

Cinética del proceso de fermentación de mostos en la producción de cerveza

Kinetic for fermentation process of wort during beer production

Héctor Andrés Granada-Díaz ¹, Guillermo Salamanca-Grosso ²

¹Universidad del Tolima. Departamento de Matemáticas y Estadística. Facultad de Ciencias. Ibagué, Colombia

✉ hgranadad@ut.edu.co

²Universidad del Tolima. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Ibagué, Colombia.

✉ gsalaman@ut.edu.co

Recibido: 09/06/2020 / Aceptado: 01/07/2020

Resumen En este trabajo se analiza la cinética del proceso de fermentación considerando la reducción de los azúcares del mosto, producción de etanol, la generación de butanodiona y acetato de etilo, a través de ecuaciones dinámicas asociadas con el efecto de la temperatura y su incidencia en la optimización multiobjetivo del proceso. Se expone una contribución al sistema de modelamiento cinético con la inclusión de expresiones tipo Arrhenius sobre las cuantificaciones dinámicas, que consolidan la reducción del número de parámetros del sistema. Se consigue describir la magnitud y extensión del proceso con visualización de las concentraciones clave para alcohol etílico, acetato de etilo y diacetilo, en función de variables iniciales de sustrato, considerando las tasas de crecimiento e inhibición. Se confirma que los contenidos de azúcares fermentables gobiernan la concentración de alcohol a diferentes temperaturas y tiempos de proceso.

Palabras clave: Azúcares fermentables; Ecuaciones dinámicas; Etanol; Fermentación; Modelamiento cinético; Operaciones unitarias; Parámetros cinéticos

Abstract In this work, kinetics of the fermentation process is analysed considering the reduction of sugars in the must, ethanol production, the generation of butanedione and ethyl acetate, through dynamic equations associated with the effect of temperature and its incidence on the Multi-objective optimization of the process. A contribution to the kinetic modelling system is presented with the inclusion of Arrhenius-type expressions on dynamic quantifications, which consolidate number of system parameters reduction. It is possible to describe the magnitude and extension of the process visualizing key concentrations for ethyl alcohol, ethyl acetate and diacetyl, as a function of initial substrate variables, considering the growth and inhibition rates. It was confirmed that the fermentable sugar contents govern the alcohol concentration at different temperatures and process times.

Keywords: Dynamic equations; Ethanol; Fermentation; Fermentable sugars; Kinetic modelling; Kinetic parameters; Unit operations

Introducción

La producción de bebidas alcohólicas con uso de levaduras, es una actividad biotecnológica que se ha ido consolidando desde el punto de vista económico e industrial. Según las condiciones de proceso de elaboración, se producen resultados diferentes. La fermentación de la cerveza, es una operación unitaria que ha ganado interés en la industria y en la comunidad científica por las implicaciones que tiene en cuanto al efecto de la temperatura sobre los parámetros de diseño y rendimiento mismo. Es un proceso fermentativo asistido por levaduras, que conlleva la formación de etanol, dióxido de carbono, con la evolución de compuestos aromáticos característicos del producto, según sean los métodos y materias primas seleccionadas (Terán, 2017; Bokulich y Bamforth, 2013; Boulton, 2013; Aniseh et al., 2011; Cortacero-Ramírez et al., 2003). Entre las fuentes de carbono de iniciación, los almidones de cereales malteados principalmente de cebada, centeno, mijo y trigo, han sido ampliamente estudiados, sobre los cuales se ha adicionado lúpulo, que aportan adhumulona, cohumulona, humulona, prehumulona y posthumulona, responsables de la astringencia de los tipos de cerveza. Desde el punto de vista operativo la calidad final de la cerveza es dependiente de la materia prima, tipos de levadura, temperatura y tiempos de fermentación, que pueden variar inclusive entre lotes de cerveza de la misma calidad (Bricio-Barrios et al., 2018; Salamanca et al., 2015).

La elaboración de cerveza, conlleva una serie de etapas consecutivas que son complementarias respecto del producto final, con operaciones de maceración simple del grano de malta molido, recirculación y cocción del mosto hasta la adición de levadura a la temperatura de fermentación preestablecida. Las levaduras, juegan un papel vital en la producción y elaboración de la cerveza, la selección de cepas son esenciales en el mantenimiento de la calidad sensorial de la bebida, por cuanto evolucionan numerosos metabolitos secundarios que actúan como congéneres

importantes del sabor, incluida la formación de ésteres, alcoholes superiores, compuestos de azufre, ácidos orgánicos, aldehídos y cetonas, que definen los atributos de aroma y sabor del producto final (Callejo, et al., 2019; Carneiro y Da Cruz Meleiro, 2011). La extensión del proceso, presupone condiciones de entorno en el mosto, disponibilidad de nutrientes, oxígeno disuelto, temperatura y presión en las unidades de reacción. El consumo de azúcares, es concomitante con la concentración de biomasa presente al inicio del proceso, la formación del etanol se extiende como parte fundamental del proceso, pero se prevé un factor de inhibición. El acetato de etilo y butanodiona (diacetilo), son productos que también se relacionan con el consumo de azúcar con una condición dependiente de la temperatura (Langenaeken et al., 2020; Callejo et al., 2019; Pires y Brányik, 2015; Li et al., 2015; Vidgren y Londesborough, 2011; Oonsivilai y Oonsivilai, 2010; Xiao et al., 2004).

La evaluación cinética de los procesos fermentativos se ha relacionado a través de modelos matemáticos con la actividad de microorganismos, los biorreactores y las consideraciones de balance para la acumulación de producto, que están en función de la biomasa y sustrato (Moutsoglou et al., 2020; Fox et al., 2019; Rodman y Gerogiorgis, 2016; Krogerus et al., 2015). El efecto térmico como parámetro importante en el desarrollo cervecero, ha sido evaluado considerablemente y se ha demostrado el efecto en su dinámica e influencia de control en la optimización del proceso. Se han usado diferentes herramientas de aproximación basados en algoritmos Quasi-Newton y Levenberg-Marquard, aunque también se han empleado métodos no lineales para identificar la tasa de producción de etanol y consumo de azúcares reductores (Callejo et al., 2019; Stewart, 2017; Bricio-Barrios et al., 2017; Garduño et al., 2014; Olaniran et al., 2011).

En el contexto anterior, el objetivo del presente trabajo se ha enfocado en la evaluación cinética de proceso de elaboración de cerveza, considerando interacciones dinámicas de las

variables de estado y funciones auxiliares que relacionan la biomasa inoculada, los azúcares fermentables, la producción de etanol y la formación acetato de etilo y diacetilo así como la incidencia en la evolución del proceso fermentativo y la estimación de nuevos parámetros cinéticos a partir de un arreglo general tipo Arrhenius a tres condiciones térmicas diferentes.

Materiales y métodos

La cinética del proceso de fermentación asistidos por levaduras, involucró la interacción dinámica de las variables de estado, tales como la concentración de biomasa $[X_A]$, activa (X_A), latente (X_L) y células muertas (X_D), azúcares fermentables (S), producción de etanol (EtOH), diacetilo (butanodiona DY) y acetato de etilo (AE), (Tabla 1). La biomasa de levaduras al inicio del proceso se disgregó y representó a través de tres componentes: biomasa activa, latente y células muertas, cuya actividad ocurrió en una secuencia de fases consecutivas que iniciaron con un periodo de latencia de las levaduras, fase de aceleración con crecimiento exponencial, ralentización y declive celular (Figura 1). El modelamiento del proceso presupuso el conocimiento de las condiciones iniciales para la biomasa activa, latente e inactiva y la concentración de azúcares fermentables.

Las ecuaciones asociadas a la cinética de proceso (Tabla 1) y las funciones auxiliares del proceso en términos de tasas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol (Tabla 2), completaron la descripción del proceso fermentativo respecto de la velocidad de cambio de la biomasa y coevolución de componentes adjuntos al sustrato. La extensión del proceso presupuso condiciones de entorno en el seno del mosto, disponibilidad de nutrientes, oxígeno disuelto, temperatura y presión en la unidad de reacción.

La evolución de la biomasa en la descripción del modelo, se planteó como parámetro de proceso a partir de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE's) y a las tasas de crecimientos a

Tabla 1. Ecuaciones dinámicas asociada a la producción de cerveza

Expresiones dinámicas	Variables de estado	Ecuación
$\frac{d[X_A]}{dt} = [X_A] \cdot (\mu_x - \mu_{DT}) + \mu_L \cdot [X_L]$	Células activas	Ec. 1
$\frac{d[X_L]}{dt} = -\mu_L \cdot [X_L]$	Células latentes	Ec. 2
$\frac{d[X_D]}{dt} = -\mu_{SD} \cdot [X_D] + \mu_{DT} \cdot [X_A]$	Células muertas	Ec. 3
$\frac{d[S]}{dt} = -\mu_s \cdot [X_A]$	Sustrato fermentable	Ec. 4
$\frac{d[EtOH]}{dt} = f \cdot \mu_c \cdot [X_A]$	Concentración de etanol	Ec. 5
$\frac{d[DY]}{dt} = \mu_{DY} \cdot [S] \cdot [X_A] - \mu_{AB} \cdot [DY] \cdot [EtOH]$	Concentración diacetilo	Ec. 6
$\frac{d[EA]}{dt} = Y_{EA} \cdot \mu_x \cdot [X_A]$	Concentración Acetato de etilo	Ec. 7

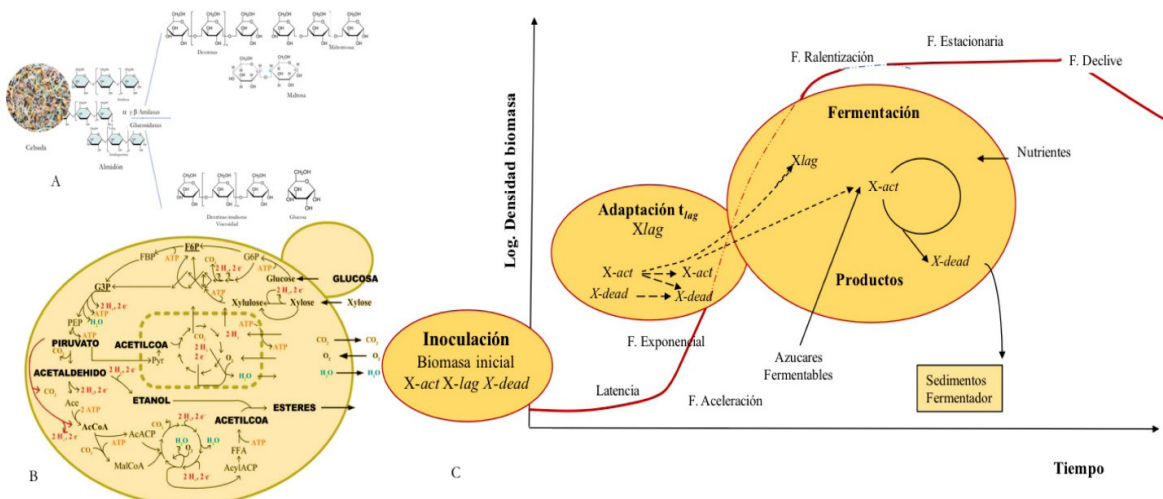


Figura 1. Representación general del proceso fermentativo. A. Degradación del almidón. B. Actividad metabólica de levadura. C. Modelo cinético del proceso.

Tabla 2. Condiciones iniciales de las variables de estado del proceso de fermentación de mostos

Valores	Ecuación	Unidades
$[X_{INC}]_0 = 4.00$	-	$g L^{-1}$
$[X_A]_0 = 0.08$	-	$g L^{-1}$
$[X_L]_0 = 0.5 [X_{INC}]_0 - [X_A]_0$	Ec. 8	$g L^{-1}$
$[X_D]_0 = [X_{INC}]_0 - [X_A]_0 - [X_L]_0$	Ec. 9	$g L^{-1}$
$[S]_0 = 130$	-	$g L^{-1}$
$[EtOH]_0 = 0.00$	-	$g L^{-1}$
$[DY]_0 = 0.00$	-	$mg L^{-1}$ (ppm)
$[EA]_0 = 0.00$	-	$mg L^{-1}$ (ppm)

través de funciones tipo Arrhenius. Los azúcares fermentables al inicio del proceso, fueron fijados en el rango $130 g L^{-1}$. La tabla 3, relaciona las funciones auxiliares del proceso sobre la velocidad de cambio de biomasa que evolucionan con el sustrato. Se asumió un inóculo inicial $[X_{INC}]_0$ en $4.00 g L^{-1}$ para las levaduras, compuesta por un 50% de células muertas, 48 de células latentes y solo el 2% de células activas. Por lo tanto $[X_A]_0 + [X_L]_0 = 0.5 + [X_{INC}]_0$, para un tiempo menor que el de adaptación ($t < t_L$).

En una segunda fase, se estudió el efecto de la temperatura en rendimiento del proceso a $8^{\circ}C$, $13^{\circ}C$, $16^{\circ}C$ y $18^{\circ}C$ con la formación temporal de etanol [EtOH], acetato de etilo [AE] y diacetilo [DY] y en comportamiento de células activas $[X_A]$ y en una tercera fase se evaluaron mapas de contorno de la evolución del etanol en el proceso como función de la temperatura y el tiempo, fijando como nivel de producción de etanol $50 g L^{-1}$ a fin de identificar la dependencia en tiempo y temperatura con este valor objetivo. En el trabajo se calcularon los puntos de equilibrio del sistema, que se alcanzaron cuando se consideró que el proceso había finalizado, es decir, cuando $X_A = X_L = X_D = 0$. Para garantizar el estado estacionario, se integró el sistema descrito en la tabla 1 en un intervalo de tiempo (t) de $[0,500]$ h., usando el integrador ode45 del software MATLAB®. En el proceso fermentativo de generación de cerveza, los azúcares se transformaron en etanol, sin que se propiciaran mecanismos de agitación, donde la temperatura fue el parámetro más importante

Tabla 3. Funciones auxiliares del proceso de fermentación sobre la velocidad de cambio de biomasa con evolución de sustrato

Expresiones	Observaciones	Ecuación
$\mu_x = \frac{\mu_{xo} \cdot [S]}{k_x + [EtOH]}$	Tasa específica de crecimiento de las células activas.	Ec. 10
$\mu_{SD} = \frac{0.5 \cdot \mu_{SDo} [S]_0}{0.5 \cdot [S]_0 + [EtOH]}$	Tasa de sedimentación de células muertas.	Ec. 11
$\mu_s = \frac{\mu_{so} \cdot [S]}{k_s + [S]}$	Tasa específica de consumo de sustrato.	Ec. 12
$\mu_e = \frac{\mu_{eo} \cdot [S]}{k_e + [S]}$	Tasa de producción de etanol.	Ec. 11
$f = 1 - \frac{[EtOH]}{0.5 \cdot [S]_0}$	Factor de inhibición para producción de etanol.	Ec. 13

de control. Es de anotar que, las operaciones a baja temperatura ralentizan el proceso con una marcada dependencia del tiempo, mientras que un incremento acelera la fermentación de manera significativa.

Resultados y discusión

Las levaduras juegan un papel vital en la elaboración de la cerveza, la selección de cepas fue esencial en el mantenimiento de la calidad sensorial de la bebida, por cuanto evolucionaron numerosos metabolitos secundarios que actuaron como análogos importantes del sabor, incluido la formación de ésteres, alcoholes superiores, compuestos de azufre, ácidos orgánicos, aldehídos y cetonas, que definieron los atributos de aroma y sabor de la bebida. Las levaduras, son organismos poiquilotérmicos y su actividad es, por lo tanto, dependiente de la temperatura. En el proceso, las levaduras acidifican el medio por efectos de la actividad de la ATPasa desde la membrana plasmática. La membrana es la barrera celular que controló el intercambio de nutrientes por efectos de difusión simple y transporte activo y con ello el control de la fermentación, creando gradientes de pH que efectuaron el transporte de nutrientes, la glucosa se transportó por difusión facilitada y maltosa por transporte activo.

El efecto sobre la eficiencia en la producción de alcohol, se redujo cuando la temperatura excedió los 15°C. En términos de proceso, los resultados indicaron que los tiempos de fermentación variaron de forma considerable entre lotes de cerveza del mismo tipo. Las amilasas que transformaron el almidón en glucosa, maltosa, maltotriosa y biomasa, fueron modificando la viscosidad y densidad del medio en el reactor. Si bien el etanol es el principal componente formado, se obtuvieron otros subproductos menores, como diacetilo (5-40 mg L⁻¹), acetaldehído (10-75 mg L⁻¹), acetato de etilo (22-64 mg L⁻¹) y ácidos acéticos y succínico que aportaron aroma y sabores característicos a la cerveza. En la fase de maduración, se presentaron reacciones con el dióxido de carbono, generando remoción de metabolitos responsables e indeseables acompañados de sedimentación de células de levadura. La ventana térmica de tolerancia para *Saccharomyces cerevisiae*, se presentó desde un valor reducido de crecimiento e inhibición celular entre 3 y 42°C, siendo óptima entre 30 y 33°C, en un rango de pH de 4.5 a 6.5.

Parámetros auxiliares como funciones tipo Arrhenius

En el proceso de fermentación, con evolución de la actividad celular, las tasas específicas de crecimiento, activación, sedimentación máxima, muerte celular y las tasas máximas de consumo de sustrato y producción de etanol, se relacionaron como funciones tipo Arrhenius, dependientes de la temperatura, representadas a través de la relación general:

$$\mu_i = \exp [x_i + y_i/T] = \exp [x_i + (m x_i + b)/T] = A_i \exp [E_i/(RT)] \quad \text{Ec. 14}$$

El análisis matemático de estas expresiones, condujo a la estimación de valores numéricos correlacionados entre si a través de una relación lineal de la forma $[y_i = m x_i + b]$, con una pendiente $[m=-290.3]$ e intercepto en $[b= -457.5]$, (Figura 2). Esta nueva relación permitió explicar el comportamiento de los parámetros de las tasas μ_i descritas en función de la temperatura y la relación existente entre el

factor preexponencial A_i , respecto de la energía de activación E_i , situación que fue concomitante con evaluaciones parciales presentadas en otros trabajos (Rodman y Gerogiorgis, 2016; de Andrés-Toro et al., 2004; Carrillo et al., 2001; 2003; Andrés-Toro et al., 1998). Esta nueva aproximación permitió reducir el número de parámetros y simplificar las características de los modelos reportados en la literatura. Las nuevas expresiones del modelo dinámico que derivaron de este trabajo, se relacionan en las ecuaciones Ec-15 a Ec-23 (Tabla 4), que junto a la tasa de producción de diacetilo y la tasa efectiva de reducción del diacetilo, permitieron realizar procesos de simulación.

Rodman y Gerogiorgis (2016), han establecido que el rango óptimo de la temperatura para la producción de cervezas está entre 9°C y 16°C y Carrillo-Uretra et al. (2001) estimaron que, para este rango térmico, los valores de las tasas de producción de diacetilo (μ_{DY}) y tasa efectiva de reducción del diacetilo μ_{AB} , asumieron valores constantes ($\mu_{DY}=0.00127672$ y $\mu_{AB}=0.00113864$). Los parámetros expresados en las ecuaciones Ec. 24 y Ec. 25, se pueden ajustar al modelo tipo Arrhenius con un arreglo $\mu_i = \exp [x_i + (m x_i + b)/T]$. Asumiendo la temperatura como $T=16^\circ\text{C} + 273.15$ y despejando el término x_i de la relación anterior, como se indica en la Ecuación 26, se encuentran nuevas expresiones para μ_{DY} y μ_{AB} como se indica en las Ecuaciones 27 y 28.

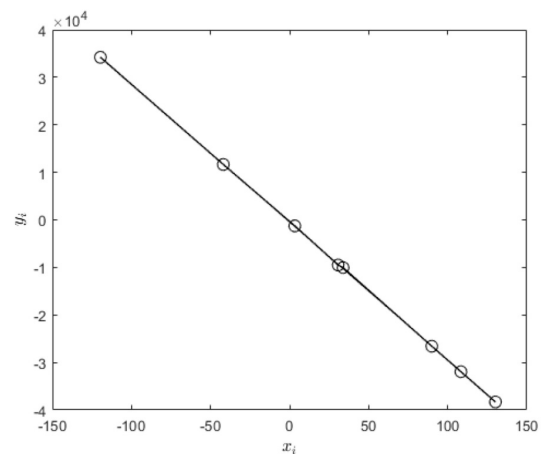


Figura 2. Correlación lineal entre los valores $\{(x_i, y_i)\}$ asociados a las tasas de evolución, crecimiento y consumo de sustrato en la fermentación asistida por levaduras.

Tabla 4. Valores de parámetros calculados, ajustados a datos experimentales en función de la temperatura (T).

Parámetros dependientes de T	Interpretación	Ecuación
$\mu_{xo} = \exp [108.31 - 31934.09/T]$	Tasa máxima de crecimiento.	Ec. 15
$Y_{EA} = \exp [89.92 - 26589/T]$	Coefficiente estequiométrico de la proporción EA/Sustrato.	Ec. 16
$\mu_{so} = \exp [-41.92 + 11654.64/T]$	Tasa específica máxima de consumo de sustrato.	Ec. 17
$\mu_L = \exp [30.72 - 9501.54/T]$	Tasa específica de activación celular.	Ec. 18
$\mu_{DT} = \exp [130.16 - 38313/T]$	Tasa de muerte celular.	Ec. 19
$\mu_{eo} = \exp [3.27 - 1267.24/T]$	Tasa máxima de producción de etanol.	Ec. 20
$\mu_{SDo} = \exp [33.82 - 10033.28/T]$	Tasa específica de sedimentación máxima.	Ec. 21
$k_e = \exp [-119.63 + 34203.95/T]$	Función de afinidad de la ecuación Michaelis-Menten en la producción de etanol.	Ec. 22
$ks = ke$	Constante de afinidad para consumo de sustrato (Michaelis-Menten).	Ec. 23
$\mu_{DY} = -6.1344 \times 10^{-8} \cdot T^2 + 8.4266 \times 10^{-6} \cdot T - 1.7672 \times 10^{-2}$	Tasa de producción de diacetilo.	Ec. 24
$\mu_{AB} = -9.1384 \times 10^{-7} \cdot T^2 + 6.7071 \times 10^{-5} \cdot T - 0.1251 \times 10^{-3}$	Tasa efectiva de reducción del diacetilo.	Ec. 25

La representación gráfica de estas tasas bajo los esquemas descritos por de Andrés-Toro et al. (1998), Carrillo-Uretra et al. (2001) y el propuesto en este trabajo, se ilustran en la Figura 3. Nótese que es posible obtener una pendiente fija m y un intercepto b para una planta piloto de elaboración de cerveza. Ahora bien, esta correlación sugiere que las constantes de las tasas específicas relacionadas (Tabla 4), se pueden estimar fácilmente considerando los resultados experimentales de una planta piloto de elaboración de cerveza con otras de construcción. Es decir, esta correlación lineal sugiere la reducción del número de parámetros que se deben estimar a partir de un diseño experimental definido.

$$x_i = \frac{T[\log(\mu_i)] - b}{T + m} \quad \text{Ec. 26}$$

$$\mu_{DY} = \exp [1853.5 - 538541.2/T] \quad \text{Ec. 27}$$

$$\mu_{AB} = \exp [1304.2 - 379083.1/T] \quad \text{Ec. 28}$$

Las condiciones establecidas para las tasas de inhibición de azúcares (k_s) y etanol (k_e) [$k_s = k_e$] y el crecimiento celular $k_x = 0.5 [S]_0$, permitieron la integración del sistema dinámico definido en las ecuaciones Ec. 1 a Ec. 5, (Tabla 1). Usando el integrador ode45 del software MATLAB® 2017b, se logró reproducir la evolución temporal del proceso fermentativo, bajo operación isotérmica a 13°C, en un tiempo máximo de integración de 160 h. y concentración de azúcares fermentables de 130 g L⁻¹. Al tener en cuenta las expresiones de las ecuaciones Ec-27 y Ec-28, se lograron resultados análogos a los descritos en la literatura (Rodman y Gerogiorgis, 2016). El comportamiento cinético isotérmico a 13°C, se ilustra en la figura 4. Valores similares derivaron de la experimentación en el tren cervecero a nivel de laboratorio proyectados como modelo cinético con el software BeerSmith™ 3 (datos no mostrados).

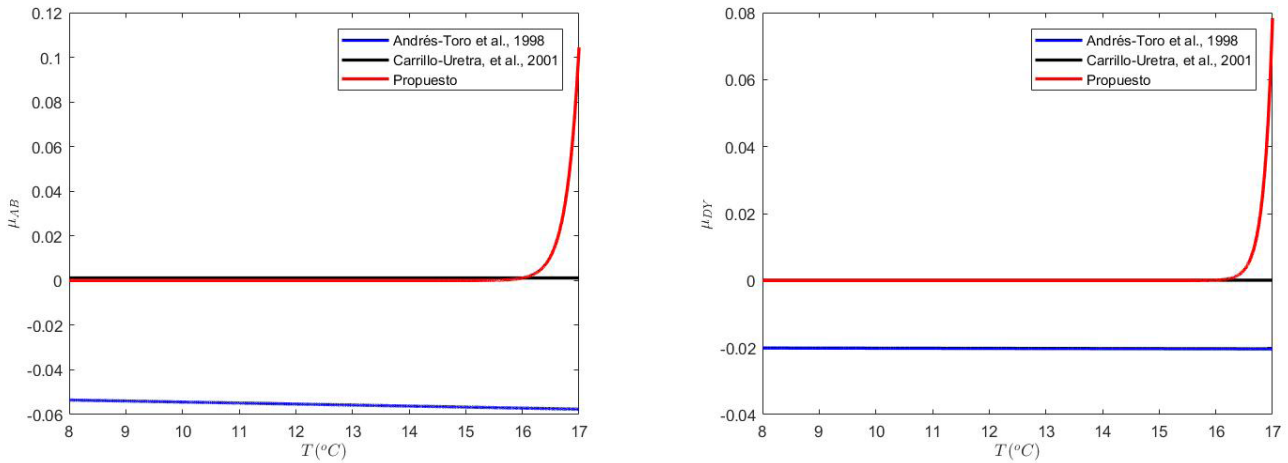


Figura 3. Tasas específicas de producción de diacetilo μ_{DY} y reducción del diacetilo μ_{AB} en función de la temperatura.

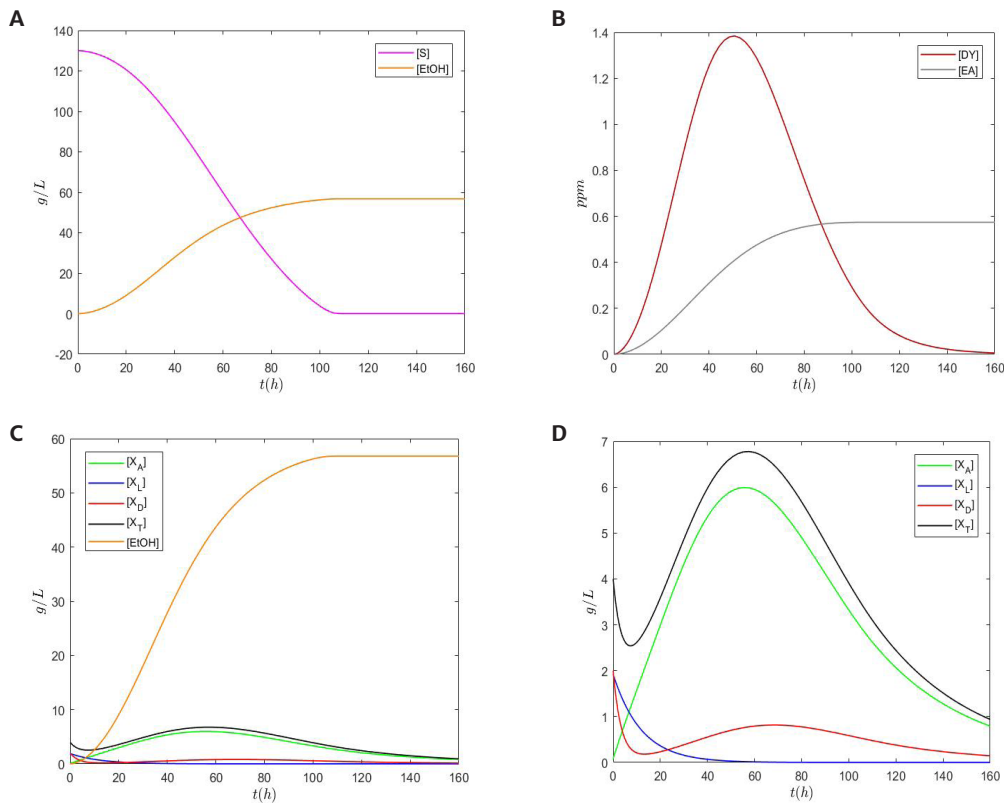


Figura 4. Simulación isotérmica $T=13^{\circ}\text{C}$ del proceso fermentativo de cerveza. A. Reducción de sustrato y producción de etanol. B. Acetato de etilo y diacetilo. C. Etanol, células activas, latentes, muertas y totales. D. Detalle de la dinámica celular.

Efecto térmico sobre el proceso de fermentación

En la fermentación asistida por levaduras el proceso se consideró como una operación abierta, no espontánea, ya que las bajas temperaturas ralentizaron la extensión de la

misma con una marcada dependencia del tiempo. Un incremento térmico aceleró el proceso y los tiempos de fermentación variaron de forma considerable entre lotes del mismo tipo. En la fase de maduración se presentaron reacciones finales en el sustrato y se generó saturación con dióxido de carbono como subproducto, además se

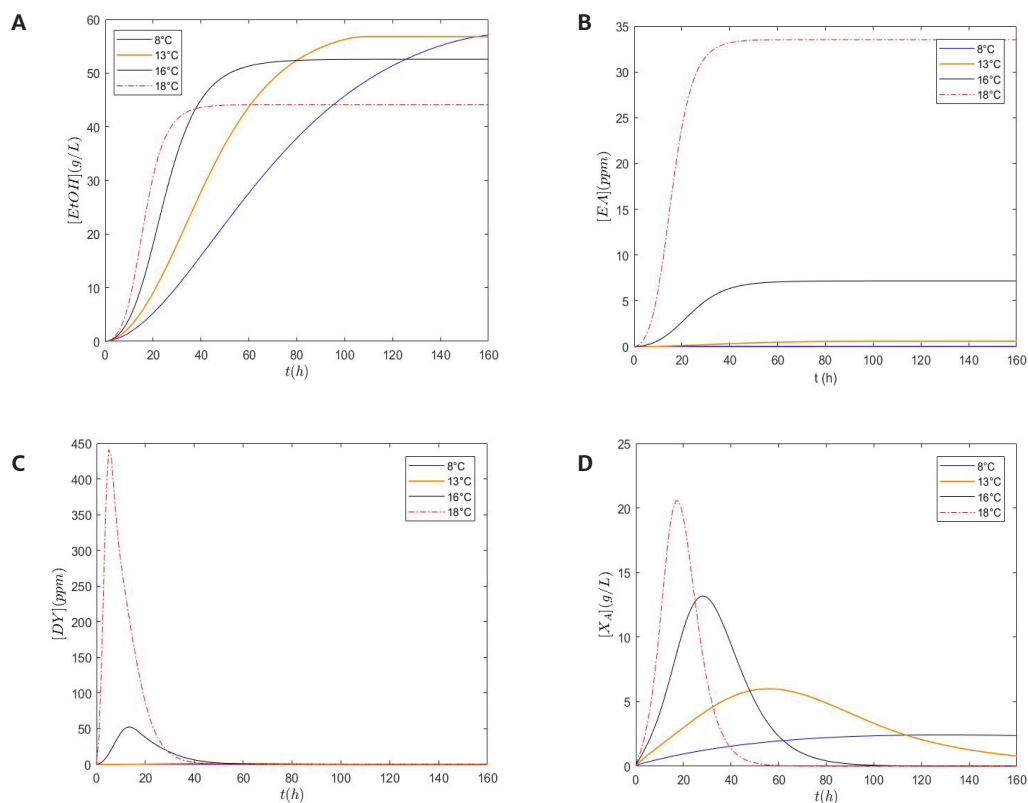


Figura 5. Incidencia de la temperatura sobre en el proceso de fermentación para la evolución de etanol, acetato de etilo y diacetilo y células activas. **A.** Evolución de etanol. **B.** Evolución del acetato de etilo. **C.** Evolución del diacetilo. **D.** Evolución de las células activas.

presentó remoción de metabolitos responsables de aromas indeseables. La incidencia de la temperatura sobre la dinámica del proceso fue determinante ya que la producción de etanol que se retardó controló el proceso a 8°C y se dinamizó a 18°C (Figura 5 A-D). En cada caso se presentó el efecto en la formación de diacetilo en las primeras horas del proceso y se degradó a acetoina y a 2,3-butanedio (García et al., 1994). A 18°C y 40 h de proceso se alcanzó el estado estacionario con niveles de [EtOH] ligeramente mayores a 40 g L⁻¹ que se incrementaron a 110 g L⁻¹ a 8°C y 13°C. En estas mismas condiciones y en el estado transitorio, se presentó una disminución en la actividad de las células activas, con rápida formación de [DY].

La producción de acetato de etilo (EA), diacetilo (DY) y el dióxido de carbono, son dependientes de [EtOH] y de la actividad de Acetil-CoA en el seno del reactor. (EA) evolucionó en condiciones más bien complejas y se produjo

como subproducto de la vía de la síntesis de los aminoácidos isoleucina, leucina y valina (Pires y Brányik, 2015; Boulton, 2013; Krogerus et al., 2013; Bokulich y Bamforth, 2013).

Superficies de respuesta

Los perfiles de superficie de respuesta y contorno en relación al consumo de sustrato y producción de etanol evidenciaron la dependencia de la temperatura y el tiempo de proceso (Figura 6 A-C), que se hicieron significativas a entre 8°C y 12°C, con 150 h de proceso y menor a 16°C y 60 h sobre el sustrato que contenía los azúcares fermentables. Las observaciones de este trabajo fueron análogas a resultados experimentales (Stewart, 2017; Rodman y Gerogiorgis, 2016; Krogerus et al., 2015; Trelea et al., 2001; de Andrés-Toro, et al., 2004; Corrieu, et al., 2000). La biomasa activa al inicio del proceso y en la fase de latencia creció de manera exponencial; en todos los casos se presentó la fase de adaptación,

que dio paso al crecimiento desde ($\mu_x = 0$), a la fase de aceleración ($\mu_x < \mu_{max}$) y crecimiento ($\mu_x < \mu_{max}$), además la tasa de mortalidad específica de la biomasa en el sistema de reacción se incrementó con la temperatura. El rendimiento de células disminuyó debido a mayores requisitos de mantenimiento por la fracción viable de biomasa y la creciente reducción y disipación del sustrato. Las operaciones a baja temperatura ralentizaron el proceso con una marcada dependencia del tiempo, mientras que un incremento aceleró la fermentación de manera significativa. El efecto sobre la eficiencia en la producción de alcohol se redujo cuando la temperatura excedió los 15°C . En términos de proceso, los tiempos de fermentación variaron de forma considerable entre lotes de cerveza del mismo tipo.

Estado estacionario

Los parámetros asociados a la dinámica y control del proceso conllevaron a la reducción de sustrato hasta el estado estacionario, donde no se presentaron cambios en las variables de estado, respecto del tiempo, posibilitando el análisis global través de las ecuaciones dinámicas (Ec-1 a Ec-7). En la condición de equilibrio, la biomasa activa (X_A), latente (X_L) y las células muertas (X_D), permitieron establecer el estado de las variables (S , EtOH, DY y EA), para la condición $X_i \geq 0$, en $i = 1, 2, 3$, donde los productos finales presentaron distintos atributos y características (Tabla 5). Para las condiciones 1 a 3, las relaciones de azúcares fermentables $[S]$ y $[\text{EtOH}]$, representaron tipos de cerveza con niveles de alcohol (x_2 , g L^{-1}),

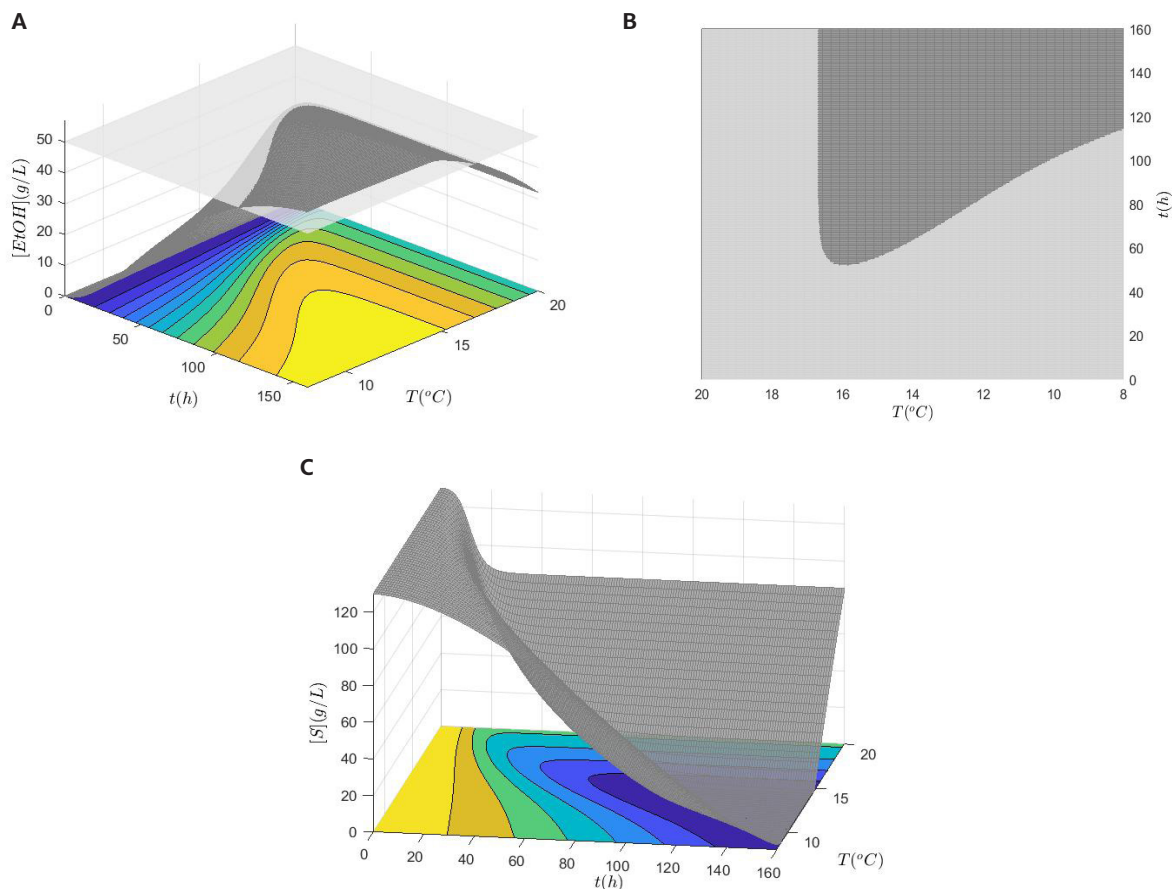


Figura 6. Perfiles de superficie de respuesta y contorno en relación al consumo de sustrato y producción de etanol dependientes de la temperatura en el tiempo. **A.** $[\text{EtOH}]$. **B.** Contorno $[\text{EtOH}] = 50 \text{ g L}^{-1}$. **C.** Azúcares fermentables.

500] h, a través del módulo o de 45 del software MATLAB®, tomando como valores iniciales fijos $[X_{INC}]_0 = 4$, $[X_A]_0 = 0.08$, $[X_L]_0 = 0.5$. $[X_{INC}]_0 - [X_A]_0$; $[X_D]_0 = [X_{INC}]_0 - [X_A]_0 - [X_L]_0$. Las condiciones 1 a 3, (Tabla 5), se alcanzaron cuando $t = 500$ h con $x_i \geq 0$. A partir de estas consideraciones, se infirió que, modificando los valores iniciales de proceso, se alcanzaron productos fermentados con diferentes atributos.

Tabla 5. Parámetros de referencia asociados a los puntos de equilibrio

Condición	S	[EtOH]	[DY]	[EA]
1	x_1	x_2	0	x_3
2	x_1	0	x_2	x_3
3	x_1	$[S]_0/2$	0	x_2
4	0	$[S]_0/2$	0	x_1
5	0	x_1	0	x_2
6	0	0	x_1	x_2

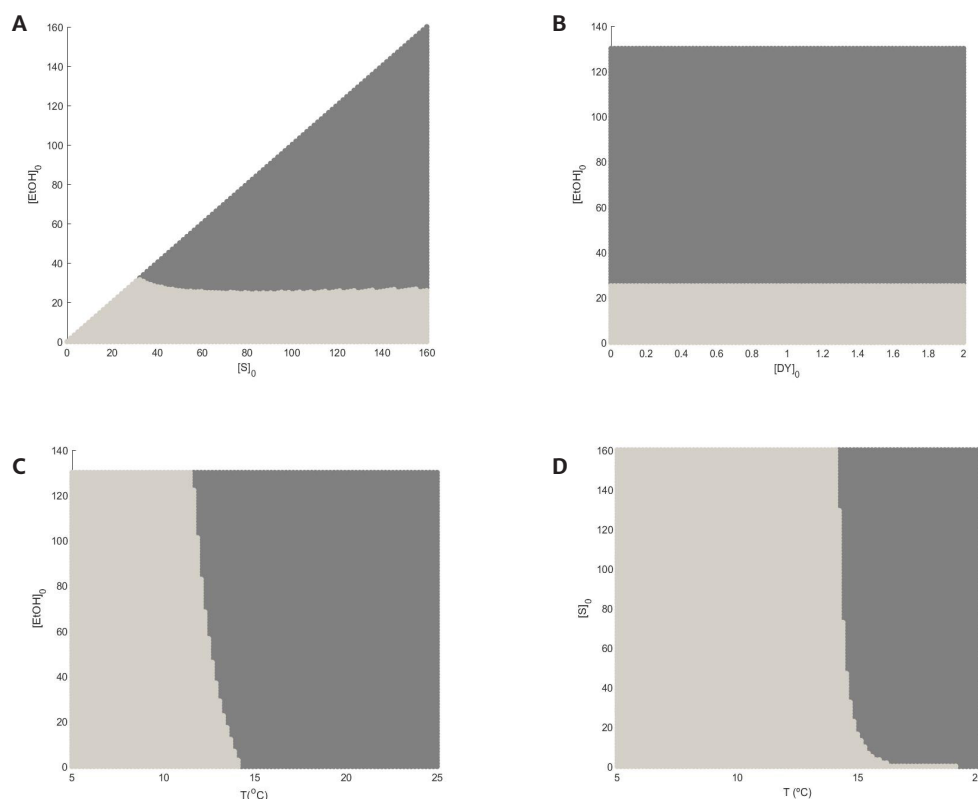


Figura 7. Efecto de las condiciones iniciales sobre el resultado final del proceso. **A.** $0 \leq [S]_0 \leq 160$; $0 \leq [EtOH]_0 \leq [S]_0$. **B.** $0 \leq [DY]_0 \leq 2$; $0 \leq [EtOH]_0 \leq [S]_0 = 130$. **C.** $5 \leq T \leq 20$; $0 \leq [EtOH]_0 \leq [S]_0 = 130$. **D.** $5 \leq T \leq 20$; $0 \leq [S]_0 \leq 160$

residual de azúcares no fermentables (x_1 , g L⁻¹) y [EA] (x_3 , mg L⁻¹), mientras que en la condición 4 el nivel de etanol fue ($[S]_0/2$ en g L⁻¹) y el acetato de etilo (x_1 , mg L⁻¹).

El efecto de la temperatura sobre la dinámica del proceso en la evolución del sustrato en función de las células activas (Figura 4), mostró que el estado estacionario del sistema se alcanzó en un tiempo inferior a 160 h. La garantía numérica del estado estacionario, se logró integrando las condiciones del sistema $X_A = X_L = X_D = 0$, en el intervalo de tiempo de [0,

El efecto de la temperatura a 13°C, cuando los azúcares fermentables se mantuvieron entre $0 \leq S_0 \leq 160$ y $EtOH_0 \leq S_0 \leq 160$, a las condiciones iniciales $DY_0 = EA_0 = 0$, difirieron cuando [EtOH] fue superior a 34 g L⁻¹, logrando un producto final similar al de la condición 3 (Tabla 5). Si [EtOH] fue inferior a 34 g L⁻¹, el producto final fue similar al descrito en la condición 6, es decir, una cerveza libre de azúcares (Figura 6A). De forma análoga cuando $0 \leq DY_0 \leq 2$ y [EtOH] < 34 g L⁻¹, con $S_0 = 130$, se obtienen cervezas tipo Light (Figura 6B) que aportan hasta 110

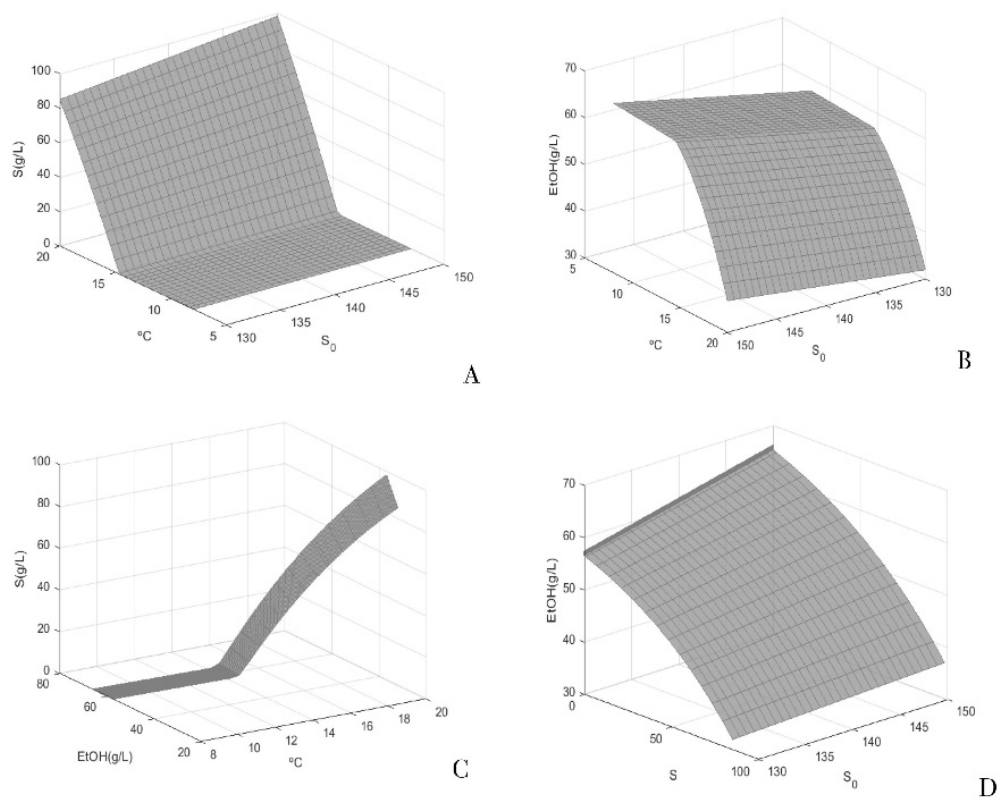


Figura 8. Superficie de respuesta de la reducción de sustrato y evolución de etanol en proceso fermentativo de mosto. **A.** Consumo de S en $8 \leq T \leq 14,5$. **B.** Óptimo de $EtOH$ en $8 \leq T \leq 14,5$. **C.** $56 \leq EtOH \leq 67$ con $S = 0$. **D.** Relación de las variables S y $EtOH$.

calorías, con grados alcohólicos entre 30 a 50 L^{-1} , a diferencia de cervezas convencionales que oscilan entre 50 a 60 $g L^{-1}$ de alcohol.

Los gráficos anteriores proporcionaron una idea del comportamiento cualitativo del sistema al variar ciertas condiciones iniciales, pero no permitieron ver la convergencia del sistema en su estado estacionario. Integrando de $[0, 500h]$ a $T(^{\circ}C)$ y $[S_0]$, el último valor en $t = 500h$ de cada una de las variables de estado para $[EtOH]$ y $[S]$, se aprecia el consumo de azúcares fermentables con la producción de etanol deseada entre 50 a 62 $g L^{-1}$ (Figura 8 B-C). Cuanto mayor es la concentración inicial de azúcares fermentables, mayor será el rendimiento de etanol (Figura 8D).

Conclusiones

La eficiencia del proceso cervecero se traduce en la producción de etanol, que es dependiente de la cantidad de levadura adicionada y concentración de sustrato, factores condicionantes de la

velocidad específica de crecimiento y declaración del cultivo en el proceso discontinuo. La fracción de azúcares mayoritarios fermentables presentes en el mosto, ejercen un efecto dominante sobre la tasa de crecimiento de levaduras y es el sustrato limitante del proceso por ser la fuente de carbono y se asimilan a distintas velocidades. El proceso de fermentación de mostos para la producción de cerveza, permite predecir la evolución de la biomasa y tasa de mortalidad en función del tiempo y la temperatura para condiciones iniciales de sustrato y células activas mediante ecuaciones dinámicas que proporcionan condiciones para la evaluación cinética que se consolidan como parte de un modelo dinámico. El efecto sobre la eficiencia en la producción de alcohol se reduce cuando la temperatura se incrementa. En este trabajo, se han considerado los parámetros dinámicos que describen la dimensión del proceso logrando la reducción de los mismos, proponiendo nuevos valores para las tasas de crecimiento celular,

el consumo de sustrato, la muerte celular, la sedimentación máxima y la producción de etanol, ajustados a datos experimentales en función de la temperatura. Además, se proponen dos nuevas expresiones para las tasas de producción de diacetilo y reducción del diacetilo. Estas nuevas relaciones, permiten explicar el comportamiento de los parámetros en función de la temperatura. La biomasa activa al inicio del proceso y en la fase de latencia, crece de manera exponencial y en todos los casos se presenta la fase de adaptación, que da paso al crecimiento, aceleración y crecimiento de biomasa, situación concomitante con evaluaciones parciales presentadas en otros trabajos. Los perfiles de respuesta planteados permiten la evaluación del comportamiento del sistema en reactores no agitados para un rango amplio de temperatura y tiempos de proceso. La fermentación en sí misma, depende de la evolución de etanol, del acetato de etilo y diacetilo, que en las primeras horas del proceso se degrada gradualmente cuando se alcanza el estado estacionario. La información relacionada con la mejora del rendimiento de la fermentación puede ser potencialmente valiosa para el diseño de procesos. La generación y optimización de modelos se consolidan como valiosas herramientas de investigación por las implicaciones técnicas y económicas que representan. La dinámica planteada es potencial y puede ser analizada considerando la teoría de los sistemas dinámicos.

Agradecimientos

Los autores expresan gratitud a los Departamentos de Química, Matemáticas y Estadística de la Universidad del Tolima, al facilitar las condiciones para el desarrollo de este trabajo. A los evaluadores y colaboradores permanentes de la Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales por las observaciones y recomendaciones durante el proceso de arbitraje.

Referencias

- Aniseh, M.; Seyyed Haddi, R.; Seyyed Mohammad, M.; Rezaei, K.R. 2011. A comparison between sugar consumption and ethanol production in wort by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* *Saccharomyces ludwigii* and *Saccharomyces rouxii* on Brewer's spent grain. *Braz J Microbiol*, 42, 605-615. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3769836/pdf/bjm-42-605.pdf>
- Bokulich, N.A.; Bamforth, C.W. 2013. The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiol Mol Biol Rev*, 77(2), 157-172. <https://doi:10.1128/MMBR.00060-12>
- Boulton, C. 2013. *Encyclopaedia of brewing*. John Wiley y Sons, Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, UK. 714 p. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118598115>.
- Bricio-Barrios, E.E.; Bricio-Barrios, J.A.; Arceo-Díaz, S.; Hernández-Escoto, H.; López-Caamal, F. 2017. Modelado de la fermentación de cerveza de alta graduación mediante modelos cinéticos. *Memorias del Congreso Internacional de Investigación. Academia Revistas Celaya*, 9(6), 747-752. https://www.researchgate.net/publication/321950774_modelado_de_la_fermentacion_de_cerveza_de_alta_graduacion_mediante_modelos_cineticos
- Bricio-Barrios, E.E.; Bricio-Barrios, J.A.; Arceo-Díaz, S.; Hernández-Escoto, H.; López-Caamal, F. 2018. Análisis de las propiedades nutrimentales de la cerveza base de amaranto – malta por medio de modelado matemático. *Revista Alimentos Hoy*, 26(43), 1-14. <https://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/476/382>
- Callejo, J.M.; Tesfaye, W.; González, M. C.; Morata, A. 2019. Craft Beers: Current Situation and Future Trends. *New Advances on Fermentation Processes*. *Licensee IntechOpen*. Pp 1-18. <https://cdn.intechopen.com/pdfs/70255.pdf>
- Carneiro, D.D.; Da Cruz Meleiro, L.A. 2011. Proposta de uma nova estratégia de controle para a fermentação cervejeira. *UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng*, 17(1), 17-28. <https://revistas2.uepg.br/index.php/exatas/article/view/969>
- Carrillo-Ureta, G.; Roberts, P.; Becerra, V. 2001. Genetic algorithms for optimal control of beer fermentation. In: *Proceedings of the 2001 IEEE International Symposium on Intelligent Control*. <https://10.1109/ISIC.2001.971541>
- Carrillo-Ureta, G.E. 2003. Optimal control of a fermentation process. *European Control Conference (ECC)*, 1947-1952. <https://10.23919/ECC.2003.7085251>
- Corrieu, G.; Trelea, I.C.; Perret, B. 2000. On-line estimation and prediction of density and ethanol evolution in the brewery. *Mater Brewers Association of the Americas*, 37(2), 173-181. <https://hal-agroparistech.archives-ouvertes.fr/hal-01537190/document>
- Cortacero-Ramírez, S.; De Castro, M.H.B.; Segura-Carretero, A.; Cruces-Blanco, C.; Fernández-Gutierrez, A. 2003. Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods. *TrAC-Trend Anal Chem*, 22(7), 440-455. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00704-0](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00704-0)

- de Andrés-Toro, B.; Girón-Sie, J.M.; López-Orozco, J. A.; Fernández-Conde, C.; Peinado, J.M.; García-Ochoa, F. 1998. A kinetic model for beer production under industrial operational conditions. *Math Comput Simulat*, 48(1), 65-74. [https://doi.org/10.1016/S0378-4754\(98\)00147-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4754(98)00147-5)
- de Andrés-Toro, B.; Girón-Sierra, J.; Fernández-Blanco, P.; López-Orozco, J.; Besada-Portas, E. 2004. Multiobjective optimization and multivariable control of the beer fermentation process with the use of evolutionary algorithms. *J Zhejiang Univ Sci*, 5, 378-389. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02851182>
- Fox, G. P., Staunton, M., Agnew, E., D'Arcy, B. 2019. Effect of varying starch properties and mashing conditions on wort sugar profiles. *Journal of the Institute of Brewing*. <https://doi.org/10.1002/jib.585>.
- García, A.; García, L.; Díaz, M. 1994. Modelling of diacetyl production during beer fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 100(3), 179-183. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1994.tb00819.x>
- Garduño-García, A.; Martínez-Romero, S.L.C.L.; Ruiz-García, A. 2014. Simulación del proceso de fermentación de cerveza artesanal. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 15(2), 221-231. [https://doi.org/10.1016/S1405-7743\(14\)72212-7](https://doi.org/10.1016/S1405-7743(14)72212-7)
- Krogerus, K.; Gibson, B. 2013. Influence of valine and other amino acids on total diacetyl and 2,3-pentanedione levels during fermentation of brewer's wort. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(15), 6919-6930. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23677441/>
- Krogerus, K.; Gibson, B.; Hytönen, E. 2015. An Improved Model for Prediction of Wort Fermentation Progress and Total Diacetyl Profile. *J Am Soc Brew Chem*, 73(1), 90-99. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2015-0106-01>
- Langenaeken, N. A., De Schepper, C. F., De Schutter, D. P., Courtin, C. M. 2020. Carbohydrate content and structure during malting and brewing: a mass balance study. *Journal of the Institute of Brewing*, 126(3), 253-262. <https://doi.org/10.1002/jib.619>
- Li, H.; Liu, F.; He, X.; Cui, Y.; Hao, J. 2015. A study on kinetics of beer ageing and development of methods for predicting the time to defection of flavor changes in beer. *J Inst Brew*, 121(1), 38-43. <https://doi.org/10.1002/jib.194>
- Moutsoglou, M. E., Dearden, A. C. 2020. Effect of the respiro-fermentative balance during yeast propagation on fermentation and wort attenuation. *Journal of the Institute of Brewing*, 126(3), 289-297. <https://doi.org/10.1002/jib.621>
- Olaniran, A., Maharaj, Y., Pillay, B. 2011. Effects of fermentation temperature on the composition of beer volatile compounds, organoleptic quality and spent yeast density. *Electron J Biotechnol*, 14, 2, 1-11. <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/657>
- Oonsivilai, R., Oonzivilai, A. 2010. Temperature profile in fermenting process using differential Evolution. *EE'10: Proceedings of the 5th IASME/WSEAS international conference on Energy & environment*, 315-319. <https://dl.acm.org/doi/10.5555/1807906.1807966>
- Pires, E.; Brányik, T. 2015. *Biochemistry of beer fermentation*. Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht, London. 80 p. <https://www.springer.com/gp/book/9783319151885>
- Rodman, A.D.; Gerogiorgis, D.I. 2016. Dynamic Simulation and Visualisation of Fermentation: Effect of Process Conditions on Beer Quality. *IFAC-Papers OnLine*, 49(7), 615-620. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2016.07.236>
- Salamanca, G., Osorio, T.M., Arango, C. 2015. Cervezas artesanales colombianas: Propiedades Físicoquímicas y estándares de cromaticidad. VII Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos, INNOVA, X Congreso Iberoamericano de Ingeniería de alimentos, CIBIA, LATU en Montevideo, Uruguay. https://catalogo.latu.org.uy/opac_css/index.php?lvl=notice_display&id=31144
- Stewart, G.G. 2017. The Production of Secondary Metabolites with Flavour Potential during Brewing and Distilling Wort Fermentations. *Fermentation*, 3(4), 1-27. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040063>
- Terán, S. 2017. *Evaluación de la utilización de amaranto (Amaranthus spp.) como adjunto y dos cepas de levadura (Saccharomyces cerevisiae) en la fabricación de cerveza*. Tesis de pregrado. Escuela Politécnica Nacional. Quito, Ecuador. <https://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/17617>
- Trelea, I.C.; Titica, M.; Landaus, S.; Latrille, E.; Corrieu, G.; Cheruy, A. 2001. Predictive modelling of brewing fermentation: From knowledge-based to black-box models. *Mathematics and Computers in Simulation*, 56(4-5), 405-424. [https://doi.org/10.1016/S0378-4754\(01\)00311-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4754(01)00311-1)
- Vidgren, V.; Londesborough, J. 2011. 125th Anniversary review: Yeast flocculation and sedimentation in brewing. *J Inst Brew*, 117(4), 475-487. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00495.x>
- Xiao, J.; Zhou, Z.K.; Zhang, G.X. 2004. Ant colony system algorithm for the optimization of beer fermentation control. *Journal of Zhejiang University*, 5, 1597-1603. <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.2004.1597>