

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Fermentación de mosto cervecero mediante un sistema semi-continuo con levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas en una matriz mixta de nanofibras de celulosa de tagua y alginato de sodio.**

**Disertación previa a la obtención de título de Licenciada en Ciencias  
Biológicas**

**YEANINA ESTEFANIA CRUZ VELASCO**

**Quito, 2017**

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Srta. Yeanina Estefania Cruz Velasco ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Ph.D. Javier Carvajal Barriga

Director de la Disertación

Quito, 1 de Agosto del 2017

*“Tu trabajo va a llenar gran parte de tu vida, la única manera de estar realmente satisfecho es hacer lo que creas que es un gran trabajo y la única manera de hacerlo es amando lo que haces.*

*Si no lo has encontrado aún, sigue buscando. Como con todo lo que tiene que ver con el corazón, sabrás cuando lo hayas encontrado”*

**-Steve Jobs-**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco de todo corazón a mis madres Elizabeth Velasco y Luz María Calvopiña, quienes son el pilar fundamental de mi formación y con su amor, comprensión y apoyo incondicional han estado junto a mí en todo momento. Son la razón de ser.

Al Dr. Javier Carvajal por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por su ayuda, apoyo, paciencia y consejos brindados en el transcurso de esta investigación, influyendo en mi formación académica. Al Lcdo. Bernardo Bastidas, por ser un apoyo infalible en el laboratorio y por convertirse en un buen amigo y a la M.Sc Patricia Portero por su guía y cooperación en esta investigación.

A Juan Fernando, Juan David, Rosi, Nancy, Héctor, Julián, Daniela y a toda mi familia, quienes con su amor, gracia, tolerancia y sus hermosas sonrisas en todo momento me apoyaron, brindaron su ayuda y entusiasmo para llevar a cabo esta investigación.

A Miguel Angel por ser más que un amigo, un compañero de vida infalible. Gracias por tu apoyo, tiempo, paciencia, amor y por encontrar siempre una razón para sonreír.

A Dracko Alexander, quien sin entender nada que lo que pasaba, compartió junto a mi cada minuto de angustias y alegrías, y que con su ronroneo me daba aliento para seguir.

A Fernanda, Mariela, Gonzalo, Fernando, Leonardo, Esteban y a todos mis amigos que durante nuestra formación académica hemos creado una aventura inolvidable.

A los chicos del CNIB, JFLN, Melanie, Pamela, Daniel, Juan, Luis L., gracias por hacer del laboratorio un lugar lleno de alegrías, historias inmemorables y apoyo mutuo.

**LISTA ABREVIATURAS**

<b>A.A</b>	Alfa- ácidos
<b>AA</b>	Atenuación aparente
<b>APV</b>	Alcohol por volumen
<b>BJCP</b>	Beer Judge Certification Program
<b>CLQCA</b>	Colección de Levaduras Quito Católica
<b>DF</b>	Densidad Final
<b>DI</b>	Densidad Inicial
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Precisión
<b>P/V</b>	Peso/volumen
<b>SFSC</b>	Sistema de Fermentación Semi-Continua
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias

## TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN .....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN .....	3
3.1. Proceso de elaboración de cerveza .....	3
3.1.1. Molienda de cereales .....	4
3.1.2. Maceración .....	4
3.1.3. Filtrado y lavado del grano .....	5
3.1.4. Ebullición .....	5
3.1.5. Whirlpool .....	6
3.1.6. Enfriado .....	6
3.1.7. Inoculación de levadura .....	6
3.1.8. Fermentación .....	6
3.1.8.1. Tipos de cerveza .....	7
3.1.9. Maduración .....	7
3.1.10. Envasado y carbonatación .....	8
3.2. Métodos de optimización de procesos de producción de cerveza .....	8
3.2.1. Inmovilización celular .....	9
4. OBJETIVOS .....	12

5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
5.1. Elaboración de mosto cervecero .....	13
5.1.1. Curva de cocción .....	13
5.2. Inmovilización de levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en matriz mixta .....	14
5.2.1. Sistema para inmovilización de levaduras .....	15
5.3. Fermentación del mosto cervecero en sistema semi-continuo y en batch .....	15
5.3.1. SFSC con levaduras inmovilizadas en matriz mixta .....	16
5.3.2. Fermentación en sistema batch con levaduras no inmovilizadas .....	17
5.3.3. Diseño sistema de fermentación semi-continuo .....	18
5.3.4. Sistema de fermentación en batch con levaduras no inmovilizadas .....	18
5.4. Cálculo de atenuación aparente .....	19
5.5. Maduración del producto obtenido en los sistemas de fermentación .....	19
5.6. Envasado y carbonatación de cerveza .....	20
5.7. Determinación de perfil de azúcares y productos de fermentación .....	20
5.8. Análisis estadístico .....	21
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	22
6.1 Elaboración de mosto cervecero .....	22
6.2 Inmovilización de levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	22
6.3 SFSC con inmovilización de células en matriz mixta .....	24

6.4 Sistema de fermentación en batch .....	26
6.5 Atenuación aparente .....	27
6.6 Maduración de cerveza .....	27
6.7 Envasado y carbonatación de cerveza .....	29
6.8 Determinación de perfil de azúcares y productos de fermentación .....	30
7. CONCLUSIONES .....	32
8. RECOMENDACIONES .....	34
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35
10. FIGURAS .....	40
11. TABLAS .....	62
12. ANEXOS .....	68

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Diagrama de pasos para la producción de cerveza .....	44
<b>Figura 2.</b>	Medición de densidad inicial de mosto cervecero para fermentación en sistema batch y SFSC .....	45
<b>Figura 3.</b>	Curva de triple decocción para elaboración de mosto cervecero .....	45
<b>Figura 4.</b>	Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> INT-086. A, levaduras floculadas; B, levaduras no floculadas .....	46
<b>Figura 5.</b>	Esferificador ® .....	46
<b>Figura 6.</b>	Columna del SFSC .....	47
<b>Figura 7.</b>	Sistema de fermentación semi-continua .....	48
<b>Figura 8.</b>	Sistema de fermentación en batch con levaduras no inmovilizadas .....	49
<b>Figura 9.</b>	Botella de boro silicato, donde se almacenaron las muestras extraídas del SFSC .....	50
<b>Figura 10.</b>	Mosto cervecero .....	50
<b>Figura 11.</b>	Matriz de nanocelulosa fibrilada de tagua y alginato de sodio .....	51
<b>Figura 12.</b>	Perlas poliméricas con levaduras inmovilizadas .....	51
<b>Figura 13.</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (INT- 086 CLQCA). A, <i>S. cerevisiae</i> no inmovilizada. B, <i>S. cerevisiae</i> inmovilizada en matriz de nanocelulosa con alginato de sodio. C, <i>S. cerevisiae</i> inmovilizada después de fermentar .....	52
<b>Figura 14.</b>	Medición de DF con hidrómetro .....	53
<b>Figura 15.</b>	Cromatograma de muestra del SFSC. Día de recolecta: 04/04/17 .....	54
<b>Figura 16.</b>	Cromatograma de muestra del SFSC. Día de recolecta: 05/04/17 .....	54

<b>Figura 17.</b>	Sistemas de fermentación en batch. A. día 1; B. 3 días; C, 5 días; D, 7 días; E, 9 días; F, 11 días; G, 13 días; H, 15 días .....	55
<b>Figura 18.</b>	SFSC con levaduras inmovilizadas en matriz mixta de nanofibras de celulosa y alginato de sodio .....	56
<b>Figura 19.</b>	Cromatograma de muestra del Sistema de fermentación batch. Día de recolecta: 13/05/17. Décimo sexto día tras su fermentación .....	57
<b>Figura 20.</b>	Sólidos y levaduras precipitadas en el embudo de separación del sistema semi-continuo .....	57
<b>Figura 21.</b>	Embudo de separación del SFSC .....	58
<b>Figura 22.</b>	Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> lisadas. Muestras tomadas del precipitado del embudo de separación del sistema de fermentación semi-continuo.....	58
<b>Figura 23.</b>	Cerveza. A, cerveza producida en sistema semi-continuo; B, cerveza producida en batch .....	59
<b>Figura 24.</b>	Cromatograma de la concentración de azúcares para el mosto cervecero ....	59
<b>Figura 25.</b>	Cromatograma de la concentración de azúcares para el mosto cervecero 2 ....	60
<b>Figura 26.</b>	Cromatograma de la concentración de azúcares para el mosto cervecero 3....	60
<b>Figura 27.</b>	Porcentaje de composición total de azúcares presentes en los mostos cerveceros elaborados .....	61
<b>Figura 28.</b>	Porcentaje de etanol y glicerol obtenido en sistemas SFSC y batch .....	61

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Registro diario de alimentación con mosto cervecero, extracción de cerveza y medición del % APV mediante hidrometría en el SFSC .....	62
<b>Tabla2.</b>	Verificación de consumo de azúcares fermentables en SFSC a las 24 horas.	65
<b>Tabla 3.</b>	Fermentación batch vs. SFSC .....	66
<b>Tabla 4.</b>	Porcentaje de APV por hidrometría en sistema batch .....	67
<b>Tabla 5.</b>	Promedio de % etanol .....	67
<b>Tabla 6.</b>	Análisis estadístico. Prueba de Wilcoxon para comparar el porcentaje de etanol obtenido por HPLC vs. Hidrometría, en sistemas batch y SFSC .....	67

**LISTA DE ANEXOS**

<b>Anexo 1.</b>	Consumo global de cerveza por regiones en el 2015 .....	68
<b>Anexo 2.</b>	Tipos de biorreactores con células inmovilizadas .....	68
<b>Anexo 3.</b>	Técnicas de inmovilización celular .....	69

## 1. RESUMEN

La cerveza es un caldo de cereales fermentado; en esta las levaduras son las responsables de fermentar el mosto cervecero convirtiendo el azúcar en etanol y dióxido de carbono. La producción de la cerveza industrial y artesanal se ha incrementado, generando un desafío entre las compañías por optimizar los procesos de producción sin afectar la calidad del producto. Los procesos fundamentales en la producción de la cerveza son la fermentación y la maduración los cuales requieren de mucho tiempo para llevarse a cabo, esto ha generado un gran interés por la aplicación de la tecnología de inmovilización celular, la cual permite optimizar la producción de cerveza debido a que el área superficial aumenta incrementando la velocidad de reacción. En el presente estudio se implementa la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* en una matriz de nanofibras de celulosa y alginato de sodio para la producción de cerveza en un sistema de fermentación semi-continuo; obteniendo como resultado la reducción de tiempo en la producción de cerveza al fermentarse y madurarse en el mismo sistema, reduciendo a tres días el proceso que de otra manera toma alrededor un mes.

Palabras clave: cerveza, fermentación, inmovilización celular, matriz, nanofibras de celulosa.

## 2. ABSTRACT

Beer can be defined as fermented malt wort; by yeast which are microorganisms that are responsible for the fermentation process to occur by metabolizing fermentable sugar into ethanol and CO<sub>2</sub>. Nowadays industrial and craft beer production have increased, creating a dispute between beer companies for optimizing production processes without affecting product quality. The most important processes in beer production are fermentation and maturation which required a lot of time, this issue has generated an increased interest in the development of immobilized yeast cell technology, which allows the optimization of beer production because surface area and reaction rate are increased. The present study focuses on the immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* in nanofibrillated cellulose and sodium alginate matrix for beer fermentation in a fed-batch system, achieving time reduction in beer making since fermentation and maturation occur in the same system, reducing the traditional process that usually lasts a month to just 72 hours.

Key words: beer, cell immobilization, fermentation, matrix, nanofibrillated cellulose.

### **3. INTRODUCCIÓN**

La cerveza ha formado parte de la dieta de los humanos desde el año 5000 a.C. (de Gaetano et al., 2016), ganándose el puesto de la bebida alcohólica más consumida en el mundo con un consumo global de 1.83 billones de hectolitros en el año 2015 (Olajire, 2012; KIRIN, 2015) (Anexo 1). Es elaborada a base de agua, malta, lúpulo y levadura y consiste en un caldo fermentado a partir de la cocción de cereales; contiene minerales como: calcio, hierro, zinc, potasio, fósforo, magnesio, sodio, manganeso, cobre, selenio, fluoruro y silicio (de Gaetano et al., 2016). Además de vitaminas del grupo B (niacina, riboflavina, piridoxina, folatos y vitamina B12) y compuestos vegetales secundarios como los polifenoles (Salud, Laura, Morona, Humberto y Brieva, 2016).

La producción de cerveza ha evolucionado de elaborarse caseramente a producirse a gran escala (Briggs, Boulton, Brookes, y Steven, 2004). Esto ha provocado que en el mercado global, las empresas que se dedican a su producción alcancen tamaños colosales (Farina et al., 2017). Se realizó un estudio de mercado en el que se demostró que la cerveza artesanal es escogida por sus consumidores debido a su gran variedad de sabores como: malta de cebada, castaña y hasta cervezas con sabor a miel; distinguiendo una mayor calidad que las cervezas comerciales (Aquilani, Laureti, Poconi y Secondi, 2015). Por ser una bebida arraigada a la historia de la humanidad su consumo sigue incrementándose al igual que su producción.

#### **3.1 PROCESO DE ELABORACIÓN DE CERVEZA**

En el proceso de producción de cerveza se requiere de mucha energía por parte de los maestros cerveceros. A continuación se describen los pasos a seguir para la producción de cerveza (Fig.1).

**3.1.1 MOLIENDA DE CEREALES:** En esta etapa se rompe la malta manteniendo la integridad de la cáscara para lograr un lecho filtrante que favorezca el lavado de grano y la separación del mosto. En la molienda se puede distinguir tres tipos de fracciones: cáscaras, sémolas y harinas, cuyo fin es aumentar las superficies de contacto de las enzimas para que los componentes de la malta sean más fáciles de solubilizar durante la maceración. Finalmente, la calidad de la molienda tiene un impacto sobre la maceración y separación del mosto, lo que conlleva a deficiencias en el rendimiento y calidad de la cerveza resultante (Briggs et al., 2004; Santucci, Bras, Belgacem, Curvelo y Pimenta, 2016).

**3.1.2 MACERACIÓN:** En cervecería el agua es un componente vital en los procesos de maceración, dilución de la cerveza, limpieza de la planta y otros. El agua, también llamada licor de braseo, presenta diferentes características de calidad dependiendo del proceso al que se emplee. Durante el proceso de maceración las características finales de la cerveza son definidas de acuerdo a la metodología empleada (Briggs et al., 2004; Montanari, Floridi, Marconi, Tironzelli y Fantozzi, 2005).

En el proceso de maceración interviene el licor de braseo y la malta previamente molida, el objetivo principal es hidrolizar el almidón de malta en glucosa, maltosa, y maltotriosa (azúcares fermentables), y dextrina (azúcares no fermentables); los glucanos a oligosacáridos; y las proteínas a péptidos y aminoácidos. La solubilización de carbohidratos y proteínas ocurre gracias a un escalado de temperaturas que activan a las enzimas contenidas en la malta. Como resultado se obtiene un licor dulce del que su composición está sujeta a diferentes curvas de cocimiento empleadas ( Koljonen, Hämäläinen, Sjöholm y Pietilä, 1995; Montanari et al., 2005; Jurić, Ćorić, Odak, Herceg y Tišma, 2015). Este proceso es fundamental ya que al variar las temperaturas de cocción permite obtener distintos tipos de cerveza (Kryl, Gregor y Los, 2012).

Existen dos técnicas para realizar la maceración: por infusión y por decocción. Cuando se incrementa gradualmente la temperatura del macerado en un solo contenedor, la maceración se ejecuta por infusión. Mientras que en la maceración por decocción, una porción del macerado es separado de la mezcla, calentado hasta llegar al punto de ebullición y reincorporado al recipiente principal; este proceso se lo puede realizar de dos a tres veces denominándose doble o triple decocción. El proceso tarda alrededor de dos horas, una vez concluido se prosigue a filtrar el macerado y la cama de granos restante es lavada con agua para recuperar el extracto residual (Montanari et al., 2005; Worrell, 2008; Olajire, 2012; Jurić et al., 2015).

**3.1.3 FILTRADO Y LAVADO DEL GRANO:** en estas etapas ocurre la separación del licor dulce de los sólidos provenientes del grano gastado, donde las cáscaras actúan como filtro durante este procedimiento (Preedy, 2009). En el inicio del filtrado, se extrae el primer mosto, el cual contiene un extracto con una concentración entre 16-20% de azúcares. Posteriormente, el grano gastado es lavado varias veces con agua caliente (concentración de extracto: 0,5-1%). La temperatura (75 - 80 °C) es un factor importante durante este procedimiento, puesto que, su aumento reduce la viscosidad y se acelera el lavado. No obstante, temperaturas sobre los 80 °C destruyen las amilasas provocando que el almidón no solubilizado no se sacarifique (Briggs et al., 2004; Preedy, 2009).

**3.1.4 EBULLICIÓN:** en este procedimiento el licor dulce junto con los lúpulos son llevados a punto de ebullición (por un tiempo de una a dos horas), cuyo objetivo es inactivar las enzimas, concentrar, esterilizar y saborizar el mosto. En este último aspecto, los alfa ácidos (A.A) del lúpulo (humulona, cohumulona, adhumulona, etc.) son responsables del amargor, aroma y confiere las propiedades antioxidantes, preservantes y antimicrobianas de la cerveza. Además, en este proceso disminuye el pH (de 0.1 a 5 unidades de pH), se evaporan componentes no deseados y se destruyen las proteínas ( Koljonen et al., 1995; Virkajärvi, 2001; Briggs et al., 2004; Olajire, 2012). Al final de la ebullición el licor dulce pasa a llamarse mosto cervecero.

**3.1.5 WHIRLPOOL:** Cuando la ebullición concluye, se remueve el mosto de forma circular hasta formar un remolino denominado whirlpool, el cual permite la precipitación de sólidos (principalmente proteínas) para clarificar el mosto cervecero. Esta etapa también puede llevarse a cabo mediante sedimentación, filtración o centrifugación (Willaert, 2012).

**3.1.6 ENFRIADO:** A continuación el mosto cervecero es enfriado, durante este proceso ocurre una segunda separación de sólidos que consisten en su mayoría de proteínas, polifenoles y algunos lípidos. El objetivo de enfriar el mosto cervecero es alcanzar una temperatura adecuada para ser inoculado con la levadura en el fermentador; airearlo u oxigenarlo sin riesgo de deterioro oxidativo y, de esta manera, proveer oxígeno a las levaduras en la etapas iniciales de la fermentación ( Virkajärvi, 2001; Briggs et al., 2004; Olajire, 2012).

**3.1.7 INOCULACIÓN DE LEVADURA:** *Saccharomyces cerevisiae* es la especie de levadura más utilizada tanto a nivel industrial como artesanal. Esta levadura presenta varias tipos de cepas, las cuales son utilizadas en los diferentes estilos de cerveza (Kobi, Zugmeyer, Potier y Jaquet-Gutfreund, 2004). En este proceso los azúcares son la fuente principal de compuestos de carbono para las levaduras, las cuales metabolizan los azúcares fermentables disueltos en el mosto cervecero, obteniendo como productos finales: alcohol etílico (etanol), y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Briggs et al., 2004; Olajire, 2012), como se muestra en la siguiente ecuación (Bastidas, 2013):



**3.1.8 FERMENTACIÓN:** Tradicionalmente la fermentación se lleva a cabo en sistemas batch, que consiste de una fermentación lenta con levadura libremente suspendida, tomando alrededor de tres a cuatro semanas (Almonacid, Nájera, Young, Simpson y Acevedo, 2012). La fermentación se divide en dos fases: la principal, la cual toma de seis a diez días; y la secundaria, la cual toma de una a dos semanas. Ambas fermentaciones ocurren

en el mismo fermentador (Virkaajärvi, 2001; Briggs et al., 2004). Durante este proceso, la levadura va a presentar floculación como consecuencia del agotamiento de los azúcares fermentables al término de la fermentación primaria. Esta característica intrínseca de las levaduras ocurre cuando estas se adhieren a otras formando agregados por las interacciones entre las proteínas de la superficie de la célula y los receptores de carbohidratos ( Miki, Poon y James, 1982; Briggs et al., 2004). Sin embargo, una floculación temprana puede resultar en una cerveza con altos niveles de levaduras residuales, causando sabores no deseados. Además, puede detener la fermentación lo que reduce el rendimiento de glucosa a etanol (Briggs et al., 2004).

**3.1.8.1 TIPOS DE CERVEZA:** Existen dos grandes grupos de cerveza, los cuales difieren por su temperatura y levadura utilizadas en la fermentación, clasificándolas en dos grandes familias: Ale y Lager. Se denominan cervezas Lager cuando el mosto cervecero es fermentado a temperaturas bajas de 6 a 14°C (Vidgren, Multanen, Ruohonen y Londesborough, 2010), requiriendo de un mayor tiempo de fermentación (Walsh y Martin, 1977; Bokulich y Bamforth, 2013). Levaduras como *Saccharomyces uvarum* y *Saccharomyces pastorianus* son tradicionalmente utilizadas en Lager (Harborne, 1971; Briggs et al., 2004). En contraste, las cervezas Ale se inoculan con levaduras que fermentan a temperaturas altas de 16 a 24°C (Virkaajärvi, 2001; Briggs et al., 2004; LÓPEZ PLUMED, 2013) y con tiempos de fermentación menores a las Lager. Este tipo de cerveza emplea en su mayoría cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Tornai-Lehoczki y Dlauchy, 2000; Kobi et al., 2004).

**3.1.9 MADURACIÓN:** En este procedimiento, generalmente ocurre un trasvase de la cerveza del fermentador al madurador. En la maduración la cerveza es sometida a refrigeración (-1° C a 8 °C), con el fin de precipitar los sólidos y reducir las dicetonas vecinales a acetoina y a 2,3-pentanodiol los cuales producen sabores indeseables, puede llevar de tres semanas a tres meses (Brányik, Vicente, Cruz y Teixeira, 2004; Briggs et al., 2004; Pires, Teixeira, Brányik, Brandão y Vicente, 2015) y las sustancias volátiles como los aldehídos y los compuestos de azufre se eliminan mediante burbujas de CO<sub>2</sub>. Finalmente, la sedimentación de la levadura aclara el brebaje (Preedy, 2009).

**3.1.10 ENVASADO Y CARBONATACIÓN:** la cerveza es envasada mediante diferentes métodos de acuerdo al recipiente que se emplee; estos pueden ser botellas, latas, barriles o kegs. Las botellas, tanto retornables como no retornables, son las más utilizadas. El empaquetamiento debe realizarse en un ambiente estéril para conservar la calidad del producto y se debe asegurar que la cerveza no contenga microorganismos perjudiciales. Una vez rellena la botella, esta debe cerrar de inmediato con una tapa corona, previamente sanitizada, para evitar que se contamine (Virkajärvi, 2001; Briggs et al., 2004; Preedy, 2009).

La competencia entre compañías se ha intensificado obligándolas a buscar nuevos métodos para optimizar su rendimiento mediante la aplicación de nuevas tecnologías que permitan lograr un incremento en el margen de ganancias reduciendo el tiempo de producción sin afectar la calidad del producto (Virkajärvi, 2001; Schmidt, 2005; Vrellas y Tsiotras, 2015; Gómez-Corona, Escalona-Buendía, García, Chollet y Valentin, 2016). La fermentación es uno de los procesos que mayor tiempo requiere, por este motivo las investigaciones se han centrado en reducir el tiempo de este proceso.

### **3.2 MÉTODOS DE OPTIMIZACIÓN DE PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE CERVEZA.**

La fermentación y la maduración son los procesos que requieren mayor tiempo en la producción de cerveza. A escala industrial, la producción puede ser operada por tres métodos: 1. fermentación en batch, 2. fed-batch (semi-continuo) y, 3. fermentación continua (Pilkington, Margaritis, Mensour y Russell, 1998; Yüzgeç, Türker, y Hocalar, 2009). Tradicionalmente la producción de cerveza tiene una fermentación lenta en batch, en el que el biorreactor es rellenado con el mosto cervecero y todo el volumen se fermenta gradualmente; posteriormente es retirado. Este método demanda de un mayor tiempo de producción, necesidad de monitoreo y control del batch (Verbelen, De Schutter, Delvaux, Verstrepen y Delvaux, 2006; Almonacid et al., 2012; T. Li, Chen, Chen, Wu y Chen, 2014).

En contraste, el sistema continuo tiene un flujo constante de mosto cervecero dentro del biorreactor y un correspondiente flujo ininterrumpido del producto fuera del sistema (T. Li et al., 2014; Verbelen et al., 2006). Por otro lado, en el sistema semi-continuo (fed-batch), la tasa de alimentación del mosto cervecero varía durante el proceso y el producto obtenido es removido al final. Estos sistemas son más económicos comparados con el proceso en batch (Ghose y Tyagi, 1979; O'Brien, Roth, y McAloon, 2000; Kwon, Yoo, Lee, Chang y Chang, 2001; Verbelen et al., 2006).

### **3.2.1 INMOVILIZACIÓN CELULAR**

La industria cervecera en su anhelo por optimizar los procesos de producción ha estado interesada en la tecnología de inmovilización de células (levaduras) desde que emergió durante el siglo pasado (Emerald, 2016). Generalmente, esa técnica se combina con sistemas semi-continuo y continuo, lo que permite la reutilización de levaduras (Pilkington et al., 1998; Virkajärvi, 2001; Brányik et al., 2004; Verbelen et al., 2006; T. Li et al., 2014).

Un factor esencial en las técnicas de inmovilización de levaduras es conocer el diseño del biorreactor, debido a que está relacionado con el método de inmovilización que se va a emplear. Existen cinco tipos de reactores para sistemas de fermentación en la industria, A. Reactor de lecho relleno, B. Reactor de lecho fluidizado, C. Reactor de gas de elevación, D. Reactor de columna de burbujas, y E. Reactor de células recicladas de membranas (Virkajärvi, 2001; Verbelen et al., 2006) (Anexo 2). Por otro lado, existen cuatro técnicas de inmovilización: 1. Atrapamiento dentro de una matriz porosa, 2. Adhesión a una superficie, 3. Coagregación, y 4. Contención detrás de una barrera (Karel, Libicki y Robertson, 1985; Verbelen et al., 2006) (Anexo 3).

Entre los requisitos que deben cumplir los materiales que portan las células inmovilizadas están ser estables, reutilizables, no tóxicos y abarcar altas concentraciones de células. Bajo estos criterios, se han propuesto diferentes materiales como: compuestos

inorgánicos y orgánicos, proteínas, polisacáridos hidrocoloidales, y productos y desechos agroindustriales celulósicos (Djordjević et al., 2015; Harborne, 1971; Karel et al., 1985; Nakagaito & Yano, 2005; Verbelen et al., 2006).

La inmovilización de células en soportes porosos ha sido empleada en la industria por su alta área superficial específica debido a su estructura compleja, donde las células se localizan principalmente en los poros. Esta técnica es la más utilizada por ser sencilla y por la gran variedad de polímeros aplicables como matrices, entre los polímeros más populares se encuentran: carragenina, agar y geles de alginato (Karel et al., 1985; Klein y Ziehr, 1990).

En los últimos años, la atención se ha centrado en utilizar la celulosa como matriz de inmovilización celular. A partir de este compuesto, se obtienen nanofibras de celulosa, las cuales confieren a este biopolímero una alta resistencia mecánica, capacidad para modificación química, permeabilidad y durabilidad. Además, al provenir de biomasa vegetal es biodegradable y no tóxico (S. T Yang, Zhu, Li y Hong, 1994; S.T Yang, Huang y Hong, 1995; Hsu, Chu, Argin-Soysal, Hahm y Lo, 2004; Kilonzo, Margaritis, y Bergougnou, 2009; Santucci et al., 2016). Estas características convierten a este biopolímero en una alternativa prometedora a los materiales porosos convencionales (alginato, carragenina, colágeno, etc.) (A. Li y Wang, 2005; Canbolat et al., 2013; Anirudhan, Deepa y Binusreejayan, 2015).

La aplicación de la inmovilización celular para la optimización de procesos de fermentación y maduración en los sistemas: semi-continuo y continuo, permite obtener el producto final en un tiempo de tres a cinco días. Esto ocurre gracias a que el área superficial de la levadura aumenta al estar en mayor contacto con el medio (mosto cervecero), incrementando la velocidad de reacción (Anirudhan et al., 2015; Pires et al., 2015).

Sin embargo, los estudios sobre fermentación con inmovilización celular solo se han reportado para cervezas tipo Lager, mientras que, existe poca información respecto a cervezas tipo Ale. Este hecho ocurre de igual manera para matrices de inmovilización a partir de nanofibras de celulosa para la industria cervecera.

Por este motivo, en la presente investigación se prueba una matriz de inmovilización mixta de alginato de sodio y nanofibras de celulosa parenquimática proveniente de endospermos de tagua (*Phytelephas aequatorialis*) para levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* en un sistema de fermentación semi-continuo obteniendo como resultado la reducción de tiempo en la producción de cerveza tanto en fermentación como en maduración.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 GENERAL:

Fermentar mosto cervecero mediante un sistema semi-continuo con levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas en una matriz mixta de nanofibras de celulosa de tagua y alginato de sodio.

### 4.2 ESPECÍFICOS:

Estandarizar el proceso de maceración por triple decocción para la obtención de mosto cervecero.

Estandarizar la técnica de inmovilización de levaduras en una matriz mixta de nanofibras de celulosa de tagua y alginato de sodio

Diseñar un sistema semi-continuo de fermentación en columna de lecho relleno utilizando levaduras inmovilizadas.

Evaluar la eficiencia de fermentación del sistema diseñado versus un sistema de fermentación tradicional.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 ELABORACIÓN DE MOSTO CERVECERO.

– Se elaboró un mosto cervecero con una densidad inicial (DI) de: 1.050 (Fig. 2). Los ingredientes fueron: 21 L de agua destilada, 3.5 Kg de malta Pilsen (Patagonia Malt), y 15 g de lúpulo Northern brewer (6 % A.A). El mosto cervecero se elaboró mediante el método de triple decocción (MacGregor, Bazin, Macri y Babb, 1999; Montanari et al., 2005; Jurić et al., 2015) (Fig. 1).

#### 5.1.1 CURVA DE COCCIÓN:

– Los 3.5 kg de malta molida fueron mezclados con 14 litros de agua destilada a 35 °C.

– La primera decocción se llevó a cabo retirando 5 litros del macerado principal. Este volumen fue llevado a ebullición en un recipiente distinto durante 10 min, al cabo de los cuales, fueron reincorporados al recipiente de maceración principal, con lo que se consigue incrementar la temperatura a 50°C. Se mantuvo la mezcla a esta temperatura durante 40 minutos. Se repitió el mismo procedimiento para la segunda y tercera decocción. Incrementando la temperatura a 62°C por 40 minutos y con la tercera decocción a 72° C por el espacio de 20 min.

– Finalmente, se elevó la temperatura del macerado a 76°C con fuego alto, se mantuvo a esta temperatura durante cinco minutos (Fig. 3).

## 5.2 INMOVILIZACIÓN DE LEVADURAS *Saccharomyces cerevisiae* EN MATRIZ MIXTA.

- Se elaboró un starter de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (CLQCA INT - 086). Se adicionó esta cepa a un medio de cultivo con 3% de sacarosa p/v, 1% de extracto de levadura p/v (DIFCO BACTO TM) y 1% de peptona p/v (DIFCO BACTO TM) a 30 °C por tres días.
- Se centrifugó a 5000 rpm por tres minutos en una centrífuga (DYNAC 297 C) y se trasladó el pellet a medio con 5% de sacarosa p/v (Bastidas, 2013).
- La observación microscópica se realizó para verificar que no exista floculación (Fig. 4).
- Se realizó el conteo de UFC (unidades formadoras de colonias) en una cámara de Neubauer, y se aplicó la siguiente fórmula:

$$UFC = \frac{\left(\# \text{ de células contadas} / 5\right)}{16} \times 4 \times 10^6 \times FD$$

En donde: #, número; FD, factor de dilución (Arredondo, 2007).

- Se calculó el volumen de starter de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (CLQCA INT - 086) que debe agregarse al hidrogel mixto de nanofibras de celulosa al 2% y alginato de sodio al 2%, con la siguiente fórmula:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

En donde: C1, concentración uno (obtenida); V1, volumen uno (obtenido); C2, concentración dos (deseada); V2, volumen dos (deseado).

- El volumen de starter calculado se centrifugó a 5000 rpm (DYNAC 297 C), se descartó el sobrenadante y se reservó el pellet.
  
- En el hidrogel mixto de nanofibras de celulosa al 2% p/v y alginato de sodio al 2% p/v (pH 7), previamente esterilizado en una autoclave (TUTTNAUER 3870mL) a 120 °C por 15 minutos, se adicionó el pellet de levadura en una cámara de flujo laminar (LABCONCO). La mezcla se agitó vigorosamente para obtener una solución homogénea.
  
- El hidrogel mixto fue reticulado en solución de CaCl<sub>2</sub> (Cloruro de calcio) estéril al 1% p/v; formando perlas de aproximadamente dos mm de diámetro (Verbelen et al., 2006), con ayuda de un esferificador ® previamente esterilizado con etanol al 94%.
  
- Finalmente las perlas se lavaron en agua estéril para retirar el CaCl<sub>2</sub>.

### **5.2.1 SISTEMA PARA INMOVILIZACIÓN DE LEVADURAS.**

- La solución de hidrogel mixto con levadura, se vierte dentro del esferificador.
  
- Se colocó el esferificador sobre la solución de CaCl<sub>2</sub> y se presionó el botón para que las gotas caigan sobre esta (Fig.5).

### **5.3 FERMENTACIÓN DEL MOSTO CERVECERO EN SFSC (SISTEMA DE FERMENTACIÓN SEMI-CONTINUA) Y EN BATCH.**

La evaluación de esta fermentación consiste en medir la atenuación de los azúcares fermentables como glucosa, maltosa y maltotriosa a lo largo de la fermentación primaria y secundaria. Los resultados de la fermentación fueron medidos por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) e hidrometría.

### 5.3.1 SFSC CON LEVADURAS INMOVILIZADAS EN MATRIZ MIXTA.

- Se empaquetó la columna de fermentación de lecho relleno con las perlas de levaduras inmovilizadas, en una cámara de flujo laminar (LABCONCO) (Fig. 6).
- Se drenó el exceso de agua intersticial con una bomba peristáltica (MILLIPORE).
- Se alimentó 1000 mL con ayuda de una bomba peristáltica (MILLIPORE), de mosto cervecero estéril y se esperó 24 horas hasta que se active la columna, al evidenciar la producción de burbujas.
- Posteriormente, se alimentó la columna con 500 mL de mosto cervecero cada 24 horas, y se extrajo 500 mL de cerveza fermentada cada 48 horas del embudo de separación donde se almacena el producto del sistema semi-continuo.
- Se midió la densidad final de las muestras extraídas diariamente, con ayuda de un hidrómetro (BREWER'S ELITE).
- Se tomaron muestras, de 1 mL, para análisis de concentración de azúcares inicial y final y % de productos de fermentación; por HPLC.
- El porcentaje de etanol producido en los análisis de HPLC se calculará con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de etanol} \frac{p}{v} = \frac{\text{Etanol obtenido} \frac{g}{L}}{0.789 \text{ (densidad del etanol)}}$$

– El porcentaje de alcohol por volumen (APV) medido por hidrómetro se calculará con la siguiente fórmula:

$$\%APV = \left[ \frac{\left( \frac{(DI - DF) * 1,05}{DF} \right) * 100}{0,789 \text{ (densidad del etanol)}} \right]$$

(García, 2013).

### 5.3.2 FERMENTACIÓN EN SISTEMA BATCH CON LEVADURAS NO INMOVILIZADAS.

– Se tomó 500 mL de mosto cervecero se añadió el pellet del volumen calculado en la sección 5.2, de starter de levadura.

– Se tomaron muestras, de 1 mL, para análisis de concentración de azúcares inicial y final y % de productos de fermentación; por HPLC.

– El porcentaje de etanol producido en los análisis de HPLC, se calculará con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de etanol } \frac{p}{v} = \frac{\text{Etanol obtenido } \frac{g}{L}}{0,789 \text{ (densidad del etanol)}}$$

– El porcentaje de APV medido por hidrómetro se calculará con la siguiente fórmula:

$$\%APV = \left[ \frac{\left( \frac{(DI - DF) * 1,05}{DF} \right) * 100}{0,789 \text{ (densidad del etanol)}} \right]$$

(García, 2013).

### **5.3.3 DISEÑO SFSC.**

- El SFSC fue diseñada con materiales autoclavables y consta de una columna de lecho relleno de 1 L de capacidad con dos filtros uno superior y otro inferior.
- La columna se alimentó por la llave de paso ubicada en la parte inferior de esta, el mosto ingresado pasó por el primer filtro y a través de las células inmovilizadas. El filtro superior sirvió para evitar el paso de las perlas poliméricas por la liberación de CO<sub>2</sub> producido por las levaduras.
- La columna se conectó con un balón de 250mL invertido, el cual posee dos escapes, uno para CO<sub>2</sub>, y otro para el producto fermentado, este escape está conectado mediante una manguera a un embudo de separación.
- El producto fermentado se almacena en el embudo de separación de 1 L de capacidad, el cual tiene adicionalmente una llave para la salida del producto (Fig. 7).

### **5.3.4 SISTEMA DE FERMENTACIÓN EN BATCH CON LEVADURAS NO INMOVILIZADAS.**

- El sistema en batch consta de una botella de borosilicato de 1000 mL.
- La tapa de la botella fue perforada, se conectó una manguera para el escape de CO<sub>2</sub> en un recipiente con etanol al 70% (Fig. 8).

#### 5.4 CALCULO DE ATENUACIÓN APARENTE (AA)

– Se realizó el cálculo de atenuación aparente, también denominado fermentabilidad del mosto, para calcular el porcentaje esperado de azúcares fermentados (Evans, Hamet y Brew, 2005).

$$AA = \left[ \frac{(DI - DF)}{DI} \right] * 100$$

(Gardens, 1922)

#### 5.5 MADURACIÓN DEL PRODUCTO OBTENIDO EN LOS SISTEMAS DE FERMENTACIÓN.

– En el SFSC la maduración se efectuó en el embudo de separación tras 24 horas de haber sido alimentada la columna.

– Transcurridas las 48 horas, las muestras se extrajeron y almacenaron en botellas de borosilicato (BOECO Germany) a 4°C (Fig. 9).

– En el sistema de fermentación batch, la maduración se efectuó en la misma botella de borosilicato (BOECO Germany).

– Transcurrido 16 días de fermentación a temperatura ambiente (18-24°C). Se almacenaron a 4°C durante tres semanas.

– Al finalizar la maduración se tomaron muestras para evaluar un conteo de UFC existentes en el producto.

## **5.6 ENVASADO Y CARBONATACIÓN DE CERVEZA.**

- Se esterilizaron las botellas de vidrio color ámbar de 330 mL en una autoclave (TUTT NAVER 3870mL) a 120 °C por 20min.
- Se sanitizaron tapacoronas, en agua destilada en ebullición, por 10 minutos.
- La carbonatación natural, la cual consiste en la adicción de CO<sub>2</sub> en la cerveza (Briggs et al., 2004), se realizó en la cámara de flujo laminar (LABCONCO). Se agregó 30 uL de “starter” de levadura con 5% de sacarosa p/v y 3g de sacarosa, en cada botella estéril y se añadió 300 mL de cerveza.
- Las cervezas fueron selladas y almacenadas en un lugar limpio, fresco y alejado del sol.
- Posterior a los siete días de carbonatación natural, a temperatura ambiente, la cerveza envasada se almacenó a 4°C.

## **5.7 DETERMINACIÓN DE PERFIL DE AZÚCARES Y PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN.**

- Se realizaron diluciones 1/100 de las muestras tomadas anteriormente y se analizaron por HPLC para determinar la concentración de sacáridos como maltodextrina, maltotriosa, glucosa y productos de fermentación como etanol y glicerol (Bastidas, 2013).

## **5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

- Se realizó una prueba de Wilcoxon, para comparar el % de etanol calculado por HPLC y el % APV medido por Hidrometría, en sistema batch y SFSC. Con el objetivo de identificar si existieron diferencias entre estos métodos (Sanchez, 2015).
- Los análisis fueron corridos empleando el paquete estadístico SPSS.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 ELABORACIÓN DE MOSTO CERVECERO.

Se elaboraron tres mostos cerveceros por triple decocción, esta técnica fue aplicada debido a que las decocciones repetidas aumentan la temperatura del macerado por etapas, minimizando el riesgo de sobrecalentamiento y destrucción enzimática total prematura (Jurić et al., 2015). Los mostos obtuvieron un color dorado profundo (Fig. 10), aroma a caramelo, sabor ligero, DI de 1.050 y un APV de 6.5%. Esta descripción encaja en las cervezas American Pale Ale según la guía de estilos de la BJCP (Beer Judge Certification Program), a su vez estas se subdividen en Blonde Ale, un estilo de cerveza ligera, refrescante y sin sabores agresivos (Strong y England, 2015).

### 6.2 INMOVILIZACIÓN DE LEVADURAS *Saccharomyces cerevisiae*.

En el presente estudio se empleó la inmovilización de células para optimizar el proceso de producción de la cerveza. Se inmovilizó *S. cerevisiae* por atrapamiento en una matriz de nanofibras de celulosa (matriz fibrosa) y alginato de sodio (matriz porosa) (Fig. 11), la fusión de ambas matrices se llevó a cabo con el fin de incrementar las propiedades de esta (Anirudhan et al., 2015). Se ha reportado que las matrices de alginato poseen una estabilidad mecánica y transferencia de masa limitadas (Verbelen et al., 2006; Jurić et al., 2015; Willaert, 2017). Por el contrario, las matrices fibrosas poseen una alta estabilidad mecánica, menor resistencia a la transferencia de masas y una alta permeabilidad como lo reporta Kilonzo et al. (2009). Por esta razón, se añadió el 20 % de alginato de sodio del volumen total de la matriz mixta, con el fin de obtener la consistencia idónea para lograr esferas resistentes (Fig. 12). No se han registrado estudios sobre inmovilización celular en matrices de nanofibras de celulosas para la optimización de producción de cerveza, por lo cual, su aplicación en procesos industriales es prometedora.

Antes de proceder con la inmovilización se verificó que las células no presenten floculación, para prevenir cúmulos de levaduras dentro de la matriz deseando que obtengan una mayor área superficial y que no se vea afectada la disponibilidad de nutrientes como lo reportado por Pires et al. (2014a, 2015b).

Las células inmovilizadas se difundieron en la matriz y no presentaron alteración en su morfología como se demuestra en la fig. 13, en donde, se pueden identificar levaduras no inmovilizadas, levaduras inmovilizadas previo a la fermentación y levaduras inmovilizadas posterior a la fermentación en SFSC. Sin embargo, se han reportado pocos casos en los que las levaduras inmovilizadas únicamente en matrices porosas presentan cambios morfológicos al encontrarse en un nuevo entorno que les genere estrés (Karel et al., 1985; Almonacid et al., 2012). La aplicación de una matriz mixta conformada por un 80% de nanofibras de celulosa, posiblemente permitió conservar la morfología de las levaduras intactas en el SFSC.

El diámetro de las perlas poliméricas oscila entre 0.3 mm a 4 mm, generalmente el más utilizado es de 1.5 mm como en estudios realizados por Almonacid et al. (2012) y Willaert (2012). En el biorreactor del SFSC se ingresó aproximadamente 40 000 perlas de 2,5 mm de diámetro (Fig. 12), aunque, no se llenó el volumen total del biorreactor (1L). Se ha descrito que las perlas con un diámetro menor a 1 mm son menos frágiles y tienen una alta relación superficie-volumen (Bressel et al., 2008), no se pudo aplicar esta medida a falta de adaptaciones del equipo de inmovilización; mientras que, no se aplicó un diámetro mayor para prevenir la desintegración de las perlas. No obstante, una minoría de perlas traspasó el segundo filtro del sistema por la presión generada debido a la movilidad de las células por la liberación de CO<sub>2</sub>, ocasionando su fragmentación (Tabla 1).

La inmovilización celular abarca una alta concentración de células dentro de la matriz (Pires et al., 2015), como ejemplos de inmovilización de *S. cerevisiae* tenemos a Mensour, Margaritis, Briens, Pilkington y Russell, (1996) con  $400 \times 10^6$  UFC/mL o a Kilonzo et al. (2009) con  $7700 \times 10^6$  UFC/mL. En este estudio se inmovilizó  $15 \times 10^6$  UFC/mL de *S. cerevisiae* (CLQCA INT-086), esta concentración no se basó en ninguna referencia para

inmovilización celular; sino en concentraciones de levaduras inoculadas en sistemas batch. El objetivo de la concentración aplicada fue obtener uniformidad en la concentración celular de ambos sistemas. La aplicación de esta no generó ningún problema y se evidenció producción de CO<sub>2</sub> a las 24 horas, tiempo esperado según varios estudios (Tata et al., 1999; Andrietta, Steckelberg y Andrietta, 2008; Kilonzo et al., 2009). La liberación de CO<sub>2</sub> de las levaduras inmovilizadas en el sistema semi-continuo fue persistente por los siguientes diez días (Tabla 1).

### **6.3 SFSC CON INMOVILIZACIÓN DE LEVADURAS EN MATRIZ MIXTA.**

El reactor escogido y diseñado en esta investigación para el SFSC fue el de lecho relleno (Anexo 2), por su simplicidad de diseño y de operación (Brányik et al., 2004; Kilonzo et al., 2009). Aunque, para la técnica de atrapamiento celular en una matriz, el reactor más utilizado es el de elevación por gas (gas lift reactor) (Mensour et al., 1996; Verbelen et al., 2006; Willaert, 2012).

Se ha sugerido, que los sistemas de fermentación deben operar a temperaturas de 15 a 17 °C para evitar la formación de alcoholes superiores y sabores no deseados (Salud et al., 2016). En esta investigación el SFSC permaneció a temperatura ambiente (18-24°C), se ingresó 500 mL de mosto cervecero cada 24 horas a una velocidad de 14 mL/min como lo sugerido por Kilonzo et al. (2009). El mosto ingresado permaneció en el sistema por 48 horas, 24 horas en el biorreactor (fermentación) y 24 horas en el embudo de separación (maduración). Posteriormente, se recolectaron 500 mL del producto cada día y se verificó por hidrometría que esté fermentado. Esta técnica, mide el grado alcohólico expresado en volumen (% vol) basándose en la densidad, siendo uno de los más utilizados en la industria cervecera (Lachenmeier et al., 2010). La densidad final de las muestras extraídas obtuvo una DF (densidad final) de 1.008 (Fig. 14), dando como resultado una cerveza de 5,5% APV. Estas características concuerdan con el estilo Blonde Ale registrado por (Strong y England, 2015). El % APV se mantuvo constante desde el primer día hasta el último, como se demuestra en la

Tabla 1; refutando a Pilkington et al. (1998) y Brányik et al. (2004), quienes alegan que las levaduras inmovilizadas disminuyen su capacidad de fermentación, lo que se traduce a una menor cantidad de etanol producido. Las variaciones en la DF y el % APV del 19 al 21 de Abril del 2017 fueron consecuencia de la no alimentación de la columna en los seis días previos, lo que provocó una desestabilización en el sistema. Willaert (2012), reportó que su sistema de fermentación tardó 60 días en estabilizarse, mientras que, en esta investigación el SFSC se tardó cuatro días.

Se tomaron muestras a las 24 horas del producto recolectado en el embudo de separación y mediante análisis por HPLC se evidenció que el mosto cervecero fue fermentado en su totalidad (Fig. 15,16; Tabla 2). El resultado obtenido es un 33% más eficiente que los reportados por Tata et al. (1999); Almonacid et al. (2012) y Willaert (2012), los cuales obtuvieron su producto fermentado dentro de tres días. Sin embargo, el producto fue retirado del sistema cada 48 horas para que precipite la levadura libre y asegurar el término de la fermentación. Por otro lado, el estudio realizado por Mensour et al. (1996), consiguió obtener un producto fermentado en 24 horas aplicando carragenina como matriz de inmovilización (porosa), sin embargo, no toma en cuenta el tiempo de maduración.

Al pasar los días, la concentración de células libres en el sistema se hizo evidente. Tras esta observación, se tomaron muestras del producto obtenido del SFSC para verificar que no exista contaminación, puesto que una de las desventajas reportadas en varios estudios, es la presencia de contaminación en sistemas con inmovilización celular en matrices porosas (S. T. Yang y Shu, 1996; Ma T, Li Y, Yang ST, y Kniss DA., 1999; Brányik et al., 2004) . Durante los 41 días de funcionamiento del SFSC la presencia microbiana fue nula, este resultado pudo deberse a la aplicación de la matriz mixta principalmente compuesta por nanofibras de celulosa, ya que se ha reportado que nanocelulosa proveniente de otras fuentes, presenta actividad antimicrobiana, en especial hacia bacterias lácticas (Dehnad, Mirzaei, Emam-Djomeh, Jafari y Dadashi, 2014). Sin embargo, se requiere de más estudios de las nanofibras de celulosa provenientes de *Phytelephas aequatorialis* para confirmar esta hipótesis.

Desde otra perspectiva, la concentración de células libres en el sistema de fermentación es explicada por Andrietta et al. (2008), quienes refieren que la presencia de estas se debe a su buena actividad metabólica en el biorreactor, en el cual la mayoría se encuentran vivas. En este estudio el SFSC funcionó durante 41 días, pero existen registros de operación de sistemas con inmovilización celular que sobrepasan el año para sistemas de fermentación de cervezas tipo Lager (Virkajärvi, 2001). Esto puede deberse a la alta tolerancia al etanol y baja de inhibición del sustrato que presentan las levaduras inmovilizadas (Rochefort, Rehg y Chau, 1986; Norton & D'Amore, 1994; Almonacid et al., 2012).

#### **6.4 SISTEMA DE FERMENTACIÓN EN BATCH.**

En esta investigación el sistema de fermentación batch (Fig. 17) fue empleado como control frente al SFSC (Fig. 18; Tabla 3).

Al igual que el SFSC, los sistemas batch contuvieron el mismo mosto cervecero con una DI: 1.050 y operaron a 18-24°C como lo sugerido por (S. T. Yang y Shu, 1996; Kobi et al., 2004). Se inoculó  $15 \times 10^6$  UFC/mL de *Saccharomyces cerevisiae* (CLQCA INT-086); basándose en la concentración reportada por Pires et al. (2014), quien determinó que la cantidad óptima de levadura inoculada en un sistema de fermentación batch es de  $10 - 20 \times 10^6$  UFC/mL. La concentración de células funcionó conforme lo esperado, al evidenciar una actividad de las levaduras a las 24 horas. Posterior a esto, se evidenció un decrecimiento gradual en la producción de CO<sub>2</sub> y en la actividad dentro de la botella de borosilicato (Fig. 17).

El tiempo promedio registrado en el que la fermentación primaria y secundaria se efectúan es de 6 a 17 días (Hsu et al., 2004; Salud et al., 2016). En el presente estudio se tomó una muestra del sistema batch al día 16 (previo a la maduración) para ser analizarlos por

HPLC y se evidenció que la fermentación tomó más de 16 días (Fig. 19). Concluyendo que en sistema batch la fermentación toma más de 16 días versus 24 horas reportado en el SFSC con levaduras inmovilizadas. Finalmente, la DF del producto obtenido se tomó tras acabar la fermentación, en promedio fue de 1.006 (Tabla 4, Fig. 14) correspondiente a un APV: 5.7%. El sistema fue llevado a maduración al décimo sexto día, en el que se evidenció baja producción de CO<sub>2</sub>, ya que, la fermentación secundaria se puede llevar a cabo a bajas temperaturas (Emerald, 2016).

## **6.5 ATENUACIÓN APARENTE**

El porcentaje de AA es considerado alto cuando es mayor a 75% y bajo cuando es menor a 75% ( Evans et al., 2005; Arziß, 2011). El cálculo de AA para el SFSC fue de 84%; mientras que la cerveza obtenida del sistema batch obtuvo una AA de 88%, estableciendo que las cervezas obtenidas tuvieron una fermentabilidad alta tal. Con este cálculo se pudo conocer ciertas características finales de la cerveza obtenida (Arziß, 2011), las cuales se discutirán en el apartado 6.7.

## **6.6 MADURACIÓN DE CERVEZA.**

Las cervezas producidas en ambos sistemas, fue puesta en maduración para que los metabolitos secundarios originados durante la fermentación desaparezcan, los sólidos presentes se precipiten y se clarifique la cerveza (Virkaajärvi, 2001; Worrell, 2008; Emerald, 2016). El seguimiento de diacetilo en cervezas Lager es importante para conocer el término de la fermentación, mientras que, para cervezas Ale no se ha registrado concentraciones altas de diacetilo debido a la temperatura a la que fermenta, la cual permite que el diacetilo sea

reducido fácilmente por las levaduras (J.E. Carvajal (comunicación personal, 11 Julio de 2017)). Para este estudio se determinó el término de la maduración al no presentar UFC en el conteo de células, concluyendo que hubo una buena precipitación de sólidos obteniendo una cerveza clara.

Al final del proceso de maduración se realizó un conteo de células libres (no precipitadas) en cámara de Neubauer para cada sistema. Como resultados no se observaron células libres en la cerveza de ambos sistemas. La principal diferencia es que en el sistema semi-continuo la precipitación total de células tomó 24 horas mientras que en el sistema batch tomó 21 días, concluyendo que la precipitación celular es más eficiente en el SFSC.

En el SFSC la maduración se llevó a cabo en el embudo de separación, en el cual se evidenció un precipitado de levaduras (Fig. 20,21); tras 48 horas las muestras extraídas se almacenaron a 4°C. Este precipitado tuvo una concentración celular de 165 - 170 x 10<sup>6</sup> UFC/mL, las cuales en su mayoría presentaron lisis (Fig. 22). Pires et al. (2014), reportó que en sistemas con inmovilización celular la concentración apta de levaduras muertas es de ~6 x 10<sup>6</sup> UFC/mL, ya que a concentraciones mayores la levadura comienza a excretar esteroides. Para contrarrestar este problema, se drenó el precipitado diariamente del embudo.

Un parámetro que induce la precipitación celular es la velocidad del consumo de azúcares fermentables de las levaduras (Bressel et al., 2008). Como se evidenció en el cromatograma (Fig. 15), el consumo total de azúcares fermentables del SFSC se produjo a las 24 horas, produciendo que se precipiten más rápido las células. Mientras que, en el sistema batch la fermentación no se ejecutaba por completo tras 16 días (Fig. 19).

Los sistemas en batch tuvieron una maduración de tres semanas, tomando en cuenta, que la precipitación de sólidos puede tomar entre una a tres semanas. Un inconveniente con

este sistema de fermentación es que se requiere de la separación de levaduras por métodos como centrifugación o filtración (Briggs et al., 2004). En este estudio, la separación de levaduras del producto se realizó por sedimentación. El SFSC tiene una ventaja frente al batch puesto que no requiere de la separación de la levadura sedimentada (Ghose y Tyagi, 1979; O'Brien et al., 2000; Kwon et al., 2001; Verbelen et al., 2006; Almonacid et al., 2012). Este sistema presentó una concentración de levaduras de  $1310 \times 10^6$  UFC/mL (posterior a la maduración).

En el SFSC (Fig. 18) empleado en el presente estudio, se obtuvo un producto fermentado y madurado en 48 horas denotando que estos dos procesos en la producción de cerveza se han juntado exitosamente logrando una ventaja, ya que este ha sido uno de los retos más complicados de lograr y aplicar en la optimización de procesos e incluso se han reportado estudios en los que no hay diferencias representativas en el tiempo de producción en un sistema continuo o semi-continuo con inmovilización celular frente al sistema en batch, al necesitar siete días adicionales para la maduración (Almonacid et al., 2012; Willaert, 2012).

## **6.7 ENVASADO Y CARBONATACIÓN DE CERVEZA.**

Las cervezas obtenidas de ambos sistemas se embotellaron y carbonataron en un ambiente aséptico. Tras una semana de carbonatación natural (Cortacero-Ramírez et al., 2003), se cataron las cervezas producidas en ambos sistemas.

Las cervezas obtenidas en ambos sistemas se caracterizaron por ser secas, de cuerpo ligero y alta tomabilidad (drinkability); estos resultados concuerdan con lo reportado por Arziß (2011) y Evans et al. (2005), los cuales enunciaron que estas características son representativas de un alto % AA. Por otro lado, la cerveza del SFSC presenta, escasa

formación de espuma, ligera presencia de sabores cítricos y carbonatación moderada. En cambio, la cerveza del sistema en batch exhibe una alta formación de espuma, ausencia de sabores cítricos y alta carbonatación. Ambas cervezas poseen una buena clarificación, aroma dulce, ausencia de aroma de lúpulos y un color dorado oscuro. (Fig. 23).

## **6.8 DETERMINACIÓN DE PERFIL DE AZÚCARES Y PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN**

El monitoreo de la composición del azúcar en el mosto y la cerveza juega un papel importante para el desarrollo de nuevos tipos de cerveza, selección de nuevas cepas de levadura y materias primas. Los principales azúcares fermentables son glucosa (alrededor del 20% del volumen total del mosto), maltosa (60%) y maltotriosa (20%). (Cortacero-Ramírez et al., 2003). Ocasionalmente la levadura puede no consumir todos los azúcares fermentables, dando como resultado un bajo rendimiento de etanol (Monošík, Magdolen, Stred'anský y Šturdík, 2013).

Se realizaron tres mostos cerveceros empleando la misma curva de cocción, posteriormente se analizó la concentración de azúcares obtenidos (malto dextrina, maltotriosa, maltosa, glucosa y xilosa) en los mostos mediante HPLC, dando como resultado: mosto 1 y mosto 2: 92.6 g/L, y mosto 3: 94.8 g/L (Fig. 24- 26). La composición del mosto 1 y el mosto 2 es similar, ambos contienen una concentración del 28.3% de malto dextrinas, 16.3% de malto triosa, 47.8% de maltosa y 7.6% de glucosa. Mientras que, el mosto 3 difiere de estos con un 21.2% de malto dextrinas, 17% de malto triosa, 53.2% de maltosa, 8.51% de glucosa y 0.005% de xilosa (Fig. 27). El porcentaje de los azúcares fermentables en los mostos 1 y 2 es de 71.7%. Mientras que, el mosto 3 obtuvo un porcentaje de 78.7%. Para ambos, el porcentaje de glucosa obtenido es 10% menor a lo citado anteriormente por Cortacero-Ramírez et al. (2003).

Se compararon las muestras del sistema batch frente al sistema semi-continuo (Tabla 3). Los análisis por HPLC, evidencian que la glucosa y la maltotriosa fueron consumidas en su totalidad en ambos sistemas. Se reportó un 1.6 % de maltosa en la muestra del sistema batch, este porcentaje pueden representar los azúcares que no fue consumido por la levadura al no poder romper sus enlaces para metabolizarlos, ya que, se ha registrado que la glucosa es el primer azúcar que se consume seguido de la maltosa y maltotriosa (Monošik et al., 2013). Desde otra perspectiva, estos últimos datos pueden deberse a falta de para concluir la fermentación, como se mencionó los sistemas batch tomaron más de 15 días. Finalmente se evidencia la presencia de glicerol; un 1.7% en batch y un 1.9% en sistema semi-continuo. El glicerol es formado por levaduras durante la fermentación alcohólica, es un indicador de esta y contribuye a la viscosidad y la calidad sensorial de la cerveza (Cordella, Antinelli y Cabrol-Bass, 2003).

En el presente estudio se midió el porcentaje de etanol por dos métodos, mediante HPLC y por hidrometría. El promedio del porcentaje de etanol analizado por HPLC fue de 6.3% para batch y 5.8% para sistema semi-continuo. Mientras que para por hidrometría se obtuvo un alcohol por volumen de 5.5% para sistema semi-continuo y de 5.8 para sistema batch (Tabla 5). Como podemos observar, el porcentaje de etanol es mayor en la cerveza del sistema en batch, para ambos métodos empleados. En la tabla 3 se sintetizan los resultados obtenidos (Fig. 28).

La prueba de Wilcoxon realizada demostró que no hubo diferencias significativas entre las dos metodologías empleadas (hidrometría vs. HPLC) para medir el % etanol en sistemas batch y SFSC; al obtener un  $p \geq 0.05$  (Tabla 6). Ambas metodologías son fiables, sin embargo en la producción de cerveza, tanto industrial como artesanal, la hidrometría es el método más utilizado para calcular el % etanol de cervezas Lager y Ale, por su sencillez, rapidez y bajo costo (Briggs et al., 2004; Navarro, Pérez, Navarro, Mena y Vela, 2007; Olajire, 2012). Por el contrario, el HPLC es más utilizado para diferentes análisis en laboratorios, por su alto costo, constante mantenimiento y necesidad de personal capacitado para su operación (Pidcocke, Kreis, Heldt-Hansen, Nielsen y Olsson, 2009).

## 7 CONCLUSIONES

1. El mosto cervecero fue ingresado en el sistema de fermentación semi-continuo en columna de lecho relleno diseñado, obteniendo el producto fermentado y maduro a las 48 horas. El sistema empleado es 15 veces más rápido que un sistema tradicional; esto se debe a que la inmovilización celular aumenta el área superficial de las células incrementando la velocidad de reacción.
2. Se logró realizar la inmovilización celular en una matriz mixta de nanofibras de celulosa y alginato de sodio, obteniendo perlas poliméricas con una baja probabilidad de desintegración.
3. Se evaluó la eficiencia de fermentación del sistema diseñado versus el tradicional por HPLC e hidrometría. Por hidrometría, la cerveza del sistema continuo tiene un porcentaje de etanol por volumen de 5.5%; mientras que, en batch el porcentaje de etanol fue de 5.8%. los análisis por HPLC reportaron que el porcentaje de etanol en sistema semi-continuo es de 5.8% y en batch de 6.3%. En ambos análisis el porcentaje de etanol obtenido fue mayor en batch.
4. Se identificó con una prueba de Wilcoxon que no existen diferencias significativas entre en el % de etanol calculado por HPLC y el % APV medido por Hidrometría, en sistema batch y SFSC.
5. La matriz de nanofibras de celulosa de tagua y alginato de sodio es significativa para lograr la producción de cerveza, ya que no se han registrado resultados positivos con matrices porosas netamente de alginato de calcio.
6. La morfología de las levaduras no se ve afectada por el proceso de inmovilización. Además no se altera la tasa de fermentación ni el crecimiento celular.

7. Se juntó exitosamente la fermentación con la maduración en un sistema semi-continuo, lo cual no se ha logrado a escala industrial excepto en la industria de cerveza sin alcohol y procesos de maduración.
  
8. Los cerveceros podrían implementar la inmovilización de células en sistemas de batch y disfrutar de sus ventajas como menor tiempo de producción o de no requerir la separación de levaduras del producto final.

## 9. RECOMENDACIONES

- Mejorar el diseño del sistema de fermentación semi-continua adicionando un sistema de limpieza interno.
- Realizar estudios de la matriz de nanofibras de celulosa sobre su interacción a diferentes temperaturas sobre el metabolismo de las levaduras, y su influencia en sabor de la cerveza.
- Igualmente se requieren estudios de la viabilidad de las células y producción de esteres excretados por levaduras que presentan lisis en sistemas semi-continuos y continuos; para procesos implicados en la producción de cerveza.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almonacid, S. F., Nájera, A. L., Young, M. E., Simpson, R. J. y Acevedo, C. A. (2012). A Comparative Study of Stout Beer Batch Fermentation Using Free and Microencapsulated Yeasts. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 750–758. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0379-4>
- Andrietta, S. R., Steckelberg, C. y Andrietta, M. da G. S. (2008). Study of flocculent yeast performance in tower reactors for bioethanol production in a continuous fermentation process with no cell recycling. *Bioresource Technology*, 99(8), 3002–3008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.037>
- Anirudhan, T. S., Deepa, J. R. y Binusreejayan. (2015). Synthesis and characterization of multi-carboxyl-functionalized nanocellulose/nanobentonite composite for the adsorption of uranium(VI) from aqueous solutions: Kinetic and equilibrium profiles. *Chemical Engineering Journal*, 273(Vi), 390–400. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.03.007>
- Aquilani, B., Laureti, T., Poponi, S. y Secondi, L. (2015). Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences. *Food Quality and Preference*, 41, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2014.12.005>
- Arredondo, B. (2007). Concentración recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos Y Herramientas Analíticas En La Evaluación de La Biomasa Microalgal*, (January 2007), 17–27.
- Arziß, L. U. N. (2011). Arsenic and arsenic compounds. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 100 C, 41–93. <https://doi.org/10.1002/14356007.a03>
- Bastidas, B.D. (2013). Sacarificación y fermentación continua (SSF) de raquis de palma afrinaca (*Elaeis guineensis*) pretratado con ácido y álcali para la producción de etanol de segunda generación. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

- Bokulich, N. A. y Bamforth, C. W. (2013). The microbiology of malting and brewing. *Microbiol Mol Biol Rev*, 77(2), 157–172. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00060-12>
- Brányik, T., Vicente, A. A., Cruz, J. M. M. y Teixeira, J. A. (2004). Continuous Primary Fermentation of Beer with Yeast Immobilized on Spent Grains — The Effect of Operational Conditions. *American Society of Brewing Chemists*, 62(4), 29–34.
- Bressel, T. A. B., Paz, A. H., Baldo, G., Lima, E. O. C., Matte, U. y Saraiva-Pereira, M. L. (2008). An effective device for generating alginate microcapsules. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1), 136–140. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572008000100023>
- Briggs, D. E., Boulton, C. a., Brookes, P. y Steven, R. (2004). *Brewing: science and practice. Journal of the Science of Food and Agriculture* (Vol. 86). <https://doi.org/10.1002/jsfa.2344>
- Canbolat, M. F., Gera, N., Tang, C., Monian, B., Rao, B. M., Pourdeyhimi, B. y Khan, S. A. (2013). Preservation of cell viability and protein conformation on immobilization within nanofibers via electrospinning functionalized yeast. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5(19), 9349–9354. <https://doi.org/10.1021/am4022768>
- Cordella, C., Antinelli, J. F. y Cabrol-Bass, D. (2003). Computer-aided determination of glycerol in food products with GlycerolSoft, a tool for assessing the quality of food. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22(2), 115–122. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00209-7](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00209-7)
- Cortacero-Ramírez, S., Hernáinz-Bermúdez, De Castro, M., Segura-Carretero, A., Cruces-Blanco, C. y Fernández-Gutiérrez, A. (2003). Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22(7–8), 440–445. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00704-0](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00704-0)
- de Gaetano, G., Costanzo, S., Di Castelnuovo, A., Badimon, L., Bejko, D., Alkerwi, A. y Iacoviello, L. (2016). Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 26(6), 443–467. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.03.007>

- Dehnad, D., Mirzaei, H., Emam-Djomeh, Z., Jafari, S. M. y Dadashi, S. (2014). Thermal and antimicrobial properties of chitosan-nanocellulose films for extending shelf life of ground meat. *Carbohydrate Polymers*, 109, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.063>
- Djordjević, R., Gibson, B., Sandell, M., de Billerbeck, G. M., Bugarski, B., Ileskošek-Čukalović, I., Vunduk, J., Nikićević, N. y Nedović, V. (2015). Raspberry wine fermentation with suspended and immobilized yeast cells of two strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 26 (32), 271–279. DOI: 10.1002/yea.3060
- Emerald, M. (2016). *Novel Food Fermentation Technologies*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-42457-6>
- Evans, D. E., Hamet, M. a G. y Brew, J. I. (2005). The Selection of a Dried Yeast Strain for Use in the Apparent Attenuation Limit Malt Analysis ( AAL ) Procedure, 111(2), 209–214.
- Farina, D., Zinellu, M., Fanari, M., Porcu, M. C., Scognamillo, S., Puggioni, G. M. G. y Pretti, L. (2017). Development of a biosensor telemetry system for monitoring fermentation in craft breweries. *Food Chemistry*, 218(September), 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.092>
- García, J.J. (2013). ¿Cómo medir el contenido de alcohol en la cerveza?. Recuperado de <http://brewmasters.com.mx/como-medir-el-contenido-de-alcohol-en-la-cerveza/>
- Gardens, K. H. (1922). The Institute of Brewing Research Scheme. *Journal of the Institute of Brewing*, 28(10), 758–761. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1922.tb06520.x>
- Ghose, T. K. y Tyagi, R. D. (1979). Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. I. Batch versus continuous systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 21(8), 1387–1400. <https://doi.org/10.1002/bit.260210807>
- Gómez-Corona, C., Escalona-Buendía, H. B., García, M., Chollet, S. y Valentin, D. (2016). Craft vs. industrial: Habits, attitudes and motivations towards beer consumption in Mexico. *Appetite*, 96, 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.10.002>

- Harborne, J. B. (1971). *Fungal Metabolites. Phytochemistry* (Vol. 10). [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97318-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97318-7)
- Hsu, C. H., Chu, Y. F., Argin-Soysal, S., Hahm, T. S. y Lo, Y. M. (2004). Effects of surface characteristics and xanthan polymers on the immobilization of *Xanthomonas campestris* to fibrous matrices. *Journal of Food Science*, 69(9), E441–E448. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09928.x>
- Jurić, A., Ćorić, N., Odak, A., Herceg, Z. y Tišma, M. (2015). Analysis of total polyphenols, bitterness and haze in pale and dark lager beers produced under different mashing and boiling conditions. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(4), 541–547. <https://doi.org/10.1002/jib.254>
- Karel, S. F., Libicki, S. B. y Robertson, C. R. (1985). The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chemical Engineering Science*, 40(8), 1321–1354. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(85\)80074-9](https://doi.org/10.1016/0009-2509(85)80074-9)
- Kilonzo, P., Margaritis, A. y Bergougnou, M. (2009). Airlift-driven fibrous-bed bioreactor for continuous production of glucoamylase using immobilized recombinant yeast cells. *Journal of Biotechnology*, 143(1), 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.06.007>
- KIRIN. 2015. Kirin Beer University Report Global Beer Production by Country in 2015. Recuperado de [http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2016/0810\\_01.html](http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2016/0810_01.html)
- Klein, J. y Ziehr, H. (1990). Immobilization of microbial cells by adsorption. *Journal of Biotechnology*, 16(1–2), 1–15. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(90\)90061-F](https://doi.org/10.1016/0168-1656(90)90061-F)
- Kobi, D., Zugmeyer, S., Potier, S. y Jaquet-Gutfreund, L. (2004). Two-dimensional protein map of an “ale”-brewing yeast strain: Proteome dynamics during fermentation. *FEMS Yeast Research*, 5(3), 213–230. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.07.004>
- Koljonen, T., Hämäläinen, J. J., Sjöholm, K. y Pietilä, K. (1995). A model for the prediction of fermentable sugar concentrations during mashing. *Journal of Food Engineering*, 26(3), 329–350. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(94\)00061-D](https://doi.org/10.1016/0260-8774(94)00061-D)

- Kryl, P., Gregor, T. y Los, J. (2012). Comparison of analytical parameters of beer brewed in two different technological ways at two pub breweries. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 60(5), 137–144.
- Kwon, S., Yoo, I. K., Lee, W. G., Chang, H. N. y Chang, Y. K. (2001). High-rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell-recycle bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 73(1), 25–34. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20010405\)73](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20010405)73)
- Lachenmeier, D. W., Godelmann, R., Steiner, M., Ansay, B., Weigel, J. y Krieg, G. (2010). Rapid and mobile determination of alcoholic strength in wine, beer and spirits using a flow-through infrared sensor. *Chemistry Central Journal*, 4(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-4-5>
- Li, A. y Wang, A. (2005). Synthesis and properties of clay-based superabsorbent composite. *European Polymer Journal*, 41(7), 1630–1637. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.01.028>
- Li, T., Chen, X. Bin, Chen, J. C., Wu, Q. y Chen, G. Q. (2014). Open and continuous fermentation: Products, conditions and bioprocess economy. *Biotechnology Journal*, 9(12), 1503–1511. <https://doi.org/10.1002/biot.201400084>
- LÓPEZ PLUMED, M. D. (2013). Plan De Empresa De Una Fábrica De Cerveza Artesanal, 103. Retrieved from [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/55115/TFG - López Plumed\\_14097362179951028026548280695631.pdf?sequence=2](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/55115/TFG_López_Plumed_14097362179951028026548280695631.pdf?sequence=2)
- Ma T, Li Y, Yang S. T. y Kniss DA. (1999). Tissue engineering human placenta trophoblast cells in 3-D fibrous matrix: spatial effects on cell proliferation and function. *Biotechnology Progress*, 15(4), 715–724.
- MacGregor, A. W., Bazin, S. L., Macri, L. J. y Babb, J. C. (1999). Modelling the Contribution of Alpha-Amylase, Beta-Amylase and Limit Dextrinase to Starch Degradation During Mashing. *Journal of Cereal Science*, 29(2), 161–169. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1998.0233>

- Mensour, N. A., Margaritis, A., Briens, C. L., Pilkington, H. y Russell, I. (1996). Application of immobilized yeast cells in the brewing industry. *Progress in Biotechnology*, 11(C), 661–671. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80090-6](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80090-6)
- Miki, B. L., Poon, N. H. y James, A. P. (1982). Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in Possible Mechanism for Flocculation Interactions Governed by Gene FLO ] in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 150(2), 878–889.
- Monošík, R., Magdolen, P., Stred'anský, M. y Šturdík, E. (2013). Monitoring of monosaccharides, oligosaccharides, ethanol and glycerol during wort fermentation by biosensors, HPLC and spectrophotometry. *Food Chemistry*, 138(1), 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.039>
- Montanari, L., Floridi, S., Marconi, O., Tironzelli, M. y Fantozzi, P. (2005). Effect of mashing procedures on brewing. *European Food Research and Technology*, 221(1–2), 175–179. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-1166-8>
- Nakagaito, A. N. y Yano, H. (2005). Novel high-strength biocomposites based on microfibrillated cellulose having nano-order-unit web-like network structure. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, 80(1), 155–159. <https://doi.org/10.1007/s00339-003-2225-2>
- Navarro, S., Pérez, G., Navarro, G., Mena, L. y Vela, N. (2007). Variability in the fermentation rate and colour of young lager beer as influenced by insecticide and herbicide residues. *Food Chemistry*, 105(4), 1495–1503. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.035>
- Norton, S. y D'Amore, T. (1994). Physiological effects of yeast cell immobilization: Applications for brewing. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(5), 365–375. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90150-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90150-3)
- O'Brien, D. J., Roth, L. H. y McAloon, A. J. (2000). Ethanol production by continuous fermentation-pervaporation: A preliminary economic analysis. *Journal of Membrane Science*, 166(1), 105–111. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(99\)00255-0](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(99)00255-0)

- Olajire, A. A. (2012). The brewing industry and environmental challenges. *Journal of Cleaner Production*, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.03.003>
- Piddocke, M. P., Kreis, S., Heldt-Hansen, H. P., Nielsen, K. F. y Olsson, L. (2009). Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(3), 453–464. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1930-y>
- Pilkington, P. H., Margaritis, A., Mensour, N. A. y Russell, I. (1998). Fundamentals of Immobilised Yeast Cells for Continuous Beer Fermentation: a Review. *Journal of the Institute of Brewing*, 104(1), 19–31. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1998.tb00970.x>
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., Côrte-Real, M., Brandão, T. y Vicente, A. A. (2014). High gravity primary continuous beer fermentation using flocculent yeast biomass. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(4), 486–494. <https://doi.org/10.1002/jib.171>
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., Brandão, T., & Vicente, A. A. (2015). Continuous beer fermentation - diacetyl as a villain. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(1), 55–61. <https://doi.org/10.1002/jib.205>
- Preedy, V. R. (2009). *Beer in Health and Disease Prevention*. Retrieved from <http://books.google.com.my/books?id=hBO3N5qLTEIC>
- Rocheffort, W. E., Rehg, T. y Chau, P. C. (1986). Trivalent cation stabilization of alginate gel for cell immobilization. *Biotechnology Letters*, 8(2), 115–120. <https://doi.org/10.1007/BF01048468>
- Salud, S. L. A., Laura, A., Morona, R., Humberto, T. y Brieva, M. (2016). Trabajo Fin De Grado Título : Producción De Cerveza Y Efectos De Un Consumo Moderado.
- Sánchez, J. (2015). Introducción a la estadística no paramétrica y al análisis multivariado. Quito: Giro Creativo Press.

- Santucci, B. S., Bras, J., Belgacem, M. N., Curvelo, A. A. da S. y Pimenta, M. T. B. (2016). Evaluation of the effects of chemical composition and refining treatments on the properties of nanofibrillated cellulose films from sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, 91, 238–248. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.017>
- Schmidt, F. R. (2005). Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(4), 425–435. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0003-0>
- Strong, G. y England, K. (2015). Beer Judge Certification Program 2015 Style Guidelines. *Beer Judge Certification Program*, 93.
- Tata, M., Bower, P., Bromberg, S., Duncombe, D., Fehring, J., Lau, V. y Stassi, P. (1999). Immobilized yeast bioreactor systems for continuous beer fermentation. *Biotechnology Progress*, 15(1), 105–113. <https://doi.org/10.1021/bp980109z>
- Tornai-Lehoczki, J. y Dlačny, D. (2000). Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1–2), 37–45. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00356-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00356-1)
- Verbelen, P. J., De Schutter, D. P., Delvaux, F., Verstrepen, K. J. y Delvaux, F. R. (2006). Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnology Letters*, 28(19), 1515–1525. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9132-5>
- Vidgren, V., Multanen, J. P., Ruohonen, L. y Londesborough, J. (2010). The temperature dependence of maltose transport in ale and lager strains of brewer's yeast. *FEMS Yeast Research*, 10(4), 402–411. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00627.x>
- Virkajärvi, I. (2001). Feasibility of continuous main fermentation of beer using immobilized yeast. *VTT Publications*, (430), 2–87.
- Vrellas, C. G. y Tsiotras, G. (2015). Quality management in the global brewing industry. *International Journal of Quality & Reliability Management*, 32(1), 42–52. <https://doi.org/10.1108/IJQRM-07-2013-0120>

- Walsh, R. M. y Martin, P. A. (1977). Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in a temperature gradient incubator. *Journal of the Institute of Brewing*, 83(3), 169-172.
- Willaert, R. (2012). Biochemistry of Beer Fermentation. *Food Biochemistry and Food Processing: Second Edition*, (Meussdoerffer 2009), 627–653. <https://doi.org/10.1002/9781118308035.ch33>
- Willaert, R. (2017). *Fungal Metabolites*. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4>
- Worrell, E. (2008). *Energy efficiency improvement and cost saving opportunities for cement making. An Energy Star Guide for Energy and Plant Managers*. Lawrence Berkeley National Laboratory. <https://doi.org/LBNL-4779E>
- Yang, S. T, Huang, Y. y Hong, G. (1995). A novel recycle batch immobilized cell bioreactor for propionate production from whey lactose. *Biotechnology and Bioengineering*, 45(5), 379–386. <https://doi.org/10.1002/bit.260450502>
- Yang, S. T, Zhu, H., Li, Y. y Hong, G. (1994). Continuous propionate production from whey permeate using a novel fibrous bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(11), 1124–1130. <https://doi.org/10.1002/bit.260431117>
- Yang, S. T. y Shu, C. H. (1996). Kinetics and stability of GM-CSF production by recombinant yeast cells immobilized in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechnology Progress*, 12(4), 449–456. <https://doi.org/10.1021/bp960037g>
- Yüzgeç, U., Türker, M. y Hocalar, A. (2009). On-line evolutionary optimization of an industrial fed-batch yeast fermentation process. *ISA Transactions*, 48(1), 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.isatra.2008.09.001>

## 10. FIGURAS

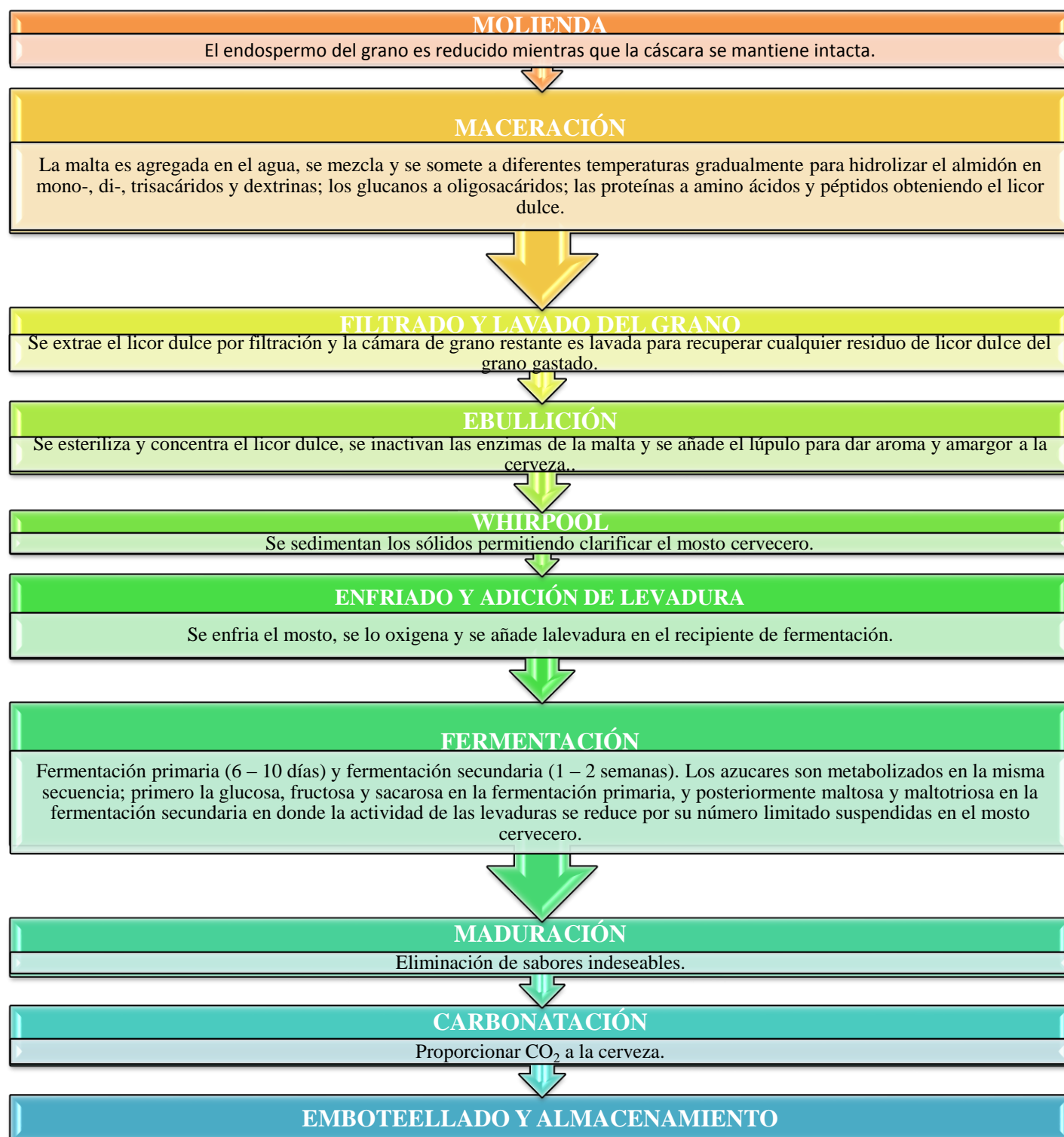
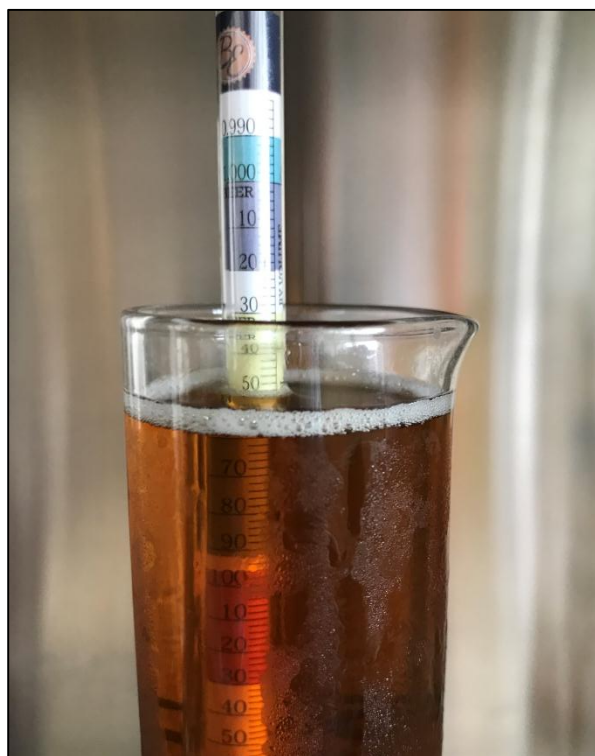
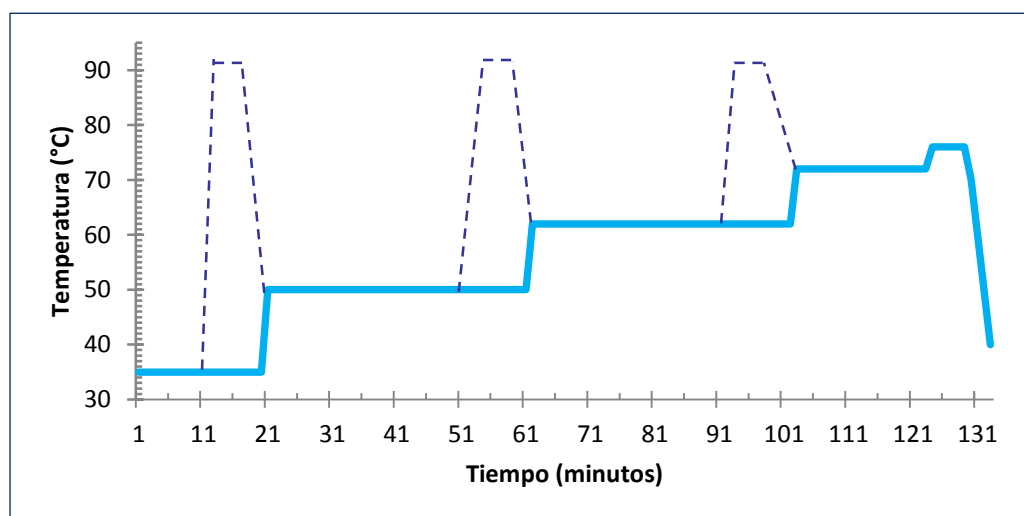


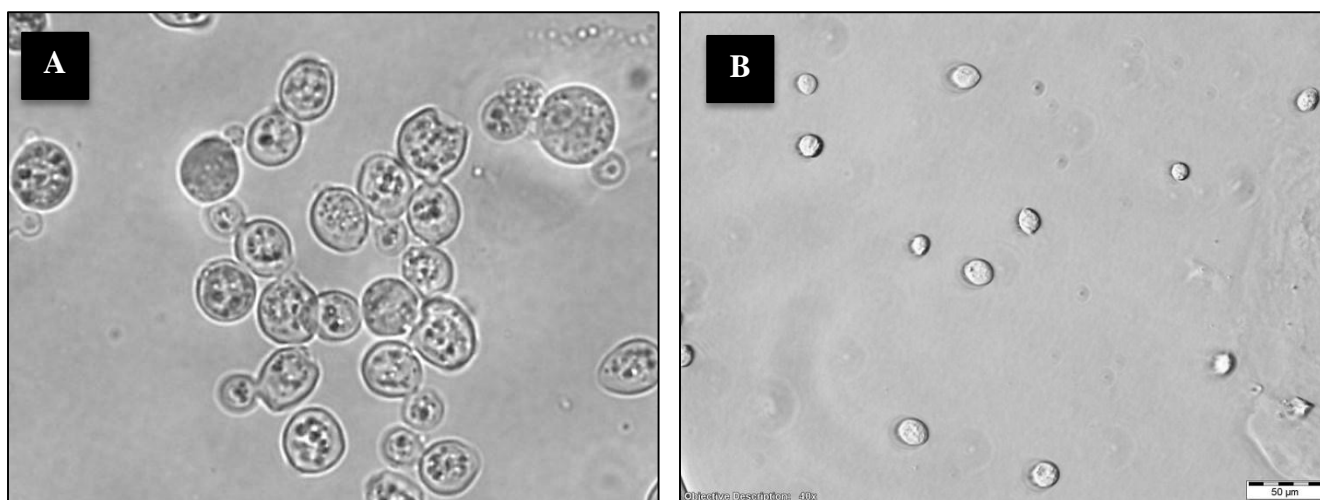
Figura 1. Diagrama de pasos para la producción de cerveza.



**Figura 2. Medición de densidad inicial de mosto cervecero para fermentación en sistema batch y SFSC. DI, densidad inicial: 1.050 g/L.**



**Figura 3. Curva de triple decocción para elaboración de m.** Primera decocción, hervir 5 litros de macerado por 10 minutos, reincorporar al macerado principal incrementando su temperatura a 50 °C, mantener la temperatura por 40 minutos; Segunda decocción, hervir 5 litros de macerado por 10 minutos, reincorporar al macerado principal incrementando su temperatura a 62 °C, mantener la temperatura por 40 minutos; Tercera decocción, hervir 5 litros de macerado por 10 minutos, reincorporar al macerado principal incrementando su temperatura a 72 °C, mantener la temperatura por 20 minutos; elevar temperatura de macerado principal a 76°C por 5 minutos.



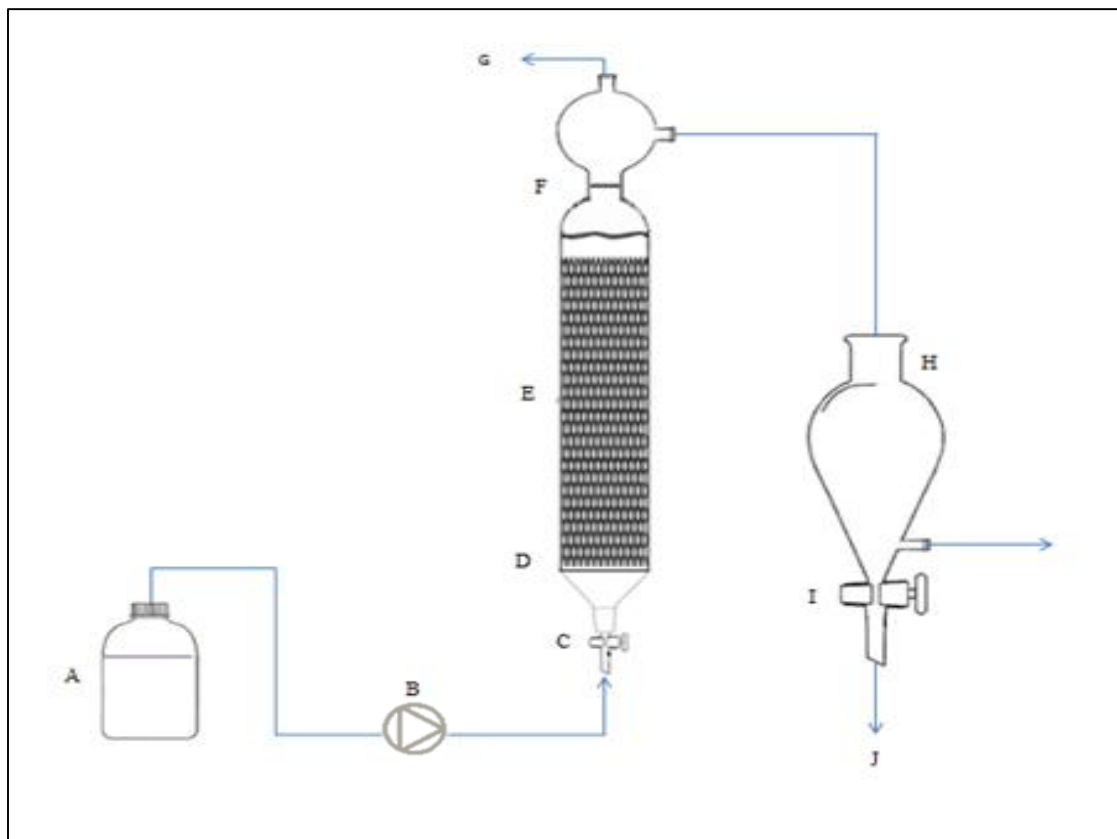
**Figura 4.** Levadura *Saccharomyces cerevisiae* INT-086. A, levaduras floculadas; B, levaduras no floculadas.



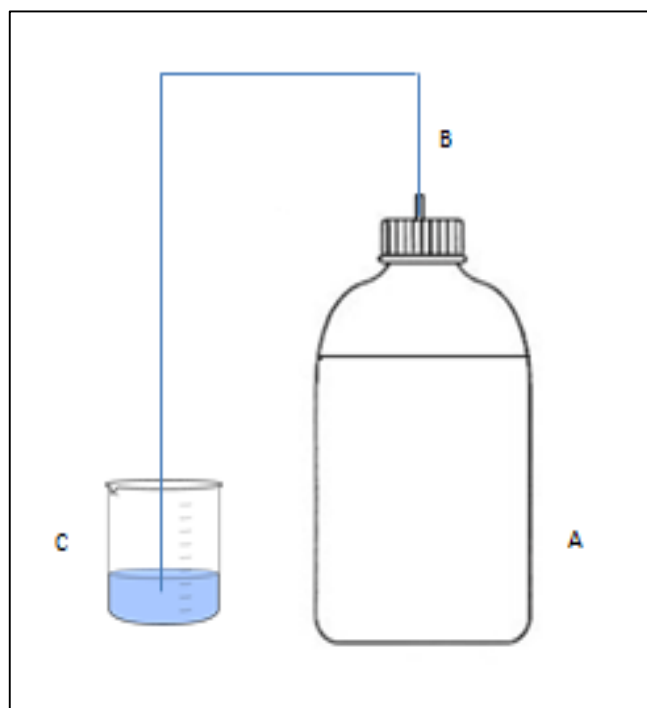
**Figura 5.** Esferificador®. Sistema utilizado para inmovilización de levaduras (*S. cerevisiae*) en matriz de nanocelulosa de tagua y alginato de sodio.



**Figura 6. Columna del SFSC.** A, empacutada con perlas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas en matriz de nanocelulosa y alginato de sodio; B, alimentación con mosto cervecero a la columna de fermentación



**Figura 7. Sistema de fermentación semi-continua.** A, botella de borosilicato con mosto cervecero; B, bomba peristáltica; C, llave para ingreso de mosto cervecero; D, filtro; E, columna de fermentación empaquetada con levadura inmovilizada; F, filtro de vidrio; G, escape de CO<sub>2</sub>; H, almacenamiento de producto fermentado; I, llave; J, salida de levadura precipitada; K, salida de producto final.



**Figura 8. Sistema de fermentación en batch con levaduras no inmovilizadas.** A, mosto cervecero con levadura *Saccharomyces cerevisiae* (CLQCA INT-086), no inmovilizada; B, escape de CO<sub>2</sub>; C, recipiente con solución de etanol al 70%.



**Figura 9.** Botella de boro silicato, donde se almacenaron las muestras extraídas del SFSC.



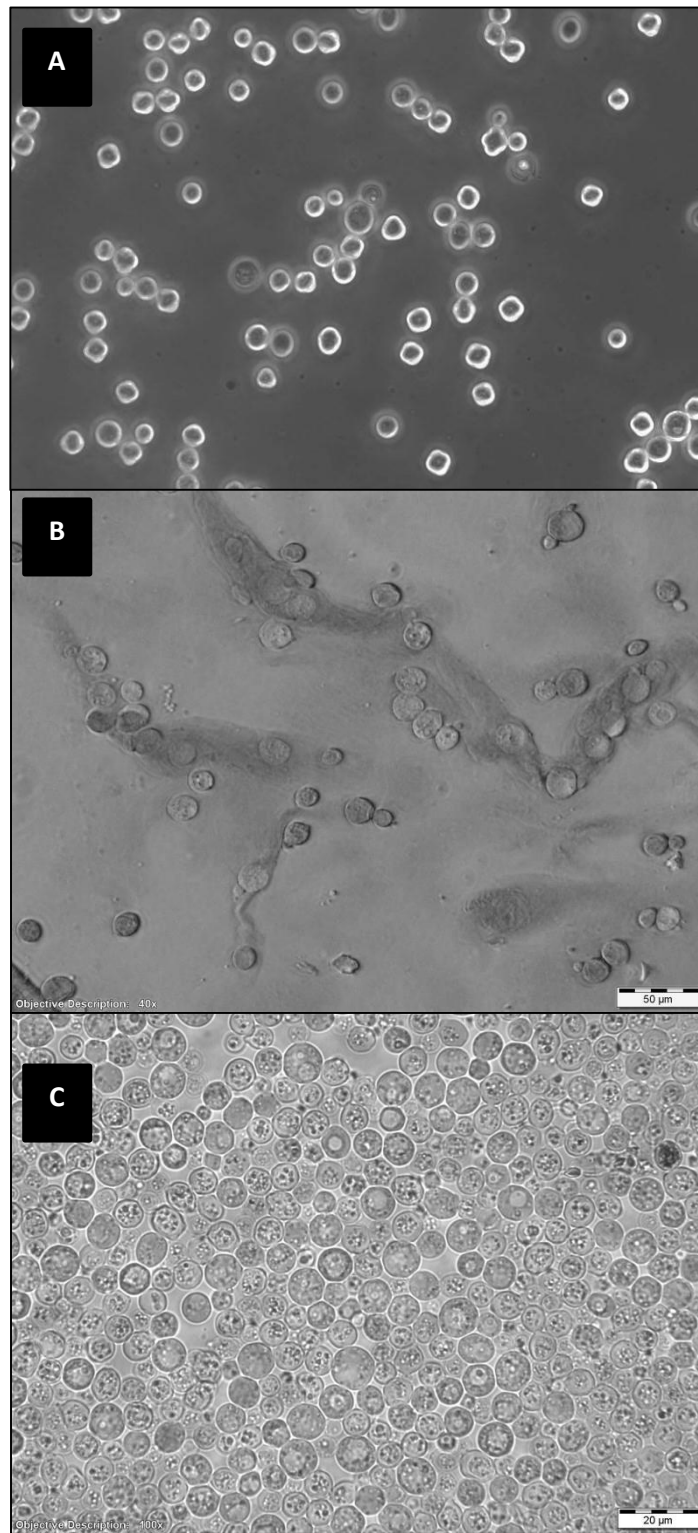
**Figura 10.** Mosto cervecero. Color dorado profundo (Deep gold).



**Figura 11.** Matriz de nanocelulosa fibrilada de tagua y alginato de sodio. Matriz de inmovilización de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*.



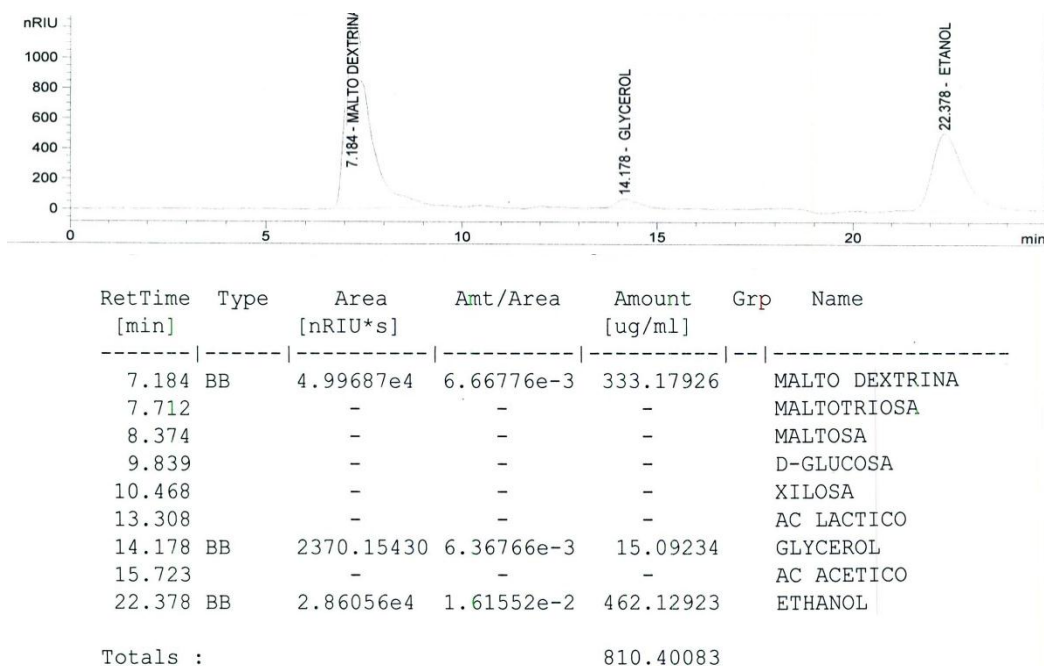
**Figura 12.** Perlas poliméricas con levaduras inmovilizadas.



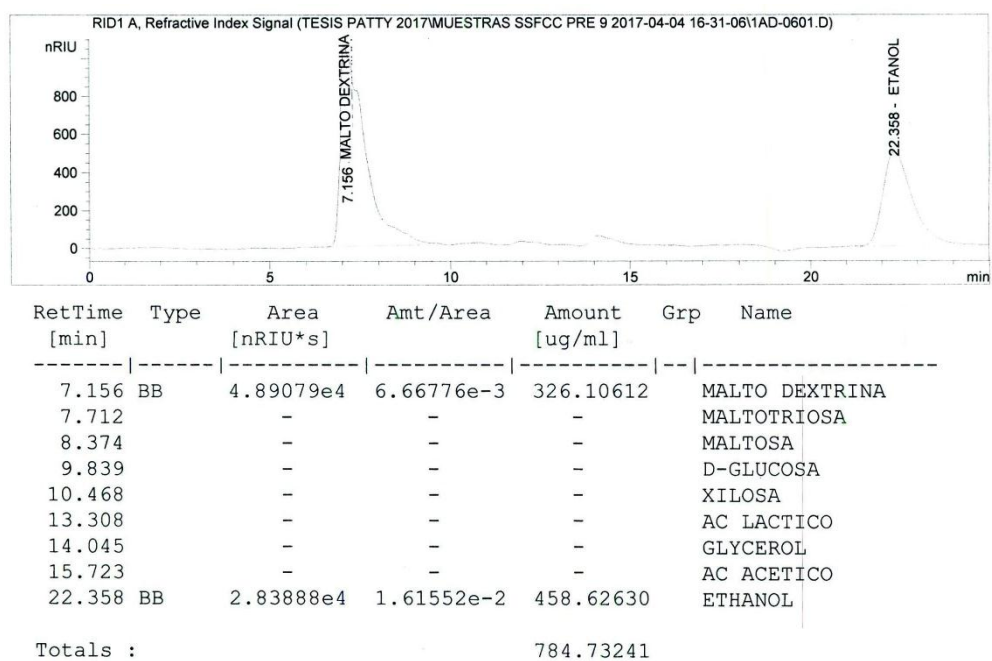
**Figura 13. *Saccharomyces cerevisiae* (INT- 086 CLQCA).** A, *S. cerevisiae* no inmovilizada. B, *S. cerevisiae* inmovilizada en matriz de nanocelulosa con alginato de sodio. C, *S. cerevisiae* inmovilizada después de fermentar.



**Figura 14. Medición de DF con hidrómetro.** A, Muestra tomada del sistema de fermentación semi-continua con DF: 1.008 g/L. B, Muestra tomada del sistema de fermentación en batch con DF: 1.006 g/L.



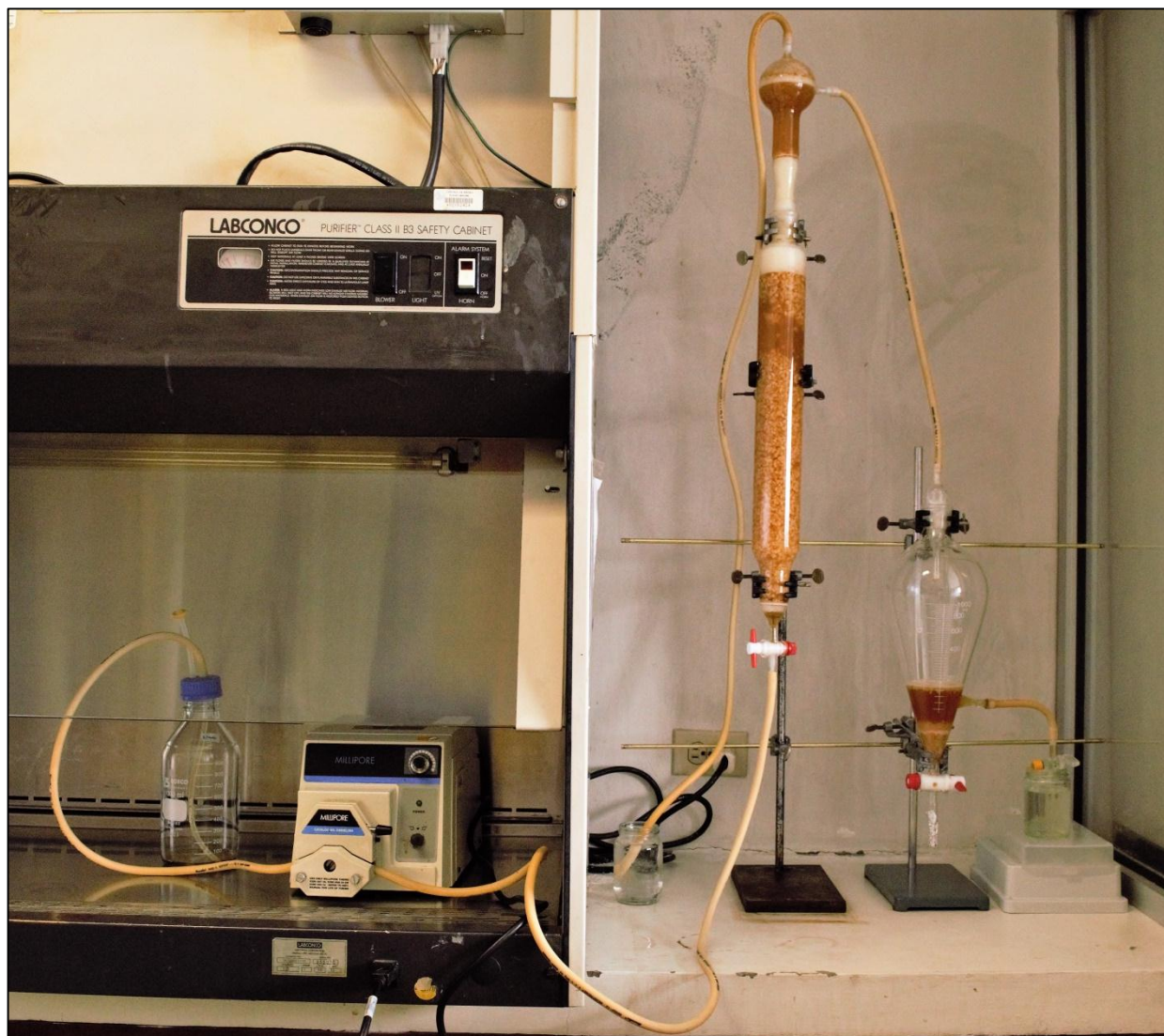
**Figura 15. Cromatograma de muestra del SFSC. Día de recolecta: 04/04/17.**



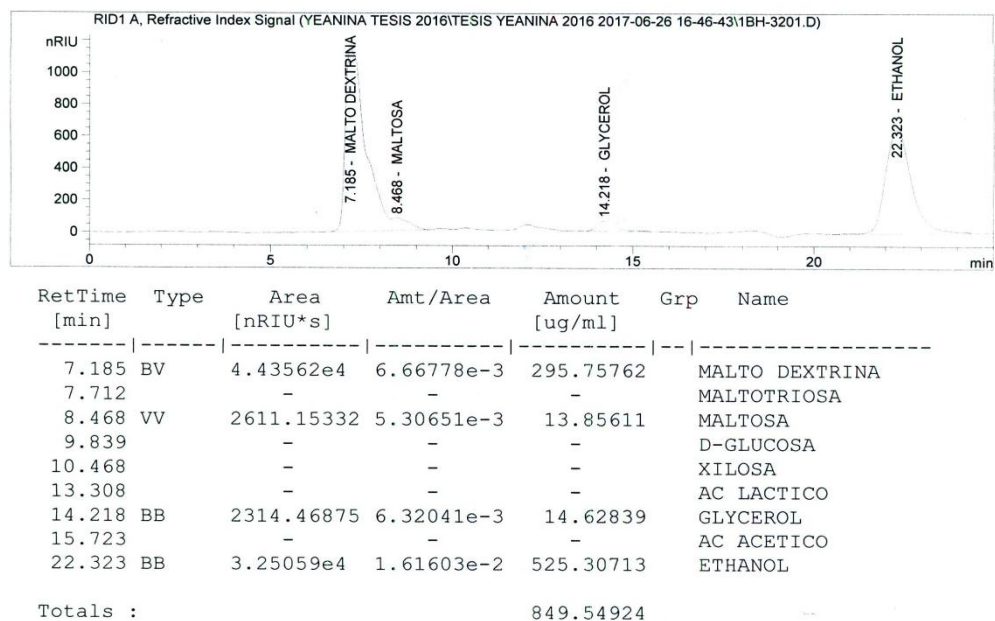
**Figura 16. Cromatograma de muestra del SFSC. Día de recolecta: 05/04/17.**



**Figura 17. Sistemas de fermentación en batch. A. día 1; B. 3 días; C, 5 días; D, 7 días; E, 9 días; F, 11 días; G, 13 días; H, 15 días.**



**Figura 18. SFSC con levaduras inmovilizadas en matriz mixta de nanofibras de celulosa y alginato de sodio.**



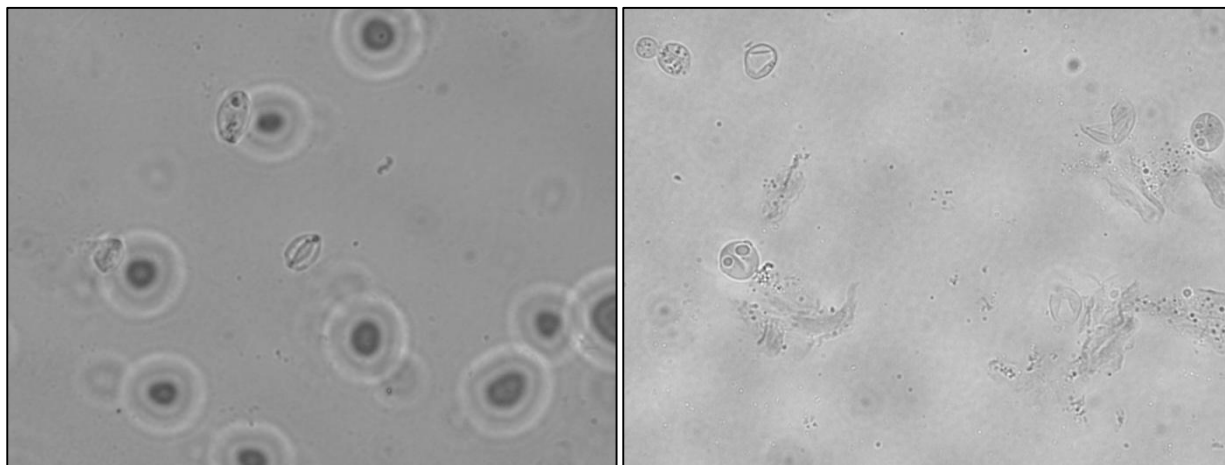
**Figura 19. Cromatograma de muestra del Sistema de fermentación batch.** Día de recolecta: 13/05/17. Décimo sexto día tras su fermentación.



**Figura 20. Sólidos y levaduras precipitadas en el embudo de separación del sistema semi-continuo.**



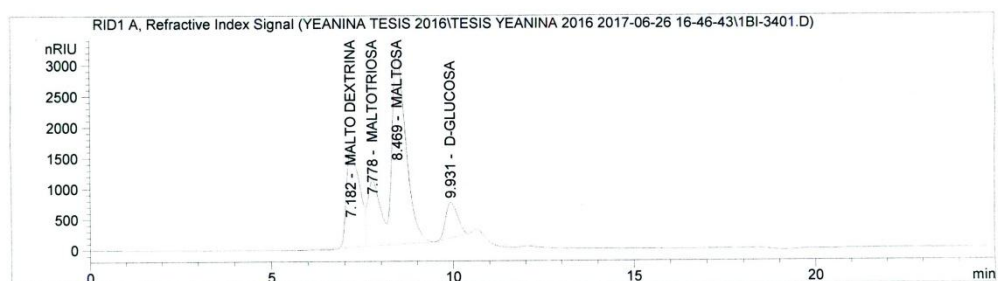
**Figura 21. Embudo de separación del SFSC.** En este se recolecta el producto fermentado.



**Figura 22. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* lisadas.** Muestras tomadas del precipitado del embudo de separación del sistema de fermentación semi-continuo.



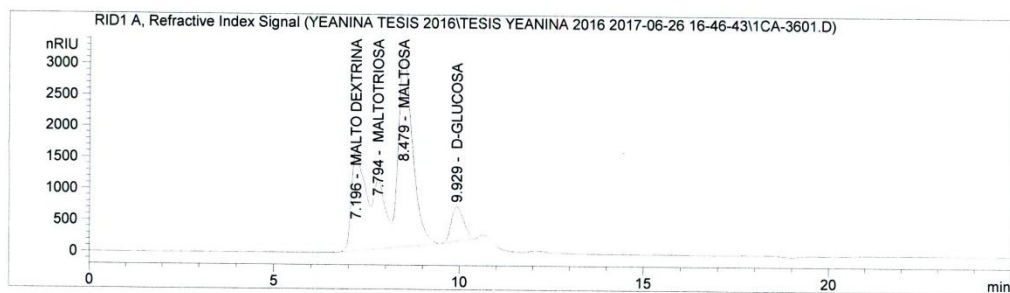
**Figura 23. Cerveza.** A, cerveza producida en sistema semi-continuo; B, cerveza producida en batch.



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.182	VV	3.90472e4	6.66778e-3	260.35810		MALTO DEXTRINA
7.778	VV	2.57804e4	5.84416e-3	150.66498		MALTOTRIOSIA
8.469	VB	8.36050e4	5.30651e-3	443.65101		MALTOSA
9.931	BB	1.33080e4	5.40952e-3	71.98966		D-GLUCOSA
10.468		-	-	-		XILOSA
13.308		-	-	-		AC LACTICO
14.045		-	-	-		GLYCEROL
15.723		-	-	-		AC ACETICO
22.129		-	-	-		ETHANOL

Totals : 926.66375

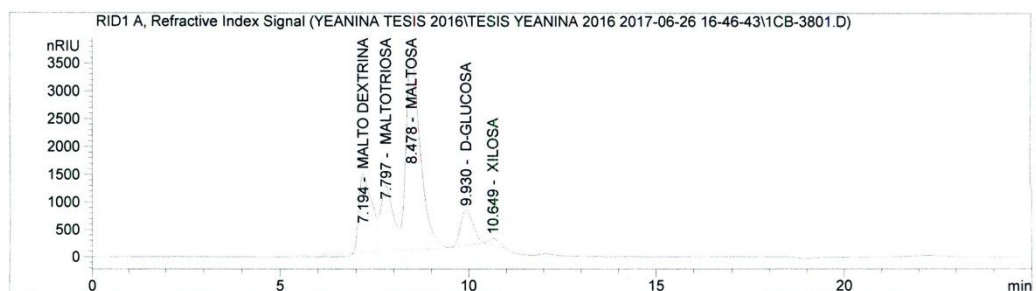
**Figura 24. Cromatograma de la concentración de azúcares para el mosto cervecero 1.**



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.196	BV	3.99231e4	6.66778e-3	266.19844		MALTO DEXTRINA
7.794	VV	2.57477e4	5.84416e-3	150.47399		MALTOTRIOSIA
8.479	VB	8.34648e4	5.30651e-3	442.90669		MALTOSA
9.929	BB	1.27832e4	5.40952e-3	69.15110		D-GLUCOSA
10.468	-	-	-	-		XILOSA
13.308	-	-	-	-		AC LACTICO
14.045	-	-	-	-		GLYCEROL
15.723	-	-	-	-		AC ACETICO
22.129	-	-	-	-		ETHANOL

Totals : 928.73023

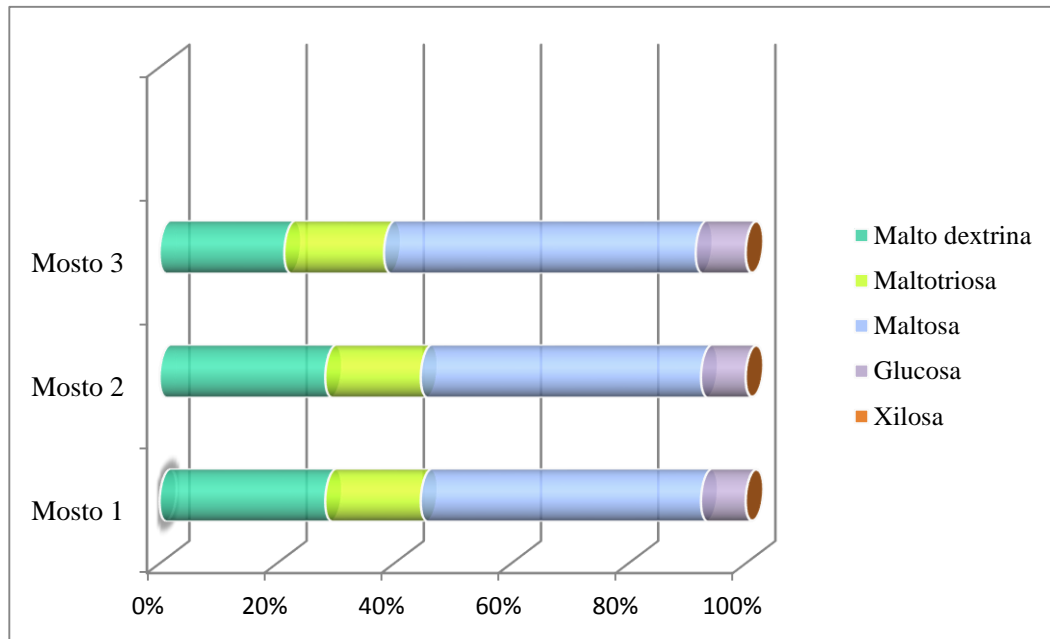
**Figura 25. Cromatograma de la concentración de azúcares para el mosto cervecero 2.**



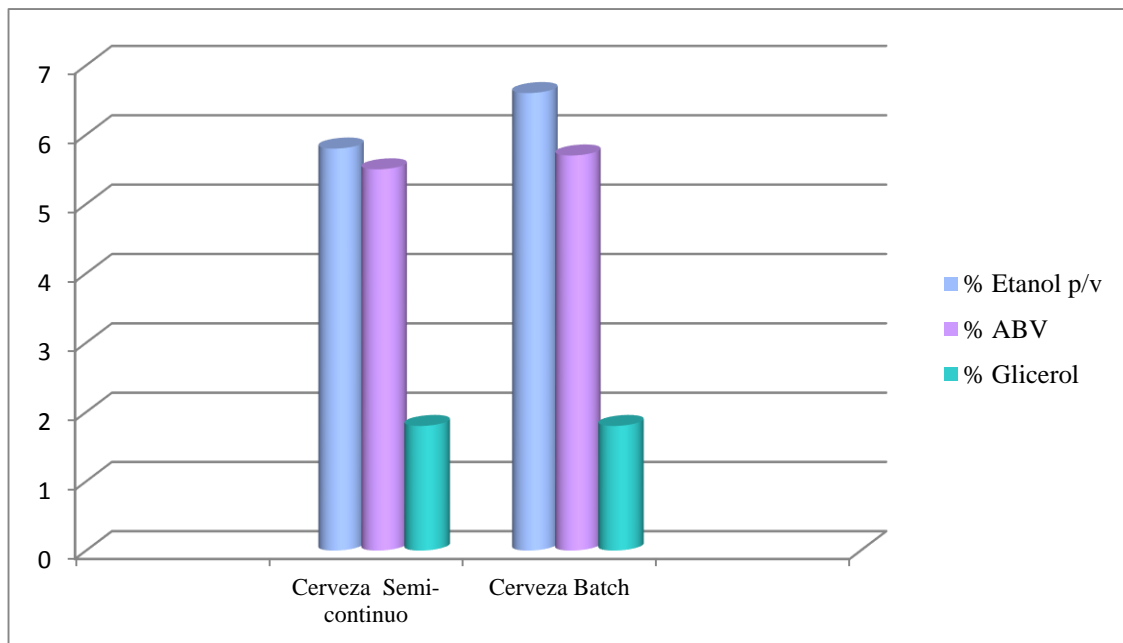
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.194	VV	3.00739e4	6.66778e-3	200.52585		MALTO DEXTRINA
7.797	VV	2.75268e4	5.84416e-3	160.87121		MALTOTRIOSIA
8.478	VB	9.45517e4	5.30651e-3	501.73951		MALTOSA
9.930	BB	1.48653e4	5.40952e-3	80.41431		D-GLUCOSA
10.649	BB	858.45093	6.01061e-3	5.15982		XILOSA
13.308	-	-	-	-		AC LACTICO
14.045	-	-	-	-		GLYCEROL
15.723	-	-	-	-		AC ACETICO
22.129	-	-	-	-		ETHANOL

Totals : 948.71070

**Figura 26. Cromatograma de la concentración de azúcares para el mosto cervecero 3.**



**Figura 27. Porcentaje de composición total de azúcares presentes en los mostos cerveceros elaborados.**



**Figura 28. Porcentaje de etanol y glicerol obtenido en SFSC y batch.**

## 11. TABLAS

**Tabla 1. Registro diario de alimentación con mosto cervecero, extracción de cerveza y medición del % APV mediante hidrometría en el SFSC.**

FECHA	REP.	mL ALI.	mL PRO.	DI		DF		% APV	OBSERVACIONES
				% AP	% AP	% AP	% AP		
28 MAR 17	N/A	1000 mL	N/A	N/A	% AP	N/A	% AP	N/A	Empaquetamiento de la columna (18:00)
29 MAR 17	N/A	N/A	N/A	N/A	% AP	N/A	% AP	N/A	Activación columna
30 MAR 17	N/A	1000 mL	700 mL	N/A	% AP	N/A	% AP	N/A	Retiro de producto diluido
31 MAR 17	1.1	500 mL	500 mL	1.050	% AP	1.008	% AP	5.5%	
1 ABR 17	1.2	500 mL	500 mL	1.050	6.5% AP	1.008	1% % AP	5.5%	
2 ABR 17	1.3	200 mL	200 mL	1.050	6.5% AP	NA	1% % AP	-	No se tomó la densidad por hidrometría debido a la falta de muestra
3 ABR 17	1.4	500 mL	500 mL	1.050	6.5% AP	1.008	N/A % AP	5.5%	
4 ABR 17	1.5	500 mL	500 mL	1.050	6.5% AP	1.008	1% % AP	5.5%	Se generó mucha presión interna causando que el balón del sistema salga volando. Se pasaron perlas
5 ABR 17	1.6	500 mL	500 mL	1.050	% AP	1.008	% AP	5.5%	
6 ABR 17	1.7	500 mL	500 mL	1.050	6.5% AP	1.008	1% % AP	5.5%	
7 ABR 17	1.8	500 mL	500 mL	1.050	6.5% AP	1.008	1% % AP	5.5%	Alta actividad en biorreactor, paso de perlas.
8 ABR 17	1.9	500 mL	500 mL	1.050	% AP	1.008	1% % AP	5.5%	
9 ABR 17	1.10	500 mL	350 mL	1.050	6.5% AP	1.008	1% % AP	5.5%	

**Tabla 1. Registro diario de alimentación con mosto cervecero, extracción de cerveza y medición del % APV mediante hidrometría en el SFSC (Continuación...)**

10 ABR 17	1.11	500 mL	500 mL	1.050	% AP 6.5%	1.008	% AP 1%	5.5%	
11 ABR 17	1.12	500 mL	500 mL	1.050	% AP 6.5%	1.008	% AP 1%	5.5%	
12 ABR 17	1.13	500 mL	450 mL	1.050	% AP 6.5%	1.008	% AP 1%	5.5%	
13 ABR 17		500 mL			% AP		% AP		
14 ABR 17		500 mL			% AP		% AP		
15 ABR 17		500 mL			% AP		% AP		
16 ABR 17		500 mL			% AP		% AP		
17 ABR 17		500 mL			% AP		% AP		
18 ABR 17		500 mL			% AP		% AP		
19 ABR 17	1.14	500 mL	500 mL	1.050	% AP 6.5%	1.010	% AP 1.3%	5.2%	
20 ABR 17	1.15	500 mL	500 mL	1.050	% AP 6.5%	1.014	% AP 1.8%	4.7%	
21 ABR 17	1.16	500 mL	450 mL	1.050	% AP 6.5%	1.010	% AP 1.3%	5.2%	
22 ABR 17	1.17	500 mL	500 mL	1.050	% AP 6.5%	1.008	% AP 1%	5.5%	
23 ABR 17	1.18	500 mL	500 mL	1.050	% AP 6.5%	1.008	% AP 1%	5.5%	
24 ABR 17	1.19	500 mL	500 mL	1.050	% AP 6.5%	1.008	% AP	5.5%	
25 ABR 17	1.20	500 mL	500 mL	1.050	% AP 6.5%	1.008	% AP 1%	5.5%	
26 ABR 17	2.1	500 MI	500 mL	1.050	% AP 6.5%	1.010	% AP 1.3%	5.2%	Comienzo de alimentación con mosto2
27 ABR 17	2.2	500 MI	500 mL	1.050	% AP 6.5%	1.008	% AP 1%	5.5%	

**Tabla 1. Registro diario de alimentación con mosto cervecero, extracción de cerveza y medición del % APV mediante hidrometría en el SFSC (Continuación)**

28 ABR 17	2.3	500 MI	500 mL	1.050	% AP	1.008	% AP	5.5%	
					6.5%		1%		
29 ABR 17	2.4	500 MI	500 mL	1.050	% AP	1.008	% AP	5.5%	
					6.5%		1%		
30 ABR 17	2.5	500 MI	500 mL	1.050	% AP	1.008	% AP	5.5%	
					6.5%		1%		
1 MAY 17	2.6	500 MI	500 mL	1.050	% AP	1.008	% AP	5.5%	
					6.5%		1%		
2 MAY 17	2.7	500 MI	500 mL	1.050	% AP	1.008	% AP	5.5%	
					6.5%		1%		
3 MAY 17	2.8	500 MI	500 mL	1.050	% AP	1.008	% AP	5.5%	
					6.5%		1%		
4 MAY 17	2.9	500 MI	500 mL	1.050	% AP	1.008	% AP	5.5%	
					6.5%		1%		
5 MAY 17	2.10	500 MI	500 mL	1.050	% AP	1.008	% AP	5.5%	
					6.5%		1%		
6 MAY 17	2.11	500 MI	500 mL	1.050	% AP	1.008	% AP	5.5%	
					6.5%		1%		
7 MAY 17	2.12	500 MI	500 mL	1.050	% AP	1.008	% AP	5.5%	
					6.5%		1%		
8 MAY 17	2.13	500 MI	500 mL	1.050	% AP	1.008	% AP	5.5%	Mayor cantidad de células libres en el sistema
					6.5%		1%		
9 MAY 17	2.14	500 MI	500 mL	1.050	% AP	1.008	% AP	5.5%	
					6.5%		1%		
10 MAY 17	2.15	500 MI	500 mL	1.050	% AP	1.008	% AP	5.5%	
					6.5%		1%		
11 MAY 17	2.16	500 MI	500 mL	1.050	% AP	1.008	% AP	5.5%	
					6.5%		1%		
12 MAY 17	2.17	500 MI	500 mL	1.050	% AP	1.008	% AP	5.5%	
					6.5%		1%		
3 MAY 17	2.18	500 MI	500 mL	1.050	% AP	1.008	% AP	5.5%	
					6.5%		1%		

**Tabla2. Verificación de consumo de azúcares fermentables en SFSC a las 24 horas.**

	<b>Muestra 1 ( 08/04/17)</b>	<b>Muestra 2 (09/04/17)</b>
	<b>ug/mL</b>	<b>ug/mL</b>
<b>MALTO DEXTRINA</b>	<b>333.2</b>	<b>326.1</b>
<b>MALTOTRIOSIA</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>MALTOSA</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>GLUCOSA</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>GLICEROL</b>	<b>15.1</b>	<b>-</b>
<b>ETANOL</b>	<b>462.1</b>	<b>458.6</b>

**Tabla 3. Fermentación batch vs. SFSC.**

	<b>SISTEMA FERMENTACIÓN BATCH</b>	<b>SFSC CON LEVADURAS INMOVILIZADAS</b>
<b>Tiempo de fermentación (1<sup>ra</sup> y 2<sup>ra</sup>)</b>	24-48 horas	>15 días
<b>Tiempo de maduración</b>	24-48 horas	2 semanas – 3 meses
<b>Tiempo de producción de cerveza</b>	4 días	1 mes
<b>Temperatura de fermentación</b>	18-24 °C	18-24 °C
<b>Temperatura de fermentación sugerida</b>	15-17°C (Rocheftort et al., 1986; Salud et al., 2016)	5-20°C (Brányik, Vicente, Cruz, & Teixeira, 2004)
<b>DI</b>	1.050 g/L	1.050 g/L
<b>DF</b>	1.008 g/L	1.006 g/L
<b>% Alcohol</b>	6.6 %	5.8 %
<b>% APV</b>	5.7%	5.5%
<b>Reutilización de levadura</b>	SI	NO
<b>Concentración celular floculada</b>	165-170 x10 <sup>6</sup> UFC/mL	60- 70 x10 <sup>6</sup> UFC/mL
<b>Presencia de diacetilo por catación</b>	NO	NO
<b>Presencia de alcoholes superiores por catación</b>	NO	SI
<b>Concentración de células inoculadas / inmovilizadas</b>	15 x10 <sup>6</sup> UFC/mL	15 x10 <sup>6</sup> UFC/mL
<b>Contaminación</b>	NO	NO
<b>% azúcares fermentados</b>	59.6%	63.58%
<b>% azúcares no fermentados</b>	-	1.62%

**Tabla 4. Porcentaje de APV por hidrometría en sistema batch.**

N° DE BATCH	DI 20°C	1.%APV aproximado	DF 20°C	2. % APV aproximado	% APV TOTAL
1	1.050	6.5 %	1.006	0,8 %	5.8 %
2	1.050	6.5 %	1.006	0,8 %	5.8 %
3	1.050	6.5 %	1.008	1 %	5.5 %
4	1.050	6.5 %	1.006	0,8 %	5.8 %
5	1.050	6.5 %	1.005	0,7 %	5.9 %
6	1.050	6.5 %	1.006	0,8 %	5.8 %
7	1.050	6.5 %	1.006	0,8 %	5.8 %

**Tabla 5. Promedio de % etanol.**

Paired Samples Statistics		
		Mean
Pair 1	HPLC_SFSC	5,8000
	HIDRO_SFSC	5,5000
Pair 2	HPLC_BATCH	6,3257
	HIDRO_BATCH	5,7714

**Tabla 6. Análisis estadístico.** Prueba de Wilcoxon para comparar el porcentaje de etanol obtenido por HPLC vs. Hidrometría, en sistemas batch y SFSC.

TEST STATISTICS <sup>A</sup>		
	HIDRO_SFSC - HPLC_SFSC	HIDRO_BATCH - HPLC_BATCH
Z	-1,183 <sup>b</sup>	-1,352 <sup>b</sup>
Asymp. Sig. (2-tailed)	,237	,176

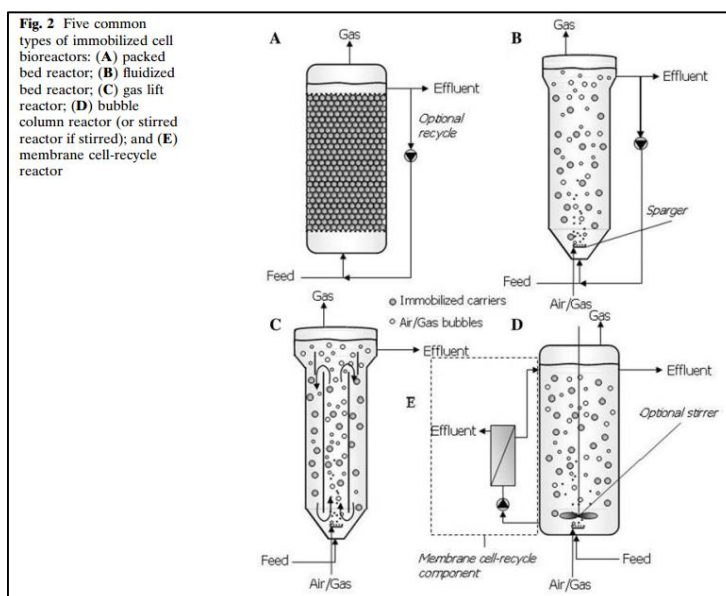
a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on positive ranks.

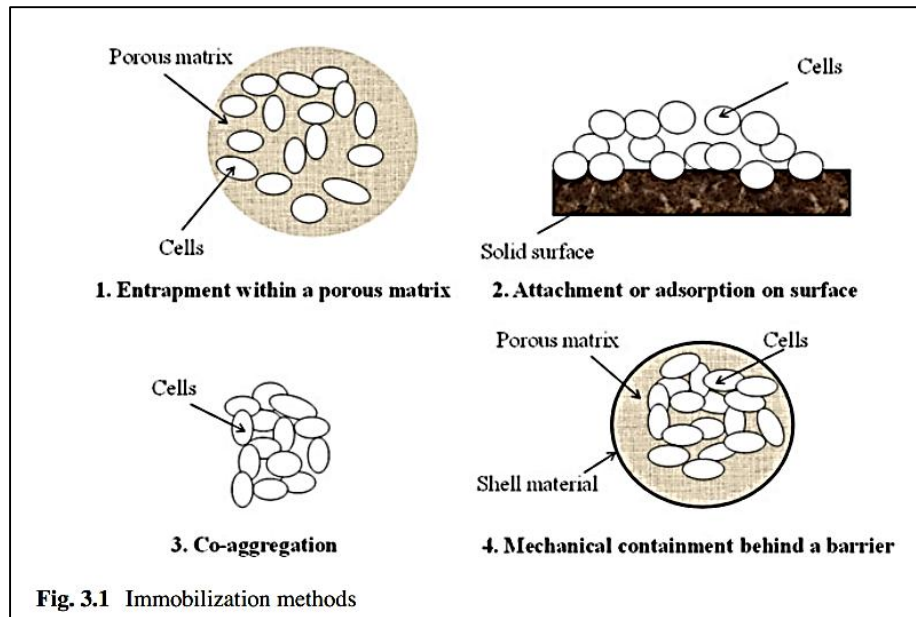
## 12. ANEXOS

Region	2015 Total Consumption (thousand kl)	633ml Bottle Equivalent (million bottles)	Growth Rate 2014–2015	Global Market Share
Japan	5,380	8,498.4	-1.5%	2.9%
Asia (excluding Japan)	57,920	91,500.8	-1.7%	31.5%
<b>Asia Total</b>	<b>63,300</b>	<b>100,000.0</b>	<b>-1.6%</b>	<b>34.4%</b>
<b>Europe</b>	<b>49,572</b>	<b>78,312.0</b>	<b>-0.6%</b>	<b>27.0%</b>
<b>Central and South America</b>	<b>28,325</b>	<b>44,746.9</b>	<b>1.7%</b>	<b>15.4%</b>
<b>North America</b>	<b>26,263</b>	<b>41,490.0</b>	<b>-0.1%</b>	<b>14.3%</b>
<b>Africa</b>	<b>12,952</b>	<b>20,461.5</b>	<b>2.0%</b>	<b>7.0%</b>
<b>Oceania</b>	<b>2,175</b>	<b>3,435.4</b>	<b>-0.9%</b>	<b>1.2%</b>
<b>Middle East</b>	<b>1,195</b>	<b>1,887.2</b>	<b>0.3%</b>	<b>0.7%</b>
<b>Global Total</b>	<b>183,780</b>	<b>290,331.8</b>	<b>-0.3%</b>	<b>100.0%</b>

Anexo 1. Consumo global de cerveza por regiones en el 2015. Fuente: KIRIN (2015).



Anexo 2. Tipos de biorreactores con células inmovilizadas. A, reactor de lecho relleno; B, reactor de lecho fluidizado; C, reactor de gas de elevación; D, reactor de columna de burbujas; E. reactor de células recicladas de membranas (Verbelen et al., 2006 ).



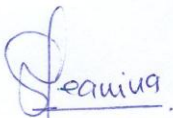
**Anexo 3. Técnicas de inmovilización celular.** 1, atrapamiento dentro de una matriz porosa; 2, adhesión a una superficie; 3, coagregación; 4, contención detrás de una barrera. (Karel, Libicki, & Robertson, 1985; Verbelen et al., 2006)

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Yeanina Estefania Cruz Velasco, con CC. 1718383340, autora del trabajo de graduación titulado: "Fermentación de mosto cervecero mediante un sistema semi-continuo con levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas en una matriz mixta de nanofibras de celulosa de tagua y alginato de sodio.", previa la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN CIENCIA BIOLÓGICAS** en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea entregado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 1 Agosto del 2017

f)   
CC# 1718383340