



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Química e Ingeniería Química

Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

Estudio de la actividad fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas en soportes naturales para la fermentación de cerveza

TESIS

Para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial

AUTOR

Carlos Elisaúl FALCÓN ESPINOZA

ASESOR

Waldir Desiderio ESTELA ESCALANTE

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Falcón, C. (2018). *Estudio de la actividad fermentativa de Saccharomyces cerevisiae inmovilizadas en soportes naturales para la fermentación de cerveza*. Tesis para optar el título de Ingeniero Agroindustrial. Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central: 619 7000 anexos 1202, 1203, 1205, 1206, 1207 Telefax: 1209, 1218
Ciudad Universitaria - Av. Venezuela s/n - Lima 1

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"
"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para mujeres y hombres"

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

A C T A DE TITULACION POR TESIS

Los suscritos Miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, bajo la Presidencia de la Mg. MIRIAM ESTELA MEMENZA ZEGARRA (Presidenta), el Ing. ROBERTO ROBLES CALDERÓN (Miembro) y el Ph.D. WALDIR DESIDERIO ESTELA ESCALANTE (Asesor), habiendo presentado para el efecto la TESIS, titulada "ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FERMENTATIVA DE *Saccharomyces cerevisiae* INMOVILIZADAS EN SOPORTES NATURALES PARA LA FERMENTACIÓN DE CERVEZA", después de SUSTENTADA Y APROBADA LA TESIS elaborada por el Bachiller en Ingeniería Agroindustrial: CARLOS ELISAÚL FALCÓN ESPINOZA; para optar el TITULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL, acordando calificarlo con la NOTA de:

DIECISIETE

(LETRAS)

17

(NÚMEROS)

Lima, 17 de diciembre del 2018

Mg. Miriam Estela Memenza Zegarra
Presidenta

Ing. Roberto Robles Calderón
Miembro

Ph.D. Waldir Desiderio Estela Escalante
Asesor

Ph.D. Jorge Ernesto Guevara Vásquez
Director de la EP de Ingeniería Agroindustrial



Agradecimientos

En primera instancia agradezco a Dios por darme una de las virtudes más valiosas que es la paciencia, la que me permitió seguir en este camino y llegar a terminar lo que una vez me propuse comenzar.

Esta tesis es fruto de mucho esfuerzo y dedicación que, si bien es cierto, corresponde a una de las materias que más me apasiona, también es cierto que me hubiera sido muy difícil de lograr sin el apoyo de mis padres. Su apoyo, tanto moral como económico, me dio la confianza suficiente en decir “si se puede” “voy a lograrlo” “quiero darles esa alegría”, alegría que una vez vi cuando ingresé a la universidad por primera vez.

Agradezco a mi asesor de tesis por brindar sus conocimientos en apoyo a este trabajo. Sin su apoyo me hubiera sido imposible de lograr; su paciencia y dedicación demuestran la confianza que tuvo en mí.

Por último, agradezco a todas aquellas personas que estuvieron allí aportando cada “granito de arena” para que este trabajo se concluya. Gracias a todos.

INDICE

RESUMEN	8
I: INTRODUCCIÓN	10
II: MARCO TEORICO	13
2.1. Generalidades de la cerveza	13
2.2. Componentes básicos en la elaboración de cerveza	14
2.2.1. La Cebada	14
2.2.2. El agua	15
2.2.3. El Lúpulo	15
2.2.4. La Levadura	17
2.3. Tecnología de elaboración de cerveza	18
2.3.1. Malteado	19
2.3.2. Molienda	20
2.3.4. Cocción	21
2.3.5. Lupulado.....	24
2.3.7. Maduración	25
2.4. Rol de levaduras durante la fermentación de cerveza	26
2.4.1. Efecto de la temperatura	26
2.4.2. Consumo de azúcares fermentables	27
2.4.3. Producción de etanol	27
2.4.4. Consumo de nitrógeno.....	29
2.4.5. Crecimiento celular.....	30
2.5. Tecnología de inmovilización celular	30
2.5.1. Inmovilización celular por adsorción	30
2.5.2. Soportes utilizados en la inmovilización de levaduras	31
2.5.3. Elección de materiales para la inmovilización celular	31
2.5.4. Soportes naturales usados en la inmovilización celular	32
2.5.5. Efecto de la inmovilización de levaduras en la fermentación	33

2.6. Calidad sensorial de la cerveza	34
III: MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. Obtención de los soportes de inmovilización	35
3.2. Acondicionamiento de los soportes de inmovilización	35
3.3. Mantenimiento de la levadura	36
3.4. Propagación de células.....	36
3.5. Inmovilización de células de levadura	36
3.5.1. Cuantificación de células en el soporte de inmovilización	37
3.6. Fermentación de mosto de malta con células inmovilizadas	37
3.6.1. Fermentación de mosto en matraces con células inmovilizadas	37
3.6.2. Fermentación de mosto en biorreactor con células inmovilizadas	37
3.7. Determinación de azúcares reductores.....	38
3.8. Determinación de nitrógeno amino libre.....	38
3.9. Determinación de etanol	39
3.10. Evaluación de la viabilidad celular	39
3.11. Evaluación sensorial de la cerveza.....	40
3.12. Análisis estadístico de los resultados	40
IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
4.1. Obtención y acondicionamiento de los soportes de inmovilización.....	41
4.2. Adsorción de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en los soportes de inmovilización	44
4.3. Fermentación de mosto de malta con células libres e inmovilizadas a nivel de matraces.....	45
4.3.1. Fermentación de mosto de malta con células libres	45
4.3.2. Fermentación de mosto de malta con células inmovilizadas en soportes de toronja y maní. 48	
4.3.3 Fermentaciones a diferentes condiciones de temperatura y concentración de extracto seco.....	51
4.4. Fermentación de mosto de malta en biorreactor “airlift”	63
4.5 Evaluación sensorial de las cervezas producidas en biorreactor	69
V. CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	74
ANEXOS	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición química de cerveza Lager y Ale.	13
Tabla 2 Composición química del lúpulo seco	16
Tabla 3: Clasificación de lúpulo según características en cerveza.....	17
Tabla 4: Diseño factorial 22 del experimento en Matraces.	40
Tabla 5: Productividad y rendimiento de etanol en fermentaciones realizadas con células libres:.....	47
Tabla 6: Matriz experimental de fermentaciones realizadas con células de <i>saccharomyces cerevisiae</i> s-33 inmovilizadas en soportes de toronja y maní.	49
Tabla 7: Análisis de varianza Productividad según tipo de soporte.....	50
Tabla 8: Análisis de varianza Rendimiento según tipo de soporte	51
Tabla 9: Rendimientos y productividades de etanol alcanzado en fermentaciones realizadas en biorreactor airlift	65
Tabla 10: Resultados de aceptación de cervezas producidas con levaduras inmovilizadas en soportes de maní y toronja de la prueba.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ca de dos hileras (izquierda) y seis hileras (derecha).	15
Figura 2: Fotografía de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por microscopia electrónica	18
Figura 3: Diagrama de flujo de elaboración de cerveza.	19
Figura 4: Metabolismo fermentativo de azúcares y producción de etanol.	28
Figura 5: Obtención de los soportes de inmovilización a partir de cascaras de toronja	42
Figura 6: Obtención de los soportes de inmovilización a partir de cáscara de maní... 43	
Figura 7: Cítica de consumo de azúcares reductores, nitrógeno amino libre y producción de etanol en fermentaciones con células libres.	46
Figura 8: Cinética de variación de pH y crecimiento celular en fermentaciones con células libres	48
Figura 9: Cinética de variación del pH en fermentaciones con levaduras inmovilizadas en soportes de maní.	52
Figura 10: Cinética de consumo de extracto seco en fermentaciones realizadas con levaduras inmovilizadas en soportes de maní.	54
Figura 11: Efecto de la temperatura en la fermentación de mosto con <i>S. cerevisiae</i> S-33 inmovilizado en soportes de maní.	55
Figura 12: Efecto de la concentración de azúcares en la fermentación de mosto con <i>S. cerevisiae</i> S-33 inmovilizado en soportes de maní.....	56
Figura 13: Cinética de variación del pH en fermentaciones de mosto de malta con levaduras inmovilizadas en soportes de toronja.	57
Figura 14: Cinética de consumo de extracto seco en fermentaciones con levaduras inmovilizadas en soportes de toronja.....	59

Figura 15: Cinética de consumo de extracto seco en fermentaciones con levaduras libres en soportes de toronja.....	60
Figura 16; Efecto de la temperatura en fermentaciones con <i>S. cerevisiae</i> S-33 inmovilizado en soportes de toronja.	62
Figura 17: Efecto de la concentración de azúcares en la fermentación de mosto con <i>S. cerevisiae</i> S-33 inmovilizado en soportes de toronja	63
Figura 18: Montaje del sistema de fermentación utilizado en donde se muestra el biorreactor airlift.....	64
Figura 19: Cinética de consumo de azúcares y producción de etanol en fermentaciones con mostos de 20°P y levaduras inmovilizadas.	66
Figura 20: Cinética de variación de pH y consumo de nitrógeno amino libre en fermentaciones con mostos de 20°P y levaduras inmovilizadas	67
Figura 21: Cinética de consumo de azúcares y producción de etanol en fermentaciones con mostos de 14°P y levaduras inmovilizadas.	68
Figura 22: Cinética de variación de pH y consumo de nitrógeno amino libre en fermentaciones con mostos de 14°P y levaduras inmovilizadas	69
Figura 23:Gráfico de barras del número de jueces vs el grado de aceptación de cervezas producidas con mostos de 14 °P y levaduras inmovilizadas en soportes de toronja y maní.....	70
Figura 24: Gráfico telaraña de evaluación descriptiva de cervezas.	71

RESUMEN

El presente estudio tiene por finalidad determinar el efecto de la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* S-33 en soportes naturales preparados a partir de cáscara de toronja (*Citrus máxima*) y maní (*Arachis hypogaea*) para su aplicación en procesos de fermentación de cerveza.

Para evaluar la performance de las levaduras inmovilizadas en ambos soportes se utilizó un diseño de bloques con arreglo factorial 2^2 y se evaluó la cinética de fermentación analizando varianzas en cuestión de rendimiento y productividad utilizando el programa MINITAB. Adicionalmente se realizaron experimentos en un birreactor airlift con mostos de 14 °Plato (1057g/l) y 20 °Plato (1083g/l) a 25 ± 0.5 °C y un flujo de aire de 0.44 vvm utilizando ambos soportes. Se evaluó la cinética de fermentación en cada caso incluyendo la productividad y el rendimiento de etanol. Las cervezas producidas se evaluaron sensorialmente utilizando pruebas afectivas y descriptivas. Los resultados de inmovilización mostraron que, a las condiciones ensayadas, un gramo de soporte de toronja absorbió 4.08×10^8 células mientras que, en el caso del soporte de maní, 0.72×10^8 células/gramos de soporte. Asimismo, la velocidad de consumo de azúcares en células inmovilizadas generó una producción de etanol de 0.50 g. etanol/g. azúcares reductores, y 0.43 g. etanol/g. azúcares reductores en células libres con mostos de malta de 14 °Plato (1057g/l); rendimientos de 0.50 y 0.42 g. etanol/g. azúcares reductores a 18 °C; y productividades de 0.245 y 0.330 g. etanol/Lh independientemente del tipo de soporte utilizado. Por otro lado, el tiempo de fermentación con mostos de malta de 14 °Plato (1057g/l) fue 3 días; mientras que fermentaciones con mostos de 20 °Plato (1083 g/L), 5 días. La productividad y rendimiento en fermentaciones realizadas en el birreactor airlift en soportes de toronja a 14 °Plato (1057g/l) resultó 0.30 g. etanol/Lh; y 0.40 g. etanol/g. azúcares reductores respectivamente. Finalmente, en cuanto a tipo de soporte utilizado en lo que respecta a productividad se obtuvo un $P > 0.05$; y un $P < 0.05$ para el rendimiento en consideración al tipo de soporte utilizado.

ABSTRACT

The present study aims to determine the effect of immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* S-33 in natural supports prepared from grapefruit peel (*Citrus maxima*) and peanut (*Arachis hypogaea*) for application in beer fermentation processes.

To evaluate the performance of the immobilized yeasts in both supports, a block design with factorial arrangement 2^2 was used and the fermentation kinetics was evaluated by analyzing variances in terms of yield and productivity using the MINITAB program. Additionally, experiments were carried out in an airlift bioreactor with 14 °Plato musts (1057 g / l) and 20 °Plato (1083 g / l) at 25 ± 0.5 °C and an air flow of 0.44 vvm using both supports. The fermentation kinetics was evaluated in each case including productivity and ethanol yield. The beers produced were sensory evaluated using affective and descriptive tests. The results of immobilization showed that, under the conditions tested, one gram of grapefruit support absorbed 4.08×10^8 cells while, in the case of peanut support, 0.72×10^8 cells / grams of support. Also, the speed of consumption of sugars in immobilized cells generated an ethanol production of 0.50 g. ethanol / g. reducing sugars, and 0.43 g. ethanol / g. reducing sugars in free cells with 14 mesh malt musts °Plato (1057g/l); performance s of 0.50 and 0.42 g. ethanol / g. reducing sugars at 18 °C; and productivity is 0.245 and 0.330 g. ethanol / Lh regardless of the type of support used. On the other hand, the time of processing with malt musts of 14 ° Plato (1057g/l) was 3 days; while fermentations with worts of 20° Plato (1083 g/L), 5 days. The productivity and yield in fermentations performed in airlift bioreactor in grapefruit support s 14 °Plato (1057g/l) resulted 0.30g. ethanol/Lh; and 0.40 g. ethanol/g. reducing sugars respectively. Finally, as regards the type of support used in terms of productivity, a $P > 0.05$ was obtained; and a $P < 0.05$ for the performance in consideration of the type of support used.

I: INTRODUCCIÓN

Las levaduras tienen una amplia aplicación en muchos procesos industriales tales como en la producción de proteína de origen celular para alimentación humana y animal, procesos fermentativos para la producción de bebidas alcohólicas e incluso para la producción de proteínas recombinantes. De todas ellas, *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo más estudiado y aprovechado comercialmente y se utiliza generalmente como sistemas libres en fermentaciones sumergidas. En lo que se refiere a la producción de bebidas fermentadas las levaduras como *S. cerevisiae* juegan un rol importante en la calidad del producto final. Tradicionalmente los procesos fermentativos industriales como el caso de la producción de cerveza se realizan en biorreactores específicos utilizando levaduras libres en el medio de fermentación. Con el paso del tiempo y con el propósito de desarrollar procesos más eficientes y productivos se ha venido explorando técnicas que ayuden a producir un mayor volumen en el menor tiempo. La inmovilización celular se presenta como alternativa interesante para alcanzar estos propósitos. Existen muchos tipos de inmovilización celular que utilizan diferentes materiales, sin embargo, para que un sistema o matriz pueda ser utilizado en la inmovilización de levaduras para su aplicación en la producción de cerveza, este debe cumplir con algunos requisitos como por ejemplo ser inocuo y no alterar la calidad sensorial del producto final ya que finalmente es un producto alimenticio. Si bien es cierto los estudios realizados sobre sistemas de inmovilización mostraron que el confinamiento de células en espacios reducidos los cuales limitan su movimiento provoca una serie de cambios fisiológicos beneficiosos a nivel celular, los cuales potencialmente pueden aprovecharse en los procesos fermentativos, sin embargo, no todas las matrices pueden exitosamente aplicarse en procesos a gran escala y debido a esto, los estudios actuales se enfocan en la búsqueda de nuevos materiales para la inmovilización de células. El rol de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación de cerveza es convertir los azúcares del mosto en etanol, CO₂ y una serie de compuestos de importancia sensorial. El tiempo de fermentación depende de muchos factores, entre ellos; la temperatura,

concentración de azúcares fermentables y el contenido de aminoácidos presentes en el mosto principalmente. Particularmente la temperatura juega un rol importante en la tasa de fermentación y la duración del proceso. Así, si se usan temperaturas entre 15 y 22°C para producir cervezas “ale”, la fermentación dura aproximadamente 7 días y, si se usan temperaturas entre 7 y 15°C para producir cervezas “lager” duran tiempos más largos de fermentación llegando incluso hasta 14 días. Con el interés de acortar los tiempos de fermentación observados en la producción comercial de cerveza “lager” manteniendo las características sensoriales se propone la utilización de sistemas de inmovilización que sean baratos y eficientes.

Los residuos agroindustriales se presentan como una oportunidad para desarrollar matrices de inmovilización de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y usarlos en los procesos de fermentación de cerveza. En la región amazónica del Perú se producen cantidades considerables de toronja y maní que al consumirlos se descartan las cáscaras. Datos estadísticos sobre su producción es escaso. Los reportes más recientes sobre la producción de estas materias primas son publicados por el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). En el año 2014 se reportó una producción de toronja de 5200 TM y 6500 TM de maní. Información sobre la cantidad de residuos generados a partir del consumo de estas materias primas no existen y su aprovechamiento no ha sido de interés hasta la fecha. Estos residuos son de naturaleza lignocelulósica y podrían potencialmente aprovecharse como matrices de inmovilización celular. Particularmente la cáscara de maní presenta una topografía rugosa y micro-cavidades en donde pueden las células de *Saccharomyces cerevisiae* depositarse. Para determinar su usabilidad debe considerarse aspectos como la cantidad de células que pueden ser depositadas (inmovilizadas) y la performance del soporte a las condiciones de fermentación de cerveza. Por su parte el albedo de la cáscara de toronja presenta una estructura esponjosa aprovechable como matriz de inmovilización. Su usabilidad debe evaluarse también en términos de su desempeño en el proceso de fermentación. En la actualidad no existen reportes sobre el aprovechamiento de estos residuos en la preparación de soportes de inmovilización y se presenta como una oportunidad para explorar su potencial uso. La utilización de estos materiales además de tener impacto en la fermentación también traería ventajas adicionales como por ejemplo su reusabilidad en fermentaciones sucesivas manteniendo una alta viabilidad celular, así como

también simplificaría el proceso de filtración de la cerveza al final de la fermentación. Otro aspecto importante en la utilización de estas matrices es su influencia en la calidad sensorial del producto final.

A pesar de todos los beneficios que involucra el aprovechamiento de residuos lignocelulósicos como la cáscara de toronja y maní, es necesario conocer su capacidad de inmovilización celular y el efecto que tiene en la actividad fermentativa de la levadura a usarse en la investigación. La información generada en este estudio servirá de base para futuras investigaciones que exploren la utilidad de matrices de inmovilización naturales heterogéneas en procesos a escala piloto y posteriormente industrial.

II: MARCO TEORICO

2.1. Generalidades de la cerveza

La industria cervecera es una de las más importantes a nivel mundial desde el punto de vista de volumen de producción y a lo largo de los años se han buscado innovar los procesos con la finalidad de mejorar la productividad (Hough, 1990). La cerveza es una bebida alcohólica producida a partir de cuatro ingredientes básicos; la cebada malteada, lúpulo, agua potable y levaduras. El contenido alcohólico pueda variar dependiendo del tipo de cerveza y puede contener desde 0.5 hasta 12 %v/v e incluso más. Además, la cerveza es fuente de muchos nutrientes tales como aminoácidos, vitaminas y minerales. En la Tabla 1 se muestra la composición química de cervezas “lager” y “ale”.

Tabla 1: Composición química de cerveza Lager y Ale.

Grupo de compuesto	Nombre	Cervezas Ale (mg/L)	Cervezas lager (mg/L)
alcoholes	Etanol	27-32x 10 ³	24x 10 ³
	Isopentanol	47-61	32-57
	Feniletanol	36-53	25-32
	n- propanol	31-48	5-10
	Isobutanol	18-33	6-11
	2 metil butanol	14-19	8-16
Esteres	Acetato de etilo	14-23	8-14
	Acetato de isopentilo	1.4-3.3	1.5-2
Diacetonas	Diacetilo	0.06-0.30	0.02-0.08
	Pentano 2,3 Diona	0.01-0.20	0.01-0.05
Compuestos sulfurados	Sulfuro de hidrogeno	0.0015-0.008	0.0015-0.008
	dimetilsulfuro	15+(ppb)	15+(ppb)

Fuente: Hough, 1990

2.2. Componentes básicos en la elaboración de cerveza

2.2.1. La Cebada

Es el ingrediente más importante en la producción de cerveza y para ser utilizada como tal debe cumplir ciertos criterios de calidad como, por ejemplo, que la variedad esté aceptada, que los granos sean de tamaño uniforme e íntegros y no contengan otro tipo de semillas o heces de roedores o insectos y además que tengan un alto potencial germinativo (Hornsey, 1999). La cebada está compuesta mayoritariamente de almidón y proteínas los cuales durante el proceso de malteado y macerado se desagregan para generar aminoácidos que sirven como nutrientes para la levadura (Hough, 1990). El almidón presente en los granos está compuesto de amilosa y amilopectina, también de azúcares (glucosa, sacarosa y rafinosa), gomas y hemicelulosas (β glucanos y pentosanos), proteínas (albúmina, globulina, hordeínas y glutelina), lípidos (fosfolípidos, ácido palmítico, oleico y linolénico), en menor cuantía mono y polifenoles y además de iones como el K^{+1} , PO_4^{-3} , Mg^{+2} , Na^{+} , Cl^{-} (Hornsey, 1999).

La cebada suele clasificarse según el número de espigas, de esta manera podemos mencionar la cebada de dos hileras y la cebada de seis hileras (figura 1). La segunda se genera cuando las tres espiguillas del nudo de la planta son fertilizadas originando una cabeza de seis hileras; es decir, seis granos en dos nudos adyacentes. Este tipo de cebada suele considerarse con un potencial enzimático muy elevado. Por otro lado, si sólo resulta fertilizada una de las tres espiguillas entonces se desarrollarán dos granos en nudos adyacentes originando un grano con mayor contenido de almidón (Panizo, 2015).



Figura 1: Cebada de dos hileras (izquierda) y seis hileras (derecha)

Fuente: Panizo, 2015

2.2.2. El agua

Es un ingrediente importante y se utiliza prácticamente en todo el proceso de elaboración, en la germinación, maceración, cocción, fermentación y en la limpieza e higienización de envases. Su calidad debe ser cuidadosamente evaluada ya que puede perjudicar algunas operaciones como es el caso de la fermentación. La calidad del agua se determina en base a su dureza el cual está relacionado con la cantidad de sales e iones metálicos presentes en ella. La dureza total del agua se define como la suma de todos los iones alcalinos, como el Ca^{+2} y Mg^{+2} . La calidad del agua para ser utilizada en procesos de elaboración de cerveza debe ser baja en dureza. Sin embargo, es preciso mencionar que aguas con cierta dureza son ideales para producir cervezas “ale” debido a que favorecen la aparición de ciertos aromas agradables, mientras que, aguas con una dureza muy baja son adecuadas para la elaboración de cervezas “lager” (Hough, 1990). La presencia de iones metálicos en exceso puede alternar la actividad enzimática de las levaduras e interrumpir el proceso de fermentación y por otro lado también puede alterar las características organolépticas de la cerveza debido a que puede participar en procesos de oxidación de lípidos presentes en ella.

2.2.3. El Lúpulo

Se cultiva en zonas templadas del mundo principalmente en países como Alemania, República Checa y USA principalmente. El estróbilo (cono femenino de la planta) se utiliza como ingrediente en la elaboración de cerveza el cual brinda amargor y aroma únicos al producto final. El amargor y aroma son otorgados por los aceites esenciales y resinas contenidas en las glándulas de lupulina. Las resinas no están presentes en aquellas plantas sin semillas mientras que el amargor (α y β ácidos y sus formas isomerizadas) es mayor en lúpulos que tengan semillas. Es por ello por lo que en la elaboración de cerveza “lager” es necesario utilizar lúpulos sin semilla (Hornsey, 2003) ya que se requiere más que nada mayor cantidad de aceites esenciales que le otorguen aromas a la cerveza en lugar de amargor (Hornsey, 1999). Durante la ebullición del mosto dulce, etapa en donde se adiciona el lúpulo; tanto los α - ácidos. (ó humulonas) y β -ácidos, (o lupulonas), sufren transformaciones estructurales de isomerización los cuales otorgan el sabor amargo. Los α ácidos generan un mayor nivel de amargor que los β ácidos (Hough, 1990). En la tabla 3 se muestra los principales componentes químicos del lúpulo.

Tabla 2 Composición química del lúpulo seco

Componentes	Contenido (%)
Sustancias amargas	18.5
Aceites esenciales	0.5
Polifenoles	3.5
Proteínas	20
Minerales	8

Fuente: Kunze, 2004

Las variedades de lúpulos en el pasado han sido agrupadas en tres grandes categorías “aroma”, “doble propósito” y “High- alfa” (Priest y Stewart, 2006). Sin embargo, recientemente esta categorización se ha cambiado en base a ciertas características como muy buenas en aroma y de mayores niveles de alfa ácidos. En la actualidad, la evaluación de cualquier nueva variedad de lúpulo para la producción de una nueva cerveza se basa en el juicio y degustación de la cerveza resultante (Priest y Stewart, 2006).

Tabla 3: Clasificación de lúpulo según características en cerveza

Lúpulos aromáticos	Lúpulos amargos
Hallertauer	Northern Brewer
Hersbrucker	Brewers Gold
Hüller	Nugget
Perle	Target
Spalter	Orion
Tettnanger	Magnum
Tradition	Bullion

Fuente: Kunze, 2004

2.2.4. La Levadura

La levadura comúnmente usada en la fermentación de cerveza es *Saccharomyces cerevisiae*. Se reproduce por gemación (Figura 2) y tiene un tamaño entre 8 y 14 μm (Hough, 1990; Boulton y Quain, 2006). Su principal función es convertir los azúcares a etanol y dióxido de carbono básicamente. Una buena levadura *Saccharomyces cerevisiae* debe mostrar una fermentación rápida, ser tolerante al etanol, resistente a altas presiones osmóticas, mostrar estabilidad genética a lo largo del tiempo, presentar altos valores de conversión de maltosa y maltotriosa a etanol, así como perfiles aromáticos equilibrados y reproducibles (Hornsey, 2003). En lo referente a la pared celular de las levaduras, está constituida por una serie de macromoléculas tales como polisacáridos, proteínas y lípidos, los cuales pueden variar con la edad de la célula, pH, temperatura, así como con la composición del medio (Foster, 1949). La pared celular de la levadura se encuentra cargada debido a la presencia de grupos fosfato y carboxilo los cuales confieren carga neta negativa. Además, presenta hidrofobicidad debido a la presencia de lípidos en la parte externa y mano proteínas que poseen compuestos fosforilados. Adicionalmente, las cargas positivas que pueden localizarse en la pared celular se deben a los grupos aminos (Hough, 1990). Asimismo, se encuentra permeada por enzimas invertasas que son segregadas por la levadura para la hidrólisis de sacarosa (Hough, 1990).

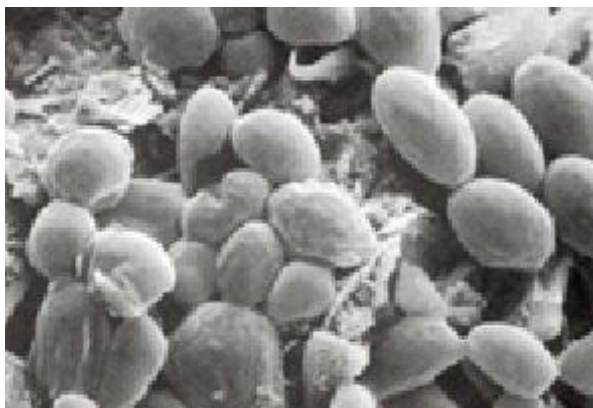


Figura 2: Fotografía de *Saccharomyces cerevisiae* por microscopía electrónica

Fuente: Kunze,2004

2.3. Tecnología de elaboración de cerveza

La tecnología de elaboración de cerveza consta de una serie de etapas definidas que no han variado desde tiempos remotos. Estas etapas incluyen el malteado de la cebada, la molienda, macerado, cocción, lupulado, fermentación, maduración y embotellado. El control de cada una de ellas conduce a obtener un producto estándar y de buena calidad organoléptica. La elección de la levadura también influye en la calidad organoléptica ya que es responsable de la producción de compuestos de importancia sensorial. En la Figura 3 se muestra el flujograma de elaboración tradicional de cerveza.

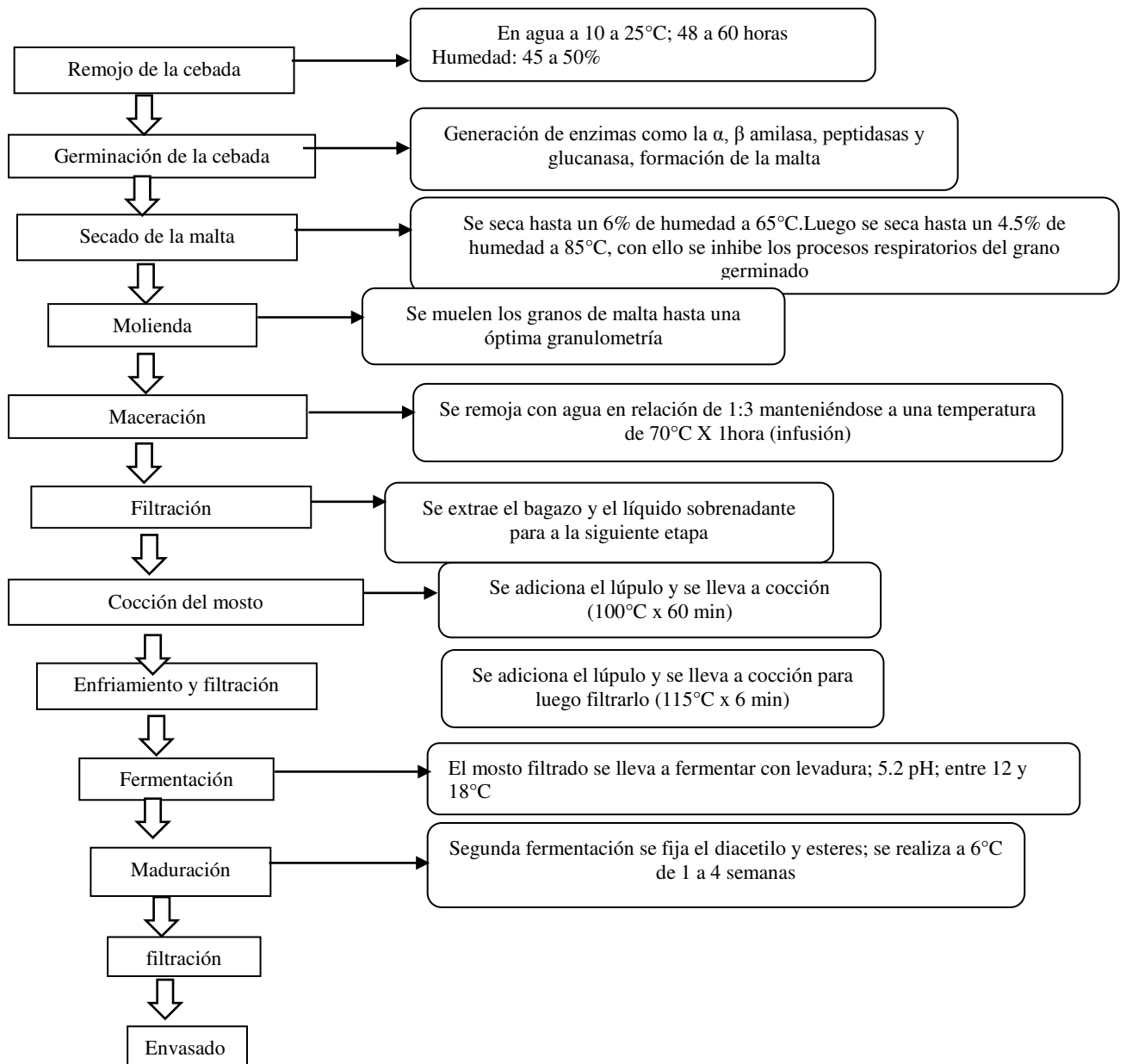


Figura 3: Diagrama de flujo de elaboración de cerveza.

2.3.1. Malteado

El principal objetivo del malteado es incrementar la cantidad de enzimas del grano, principalmente el contenido de enzimas amilolíticas, las cuales degradan el almidón del mosto generando las cantidades necesarias de azúcar fermentables para llevar a cabo la fermentación. El grano de cebada se germina a temperaturas de 10 a 15 °C, la humedad se

incrementa de 10% hasta 41-45% por un tiempo de 60 horas. Después, la cebada germinada se seca usando aire caliente, el tiempo y la temperatura depende de las características que se deseen en la malta (Malomo et al., 2011). Las temperaturas típicas de secado para maltas “lager” están entre 55 °C y 70 °C y para malta “ale” entre 60 °C y 117 °C, y en casos especiales, después del secado se le da un tratamiento de tostado con temperaturas de hasta 233 °C, obteniéndose así maltas negras o “chocolate”.

2.3.2. Molienda

La molienda consiste en reducir de tamaño la malta para facilitar la extracción de todos los azúcares fermentables y enzimas que se encuentran dentro del grano generadas durante el proceso del malteado. Es conveniente tener en consideración que el tamaño de partícula en la molienda es de suma importancia en la posterior etapa de maceración. En el caso de tener una molienda demasiado fina se extraerían mayores cantidades de azúcares; sin embargo, dificultaría la filtración de la cerveza al final, resultando un producto muy turbio. Por otro lado, una molienda demasiado grosera implicaría un bajo rendimiento en azúcares fermentables puesto que se perdería en el bagazo. En tal sentido la finalidad del triturado es partir los granos de malta para liberar la masa y demás componentes necesarios para el proceso fermentativo (Vogel 2003).

2.3.3. Maceración

La maceración es el proceso donde se mezcla la malta triturada y agua caliente y se deja reposar a ciertos regímenes de temperatura, con el fin de que las enzimas degraden las proteínas y el almidón, para producir el extracto de malta soluble. Existen diferentes métodos de maceración que se han ido desarrollando por la industria cervecera:

A. Maceración por infusión

Es el clásico sistema de macerado, se usa un tonel de macerado a una sola temperatura y sin agitación. Requiere de malta bien germinada de alta calidad; y hasta la actualidad todavía

se utiliza en pequeñas cervecerías. En la producción de cerveza artesanal, la maceración se realiza en dos diferentes condiciones, la primera a temperatura de 68° C -70°C por 1 hora y la segunda por 30 minutos a temperatura entre 72° C -74°C (Lujan, 2010).

B. Maceración por decocción

Es un sistema de maceración tipo europeo que utiliza una serie de diferentes temperaturas. El aumento de la temperatura de la mezcla se realiza mediante el calentamiento a punto de ebullición de una parte y devolviéndolo de nuevo al recipiente de maceración. Esto puede realizarse una o varias veces (simples, dobles, triples). De esta manera, la temperatura óptima para la proteólisis es alrededor de los 40 a 50 °C, puede ser seguido de temperaturas óptimas para la hidrólisis del almidón (54 a 65 °C) y finalmente una temperatura elevada durante la separación del mosto de aproximadamente 70 °C. La separación del mosto se lleva a cabo generalmente utilizando otro equipo el cual puede ser un tonel de filtración o un filtro de mosto.

2.3.4. Cocción

Consiste en elevar la temperatura del mosto hasta ebullición por espacio de 1 a 1.5 horas con la finalidad de coagular las sustancias proteicas disueltas en el mosto los cuales sedimentan, destruir enzimas y microorganismos, evaporar el agua necesaria para obtener la concentración deseada de extracto seco primitivo y por último isomerizar el lúpulo para que transfiera a la cerveza sus componentes deseados.

2.3.4.1. Composición del mosto

La composición del mosto es muy importante para alcanzar una fermentación completa. Durante la cocción se definen el contenido azúcares fermentables, nitrógeno amino libre, contenido de vitaminas, entre otros, los cuales en su conjunto determinan el valor de la gravedad específica. Asimismo, temperaturas de cocción inactivan enzimas que participan en la hidrólisis del almidón, proteínas, entre otras. Durante la cocción también se producen

reacciones químicas que resultan en la producción de compuestos de color y sabor. Industrialmente para producir una cerveza de 4-5 %v/v de etanol se necesita un mosto de 12-14°Plato (1048g/L y 1083 g/L respectivamente), (Vogel, 2003).

A. Contenido de azúcares

El contenido de azúcares fermentables del mosto es importante ya que determina el contenido alcohólico de la cerveza. Está incluida en los valores de extracto seco (grados Plato) o gravedad específica. Los grados Plato es la cantidad de extracto seco expresada en gramos que existe en 100 mL de mosto. Los grados Plato (°P) están relacionados con la densidad del mosto mediante la siguiente ecuación:

$$^{\circ}P = 259 - \frac{259000}{D}$$

Donde;

°P: Grados plato

D: Densidad del mosto (g/L)

Los mostos de malta destinadas a la producción de cerveza mayormente contienen maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, y pocas cantidades de glucosa y sacarosa. El contenido de azúcares es muy importante al momento de la fermentación ya que es la fuente de carbono y energía preferida por la levadura. Mostos que resultan de granos de cebada no muy conocidos son evaluados en su capacidad fermentativa mediante pruebas de ensayo piloto. En caso de que resulte en un contenido de etanol menor a lo estimado, deben acondicionarse los procesos de maceración y cocción.

B. Contenido de nitrógeno

Otro factor de gran importancia en el proceso de fermentación de cerveza es la cantidad de aminoácidos libres que se generan durante el proceso de maceración, el cual está expresado como nitrógeno amino libre. El contenido y calidad de proteína del grano de cebada es un

aspecto importante al momento de elegir la materia prima destinada a la elaboración de cerveza. Durante la maceración, las proteínas de la malta son hidrolizadas hasta aminoácidos por proteasas y peptidasas propias del grano. Una parte de los aminoácidos son utilizados por las levaduras durante la fermentación para su crecimiento y otra parte para la producción de compuestos de interés sensorial. En el mosto pueden estar presentes hasta 19 diferentes aminoácidos cada uno de especial importancia para el metabolismo de la levadura. La deficiencia de aminoácidos libres en el mosto puede conducir a problemas como por ejemplo una fermentación perezosa o trunca (Kunze, 2004).

C. Vitaminas y minerales

El mosto de cebada es una rica fuente de vitaminas y minerales necesarios para la iniciación y continuidad de la fermentación. Entre las vitaminas más comunes están: biotina, tiamina (B₁), riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina, piridoxamina, pantotenato cálcico e inositol; este último tiene participación en la síntesis de la membrana lipídica de las levaduras por lo que desempeña un papel estructural a diferencia de las demás que desempeñan funciones catalíticas formando parte de alguna coenzima en el metabolismo del proceso (Hornsey 2003).

Por otro lado, existen muchos minerales (dentro de estos los cationes) que juegan un papel importante en la actividad de la levadura; sin embargo, los cationes como el calcio y magnesio son los que aseguran una proliferación celular óptima y una producción de etanol adecuada. La necesidad mínima de Mg⁺² en la mayoría de las levaduras cerveceras oscila entre 42 ppm mientras que concentraciones superiores a los 25000 ppm inhiben su crecimiento. Asimismo, el requerimiento de Ca⁺² mínimo por parte de la levadura está entre los 10 y 20 ppm y concentraciones superiores a los 1000 ppm actúa como inhibidor (Hornsey, 2003).

2.3.5. Lupulado

Es la etapa en la que se agrega el lúpulo y consta de tres sub-etapas. En la primera se agrega lúpulo al inicio de la cocción para ayudar a desprender los alfa y beta ácidos e isomerizarlos otorgando el amargor adecuado a la cerveza; la segunda consiste en agregar lúpulo a la mitad de la cocción con el objetivo de otorgar sabores a la cerveza; y por último se realiza una última adición con la finalidad de otorgar aromas propios del lúpulo a la cerveza y se agrega poco antes de terminar la cocción (Vogel, 2003).

2.3.6. Fermentación

Es la etapa más importante en el proceso de producción de cerveza y la que determina en gran medida la calidad organoléptica del producto final. En esta etapa se produce la conversión de azúcares del mosto en etanol, CO₂, compuestos de importancia sensorial y biomasa celular principalmente. La conversión de azúcares en etanol es realizada por levaduras *Saccharomyces cerevisiae* específicas para procesos de fermentación de cerveza. Se han estudiado hasta el momento los parámetros tecnológicos que influyen en el proceso de fermentación entre ellos la temperatura, presión osmótica, pH, concentración celular e incluso la concentración de oxígeno (Novonty, 1992). Particularmente la temperatura tiene un efecto importante en la tasa de fermentación y calidad organoléptica. Desde el punto de vista tecnológico se conocen dos tipos de cerveza dependiendo de la temperatura de fermentación, cervezas de fermentación baja y de fermentación alta.

2.3.6.1. Procesos con fermentación alta

Las cervezas producidas por procesos de fermentación alta se conocen comercialmente como “ale”. Se usan temperaturas de fermentación entre 15 y 22°C y cepas de *Saccharomyces cerevisiae* las cuales tienen la particularidad de suspenderse en el fermentador al final de la fermentación facilitando su separación. La tasa de fermentación es mayor cuando se emplean este tipo de levaduras lo que repercute en un menor tiempo de fermentación (máximo una semana) y una mayor producción de compuestos de importancia

sensorial que afectan el aroma y sabor (Hough, 1990). Entre las cervezas de este tipo podemos encontrar la “mild ale”, la cual posee un amargor casi imperceptible, “bitter ale”, la cual posee un amargor característico, “pale ale”, Indian pale ale, “brown ale” y la “old ale” (Hornsey, 2003; Kunze, 2006).

2.3.6.2. Procesos de fermentación baja

Se caracteriza por utilizarse temperaturas entre 7 y 15°C y duran un mayor tiempo de fermentación comparado a los procesos de fermentación alta (Vogel 2003, Kunze, 2004). Las cervezas que se producen por este tipo de fermentación se llaman lager. Se usan levaduras *Saccharomyces carlbergensis* las cuales tienen la particularidad de flocular hacia el final de la fermentación y sedimentar en el fondo del fermentador facilitando su separación. La composición de la cerveza producida por este proceso es diferente ya que al haber mayor tiempo de fermentación se forman diferentes aromas y sabores deseables (Hough, 1990). Las cervezas producidas por fermentación baja son percibidas por los consumidores como de muy buena calidad debido a sus peculiares características en sabor y aroma (Vogel, 2003) y esto debido a que las bajas temperaturas influyen en la producción de compuestos volátiles agradables (Hornsey, 2003). Generalmente las cervezas elaboradas por fermentación baja suelen tener una mayor cantidad de espuma y ser más suaves al paladar. Entre los tipos de cervezas lager tenemos a “Pilsner”, “Viena”, “Dortmund” y “Munich”, siendo la Pilsner la más consumida en el mundo debido a que es clara con un ligero sabor a lúpulo y con un contenido alcohólico de tres a seis por ciento (Vogel, 2003; Hornsey, 2003; Kunze, 2004).

2.3.7. Maduración

Es la etapa en la cual se obtiene una estabilidad en cuanto a características organolépticas como sabor, aroma, etc., generando una cerveza de buena calidad para la filtración y envasado posterior. En la maduración se generan una serie de cambios principalmente en la turbidez debido a que se realiza a temperaturas bajas (0 °C). El mantener una temperatura baja genera flóculos de polipéptidos y polifenoles; los cuales

pueden ser eliminados por sedimentación o filtración para obtener un producto brillante y de estabilidad adecuada. Por otro lado, en la maduración se inhiben sabores indeseables y aromas generados por el purgado de ciertos compuestos químicos sulfurados, acetaldehído, así como también diacetilo. Además, en esta etapa sucede cierto grado (mínimo) de carbonatación natural de la cerveza debido a la presencia de levaduras vivas que, a pesar de mantenerse a temperaturas bajas, su metabolismo fermentativo es mínimo (Hornsey, 2003).

2.4. Rol de levaduras durante la fermentación de cerveza

La levadura cumple un rol fundamental en la fermentación y, durante este proceso está expuesta a diversos factores que afectan su actividad fermentativa y viabilidad. El mosto de cebada debe proveer todos los nutrientes necesarios para su metabolismo, entre ellos, fuente de carbono, nitrógeno, ácidos grasos, vitaminas, minerales y factores de crecimiento. La deficiencia de uno o más nutrientes conduce a ciertos problemas durante el proceso de fermentación y afecta la calidad de la cerveza. A parte de los nutrientes, otros parámetros también influyen en el comportamiento fermentativo de la levadura como son la temperatura, el pH del medio, la concentración de sólidos solubles, entre otros. Todos ellos tienen efecto en la velocidad de fermentación, consumo de azúcares fermentables, consumo de nitrógeno amino libre, producción de compuestos de importancia sensorial etc.

2.4.1. Efecto de la temperatura

La temperatura tiene un efecto directo en la actividad fermentativa de las levaduras, así al incrementarse acelera las reacciones bioquímicas dentro de la célula conduciendo a una mayor tasa de consumo de azúcares y producción de etanol. Controlar la temperatura durante la fermentación es necesario para evitar la producción de compuestos volátiles indeseables principalmente alcoholes superiores (Hornsey, 2003). Temperaturas bajas por el contrario favorecen la producción de compuestos aromáticos deseables (Bardi et al., 1997). Según Owen (1991), la velocidad de fermentación incrementa sustancialmente al aumentar la temperatura entre 15 y 35°C y consecuentemente incrementa los niveles de

cetonas, aldehídos, glicerol y ácido pirúvico. A medida que se incrementa la temperatura de fermentación surge el riesgo de contaminación por microorganismos indeseables conduciendo a la aparición de defectos en la cerveza (Hornsey, 2003).

2.4.2. Consumo de azúcares fermentables

Las levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae* fermenta un amplio rango de azúcares tales como: glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y maltotriosa presentes en el mosto y generan principalmente etanol y CO₂ (Varnan y Sutherland, 1997). Teóricamente, por cada gramo de glucosa se genera 0.51 g de etanol y 0.49 g de CO₂, sin embargo, en la práctica el rendimiento disminuye a valores de 90 % del valor teórico (Owen, 1991). Durante la fermentación el consumo de azúcares es gradual, primero se consumen los más sencillos seguido de los más complejos. *Saccharomyces cerevisiae* utiliza los monosacáridos, disacáridos y trisacáridos presentes en el mosto. Azúcares de mayor peso molecular no puede metabolizarlo debido a que no tiene las enzimas necesarias para su hidrólisis. Luego de agotarse los monosacáridos, los disacáridos como la sacarosa se hidrolizan extracelularmente en glucosa y fructosa y son consumidos por la levadura. La maltosa es hidrolizada a moléculas de glucosa una vez que los azúcares sencillos hayan sido consumidos (Hornsey, 2003). Los azúcares tales como maltotriosa son consumidos hacia el final de la fermentación.

2.4.3. Producción de etanol

El etanol es el principal producto de la fermentación de cerveza y se produce a partir de los azúcares del mosto por acción de las levaduras a condiciones anaerobias. El proceso de conversión consiste en una serie de reacciones enzimáticas que comienza cuando la glucosa es transportada hacia la célula y energizada. La glucólisis es la principal vía del catabolismo de la glucosa el cual termina con la formación de piruvato. Subsecuentemente el piruvato es convertido en acetaldehído y este finalmente a etanol. Las reacciones bioquímicas de la glucólisis y la producción de etanol se muestran en la Figura 4.

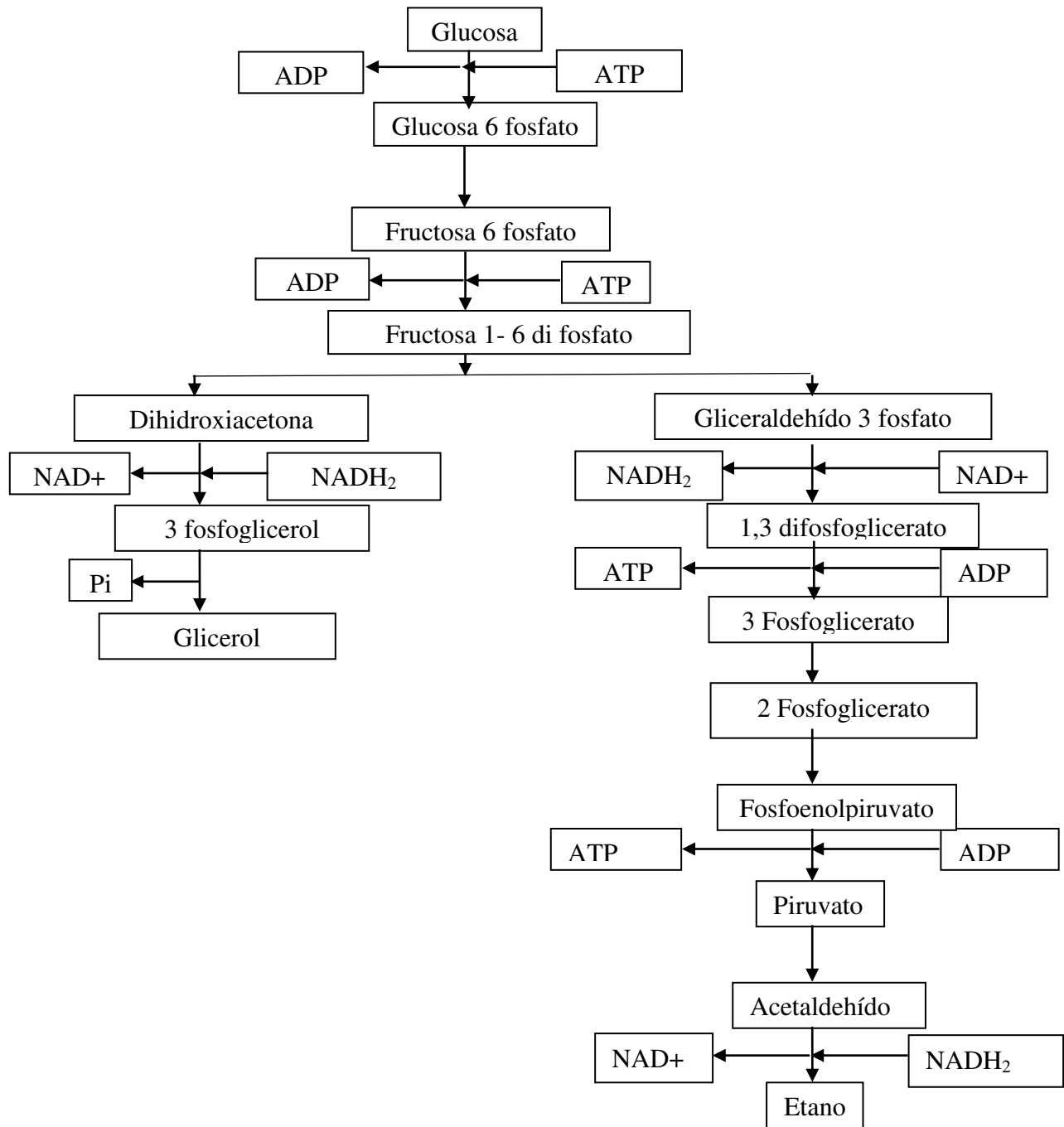


Figura 4: Metabolismo fermentativo de azúcares y producción de etanol (Hornsey, 2003).

El etanol producido es excretado por la levadura al medio acumulándose a medida que la fermentación transcurre. A medida que su concentración incrementa ejerce un efecto tóxico para la levadura afectando su actividad fermentativa. Concentraciones altas de etanol inhiben la levadura y la fermentación alcohólica cesa aun habiendo azúcares fermentables para ser convertidos en etanol.

Durante la producción de cerveza es importante que los azúcares fermentables del mosto sean convertidos en su totalidad en etanol por la levadura, esto es un indicativo que la fermentación ha sido completa. Cuando los azúcares no han sido totalmente utilizados, el rendimiento en etanol es menor a lo esperado y consecuentemente puede generar algunos problemas en el producto final. Fermentaciones incompletas son consecuencia de la

deficiencia de algún nutriente en el mosto o de la incapacidad de la levadura de producir altas concentraciones de etanol.

2.4.4. Consumo de nitrógeno

La fuente de nitrógeno es importante en el proceso de producción de cerveza. Una fracción es responsable de la formación de espuma, mientras que otra sirve para la nutrición de la levadura y el incremento de biomasa. La fuente de nitrógeno preferida son los aminoácidos libres. *Saccharomyces cerevisiae* es incapaz de hidrolizar proteínas y péptidos de alto peso molecular y debido a esto es necesario hidrolizar las proteínas de la malta en etapas como la maceración. El incremento de la biomasa asegura una fermentación completa de los azúcares presentes en el mosto. El mosto de cebada puede normalmente contener hasta 19 diferentes aminoácidos, los cuales son transportados hacia el interior de la célula a través de sistemas de transporte específicos (Owen, 1991). Los aminoácidos también pueden servir como precursores de la producción de compuestos de importancia organoléptica, principalmente alcoholes superiores, los cuales en altas concentraciones afectan negativamente la calidad sensorial de la cerveza.

2.4.5. Crecimiento celular

A las condiciones como las que se observan en la fermentación de cerveza en donde la concentración de oxígeno es crítica y la cantidad de azúcar es alta, la levadura desarrolla su actividad fermentativa con ciertas limitaciones. Parte de los nutrientes presentes en el mosto son utilizados para el crecimiento celular y el mantenimiento de la viabilidad. Bajo estas condiciones la tasa de crecimiento es baja y la viabilidad celular se ve afectada a medida que las células están sometidas a condiciones de estrés provocadas por altas concentraciones de etanol y el consumo de nutrientes. En la producción de cerveza es importante mantener altos valores de viabilidad celular ya que es determinante para definir la usabilidad de dicha biomasa como inóculo para la siguiente fermentación.

2.5. Tecnología de inmovilización celular

Los procesos tradicionales de fermentación de cerveza se realizan con células suspendidas en el medio. Ellas se mueven libremente en el mosto ejerciendo su actividad fermentativa. En vista del incremento de los volúmenes de producción y el interés de mejorar el rendimiento y productividad de dichos procesos en los últimos años se ha explorado el uso de sistemas de inmovilización para este propósito. La inmovilización celular es el confinamiento físico de un microorganismo (levaduras, bacterias, etc.) en un espacio reducido en donde la célula realiza su actividad catalítica.

Existen diferentes tipos de inmovilización celular dependiendo de su naturaleza ya sea química o física. La inmovilización física incluye el atrapamiento y la inclusión en membranas (microencapsulación) mientras que las de naturaleza química incluyen la unión a soportes por absorción iónica o unión covalente (Arroyo, 1998).

2.5.1. Inmovilización celular por adsorción

La inmovilización se da por unión entre un soporte orgánico o inorgánico (adsorbente activo) y la célula de levadura a través de interacciones iónicas o fuerzas relativamente débiles entre ellas fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas,

puentes de hidrógeno (Chang, 2002). Según Arroyo (1998) los principales factores que influyen en la adsorción son:

- pH del medio (controla la cantidad y la naturaleza de las cargas)
- Fuerza iónica (mientras mayor es la fuerza mayor será la unión)
- Diámetro de poro de la matriz de inmovilización
- Presencia de iones en el medio

Este tipo de inmovilización es la más estudiada ya que es fácil y rápido y, además ofrece algunas ventajas frente a otros sistemas de inmovilización como por ejemplo pone en contacto directo a la célula con los componentes del medio y disminuye los inconvenientes de transferencia de masa (Debourg, 1993). Sin embargo, presenta algunos inconvenientes como por ejemplo el desprendimiento de células debido a los enlaces débiles generados durante la interacción.

2.5.2. Soportes utilizados en la inmovilización de levaduras

Hasta la actualidad se han explorado el uso de diferentes tipos de soportes de inmovilización. Estos materiales difieren en su tamaño, densidad, forma y porosidad y se clasifican en soportes inorgánicos y soportes orgánicos (Arroyo, 1998). Entre los soportes inorgánicos están aquellos naturales (arcilla, bentonita, piedra volcánica, piedra pómez, etc.) y materiales manufacturados (vidrio poroso, alúmina, porcelana, etc.). Entre los soportes orgánicos se tienen polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, quitosano, etc.), proteínas (colágeno, queratina, etc.) y polímeros sintéticos los cuales pueden ser poliolefinas (poliestireno), polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.) entre otros (Arroyo, 1988).

2.5.3. Elección de materiales para la inmovilización celular

Para que un soporte pueda ser utilizado en la inmovilización de células debe reunir ciertas características (Kolot, 1981), entre ellas se tiene:

- a) La matriz debe ser inerte no perjudicar al microorganismo ni conferir características extrañas al producto final.
- b) Deben retener la mayor cantidad de células y mantenerlas adheridas por largo tiempo. En la inmovilización por adsorción existe una dinámica de adhesión y desprendimiento de células de la matriz (Branyik, 2006).
- c) El soporte debe ser resistente a la fuerza mecánica y a deformaciones y además estable a las condiciones del proceso (temperatura, pH, presión).
- d) El soporte debe facilitar la difusión del sustrato de tal modo que el contacto con el microorganismo sea rápido. La inmovilización por adsorción presenta ventaja comparado a los demás (Debourg, 1993).

2.5.4. Soportes naturales usados en la inmovilización celular

Los soportes naturales han despertado especial interés en los últimos años debido a su amplio potencial de utilizarse como matrices para la inmovilización celular. Además, son baratos, abundantes y fácilmente accesibles (Serp, 2002). La mayoría son residuos agroindustriales y materiales lignocelulósicos. Para que estos materiales puedan ser usados deben ser resistentes y estables biológica- y químicamente a diferentes condiciones de fermentación (Brányik 2004). Con la finalidad de encontrar el soporte natural idóneo para su aplicación en la inmovilización de levaduras y en procesos de fermentación de cerveza se han realizado algunos estudios. Dragone (2005) utilizó bagazo de malta como soporte de inmovilización de levaduras aprovechando la enorme cantidad de bagazo que se genera en la producción de cerveza (aproximadamente 1.7 millones de toneladas de bagazo de malta anualmente). También se han realizado estudios utilizando cáscara de naranja en la fermentación de vino, obteniéndose resultados alentadores (Kourkoutasen, 2005). En vista que aún no se ha logrado encontrar un soporte que reúna las características ideales para estos procesos se continúa investigando y explorando la utilización de nuevos materiales.

2.5.5. Efecto de la inmovilización de levaduras en la fermentación

Estudios realizados anteriormente han reportado que las células limitadas en su movimiento presentan ciertos cambios favorables en su actividad metabólica y fermentativa los cuales pueden aprovecharse en procesos industriales fermentativos. Entre los cambios observados se tiene: mayor productividad volumétrica, mayores tasas de consumo de azúcares y producción de etanol, etc., los cuales incluso influenciarían en el diseño de biorreactores de acuerdo a los estándares requeridos (Hartmeier, 1985; Martynenko y Gracheva, 2003). En la producción de cerveza estas características son interesantes ya que permitiría la disminución del tiempo de fermentación, lo que sería conveniente desde el punto de vista económico. Algunos estudios por ejemplo reportan un incremento de hasta el 20% en la producción de etanol con levaduras inmovilizadas comparadas con procesos realizados con células libres (Bardi, 1997). Otra característica reportada en la literatura es el incremento de la tasa de consumo de azúcares probablemente debido a que los azúcares están fácilmente disponibles para las levaduras. Esto tienen una repercusión importante en la tasa de producción de etanol lo cual resultaría en un menor tiempo de fermentación (Bamforth, 2006). Adicionalmente se han observado que la inmovilización de levaduras trae como consecuencia un consumo más eficiente de nitrógeno amino libre lo cual resulta en una mejor performance del proceso fermentativo (Bamforth, 2006). Otra característica es el hecho que el confinamiento beneficia la viabilidad celular comparado a los procesos que usan células libres (Masschelein, 1997). Esto es particularmente importante en los procesos de fermentación de cerveza ya que la disminución de la viabilidad celular es un problema que aún no se logra superar tecnológicamente. Además de que la inmovilización mantiene la viabilidad celular también se ha reportado que ayuda a mantener su actividad metabólica a temperaturas bajas (Melzoch et al., 1994).

2.6. Calidad sensorial de la cerveza

La calidad de una cerveza está influenciada por todas las etapas de su proceso de elaboración. Debe evitarse el ingreso de oxígeno durante la maceración, clarificación y cocción del mosto, la eliminación de sustancias propensas a reaccionar con compuestos aromáticos entre otros. Por otro lado, es importante limitar la formación de productos de la reacción de Maillard. La cerveza envasada tiene una vida útil limitada, los compuestos responsables del sabor rancio varían durante el almacenamiento prolongado, generando cambios en el sabor y aroma. Asimismo, el sabor depende del amargor otorgado por el lúpulo y el aroma los cuales se fusionan y otorgan características equilibradas. En cuanto al aroma depende exclusivamente de la cepa de la levadura y la formación de productos de la fermentación, la variedad y cantidad de lúpulo utilizado, así como los compuestos azufrados generados (Kunze, 2006).

III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de los soportes de inmovilización

Se compararon frutos de toronja en estado maduro del mercado de frutas de Lima y las cáscaras se colectaron luego de su consumo. Luego las cáscaras se redujeron de tamaño con una cuchilla hasta obtener trozos de tamaño uniforme de aproximadamente 1x1 cm. Subsecuentemente con una cuchilla se separó la parte externa (flavedo) el cual contiene aceites esenciales. Para el caso del maní, las bayas se compraron en estado seco de un mercado local y luego de su consumo se colectaron las cáscaras. Luego, se separaron las partículas (restos de tierra) y se trituraron en un molino mecánico de tornillo sinfín hasta alcanzar un tamaño de partícula uniforme de 0.5cm aproximadamente.

3.2. Acondicionamiento de los soportes de inmovilización

La cáscara de toronja (albedo) se trató con etanol al 10 % (v/v) durante 48 horas con la finalidad de eliminar la pectina y, posteriormente se secó a 70 °C por 24 horas hasta obtener un peso constante. Las partículas obtenidas se trituraron con un molino mecánico de tornillo sinfín y se pasaron por tamices estandarizados (ASTM), primero por el tamiz N°4 (4.76 mm) y las partículas retenidas en el tamiz N ° 6 (3.35mm) se utilizaron en los experimentos. En el caso del maní, la cáscara triturada se lavó con agua destilada y luego se colocó en un matraz Erlenmeyer conteniendo NaOH 0.2% (p/v) y se agitó a 120 rpm, durante 6 horas a 25°C. La relación de cáscara de maní y solución alcalina fue de 1:1. Luego del tratamiento se enjuagó con abundante agua destilada hasta alcanzar pH neutro. Seguidamente se secó en una estufa a 70°C hasta alcanzar peso constante. Luego de enfriarse, las partículas se pasaron por el tamiz N ° 12 (1.68 mm) y las partículas retenidas en el tamiz N ° 14 (1.41 mm) se utilizaron en los experimentos. Ambos soportes acondicionados se conservan por separado en frascos de vidrio estériles y herméticos previos a su utilización.

3.3. Mantenimiento de la levadura

Se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* s-33 (Fermentis), levadura cervecera disponible comercialmente en forma liofilizada. La levadura se reactivó en agua peptonada (10 g/L) estéril por 30 minutos a 30 °C. Se utilizó medio de cultivo de la siguiente composición: extracto de malta 40 g/L, agar 18 g/L y peptona bacteriológica 2 g/L. Los tubos, conteniendo el medio, se esterilizaron a 125 °C por 20 minutos y luego se enfriaron sobre una superficie con un ángulo de inclinación. Luego los tubos, con agar inclinado, se sembraron con asa de siembra e incubaron a 20°C por 72 horas hasta observar la aparición de colonias. Finalmente, los tubos se mantuvieron en refrigeración a 7 °C con renovación periódica cada 3 meses.

3.4. Propagación de células

Saccharomyces cerevisiae s-33 se propagó a 25°C en matraces Erlenmeyer conteniendo 100 ml de mosto de malta 6 °Plato (1024g/L) pasteurizado a 115°C por 6 min. El mosto se preparó a partir de extracto de malta concentrado de 80 °Brix adquirido de un proveedor local (Aromas del Perú). El mosto contenido se diluyó con agua destilada. Los matraces se agitaron a 200 rpm en un agitador orbital durante 24 horas a 25°C. Luego de la propagación, las células se separaron por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos antes de utilizarlo como inóculo.

3.5. Inmovilización de células de levadura

Las células obtenidas en la propagación se inocularon en 200 ml de mosto de malta pasteurizado de 12 °Plato (1048g/L), pH 5.5 y luego se adicionó asepticamente un gramo de soporte acondicionado (toronja o maní en cada caso) y se mantuvo en agitación (200 rpm) por 24 horas a temperatura ambiente. Luego de ello, los soportes conteniendo células inmovilizadas se separaron cuidadosamente usando un papel filtro estéril. Subsecuentemente los soportes se enjuagaron cuidadosamente con agua destilada estéril previo a su uso en los ensayos de fermentación.

3.5.1. Cuantificación de células en el soporte de inmovilización

Para determinar la cantidad de células adheridas en cada soporte de inmovilización se colocó un gramo de este en 40 ml de solución de Ringer de la siguiente composición NaCl 8.6 g/L, CaCl₂·2H₂O 0.33 g/L y KCl 0.3 g/L (Ringer, 1886) La mezcla se agito a 200 rpm durante 3 h a 20 °C. Luego, las células viables contenidas en el sobrenadante se determinaron mediante el método de tinción con azul metileno y se cuantificaron usando una cámara de Neubauer por microscopia óptica 10x. Los resultados se expresaron en células/gramo de soporte seco.

3.6. Fermentación de mosto de malta con células inmovilizadas

3.6.1. Fermentación de mosto en matraces con células inmovilizadas

Las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 350 ml de mosto de malta de 14 y 20 °Plato (1057g/l y 1083g/L) pasteurizado (115°C x 6 minutos; pH=5.5), concentraciones típicamente utilizadas en la producción de cerveza. En los matraces se colocaron una cantidad de soporte correspondiente a la cantidad de células requeridas para la fermentación (1×10^6 células/ml.°P). Las fermentaciones se realizaron en condiciones estáticas a 12 °C y 18 °C. Durante la fermentación se tomaron muestras cada 24 horas y se evaluaron la cinética de producción de etanol, consumo de aminoácidos y azúcares reductores. Paralelamente se realizaron ensayos de fermentación con células libres bajo condiciones similares con la finalidad de evaluar el efecto de la inmovilización en los parámetros cinéticos antes mencionados.

3.6.2. Fermentación de mosto en biorreactor con células inmovilizadas

Se realizaron fermentaciones de mosto en un biorreactor “airlift” de 5 L con un volumen de trabajo de 2.7 L (Ver anexo 1). En los experimentos se utilizaron mostos de malta de 14 y 20 °Plato (1057g/l y 1083g/L) pasteurizado; a temperatura de 25 ± 0.5 °C y

un flujo de aire de 0.44 vvm . (filtro de 20 μm de tamaño de poro). El pH inicial del mosto fue de 5.2 y la cantidad de soporte adicionado correspondió a la cantidad de células (1×10^6 células/ml $^\circ\text{P}$) necesarios para el proceso de fermentación de cerveza. Durante la fermentación se tomaron muestras cada 24 horas, se evaluó la producción de etanol y la integridad física del soporte de inmovilización.

3.7. Determinación de azúcares reductores

La determinación de azúcares reductores se realizó mediante el método de oxidación con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), el cual es un método colorimétrico desarrollado por Miller (1959). Para la cuantificación se construyó una curva patrón en base a la oxidación de glucosa (estándar) a 0; 100; 200; 400; 800 y 1000 ppm. Luego de la reacción con ácido 3,5- dinitrosalicílico se mide la intensidad del color mediante absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro visible. Para determinar la concentración de azúcares reductores en las muestras obtenidas durante la fermentación primero se separó las células por centrifugación (4000 rpm x 10 minutos) y luego se realizó diluciones múltiples con agua destilada ya que el método es sensible a muy bajas concentraciones de azúcares.

3.8. Determinación de nitrógeno amino libre

La determinación de nitrógeno amino libre se realizó mediante el método de la ninhidrina, el cual se fundamenta en la descarboxilación oxidativa de los aminoácidos resultando en la producción de CO_2 , NH_3 y un aldehído. Producto de la reacción se genera una coloración azul el cual se analiza por espectrofotometría. Es un método colorimétrico desarrollado por Lie (1973). Para la cuantificación de nitrógeno amino libre se construyó una curva patrón en base a la oxidación de glicina (estándar) a 0; 5; 10; 20; 40; 60 y 80ppm. Luego de la reacción la intensidad del color se midió mediante absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro visible. Para determinar la concentración de nitrógeno amino libre en las muestras obtenidas durante los ensayos de fermentación primero se separó las células por centrifugación (4000 rpm x 10 minutos) y luego se realizó diluciones sucesivas con agua destilada previo al análisis.

3.9. Determinación de etanol

La determinación de etanol se realizó mediante oxidación con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) el cual es un método químico-colorimétrico modificado basado en los principios del método propuesto por Borkenstein (1962). El método se fundamenta en la pérdida de uno o más hidrógenos del carbono que contiene al grupo $-OH$. El tipo de producto que se genera depende del número de estos hidrógenos que tiene el alcohol. La oxidación de alcoholes primarios como el etanol produce el correspondiente aldehído el cual se oxida a ácido. Para la cuantificación se construyó una curva patrón en base a la oxidación de etanol (estándar) a 0; 78; 156; 312 y 624ppm. La intensidad del color se midió mediante la absorbancia a 440 nm en un espectrofotómetro visible. Para determinar la concentración de etanol en las muestras obtenidas durante la fermentación primero se separó las células por centrifugación (4000 rpm x 10 minutos) y luego se destiló por arrastre de vapor. El destilado recolectado se reconstituyó con agua destilada hasta el volumen inicial de la muestra, luego se diluyó sucesivas veces y se utilizó en la cuantificación.

3.10. Evaluación de la viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante tinción con azul de metileno y observación en un microscopio óptico de acuerdo con lo establecido por la ASBC (1992). El método se fundamenta en que células con membranas celulares dañadas son permeables al paso de azul de metileno tiñéndose de azul mientras que las células viables permanecen incoloras. Para el conteo de células se utiliza una cámara de Neubauer. Las muestras obtenidas durante la fermentación se diluyeron sucesivas veces con agua destilada estéril y finalmente con una solución de azul del metileno. Se tomó una alícuota de esta solución y se colocó en la cámara de Neubauer, el cual se colocó en un microscopio óptico (10x de aumento) para el conteo, la concentración celular se expresó como células/mL.

3.11. Evaluación sensorial de la cerveza

La evaluación sensorial de las cervezas producidas utilizando los diferentes soportes (maní y toronja) se realizó mediante la prueba afectiva de satisfacción utilizando una escala hedónica de cinco puntos (1=me gusta mucho y 5=me desagrada mucho). La evaluación se realizó con un panel conformado por 7 jueces semientrenados (2 mujeres y 5 varones) entre 22 y 40 años, los cuales fueron seleccionados considerando que no sean abstemios ni bebedores asiduos. Adicionalmente se aplicó una prueba descriptiva en diagrama de telaraña a cinco atributos comúnmente evaluados en cervezas: impacto alcohólico, acidez, aroma frutal, cítrico y sabor a levadura. Para ello se utilizó una escala de seis puntuaciones para cada atributo (de 0 a 5).

3.12. Análisis estadístico de los resultados

Con la finalidad de evaluar el efecto de las variables de entrada (Temperatura y grados Plato) sobre la productividad y rendimiento de etanol en experimentos de fermentación en matraces Erlenmeyer se desarrolló un diseño de bloques con arreglo factorial 2^2 , mediante el software MINITAB (Tabla 4). Asimismo, los resultados de la cinética de fermentación, así como de la evaluación sensorial se presentaron como promedios y error estándar en base a tres repeticiones utilizando Excel.

TABLA 4: Diseño factorial 2^2 del experimento en Matraces.

	Bloques	Temperatura (°C)	Concentración (°P)	productividad (g de etanol/LH)	Rendimiento (g etanol/g Azúcares reductores)
1	Toronja	12	14		
2	Toronja	12	20		
3	Toronja	18	14		
4	Toronja	18	20		
5	Maní	12	14		
6	Maní	12	20		
7	Maní	18	14		
8	Maní	18	20		

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Obtención y acondicionamiento de los soportes de inmovilización

Frutos de toronja en estado maduro se pelaron y las cáscaras se separaron para su posterior uso (Figura 5a y b). La cáscara está conformada por el albedo y flavedo. La separación del flavedo es importante ya que contiene aceites esenciales que podrían inhibir la actividad fermentativa de *S. cerevisiae*. Una vez separado el albedo se procedió a cortar en trozos de tamaños uniformes de 1x1 cm como se observa en la figura 5c. Luego, los trozos se trataron con una solución etanólica al 10 %v/v con la finalidad de eliminar la pectina contenida en ella. La separación de la pectina es importante ya que podría tener un efecto negativo en la calidad sensorial del producto final. La pectina se usa comúnmente en la industria de alimentos como agente gelificante y modificador de la reología de fluidos. Luego del tratamiento con la solución etanólica los trozos se enjuagaron asépticamente con agua destilada, se escurrieron y se secaron a 70°C en estufa hasta obtener un peso constante. Subsecuentemente los trozos se trituraron en un molino mecánico helicoidal y se tamizaron. Las partículas se hicieron pasar el tamiz N ° 4 y los que se retuvieron en el tamiz N ° 6 se utilizaron en los experimentos subsecuentes. Finalmente, las partículas de toronja acondicionadas se guardaron en bolsas plásticas herméticas hasta su uso. En la figura 5d se muestra los soportes de inmovilización contenidos en un matraz. Un aspecto importante que tomar en cuenta es el tamaño de partícula ya que mientras menor sea hay una mayor área superficial de contacto.



Figura 5: Obtención de los soportes de inmovilización a partir de cascaras de toronja A: fruto de toronja, B: cáscara de toronja, C: albedo de la cáscara de toronja, D: soportes acondicionados.

En el caso del maní, la cáscara se trituró en un molino mecánico helicoidal hasta obtener un tamaño pequeño de partícula (Figura 6b). Luego, el material se lavó varias veces con agua destilada y subsecuentemente se procedió a realizar una deslignificación parcial. El proceso de deslignificación se llevó a cabo utilizando una solución de NaOH, 0.2 % p/v con la finalidad de eliminar parcialmente el contenido de lignina del material. La cáscara de maní está constituida principalmente de lignocelulosa y ambos componentes (lignina y celulosa) tienen características químicas diferentes que influyen en los procesos de flotación del material y adhesión celular. Un balance adecuado de ambos componentes influye favorablemente en la inmovilización de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. En investigaciones realizadas anteriormente sobre procesos de deslignificación de materiales lignocelulósicos se utilizaron diferentes agentes deslignificantes como ácidos o álcalis

minerales a diferentes concentraciones, los cuales tuvieron un efecto diferente en las características finales del material (Guerrero, 2016). La exposición de materiales lignocelulósicos a agentes ácidos y álcalis no solo elimina la lignina sino también modifica la configuración espacial topográfica de dichos materiales. Luego de la exposición del material triturado al NaOH, (0.2%p/v) se lavó varias veces con agua destilada hasta la neutralidad. Subsecuentemente se secó a 70°C en una estufa hasta peso constante. Finalmente, el material deslignificado se hizo pasar a través del tamiz N °12 (1.68mm) y aquellas partículas retenidas en el tamiz N °14 (1.41mm) (Figura 6c) se utilizaron en los procesos de inmovilización de levaduras. Los procesos de deslignificación se realizan con la finalidad de incrementar la adsorción celular de los materiales a ser utilizados en los procesos de fermentación.



Figura 6: Obtención de los soportes de inmovilización a partir de cáscara de maní: A cáscara de maní, B: cáscara de maní triturado y seco, C: soporte acondicionado.

4.2. Adsorción de células de *Saccharomyces cerevisiae* en los soportes de inmovilización

Los soportes de inmovilización acondicionados (toronja y maní) se pusieron en contacto por separado con una suspensión de células de *Saccharomyces cerevisiae* S-33 propagado previamente siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 3.4. Luego de 24 horas de contacto se determinó la máxima concentración de células adheridas por gramo de soporte. La cuantificación se realizó siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 3.5.1. Los resultados mostraron una máxima concentración de levaduras inmovilizadas en el soporte de toronja de 4.08×10^8 células/gramo de soporte mientras que en el caso del soporte de maní 0.72×10^8 células/gramos de soporte. La capacidad de adhesión celular de un material es importante desde el punto de vista tecnológico ya que a mayor capacidad de adhesión de levaduras implica usar una menor cantidad de soporte en los procesos de fermentación de cerveza. Estudios realizados anteriormente por otros investigadores usando soportes de inmovilización naturales mostraron diferentes capacidades de adsorción celular el cual depende del tipo de material usado para producir los soportes, la concentración del ácido o álcali usado en el proceso de deslignificación, las condiciones de deslignificación (tiempo y temperatura) e incluso de la cepa de levadura utilizada en la inmovilización celular (Dragone, 2005). De los resultados obtenidos se observa que se necesita una mayor cantidad de soporte de maní para alcanzar la concentración celular por gramo de soporte alcanzado en el caso de la toronja. En prácticas comunes de elaboración de cerveza para iniciar el proceso de fermentación es necesario considerar una concentración de levaduras igual a 1×10^6 células/ml.°P. En base a este principio debe considerarse la cantidad de soporte correspondiente a la cantidad de células necesarias para iniciar el proceso de fermentación.

Investigaciones realizadas por otros autores han determinado los mecanismos de adhesión de las células a soportes naturales. Así, la adhesión se lleva a cabo mediante enlaces débiles tales como: interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, entre otros (Hornsey, 2003). Debido a los mecanismos débiles de adhesión celular, las células están continuamente adhiriéndose y liberándose de los soportes de inmovilización hasta alcanzar un equilibrio en donde el soporte alcanza su máxima capacidad de adhesión. Una de las ventajas de los sistemas de inmovilización celular por

adsorción es que los nutrientes (azúcares fermentables, fuente de nitrógeno, vitaminas, etc.) presentes en el mosto de malta están en contacto directo con las levaduras, lo cual minimiza las limitaciones de transferencia de masa en el sistema. Otro aspecto importante desde el punto de vista de la calidad sensorial del producto final es que el soporte de inmovilización debe ser inerte, es decir que no reaccione o libere compuestos que alteren el aroma y sabor de la cerveza.

4.3. Fermentación de mosto de malta con células libres e inmovilizadas a nivel de matraces

4.3.1. Fermentación de mosto de malta con células libres

Se realizaron experimentos de fermentaciones en matraces con células libres de *Saccharomyces cerevisiae* S-33 con la finalidad de evaluar su comportamiento fermentativo y compararla con experimentos de fermentación realizadas con células inmovilizadas en soportes de toronja y maní. La propagación celular se realizó de acuerdo con el procedimiento detallado en la Sección 3.4. Los experimentos se llevaron a cabo con mosto de malta de 14 y 20°P y a temperatura de 25°C. La fermentación se controló mediante la variación de pH y la producción de CO₂. La performance de la fermentación se evaluó mediante el rendimiento y la productividad de etanol. Los ensayos se realizaron a condiciones estáticas y cada 24 horas se tomaron muestras a condiciones asépticas para la determinar el consumo de azúcares reductores y nitrógeno amino libre, producción de etanol, variación de pH y °Brix respectivamente. Los resultados se muestran en las figuras 7 y 8.

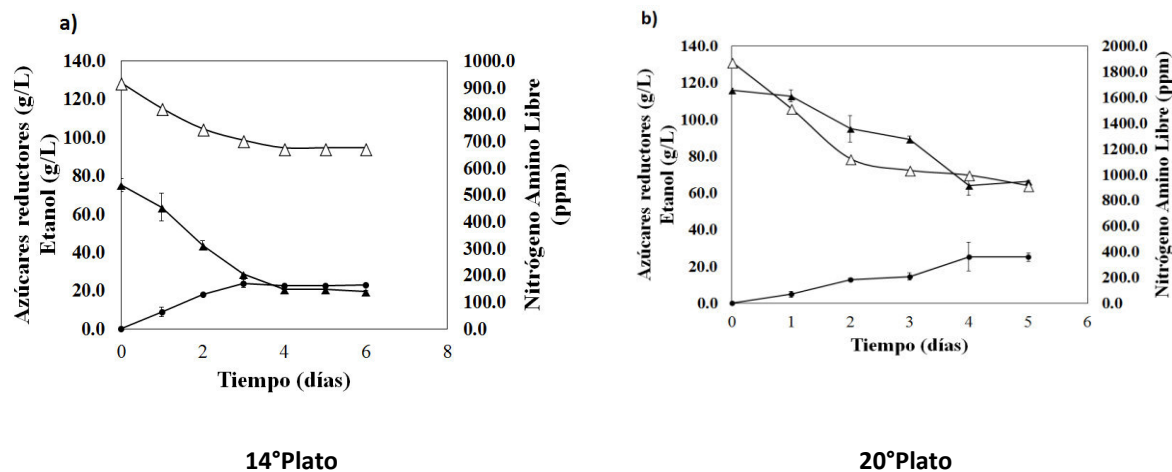


Figura 7: Cinética de consumo de azúcares reductores, nitrógeno amino libre y producción de etanol en fermentaciones con células libres. (Δ : Nitrógeno amino libre, \bullet : Etanol, \blacktriangle : Azúcares reductores).

Como se observa en la figura 7a, la concentración inicial de azúcares reductores en el mosto de 14° Plato (1057g/l) fue de 75 g/L y la producción de etanol hacia el final de la fermentación resulto ser 23.64 g/L. Esto indica un rendimiento de etanol de 43.0 % a partir de los azúcares reductores (maltosa, maltotriosa, glucosa, fructosa principalmente) presentes en el mosto de malta. La baja concentración de azúcares reductores (75 g/L) en el mosto de 14 °P se debería a la presencia de un mayor contenido de azúcares no fermentables (almidón, dextrinas de alto peso molecular) el cual está relacionado con la producción de etanol (23.64 g/L). El mosto de malta está compuesto comúnmente de maltosa, maltotriosa, maltotetraosa y dextrinas de mayor peso molecular, así como también de pequeñas cantidades de glucosa, fructosa y sacarosa. De todos los azúcares presentes en el mosto de malta sólo maltosa, maltotriosa, glucosa, fructosa y sacarosa pueden ser fermentados por *Saccharomyces cerevisiae*. Los azúcares fermentables representan aproximadamente el 50 % del total de azúcares presentes en el mosto de malta. Azúcares tales como maltotetraosa no pueden ser fermentados por *Saccharomyces cerevisiae* (Hornsey, 2003). Un mosto de malta con menor proporción de azúcares fermentables se debería al régimen de maceración utilizado en su producción.

Las fermentaciones alcohólicas se evalúan en base al rendimiento y productividad de etanol. El rendimiento permite conocer la cantidad de azúcar convertida en etanol. El rendimiento teórico es aproximadamente de 51% (relación de Gay Lussac). Sin embargo, este valor disminuye debido a que parte del azúcar fermentable (glucosa) se utiliza en la producción de biomasa, glicerol y otros subproductos de la fermentación alcohólica. Los resultados obtenidos en esta investigación muestran un mayor rendimiento (0.49 g etanol/g azúcares) cuando se utilizó mosto de malta con mayor concentración de extracto seco (20 °Plato) mientras que la productividad fue menor (0.212 g. etanol/L.h) comparado a fermentaciones realizadas con mostos de 14°Plato (1057g/l) (Tabla 5). Este efecto se debería a que mayores concentraciones de sólidos solubles en el mosto provoca estrés osmótico afectando la actividad fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* S-33.

Tabla 5: Productividad y rendimiento de etanol en fermentaciones realizadas con células libres:

Temperatura (°C)	Extracto seco (°P)	Productividad (g de etanol/L. h)	Rendimiento (g etanol/g azúcares)
25	14	0.328	0.43
25	20	0.212	0.49

De los resultados obtenidos se observa que no hay una diferencia sustancial entre fermentaciones realizadas con mostos de 14 o 20°P en términos de tasa de consumo de azúcares y producción de etanol. Otro aspecto importante es la disminución del pH y el crecimiento celular durante la fermentación tal como se observa en la figura 8.

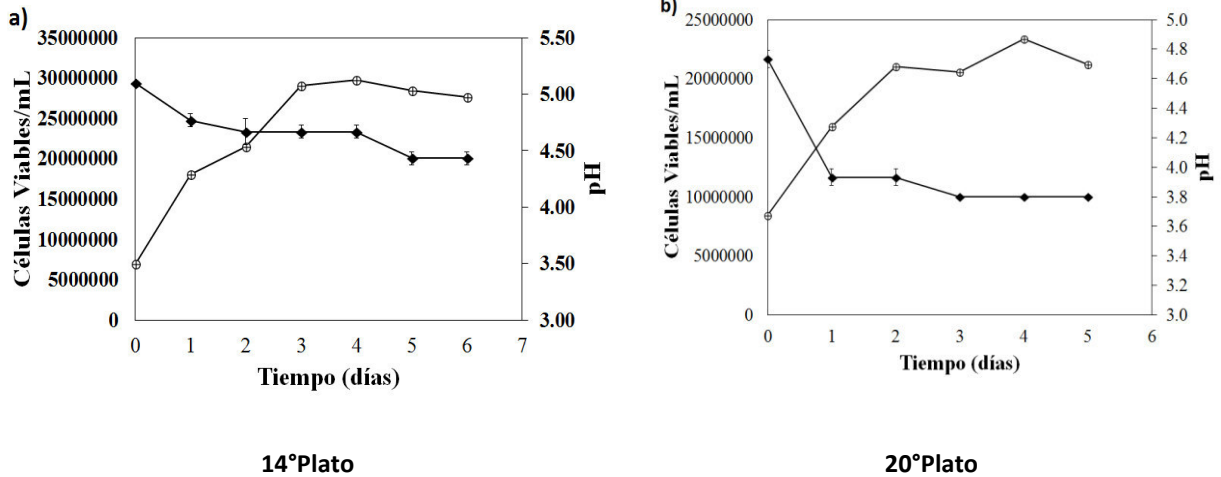


Figura 8: Cinética de variación de pH y crecimiento celular en fermentaciones con células libres (Θ: Células viables/mL, ◆: pH).

4.3.2. Fermentación de mosto de malta con células inmovilizadas en soportes de toronja y maní

Se realizaron experimentos de fermentación de mosto de malta utilizando levaduras *Saccharomyces cerevisiae* S-33 inmovilizadas en soportes de toronja y maní. Los experimentos se realizaron con mostos de diferentes contenidos de extracto seco (14 y 20 °Plato), y a diferentes temperaturas de fermentación (12 y 18°C). La concentración de células inoculadas en cada matraz y el pH inicial fueron similares en ambos casos (3.5×10^8 cel. ° P; y 5 ± 0.2 respectivamente). Las variables dependientes fueron el rendimiento y la productividad de etanol. Para evaluar el efecto de la temperatura y la concentración de extracto seco del mosto (°Plato) se utilizó un diseño (soporte de toronja y maní) factorial 2^2 . La matriz experimental con los resultados de cada tratamiento se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6: Matriz experimental de fermentaciones realizadas con células de *saccharomyces cerevisiae* s-33 inmovilizadas en soportes de toronja y maní.

Tratamiento	Bloques	Temperatura (°C)	Extracto seco (°P)	Productividad (g. etanol/L.h)	Rendimiento (g. etanol/g azúcares reductores)
1	Toronja	12	14	0.239	0.50
2			20	0.183	0.40
3		18	14	0.245	0.46
4			20	0.219	0.50
5	Maní	12	14	0.327	0.41
6			20	0.137	0.32
7		18	14	0.330	0.41
8			20	0.220	0.42

Se alcanzaron los mayores rendimientos (0.50, 0.46, 0.42 y 0.41 g etanol/g azúcar utilizado) en experimentos realizados con mostos de 14 °P. Las levaduras inmovilizadas en soportes de toronja mostraron los valores más altos de rendimiento de etanol (0.5 g etanol/g azúcar utilizado) en base a azúcares reductores consumidos. Teóricamente por cada gramo de glucosa se genera 0.51g de etanol y 0.49g de CO₂. En la práctica el rendimiento es comúnmente el 90% del valor teórico (Owen, 1989). Los valores obtenidos en los experimentos se encuentran dentro de los valores esperados. En lo referente a los resultados de productividad, se observa que las fermentaciones con mostos de 14 °Plato (1057g/l) mostraron los mayores valores independientemente del soporte utilizado. Así las mayores productividades (0.245 y 0.330 g de etanol/L.h) se obtuvieron en fermentaciones realizadas con mostos de 14 °Plato (1057g/l) y a 18 °C respectivamente. Temperaturas de 12°C se usan por lo general en la fermentación de cervezas lager, las cuales se caracterizan por un contenido balanceado de alcoholes superiores y esteres, mientras que temperaturas de 18 °C se usan para producir cervezas “ale” los cuales se caracterizan por un mayor contenido de alcoholes superiores y esteres. La temperatura juega un rol importante en la actividad fermentativa de la levadura. Por otro lado, fermentaciones de cerveza tradicionalmente se realizan usando mostos de 12 a 14 °Plato (1057g/l) los cuales resultan en cervezas de 4.5 %v/v de etanol. Fermentaciones realizadas con mostos de mayor contenido de extracto seco (20 °Plato) se realizan con la finalidad de incrementar los volúmenes de producción desde

que las cervezas producidas por este método se diluyen al término de la fermentación hasta alcanzar el contenido de etanol de una cerveza comercial. Los procesos que utilizan mostos de mayor contenido de extracto seco se conocen como fermentaciones de alta gravedad. En estos procesos las levaduras están sujetas a estrés osmótico y por otro lado deben producir altas concentraciones de etanol. Para ello, las levaduras deben presentar buenas condiciones fermentativas.

Teniendo en cuenta el nivel de significancia establecido a un 0.05%; los resultados obtenidos en el análisis de varianza en el programa MINITAB, establece que no hay diferencias significativas en cuanto a tipo de soporte utilizado en lo que respecta a productividad ($P > 0.05$). Los resultados obtenidos para el tipo de soporte fue 0.173. (Tabla 7).

Tabla 7: Análisis de varianza Productividad según tipo de soporte

Fuentes	GL	SC	MC	F	P
TIPO DE SOPORTE	1	0.002048	0.002048	0.95	0.402
TRATAMIENTO	3	0.0218001	0.007267	3.36	0.173
ERROR	3	0.006495	0.002165		
TOTAL	7	0.030344			
S=0.04653	R-CUAD.	=78.60%	R-CUAD.	AJUSTADO	=50.06%

Por otro lado; haciendo el mismo análisis, se observa que el rendimiento sí genera diferencias significativas en consideración al tipo de soporte utilizado. MINITAB arrojó un P-Valor de 0.01; ($P < 0.05$). A pesar de ello no se puede elegir un tratamiento en especial ya que tratamientos de 12°C-14°P; 18°C-14°P y 18°C-20°P se comportan de forma similar. Sin embargo, a condiciones de 12°C-20°P se muestra una diferencia en relación con los tres tratamientos anteriores (Tabla 8).

Tabla 8: Análisis de varianza Rendimiento según tipo de soporte

Fuentes	GL	SC	MC	F	P
TIPO DE SOPORTE	1	0.01125	0.0112500	0.75	0.003
TRATAMIENTO	3	0.01285	0.0042833	28.56	0.010
ERROR	3	0.00045	0.0001500		
TOTAL	7	0.02455			
S=0.01225	R-CUAD.	=98.17%	R-CUAD.	AJUSTADO	=95.62%

4.3.3 Fermentaciones a diferentes condiciones de temperatura y concentración de extracto seco (°Plato).

4.3.3.1 Fermentaciones con levaduras inmovilizadas en soporte de maní.

La temperatura y la concentración de extracto seco dependiendo de sus valores mostraron un efecto variable en la disminución del pH (Figura 9). En el gráfico se observa una mayor disminución del pH en fermentaciones realizadas a 12°C con mostos ya sea de 14 ó 20 °Plato (1057 ó 1083g/L respectivamente) en comparación con fermentaciones realizadas a 18 °C respectivamente. Este efecto sería de particular importancia ya que indicaría que *Saccharomyces cerevisiae* S-33 inmovilizada en soportes de maní produciría una mayor cantidad de ácidos orgánicos los cuales provocan una mayor disminución del pH trabajando a menores temperaturas y con mostos de igual concentración de extracto seco. Desde el punto de vista sensorial cervezas menos ácidas es preferible. Así mismo se observa que la disminución del pH es menor a medida que se trabaja con mostos de mayores grados Plato (12 °C/20 °P y 18 °C/20 °P). Particularmente, esta característica es interesante desde el punto de vista sensorial sin embargo es necesario tomar en consideración la cantidad de azúcares que se convierte en etanol. En términos generales se observa que *S. cerevisiae* S-33 inmovilizada en soporte de maní produce cervezas menos ácidas cuando se fermenta a temperaturas mayores de 12°C y con mostos más concentrados.

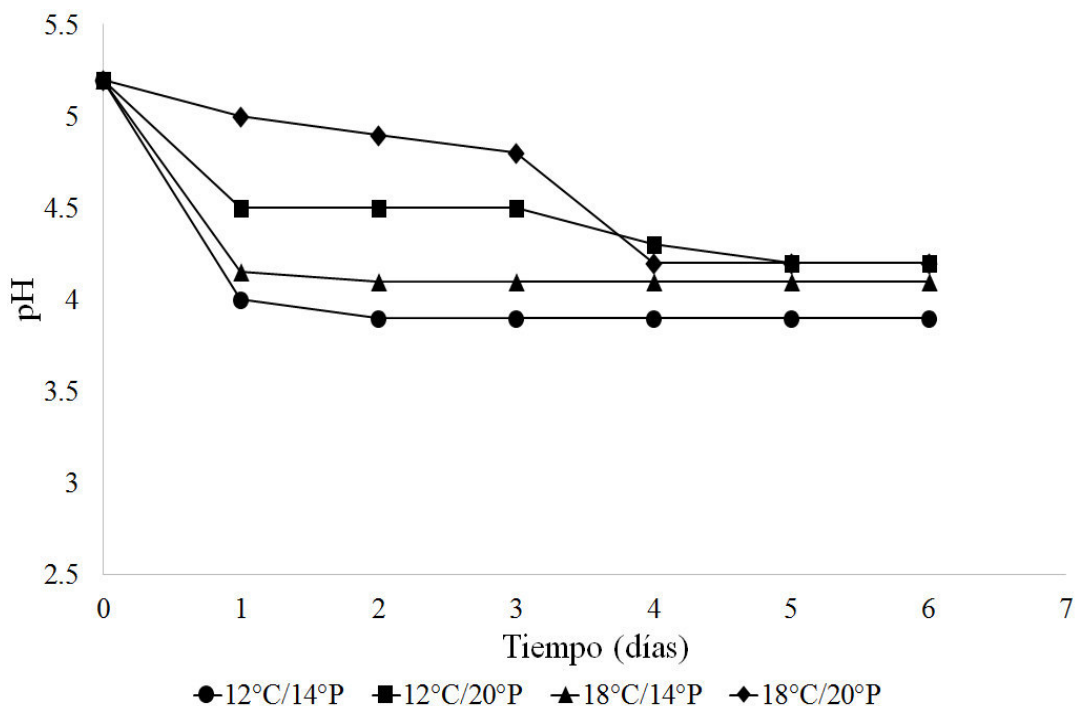


Figura 9: Cinética de variación del pH en fermentaciones con levaduras inmovilizadas en soportes de maní.

La temperatura juega un rol importante en la actividad fermentativa de levaduras. En la fermentación de cerveza se trabajan en rangos definidos dependiendo del tipo de cerveza a producir, ya sea “lager” (7–14°C) o “ale” (15–25°C). El incremento de la temperatura de fermentación acelera las reacciones bioquímicas dentro de la célula conduciendo a un mayor consumo de azúcares y producción de etanol. Sin embargo, este comportamiento puede ser afectado por factores como por ejemplo la concentración de extracto seco del mosto. En lo que se refiere a este parámetro, al incrementar su valor provoca estrés osmótico en la célula afectando su actividad fermentativa. Existen números reportes sobre el efecto de estos dos parámetros (Temperatura y °Plato) en la actividad fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* en fermentaciones realizadas con células libres. Sin embargo, poco se ha explorado sobre su efecto en fermentaciones realizadas con células inmovilizadas y más aun utilizando soportes naturales.

La variación del pH puede ser usado para evaluar el tiempo de fermentación, así la medición de dos valores iguales durante el proceso indica el término de la fermentación. Se observa en la figura 10 que la fermentación con levaduras inmovilizadas duró entre 2 y 3 días mientras que la fermentación con células libres a temperaturas de 25°C duró 4 días (Figura 8). Estos resultados están en concordancia con lo mencionado por Dragone et al. (2005) y Branyk et al. (2006), quienes afirmaron que la inmovilización celular conduce a cambios en la actividad fermentativa de las levaduras otorgando ventajas tecnológicas en comparación con los procesos fermentativos tradicionales en donde se usan células libres. El ahorro de 24 horas en el tiempo de fermentación tendría un efecto importante en los volúmenes de producción global de cerveza.

Como se puede apreciar en la figura 10, mostos de 14 °Plato (1057g/l) fermentados con células inmovilizadas en soportes de maní mostraron una disminución máxima de 6 °Plato (1024g/L). Este fenómeno fue similar de mostos fermentados con células inmovilizadas a 20 °Plato (1083 g/L),. Esta observación indicaría que *Saccharomyces cerevisiae* S-33 es capaz de consumir aproximadamente 60 g/L de azúcares fermentables, el cual resultaría teóricamente 30.6 g/L de etanol. Esto se sustenta en base a que mostos de 20 °Plato (1083 g/L), contienen mayor concentración de azúcares fermentables comparado a mostos de 14 °Plato (1057g/l) los cuales resultarían en una mayor producción de etanol. En este caso particular, la cepa de levadura podría inhibirse al alcanzar una determinada concentración de etanol correspondiente a la conversión de 60 g/L de azúcares fermentables y consecuentemente habría una cantidad considerable de azúcares fermentables (contenido en 20°Plato (1083 g/L)) remanentes y disponibles para convertirse en etanol. Desde el punto de vista tecnológico cepas con baja capacidad de producción de etanol no son convenientes para uso industrial en fermentaciones de mostos con altos valores de gravedad específica. Cabe mencionar que la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* S-33 usada en los experimentos se usa para producir cervezas comerciales los cuales tienen un contenido de 45 mL de etanol/L (equivalente a 35.1 gramos de etanol/L). Por otro lado, la temperatura tuvo efecto en la tasa de consumo de extracto seco en fermentaciones realizadas con mostos de 14 °Plato (1057g/l) al incrementar de 12 a 18 °C (Figura 10).

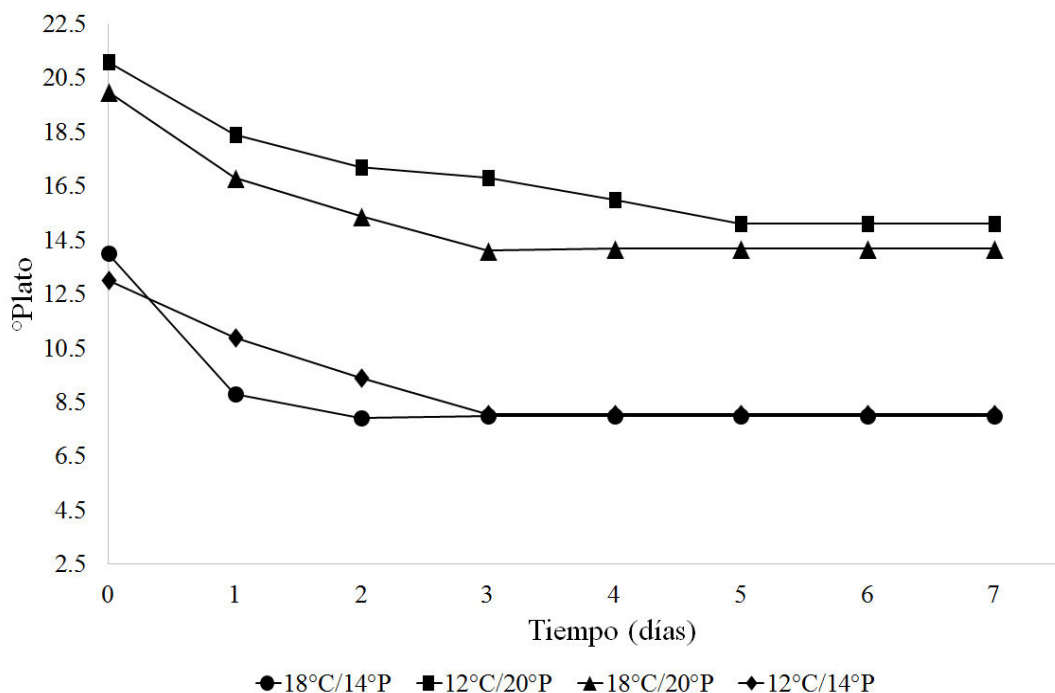


Figura 10: Cinética de consumo de extracto seco en fermentaciones realizadas con levaduras inmovilizadas en soportes de maní.

El extracto seco (°Plato) consumido en el transcurso de la fermentación proporcionan información indirecta del consumo de azúcares por la levadura. Sin embargo, debido a que el contenido de extracto seco se midió indirectamente mediante refractometría (°Brix) estos valores son sólo referenciales debido a la variación de la densidad del medio a lo largo de la fermentación. Por el contrario, la medición del consumo de azúcares reductores es importante para valorar la fermentación alcohólica. En la Figura 11 se muestra los resultados del consumo de azúcares reductores en correspondencia con la producción de etanol en fermentaciones realizadas con levaduras inmovilizadas en soportes de maní. Se observa una mayor tasa de consumo de azúcares reductores (54.5 g. azucars reductores/L. día) en correspondencia con la tasa de producción de etanol (14.7 g. etanol/L día) en fermentaciones realizadas a 18 °C comparado con aquellas realizadas a 12 °C (27.2 g. azucars reductores/L. día; y 12.1 g. etanol/L día) considerando el primer día de fermentación. Este comportamiento ha sido reportado por otros investigadores en donde manifestaron que la temperatura es un acelerador del metabolismo fermentativo en la producción de cerveza. Adicionalmente se observa que la fermentación terminó entre el

segundo y tercer día (figura 11b) ya que la máxima producción de etanol y consumo de azúcares reductores se alcanzó hacia el tercer día. Además, se observó una producción máxima de etanol de aproximadamente 22.5 g/L como resultado del consumo de azúcares reductores. La baja producción de etanol se debería a la presencia de azúcares reductores presentes en el mosto que no pueden ser utilizados por *S. cerevisiae* S-33. Cabe mencionar que azúcares reductores tales como maltotetraosa, maltopentaosa y dextrinas de mayor peso molecular no pueden ser convertidos en etanol por *S. cerevisiae*.

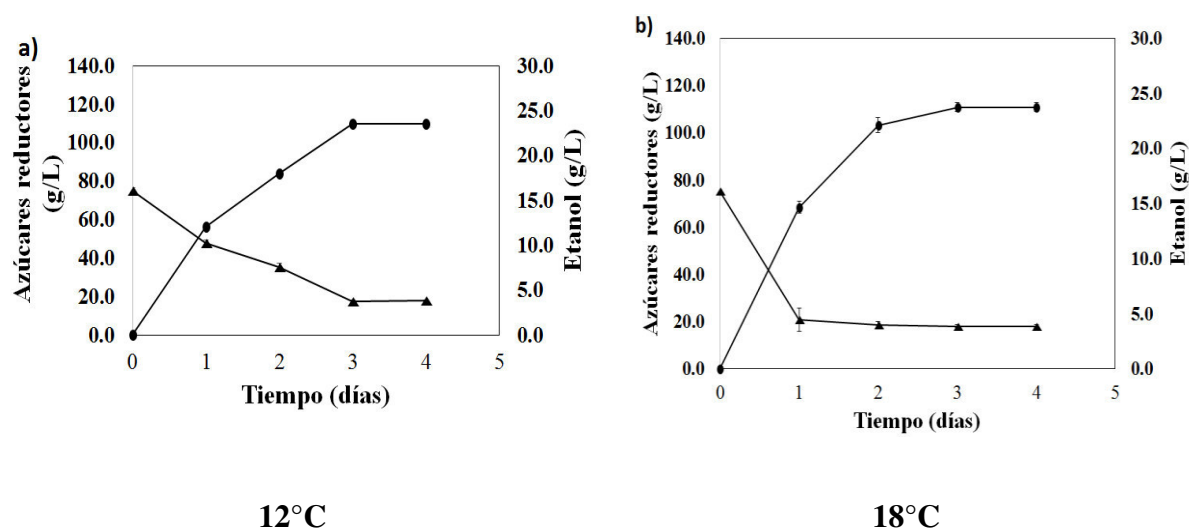


Figura 11: Efecto de la temperatura en la fermentación de mosto con *S. cerevisiae* S-33 inmovilizado en soportes de maní (●: Etanol, ▲: Azúcares reductores)

El efecto de la concentración de extracto seco del mosto en fermentaciones realizadas a 18°C se muestra en la figura 12. Se observa un mayor contenido de azúcares reductores (125 g/L) en el mosto de 20 °Plato (1083 g/L), lo que resultaría en una mayor producción de etanol. Sin embargo, no se observa una producción de este en correspondencia con la cantidad de azúcares reductores del mosto. Esto se debería a que sólo una parte de los azúcares reductores fueron utilizados para la producción de etanol quedando en el medio una cantidad remanente de aproximadamente 75 g/L (Figura 12b). Esto se debería en parte a la incapacidad de *S. cerevisiae* S-33 para convertir el remanente de los azúcares reductores en etanol o debido a la presencia en el mosto de azúcares reductores que no serían necesariamente fermentables. Estos resultados son particularmente importantes ya

que demostraría que la inmovilización celular no mejora el espectro de fermentación de azúcares reductores que no sean fermentables. Desde el punto de vista tecnológico levaduras *Saccharomyces cerevisiae* capaces de fermentar una mayor cantidad de azúcares es deseado. Una observación importante es la duración de la fermentación, en el caso de fermentaciones realizadas con mostos de 14 °Plato (1057g/l) el tiempo de fermentación fue de 3 días mientras que en fermentaciones con mostos de 20 °Plato (1083 g/L), el tiempo de fermentación fue de 4 días. Esto se explicaría en parte que el contenido de sólidos solubles en el mosto ejerce una presión osmótica que afecta la actividad fermentativa de *S. cerevisiae* S-33.

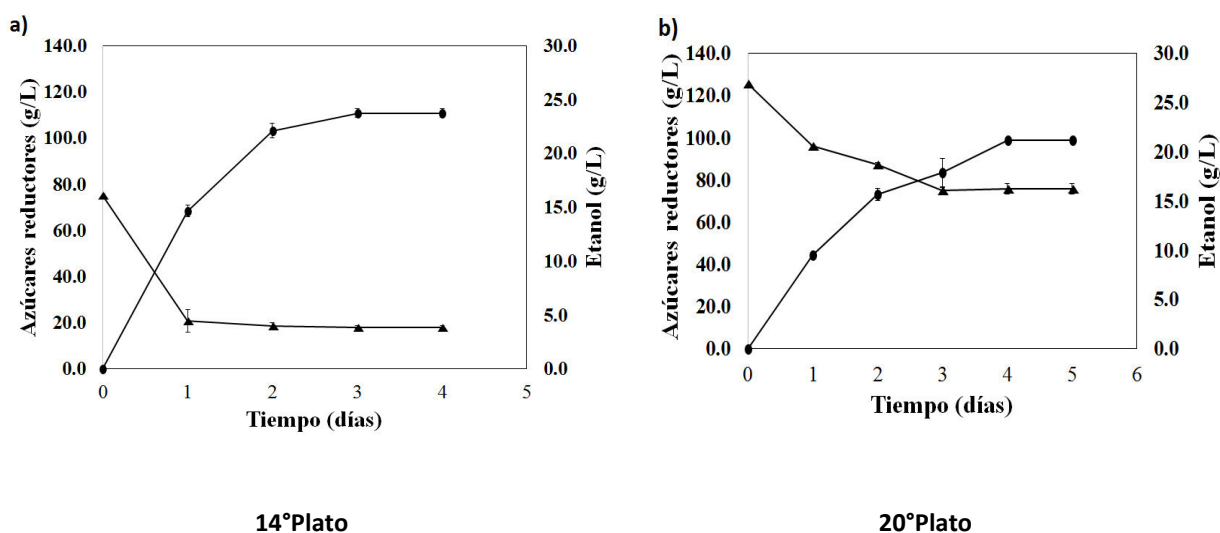


Figura 12: Efecto de la concentración de azúcares en la fermentación de mosto con *S. cerevisiae* S-33 inmovilizado en soportes de maní (●: Etanol, ▲: Azúcares reductores)

4.3.3.2. Fermentaciones con levaduras inmovilizadas en soporte de toronja

Los soportes de toronja se caracterizaron por adherir una mayor concentración de células de *S. cerevisiae* S-33 por gramo de soporte comparado a los soportes de maní. Además, presentan una estructura esponjosa fácilmente hidratable y sedimentable. En esta investigación se realizaron fermentaciones de mosto de malta a diferentes temperaturas (12 y 18 °C) y a diferentes concentraciones de extracto seco (14 y 20 °Plato). Los valores de los

demás parámetros (como pH del medio) se mantuvieron similares con aquellos utilizados en fermentaciones con levaduras inmovilizadas en soporte de maní. La cinética de variación de pH en el transcurso de las fermentaciones se muestra en la figura 13. El perfil de variación del pH es diferente comparado a lo observado en fermentaciones realizadas con levaduras inmovilizadas en soporte de maní (Figura 10). Como se observa en la figura 13 la fermentación de mosto de malta de 20 °P a 12 °C resulto en una mayor disminución de pH hacia el primer día de la fermentación comparado a los demás experimentos. Esto indica que el tipo de soporte de inmovilización ejerce un efecto particular en la actividad metabólica de la levadura el cual consecuentemente es responsable de la variación de pH del mosto de malta. Esto indicaría que la levadura inmovilizada en el soporte de toronja provoca una acidificación rápida del mosto. Esta característica no sería favorable desde el punto de vista de producción de cerveza.

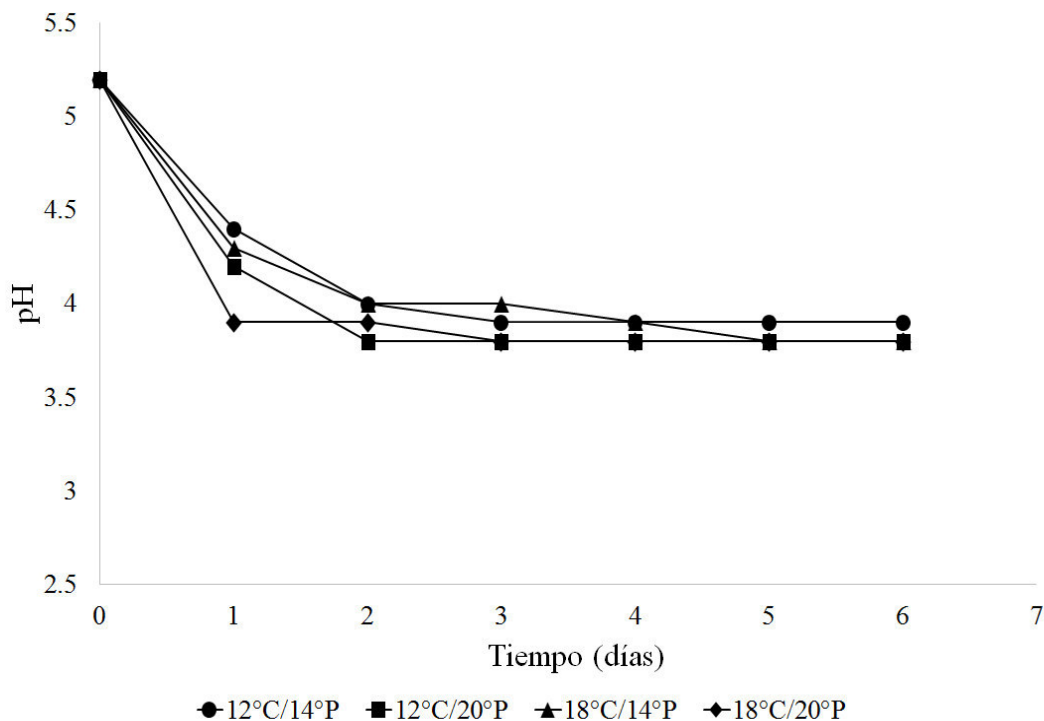


Figura 13: Cinética de variación del pH en fermentaciones de mosto de malta con levaduras inmovilizadas en soportes de toronja.

Otro parámetro evaluado a lo largo de la fermentación es la disminución de la concentración de extracto seco (Figura 14). Como se observa, el perfil de consumo de extracto seco (°Plato) es similar tanto a 12°C (6.3 y 6°Plato) como 18 °C (5 y 5°Plato) en mostos de 14 y 20 °Plato respectivamente. Con respecto al tiempo de fermentación, en experimentos con mostos de 14 °Plato (1057g/l) tomó tres días mientras en mostos de 20 °Plato (1083g/l) el tiempo de fermentación fue mayor. Esto se debe al efecto de la presión osmótica causado por la concentración de sólidos solubles del mosto el cual tiene un efecto represor en la actividad fermentativa de la levadura. Así mismo se observa que la inmovilización no provocó una disminución acentuada de los °Plato y esto se debería a varios factores como por ejemplo a la actividad fermentativa de la levadura la cual no fue capaz de producir una mayor cantidad de etanol, la presencia de azúcares no fermentables o el agotamiento de algún nutriente necesario para completar la fermentación (sales, vitaminas, iones, etc.). Eso se debe a que mostos de 20 °Plato (1083g/l) presentan mayor contenido de azúcares fermentables, pero sin embargo *Saccharomyces cerevisiae* S-33 fue incapaz de convertirlo en etanol y así consecuentemente disminuir los valores de extracto seco del mosto. Desde el punto de vista industrial, levaduras con altas capacidades de producción de etanol son deseables para ser utilizadas en procesos de fermentación con mostos de altas gravedades específicas.

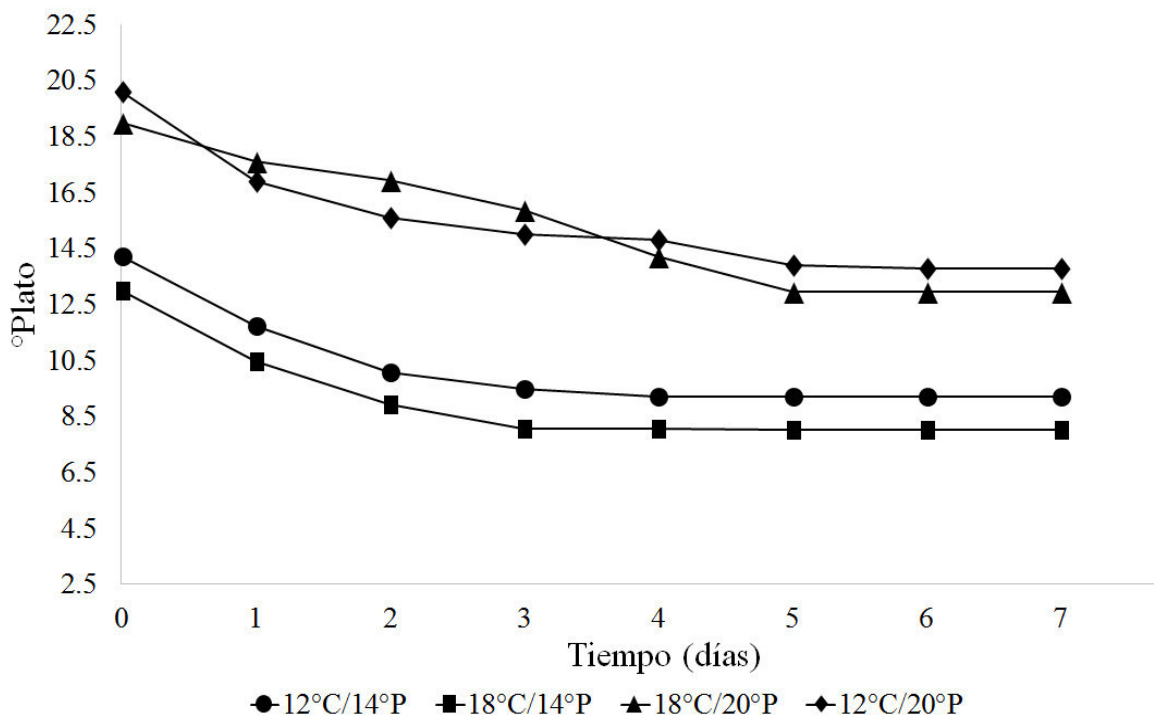


Figura 14: Cinética de consumo de extracto seco en fermentaciones con levaduras inmovilizadas en soportes de toronja.

Al comparar el desempeño de las fermentaciones realizadas con levaduras inmovilizadas (Figura 14) y libres (Figura 15) se observa una ventaja de los sistemas inmovilizados en términos de productividad incluso teniendo en consideración temperaturas de 25°C. Esta observación ha sido reportada previamente por Bamforth (2006), quien manifestó que la inmovilización celular permite un mayor consumo de azúcares en comparación con las células libres debido principalmente a que existe una mayor eficiencia en el uso de estos.

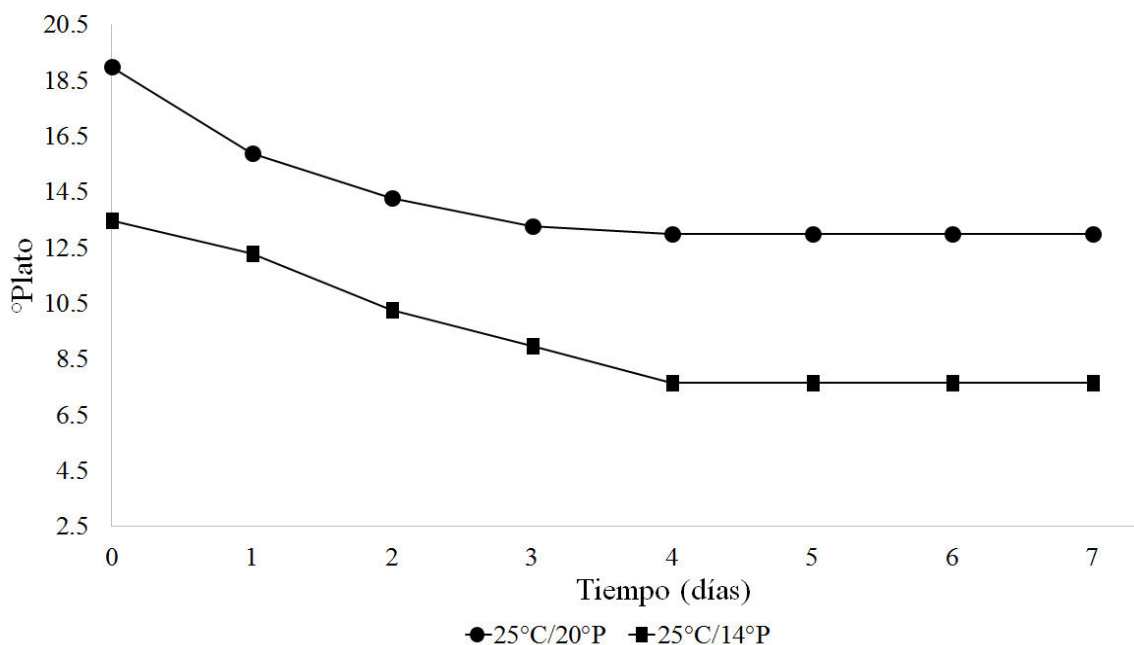


Figura 15: Cinética de consumo de extracto seco en fermentaciones con levaduras libres.

Es necesario mencionar que, en los sistemas de inmovilización por adsorción, las células están adheridas a la superficie del soporte y por tanto están en contacto directo con los nutrientes, principalmente los azúcares del mosto. La temperatura es un parámetro que afecta notablemente la fermentación alcohólica. Al incrementar la temperatura de fermentación incrementa la productividad de etanol, lo cual es conveniente desde el punto de vista tecnológico. Sin embargo, a medida que se incrementa la temperatura de fermentación, tienen efecto en la producción de compuestos de importancia sensorial que afectan negativamente la calidad del producto. Se han realizado experimentos de fermentación con mostos de malta de 14 °Plato (1057g/l) incrementando la temperatura de 12 a 18 °C. (figura 16). Como se observa la temperatura tuvo efecto en la velocidad de consumo de azúcares y en la producción de etanol, el cual incrementó el rendimiento. Temperaturas de fermentación 18 °C están dentro del rango para la producción de cervezas “ale” las cuales se caracterizan por ser más fuertes desde el punto de vista sensorial. Adicionalmente, se observó la producción de etanol en correspondencia con el consumo de azúcares reductores. Cabe mencionar que la concentración de azúcares residuales en ambos

casos fue mayor a 20 g/L. Esto es particularmente importante ya que indica la presencia de azúcares reductores que no son fermentables. La inmovilización celular en estas condiciones no mejoró el espectro de fermentación de azúcares de *Saccharomyces cerevisiae* S-33 inmovilizado en soportes de toronja. Este comportamiento es similar a lo observado en fermentaciones realizadas con *S. cerevisiae* S-33 inmovilizado en soporte de maní. El contenido de azúcares del mosto de malta está compuesto de aproximadamente de 50% de maltosa y pequeñas cantidades de glucosa, fructosa y sacarosa, indicando que la mayor producción de etanol proviene de la utilización de maltosa. En este caso particular, el mosto de malta comercial usado en los experimentos sería deficiente de azúcares fermentables, principalmente maltosa. Las dextrinas que representan comúnmente la otra mitad de azúcares no serían fermentables para *Saccharomyces cerevisiae* S-33. Adicionalmente, se observa que la fermentación en ambos casos termina hacia los tres días de la fermentación. Comparado con los experimentos realizados con células libres se observa una ventaja de los sistemas con levaduras inmovilizadas.

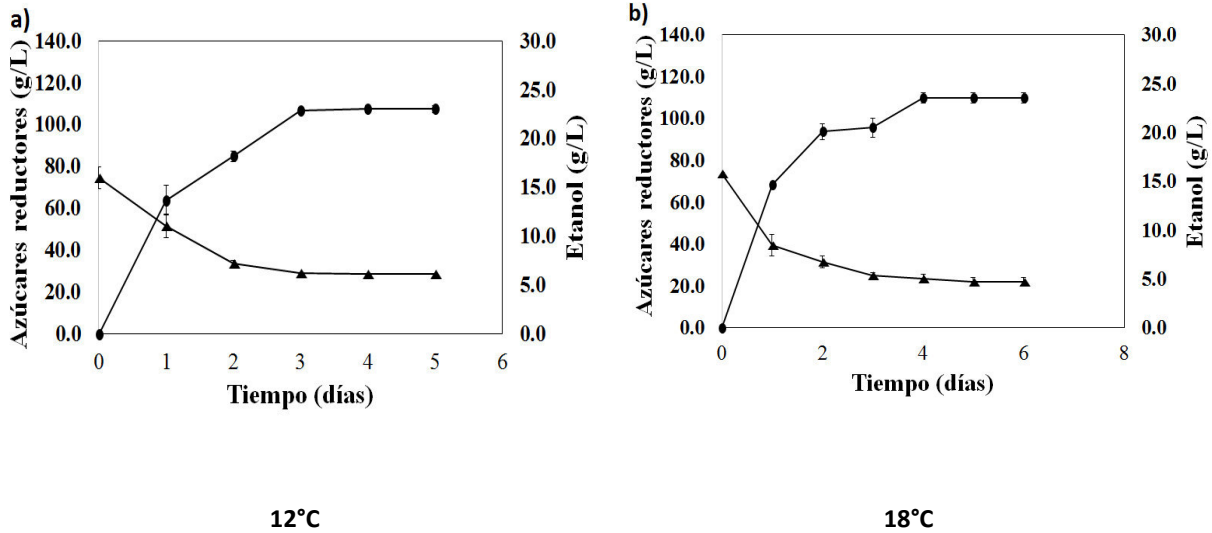


Figura 16: Efecto de la temperatura en fermentaciones con *S. cerevisiae* S-33 inmovilizado en soportes de toronja (●: Etanol; ▲: Azúcares reductores).

Adicionalmente se ha evaluado el efecto de la concentración de extracto seco del mosto (14 y 20 °Plato) en la cinética de fermentación considerando una temperatura de 18 °C. Los resultados de consumo de azúcares reductores y producción de etanol se muestran en la Figura 17. Como se puede observar, la concentración de sólidos influye notablemente en el tiempo de fermentación. Así, la fermentación de mostos de 14°Plato (1057g/l) , demoró tres días en terminar mientras que fermentaciones con mostos de 20°Plato (1083g/l) duraron cinco días. Esta observación ha sido reportada previamente por Novonty (1992), quien menciona que el rendimiento, producción de etanol y el consumo de azúcares dependen de varios factores entre ellos la temperatura, tolerancia de la cepa al etanol y la concentración de sólidos solubles del mosto. Asimismo, se observa que la concentración del mosto afecta la tasa de consumo de azúcares reductores y de producción de etanol, lo cual está en correspondencia con el tiempo de fermentación. Altas concentraciones de sólidos solubles provocan estrés osmótico en las células de levadura, lo cual afecta en su actividad fermentativa. Un menor estrés durante la fermentación resulta en una mayor estabilidad del proceso y, consecuentemente el consumo de azúcares fermentables es más eficiente y permite un desarrollo óptimo de la levadura (Bamforth, 2006). Este

comportamiento también fue reportado por Kunze (2004), quien demostró que la concentración de azúcares juega un papel fundamental en el estrés celular.

Otro aspecto que se observó en los resultados (Figura 17) es la concentración de azúcares reductores residuales al final de la fermentación que en el caso de las fermentaciones con mostos de 20 °Plato (1083 g/L) fue aproximadamente 60 g/L. Esto indicaría que *Saccharomyces cerevisiae* S-33 fue incapaz de utilizar la totalidad de los azúcares fermentables para producir etanol. Desde el punto de vista tecnológico cepas de levadura con alta capacidad de producción de etanol son deseables.

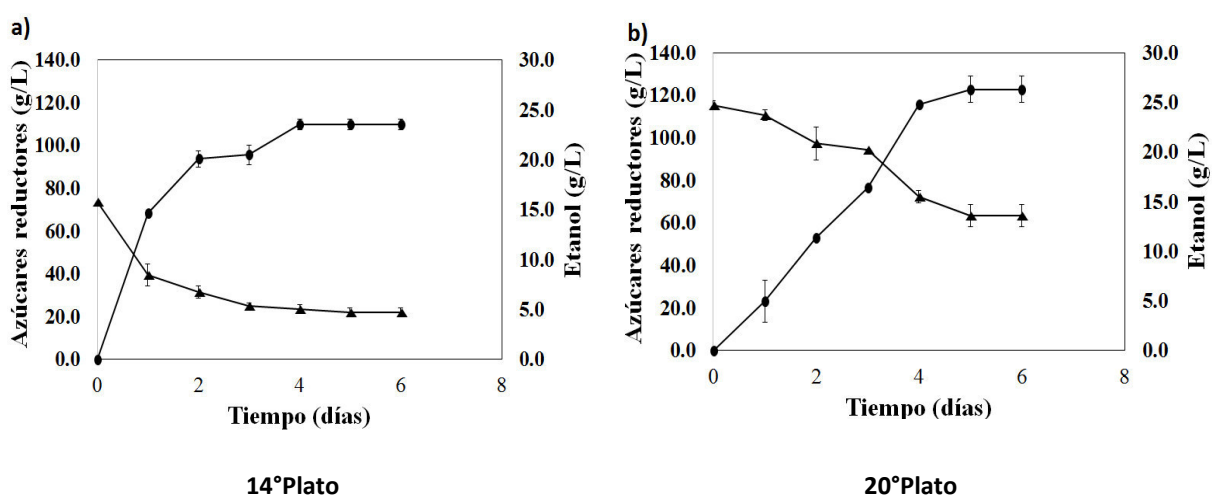


Figura 17: Efecto de la concentración de azúcares en la fermentación de mosto con *S. cerevisiae* S-33 inmovilizado en soportes de toronja (●: Etanol; ▲: Azúcares reductores)

4.4. Fermentación de mosto de malta en biorreactor “airlift”

Con la finalidad de evaluar la influencia de los soportes de inmovilización en procesos de fermentación de mosto de malta a mayor escala se ha realizado experimentos utilizando un biorreactor de bucle interno (airlift) de 5 L de volumen total diseñado y construido para este fin. La configuración del sistema de fermentación se muestra en la figura 18.

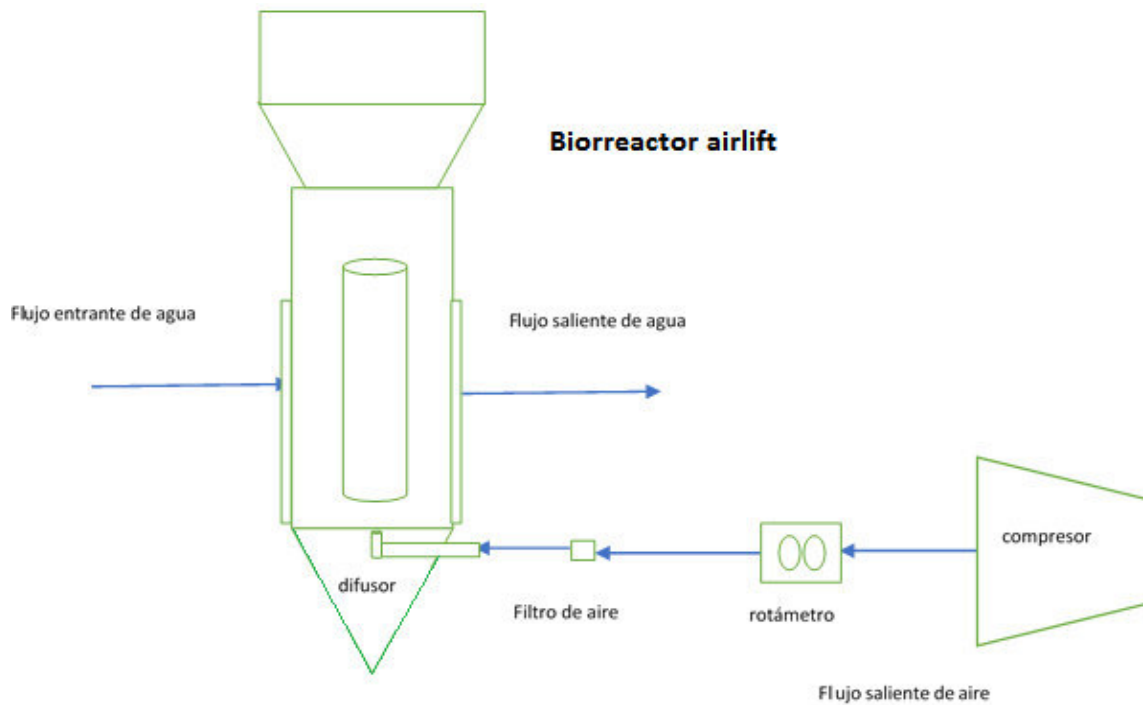


Figura 18: Montaje del sistema de fermentación utilizado en donde se muestra el biorreactor airlift.

El biorreactor airlift se ha conectado por la parte inferior a una unidad de suministro de aire (compresor) a través de mangueras de silicona la cual se conectó a una unidad de esterilización de aire (filtro de 20 μm de tamaño de poro) para evitar algún tipo de contaminación. Antes de su uso se ha sanitizado con agua clorada (200 ppm) durante 1 hora, y luego se enjuaga 3 veces con agua destilada estéril. El mosto se pasteurizó previamente a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min adicionando lúpulo durante el proceso de pasteurizado (7g/L). El biorreactor se inoculó con el soporte (toronja o maní) conteniendo las células de *Saccharomyces cerevisiae* S-33 preparadas de acuerdo con el procedimiento descrito en la Sección 3.5. La cantidad de soporte inoculado correspondió a la cantidad de células necesarias para llevar a cabo la fermentación (1×10^6 células/mL.°P). Las fermentaciones se realizaron a $25 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ con mostos de 14 y 20 °Plato (1057 g/L y 1083 g/L respectivamente) y un flujo de aire igual a 0.44 vvm. Para mantener la temperatura de trabajo ($25 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) se circuló agua a través de la chaqueta de enfriamiento del biorreactor. Los resultados globales de las fermentaciones se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9: Rendimientos y productividades de etanol alcanzado en fermentaciones realizadas en biorreactor airlift

Soporte	Concentración (°P)	Productividad (g de etanol/L.h)	Rendimiento (g etanol/g azúcares reductores)
Toronja	14	0.3	0.4
	20	0.23	0.45
Maní	14	0.29	0.38
	20	0.24	0.47

Como se observa en la Tabla 9, los mayores valores de productividad (0.30 y 0.29 g. etanol/L. día) se obtuvieron en fermentaciones realizadas con mostos de 14 °Plato (1057 g/L) utilizando soportes de inmovilización de toronja y maní respectivamente. Resultados similares se observaron en experimentos realizados en matraces (Sección 4.3). Con respecto al rendimiento, los mayores resultados (0.45 y 0.47 g. de etanol/g. azúcares reductores utilizado) se observaron en fermentaciones realizadas con mostos de 20 °Plato (1083 g/L). Estos resultados son inferiores a lo observado en experimentos realizados en matraces y se debería al efecto del suministro de oxígeno en el biorreactor. El oxígeno jugaría un rol importante en fermentaciones de alta gravedad teniendo una repercusión en el mayor rendimiento de etanol. En términos generales, fermentaciones realizadas en el biorreactor airlift a las condiciones consideradas resultaron en rendimientos globales de etanol menor a lo observado en experimentos realizados en matraces.

Teniendo en cuenta el nivel de significancia establecido a un 0.05%; los resultados obtenidos en el análisis de varianza en el programa MINITAB, establece que no hay diferencias significativas en cuanto a tipo de soporte utilizado en lo que respecta a productividad. Los resultados obtenidos de P-Valor para el tipo de soporte fue 0.105 siendo mayor a 0.05 de esta forma se aceptó que los tratamientos expuestos se comportan de manera similar. (Anexo 2).

Del mismo modo se observa que, en cuanto al rendimiento, MINITAB arrojo un P- Valor de 0.177. valor menor al nivel de significancia establecido de 0.05 %. (Anexo 3). Por lo que no se evidencias diferencias significativas en consideración al tipo de soporte utilizado.

Adicionalmente se evaluó la cinética de las fermentaciones realizadas en el biorreactor airlift con levaduras inmovilizadas en soportes de toronja y maní. Los resultados de fermentaciones realizadas con mostos de 20 °Plato (1083 g/L) se muestran en la Figura 19. Como se observa, las fermentaciones con levaduras inmovilizadas en soportes de toronja y maní terminaron en aproximadamente cuatro días. La mayor tasa de fermentación se observó en fermentaciones con soportes de maní (9.4 g. etanol/L. día) y toronja (5.8 g. etanol/L. día) considerando el primer día; sin embargo, la producción de etanol fue similar en ambos casos (22.8 g. etanol/L. día; y 22.5 g. etanol/L. día respectivamente).

Particularmente se observa una cantidad considerable (68.4 g/L) de azúcares reductores residuales al final de la fermentación indicando que *Saccharomyces cerevisiae* S-33 no pudo convertirlo en etanol. Este comportamiento fue observado en experimentos realizados en matraces a condiciones similares de fermentación (Sección 4.3.2).

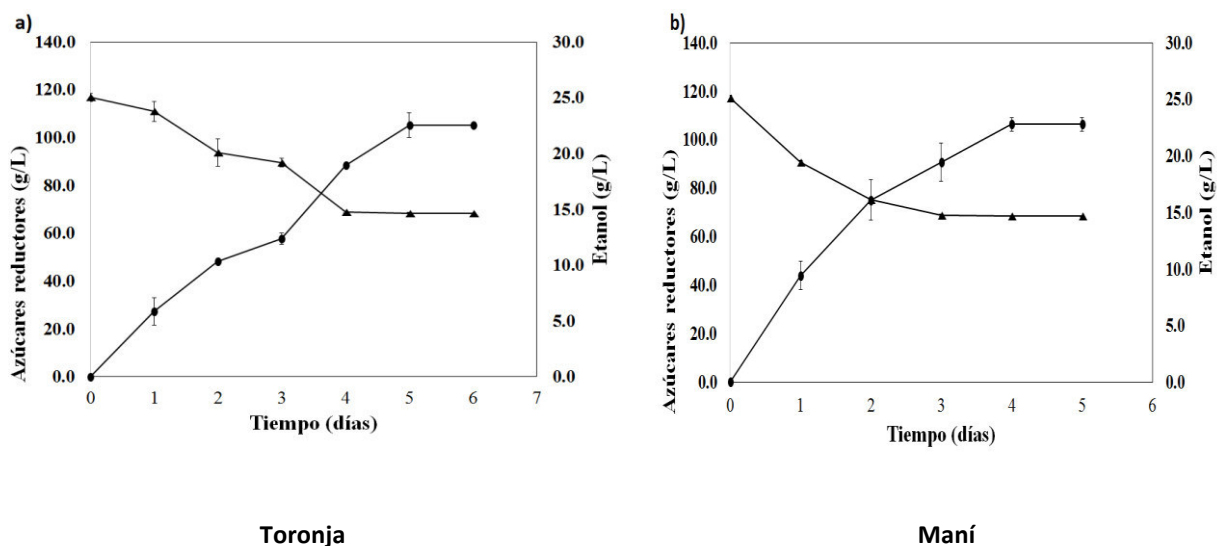


Figura 19: Cinética de consumo de azúcares y producción de etanol en fermentaciones con mostos de 20°P y levaduras inmovilizadas (●: Etanol; ▲: Azucares reductores).

Otro aspecto importante evaluado durante los experimentos de fermentación utilizando mostos de 20 °P (1083 g/L) y levaduras inmovilizadas en soportes de toronja y maní ha sido la disminución de pH y el consumo de nitrógeno amino libre (Figura 20). Se ha observado un perfil de disminución similar en ambos casos tanto en fermentaciones con

levaduras inmovilizadas en soportes de toronja y maní. El consumo de nitrógeno amino libre alcanzó en ambos casos aproximadamente 1100 mg/L. El contenido de nitrógeno amino libre de los mostos es importante ya que favorece la actividad fermentativa de la levadura.

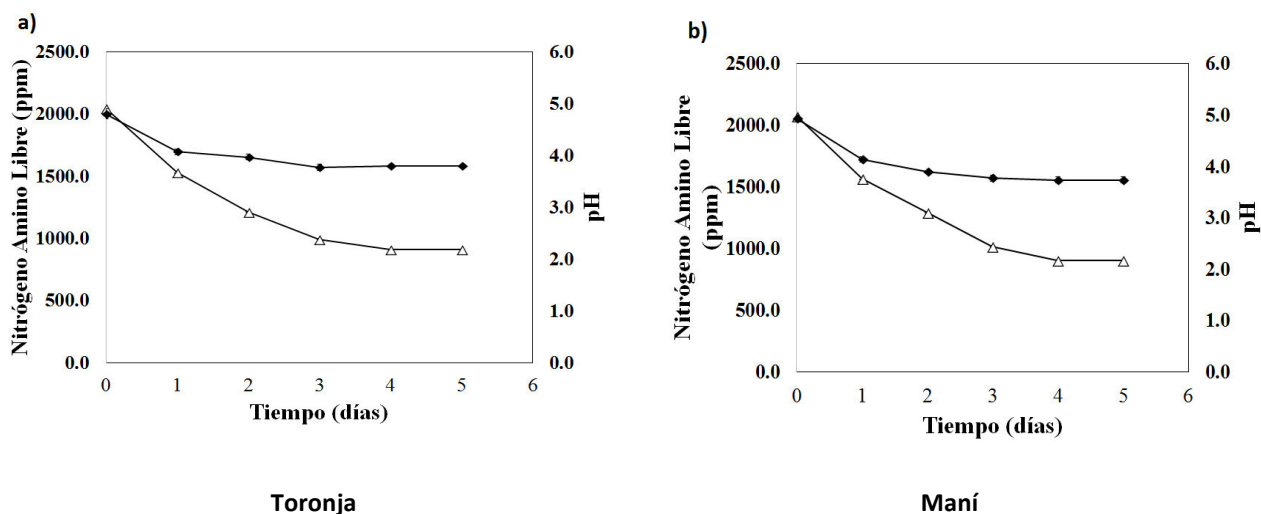


Figura 20: Cinética de variación de pH y consumo de nitrógeno amino libre en fermentaciones con mostos de 20°P y levaduras inmovilizadas (♦: pH, Δ: Nitrógeno amino libre).

Las cinéticas de consumo de azúcares reductores y producción de etanol en fermentaciones con mostos de 14 °Plato (1057 g/L) con células inmovilizadas se muestran en la Figura 21. Se observa que el tiempo de fermentación es menor (3 días) comparado a los resultados de experimentos realizados con mostos de 20 °Plato (1083 g/L) (4 días.). Esto indica que la concentración de sólidos solubles tiene efecto importante en el comportamiento fermentativo de *S. cerevisiae* S-33. Asimismo, la tasa de consumo de azúcares reductores y la producción de etanol durante el primer día de fermentación fue mayor en fermentaciones realizadas con levaduras inmovilizadas en soportes de maní (16.9 g. azucares reductores/L. día; y 7 g. etanol/L. día) en comparación con levaduras inmovilizadas en soportes de toronja (13.5 g. azucares reductores/L. día; y 4.9 g. etanol/L. día) (Figura 21a). Otro aspecto importante es la concentración residual de azúcares reductores al final de la

fermentación (22 g/L), el cual indica que la levadura no ha sido capaz de terminar la fermentación.

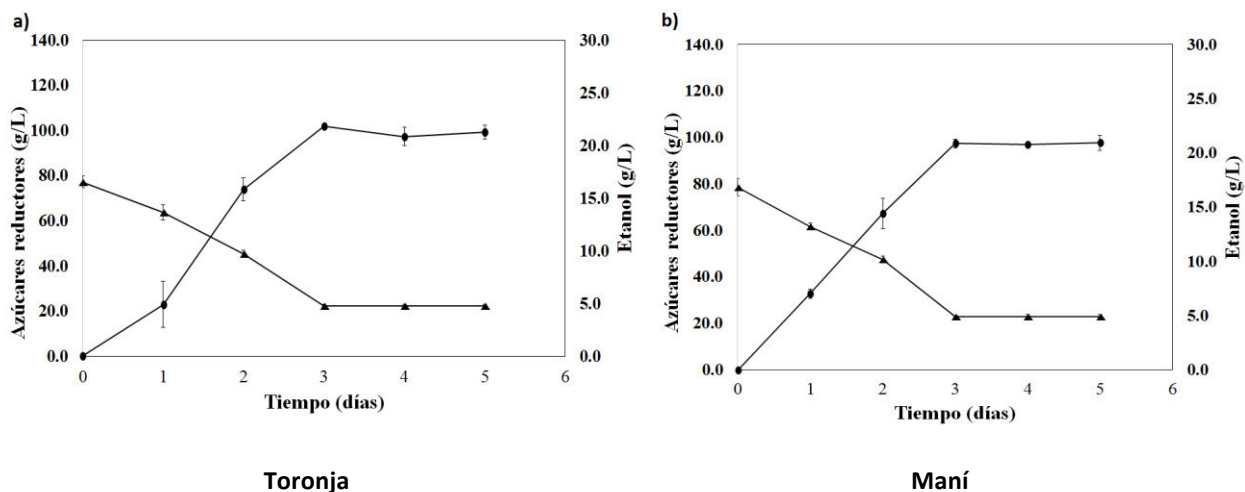


Figura 21: Cinética de consumo de azúcares y producción de etanol en fermentaciones con mostos de 14°P y levaduras inmovilizadas (●: Etanol; ▲: Azúcares reductores).

Los resultados de disminución del pH y consumo de nitrógeno amino libre en experimentos con levaduras inmovilizadas se muestran en la Figura 22. Se observa una mayor acidificación del medio durante el primer día de fermentación en experimentos realizados con levaduras inmovilizadas en soportes de toronja. El pH al final de la fermentación en ambos casos alcanzo valores de aproximadamente 4.4. En lo referente al consumo de nitrógeno amino libre se observó un perfil de disminución similar tanto en toronja (262mg/L) como en maní (267mg/L). En los experimentos de fermentaciones con mostos de 20 °P (1083 g/L) se observó un mayor consumo de nitrógeno tanto en toronja (1138 mg/L). como en maní (1172 mg/L). Esto indicaría que la inmovilización provoca un mayor consumo de nitrógeno sin observar un efecto sustancial en el consumo de azúcares reductores. Desde el punto de vista tecnológico, levaduras que consumen menor proporción de nitrógeno amino libre es deseado.

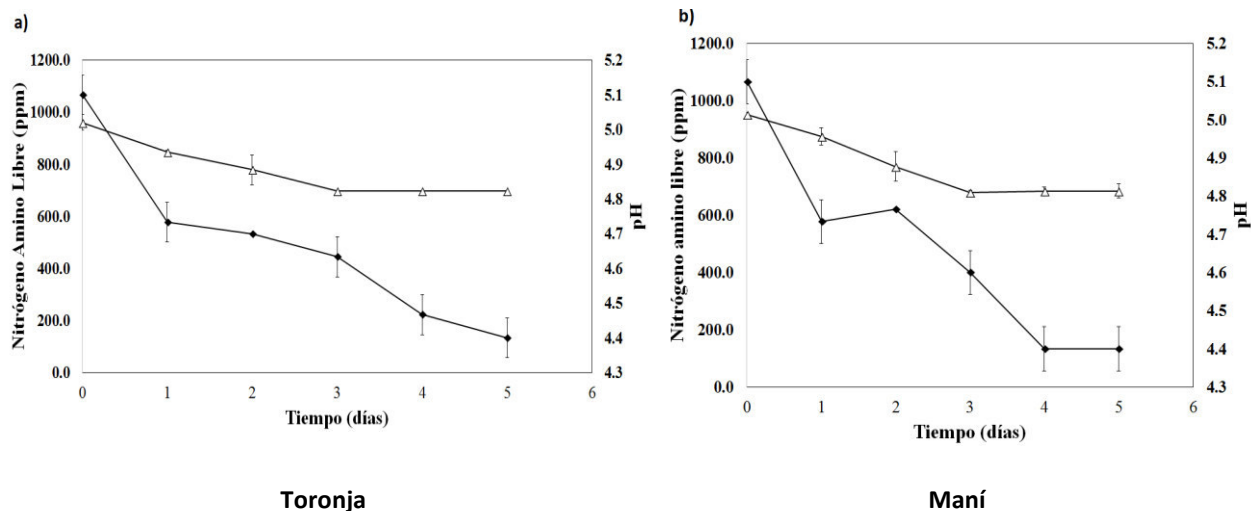


Figura 22: Cinética de variación de pH y consumo de nitrógeno amino libre en fermentaciones con mostos de 14°P y levaduras inmovilizadas (◆: pH, △: Nitrógeno amino libre).

4.5 Evaluación sensorial de las cervezas producidas en biorreactor

Las cervezas obtenidas en los experimentos de fermentación con levaduras inmovilizadas en soportes de maní y toronja (Sección 4.4.) se evaluaron sensorialmente mediante pruebas afectivas y descriptivas. En la evaluación afectiva se utilizó una escala hedónica de 5 puntos (1=me desagrada, 2=no me gusta, 3=no me gusta ni me desagrada, 4=me gusta, 5=me gusta mucho). Para la evaluación sensorial se utilizó un panel compuesto de 7 jueces no entrenados, cinco varones y dos mujeres de edades entre 22 y 25 años y no consumidoras habituales de cerveza. Las muestras se evaluaron al azar sin especificar qué tipo de cerveza se degustó. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Como se puede observar, existe evidentemente una inclinación por la cerveza producida con levaduras inmovilizadas en soporte de toronja ya que el 100% de la población (7 personas) dieron la apreciación “me gusta”. Ello nos da a entender que, en canto a nivel de aceptación, la cerveza con cáscara de toronja resulta superior. Quizá esto se deba a algunas características propias de la toronja que no se llega a encontrar en el maní.

Tabla 10: Resultados de aceptación de cervezas producidas con levaduras inmovilizadas en soportes de maní y toronja de la prueba

Escala	Cerveza producida con levaduras inmovilizadas en soportes de maní	Cerveza producida con levaduras inmovilizadas en soportes de toronja
	Número de personas	Número de personas
Me gusta mucho	2	0
Me gusta	1	7
No me gusta ni me desagrada	2	0
No me gusta	2	0
Me desagrada	0	0

Como se puede observar en la Figura 23, el nivel de aceptación de la cerveza fermentada con levaduras inmovilizadas en soportes de toronja fue superior en relación con la cerveza elaborada con levaduras inmovilizadas en soportes de maní.

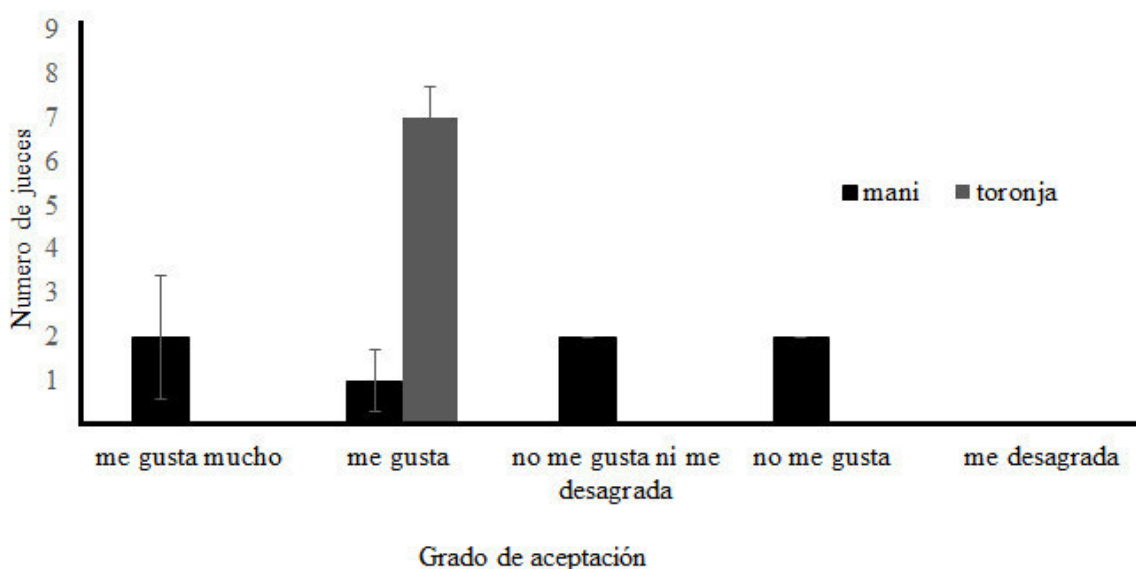


Figura 23: Gráfico de barras del número de jueces vs el grado de aceptación de cervezas producidas con mostos de 14 °P y levaduras inmovilizadas en soportes de toronja y maní.

Adicionalmente se realizó una prueba descriptiva considerando cinco atributos sensoriales comúnmente evaluados en cervezas tales como: alcohólico, acidez, cítrico,

frutal y a levadura. Los resultados se presentaron en puntuaciones de cero a cinco (0=nulo y 5=intenso) y los resultados se presentan en un gráfico de telaraña (Figura 24).

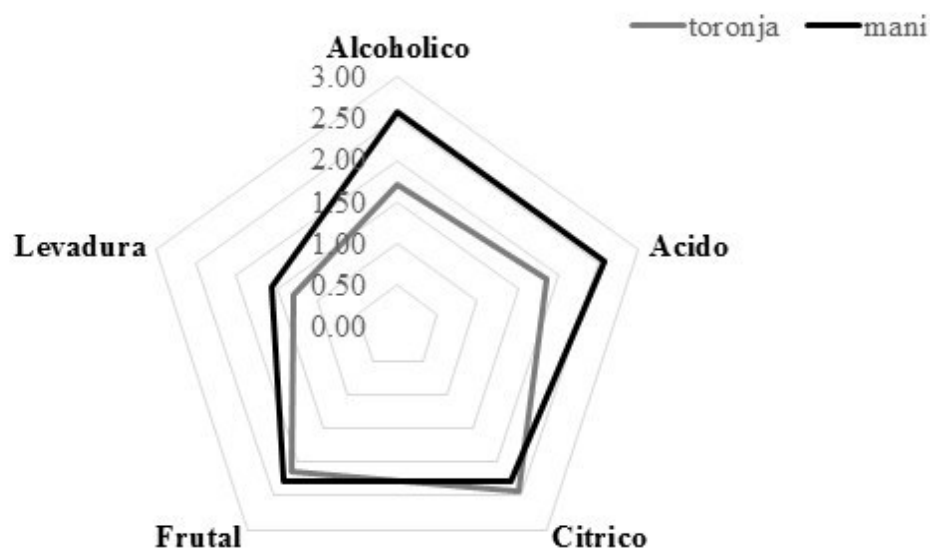


Figura 24: Gráfico telaraña de evaluación descriptiva de cervezas.

En base a los resultados del gráfico de telaraña, se observa que las cervezas elaboradas con levaduras inmovilizadas en ambos soportes tuvieron un alto puntaje en lo referente a atributos “frutal” y “cítrico”. Asimismo, los atributos de percepción “a levadura”, “alcohólico” y “ácido” fueron menores en la cerveza fermentada con levaduras inmovilizadas en soportes de toronja. En la valoración de la calidad sensorial de las cervezas se prefiere que estos atributos tengan una baja percepción

Sin embargo, al momento de realizar un análisis de varianza resulta un P- valor de 0.144. Este p valor es mayor que 0.05 por lo que no existen diferencias significativas entre ambos tipos de cerveza. (Anexo 4).

V. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

- El proceso de depectinización etanólica de la cáscara de toronja (albedo) resultó en una capacidad de adsorción celular de 4.08×10^8 células/gramo de soporte, mientras que, la deslignificación parcial de la cáscara de maní con NaOH (0.2 % p/v) resultó en una adsorción máxima de 0.72×10^8 células/gramos de soporte. Los soportes de toronja resultan ser más convenientes para ser utilizados en procesos de fermentación de cerveza.
- El efecto de la inmovilización celular en soportes de toronja y maní, usando mostos de 20°Plato (1083 g/L), en la performance fermentativa de rendimiento (0.50 y 0.42 g. etanol/g. azúcares reductores) y productividad (0.219 y 0.220 g. etanol/Lh) no depende solamente del tipo de soporte utilizado sino también de la capacidad fermentativa de la cepa *S. cerevisiae* S-33 utilizado en el estudio.
- La inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* S-33 en soportes de toronja y maní tiene un efecto positivo en la tasa de consumo de azúcares reductores y producción de etanol comparado con fermentaciones realizadas con células libres. El mayor efecto se observó en fermentaciones realizadas con mostos de malta de 14°Plato (1057 g/L), (0.50 g. etanol/g. azúcares reductores) en comparación a fermentaciones con células libres a esa misma concentración (0.43 g. etanol/g. azúcares reductores).
- El incremento de la temperatura afecta directamente en la performance de la fermentación del mosto de malta. Temperaturas de fermentación de 18°C resultaron en mayores valores de rendimiento (0.50 y 0.42 g. etanol/g. azúcares reductores) y productividad de etanol (0.245 y 0.330 g. etanol/Lh) comparados con fermentaciones realizadas a 12°C con rendimientos (0.40 y 0.32 g. etanol/g. azúcares reductores) y productividades de etanol (0.239 y 0.327 g. etanol/Lh) bajas, independientemente del tipo de soporte utilizado.
- La composición del mosto de malta juega un rol importante en el rendimiento de etanol. El contenido de azúcares reductores del mosto no necesariamente representa el contenido de azúcares fermentables disponibles para *Saccharomyces cerevisiae* S-33. Esto se corrobora en fermentaciones realizadas con mostos de malta de 20 °Plato (1083

g/L), en donde al final del proceso se observó una cantidad importante de azúcares reductores residuales.

- El contenido de extracto seco (°Plato) tiene efecto directo en el tiempo de fermentación independientemente del tipo de soporte usado. Así, fermentaciones de mostos de malta de 14 °Plato (1057 g/L), duraron 3 días mientras que fermentaciones de mosto de malta de 20 °Plato duraron 5 días.
- La utilización de soportes de maní en la inmovilización celular resultó en una mayor disminución de pH usando mostos de malta de 14 °Plato (1057 g/L), comparados a fermentaciones realizadas con mostos de 20 °Plato (1083 g/L), descendiendo de 5.2 hasta valores de 3.9 para el primer caso y 4.2 para el segundo.
- Las mayores productividades de etanol se alcanzaron en fermentaciones realizadas con mostos de malta de 14°Plato (1057 g/L), y a 18°C independiente de los soportes utilizados (0.245 y 0.330 g. etanol/Lh). El efecto de la presión osmótica de mostos de malta de 20 °Plato (1083 g/L), prolongó el tiempo de fermentación disminuyendo las productividades (0.219 y 0.220 g. etanol/Lh).
- El suministro de aire en fermentaciones realizadas en el biorreactor airlift con levaduras inmovilizadas afecta la performance del sistema afectando el metabolismo de la levadura.
- Los procesos de fermentación realizados con *S. cerevisiae* S-33 inmovilizados en soportes de toronja y maní en el biorreactor airlift suministrando aire al sistema (0.44 vvm) resultaron en la disminución de la productividad (0.30 y 0.29 g. etanol/Lh) y rendimiento de etanol (0.40 y 0.38 g. etanol/g. azúcares reductores). El soporte de toronja mostro un mejor desempeño en base a los resultados obtenidos.
- Las cervezas producidas con levaduras *S. cerevisiae* S-33 inmovilizadas en soportes de toronja mostraron una alta puntuación en atributos de percepción “a cítrico” y “frutal” y por el contrario menores puntuaciones de percepción de “a levadura”, “alcohólico” y “ácido” comparado a cervezas producidas con levaduras inmovilizadas en soportes de maní.

BIBLIOGRAFÍA

- Altamirano, C. (2013). Optimización de un Método para la Producción de Biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la etapa de Fermentación del Mosto de Cerveza, desde un nivel de Laboratorio a un nivel Piloto. Tesis para optar por el título de Ingeniero Químico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- American Society of Brewing Chemists (ASBC). (1992). Methods of Analysis, 8th ed. The Society, Minneapolis, MN.
- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. Archivos de Pharmaceutica, 39(2), 23-39.
- Bamforth, C. W. (2006). Scientific principles of malting and brewing. American Society of Brewing Chemists, USA.
- Bandyopadhyay, K. K., & Ghose, T. K. (1982). Studies on immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. III. Physiology of growth and metabolism on various supports. Biotechnology and Bioengineering, 24(4), 805-815.
- Bardi, E., Koutinas, A. A., & Kanellaki, M. (1997). Room and low temperature brewing with yeast immobilized on gluten pellets. Process Biochemistry, 32(8), 691-696.
- Bekatorou, A., Koutinas, A. A., Psarianos, K., & Kanellaki, M. (2001). Low-temperature brewing by freeze-dried immobilized cells on gluten pellets. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(1), 373-377.
- Berezin, I. V., Antonov, V. K., & Martinek, K. (1987). Immobilizovannyye fermenty. Sovremennoe Sostoyanie i Perspektivy (Rusia).
- Blieck, L., Toye, G., Dumortier, F., Verstrepen, K. J., Delvaux, F. R., Thevelein, J. M., & Van Dijck, P. (2007). Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions. Applied and Environmental Microbiology, 73(3), 815-824.
- Blieck, L., Toye, G., Dumortier, F., Verstrepen, K. J., Delvaux, F. R., Thevelein, J. M., & Van Dijck, P. (2007). Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions. Applied and Environmental Microbiology, 73(3), 815-824.
- Borkenstein, R. F. (1962). Alcohol and Road Traffic: Problems of Enforcement and Prosecution. Department of Police Administration, Indiana University.

- Boulton, C., & Quain, D. (2008). *Brewing yeast and fermentation*. John Wiley & Sons.
- Brányik, T., Silva, D. P., Vicente, A. A., Lehnert, R., e Silva, J. B. A., Dostálek, P., & Teixeira, J. A. (2006). Continuous immobilized yeast reactor system for complete beer fermentation using spent grains and corncobs as carrier materials. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(12), 1010-1018.
- Brányik, T., Vicente, A. A., Cruz, J. M., & Teixeira, J. A. (2004). Continuous primary fermentation of beer with yeast immobilized on spent grains: The effect of operational conditions. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 62(1), 29-34.
- Chang Raymon. (2002). *Enlace químico I conceptos básicos*, . *Química General*(pp.329-367). México DF, México: Miembro de la Camara Nacional de la Industria Editorial Mexicana.
- Chibata, I. (1978). *Immobilized enzymes, research and development*. Kodansha; Wiley. (UK)
- Debourg, A., Laurent, M., Dupire, S., & Masschelein, C. A. (1993). The specific role and interaction of yeast enzymatic systems in the removal of flavour-potent wort carbonyls during fermentation. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress* (pp. 437-444).
- Doran, P. M., & Bailey, J. E. (1986). Effects of immobilization on growth, fermentation properties, and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(1), 73-87.
- Dragone, G. Mussatto, S. Almeida e Silva, J. (2005) *Levaduras Inmovilizadas en Soporte Lignocelulósicos para la Producción Continua De Cerveza*. *Brazilian Journal of Food Technology*, 1: 70-73.
- Estela-Escalante, W. D., Rychtera, M., Melzoch, K., Torres-Ibáñez, F., Calixto-Cotos, R., & Chávez-Guzmán, Y. M. (2014). Efecto de la aireación en la producción de compuestos volátiles por cultivo mixto de *Brettanomyces intermedius* y *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación de sidra. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 5-14.
- Foster, J. W. (1949). *Chemical, Activities Of Fungi*. Academic Press Inc., New York.

- Genisheva, Z., Mussatto, S. I., Oliveira, J. M., & Teixeira, J. A. (2011). Evaluating the potential of wine-making residues and corn cobs as support materials for cell immobilization for ethanol production. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 979-985.
- Guerrero, J. I. (2016). Extracción de fibra de los desechos agroindustriales de Cacahuete, para su aplicación en el desarrollo de alimentos. 1: 806-812 (*Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(2), 806-812)
- Gupta, M. N., & Mattiasson, B. (2006). Unique applications of immobilized proteins in bioanalytical systems. *Methods of Biochemical Analysis: Bioanalytical Applications of Enzymes*, 36, 1-34.
- Hartmeier, W. (1985). Immobilized biocatalysts: from simple to complex systems. *Trends in Biotechnology*, 3(6), 149-153.
- Hornsey, I. S. (2003). *Elaboración de cerveza: microbiología, bioquímica y tecnología.* (Acribia, España)
- Hough, J. S. J. (1990). *Biotecnología de la cerveza y de la malta.* (Acribia y España)
- Instituto Nacional de Estadística e Informática. *Compendio estadístico (2014). Agrario 2013.* Lima, Perú.
- Jones, H. L., Margaritis, A., & Stewart, R. J. (2007). The combined effects of oxygen supply strategy, inoculum size and temperature profile on very-high-gravity beer fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*, 113(2), 168-184.
- Kolot, F. B. (1981). Microbial Carriers- Strategy for Selection. *Process Biochemistry*, 16(5), 2-4.
- Kopsahelis, N., Kanellaki, M., & Bekatorou, A. (2007). Low temperature brewing using cells immobilized on brewer's spent grains. *Food Chemistry*, 104(2), 480-488.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., & Koutinas, A. A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21(4), 377-397.
- Kourkoutas, Y., Kanellaki, M., Koutinas, A. A., & Tzia, C. (2005). Effect of fermentation conditions and immobilization supports on the wine making. *Journal of Food Engineering*, 69(1), 115-123.

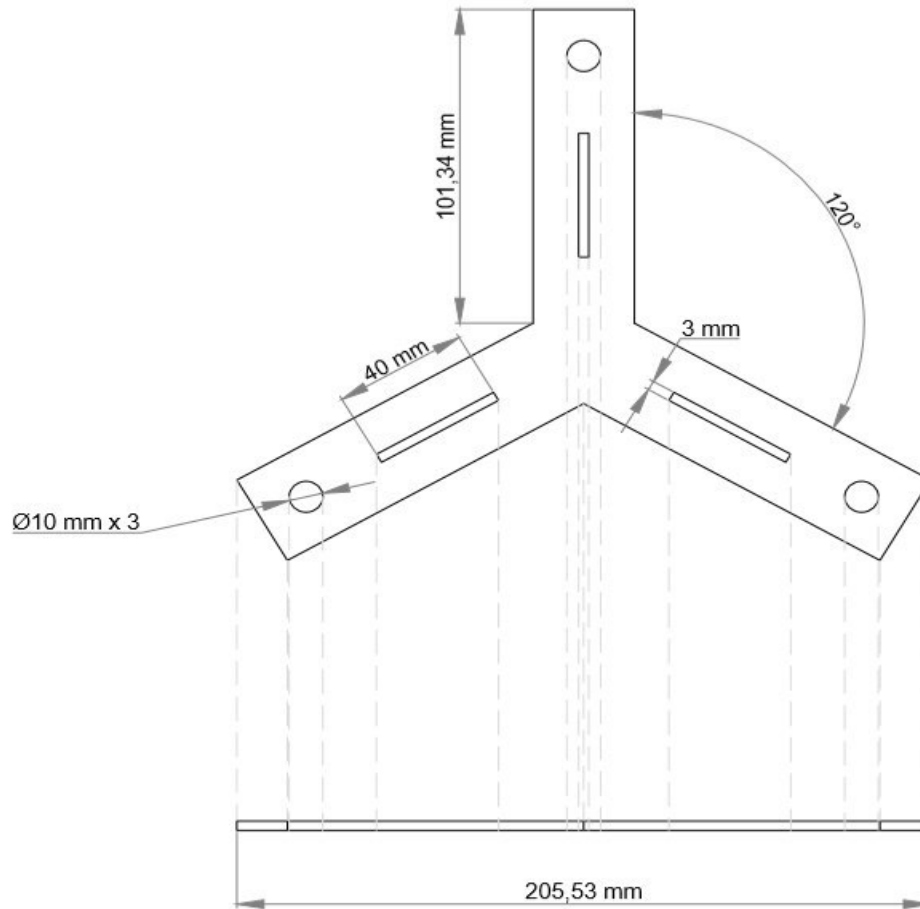
- Kunze, W., & Mieth, H. O. (2004). Technology of brewing and malting. (westkreuz-druckerei ahrens kg). Berlin. Pp. 493-494.
- Lie, S. (1973). The EBC-Ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing*, 79(1), 37-41.
- Linko, M., Haikara, A., Ritala, A., & Penttila, M. (1998). Recent advances in the malting and brewing industry. *Journal of Biotechnology*, 65(2), 85-98.
- Linko, Y. Y., Javanainen, P., & Linko, S. (1997). Biotechnology of bread baking. *Trends in Food Science and Ttechnology*, 8(10), 339-344.
- Luján, M., & Vásquez, V. (2010). Automatic control with fuzzy logic of home-made beer production in maceration and cooking stages. *Scientia Agropecuaria*, 1(2), 125-137.
- Malomo, O., Ogunmoyela, O. A. B., Oluwajoba, S. O., & Adigun, M. O. (2011). Sensory assessment of sorghum brew adjunct and barley brew lager beer. *Journal of Brewing and Distilling*, 2(5), 62-68.
- Martynenko, N. N., & Gracheva, I. M. (2003). Physiological and biochemical characteristics of immobilized champagne yeasts and their participation in champagnizing processes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39(5), 439-445.
- Masschelein, C. A. (1997). Horace brown memorial lecture a realistic view on the role of research in the brewing industry today. *Journal of the Institute of Brewing*, 103(2), 103-113.
- Masschelein, C. A., Ryder, D. S., & Simon, J. P. (1994). Immobilized cell technology in beer production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14(2), 155-177.
- Meilgaard, M., Civille, G.V. (2007), *Sensory Evaluation Techniques*. 4th edition, CRC Press, Boca Raton, New York., pp: 22–35.
- Melzoch, K., Rychtera, M., & Habova, V. (1994). Effect of immobilization upon the properties and behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Journal of Biotechnology*, 32(1), 59-65.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mojovic, L., Rakin, M., Vukasinovic, M., Nikolic, S., Pejin, J., & Pejin, D. (2010). Production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal by immobilized yeast. *Chemical Engineering*, 21, 1333-1338.

- Nedovic, V., Willaert, R., Leskosek-Cukalovic, I., Obradovic, B., & Bugarski, B. (2005). Beer production using immobilised cells. In: Applications of cell immobilisation biotechnology. Springer. Netherlands. pp. 259-273.
- Nguyen, H. P., & Du Le, H. (2015). Effect of ethanol stress on fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on *Nypa fruticans* leaf sheath pieces. Food Technology and Biotechnology, 53(1), 96-101.
- Novotny, C., Flieger, M., Panos, J., & Karst, F. (1992). Effect of 5,7-unsaturated sterols on ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 15(3), 314-320.
- Owen, P. W. (1991). Biotecnología de la Fermentación. Principios, procesos y productos. Acribia. Zaragoza, España.
- Panizo Casado, M. 2015. Caracterización bromatológica de las variedades locales de cebada (*Hordeum vulgare* L.) de Canarias. Trabajo final de carrera. Directores: Rodríguez Rodríguez, M.E. Ríos Mesa, D. Afonso Morales, D. Centro de Conservación de la Biodiversidad Agrícola de Tenerife. Universidad de La Laguna.
- Priest, F. G., & Stewart, G. G. (Eds.). (2006). Handbook of brewing. (Advisory USA)
- Puig, A., Bertran, E., Masqué, M., Vilabella, M., García, T., Mauricio, J.C., Minguez, S. (2010). Uso de un nuevo sistema de inmovilización de levaduras en vinificación. Estudio de su reutilización. Institut Català de la Vinya i el Vi, 1: 1-8.
- Ragauskas, A. J., Nagy, M., Kim, D. H., Eckert, C. A., Hallett, J. P., & Liotta, C. L. (2006). From wood to fuels: integrating biofuels and pulp production. Industrial Biotechnology, 2(1), 55-65.
- Rodríguez, H. A. (2003). Determinación de parámetros físico - químicos para la caracterización de cerveza tipo lager elaborada por la compañía cervecera Kunstmann S.A. Tesis grado. Lic. Ingeniero de alimentos. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile.
- Ryder, D. S., & Masschelein, C. A. (1985). The growth process of brewing yeast and the biotechnological challenge. Journal of the American Society of Brewing Chemists (USA). (43:0066)

- Ringer, S. (1886). A further contribution regarding the effect of minute quantities of inorganic salts on organised structures. *The Journal of physiology*, 7(2), 118-127
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Pasado, presente y futuro. *Biotecnología*, 16(2), 14-46.
- Serp, P., Kalck, P., & Feurer, R. (2002). Chemical vapor deposition methods for the controlled preparation of supported catalytic materials. *Chemical Reviews*, 102(9), 3085-3128.
- Springer, D, (15 de diciembre de 2014). Neomexicanus Hops: What's Available recuperado de <https://www.fivebladesbrewing.com/neomexicanus-hops-whats-available/>.
- Sree, N. K., Sridhar, M., Suresh, K., Banat, I. M., & Rao, L. V. (2000). High alcohol production by repeated batch fermentation using an immobilized osmotolerant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 222-226.
- Stewart, G. G., & Russell, I. (1986). One hundred years of yeast research and development in the brewing industry. *Journal of the Institute of Brewing*, 92(6), 537-558.
- Tanaka, A., & Kawamoto, T. (1999). Cell immobilization. *Encyclopedia of Bioprocess Technology*.
- Tapani, K., Soininen-Tengvall, P., Berg, H., Ranta, B., & Pajunen, E. (2003) Continuous primary fermentation of beer with immobilised yeast. In: Smart, K. (Ed.) *Brewing yeast fermentation performance*, 2nd Edition. Blackwell Publishing, Oxford. pp. 293-301.
- Tenney, R. I. (1985). Rationale of the brewery fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, USA.
- Varnam, A. H., & Sutherland, J. P. (1997). *Bebidas, Tecnología, Química y Microbiología*; Acribia. Zaragoza, España. pp. 259.
- Vogel, W. (2003). *Elaboración casera de cerveza*. Acribia. España.
- Wiseman, A. (1985). *Handbook of enzyme biotechnology*. E. Horwood.

ANEXOS

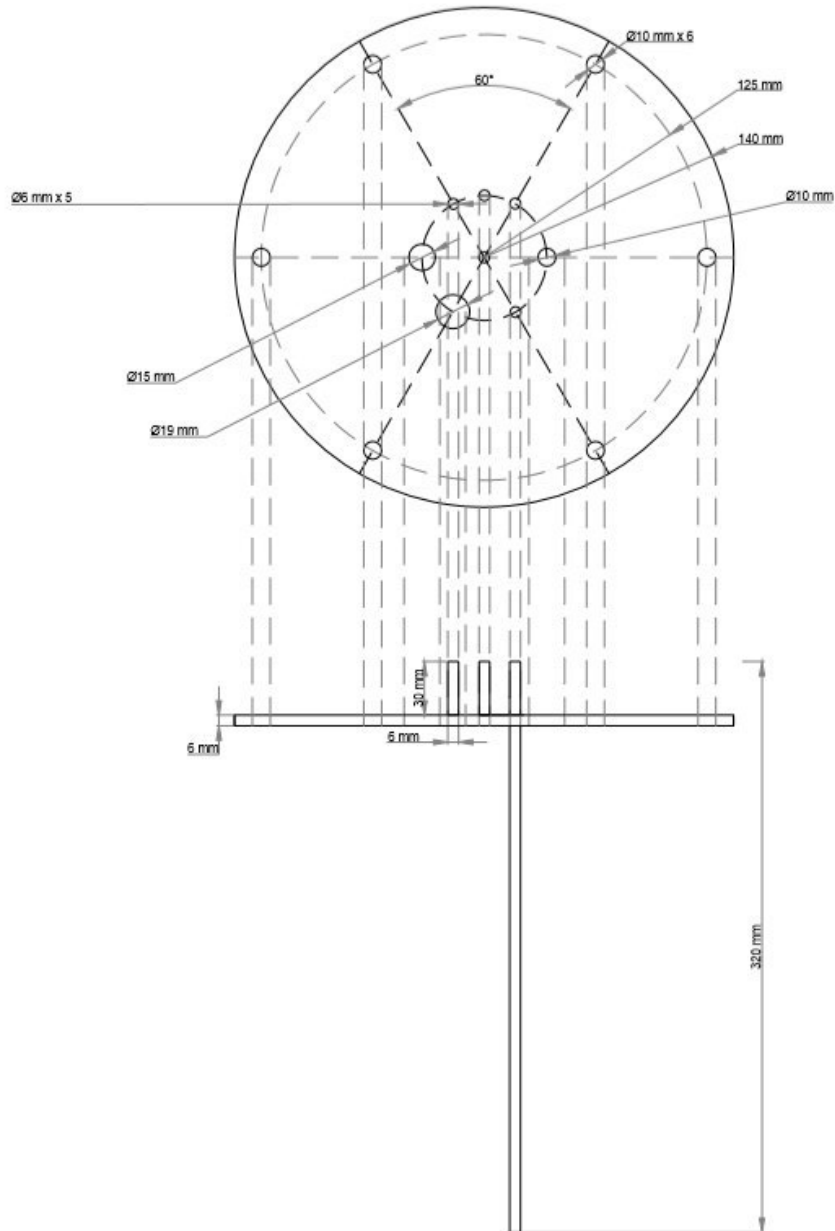
Anexo 1. Biorreactor airlift utilizado en experimentos de fermentación de cerveza



	ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL		CÓDIGO DBA-01
	PROYECTO DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE BIORREACTOR AIRLIFT	ALUMNO HERNAN GASTELLU DAVID LEON FLORES, EMBELIANO	CARRERA AN
	MATERIA DR. ING. VALDIR ESTELA ESCALANTE, P.D.	VISTA PLANTA Y FRONTAL BATERIA DE INCLAJE DEL TUBO INTERIOR	PROFESOR ---
			FECHA OCTUBRE 2011



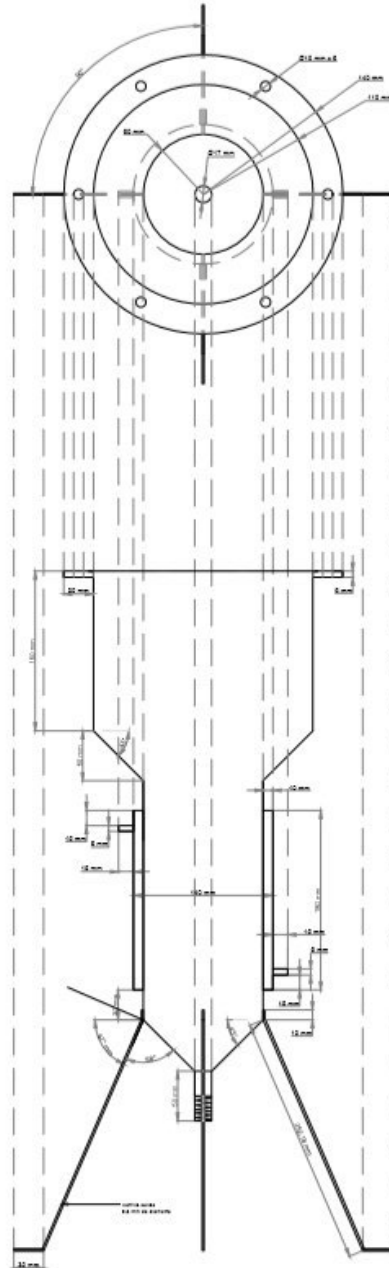
UNIVERSIDAD NACIONAL
MAYOR DE SAN MARCOS
UNIVERSIDAD DEL PERU, DECANA DE AMERICA



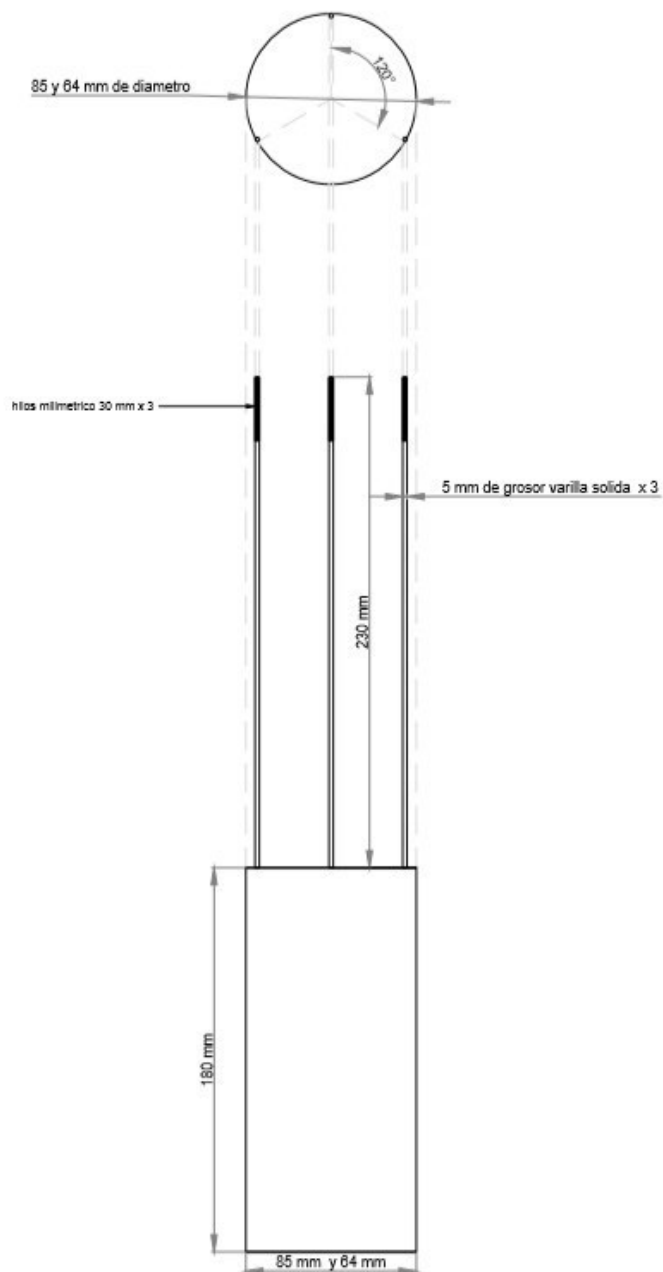
	ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL		DBA-01
	PROYECTO DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE BIORREACTOR AIR-LIFT	ALUMNO DESCRPTIVO HUMANO CASTELLU DAVID LEÓN FLORES, EMBELIANO	
PROFESOR DR. ING. WALTER ESTELA BAZALANTE, P.ING.	VECT. PLANTA Y FRENTEL TAPA SUPERIOR DEL BIORREACTOR	PROFESOR VICELIBRO VICELIBRO OCTUBRE 2018	



UNIVERSIDAD NACIONAL
MAYOR DE SAN MARCOS
UNIVERSIDAD DEL PERU, DECANA DE AMERICA



	ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL INGENIERIA AGROINDUSTRIAL		DBA-01
	PROYECTO	DESCRIPTIVO	
	DISEÑO Y CONSTRUCCION DE BIORREACTOR AIR/LF	ELABORADO POR	16
		HELIAMAN GASTELU, DAVID LEON FLORES DE SABLUMAS	PROYECTO
		USO	---
		PLANTA Y PROFITAL	---
		TUBO EXTERIOR, CHAQUETA DE SOPORTAMIENTO Y SOPORTE	---
			FECHA: OCTUBRE 2018



ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

PROYECTO	DISEÑO Y CONSTRUCCION DE BIORREACTOR AIR/LF
ASIGNATURA	DR. ING. VALDIR ESTELA ESCALANTE P.D.

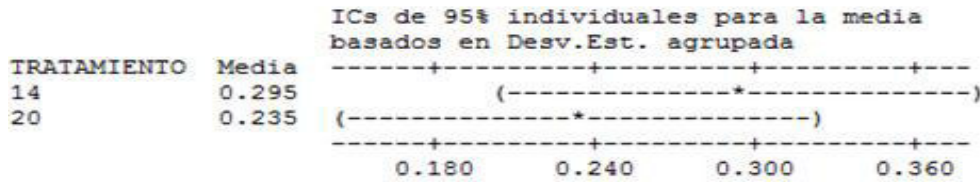
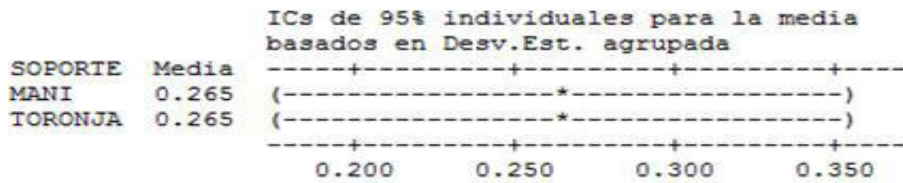
ALUMNO	DESCRIPTIVO
ELABORADO POR	JEJAMAN-GASTELLI, DAVID LEON FLORES, EMILIANO
UBI	PLANTA Y FRONTAL TUBO INTERIOR Y SISTEMA DE ANCLAJE

PROYECTO	DBA-01
LABORIO	DA
PROFESOR	
UNIVERSIDAD	
FECHA	OCTUBRE 2018

Anexo 2 .- Análisis de varianza Productividad según tipo de soporte (biorreactor)

Fuente	GL	SC	MC	F	P
SOPORTE	1	0.0000	0.0000	0.00	1.000
TRATAMIENTO	1	0.0036	0.0036	36.00	0.105
Error	1	0.0001	0.0001		
Total	3	0.0037			

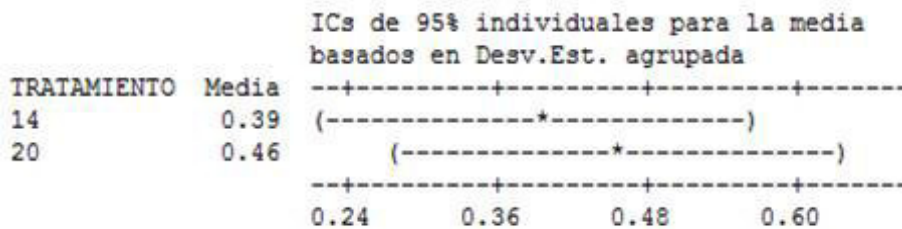
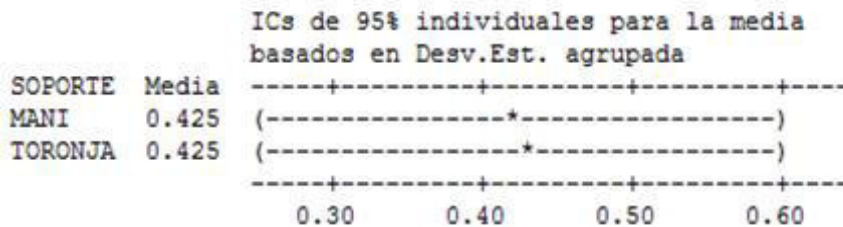
S = 0.01 R-cuad. = 97.30% R-cuad.(ajustado) = 91.89%



Anexo 3 .- Análisis de varianza Rendimiento según tipo de soporte (biorreactor)

Fuente	GL	SC	MC	F	P
SOPORTE	1	0.0000	0.0000	0.00	1.000
TRATAMIENTO	1	0.0049	0.0049	12.25	0.177
Error	1	0.0004	0.0004		
Total	3	0.0053			

S = 0.02 R-cuad. = 92.45% R-cuad.(ajustado) = 77.36%



Anexo 4.- Análisis de varianza Rendimiento según tipo de soporte (biorreactor)

Fuente	GL	SC	MC	F	P
SOPORTE	1	0.34490	0.344898	4.07	0.114
CARACTERISTICA	4	1.08163	0.270408	3.19	0.144
Error	4	0.33878	0.084694		
Total	9	1.76531			

S = 0.2910 R-cuad. = 80.81% R-cuad. (ajustado) = 56.82%

