



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

---

TÍTULO DEL TRABAJO:

CARACTERIZACIÓN DE UN PREPARADO BIOLÓGICO DE LEVADURA  
COMERCIAL PARA LA ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE  
FERMENTACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE CERVEZA NEGRA ARTESANAL  
TIPO ALE.

TRABAJO ESCRITO CORRESPONDIENTE A LA OPCIÓN DE TITULACIÓN  
CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:

**ESTANCIA INDUSTRIAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTAN:

**CUEVAS HERNANDEZ OSCAR**

**MARTINEZ MEZA ISABEL STEPHANIE**

DIRIGIDAPOR:

M. EN C. JONAS MARTÍNEZ LIMÓN

México D.F. Julio 2015



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

---

### CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 2 de Julio del 2015, el que suscribe Oscar Cuevas Hernández e Isabel Stephanie Martínez Meza, alumnos del Programa Académico Ingeniería Biotecnológica con número de boleta 2011620030 y 2011620072 respectivamente, de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo escrito bajo la Dirección de M. en C. Jonás Martínez Limón y cede los derechos del trabajo titulado Caracterización de un preparado biológico de levadura comercial para la estandarización del proceso de fermentación en la producción de cerveza negra artesanal tipo ale. al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con los fines académicos que desarrolla.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser solicitado en las siguientes direcciones de correo electrónico: [oscar\\_cuevas\\_hernandez@hotmail.com](mailto:oscar_cuevas_hernandez@hotmail.com) e [isabel.martinez.meza@gmail.com](mailto:isabel.martinez.meza@gmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá citar la fuente y dar el agradecimiento correspondiente.

Martínez Meza Isabel Stephanie

Nombre y firma

Oscar Cuevas Hernández

Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

## SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA

### ACTA DE TRABAJO ESCRITO

En la Ciudad de México el día 2 de Julio del 2015, siendo las 13:00 pm se reunieron los integrantes de la Comisión de Evaluación para Opción Curricular con el fin de revisar el trabajo escrito titulado: Caracterización de un preparado biológico de levadura comercial para la estandarización del proceso de fermentación en la producción de cerveza negra artesanal tipo ale. que presentan los alumnos Isabel Stephanie Martínez Meza y Oscar Cuevas Hernández con número de boleta 2011620072 y 2011620030 respectivamente, aspirantes a Ingeniero biotecnólogo.

Después de intercambiar opiniones los integrantes de la Comisión de Evaluación manifiestan APROBAR EL TRABAJO ESCRITO, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones vigentes para la opción curricular de titulación.

### COMISIÓN

Gustavo González Chozas  
Nombre y firma (Director Externo)

M. en C. Jonás Martínez Limón  
Nombre y firma (Director Interno)

Dra. Rosa Isela Carbajal de Nova  
Nombre y firma (Evaluador)

Dr. Germán Fernando Gutiérrez Hernández  
Nombre y firma (Evaluador)

M. en C. Jonás Martínez Limón

Nombre y firma  
Presidente (Jefe de carrera)

**Instituto Politécnico Nacional**

**P r e s e n t e**

Bajo protesta de decir verdad el que suscribe **Oscar Cuevas Hernández e Isabel Stephanie Martínez Meza**, manifestamos ser autores y titulares de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada **Caracterización de un preparado biológico de levadura comercial para la estandarización del proceso de fermentación en la producción de cerveza negra artesanal tipo ale**, en adelante “La Tesis” y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales **con fines educativos en medio impreso y electrónico** “La Tesis” por un periodo de **3 años** contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a “El IPN” de su terminación.

En virtud de lo anterior, “El IPN” deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de “La Tesis”.

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de “La Tesis”, manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de “La Tesis”, por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de “La Tesis” o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

México, D. F., 15 de Julio de 2015.

---

## índice

1. Resumen .....	1
2. Introducción .....	2
3. Antecedentes históricos.....	3
3.1 El misterio de la elaboración de la cerveza .....	3
4. Fundamentos teóricos .....	4
4.1 La cerveza y sus ingredientes .....	4
4.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y sus condiciones óptimas de crecimiento ...	4
4.3 Etapas del proceso general de la elaboración de la cerveza.....	6
4.3.1 <i>Preparación de la malta o malteado</i> .....	7
4.3.2 <i>Producción del mosto o macerado</i> .....	7
4.3.3 <i>Fermentación</i> .....	8
5. Justificación .....	10
6. Objetivos.....	12
6.1 General .....	12
6.2 Específicos.....	12
7. Metodología .....	13
7.1 Cinética de prueba .....	13
7.1.1 Microorganismo de estudio.....	13
7.1.2 Condiciones de cultivo.....	13
7.1.3 Evaluación del crecimiento celular .....	13
7.2 Cinética de evaluación del efecto de pH en el crecimiento de biomasa y producción de alcohol en medio de cultivo y mosto .....	14
7.2.1 Microorganismo de estudio.....	14
7.2.2 Condiciones de cultivo.....	14
7.2.3 Evaluación del crecimiento celular .....	14
7.2.4 Evaluación de consumo de sustrato.....	15
7.2.5 Evaluación de la producción de alcohol .....	15
7.3 Cinética de evaluación del efecto de temperatura en el crecimiento de biomasa y producción de alcohol en mosto .....	16
7.3.1 Microorganismo de estudio.....	16
7.3.2 Condiciones de cultivo.....	16

7.3.3 Evaluación del crecimiento celular .....	16
7.3.4 Evaluación de consumo de sustrato .....	17
7.3.5 Evaluación de la producción de alcohol .....	17
7.4 Cinética de evaluación del efecto de concentración de sustrato en el crecimiento de biomasa y producción de alcohol en mosto .....	17
7.4.1 Microorganismo de estudio.....	17
7.4.2 Condiciones de cultivo.....	17
7.4.3 Evaluación del crecimiento celular .....	17
7.4.4 Evaluación de consumo de sustrato.....	18
7.4.5 Evaluación de la producción de alcohol .....	18
7.5 Cinética de escalamiento a biorreactor .....	18
7.5.1 Microorganismo de estudio.....	18
7.5.2 Condiciones de cultivo.....	18
7.5.3 Evaluación del crecimiento celular .....	18
7.5.4 Evaluación de consumo de sustrato.....	18
7.5.5 Evaluación de la producción de alcohol .....	18
8. RESULTADOS Y ANALISIS .....	19
8.1 <i>Cinética de prueba</i> .....	19
8.2 <i>Cinética de evaluación del efecto de pH sobre el crecimiento celular en caldo nutritivo</i> .....	21
8.3 <i>Cinética de evaluación de la influencia del pH sobre el crecimiento celular y formación de producto en mosto</i> .....	23
8.4 <i>Cinética del efecto de temperatura de incubación sobre el crecimiento celular y formación de etanol</i> .....	24
8.5 <i>Cinética del efecto de la concentración de sustrato sobre el crecimiento celular y formación de etanol</i> .....	27
8.6 <i>Cinética de escalamiento a biorreactor</i> .....	29
9. CONCLUSIONES .....	32
10. PROPUESTAS DE MEJORA .....	33
11. BIBLIOGRAFIA.....	34
12. ANEXOS .....	35

## Índice de tablas

Tabla 1 Comparación de concentración final de alcohol entre las diferentes cinéticas .....	31
Tabla 2 Número de células/mL en inóculo .....	31

## Índice de figuras

Fig. 1 Bebiendo cerveza en la época de la civilización babilónica (2400 a.C. tomado de 100 Jahre Fakultatfur BrawesenWeihenstephan 1865-1965, Verlag Hans Carl: Nurenberg .....	3
Fig. 2 Vista macroscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio PDA. Fuente: Manual de Medios de Cultivo. Merk, 2000 .....	5
Fig. 3 Desarrollo experimental de las cinéticas .....	13

## Índice de gráficas

Gráfica 1 Cinética de crecimiento celular en caldo nutritivo mediante espectrofotometría. ....	19
Gráfica 2 Conteo en cámara de la cinética de crecimiento en caldo nutritivo del preparado de levadura comercial a 22°C .....	20
Gráfica 3 Crecimiento de la biomasa con respecto al tiempo de fermentación ....	20
Gráfica 4 Cinética de crecimiento celular del preparado de levadura comercial a diferentes pHs del caldo nutritivo mediante lecturas de D.O a 292 nm .....	21
Gráfica 5 Conteo celular del medio de cultivo con variación de pH.....	21
Gráfica 6 Cinética de crecimiento celular a diferentes pHs de caldo nutritivo mediante técnica de peso seco .....	22
Gráfica 7 Consumo de sustrato de la cepa con respecto al tiempo para los distintos medios de cultivo .....	22
Gráfica 8 Cinética de crecimiento de la levadura en mosto a 22°C, D.O 580 nm .	23
Gráfica 9 Cinética de crecimiento celular en mosto mediante cuenta directa en Cámara de Neubauer.....	23
Gráfica 10 Azúcares reductores residuales en mosto .....	24
Gráfica 11 Producción de alcohol en mosto .....	24
Gráfica 12 Cinética de crecimiento celular en mosto incubado a diferentes temperaturas .....	25
Gráfica 13 Conteo en cámara de Neubauer de la cinética a diferentes temperaturas .....	25
Gráfica 14 Conteo en placa.....	26
Gráfica 15 Consumo de sustrato en mosto .....	26

Gráfica 16 Producción de alcohol en mosto con variación en la temperatura de incubación .....	27
Gráfica 17 Seguimiento del crecimiento celular en mosto a diferentes concentraciones de sustrato.....	27
Gráfica 18 Incremento de las células/mL en mosto a diferentes concentraciones de sustrato .....	28
Gráfica 19 Azúcares reductores residuales en mosto a diferentes concentraciones de sustrato.....	28
Gráfica 20 Formación de etanol en función al tiempo en mosto a diferentes concentraciones de sustrato.....	28
Gráfica 21 Conteo en cámara de Neubauer correspondiente a la cinética de escalamiento a biorreactor .....	29
Gráfica 22 Seguimiento de la cinética de crecimiento celular mediante lecturas de D.O a 292 nm .....	29
Gráfica 23 Concentración de sustrato en mosto .....	30
Gráfica 24 Formación de producto en mosto a condiciones óptimas de crecimiento .....	30



## 1. Resumen

La fermentación alcohólica en la elaboración de cerveza es un proceso biológico que es operado en ausencia de oxígeno. La fermentación es realizada por la actividad de algunos microorganismos, principalmente las levaduras que consumen los azúcares para transformarlos en etanol y dióxido de carbono como productos finales.

Además, la fermentación del extracto de malta de cebada o de cualquier otro cereal durante el proceso de elaboración de cerveza es una de las etapas más estudiadas en la producción de esta bebida, por otra parte en la elaboración de cerveza artesanal es un elemento esencialmente clave que tiene el alcance de conseguir mejoras y características auténticas en muchos aspectos del producto final, y así poder definirlo para volverlo sobresaliente.

Durante el proceso de fermentación anaerobia para la producción de etanol, se estudiaron los efectos de la temperatura, pH y concentración de azúcares en los parámetros de crecimiento de un preparado biológico de levadura comercial (PBLV).

Para formular una idea respecto al comportamiento de crecimiento del PBLV en las distintas fases que compone la cinética, el preparado biológico fue sembrado en caldo nutritivo y así poder estimar los tiempos de inoculación y tomas de muestra para sus respectivos tratamientos.

Las variaciones de las distintas condiciones de cultivo fueron realizadas en matraces Erlenmeyer de 500 mL, y posteriormente fueron escaladas a un biorreactor con 5 litros de operación aplicando las variables que resultaron más eficientes en el crecimiento y producción de alcohol del preparado de levadura estudiado.

La temperatura resultó ser una de las variables más importantes involucradas en la fermentación del mosto, sin embargo, los efectos de la concentración de azúcares y el pH fueron también significativos en cuanto a las propiedades organolépticas como: sabor, color, olor y cuerpo del producto obtenido.

## 2. Introducción

La biotecnología se ha definido como la aplicación sistemas y organismos biológicos o parte de ellos a procesos de la industria manufacturera y de servicios. El malteado y la elaboración de cerveza son industrias que ejemplifican la biotecnología tradicional, basada en un arte que ha ido refinándose a lo largo de miles de años y que implica, por ejemplo, la explotación de la germinación de la cebada y de la fermentación por levaduras. (Hough, 1990)

El proceso de elaboración de cerveza consta de tres etapas claramente definidas, que son malteado, macerado, y fermentación las cuales dependen exclusivamente del tipo de cerveza que se desea elaborar, generando así gran diversidad de cervezas que se pueden producir variando la cantidad y tipo de materia prima en las operaciones mencionadas. Algunas otras variables que pueden definir las características de la cerveza son:

- Tipo y naturaleza de Agua cervecera
- Tipo y naturaleza de levadura cervecera
- Tiempos y Temperaturas en Cocimiento
- Tiempos y Temperaturas en Fermentación

Desde los primeros registros de la producción de cerveza en la humanidad, muchos cambios han sido realizados, resultando procesos modernos de fabricación. Ya pesar de todos los cambios hechos a través de la historia y la gran diversidad de cervezas que han surgido, el único factor que ha sido constante es la levadura en la etapa de fermentación. La levadura es el microorganismo que asimila los carbohidratos que contiene el mosto y realiza la bioconversión a etanol y dióxido de carbono. Por lo tanto, la fermentación ha sido el fenómeno más estudiado y de mayor importancia de todo el proceso, comenzando por clasificar la fermentación de acuerdo al comportamiento de floculación de los dos tipos de levaduras cerveceras que existen: fermentación alta (levadura ale y weiss) y fermentación baja (levadura lager). Su comportamiento es tan distinto que las dos principales clases de cerveza (ales y lagers), son basadas en estas dos tipos de levaduras.

Dentro del proceso de fermentación las variables esenciales son temperatura, pH, y concentración de sustrato inicial. Además si a esto le sumamos las formas en las que una fermentación puede ser operada: lote, lote alimentado y continuo. La combinación de estas condiciones da como resultado el incremento indefinido de características entre los distintos estilos de cerveza.

### 3. Antecedentes históricos

#### 3.1 El misterio de la elaboración de la cerveza

El arte de fabricar de cerveza se ha ido desarrollando a lo largo de 5.000-8.000 años. Debieron producirse varios descubrimientos independientes de que exponiendo al aire los jugos de frutas, o los extractos de cereales, se obtenían bebidas fermentadas. Existen ilustraciones de la elaboración de cerveza que pertenecen al apogeo de las civilizaciones Egipcia y Babilónica, de unos 4.300 años de antigüedad; durante la civilización griega y más tarde durante la romana, el dominio del vino se convirtió en una cuestión de importancia para el mercado internacional. Además se encontró evidencia arqueológica de la actividad cervecera en escritos. Sumarios que datan alrededor de 1800 a.C. y que mencionaban la creencia de un dios que era capaz de crear cerveza. Explicar cómo sucede la fermentación no fue posible hasta el siglo XIX, lo que no impidió que se fueran introduciendo sucesivas mejoras en las técnicas de elaboración. Esas bebidas alcohólicas resultaban particularmente atractivas para aquellos individuos de vida poco placentera, en cuanto que producían euforia alcohólica. Otras ventajas, sin importancia en aquellos tiempos, eran la mejora relativa de la dudosa calidad microbiológica del agua, en virtud de su bajo pH, su contenido alcohólico, y de su valor nutritivo; además de su elevado valor calórico y de su riqueza en sustancias nitrogenadas asimilables, si contenían levaduras las bebidas en cuestión proporcionaban vitaminas del complejo B. (Hough, 1990) En la Edad Media la elaboración de cerveza fue considerada un arte o un misterio, cuyos detalles eran celosamente guardados por los maestros cerveceros y sus gremios. Y ciertamente era un misterio, porque se desconocían las razones que justificaban las diversas etapas del proceso de elaboración, la mayor parte de los cuáles, como la fermentación, fueron descubiertas por casualidad. Así, el malteado consistía en la inmersión de la cebada en agua y en permitirle que germinara, pero no se conocía las razones por las que la cebada se ablandaba y se hacía dulce. De un modo similar se desconocían por qué convenía secar la cebada germinada a temperaturas relativamente frías, a lo que se buscaban explicaciones esotéricas. Ver fig.1



Fig. 1 Bebiendo cerveza en la época de la civilización babilónica (2400 a.C. tomado de 100 Jahre Fakultatfur BrawesenWeihenstephan 1865-1965, Verlag Hans Carl: Nurenberg

## 4. Fundamentos teóricos

### 4.1 La cerveza y sus ingredientes

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).

Para la elaboración de cerveza se requiere de las siguientes materias primas: agua, malta y lúpulo.

(a) 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.

(b) 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).

(c) 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).

### 4.2 Saccharomyces cerevisiae y sus condiciones óptimas de crecimiento

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 CO<sub>2</sub> (Varnan y Sutherland, 1997).

*S. cerevisiae* es un hongo levaduriforme que presenta células alargadas, globosas o elipsoidales, pudiendo encontrarse en agrupaciones de dos, encadenas 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). Ver fig. 2.



Fig. 2 Vista macroscópica de *Saccharomyces cerevisiae* en medio PDA. Fuente: Manual de Medios de Cultivo. Merk, 2000

Esta levadura crece de forma óptima a pH's ácidos (Calaveras, 2004; García, 2005).

El pH es un factor importante en la fermentación, debido al control que ejerce frente a la contaminación bacteriana como así también en el efecto del crecimiento de las levaduras, la velocidad de fermentación y la producción de alcohol. Durante la fermentación la levadura toma el nitrógeno de los aminoácidos orgánicos, perdiendo su carácter anfótero y pasando a ácidos, lo cual origina una disminución del pH del medio. Según estudios se halló que el pH más favorable para el crecimiento de la *Saccharomyces Cerevisiae* se encuentra entre 4.4 - 5.0, con un pH de 4.5 para su crecimiento óptimo. Un entorno neutro o moderadamente alcalino es poco favorable para el crecimiento de la levadura y la alcalinización súbita del medio, le supone una importante situación de estrés que afecta negativamente su crecimiento y productividad.

La temperatura óptima de crecimiento para *Saccharomyces cerevisiae* está en torno a los 25 °C, mientras que temperaturas de 10 a 13 °C son totalmente restrictivas para este microorganismo. (Vargas, 2010).

### 4.3 Etapas del proceso general de la elaboración de la cerveza.



Las etapas más importantes se describen a continuación:

#### *4.3.1 Preparación de la malta o malteado.*

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).

#### *4.3.2 Producción del mosto o macerado.*

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  $\beta$ -glucanasas y la  $\beta$ -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  $\beta$ -glucanasas hidrolizan los glucanos presentes en la cebada; la degradación de estos polímeros es importante para disminuir la viscosidad del mosto. La  $\beta$ -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):

1. Concentración de sólidos en el mosto.
2. Extracción de los componentes del lúpulo.
3. Inactivación de las enzimas de la malta.
4. Esterilización del mosto.
5. Eliminación de compuestos volátiles indeseables.
6. Formación de los compuestos responsables del aroma, sabor y color de la cerveza mediante reacciones de Maillard.
7. 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).

#### *4.3.3 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 CO<sub>2</sub> 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).



Para el monitoreo de la formación de alcohol en el proceso de fermentación se utiliza el Grado Plato, que es una unidad de concentración definida como: el porcentaje en masa de sacarosa presente en una solución. Se obtiene una medida indirecta del grado alcohólico de la cerveza bajo el principio de que los azúcares fermentables disminuyen conforme a que la levadura metaboliza estos a alcohol, aumentando la concentración de alcohol en el mosto derivando en una disminución de la densidad.

## 5. Justificación

Las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del año pasado informaron que México se había convertido en el décimo país en América Latina que bebe más cerveza. Los mexicanos consumen 7.2 L per cápita por año de alcohol. Un detalle importante que debe ser resaltado es que con respecto al tipo de alcohol consumido en América Latina, lo que más se consume es cerveza con un 53% , seguida de los licores (vodka, whiskey) con un 32.6% y un 11.7 % de vino.

En la actualidad los gustos y las preferencias respecto a la elección de cervezas han incrementado de forma notoria, y si a esto le sumamos el gusto por los productos artesanales y lo combinamos con el amor a la gastronomía y el maridaje, obtenemos los ingredientes necesarios para que empiece a fraguarse una pequeña pero floreciente industria de la cerveza artesanal en el país.

Esto ha causado que los microproductores de cerveza artesanal se estén posicionando de forma más sólida en el mercado de producción. Y aunque existen grandes barreras por los monopolios que han manejado el negocio por años en nuestro país, la producción artesanal de cerveza tiene una identidad y un enfoque único que el mercado tradicional de cervezas no puede satisfacer.

Aunque la venta de cerveza artesanal en México representa solo el 1.16% del mercado total, con el crecimiento de este rubro también incrementa la creación de nuevas microempresas dedicadas a la fabricación de este producto. Gran parte de estas empresas basan su producción en prácticas experimentales, es decir, no cuentan con la estandarización del proceso, lo que provoca variaciones en cuanto a tiempos de producción, costos, alteraciones organolépticas y en general un producto que varía de lote en lote.

La cervecera Cosaco es una microempresa de cerveza artesanal que ha sido pionera en la producción, comercialización y venta en esta rama auténtica de bebidas artesanales. Su producción base consiste en 3 estilos de cerveza: güera, negra y roja; estas son de tipo "ALE" y se caracterizan por tonos frutales, con recetas originales provenientes principalmente de Bélgica, Inglaterra y Escocia.

En la cervecería Cosaco uno de los principales problemas de producción es el desconocimiento de las condiciones óptimas en las que se debe llevar a cabo la fermentación, como es la temperatura, el volumen y viabilidad del inóculo y tiempo requerido para llegar a la concentración deseada de alcohol. Las consecuencias de no tener estandarizado el proceso de fermentación es el retraso de producción, ya que muchas veces el inóculo es insuficiente y es necesario agregar un volumen extra de levadura o recircular el mosto, lo que puede ser una fuente de

contaminación además de alargar el tiempo de producción. Debido a esta problemática en la empresa, se busca caracterizar un preparado biológico de levadura comercial para la producción de cerveza negra, que es el elemento clave del proceso y así erradicar los problemas antes mencionados además de verse reflejado en un aumento en la cobertura de la demanda insatisfecha y la minimización de los costos en esta etapa del proceso.

## **6. Objetivos**

### **6.1 General**

Estandarizar el proceso de fermentación en la producción de cerveza negra artesanal tipo ALE elaborada en la cervecería Cosaco, mediante la caracterización de un preparado biológico de levadura comercial (PBLC), el cual será tratado a diferentes condiciones de cultivo: pH, concentración de sustrato y temperatura.

### **6.2 Específicos**

- Identificar la duración de la cinética de crecimiento del preparado biológico de levadura comercial, con sus respectivas fases.
- Establecer la relación de volumen de inóculo con respecto al volumen de operación para la fermentación.
- Determinar la concentración óptima inicial de sustrato en el mosto para obtener el mayor rendimiento de sustrato-producto.
- Analizar la influencia del pH inicial del mosto sobre el crecimiento de la levadura comercial utilizada en la producción de etanol.
- Estudiar la influencia de la temperatura de la fermentación sobre el crecimiento de la levadura comercial utilizada en la producción de etanol.
- Establecer el tiempo de fermentación para obtener el grado de alcohol requerido por la cervecería cosaco.
- Escalar la fermentación a un biorreactor utilizando las variables óptimas de crecimiento (temperatura, pH y concentración de sustrato).

## 7. Metodología

El trabajo experimental consistió de 6 cinéticas en las que se evaluó el crecimiento de la levadura y la producción de alcohol. En la Fig. 2 se muestra la sucesión de las cinéticas.



Fig. 3 Desarrollo experimental de las cinéticas

A continuación se detalla el desarrollo experimental de cada etapa:

### 7.1 Cinética de prueba

#### 7.1.1 *Microorganismo de estudio*

Preparado comercial de levadura ideal para elaboración de cervezas Ales oscuras.

#### 7.1.2 *Condiciones de cultivo*

La cinética de prueba se realizó sin suplementación de oxígeno, por un periodo de 35 horas, con toma de muestra cada 2 horas en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de caldo nutritivo en agitador orbital a 22°C, 100 rpm y pH inicial 4.5.

La relación del volumen agregado del inoculo con respecto al volumen del medio fue de 1% v/v (2mL). La variable estudiada fue crecimiento de biomasa.

#### 7.1.3 *Evaluación del crecimiento celular*

Se hizo seguimiento al crecimiento celular por lectura de densidad óptica (D.O), peso seco y cuenta en cámara de Neubauer. Las cuales se desarrollaron en la forma que a continuación se explica.

##### 7.1.3.1 *Lectura de densidad óptica*

Se homogenizó el cultivo antes de la toma de muestra, posteriormente se toma 1.5 mL del caldo y se lee la absorbancia a 292nm en una celda de 1 cm de paso de luz; se tomó el primer valor que arrojó el espectrofotómetro.

##### 7.1.3.2 *Peso seco*

Los tubos eppendorf fueron llevados previamente a peso constante en una estufa a 70°C durante 24 horas. Estos fueron puestos en un desecador durante 5 minutos y pesados cada uno en una balanza analítica.

Se tomó 1 mL de suspensión celular de cada matraz, en un tubo eppendorf de 2 mL, posteriormente se centrifugó a 6600 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se sometió el pellet húmedo a secado en estufa a 70 °C durante 24 horas.

#### *7.1.3.3 Cuenta en cámara de Neubauer*

Se tomó 0.5 mL de muestra y se homogenizó con una pipeta pasteur en un tubo eppendorf, la muestra se tiñó con una gota de colorante azul de metileno al 1 %, se cargó la muestra en la cámara de Neubauer y se procedió a contar las células viables y no viables de los 4 cuadrados de las esquinas y el cuadro central.

## **7.2 Cinética de evaluación del efecto de pH en el crecimiento de biomasa y producción de alcohol en medio de cultivo y mosto**

### ***7.2.1 Microorganismo de estudio***

Preparado comercial de levadura ideal para elaboración de cervezas Ales oscuras.

### ***7.2.2 Condiciones de cultivo***

La cinética se realizó por triplicado en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de caldo nutritivo en agitador orbital a 22°C, 100 rpm y pH inicial 4,4.5 y 5, los cuales se ajustaron con ácido clorhídrico 0.5 N; sin suplementación de oxígeno, por un periodo de 32 horas.

Una segunda cinética se llevó a cabo con mosto en las mismas condiciones mencionadas anteriormente para el medio de cultivo, con una duración de 76 h. La elaboración del mosto se describe a continuación:

Se utilizó mosto elaborado a partir de 3 tipos de maltas y 2 tipos de lúpulo, teniendo una relación de 1 a 4 entre malta y volumen de agua. El mosto se mantuvo a 68-69 °C durante una hora en constante agitación. Posteriormente se filtró el sobrenadante con papel filtro y se hirvió durante 90 minutos, agregando el lúpulo a 1 h y 1h con 15 minutos respectivamente después de comenzada la ebullición. El mosto se ajustó a una densidad de 1061 kg/m<sup>3</sup>.

### ***7.2.3 Evaluación del crecimiento celular***

El crecimiento de biomasa en medio de cultivo y para mosto se cuantificó por el método de peso seco, cuenta en cámara de Neubauer, lectura de D.O.

Enseguida se describe cada técnica:

#### *7.2.3.1 Peso seco*

Esta técnica se realizó únicamente para la cinética en medio de cultivo y se ha descrito en el apartado anterior.

#### *7.2.3.2 Cuenta en cámara de Neubauer*

Ver evaluación del crecimiento celular de la cinética de prueba.

#### *7.2.3.3 Lectura de D.O*

Al mosto sin inocular se le realizó un barrido de longitudes de onda de 300 a 1000 nm, obteniendo el mayor pico a la longitud de 580 nm.

Se tomó con una micropipeta 0.1 mL de muestra homogenizada y se agregó a una celda de 1 cm de paso de luz. Posteriormente se añadió 0.9 mL de agua destilada, se homogenizó con la ayuda de la micropipeta y se leyó la absorbancia a 580 nm.

#### **7.2.4 Evaluación de consumo de sustrato**

El contenido de azúcares reductores se determinó por el método del Ácido Dinitro Salicilico (DNS), el cual cuantifica de forma indirecta el consumo de sustrato. La técnica es la siguiente:

Se tomó 0.1 mL de sobrenadante después de centrifugar para la determinación de peso seco, y se agregó a un tubo eppendorf de 2 mL, posteriormente se añadió 0.1 mL de reactivo de DNS y se sometió a baño maría en ebullición durante 5 min, se enfrió en baño de agua fría. Una vez enfriado se agregó 1 mL de agua destilada, se homogenizó con micropipeta y se leyó la D.O a 540 nm.

#### **7.2.5 Evaluación de la producción de alcohol**

El seguimiento de la producción de alcohol se llevó a cabo mediante la diferencia de densidades inicial y final.

## **7.3 Cinética de evaluación del efecto de temperatura en el crecimiento de biomasa y producción de alcohol en mosto**

### **7.3.1 *Microorganismo de estudio***

Preparado comercial de levadura ideal para elaboración de cervezas Ales oscuras.

### **7.3.2 *Condiciones de cultivo***

Las cinéticas se llevaron a cabo por triplicado en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 300 mL de mosto cada uno. Las temperaturas ensayadas fueron 18, 22 y 25 °C. Sin suplementación de oxígeno ni agitación por un periodo 76 h. El mosto se realizó de la misma forma que se describe en el apartado anterior.

### **7.3.3 *Evaluación del crecimiento celular***

El crecimiento de biomasa en mosto se cuantificó por el método de Cuenta en placa, cuenta en cámara de Neubauer y lectura de D.O

La descripción del proceso se detalla enseguida:

#### **7.3.3.1 *Cuenta en placa***

Se agregó 1 mL de muestra en un tubo de ensaye con 9 mL de agua destilada estéril y se homogenizó en vortex durante 10 segundos, posteriormente se tomó 1 mL del tubo homogenizado y se agregó a otro tubo con 9 mL de agua destilada estéril. Este procedimiento se realizó hasta llegar a la dilución deseada.

Para la siembra de las diluciones se utilizaron cajas de Petri con y sin división con agar dextrosa y papa, se sembró un volumen de 0.1 mL y 0.05 mL en las placas sin división y con división respectivamente. Posteriormente se extendió sobre el agar con ayuda de perlitas de vidrio estériles que fueron retiradas después de haber realizado la extensión. Las cajas fueron incubadas a 30 °C durante 24 horas y transcurrido este tiempo fueron contadas las colonias formadas.

#### **7.3.3.2 *Cuenta en cámara de Neubauer***

Ver la descripción del proceso en evaluación del crecimiento celular del apartado anterior.

#### **7.3.3.3 *Lectura de densidad óptica***

Ver la descripción del proceso en evaluación del crecimiento celular del apartado anterior



#### **7.3.4 Evaluación de consumo de sustrato**

El contenido de azúcares reductores se determinó por el método del Ácido Dinitro Salicílico (DNS), la técnica se describió anteriormente.

#### **7.3.5 Evaluación de la producción de alcohol**

El seguimiento de la producción de alcohol se llevó a cabo mediante la diferencia de densidades inicial y final.

### **7.4 Cinética de evaluación del efecto de concentración de sustrato en el crecimiento de biomasa y producción de alcohol en mosto**

#### **7.4.1 Microorganismo de estudio**

Preparado comercial de levadura ideal para elaboración de cervezas Ales oscuras.

#### **7.4.2 Condiciones de cultivo**

Las cinéticas se llevaron a cabo por triplicado en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 300 mL de mosto cada uno. Las concentraciones ensayadas fueron 13, 15 y 17 °P. Sin suplementación de oxígeno ni agitación

#### **7.4.3 Evaluación del crecimiento celular**

El crecimiento de biomasa en mosto se cuantificó por el método de Cuenta en placa, cuenta en cámara de Neubauer y lectura de D.O

La descripción del proceso se detalla enseguida:

##### **7.4.3.1 Cuenta en placa**

La metodología se especificó en el apartado anterior.

##### **7.4.3.2 Cuenta en cámara de Neubauer**

Ver la descripción del proceso en evaluación del crecimiento celular del apartado anterior.

##### **7.4.3.3 Lectura de densidad óptica**

Ver la descripción del proceso en evaluación del crecimiento celular del apartado anterior

#### **7.4.4 Evaluación de consumo de sustrato**

El contenido de azúcares reductores se determinó por el método del Ácido Dinitro Salicilico (DNS), la técnica se describió anteriormente.

#### **7.4.5 Evaluación de la producción de alcohol**

El seguimiento de la producción de alcohol se llevó a cabo mediante la diferencia de densidades inicial y final.

### **7.5 Cinética de escalamiento a biorreactor**

#### **7.5.1 Microorganismo de estudio**

Preparado comercial de levadura ideal para elaboración de cervezas Ales oscuras.

#### **7.5.2 Condiciones de cultivo**

La cinética se llevó a cabo en un biorreactor tanque agitado con volumen nominal de 7Ly volumen de operación de 5 L. La temperatura ensayada fue de 25 °C., sin agitación.

#### **7.5.3 Evaluación del crecimiento celular**

El crecimiento de biomasa en mosto se cuantificó por el método de cuenta en cámara de Neubauer y lectura de D.O. empleando los mismos procedimientos mencionados en los apartados anteriores.

#### **7.5.4 Evaluación de consumo de sustrato**

El contenido de azúcares reductores se determinó por el método del Ácido Dinitro Salicilico (DNS), la técnica se describió anteriormente.

#### **7.5.5 Evaluación de la producción de alcohol**

El seguimiento de la producción de alcohol se llevó a cabo mediante la diferencia de densidades inicial y final.

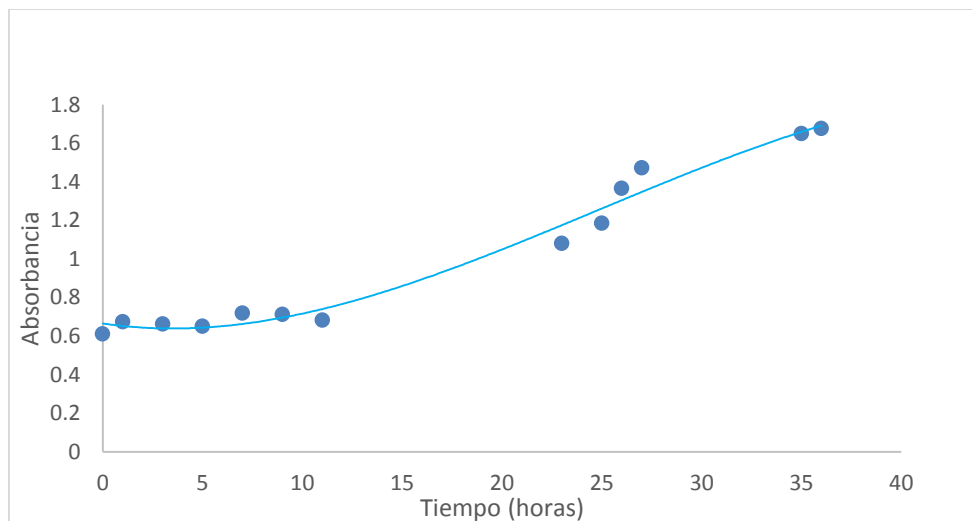
## 8. RESULTADOS Y ANALISIS

### 8.1 Cinética de prueba

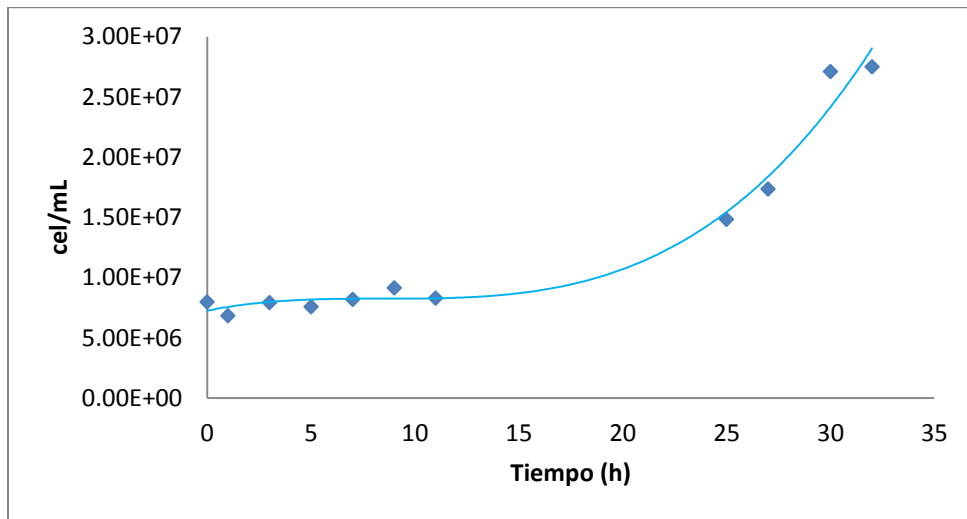
Se realizó una cinética de prueba con la finalidad de conocer el periodo de tiempo que requiere el preparado de levadura comercial para llegar a la fase estacionaria, ya que en la fase exponencial es cuando la levadura produce una cantidad de alcohol 30 veces mayor que en su fase estacionaria. La primera fase es de latencia (fase lag), durante la cual la levadura debe adaptarse al ambiente. En este periodo, es poco o nulo el crecimiento de la levadura y por consiguiente no se producirá alcohol (esta etapa tiene una duración de 4 a 12 horas). La segunda fase, llamada de crecimiento exponencial, es la más importante, en la que se produce casi la totalidad del alcohol. El tiempo que la levadura puede permanecer en esta fase es función de los nutrientes disponibles y los productos generados, factores que limitan la cantidad de alcohol producido. (Dacosta, 2007).

La temperatura de incubación fue de 22<sup>a</sup>C, ya que corresponde a la utilizada en la cervecería Cosaco.

En la gráfica 1 y 2 se observa que la fase lag dura aproximadamente 10 h y posteriormente existe un incremento en las lecturas de absorbancia y número de células/mL, el cual corresponde a la fase exponencial.

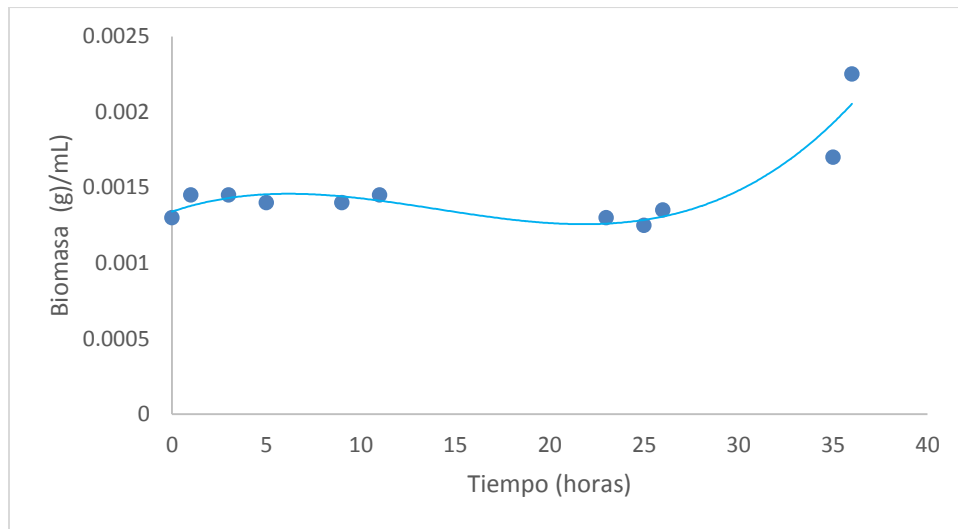


Gráfica 1 Cinética de crecimiento celular en caldo nutritivo mediante espectrofotometría.



Gráfica 2: Conteo en cámara de la cinética de crecimiento en caldo nutritivo del preparado de levadura comercial a 22°C

Se realizó la técnica de peso seco para cuantificar biomasa total, en la gráfica 3 se observa una tendencia semejante a las reportadas en la gráfica 1 y 2, con la diferencia de que en ésta, la fase lag tiene una duración de 26 horas, lo que no corresponde con los resultados de absorbancia y número de células/mL. Estos resultados pueden ser explicados por un manejo erróneo del procesamiento de la muestra.



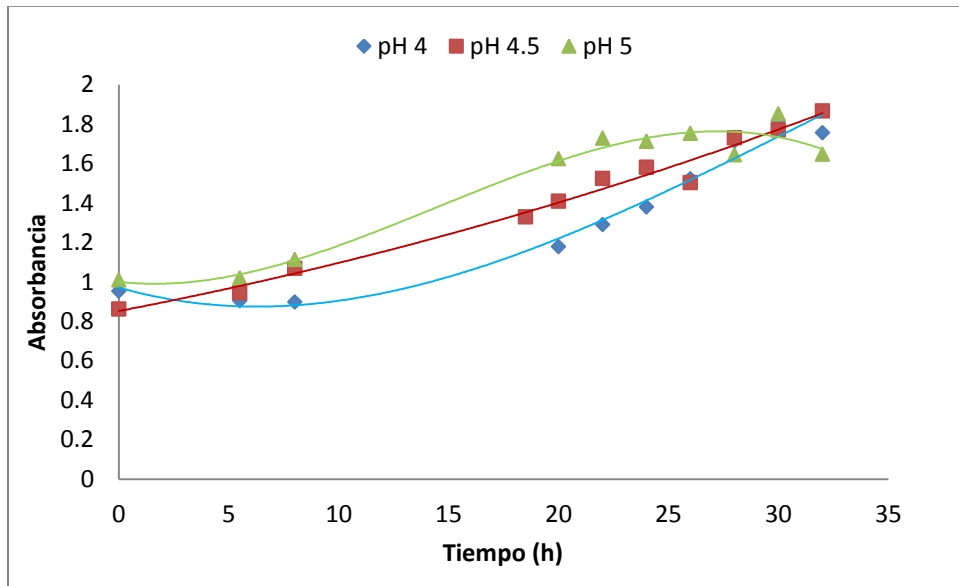
Gráfica 3: Crecimiento de la biomasa con respecto al tiempo de fermentación

Con los resultados obtenidos se estimó la hora de inoculación para la siguiente cinética y las técnicas de seguimiento del crecimiento celular a emplear para el manejo de las muestras de las cinéticas posteriores.

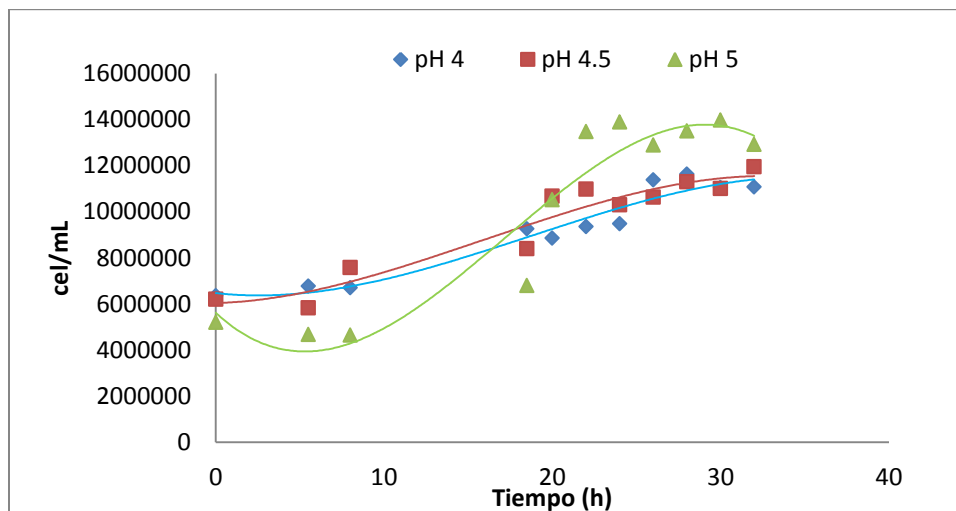
## 8.2 Cinética de evaluación del efecto de pH sobre el crecimiento celular en caldo nutritivo

La segunda cinética se realizó para conocer el pH óptimo de crecimiento, se evaluaron 3 diferentes pH's considerando que el mosto de la cervecera COSACO tiene un pH de 5 y según la literatura (Vargas, 2010) el pH óptimo de *Saccharomyces cerevisiae* es de 4.5.

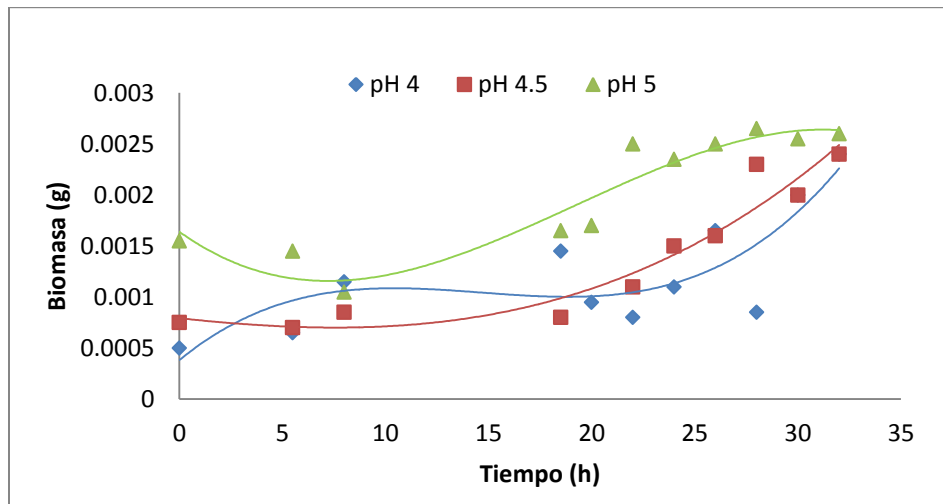
En la gráfica 5 y 6 se muestra que la mayor producción de biomasa se obtuvo en el medio con pH 5, seguido del medio con pH 4.5 y pH 4 respectivamente.



Gráfica 4 Cinética de crecimiento celular del preparado de levadura comercial a diferentes pH's del caldo nutritivo mediante lecturas de D.O a 292 nm

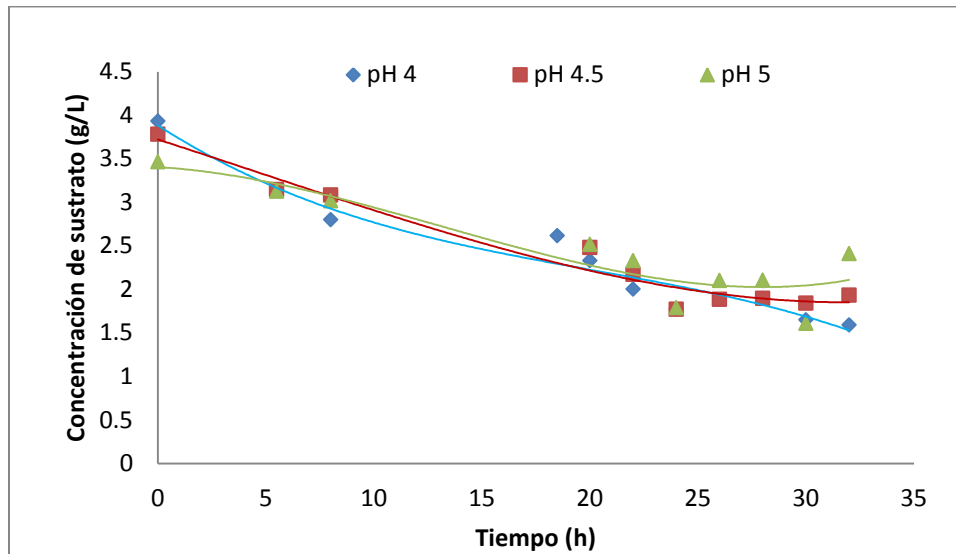


Gráfica 5 Conteo celular del medio de cultivo con variación de pH



Gráfica 6 Cinética de crecimiento celular a diferentes pH's de caldo nutritivo mediante técnica de peso seco

En la gráfica 6 se aprecia la tendencia del crecimiento de la cepa, pero igual que en el caso anterior el cambio de fases de la cinética se muestra retrasada, además de que existe variaciones significativas con respecto a la línea de tendencia, es por ello que se decidió omitir esta técnica para las siguientes cinéticas.



Gráfica 7 Consumo de sustrato de la cepa con respecto al tiempo para los distintos medios de cultivo

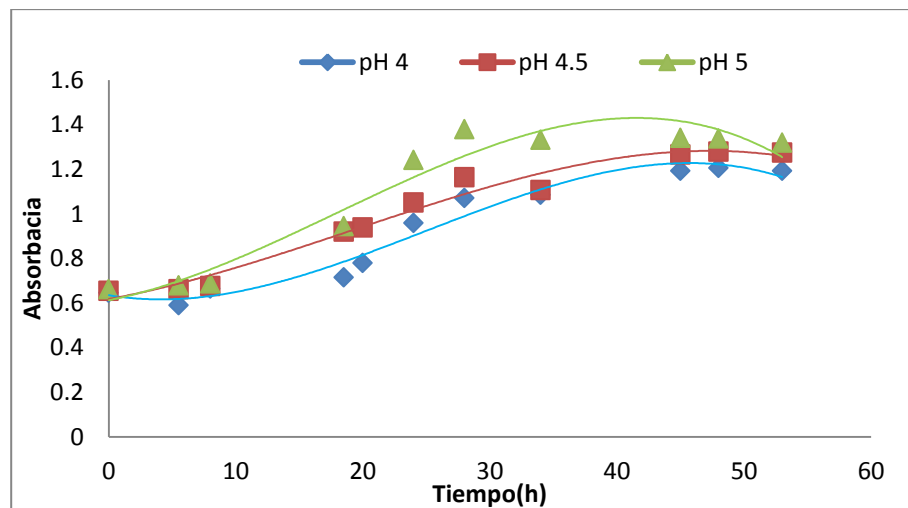
La determinación de azúcares reductores presentes en el medio muestra una relación inversamente proporcional al consumo de sustrato por parte de la levadura y simultáneamente se relaciona con el incremento de la biomasa y producción de etanol, es decir, a mayor consumo de sustrato, mayor será el etanol y biomasa producida. Esto se ve reflejado en la Gráfica 7, en la que a pH 5 el consumo de sustrato es mayor y coincide con los resultados anteriores de mayor producción de biomasa.

### 8.3 Cinética de evaluación de la influencia del pH sobre el crecimiento celular y formación de producto en mosto

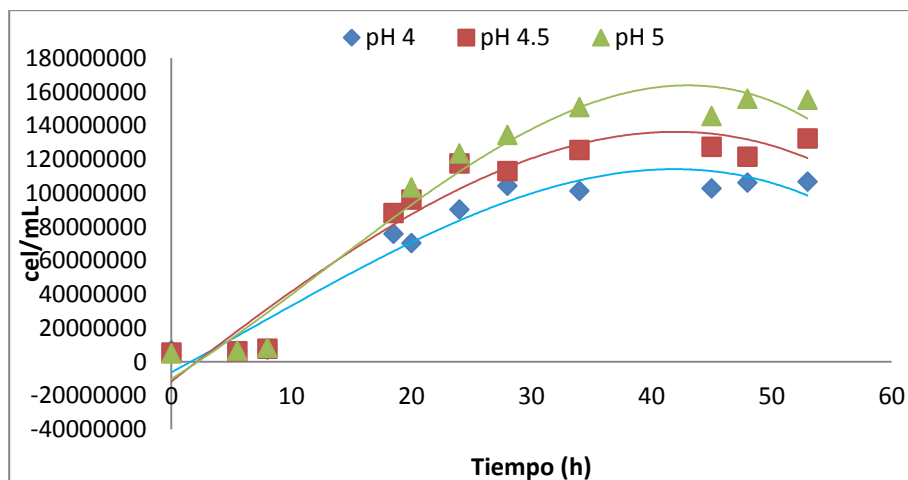
La finalidad de esta cinética fue comprobar que el pH 5 fuera el óptimo para reproducir la levadura y así obtener el mayor grado de alcohol.

El pH óptimo para la producción de biomasa igual que en la cinética anterior fue de 5, como se muestra en las gráficas 8 y 9. También se comprobó que a pH 5 se consume más rápido el sustrato (ver Gráfica 10), pero a diferencia de los resultados esperados en la producción de alcohol este pH resultó no ser el óptimo. Por lo que un pH de 4.5 mostro ser la condición en la que se produjo mayor porcentaje de alcohol en menor tiempo.

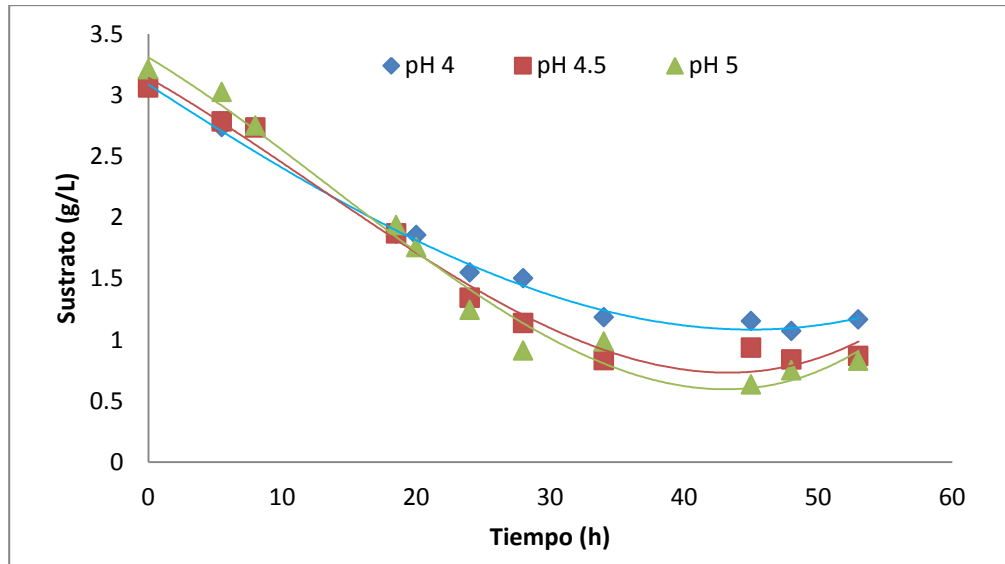
Al final de la cinética se evaluó las propiedades organolépticas de cada matraz resultando en que el pH 4 y pH 4.5 fueron descartados, ya que afectaron el sabor de la cerveza. Por lo tanto el pH 5 se tomó como parámetro óptimo de la cinética.



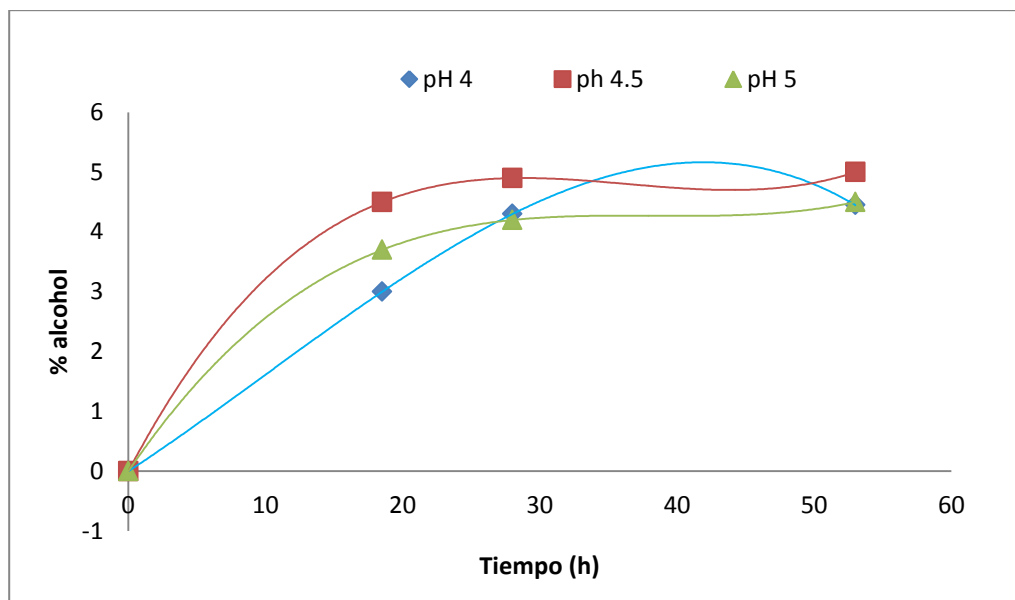
Gráfica 8 Cinética de crecimiento de la levadura en mosto a 22°C, D.O 580 nm



Gráfica 9 Cinética de crecimiento celular en mosto mediante cuenta directa en Cámara de Neubauer



Gráfica 10 Azúcares reductores residuales en mosto



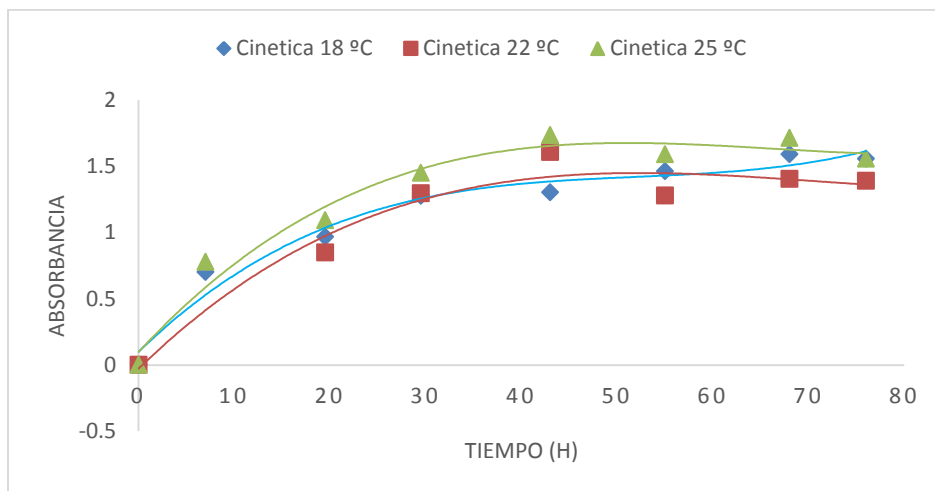
Gráfica 11 Producción de alcohol en mosto

#### 8.4 Cinética del efecto de temperatura de incubación sobre el crecimiento celular y formación de etanol

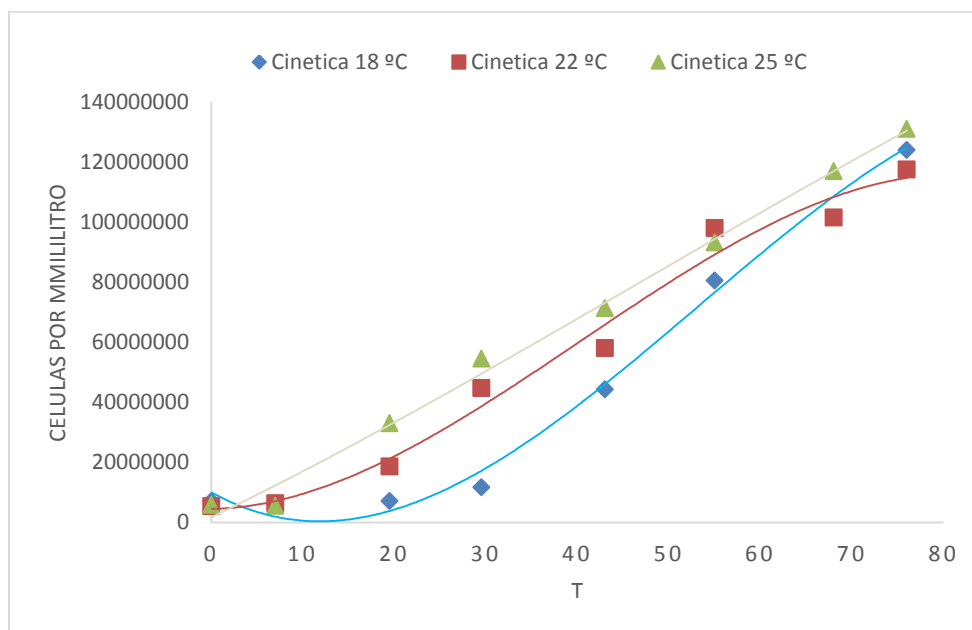
Se realizó una tercera experimentación incubando 3 matraces diferentes temperaturas (18° C, 22°C, 25°C) y manteniéndolas constantes durante toda la cinética, para comprobar que la temperatura a la que se había estado exponiendo el proceso de fermentación era la condición óptima que brindaba las mejores



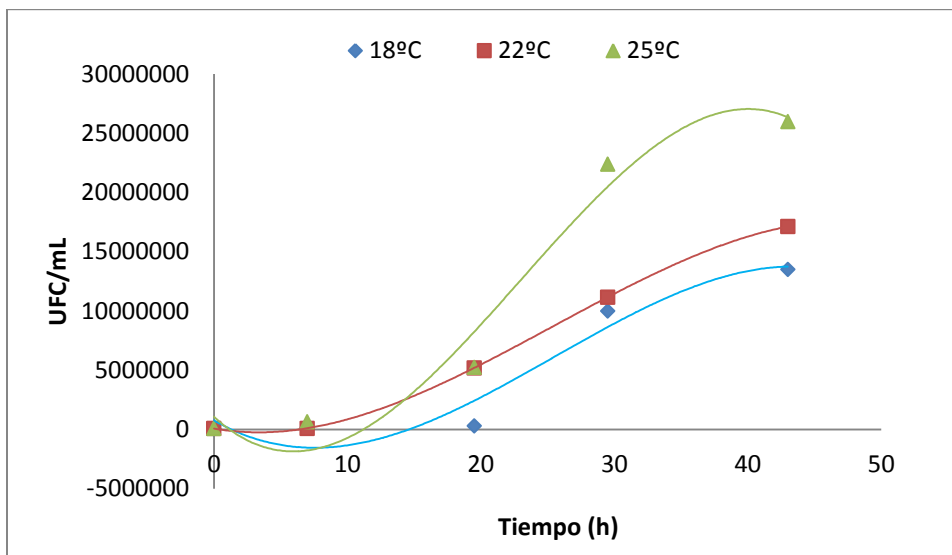
escalas de producción a la cervecera COSACO. En las gráficas 12, 13 y 14 se observa que la temperatura óptima de crecimiento es de 25°C, seguida de 22 y 18°C.



Gráfica 12 Cinética de crecimiento celular en mosto incubado a diferentes temperaturas

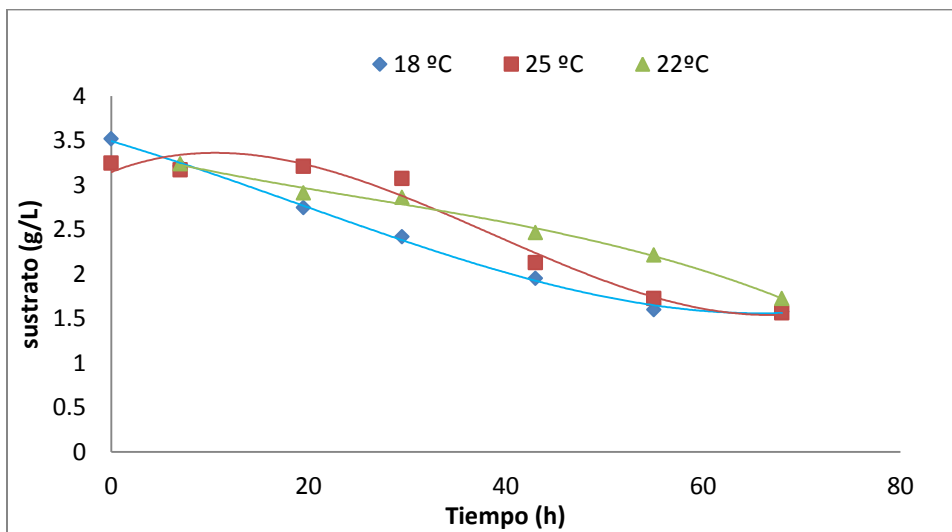


Gráfica 13 Conteo en cámara de Neubauer de la cinética a diferentes temperaturas

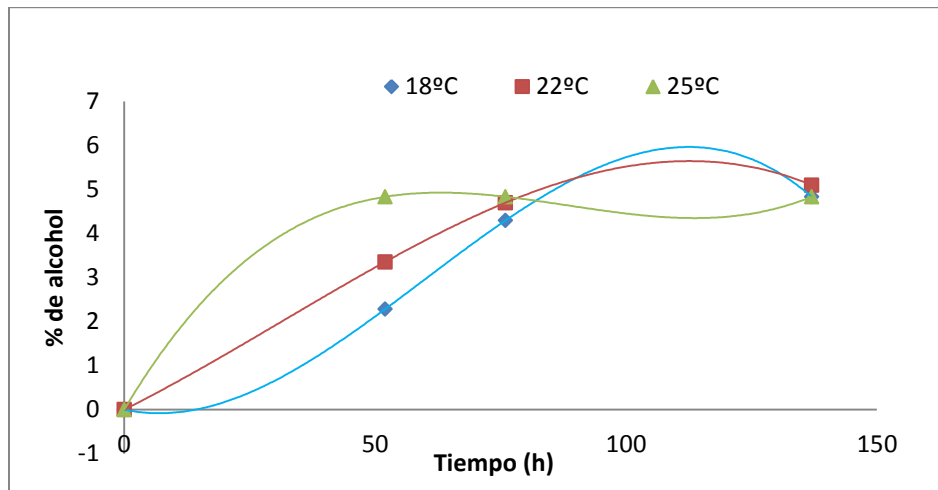


Gráfica 14 Conteo en placa

De acuerdo a que la temperatura óptima de crecimiento fue de 25°C se esperaba que es ésta resultara la mayor producción de alcohol. En la gráfica 16 se observa que se llega a concentraciones muy similares de alcohol después de las 80 h, sin embargo se obtuvo etanol más rápido a 25 °C, llegando a su concentración final a las 50 h.



Gráfica 15 Consumo de sustrato en mosto



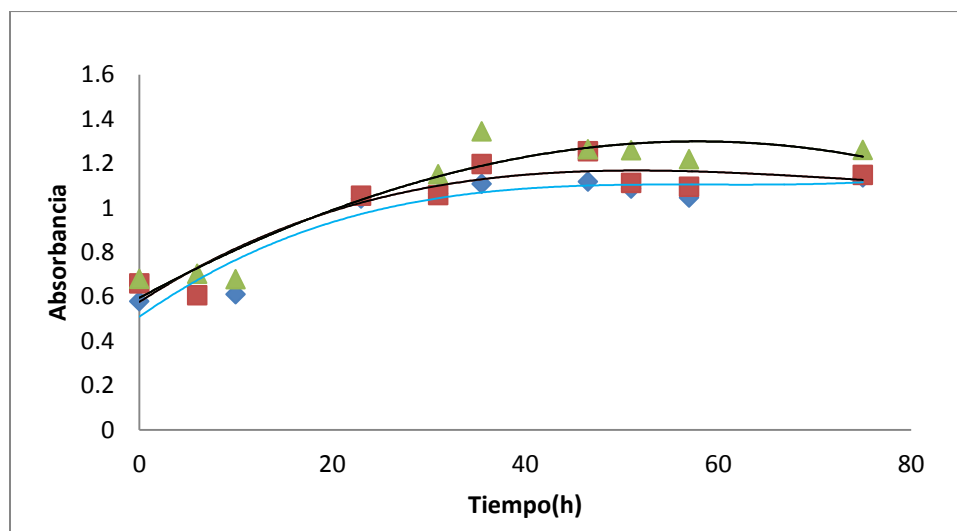
Gráfica 16 Producción de alcohol en mosto con variación en la temperatura de incubación

### 8.5 Cinética del efecto de la concentración de sustrato sobre el crecimiento celular y formación de etanol

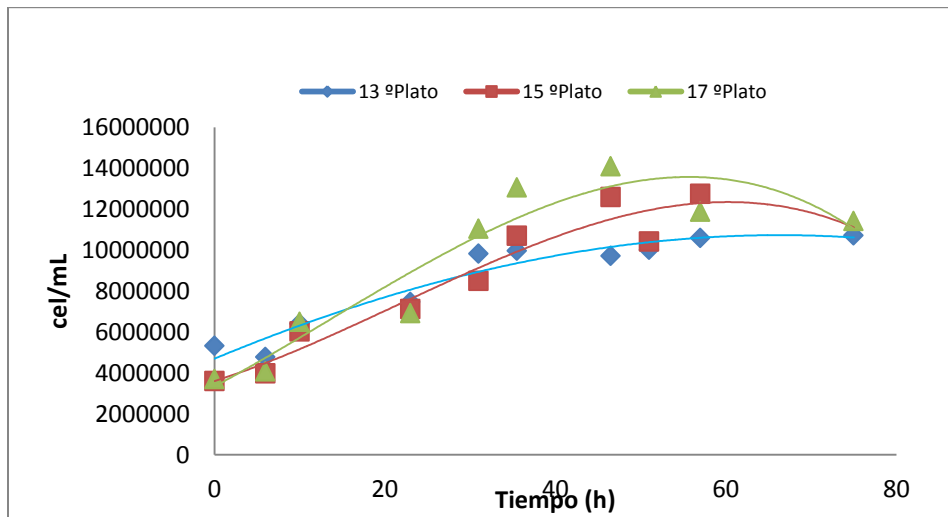
Esta cinética se llevó a cabo para conocer la concentración óptima de sustratos para obtener la mayor formación de producto, se tomó en cuenta que 15 °P es la concentración ideal de la empresa.

De acuerdo a la gráfica 17y 18, la mejor concentración de sustrato para la producción de biomasa es 17°P, ya que contiene más azúcares fermentables (Gráfica 19) que pueden ser metabolizados en alcohol.

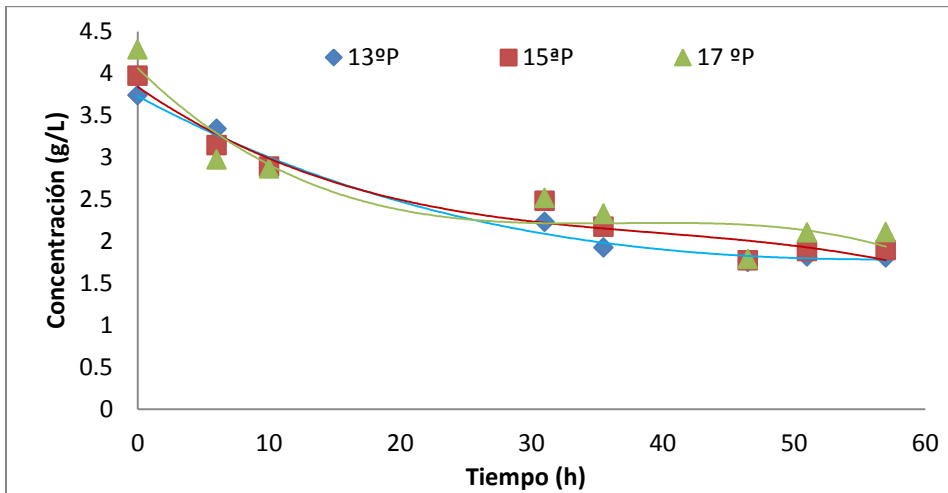
En la gráfica 20 se muestra que a mayor concentración de sustrato mayor será la producción de etanol.



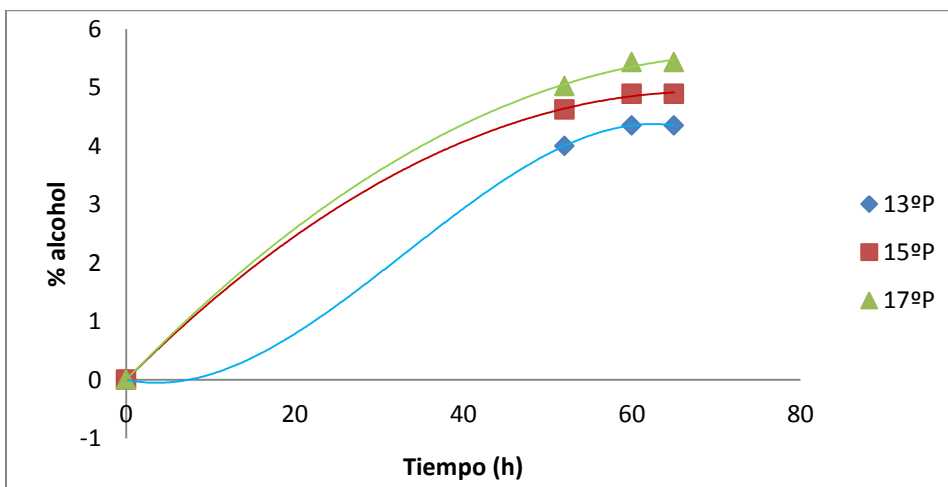
Gráfica 17 Seguimiento del crecimiento celular en mosto a diferentes concentraciones de sustrato



Gráfica 18 Incremento de las células/mL en mosto a diferentes concentraciones de sustrato



Gráfica 19 Azúcares reductores residuales en mosto a diferentes concentraciones de sustrato

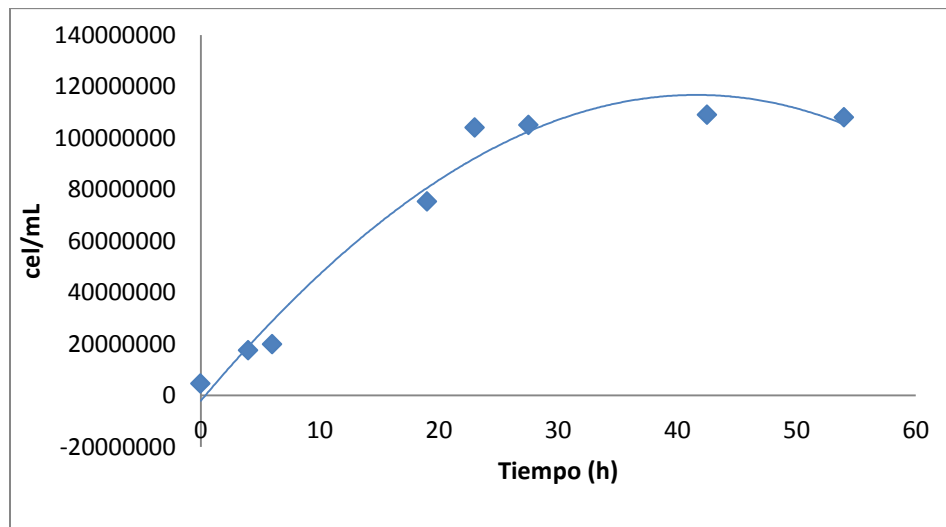


Gráfica 20 Formación de etanol en función al tiempo en mosto a diferentes concentraciones de sustrato

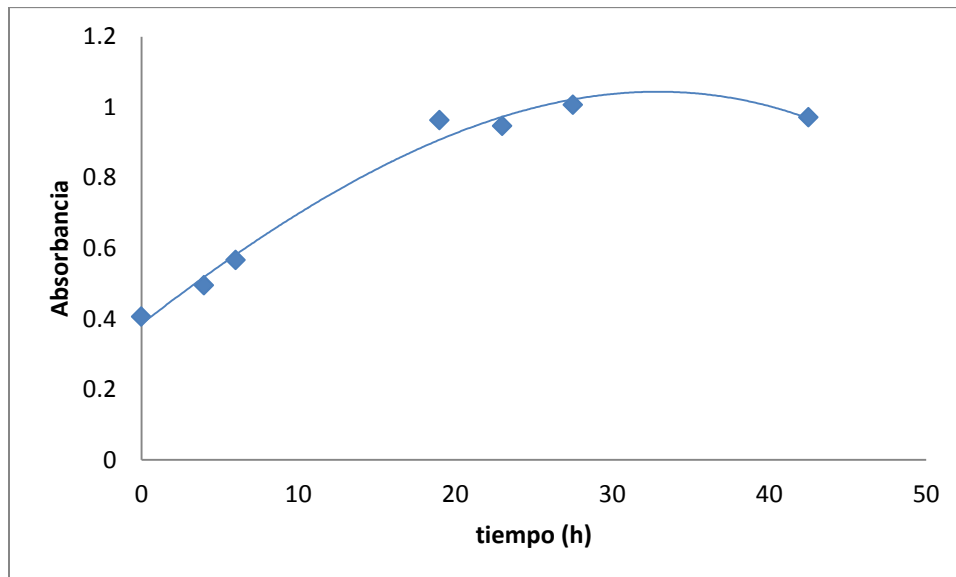
## 8.6 Cinética de escalamiento a biorreactor

El escalamiento a biorreactor se llevó a cabo en las condiciones óptimas resultantes de las cinéticas anteriores, con el fin de optimizar el proceso de fermentación y obtener una cerveza de grado alcohólico mayor.

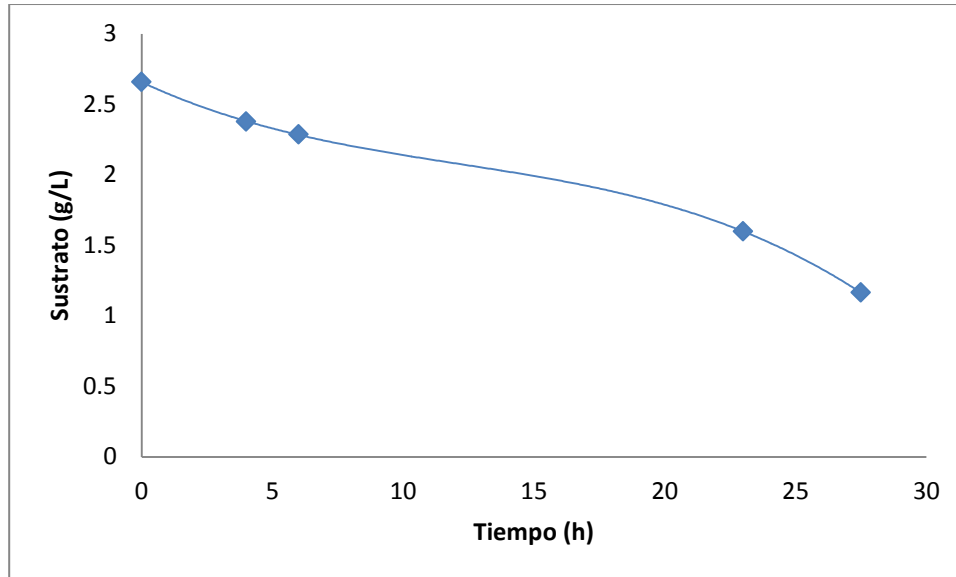
De la gráfica 21 y 22 se obtiene que el periodo de fase lag es de 10 h, la fase exponencial es de 12 horas aproximadamente, y esta tendencia corresponde a la disminución de azúcares reductores en el medio (Gráfica 23).



Gráfica 21 Conteo en cámara de Neubauer correspondiente a la cinética de escalamiento a biorreactor

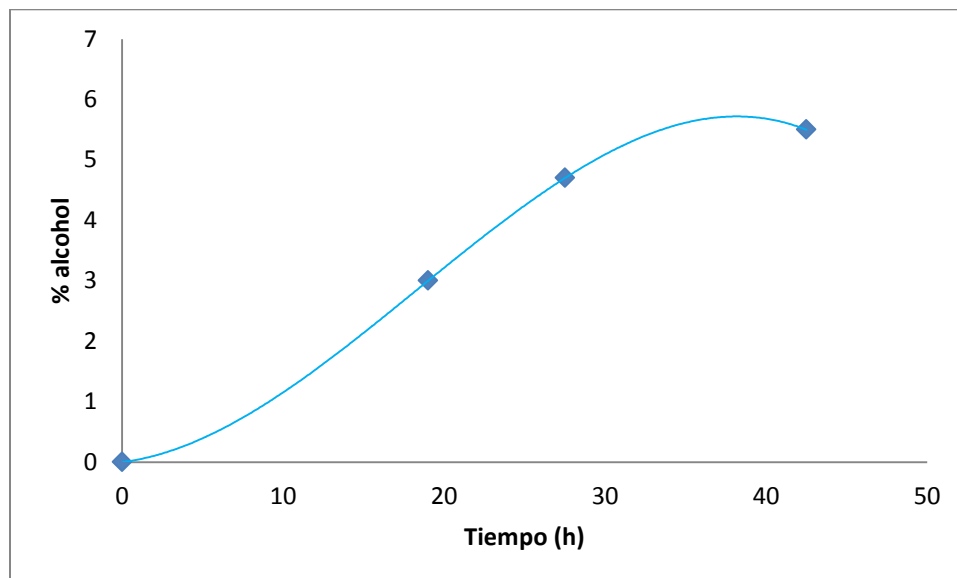


Gráfica 22 Seguimiento de la cinética de crecimiento celular mediante lecturas de D.O a 292 nm



Gráfica 23 Concentración de sustrato en mosto

En la gráfica 24 se observa la cinética de formación del producto, la cual corresponde a la mayor producción de alcohol de todas las cinéticas realizadas previamente, por lo tanto se ha establecido las condiciones óptimas de la fermentación para la elaboración de cerveza artesanal negra de la cervecería COSACO.



Gráfica 24 Formación de producto en mosto a condiciones óptimas de crecimiento

En la Tabla 1 se muestra el porcentaje de alcohol obtenido para cada cinética, se observa que en la cinética del biorreactor se obtuvo mayor formación de alcohol, utilizando las condiciones óptimas resultantes de los experimentos anteriores,

comprobando así que dichas condiciones satisfacen los requerimientos de COSACO (cervezas de 5 a 5.5 % de alcohol).

**Tabla 1 Comparación de concentración final de alcohol entre las diferentes cinéticas**

Cinética	pH	Temperatura	Concentración de sustrato	Biorreactor
% alcohol	5	5.1	5.43	5.5

La tabla 2 muestra el número de células por mL en el inóculo de cada cinética, en todas las cinéticas realizadas se mostró el mismo comportamiento de crecimiento, es decir, sin variaciones significativas en el número de células; por ello se tomará como inóculo aceptable aquel en que la concentración celular este dentro de 420 833 300 a 685 000 000 cel/mL.

**Tabla 2 Número de células/mL en inóculo**

Cinética	Cel/mL en inóculo
Prueba	685 000 000
pH en caldo nutritivo	591 666 700
pH en mosto	566 000 000
Temperatura	605 833 300
Concentración de sustrato	420 833 300
Biorreactor	455 000 000

## 9. CONCLUSIONES

Durante los procedimientos de caracterización del preparado biológico de levadura, se obtuvo que la temperatura óptima de crecimiento fue de 25°C, y que resulto ser distinta a la temperatura que se había estado utilizando en COSACO. Al utilizar diferentes pH's iniciales se observó que un valor de 4.5 es el adecuado para la producción de alcohol y un valor de 5 es óptimo para producir mayor biomasa. Sin embargo el pH inicial no pudo ser considerado como un parámetro cinético que se pueda ajustar debido que al modificar el pH del mosto, se afectó las propiedades organolépticas de la cerveza, por lo tanto el pH inicial adecuado para la fermentación fue el que proporciona el mosto y corresponde a un rango de 5.96-5.99. También utilizar una concentración inicial de sustrato igual a 17 grados plato resultó ser un acelerador del proceso de fermentación debido a que en menor tiempo se producía un porcentaje de alcohol mayor que al utilizar una concentración de 15 grados plato. Finalmente las condiciones óptimas encontradas a lo largo de la experimentación fueron aplicadas a un biorreactor con 5 litros de mosto previamente acondicionado logrando una producción de 5.5 % de alcohol en un periodo de 78 horas.



## **10. PROPUESTAS DE MEJORA**

- Realizar cinéticas para poder variar significativamente el número de células en el inóculo, y poder definir las repercusiones o beneficios que se pueden obtener en cuanto la velocidad de formación de producto, alteración de las propiedades de la cerveza.
- Implementar un sistema previo a la inoculación para poder contar con el inóculo suficiente en cada lote de producción, además de la preservación de la cepa, lo que contribuye a la disminución de costos que esto implica, ya que no se tendría que obtener esta materia prima del extranjero.

## 11. BIBLIOGRAFIA

- Hough, J. 1998. Biotecnología de la cerveza y de la malta. Editorial Acribia. España. pp. 22-40.
- López, A., García, G.M., Quintero, R. R., et al. 2002. Biotecnología alimentaria. Editorial Limusa. México. pp. 263-312.
- Hernández, R.M y Sastre, G.A. 1999. Tratado de nutrición. Editorial Díaz de Santos. España. pp 431-438.
- Posse, J. 1993. Productos agropecuarios no tradicionales. IICA. Argentina. pp. 187-193.
- Varnan, A.H., y Sutherland, J.P. 1997. Bebidas: Tecnología, Química y Microbiología. Editorial Acribia. España. pp.307-372.
- Calaveras, J. 2004. Nuevo tratado de panificación y bollería. Editorial Mundi-Prensa. España. p.p. 155-250.
- García, C.V. 2005. Introducción a la microbiología: Segunda edición. Editorial EUNED. Chile. pp. 113-117.
- Vargas, L.T., Ponce, H.R., et al. 2010. Complementos nutricionales para el rendimiento y nutrición para el cultivo de melón con fertirriego y acolchado. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. pp 5-15.
- Vicent, V.M.C., Álvarez, B.S., Zaragoza, C.J.L. 2006. Química Industrial Orgánica. Editorial Universidad Politécnica de Valencia, España. p.p 67-93.
- NOM-142-SSA1-1995. Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial.
- Linko, M. Haikara, A., et al. "Recent advances in the malting and brewing industry". J. *Biotechnol.* 65, 85-98.

## 12. ANEXOS

### Preparación de reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

1. Disolver 30 g de tartrato de sodio y potasio en agua destilada hasta obtener un volumen final de máximo 50 mL.
2. Agregar 1.6 g de NaOH previamente disuelto en 10 mL de agua destilada.
3. Agregar 1.0 g de DNS previamente disuelto en 20 mL de agua destilada.
4. Aforar a 100 mL con agua destilada.
5. Guardar en obscuridad y en frasco ámbar.

Deja reposar 15 min, en caso de uso inmediato. Es importante tener cuidado con los volúmenes que se manejan, porque el volumen final no debe ser mayor a 100 mL. Para esto, se aconseja ir disolviendo el tartrato de sodio agregando agua hasta lograr el volumen final de 50 mL (no agregar 50 mL de agua a la sal porque dará un volumen mayor).

### Curva tipo de DNS

