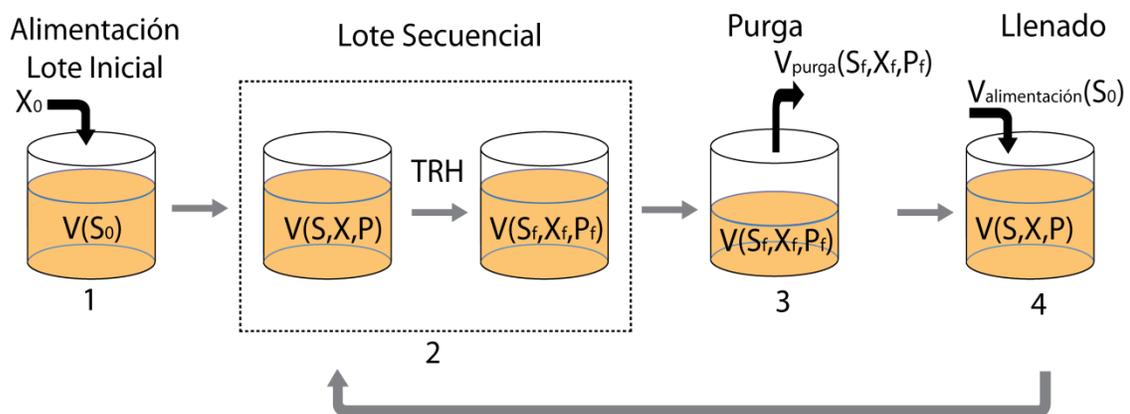


Figura 7. Operación del sistema de fermentación semicontinuo.

Las ecuaciones obtenidas del balance de materiales para el sistema semicontinuo global son similares a las del sistema continuo.

2.5.3.1 Ventajas. El uso de este sistema elimina los tiempos muertos en la línea de producción. Dado que la nueva etapa después del recambio de medio se comienza con un volumen importante de biomasa en crecimiento, el

tiempo de adaptación (fase lag) se reduce de manera importante entre una etapa y otra. Otra ventaja es la posibilidad de operar el biorreactor con concentraciones altas de biomasa y tasas de formación de producto altas con respecto a los sistemas por lote (Victores *et al.*, 2008).

Lo anterior se traduce en un aumento de la productividad volumétrica del sistema semicontinuo en comparación con el sistema por lote.

2.5.3.2 Desventajas. El sistema es más caro de operar y de instalarse en comparación al sistema por lote, puede presentarse contaminación microbiológica y mutación de la cepa si la levadura se mantiene en procesamiento durante largos periodos de tiempo (Brányik *et al.*, 2008; Fondevila y Pérez, 2007).

3. HIPÓTESIS

La aplicación de un sistema semicontinuo en el proceso de fermentación de malta de cebada aumenta la productividad volumétrica con respecto al método tradicional de fermentación por lote.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Obtener una mayor productividad volumétrica de mosto fermentado a partir de malta de cebada mediante el uso de un sistema semicontinuo, en comparación con un sistema por lote.

4.2 Objetivos específicos

1. Aislar y aclimatar levadura liofilizada comercial de panificación, *S. cerevisiae*, a un medio de fermentación de cebada malteada para la producción de alcohol.
2. Seleccionar la mejor formulación de mosto de cebada para el proceso de fermentación, utilizando un sistema por lote.
3. Comparar la productividad volumétrica de los sistemas de fermentación semicontinuo y por lote con base en cinéticas de biorreacción.

5. METODOLOGÍA

Durante la experimentación se emplearon los reactivos mostrados en la Tabla 2, todos grado reactivo. En lo que respecta a la formulación del mosto de cebada se empleó extracto de malta en polvo; Maltex, México, y extracto de lúpulo; Seheyex Lote SH-020305, México. Para el sistema de biorreacción se empleó levadura liofilizada, *S. cerevisiae* para panificación; Nevada.

Tabla 2. Reactivos utilizados en la experimentación.

Reactivo	Abreviatura	Marca
Ácido tartárico	AT	J.T. Baker
Agar dextrosa sabouraud al 4%	ADS	Merk
Agar papa dextrosa	APS	Bioxon
Caldo ácido	CA	DIBICO
Caldo glucosa sabouraud al 2%	CGS	Merk
Glucosa	-	Abaquim
NaOH (Hidróxido de sodio)	-	J.T. Baker
(NH ₄) ₂ SO ₄ (sulfato de amonio granular)	-	J.T. Baker
K ₂ HPO ₄ (fosfato de potasio dibásico)	-	Técnica Química
KNaC ₄ H ₄ O ₆ ·4H ₂ O (tartrato de sodio y potasio)	-	J.T. Baker
CuSO ₄ (sulfato cúprico)	-	J.T. Baker

5.1 Plan de trabajo

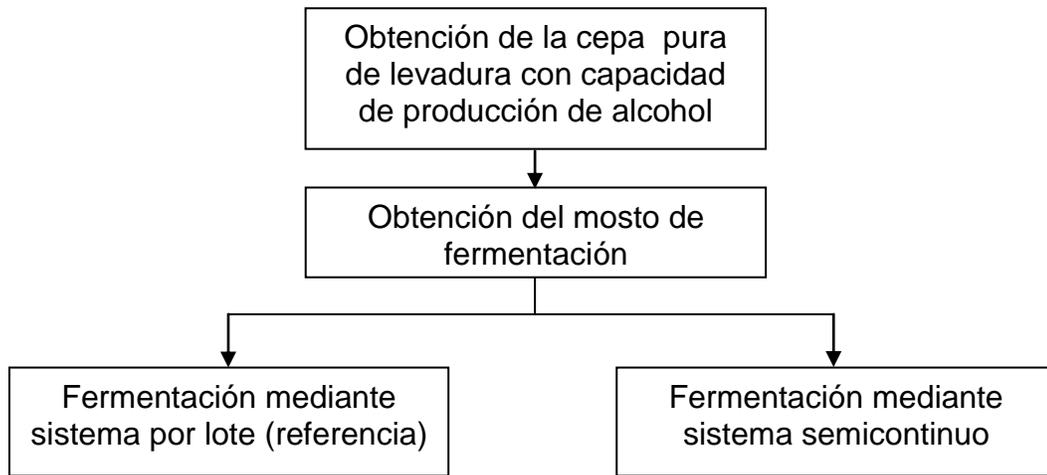


Figura 8. Plan de trabajo general.

5.2 Obtención de la cepa *S. cerevisiae* con capacidad de producción de alcohol

Se partió de levadura liofilizada comercial para panificación y se realizaron los siguientes pasos:

- (i) Activación de la levadura comercial.
- (ii) Aislamiento de *S. cerevisiae*.
- (iii) Mantenimiento de *S. cerevisiae*.
- (iv) Aclimatación de *S. cerevisiae* a un medio de mosto de cebada.

A continuación se detalla la metodología desarrollada en cada una de estas etapas.

(i) Activación de la levadura comercial

La levadura liofilizada comercial para panificación, *S. cerevisiae*, se activó usando CGS. Se prepararon 25 mL de caldo en un frasco de dilución, después de lo cual, el medio se esterilizó. Se le agregó un inóculo de 3.0 g de levadura liofilizada en una campana de flujo laminar (Labconco modelo 36125-50). Se incubó en estufa a 28 °C durante 5 días, después de los cuales se midió el pH con un potenciómetro (Hach modelo 54650-18). Finalmente se tomó una muestra por frotis simple y se observó el crecimiento celular en un microscopio óptico.

Debido a la existencia de contaminación microbiológica en la muestra, se realizó el aislamiento de la levadura *S. cerevisiae* como se describe a continuación.

(ii) Aislamiento de *S. cerevisiae*

El aislamiento de la levadura se realizó mediante el empleo de medios selectivos; APD, CA y ADS (Gutiérrez y Gómez, 2008; Yegres *et al.*, 2003; Zapata *et al.*, 2002). Durante esta etapa se realizó la toma de muestra y siembra en condiciones asépticas, para cada una de las siguientes subetapas (Figura 9):

- a. Del producto obtenido en la etapa (i) se tomó 1 mL de inóculo, se sembró en APD por vertido en placa y se incubó en una estufa a 28 °C durante 5 días. Se realizó un frotis simple de una de las colonias resultantes y se observó el crecimiento obtenido en el microscopio.

- b. Se colocaron 25 mL de CA (pH = 4.1) en un frasco de dilución. Se inoculó con dos hisopos de levadura provenientes de la fase (a) y se incubó a 28 °C durante 5 días.
- c. Del cultivo de levaduras obtenido en la fase (b), se tomó 1 mL y en medio ADS acidificado con 0.2 mL de AT al 10% se sembró por vertido en placa. Se incubó a 28 °C durante 5 días y se observó al microscopio.
- d. Se realizaron resiembras por estriado de la cepa obtenida en medio ADS acidificado hasta observar en el microscopio una cepa de levadura sin contaminación microbiológica.

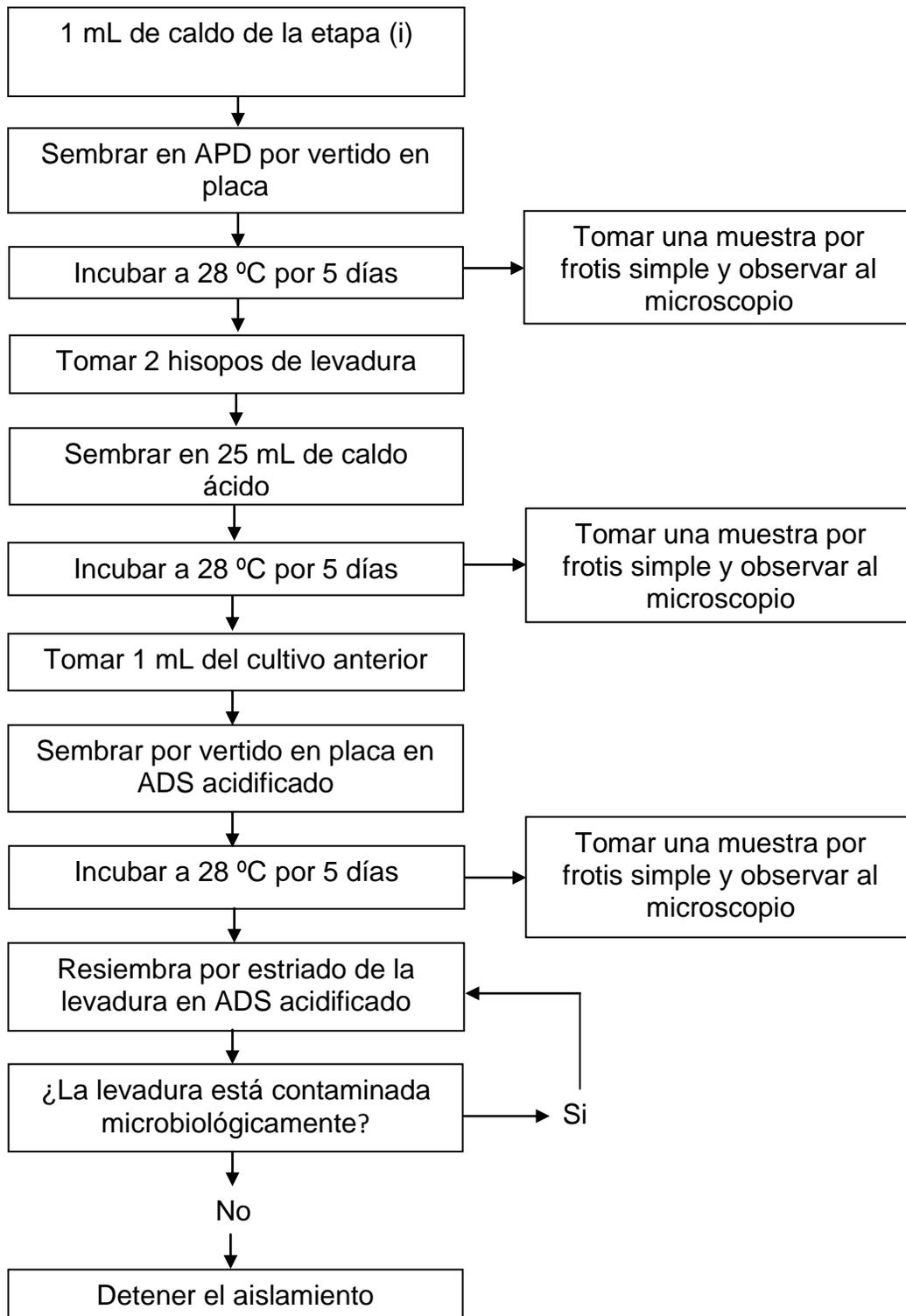


Figura 9. Diagrama descriptivo del aislamiento de *S. cerevisiae*.

(iii) *Mantenimiento de S. cerevisiae*

Se tomó una asada de la cepa pura obtenida en la etapa anterior y se sembró mediante la técnica de estriado en cajas petri y tubos de ensaye en medio de cultivo ADS acidificado. Los medios inoculados se incubaron a 28 °C durante 5 días. Posteriormente, para descartar la posibilidad de contaminación microbiológica, se realizó la observación del crecimiento obtenido en el microscopio.

(iv) *Aclimatación de S. cerevisiae a un medio de mosto de cebada*

La aclimatación de *S. cerevisiae* en el medio de mosto de cebada se realizó en dos fases: La Fase 1 consistió en la formulación de un medio de cultivo sintético para *S. cerevisiae*, empleando glucosa como fuente de carbono de fácil asimilación (López *et al.*, 2002). La Fase 2 consistió en la adaptación de *S. cerevisiae* a un medio de cultivo complejo (mosto de cebada) utilizado para la elaboración de cerveza.

Aclimatación Fase 1 en medio de cultivo balanceado. La preparación del medio de cultivo sintético consistió en formular un medio de cultivo balanceado (medio A) que cubriera las necesidades nutricionales para el crecimiento de la levadura. El medio de cultivo incluye glucosa como fuente de carbono y energía, así como los siguientes componentes: nitrógeno, fósforo, potasio y azufre (Quintero, 1981; Rodríguez, 1987; Vong, 1996). La masa necesaria de cada componente se determinó en base a la fuente de carbono y tomando en cuenta la composición elemental de un microorganismo (Galíndez y Ruiz,

1994), Tabla 3. Empleando las materias primas descritas en la Tabla 4 se calculó la relación del elemento con respecto a la materia prima [E/MP] dividiendo el peso del número de átomos del elemento entre el peso molecular de la materia prima. Se continuó con el cálculo de la cantidad de materia prima con respecto a la fuente de carbono [MP/Glucosa] aplicando la ecuación [28] (Galíndez y Ruiz, 1994):

$$[MP/Glucosa] = [0.40]/\{[C/E]_{mc} [E/MP]\} \quad [28]$$

Tabla 3. Composición elemental de un microorganismo (Galíndez y Ruiz, 1994).

Elemento [E]	Composición celular	Relación [C/E] _c en la célula	Relación [C/E] _{mc} en el medio de cultivo
%C	50	-	-
%N	10	5.0	7.5
%P	1.5	33	50
%K	2.0	25	38
%Mg	0.3	166	251
%S	0.6	83	125
%Ca	0.1	500	750

Tabla 4. Materias primas empleadas para el medio de cultivo sintético y su relación con respecto a la Glucosa como fuente de carbono.

Elemento [E]	[MP]	Peso Molecular	Relación [E/MP] [g/g]	Relación [MP/Glucosa] [g/g]
C	Glucosa	180	0.40	1
N	(NH ₄) ₂ SO ₄	132	0.21	0.254
P	K ₂ HPO ₄	174	0.18	0.044
K	K ₂ HPO ₄	174	0.45	0.023
S	(NH ₄) ₂ SO ₄	132	0.24	0.013

Para la formulación del medio de cultivo sintético se sugirieron 5 g de glucosa y la formulación quedó como se resume en la Tabla 5.

Tabla 5. Formulación del medio de cultivo sintético balanceado (Medio A) para un volumen de 500 mL.

Elemento	Reactivo	Cantidad (g)
C	C ₆ H ₁₂ O ₆	5
N y S	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.335
P y K	K ₂ HPO ₄	0.34

Se preparó un volumen de operación (V_{op}) de 500 mL del medio A, después de lo cual se esterilizó y acidificó con AT. Posteriormente el medio se inoculó con dos asadas de levadura provenientes de la etapa (iii), bajo condiciones asépticas. Después de esto se realizó la fermentación en sistema semicontinuo usando las condiciones de operación mostradas en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de operación para la Fase 1 de aclimatación de *S. cerevisiae* al medio de mosto de cebada (fermentación semicontinua).

Parámetro	Valor
T (° C)*	22±1° C
Q (mL/día)	100
TRH (días)	5

Nota: * Temperatura del cuarto de incubación controlada por un sistema de enfriamiento (Mini Split, Carrier modelo TAC490).

Las condiciones de fermentación empleadas se basan en las mencionadas por Varnan y Sutherland (1997) y Desrosier (1998) para cerveza tipo Ale.

Determinación de alcohol. Se determinó la concentración de alcohol en grados Gay-Lussac (°GL) tomando una muestra de 50 mL del volumen de medio fermentado purgado diariamente. Se colocó la muestra en un matraz balón, se agregó 100 mL de agua destilada y la mezcla se destiló hasta obtener 45 mL de volumen destilado. El destilado se transfirió a una probeta de 50 mL y se completó el volumen con agua destilada, se colocó el densímetro cuidando que este no tocara las paredes de la probeta y se tomó la lectura en °GL (Sierra *et al.*, 2007).

Se operó el sistema de fermentación hasta obtener una concentración alcohólica detectable. La levadura obtenida en esta etapa se conservó en medio selectivo ADS acidificado, para lo cual bajo condiciones asépticas se tomó un 1

mL del caldo de fermentación y se sembró por vertido en placa. Una vez crecidas las colonias, se tomó una muestra y se resembró por estriado en cajas petri y en tubo inclinado. Las muestras se incubaron a 28 °C durante 5 días.

Aclimatación Fase 2 en medio de mosto de cebada. Esta fase consistió en aclimatar a las células de *S. cerevisiae* al medio de mosto de cebada (Medio B) el cual consistió en la formulación descrita en la Tabla 7.

Tabla 7. Formulación del mosto de cebada (Medio B).

Materia prima	Cantidad
Malta	166.4 g
Lúpulo	2.5 g
Agua	960 mL

Para preparar el mosto de cebada se llevó a cabo el procedimiento mostrado en la Figura 10 (López, *et al.*, 2002).

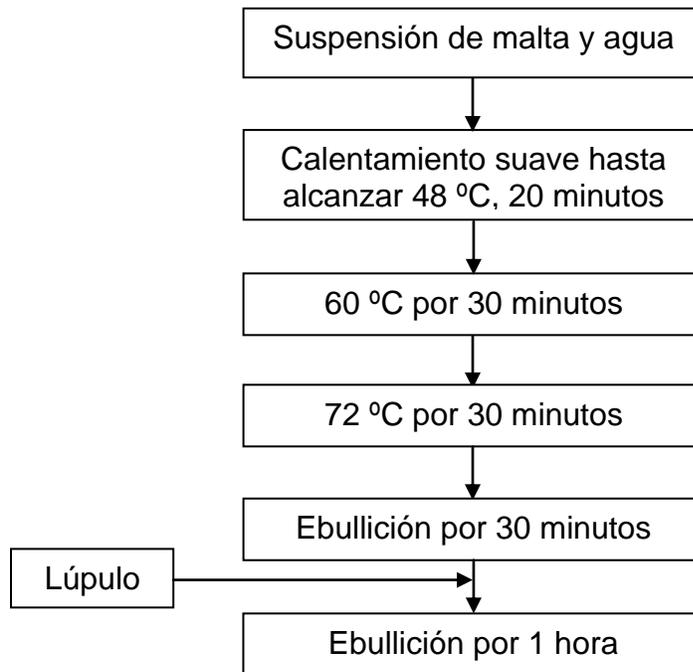


Figura 10. Procedimiento para la obtención del mosto de cebada (López, *et al.*, 2002).

Para lograr el objetivo de la Fase 2, se sustituyó progresivamente el medio A por medio B de acuerdo a la Tabla 8. Inicialmente se inoculó un medio que contenía 90% de A y 10% de B, con 2 asadas de levadura de la Fase 1. Se realizó una fermentación semicontinua, bajo las siguientes condiciones de operación $V_{op} = 1000 \text{ mL}$, $TRH = 5 \text{ días}$, $Q = 200 \text{ mL/día}$, $T = 22 \pm 1 \text{ °C}$.

Para pasar de un medio de fermentación a otro, se inocularon 10 mL del medio fermentado anterior en 990 mL de medio fresco con la nueva composición.

Tabla 8. Porcentajes de medio A y B empleados en la aclimatación de la levadura a mosto de cebada.

Medio de Fermentación (MF)	Semana	Medio A (%)	Medio B (%)
1	1	90	10
2	3	80	20
3	5	70	30
4	7	60	40
5	9	50	50
6	11	40	60
7	13	30	70
8	14	20	80
9	15	10	90
10	16	0	100

Se determinó diariamente la concentración de alcohol usando el método del densímetro. Para la conservación de la levadura aclimatada se realizó el procedimiento mencionado en la Fase 1.

5.3 Obtención del mosto de fermentación

El mosto de fermentación es el producto obtenido de la mezcla de malta, lúpulo y agua (Hernández, 2003). Para la selección del mosto de fermentación, se ensayaron 4 formulaciones de mosto de cebada, de las cuales de la

formulación F1 a la F4 se varió la cantidad de lúpulo para disminuir el amargor del producto final, Tabla 9.

Tabla 9. Formulaciones de mosto para fermentación.

Reactivo	Formulación			
	F1 ¹	F2 ²	F3*	F4*
Malta	166.4 g	100 g	100 g	100 g
Lúpulo	2.5 g	2.5 g	1.5 g	0.7 g
Agua	960 mL	960 mL	960 mL	960 mL

Notas: ¹Angiolani, 1960; ²Hernández y Sastre, 1999; *Propuestas.

Para cada formulación se preparó un V_{op} de 1400 mL de la solución de malta y agua y se sometió a tres incrementos de temperatura. Esto tuvo como finalidad activar las enzimas de la malta y propiciar la hidrólisis de azúcares complejos (Varnan y Sutherland, 1997), Figura 10.

Los mostos resultantes de las formulaciones mostradas en la Tabla 9 se fermentaron usando el sistema por lote con las siguientes condiciones de operación: $V_{op} = 1400$ mL, $T = 19 \pm 1^\circ$ C y $t = 5$ días. Se realizaron muestreos en el reactor cada 24 horas tomando un volumen de 70 mL para determinar la concentración de alcohol ($^\circ$ GL) y la concentración de azúcares reductores (g/L).

Determinación de azúcares reductores. La determinación de azúcares reductores se realizó por el método de Fehling usando azul de metileno como indicador (CPNT, 1995). Inicialmente se tomaron 10 mL de mosto fermentado y

se llevaron a un aforo de 100 mL con agua desionizada, y la mezcla se colocó en una bureta. Por otro lado en un matraz erlenmeyer se colocaron 5 mL de solución A de Fehling y 5 mL de solución B de Fehling (Apéndice B), se añadieron 2 gotas de azul de metileno y 20 mL de agua desionizada. La solución se llevó a calentamiento con agitación y una vez iniciada la ebullición se agregó gota a gota el mosto fermentado hasta que se alcanzó un color rojo ladrillo. Se tomó la lectura del volumen utilizado y se sustituyó en la ecuación [29] para determinar el contenido de azúcares reductores en g/L.

$$x = \frac{1000 \times TE}{G'} \times FD \quad [29]$$

En la ecuación [29], TE tiene un valor de 0.0484 y se determinó de la titulación del estándar de glucosa (Apéndice B); G' es el gasto del mosto fermentado y FD el factor de dilución.

Determinación de alcohol. La concentración de alcohol se midió por el método del densímetro como se describe en la sección 5.2 (p.36).

Finalizada la etapa de fermentación se llevó a cabo la etapa de maduración. El producto obtenido de la fermentación se centrifugó en un equipo IEC HN-SII a 9000 rpm durante 10 minutos. Después de lo cual, el sobrenadante se colocó en un matraz erlenmeyer estéril y se refrigeró a 4 °C durante 4 días. Al finalizar la maduración se determinó la concentración de alcohol, los azúcares reductores y el pH.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) usando un diseño factorial simple sobre los parámetros de concentración de azúcares reductores y de alcohol para determinar la existencia de diferencia significativa entre los datos en función del tiempo de fermentación. Para el análisis estadístico se empleó el software Desing-Expert 6.0.10, utilizando un valor α de 0.05. Posteriormente se aplicó la prueba del rango múltiple de “Duncan” (RMD) con un nivel de significancia de 0.05 y 8 grados de libertad (Montgomery, 2006), para determinar los pares de medias que presentaran diferencia significativa, en los parámetros de concentración azúcares reductores y alcohol.

5.4 Fermentación mediante el sistema semicontinuo

El estudio de la fermentación semicontinua se realizó mediante un diseño experimental factorial simple que relaciona el efecto del factor tiempo de retención hidráulico (TRH) con 3 niveles (5, 4 y 3 días) sobre tres variables de respuesta: concentración de biomasa, concentración de azúcares reductores y concentración de alcohol.

Para cada TRH se realizaron tres corridas con un V_{op} de 1400 mL de mosto de cebada preparado según la formulación seleccionada en la sección 5.3. Posteriormente, el mosto se inoculó asépticamente con 2 asadas de cepa pura de *S. cerevisiae* y se puso a fermentar bajo condiciones anaeróbicas. Las condiciones de operación de los diferentes tratamientos se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Condiciones de operación de los sistemas semicontinuos para diferentes TRH's.

TRH (días)	T (°C)	Q (mL/día)
5	19 ± 1	280
4	19 ± 1	350
3	19 ± 1	467

Del volumen de purga realizada cada 24 h se tomó una muestra como se menciona en el apartado 5.3 (p. 40) y se midió la concentración de biomasa, azúcares y alcohol.

Determinación de Biomasa. La determinación se llevó a cabo en dos pasos: (i) Se tomó una muestra de mosto fermentado y se midió la densidad óptica a 620 nm (Silva *et al.*, 2008); (ii) Se tomó 1 mL de la muestra de mosto fermentado y se hicieron las diluciones correspondientes para sembrar por vertido en placa en medio ADS acidificado. Se realizó una curva de calibración que relaciona las UFC en función de la densidad óptica (Apéndice A). Con la curva de calibración se pudo determinar las UFC de la muestra mediante el uso de la ecuación de calibración que relaciona la densidad óptica con la biomasa.

La determinación de la concentración de alcohol y azúcares reductores se realizaron como se mencionan en los apartados 5.2 (p.36) y 5.3 (p.40) respectivamente.

Se realizaron observaciones de muestras de mosto fermentado cada 48 h mediante la técnica de frotis simple. Los sistemas de fermentación semicontinuo fueron operados hasta el momento en que se presentó contaminación microbiológica. Para el análisis de resultados se tomó en cuenta el tiempo de fermentación de la muestra que presentó contaminación con mayor rapidez. Los mostos fermentados que no sufrieron contaminación se llevaron a

maduración, después de la cual se determinaron los siguientes parámetros: azúcares reductores, concentración alcohólica y pH.

Es de interés en este estudio el determinar si el sistema semicontinuo llega al equilibrio dinámico (en el que no hay cambios significativos en las variables de respuesta en el transcurso de los TRH's). Para probar esto, los datos obtenidos de las cinéticas (variables de respuesta vs tiempo) se ajustaron a una ecuación lineal empleando la metodología de regresión por mínimos cuadrados. Considerando que la ecuación de la línea recta ajustada está dada por $F(x) = ax + b$, los coeficientes de regresión lineal son (Larson *et al.*, 2006):

$$a = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2} \quad [30]$$

$$b = \frac{1}{n} (\sum_{i=1}^n y_i - a \sum_{i=1}^n x_i) \quad [31]$$

El valor de "a" representa la pendiente y "b" es la ordenada al origen de la recta de ajuste. Cuando el valor de "a" es cero la recta es horizontal.

Se aplicó el método de regresión por mínimos cuadrados a los datos cinéticos para los diferentes TRH's. Se establecieron rangos de datos para probar si la pendiente es cercana a cero y por lo tanto si el sistema llegó al equilibrio dinámico.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Obtención de la cepa *S. cerevisiae* con capacidad de producción de alcohol

Para desarrollar el objetivo propuesto en este trabajo, primero se trabajó en la obtención de una cepa pura de levadura *S. cerevisiae* con la capacidad de aprovechar los carbohidratos presentes en el mosto de cebada y generar alcohol.

A continuación se detallan los resultados obtenidos en el proceso de activación y aclimatación de la levadura.

(i) **Activación de la levadura comercial**

La levadura liofilizada comercial para panificación, *S. cerevisiae* fue inoculada en medio CGS. El medio tenía un pH inicial de 4.5, que es un pH idóneo para el crecimiento de levaduras (Calaveras, 2004). Sin embargo, al realizar la observación al microscopio se detectó contaminación bacteriana (bacilos). Debido a la contaminación observada fue necesario aislar la cepa mediante resiembras sucesivas en placa.

(ii) Aislamiento de *S. cerevisiae*

Para obtener una cepa de levadura libre de contaminación microbiológica se aisló la cepa usando medios selectivos (APD, CA y ADS). Se logró la purificación de la cepa (Figura 11) al cabo de 15 resiembras en medio ADS acidificado.

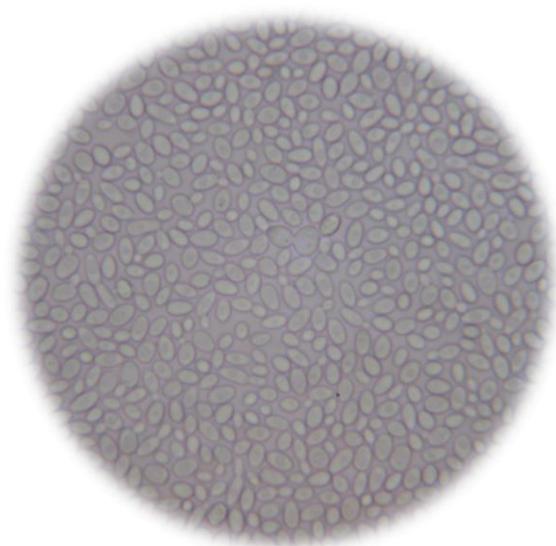


Figura 11. Observación en fresco de levadura *S. cerevisiae* libre de contaminación microbiológica a partir de colonias en placa de agar dextrosa sabouraud.

En la resiembra en ADS número 15 se observaron al microscopio células de levadura elipsoidales, en su mayoría sin agruparse y con gemación multilateral. Las colonias en el medio sólido presentaron apariencia color crema, brillante, húmeda y lisa, lo cual es característico de las levaduras *S. cerevisiae* (López *et al.*, 2002).

(iii) *Mantenimiento de S. cerevisiae*

Después del aislamiento de *S. cerevisiae*, se hicieron resiembras de la cepa para su mantenimiento. Mediante observaciones al microscopio se determinó que los cultivos estaban libres de contaminación microbiológica.

(iv) *Aclimatación de S. cerevisiae a un medio de mosto de cebada*

Aclimatación Fase 1 en medio de cultivo balanceado. Durante los primeros 29 días de fermentación del sistema semicontinuo no hubo producción de alcohol. No fue sino hasta el comienzo de la semana 5 cuando se obtuvo un incremento en la concentración alcohólica, llegándose a obtener un máximo de 5.5 ± 0.1 °GL a principios de la sexta semana, Figura 12.

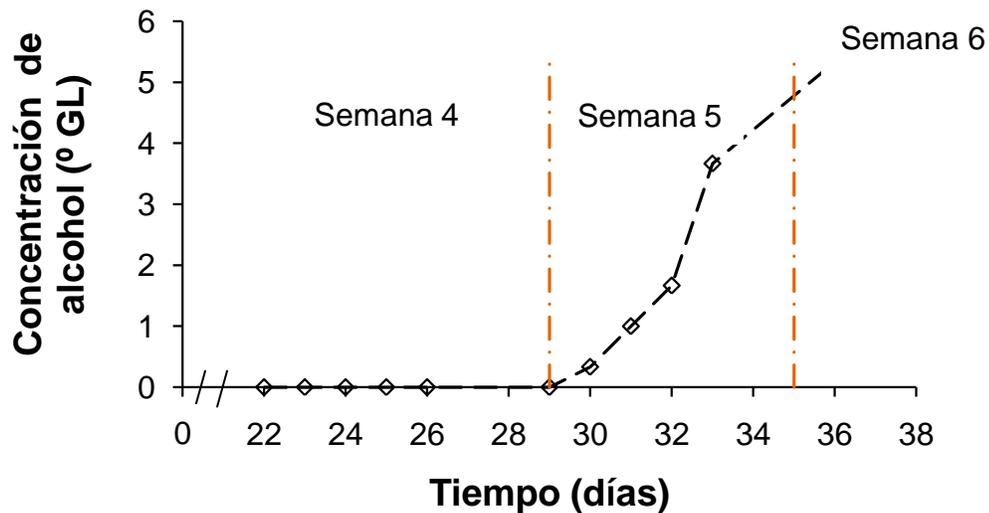


Figura 12. Cinética de concentración de alcohol en medio sintético balanceado para la activación de *S. cerevisiae* usando un sistema semicontinuo.

Aclimatación Fase 2 en medio de mosto de cebada. Una vez obtenida la cepa de *S. cerevisiae* con capacidad de producir alcohol se continuó con la Fase 2 en la cual se sustituyó de forma gradual el medio A (medio sintético balanceado) por el medio B (mosto). Se monitoreó la concentración de alcohol de las diferentes etapas de fermentación con el aumento paulatino del contenido de medio B, hasta llegar al medio de mosto de cebada al 100%, Figura 13.

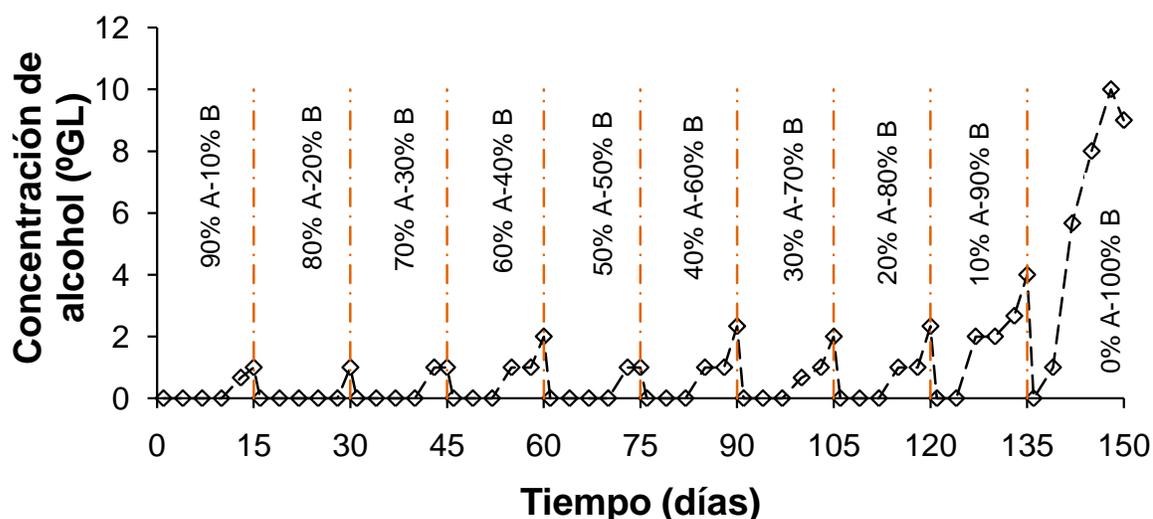


Figura 13. Cinética de producción de alcohol en la sustitución de medio A por medio B en un sistema por lote.

En la Figura 13 se observa un incremento gradual de la concentración de alcohol conforme aumenta el porcentaje de medio B en el biorreactor. Lo anterior podría deberse a que a medida que sustituimos el medio A por B, la concentración de azúcares disponibles en el medio de fermentación aumenta

gradualmente. La concentración máxima de alcohol obtenida en el lote donde se empleó el 100% del medio B fue de 10 °GL.

6.2 Obtención del mosto de fermentación

Para obtener la formulación del mosto de cebada se probaron 4 formulaciones en procesos de fermentación por lote, en las cuales se varió la cantidad de malta y lúpulo.

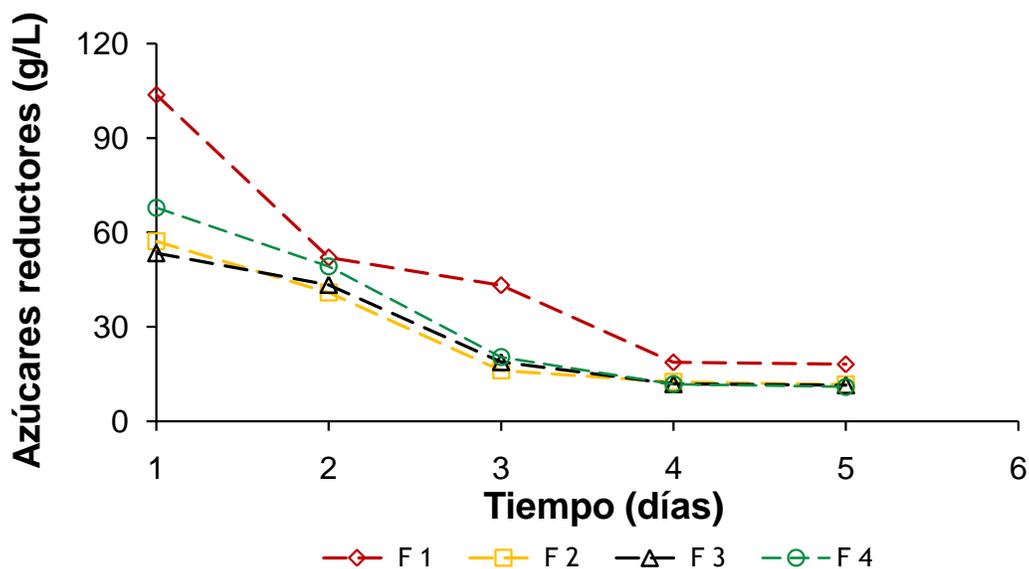


Figura 14. Cinética de consumo de azúcares reductores en sistema de fermentación por lote para diferentes formulaciones de mosto de cebada.

En la Figura 14 se observa que la concentración de azúcares reductores disminuyó con respecto al tiempo. La concentración inicial de azúcares reductores para F1, F2, F3 y F4 fueron de: 104.01, 57.69, 53.40 y 67.94 g/L respectivamente y la concentración final para las mismas formulaciones fueron de: 18.11, 11.71, 11.50 y 11.04 g/L respectivamente. Al final de las

fermentaciones, los porcentajes de consumo de azúcares (η_{Azu}) para las formulaciones F1, F2, F3 y F4 fueron de $(82.53 \pm 1.39)\%$, $(79.59 \pm 1.47)\%$, $(78.46 \pm 0.50)\%$ y $(83.74 \pm 0.8)\%$ respectivamente, Figura 15.

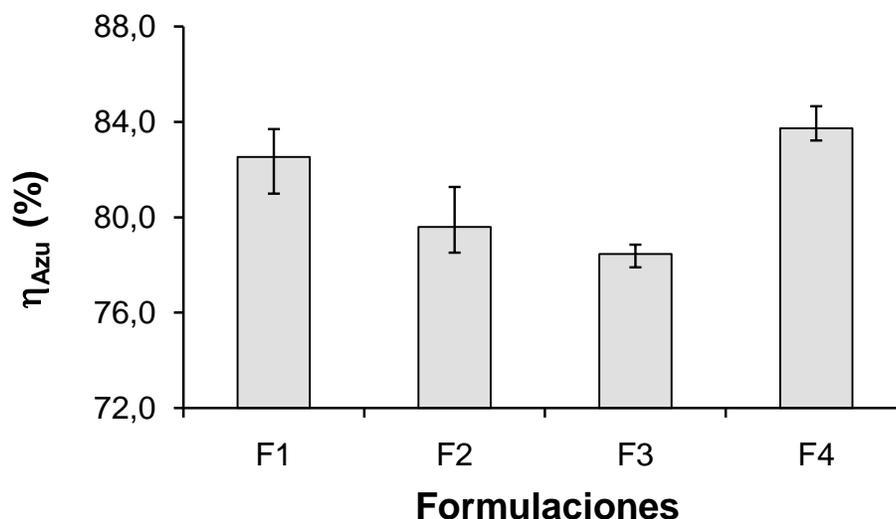


Figura 15. Porcentaje de consumo de azúcares (η_{Azu}) en un sistema de fermentación por lote, para las diferentes formulaciones de mosto de cebada.

Los resultados del estudio de ANOVA y el RMD (Apéndice C) demuestran que no existe diferencia significativa entre los pares de medias de F1 y F4 (grupo a) y entre los pares de medias de F2 y F3 (grupo b) y que a su vez el grupo (a) es estadísticamente diferente del grupo (b).

El criterio escogido para el parámetro de concentración de azúcares reductores fue el que mayor porcentaje de consumo de azúcares presentara. Dado que el mayor porcentaje de consumo de azúcares lo presenta el grupo (b) se puede elegir la formulación F1 ó F4 indistintamente.

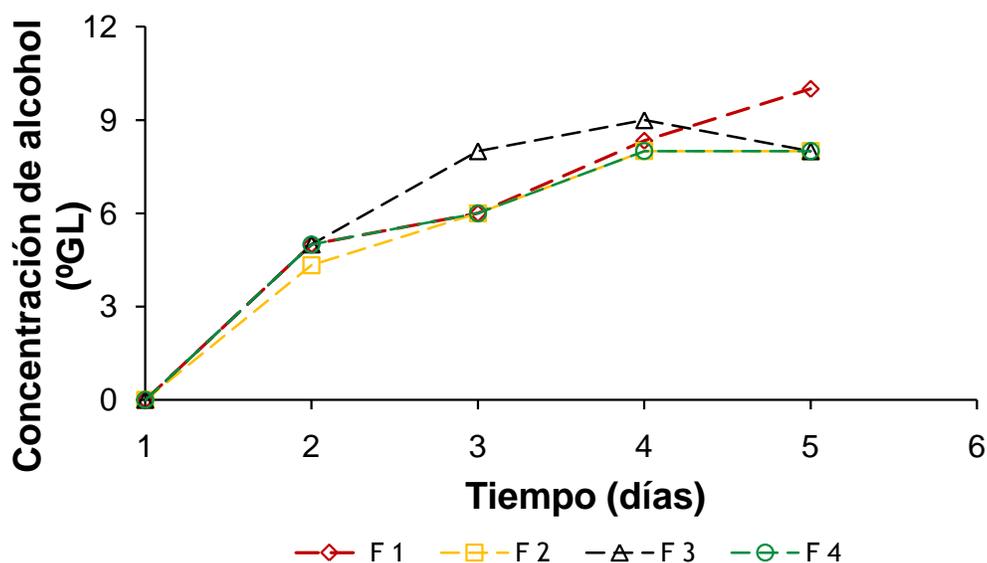


Figura 16. Cinética de producción de alcohol en un sistema de fermentación por lote para las diferentes formulaciones de mosto de cebada.

La concentración final máxima de alcohol para la formulación de mosto de cebada F1 fue de 10 °GL, mientras que para el resto de las formulaciones fue de 8 °GL. Los resultados del estudio de ANOVA y el RMD (Apéndice D) demuestran que la concentración final de alcohol es igual para los pares de medias de F2, F3 y F4 y que F1 es diferente a estas.

López *et al.* (2002) mencionan que en general las cervezas tienen un contenido alcohólico que va de 3 a 6 °GL y que existen cervezas con mayor contenido de alcohol, sin embargo en México se consumen en su mayoría cervezas de bajo contenido de alcohol. Debido a lo anterior se optó por trabajar con las formulaciones que presentaron menor contenido alcohólico resultando las formulaciones 2, 3 y 4 como posibles formulaciones a emplear.

Una vez terminada la fermentación, los medios fermentados se pasaron al proceso de maduración. Las concentraciones de azúcares reductores residuales después de la maduración disminuyeron en 1 g/L en todos los casos. El grado alcohólico se mantuvo constante y el valor promedio del pH fue de 4.40 ± 0.10 . Estos valores concuerdan con los valores reportados por Sierra *et al.* (2007) para cerveza tipo ale.

Se seleccionó la formulación F4 de mosto de cebada para llevar a cabo todos los estudios de fermentación en sistema semicontinuo debido a que presentó una concentración alcohólica de 8 °GL y un mayor η_{AZU} respecto a las otras formulaciones.

6.3 Fermentación mediante el sistema semicontinuo

Se estudió el efecto del tiempo de retención hidráulico (TRH) en la concentración de biomasa, azúcares reductores y alcohol durante procesos de fermentación semicontinua del mosto con formulación F4. Los sistemas semicontinuos se operaron por triplicado con duración de 25 días cada uno debido a que fue el tiempo máximo sin contaminación microbiológica.

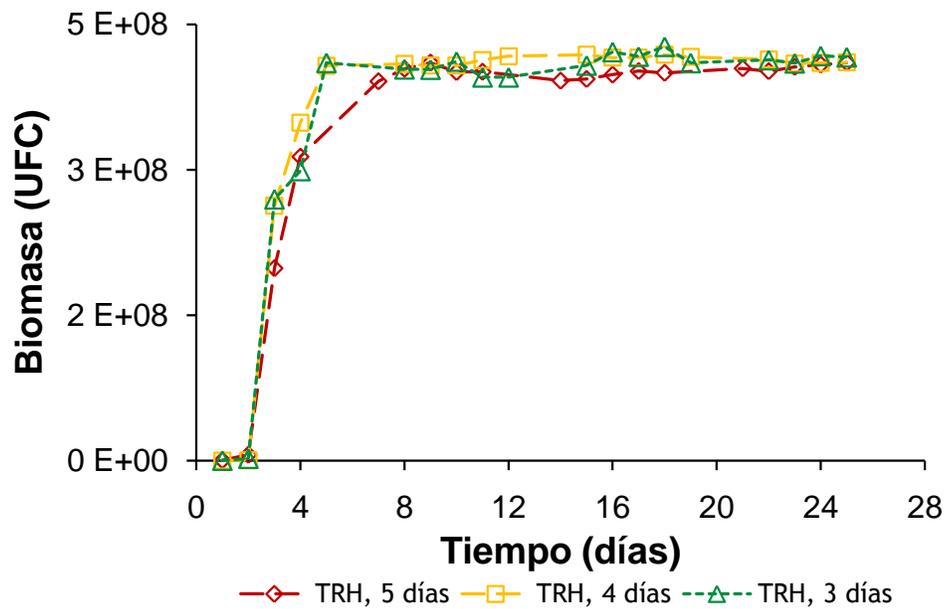


Figura 17. Cinética de producción de biomasa usando un sistema semicontinuo para diferentes TRH's.

Las pendientes resultantes al aplicar regresión por mínimos cuadrados a diferentes rangos de datos de concentración de biomasa en función del TRH (Apéndice E) se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Pendientes obtenidas al aplicar regresión por mínimos cuadrados a diferentes rangos de datos de biomasa en un sistema semicontinuo en función del TRH.

TRH (días)	a_A	Sección a_B	a_C	Tiempo de estabilización (día)
5	1.1294	0.2350	0.0028	8
4	1.3147	0.7200	0.0021	5
3	1.3491	0.0700	0.0071	5

Notas: a_A pendiente de la recta de ajuste de regresión por mínimos cuadrados en la sección A; a_B pendiente en la sección B; a_C pendiente en la sección C.

A medida que transcurre el tiempo de fermentación la pendiente disminuye hasta llegar a un valor aproximado a cero (Tabla 11), lo cual nos indica que el sistema semicontinuo alcanza un estado de equilibrio dinámico (Galíndez y Ruiz, 1994).

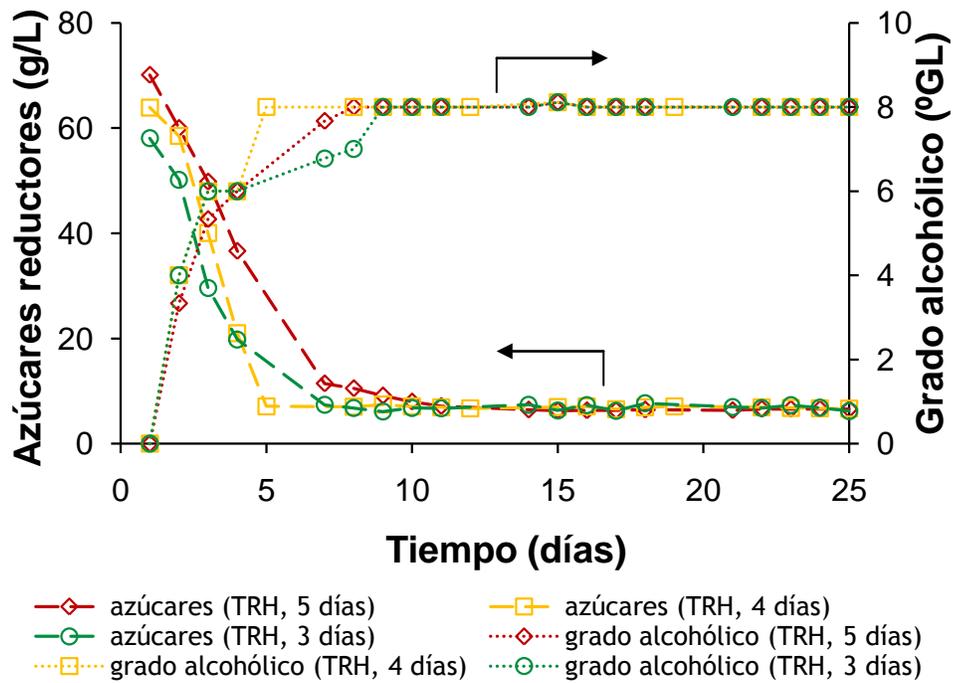


Figura 18. Cinética de consumo de azúcares y concentración de alcohol en un sistema semicontinuo para diferentes TRH's.

Las pendientes resultantes de aplicar la regresión por mínimos cuadrados a los datos de concentración de azúcares reductores y concentración de alcohol al trabajar con los diferentes TRH's (Apéndice F) se muestran las Tablas 12 y 13 respectivamente.

Tabla 12. Pendientes obtenidas al aplicar regresión por mínimos cuadrados a diferentes rangos de datos de azúcares reductores en un sistema semicontinuo en función del TRH.

TRH (días)	Sección			Tiempo de estabilización (día)
	a _A	a _B	a _C	
5	-9.8594	-1.1780	0.0075	11
4	-5.4119	-17.3134	0.0203	5
3	-7.8947	-13.8241	0.0004	5

Notas: a_A pendiente de la recta de ajuste de regresión por mínimos cuadrados en la sección A; a_B pendiente en la sección B; a_C pendiente en la sección C.

Tabla 13. Pendientes obtenidas al aplicar regresión por mínimos cuadrados a diferentes rangos de datos de concentración de alcohol en un sistema semicontinuo en función del TRH.

TRH (días)	Sección			Tiempo de estabilización (día)
	a _A	a _B	a _C	
5	2.6667	0.5392	0.0004	8
4	3.0000	1.0000	0.0001	5
3	2.2000	0.3137	0.0006	9

Notas: a_A pendiente de la recta de ajuste de regresión por mínimos cuadrados en la sección A; a_B pendiente en la sección B; a_C pendiente en la sección C.

Como podemos ver en las Tablas 12 y 13, a medida que transcurre el tiempo de fermentación las pendientes disminuyen hasta llegar a un valor aproximado a cero, esto nos confirma que el sistema semicontinuo alcanza un estado de equilibrio dinámico entre lotes secuenciales.

Los tiempos mínimos de fermentación a partir de los cuales se obtuvo un estado de equilibrio dinámico para todas las variables de respuesta en función de los TRH's de 5, 4 y 3 días fueron en los días 11, 5 y 9 de fermentación respectivamente.

Para evaluar el sistema de fermentación semicontinuo con respecto al sistema de fermentación tradicional (sistema por lote), se compararon las productividades volumétricas de ambos sistemas de fermentación, las cuales se calcularon mediante la ecuación [32].

$$r = \frac{V_{\text{producto}}}{t} \quad [32]$$

Donde “r” es la productividad volumétrica, “ V_{producto} ” el volumen de producto obtenido y “t” el tiempo requerido para la obtención del producto.

La fermentación en sistema por lote requiere de 6 días: 5 días para la fermentación y 1 día para la preparación del material y del medio de fermentación. Se considera un volumen de operación de 1400 mL, por ser el volumen con el que se operó el sistema semicontinuo. Sustituyendo estos datos en la ecuación [32] se tiene una productividad volumétrica para un sistema por lote de:

$$r = \frac{1400 \text{ mL}}{6 \text{ días}} = 233 \text{ mL/día}$$

Para calcular las productividades volumétricas del sistema semicontinuo en función del TRH, se consideraron para “ V_{producto} ” los volúmenes de producto

obtenidos a partir del momento en que el sistema semicontinuo alcanzó el equilibrio dinámico y “t” los tiempos que permaneció el equilibrio dinámico.

En la Tabla 14 se presentan los tiempos de equilibrio dinámico en función del TRH, los volúmenes de producto obtenidos durante el equilibrio y las productividades volumétricas en función del TRH.

Tabla 14. Productividades volumétricas en sistema semicontinuo y por lote.

TRH	Tiempo de equilibrio dinámico (días)	Volumen (mL) de:		r (mL/día) (semicontinuo)	r (mL/día) (por lote)
		Purga	Producto (semicontinuo)		
5	14	280	3920	280	
4	20	350	7000	350	233
3	16	467	7472	467	

Como se puede observar en la Tabla 14 la productividad volumétrica de la fermentación en sistema semicontinuo para los tres TRH's fue mayor con respecto a la productividad del sistema por lote. Para un TRH de 5 días la productividad volumétrica fue mayor respecto al sistema por lote en 47 mL/día, el TRH de 4 días presentó una productividad volumétrica superior en 117 mL/día y para un TRH de 3 días esta productividad fue mayor en 234 mL/día en comparación a l sistema por lote.

De acuerdo a los resultados anteriores, la fermentación en sistema semicontinuo para los tres TRH's ensayados provee de un mayor volumen de producto bajo condiciones de equilibrio dinámico.

7. CONCLUSIONES

1. Se aisló y se conservó una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* libre de contaminantes microbiológicos a partir de una levadura comercial para panificación y fue capaz de producir alcohol, obteniéndose valores entre 5 y 10°GL.
2. La formulación F4 de mosto de cebada con 100 g de malta, 0.7 g de lúpulo y 960 mL de agua, se escogió de acuerdo a los criterios establecidos.
3. Se pueden realizar fermentaciones en sistema semicontinuo con TRH's de 5, 4 y 3 días por un periodo de 25 días.
4. Empleando un TRH de 5 días se obtuvo 20.2% mayor productividad volumétrica con respecto a un sistema por lote, para un TRH de 4 días esta productividad fue mayor respecto al sistema por lote en un 50.2% mientras que para un TRH de 3 días la productividad volumétrica respecto al sistema por lote fue mayor en un 100.4%.
5. El sistema semicontinuo representa una opción viable de fermentación de mosto de cebada para la obtención de cerveza.

8. PERSPECTIVAS

1. Determinar los azúcares reductores en cervezas comerciales para tener un rango de comparación.
2. Implementar un método diferente para la determinación de la concentración de alcohol.
3. Realizar ensayos de manipulación de la formulación para llegar a una concentración alcohólica deseada.
4. Implementar el proceso de gasificación para el producto madurado mediante el empleo de un gasificador y un dosificador de CO₂.
5. Realizar una evaluación de las características organolépticas del producto.
6. Realizar el perfil de aromas del producto obtenido para descartar la presencia de 2,3-butanodiona debido a que confiere sabores indeseables al producto final.

9. REFERENCIAS

- Angiolani, A. 1960. Introducción a la química industrial: fundamentos químicos y tecnológicos. Editorial Andrés Bello. Chile. pp. 670-687.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1997.
- Atkinson, B. 2008. Reactores bioquímicos. Editorial Reverté. Barcelona. pp. 26-30.
- Brányik, T., Vicente, A.A., Dostálek, P., Teixeira, J.A. 2008 “A review of flavour formation in continuous beer fermentations”. *J. Inst. Brew.* 114 (1), 3-13.
- Calaveras, J. 2004. Nuevo tratado de panificación y bollería. Editorial Mundi-Prensa. España. pp. 155-250.
- Comisión panamericana de normas técnicas (CPNT). 1995.
- Desrosier, N.W. 1998. Elementos de tecnología de alimentos. Editorial CECSA. México. pp. 639-641.
- Dragone, G., Mussato, S.I., Almeida e Silva J.B. 2007. “High gravity brewing by continuous process using immobilised yeast: effect of wort original gravity on fermentation performance”. *J. Inst. Brew.* 113 (4), 391-398.
- Erlend, A., Townsend, J.P., Adams, R.I., Nielsen, K.M., Taylor, J.W. 2006. “Population structure and gene evolution in *Saccharomyces cerevisiae*”. *FEMS.* 702–715.

- Fondevila, M. y Pérez, E.B. 2007. "In vitro study of effect of the liquid phase flow and pH on microbial fermentation in concentrated diets". *J. ITEA*. 28(1), 135-137.
- Galíndez, M.J. y Ruiz, O.N. 1994. Bioingeniería: Fundamentos biocinéticos para el diseño de procesos fermentativos. Editorial Instituto Politécnico de México. México. pp. 60-87
- García, C.V. 2005. Introducción a la microbiología. Segunda edición. Editorial EUNED. Chile. pp. 113-117.
- Gummadi, S.N. 2007. Biochemical Engineering. Editorial Prentice-Hall. pp. 50-140.
- Gutiérrez, R.L. y Gómez, R.A. 2008. Determinación de proteína total de *Candida utilis* y *Sacharomyces cerevisiae* en bagazo de caña. *Revista Lasallista de Investigación*. 5(1), 61-64.
- Harvey, W.B. y Douglas, S.C. 1997. Biochemical Engineering. Editorial M. Dekker. pp. 157-164.
- Hernández, P.A. 2003. Microbiología industrial. Editorial EUNED. Chile. pp. 36-61.
- Hernández, R.M. y Sastre, G.A. 1999. Tratado de Nutrición. Editorial Díaz de Santos. España. pp. 431-438.
- Instituto interamericano de Cooperación para la agricultura (IICA). 1999. Industria de la cerveza. Guía para la aplicación del sistema de análisis de riesgos y de puntos críticos (ARPC). Series agroalimentarias.
- Laing, I. y Helm, M.M. 1981. "Factors affecting the semi-continuous production of *Tetraselmis suecica* (Kyllin) butch in 200-1 Vessels". *Aquaculture*. 22, 137-148.

- Larson, R.E., Hostetler, R.P., Abellanas R.L. 2006. Cálculo. Séptima edición. Editorial pirámide. México. pp. 254-258.
- Linko, M., Haikara, A., Ritala, A., Penttilä, M. 1998. "Recent advances in the malting and brewing industry". *J. Biotechnol.* 65, 85-98.
- López, A., García, G.M., Quintero, R.R., López-Munguía A., Canales, I. 2002. Biotecnología alimentaria. Editorial Limusa. México. pp. 263-312.
- Montgomery, C.D. 2006. Diseño y análisis de experimentos. Segunda edición. Editorial Limusa. México. pp. 65-102.
- Nielsen, J., Villadsen, J., Lidén, S.G. 2003. Bioreaction Engineering principles. Segunda edición. New york. pp. 339-308.
- NOM-142-SSA1-1995. Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial.
- Pares, R. y Juárez, A. 1997. Bioquímica de los Microorganismos. Editorial Reverté. España. pp. 16-20.
- Posse, J. 1993. Productos agropecuarios no tradicionales. IICA. Argentina. pp. 187-193.
- Quintero, R. 1981. Ingeniería bioquímica. Primera edición. Editorial Alhambra Mexicana. México. pp. 215-229.
- Rao, D.G. 2005. Introduction to biochemical engineering. Editorial Tata Mc Graw-Hill. India. pp. 97-128.
- Riet, K.V. y Tramper, J. 1991. Basic bioreactor design. Editorial CRC. New York. pp. 387-413.

- Ruiz, L.H.A., Rodríguez, J.R.M., Rodríguez, H.R., Contreras, E.J.C., Aguilar C.N. 2007. "Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido". *Revista mexicana de ingeniería química*. 6(1), 33-40.
- Sierra, A.I., Morante, Z.S., Pérez, Q.D. 2007. Experimentación en química analítica. Editorial Dykinson. España. pp. 121-136.
- Silva, A.J., Cabrera, I.A., Chairez, I.J. 2008. "Predicción del contenido intracelular de trehalosa en el proceso de producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*". *Revista Mexicana de ingeniería química*. 7(1), 71-78.
- Stanier, R., Villanueva, J., Guerrero, R. 1996. Microbiología. Segunda edición. Editorial Reverté. España. pp. 200-213.
- Van Balken, J.A. 1997. Biotechnological innovations in chemical synthesis. Editorial Butterworth-Heinemann. Gran Bretaña. pp. 278-297.
- Varnan, A.H. y Sutherland, J.P. 1997. Bebidas: Tecnología, Química y Microbiología. Editorial Acribia. España. pp. 307-372.
- Vázquez, H.J. y Dacosta, O. 2007. "Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas". *Ingeniería, Investigación y Tecnología*. 8(4), 249-259.
- Victores, S., Castillo, A., Faife, E., Rabasa, Y., Rodríguez, Y. 2008. "Cultivos semicontinuos como una herramienta para la caracterización celular del híbrido murino 1E10". *Biotecnología Aplicada*. 25 (2), 149-154.
- Vincent, V.M.C., Álvarez, B.S., Zaragoza, C.J.L. 2006. Química industrial orgánica. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. España. pp. 67-93.

- Virkajärvi, I., Vainikka, V.M., Home, S. 2002. "Productivity of immobilized yeast reactors with very high-gravity worts". *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 60, 188-197.
- Vong, T.A.M. 1996. "Estudio de la producción de etanol mediante la fermentación de tres sustratos diferentes obtenidos a partir del banano". Tesis para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Willaert, R. y Nedovic, V. 2006. "Primary beer fermentation by immobilised yeast- a review on flavour formation and control strategies". *J. Chem. Technol. Biot.* 81, 1353-1367.
- Yegres, F., Fernández-Zeppenfeldt, G., Padin, C.G., Rovero, L., Richard-Yegres, N. 2003. *Saccharomyces cerevisiae* en la fabricación del licor cocuy. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 23(1), pp.51-54.
- Zapata, M., José, E., Moreno, O.G., Marquez, F.E.J. 2002. Efectos de los campos magnéticos sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. *INCI.* 27(10), 544-550.
- Zeng, F., Dahhou, B., Goma, G. 2001. Reference model adaptative estimation applied to a continuous flow fermentation process. *J. Chem. Technol. Biot.* 76, 1124-1137.

9.1 Otras fuentes consultadas

Bial-Arístegui. 2002. "*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen". Consultado en enero del 2011. Disponible en red: <http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/039.PDF>.

Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma. "Tipos de cerveza". Consultado en enero del 2009. Disponible en red: <http://www.ccm.com.mx/>.

Grupo Modelo S.A. B. de C. V. "Proceso de elaboración". Consultado en enero del 2009. Disponible en red: http://www.gmodelo.com.mx/como_producimos/como_producimos3.html.

APÉNDICE

A. Curva de calibración de la formulación F4 de mosto de cebada

Se graficaron los valores de densidad óptica vs UFC obtenidos para la formulación.

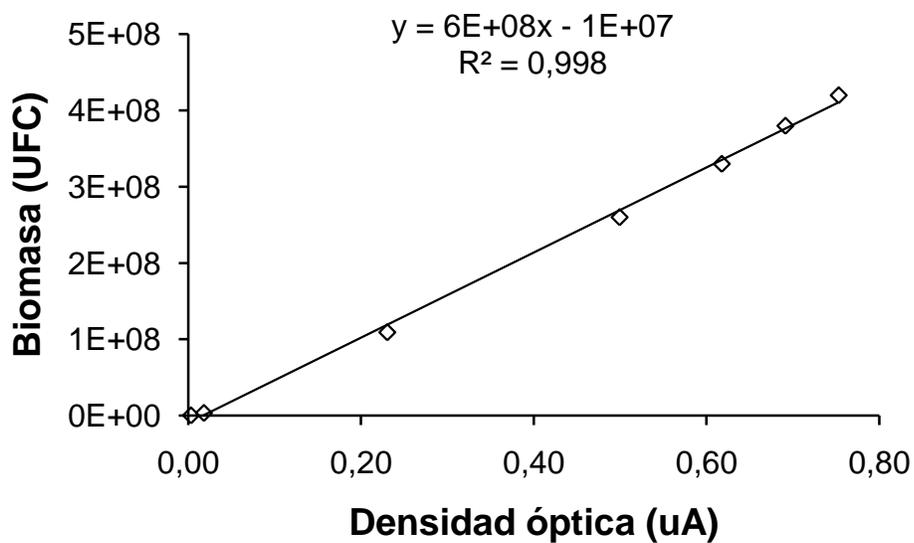


Figura A1. Curva de Calibración de la formulación F4 de mosto de cebada.

B. Titulación del estándar de Glucosa

1. Se preparó una solución estándar de glucosa, 2 en 1000 y se colocó en una bureta.
2. En un matraz erlenmeyer se colocaron 5 mL de solución A de Fehling, 5 mL de solución B, 2 gotas de azul de metileno y 20 mL de agua desionizada.
 - (i) *Solución A de Fehling.* Se preparó una solución al 3% de sulfato cúprico cristalizado.
 - (ii) *Solución B de Fehling.* Se preparó una solución al 15% de sal de Rochelle (tartrato de sodio y potasio) en solución acuosa al 5% de NaOH.
3. La solución se calentó con agitación y una vez iniciada la ebullición se agregó lentamente la solución estándar de glucosa hasta que se alcanzó un color rojo ladrillo.
4. El volumen de estándar de glucosa gastado (G) fue de 24.2 mL y se sustituyó en la ecuación B1 para determinar el valor de la titulación del estándar de glucosa (TE).

$$TE = \frac{2 \times G}{1000} = \frac{2 \times (24.2)}{1000} = 0.0484 \quad [B1]$$

**C. Análisis de varianza (ANOVA) y rango múltiple de Duncan (RMD)
para el porcentaje de consumo de azúcares de las formulaciones de
mosto de cebada**

Tabla C1. ANOVA de los porcentajes de consumo de azúcares reductores para las formulaciones de mosto.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F₀	Prob > F
Métodos	55,830	3	18,610	14,3475	0.0014 significativa
Error	10,3768	8	1,2971		
Total	66,207	11			

Para la prueba del rango múltiple de Duncan (RMD) se tiene un MSE (cuadrado medio del error) de 1.2971, N (numero de observaciones) de 12, n (numero de réplicas) de 3 y 8 grados de libertad.

Los promedios de los tratamientos (formulaciones) se muestran en la Tabla C2.

Tabla C2. Promedio de los tratamientos para el consumo de azúcares reductores para las formulaciones de mosto, en orden ascendente.

Formulación	Promedio
3	78,460
2	79,590
1	82,530
4	83,740

El error estándar de cada promedio es $S_{\bar{y}_i} = \sqrt{1.2971/3} = 0.658$. Del conjunto de rangos significativos de la Tabla VII del apéndice para 8 grados de libertad (Montgomery, 2006) y α de 0.05 se obtienen los datos de la columna $r_{0.05}(\text{formulación}, 8)$ de la Tabla C3 y al calcular los rangos de significancia mínima (ecuación C1) se tiene la columna $R_{\text{formulación}}$ de la Tabla C3.

$$R_{\text{formulación}} = r_{0.05}(\text{formulación}, 8)S_{\bar{y}_i} \quad [C1]$$

Tabla C3. Rangos de significación mínima para los datos de azúcares reductores de las formulaciones de mosto.

Formulación	$r_{0.05}(\text{formulación}, 8)$	$R_{\text{formulación}}$
F2	3,26	2,144
F3	3,39	2,229
F4	3,47	2,282

Los resultados de comparación son mostrados en la tabla C4.

Tabla C4. Comparación de pares de medias para los datos de azúcares reductores de las formulaciones de mosto.

F4 vs F3:	83.74	-	78.46	=	5.28	>	2.282
F4 vs F2:	83.74	-	79.59	=	4.15	>	2.229
F4 vs F1:	83.74	-	82.53	=	1.21	<	2.144
F1 vs F3:	82.53	-	78.46	=	4.07	>	2.229
F1 vs F2:	82.53	-	79.59	=	2.94	>	2.144
F2 vs F3:	79.59	-	78.46	=	1.13	<	2.144

Por el análisis se observa que hay diferencias significativas entre los pares de medias de las formulaciones (F4 vs F3), (F4 vs F2), (F1 vs F3) y (F1 vs F2) y que no existe diferencia significativa entre los pares de medias de (F1 vs F4) y (F2 vs F3).

D. Análisis de varianza (ANOVA) y rango múltiple de Duncan (RMD) para la concentración de alcohol de las formulaciones de mosto de cebada

Tabla D1. ANOVA de la concentración de alcohol para las formulaciones de mosto.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F₀	Prob > F
Métodos	9,000	3	3,000	6,37E+07	< 0.0001
Error	0,000	8	0,000		significativa
Total	9,000	11			

Para la prueba del rango múltiple de Duncan (RMD) se tiene un MSE (cuadrado medio del error) de 0.000, N (numero de observaciones) de 12, n (numero de réplicas) de 3 y 8 grados de libertad.

Los promedios de los tratamientos (formulaciones) se muestran en la Tabla D2.

Tabla D2. Promedio de los tratamientos para la concentración de alcohol en orden ascendente.

Formulación	Promedio
2	8
3	8
4	8
1	10

El error estándar de cada promedio es $S_{\bar{y}_i} = \sqrt{0/3} = 0.00$. Del conjunto de rangos significativos de la Tabla VII del apéndice para 8 grados de libertad y α de 0.05 (Montgomery, 2006) se obtienen los datos de la columna $r_{0.05}(\text{formulación},8)$ de la Tabla D3 y al calcular los rangos de significancia mínima (ecuación C1) se tiene la columna $R_{\text{formulación}}$ de la Tabla D3.

Tabla D3. Rangos de significación mínima para los datos de concentración de alcohol de las formulaciones de mosto.

Formulación	$r_{0.05}(\text{formulación},8)$	$R_{\text{formulación}}$
F2	3,26	0.00
F3	3,39	0.00
F4	3,47	0.00

Los resultados de comparación son mostrados en la tabla D4.

Tabla D4. Comparación de pares de medias para los datos de concentración de alcohol de las formulaciones de mosto.

F1 vs F2:	10	-	8	=	2	>	0.00
F1 vs F3:	10	-	8	=	2	>	0.00
F1 vs F4:	10	-	8	=	2	>	0.00
F4 vs F2:	8	-	8	=	0	=	0.00
F4 vs F3:	8	-	8	=	0	=	0.00
F3 vs F2:	8	-	8	=	0	=	0.00

Por el análisis se observa que hay diferencia significativa entre los pares de medias de las formulaciones (F1 vs F2, F3 y F4) y que no existe diferencia significativa entre los pares de medias de (F4 vs F2 y F3) y (F3 vs F2).

E. Rectas de regresión por mínimos cuadrados de los diferentes rangos de datos de concentración de biomasa para los diferentes TRH's

Para calcular la recta de regresión de mínimos cuadrados, inicialmente se segmentó la curva de acuerdo a su comportamiento. Posteriormente se calcularon las sumatorias de x , y , xy y x^2 para cada segmento y se sustituyeron en las ecuaciones [30] y [31].

i. TRH de 5 días

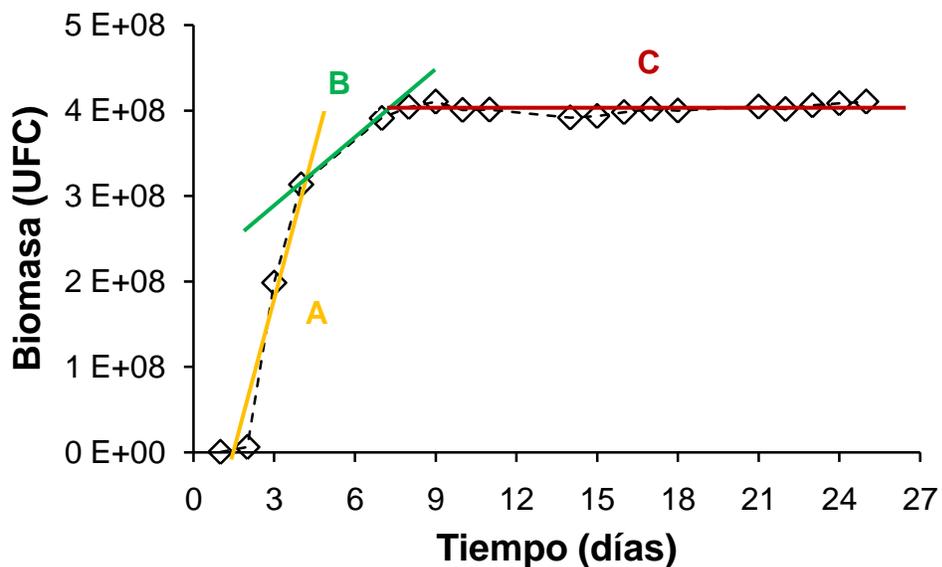


Figura E1. Segmentación de la curva de producción de biomasa para un TRH de 5 días.

La sección A abarcó del día 1 al 4, la sección B los días 4 al 7 y la sección C del día 8 al 25.

Tabla E1. Sumatorias de la sección A de la curva de producción de biomasa para TRH de 5 días.

X	Y	XY	X²
1,0000	0,00458	0,0046	1,0000
2,0000	0,0618	0,1236	4,0000
3,0000	1,9800	5,9400	9,0000
4,0000	3,1300	12,5200	16,0000
Sumatorias			
10,0000	5,1764	18,5882	30,0000

Tabla E2. Sumatorias de la sección B de la curva de producción de biomasa para TRH de 5 días.

X	Y	XY	X²
4,0000	3,1300	12,5200	16,0000
7,0000	3,9100	27,3700	49,0000
8,0000	4,0400	32,3200	64,0000
Sumatorias			
19,0000	11,0800	72,2100	129,0000

Tabla E3. Sumatorias de la sección C de la curva de producción de biomasa para TRH de 5 días.

X	Y	XY	X²
8,0000	4,0400	32,3200	64,0000
9,0000	4,1000	36,9000	81,0000
10,0000	4,0100	40,1000	100,0000
11,0000	4,0100	44,1100	121,0000
14,0000	3,9200	54,8800	196,0000
15,0000	3,9400	59,1000	225,0000
16,0000	3,9800	63,6800	256,0000
17,0000	4,0200	68,3400	289,0000
18,0000	4,0000	72,0000	324,0000
21,0000	4,0500	85,0500	441,0000
22,0000	4,0200	88,4400	484,0000
23,0000	4,0600	93,3800	529,0000
24,0000	4,0800	97,9200	576,0000
25,0000	4,1000	102,5000	625,0000
Sumatorias			
233,0000	56,3300	938,7200	4311,0000

Al sustituir las sumatorias en las ecuaciones [30] y [31] para cada sección se obtuvieron valores de a y b mostrados en la Tabla E4.

Tabla E4. Valores de a y b en las diferentes secciones de la curva de producción de biomasa para TRH de 5 días.

	Sección		
	A	B	C
a	1.1294	0.2350	0.0028
b	-1.5295	2.2050	3.9764

ii. TRH de 4 días

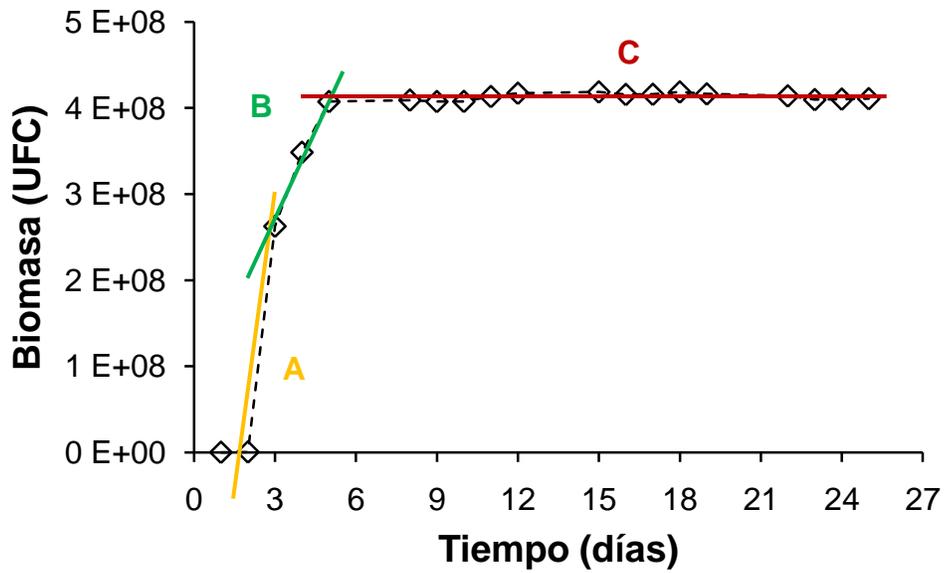


Figura E2. Segmentación de la curva de producción de biomasa para un TRH de 4 días.

La sección A abarcó del día 1 al 3, la sección B del día 3 al 5 y la sección C del día 5 al 25.

Los datos se manejaron de forma similar a los de TRH de 5 días, obteniéndose en las diferentes secciones los valores de a y b mostrados en la Tabla E5.

Tabla E5. Valores de a y b en las diferentes secciones de la curva de producción de biomasa para TRH de 4 días.

	Sección		
	A	B	C
a	1.3147	0.7200	0.0021
b	- 1.7510	0.5133	4.0959

iii. TRH de 3 días

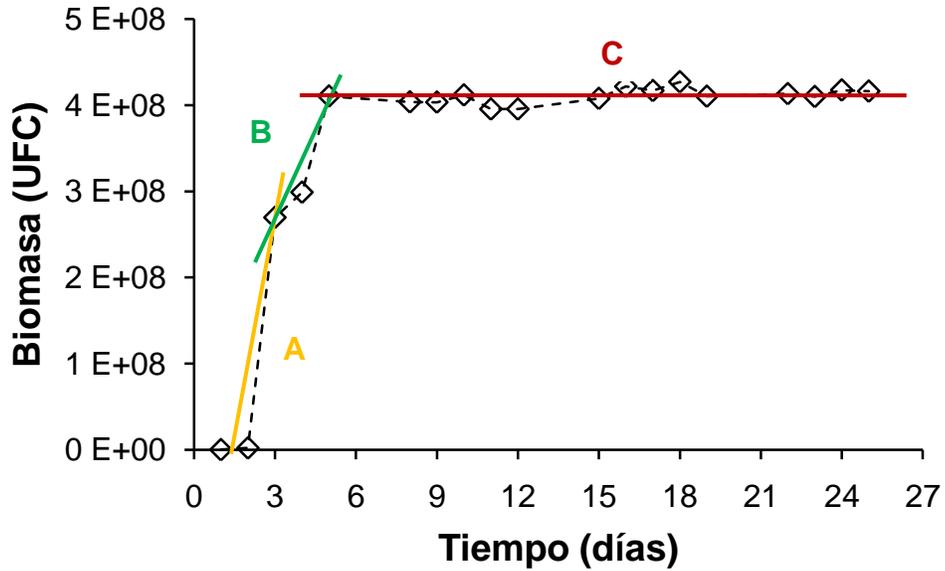


Figura E3. Segmentación de la curva de producción de biomasa para un TRH de 3 días.

La sección A abarcó del día 1 al 3, la sección B los días 3 al 5 y la sección C del día 5 al 25.

Los datos se manejaron de forma similar a los de TRH de 5 días, obteniéndose en las diferentes secciones los valores de a y b mostrados en la Tabla E6.

Tabla E6. Valores de a y b de las diferentes secciones de la curva de producción de biomasa para TRH de 3 días.

	Sección		
	A	B	C
a	1.3491	0.0700	0.0071
b	-1.7903	0.4633	3.9948

F. Recta de regresión por mínimos cuadrados de los datos de concentración de azúcares reductores y concentración de alcohol para los diferentes TRH's

Los pasos para aplicar la regresión de mínimos cuadrados fueron los seguidos en el apéndice E.

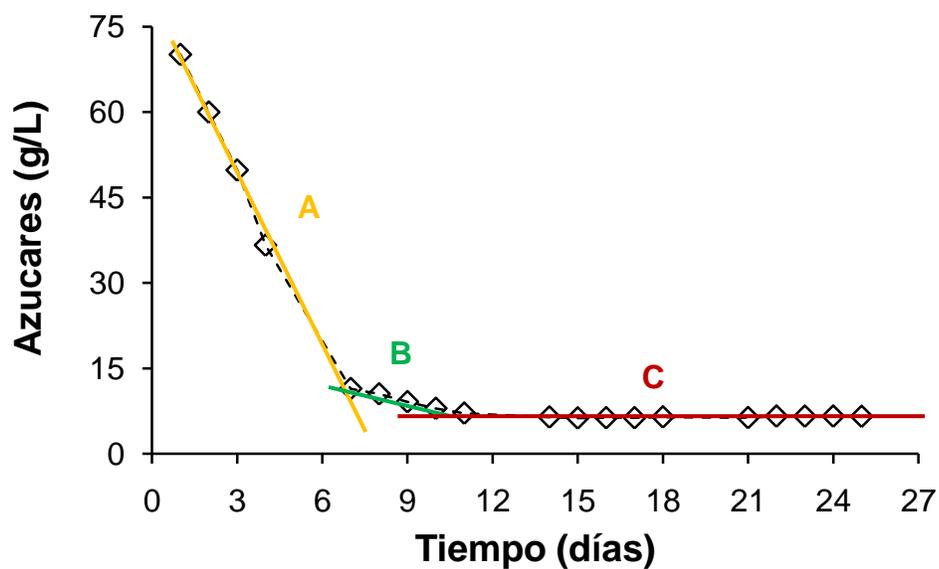


Figura F1. Segmentación de la curva de consumo de azúcares reductores para un TRH de 5 días.

La sección A abarcó del día 1 al 7, la sección B los días 7 al 10 y la sección C del día 11 al 25.

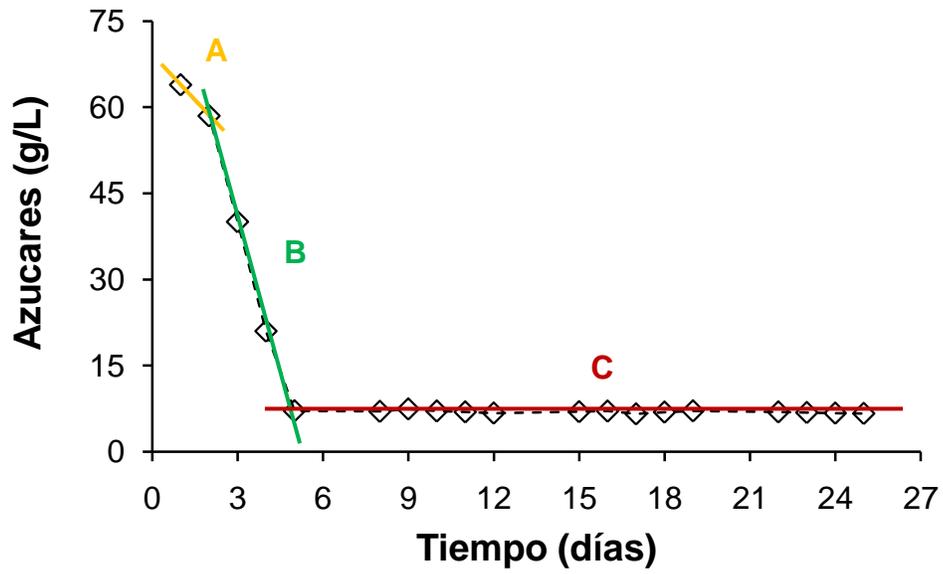


Figura F2. Segmentación de la curva de consumo de azúcares reductores para un TRH de 4 días.

La sección A abarcó del día 1 al 2, la sección B los días 2 al 5 y la sección C del día 5 al 25.

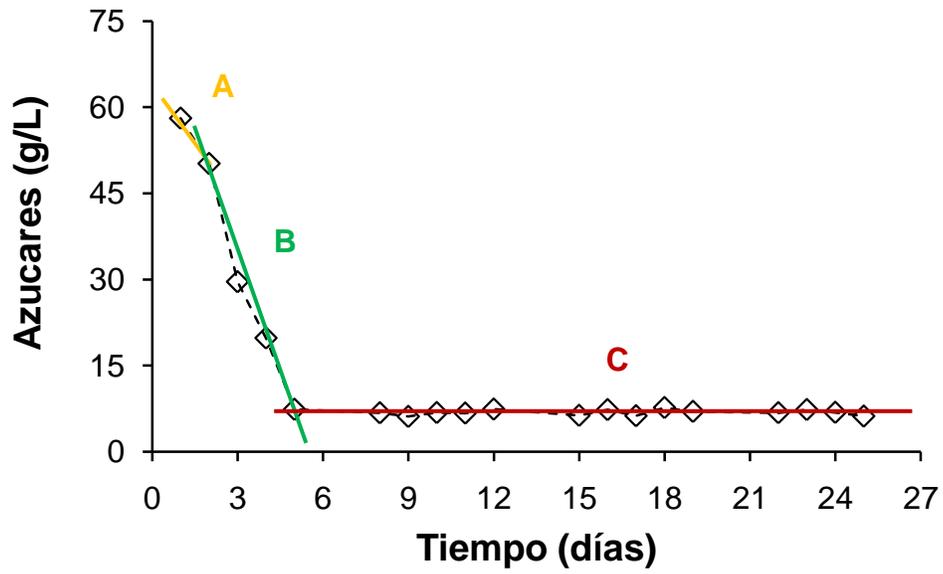


Figura F3. Segmentación de la curva de consumo de azúcares reductores para un TRH de 3 días.

La sección A abarcó del día 1 al 2, la sección B los días 2 al 5 y la sección C del día 5 al 25.

Al aplicar la ecuación [30] y [31] en las diferentes secciones se obtuvieron los valores de a y b mostrados en la Tabla F1.

Tabla F1. Valores de a y b de las diferentes secciones de la curva de concentración de azúcares reductores para los diferentes TRH's.

TRH (días)	Sección			
	A	B	C	
5	a	-9.8954	-1.1780	0.0075
	b	79.1200	19.7782	6.6565
4	a	-5.4119	-17.3134	0.0203
	b	69.3078	92.2579	7.2523
3	a	-7.8947	-13.8241	0.0004
	b	65.9747	75.1212	6.9212

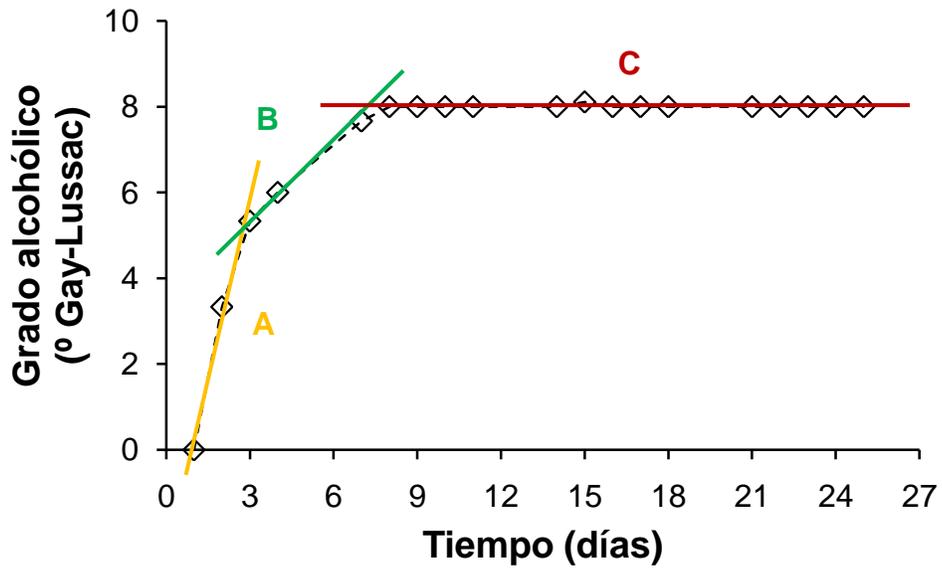


Figura F4. Segmentación de la curva de producción de alcohol para un TRH de 5 días.

La sección A abarcó del día 1 al 3, la sección B los días 3 al 8 y la sección C del día 8 al 25.

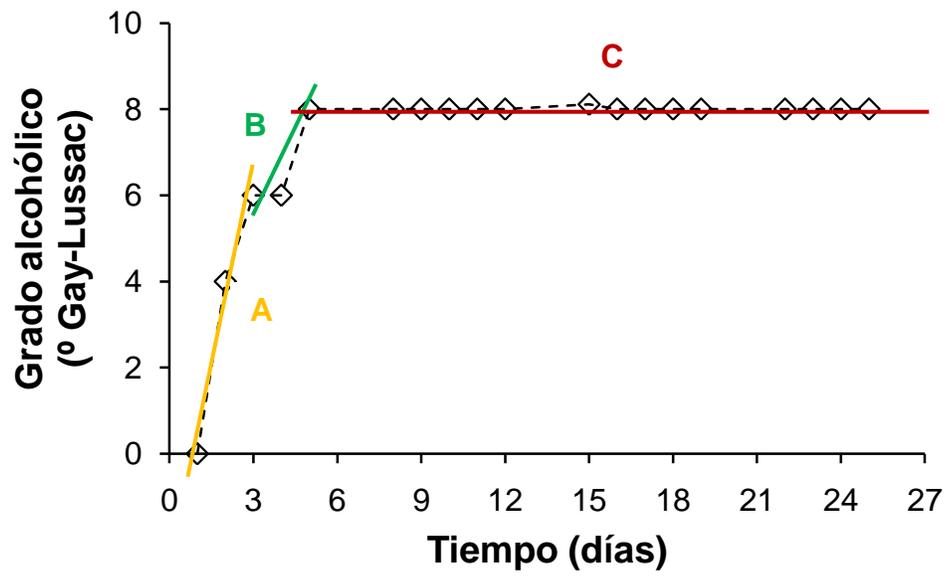


Figura F5. Segmentación de la curva de producción de alcohol para un TRH de 4 días.

La sección A abarcó del día 1 al 3, la sección B los días 3 al 5 y la sección C del día 5 al 25.

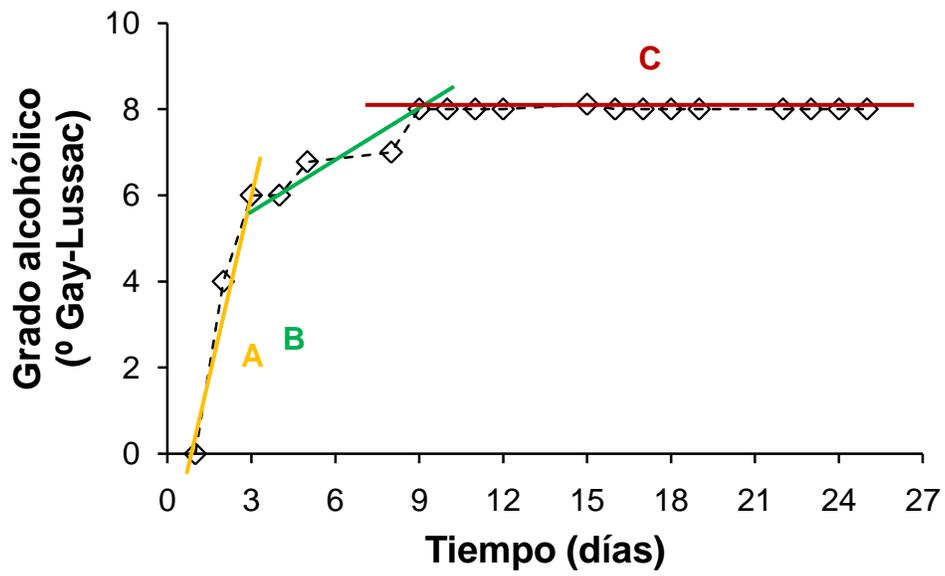


Figura F6. Segmentación de la curva de producción de alcohol para un TRH de 3 días.

La sección A abarcó del día 1 al 3, la sección B los días 3 al 5 y la sección C del día 5 al 25.

Al aplicar la ecuación [30] y [31] en las diferentes secciones se obtuvieron los valores de a y b mostrados en la Tabla F2.

Tabla F2. Valores de a y b de las diferentes secciones de la curva de concentración de alcohol para los diferentes TRH's.

TRH (días)	Sección			
	A	B	C	
5	a	2.6667	0.5392	0.0004
	b	-1.8333	3.7843	8.0149
4	a	3.0000	1.0000	0.0001
	b	-2.6667	2.6667	8.0093
3	a	2.2000	0.3137	0.0006
	b	-0.8000	4.9052	8.0191