

UNIVERSIDAD DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA UTEC

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA



**EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE CERVEZA
ARTESANAL Y SU MEJORAMIENTO MEDIANTE
TÉCNICAS DE RECIRCULACIÓN DE
LEVADURAS EN LA ETAPA DE FERMENTACIÓN**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Para optar por el grado de bachiller en Ingeniería Química

AUTOR:

Ignacio Jesus Manfredo Ñañez Mouchard (ORCID: 0000-0002-0099-9323)

Código 201510137

ASESORA:

Ursula Rodríguez Zúñiga (ORCID: 0000-0001-5426-9871)

Lima-Perú

2020

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN.....	8
CAPÍTULO I.....	10
OBJETIVOS.....	10
1.1. Objetivo General.....	10
1.2. Objetivos Específicos	10
CAPÍTULO II.....	11
ESTADO DEL ARTE	11
2.1. Descripción del Proceso de Producción de Cerveza Artesanal	11
2.1.1. Molienda.....	11
2.1.2. Maceración	12
2.1.3. Fermentación	14
2.2. Equipos de Fermentación en la industria cervecera	16
2.2.1. Fermentadores	16
2.2.2. Algunos equipos accesorios.....	17
2.3. Tipos de levadura en el proceso de fermentación.....	17
2.4. Cinética de los bioprocesos y fermentación	19
2.4.1. Crecimiento celular en un sistema por lotes	19
2.4.2. Cinética del proceso de crecimiento celular	20
2.4.3. Simulación de la cinética de crecimiento	24
2.5. Alternativas de recirculación de levaduras	24

2.5.1. Repitching artesanal.....	24
2.5.2. Inmovilización celular	25
2.5.2.1. Definición de inmovilización	25
2.5.2.2. Tipos de inmovilización	26
2.5.2.2.1. Inmovilización activa.....	26
2.5.2.2.2. Inmovilización pasiva.....	26
2.5.2.3. Inmovilización de levaduras para fermentación alcohólica.....	27
CONCLUSIONES.....	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 2.1. Ecuaciones de Crecimiento Celular más utilizadas	21
Tabla 2.2. Tabla comparativa de resultados obtenidos	29
Tabla 2.3. Tabla de resultados de la producción de bioetanol a partir de harina de maíz utilizando simultáneamente sacarificación enzimática y fermentación alcohólica con células inmovilizadas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para medios suplementados y sin suplementar	34

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 2.1. Paila de Cocción conocida como Lauter Tun.....	13
Figura 2.2. Sistema de Agitación Interno de la Paila de Cocción.....	13
Figura 2.3. Proceso de elaboración de cerveza	15
Figura 2.4. Crecimiento celular en un proceso batch.....	20
Figura 2.5. Imágenes de las partículas inmovilizadas de polietenol (lado izquierdo de la figura) y alginato de calcio (lado derecho de la figura)	27
Figura 2.6. Gráfica de Concentración de Etanol vs Tiempo para las partículas de alginato de calcio	28
Figura 2.7. Gráfica de Concentración de Etanol vs Tiempo para las partículas de polietenol.....	28
Figura 2.8. Evolución de los ciclos uno, tres y cinco de fermentación de glucosa utilizando lechos de alginato de calcio como medio inmovilizador de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
Figura 2.9. Evolución de los ciclos uno, tres y cinco de fermentación de sucrosa utilizando lechos de alginato de calcio como medio inmovilizador de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
Figura 2.10. Evolución de los ciclos uno, tres y cinco de fermentación de glucosa utilizando lechos de alginato de calcio cubiertos con quitosano como medio inmovilizador de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
Figura 2.11. Evolución de los ciclos uno, tres y cinco de fermentación de sucrosa utilizando lechos de alginato de calcio cubiertos con quitosano como medio inmovilizador de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
Figura 2.12. Comparación de la fermentación alcohólica de jugo de fruto de anacardo con a) células libres y b) células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inmovilizadas con el bagazo del fruto de anacardo	33

RESUMEN

A nivel mundial, la industria de la cerveza artesanal ha crecido a una tasa aproximada del 20%, se estima que las ventas ascenderán a más de \$ 502.9 millones con miras al año 2025. La etapa más importante del proceso de fermentación es la conversión alcohólica del mosto mediante distintos tipos de levaduras (que se importan a nuestro país), por lo que uno de los gastos operativos más importantes radica en el costo de adquisición de este microorganismo. Por otro lado, la fermentación es el paso limitante más significativo dentro del proceso de producción de cerveza artesanal. Hoy en día, la recirculación y la reutilización de este biocatalizador despiertan un gran interés y abren la posibilidad de reducir los costos de producción y el tiempo de procesamiento manteniendo la calidad deseada, lo que resultaría en una optimización general del proceso. El presente trabajo de investigación es una revisión bibliográfica de las teorías que fundamentan el proceso de fermentación en la industria de producción de cerveza, así como de los métodos y técnicas utilizados para la recirculación de levaduras en dicho proceso debido a que diversas investigaciones reportan su elevada viabilidad. Estos conceptos permiten comprender el proceso en estudio con el que se trabaja y como abordar el futuro diseño del sistema de recirculación.

PALABRAS CLAVES:

Levadura; Fermentación; Sistema de recirculación; Producción de Cerveza artesanal; Bioseparaciones

ABSTRACT

THE CRAFT BEER PRODUCTION PROCESS AND ITS IMPROVEMENT THROUGH YEAST RECIRCULATION TECHNIQUES IN THE FERMENTATION STAGE

Worldwide, the craft beer industry has grown in an approximate rate of 20%, it is estimated that the sales will ascend over \$ 502.9 million by 2025. A fermentation process's central step is the alcoholic conversion of wort mediated by brewer's yeasts (which are imported to Peru), so one of the most important operational expenditures lies in the cost of this microorganism. On the other hand, fermentation is the most influential limiting step in the craft beer production process. Nowadays, the recirculation and reuse of this biocatalyst has a great interest because it opens the possibility of reducing production costs and time of processing without making a major impact in the desired beer quality, resulting in an overall process optimization. The present research work is a literature review of the theory behind the fermentation process in beer production industry as well as the methods and techniques used for the recirculation of yeasts in this process. Furthermore, it was found that these cells that are planned to be recycled are , in various investigations, still viable. This, undoubtedly serves to understand the processes with which it is planned to work and how to approach the future design of the recirculation system.

KEYWORDS:

Yeast; Fermentation; Recirculation System; Craft Beer Production; Bioseparations

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la industria de producción de cerveza artesanal o artesana se encuentra en crecimiento a nivel global y nacional. Se estima que para el 2025 llegue a valer alrededor de los \$ 502.9 millones y crezca a una tasa de 19.9% a nivel mundial [1] y nuestro país no es la excepción. Durante el proceso de elaboración de este producto existen diversas operaciones y procesos unitarios entre los cuales se encuentra la fermentación [2]. En este proceso se inoculan levaduras al mosto y estas proceden a alimentarse de la maltosa (y otros azúcares del mosto), generando, así como productos alcohol y dióxido de carbono [3]. Al ser un organismo vivo y unicelular, la levadura requiere de bastante cuidado al momento de utilizarse, es por eso que se debe invertir en mantener las condiciones de operación como por ejemplo la temperatura a la cual se realiza la fermentación. De otro modo, el producto que buscamos sufrirá alteraciones en sus propiedades sensoriales y su calidad no será la esperada [4].

Según el portal web de Inland Island Yeast Laboratories, uno de los laboratorios más especializados en cultivo y venta de levadura para la industria de cerveza artesanal, la levadura es costosa pero necesaria. Por ejemplo, si se desea tener una producción media de alrededor de 15 barriles de cerveza se necesitaría invertir sólo en levadura alrededor de \$ 420 exclusivamente para ese lote [5]. Cabe recalcar que en un lote se produce solo un tipo de cerveza.

Hoy en día, los maestros cerveceros tratan de recircular y reaprovechar la levadura a partir de un proceso llamado purga. La purga consiste en la apertura de una válvula y retirada de material compuesto por harina de los granos utilizados, del lúpulo y de la levadura misma, que por gravedad han decantado en el fondo del tanque de fermentación convirtiéndose en material de descarte. En esta etapa del proceso se pierde no sólo cerveza sino también levaduras que ya se encuentran adaptadas en fase exponencial de crecimiento y pueden utilizarse para otro lote de producción [6]. Adicionalmente la levadura se reproduce con relativa facilidad y la población de esta cepa puede aumentar en cuestión de horas. Con el objetivo de recircular y aprovechar la levadura, pequeños productores de cerveza artesanal en EE. UU., realizan una técnica llamada “repitching” [7], en donde se deja decantar el sedimento producido por un lote de fermentación en

frascos esterilizados. Luego, las fases deseadas (líquido y levadura) son trasvasadas en sucesivas oportunidades (número empírico basado en la experiencia del productor) y se culmina el proceso almacenando la levadura en un frasco en donde recibe el nombre de “starter” o iniciador de levadura para el siguiente lote. Sin embargo, uno de los problemas con este método es que no se tiene la eficiencia deseada y las posibilidades de contaminación incrementan significativamente. La contaminación genera que las levaduras produzcan especies químicas no deseadas como cetonas, aldehídos y ésteres. Estas especies químicas cambian las propiedades organolépticas y la calidad de la cerveza que se desean. Así surge la necesidad de crear un sistema que permita mantener las levaduras viables y reduzca al mínimo la posibilidad de contaminación de estas [8]. Además, uno de los retos es que este sistema se adapte conforme a los volúmenes de producción y sea rentable.

En la presente investigación se hace una revisión bibliográfica de las teorías que fundamentan el proceso de fermentación en la industria de producción de cerveza, así como de los métodos y técnicas utilizados para la recirculación de levaduras en dicho proceso. Esto, con el objetivo de sentar las bases para el diseño de un sistema de recirculación de levaduras que permita que las empresas productoras de cerveza artesanal disminuyan los costos asociados a la compra de levadura e incrementen su productividad a partir de la misma cepa de levadura.

CAPÍTULO I

OBJETIVOS

1.1 Objetivo General:

Analizar y sistematizar los principales conceptos de bioprocesos aplicables para un diseño de un sistema de recirculación de levaduras para la producción de cerveza artesanal.

1.2 Objetivos Específicos:

- Evaluar las configuraciones de los procesos de recirculación que se realizan en la industria mencionada líneas arriba y también los métodos y técnicas que se utilizan en otros procesos fermentativos.
- Conocer los parámetros cinéticos y de operación de los procesos fermentativos y como estos impactan en la producción de cerveza artesanal.

CAPÍTULO II

ESTADO DEL ARTE

2.1. Descripción del Proceso de Producción de Cerveza Artesanal

El proceso de elaboración de cerveza artesanal está bastante estandarizado a nivel mundial. La mayoría de las cervecerías, artesanales y en escalas mayores, utilizan procesos muy similares y en líneas generales varían muy poco. El proceso consta de 3 grandes etapas: Molienda, Maceración/Cocción y Fermentación/Maduración. Cada uno de los procesos es importante porque si falla alguno la calidad de la cerveza se ve afectada directamente. Sin embargo, la etapa central es la etapa de fermentación. En las siguientes secciones se detallará cada proceso, así como la importancia de la fermentación.

2.1.1. Molienda

La molienda es la primera etapa del proceso, donde se utiliza un molino de rodillos, aquí se reduce el tamaño de partícula de la cebada, demás cereales (arroz, avena, trigo, kiwicha, etc.) y otros ingredientes que se vayan a utilizar para elaborar la cerveza que se desea preparar. El objetivo de reducir el tamaño de partícula es partir el grano de cereal para que el almidón de la malta que se encuentra en los granos de cebada se extraiga. Esto permitirá que las enzimas de la malta puedan penetrar en el almidón de una manera más fácil y eficiente durante el proceso de maceración [4][9]. Una buena molienda es clave para poder separar los sólidos en las etapas posteriores del proceso. Si las partículas son muy finas se quedarán suspendidas en el líquido y se tendrá que recurrir a otros procesos adicionales a la decantación, como la centrifugación, para poder retirar estos sólidos mencionados. Se debe seleccionar un tamaño de partícula determinado para que el producto del proceso de molienda sea homogéneo, estos tamaños varían entre 53-150 micras [10]. Los tiempos de molienda dependen de la cantidad de materia prima que se tenga.

2.1.2. Maceración

En el proceso de maceración, se juntan los cereales molidos provenientes de la molienda y el agua previamente ablandada. Aquí se eleva la temperatura en tres etapas distintas. A este proceso se le conoce como maceración escalonada. La primera etapa se realiza a 55°C y se conoce como escalón proteico. En esta etapa se activan diversas enzimas como la beta-glucanasa, las peptidasas y las proteasas, presentes en los cereales, que se encargan de producir mostos visualmente más claros y con un mayor aroma y sabor. Las enzimas peptidasas y proteasas al momento de activarse producen una degradación de las proteínas de cadena larga por hidrólisis. Esta degradación de proteínas también genera que exista amino nitrógeno libre (FAN por sus siglas en inglés), compuestos que ayudan a que las levaduras se reproduzcan aguas abajo en el proceso [4][9].

La segunda etapa del escalón se conoce como escalón de sacarificación en el que los azúcares (maltosas, maltotriosas, etc.) se convierten en azúcares simples y con un potencial fermentable mucho mayor. La hidrólisis de estos azúcares está a cargo de las enzimas Alfa- y Beta-Amilasas presentes en los cereales y liberadas después de la molienda de los mismos. Por ejemplo, la enzima beta-amilasa se encarga de hidrolizar las moléculas de la maltosa pudiendo romper dos enlaces a la vez de la cadena polisacárida, siendo la temperatura de operación en esta etapa de 62°C aproximadamente. La alfa-amilasa se encarga de reducir los almidones solubles e insolubles hidrolizando la cadena en porciones menores de polisacáridos como las maltotriosas y dextrinas. La beta-amilasa se encarga de terminar de hidrolizar las cadenas que deja como producto la alfa-amilasa en azúcares fermentables. La tercera y última etapa del escalón es el escalón de dextrinas que se realiza a 71°C buscando hidrolizar la mayor cantidad posible de dextrinas con la enzima isomaltasa, estas moléculas son oligosacáridos de difícil digestión para las levaduras en etapas posteriores de fermentación. [4][9]

Al final de la maceración escalonada se realiza un proceso llamado *mash out* que se realiza a una temperatura de 75°C y frena las reacciones de hidrólisis (conversión enzimática de los almidones) que se han expuesto anteriormente. Aquí también se produce una reducción de la viscosidad haciendo que el mosto fluya mejor producto de

la gelatinización de algunos almidones y que se favorezca, posteriormente, la separación de sólidos.

Luego se realiza un lavado que se hace a 85 °C en el que los sólidos son concentrados en el fondo de la paila de cocción y unas paletas de agitación ubicadas en la base de la paila asisten el proceso de filtrado del mosto [4]. Se puede observar en las Figuras 2.1 y 2.2 la paila de cocción y el sistema de agitación respectivamente.



Figura 2.1. Paila de Cocción conocida como Lauter Tun. [11]

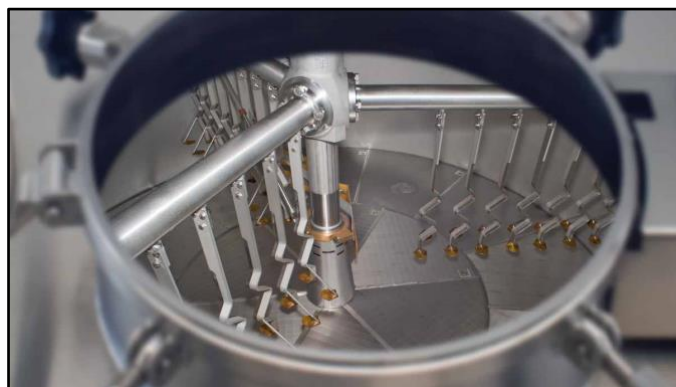


Figura 2.2. Sistema de Agitación Interno de la Paila de Cocción. [11]

Una vez hecho el *mash out* se procede a la cocción, etapa en la cual se hace hervir el mosto y se añade el lúpulo con la finalidad de que las altas temperaturas faciliten la

extracción de sus componentes. El lúpulo contiene alfa-ácidos orgánicos que con el aumento de temperatura se isomerizan y se convierten en iso-alfa-ácidos, responsables de darle el amargor y aroma al mosto [4]. Luego el mosto es enfriado en un intercambiador de calor de placas que utiliza como fluido de enfriamiento agua glicolada al 30%wt hasta una temperatura de 19°C aproximadamente, posterior a la etapa de enfriamiento se puede iniciar la etapa de fermentación.

2.1.3. Fermentación

En esta etapa, la fermentación, sucede la principal reacción bioquímica de todo el proceso: la fermentación. Los microorganismos protagonistas son las levaduras. La fermentación tiene una duración variable según el tipo de cerveza que se desee preparar. Las levaduras metabolizan los azúcares, utilizando la enzima invertasa presente en su organismo, del mosto para producir etanol y dióxido de carbono. De esta manera el mosto se convierte, finalmente, en cerveza. Durante este proceso las levaduras floculan y los sólidos que han quedado de la etapa de maceración se decantan hacia la base del fermentador. Luego de pasado el tiempo deseado de acuerdo a la maduración de la cerveza (puede ser dentro del fermentador) el producto es retirado, filtrado y envasado para su posterior venta.

En la Figura 2.3 se elaboró un diagrama de flujo del proceso (PFD, por sus siglas en inglés) del proceso de elaboración de cerveza. En el diagrama se pueden observar los principales equipos del proceso como el molino, las pailas de cocción, el fermentador, el intercambiador de calor de placas, las bombas centrífugas y el filtro. Adicionalmente se pueden visualizar también las válvulas y los impulsores de fluido que se utilizan, así como también los servicios auxiliares, la caldera para la producción de agua caliente y vapor, el chiller para la producción de agua y agua glicolada de enfriamiento y el sistema de ablandamiento de agua.

Proceso de Producción de Gold Cerveza Artesanal S.R.L.

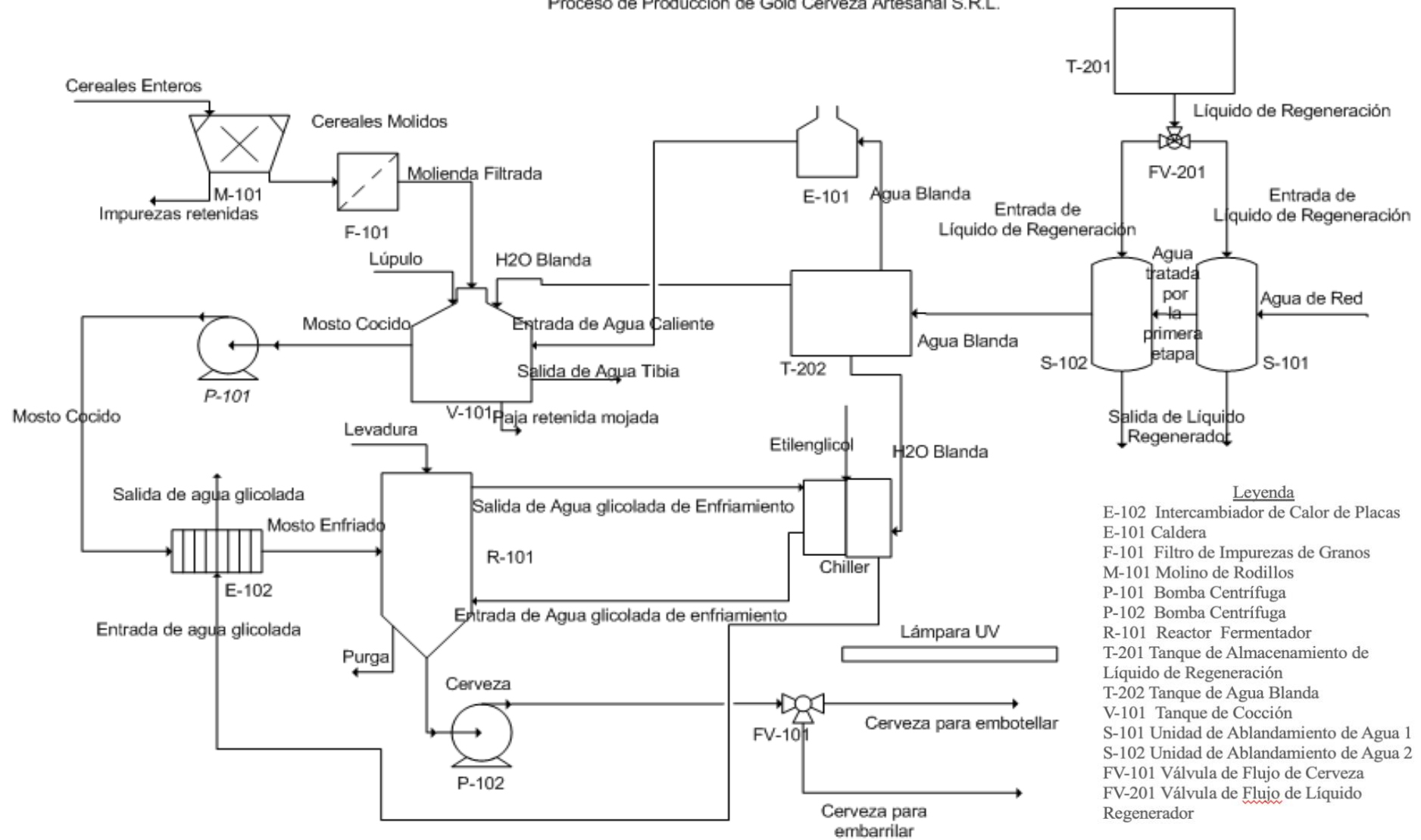


Figura 2.3. Proceso de elaboración de cerveza

2.2. Equipos de Fermentación en la industria cervecera

2.2.1. Fermentadores

Debido a que la fermentación es un paso clave en el proceso de elaboración de cerveza artesanal, uno de los equipos más importantes es el fermentador. Este equipo es el lugar en donde se lleva a cabo la conversión de mosto en cerveza (reacción principal de todo el proceso). Dicha conversión va a depender de la cantidad de azúcares que se encuentren en el mosto. Este parámetro está ligado con la calidad de cebada que se agrega al proceso y como se han realizado los escalones de cocción/maceración, la temperatura a la que se lleva a cabo la fermentación, el pH, la cantidad de etanol que se genere y el tipo de levadura que se vaya a utilizar.

Con el objetivo de realizar un reactor de fermentación para cerveza con poco volumen de producción, en [12], se diseñó un equipo cuya función era proteger el mosto de cualquier tipo de contaminación y así asegurar una fermentación eficiente y de calidad. Este equipo contaba con un solo módulo en el cual se acoplaron sensores de gravedad específica, de alcohol y de temperatura. La geometría del fermentador era cilindro-cónica. El cono, con un ángulo de inclinación de 60° , de la base se utilizó en esta investigación para poder asegurar una decantación de los sólidos y que estos se pudieran desechar de una manera más rápida y no se quedaran en el producto final.

Por otro lado, en [13] se diseñó un equipo de fermentación en el cual se controlaba el calentamiento o enfriamiento en base al nivel del mosto dentro del fermentador. De esta manera se protegía a las levaduras de un incremento temperatura que pudiese resultar perjudicial para su crecimiento y también que se genere una desviación del valor de temperatura al que opera el sistema. De esta forma, como se mencionó anteriormente, no solo se prevenía su destrucción a causa de los efectos térmicos sino también se lograron fermentaciones ininterrumpidas teniendo una actividad elevada y un proceso más eficiente. Por último, esta estabilidad en la fermentación, según [13] hace que la calidad en el sabor de la cerveza no se vea afectada. Del mismo modo que en [12], la geometría del fermentador era cilindro-cónica por las mismas razones descritas anteriormente.

En [14] se propone un sistema para el procesamiento de pequeños volúmenes de producción. En este sistema se propone un solo equipo para realizar todo el proceso de elaboración de cerveza. Mediante una interfaz electrónica se instruye al usuario según

algunas características programadas para cada etapa del proceso en el sistema operativo del equipo. Al realizarse en un solo equipo las posibilidades de contaminación disminuyen de manera sustancial ya que no existen muchas partes en las que la materia prima tenga contacto con el exterior. Del mismo modo que en [12] y en [13], la geometría del fermentador era cilindro-cónica. El proceso de elaboración de cerveza en esta investigación era optimizado desde el punto de vista séptico. Al igual que en [13], la actividad elevada de las levaduras es sustancial para poder tener un proceso eficiente.

2.2.2. Algunos equipos accesorios

Todos los procesos de fermentación de cerveza requieren de bombas que impulsen el fluido como se puede observar en las patentes realizadas por [12], [13] y [14].

En [13], [15], y en la industria se utiliza una chaqueta de enfriamiento acoplada al fermentador para poder controlar que la temperatura de fermentación sea constante. De esta manera, se asegura su eficiencia y se preserva las levaduras como ya se mencionó anteriormente. Además, el uso de bombas centrífugas según [16] es necesario para poder controlar los flujos de entrada y/o salida de cerveza fermentada según sea el proceso.

En [16] se propone un sistema de producción de cerveza a partir de granos integrales en donde se utiliza un sistema de bombeo y de control de temperatura como en [12], [13], [14] y [15]. Las bombas del mismo tipo también impulsarán los fluidos de enfriamiento y calentamiento que se requieran para mantener las condiciones deseadas en el fermentador y en todo el proceso.

2.3. Tipos de levadura en el proceso de fermentación

Las levaduras son los microorganismos que se encargan de realizar la fermentación, y es gracias a su actividad metabólica y su manera de llevar a cabo la conversión de los azúcares del mosto en etanol y dióxido de carbono, que se obtiene la cerveza. Existen múltiples cepas de levadura en el mundo, pero principalmente se usan dos. Esta sección aborda brevemente los orígenes de las levaduras, las cepas usadas en la industria cervecera y los tipos de cerveza producto del uso de distintas cepas de levadura.

En [17], se investigó el proceso de domesticación de levaduras a lo largo de la historia y se trató de clasificar los tipos de levaduras más utilizadas en la producción de pan, cerveza y vino. Para analizar su cambio en el tiempo se tuvo que estudiar cuales eran los tipos de levadura que se utilizaban para elaborar los productos mencionados. Para la producción de cerveza, los resultados mostraron que existen dos tipos de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces carlsbergensis* que producen dos clases de cerveza, las cervezas tipo Ale y las cervezas tipo Lager.

Por un lado, las cervezas tipo Ale que se producen utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fermentan a una temperatura en el rango de 15-24° con la finalidad de que las células tengan una actividad más elevada. Posteriormente se presentarán otras investigaciones en donde este parámetro de actividad de las células es muy importante y como afecta este al producto final. Se encontró también que este tipo de cerveza es la más antigua, el cultivo de la levadura data probablemente desde el año 6000 AC.

Por otro lado, las cervezas tipo Lager utilizan otro tipo de Levadura llamado *Saccharomyces pastorianus* (también conocida como *Saccharomyces carlsbergensis*) y la fermentación se realiza en un rango de temperatura de 5-14°C. Este tipo de cerveza también se produce hace más de mil años comenzando aproximadamente en la edad media.

En [18] se investigó la resistencia al estrés y el rendimiento de fermentación de las células de *Saccharomyces carlsbergensis*. Los resultados mencionan que esta levadura es la que se utiliza para la producción de cerveza tipo lager debido a su capacidad de producir etanol a temperaturas más bajas que las utilizadas en la fabricación de cerveza tipo Ale y su estabilidad a esas condiciones.

De las investigaciones expuestas, se puede concluir que la diferencia entre un tipo de cerveza y otro está principalmente en el tipo de levadura que se utilice y la temperatura a la cual se realice la fermentación, de acuerdo con la modificación de estos parámetros se obtendrían cervezas distintas con diversas propiedades organolépticas y contenido alcohólico.

Para efectos del diseño de un sistema de recirculación de levaduras, es muy importante conocer la influencia de estos microorganismos en el proceso y qué variables

son las que se deben monitorear con mayor atención para poder cuidarlos de una posible contaminación y/o destrucción.

2.4. Cinética de los bioprocesos y fermentación

2.4.1. Crecimiento celular en un sistema por lotes

Es de suma importancia entender como sucede el crecimiento de las células en un proceso por lotes para poder estimar como irá variando la población celular a lo largo del proceso de fermentación. Esto tiene un impacto directo en la calidad deseada de la cerveza, en las condiciones microambientales generadas durante el proceso y en el tipo de cerveza que se desea producir.

En [19] y [20], se muestra el crecimiento típico de las células en un proceso por lotes. Como resultado se observa primero una fase de adaptación en la cual la célula se adecúa al nuevo ambiente y el aumento de biomasa microbiana es muy pequeño o casi inexistente. Luego, se observa un período de aceleración en donde el crecimiento exponencial de la biomasa microbiana comienza. Acto seguido, inicia la fase de crecimiento exponencial en el cuál la velocidad de crecimiento alcanza su máximo valor. Después, inicia la desaceleración del crecimiento celular, debido al consumo de nutrientes o la producción de especies químicas inhibitoras del crecimiento. Por otro lado, inicia la fase estacionaria en donde el crecimiento cesa y se entra a una etapa de tipo meseta.

Finalmente, el proceso culmina con la fase de muerte en la cual las células pierden viabilidad y sufren lisis. Este proceso se puede observar en la Figura 2.4. y las fases de adaptación (lag), crecimiento exponencial (exponential), estacionaria (stationary) y muerte (death).

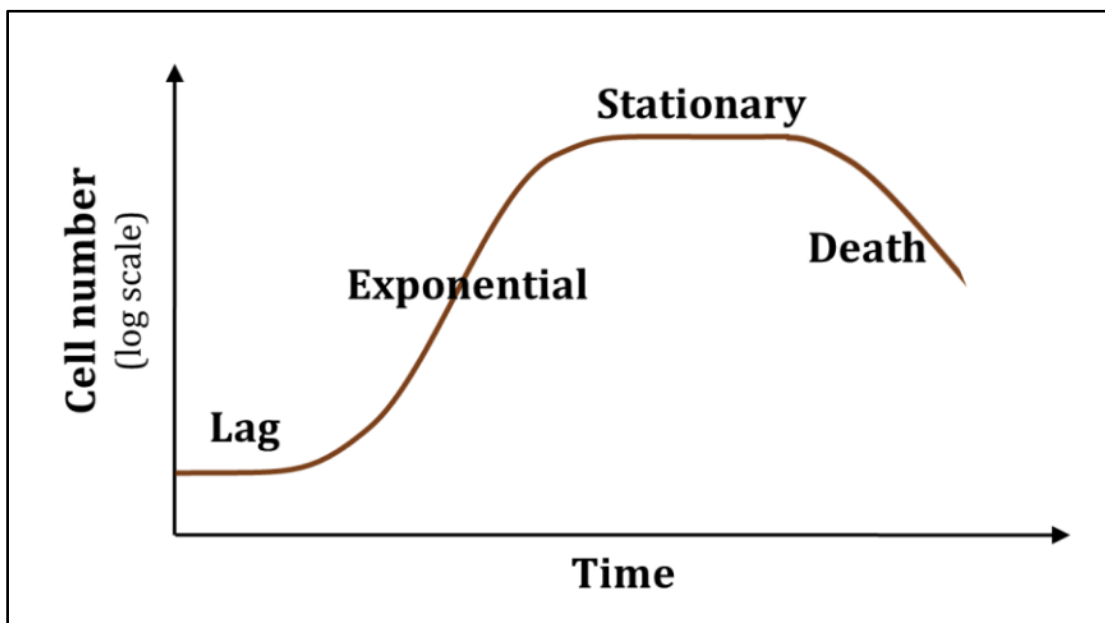


Figura 2.4. Fases del Crecimiento celular en un proceso batch. [20]

Este proceso fue observado por [21], quien propuso y analizó el diseño de un biorreactor para la fabricación de cerveza mostrando que la última etapa en [19] correspondiente a la muerte de las levaduras, coincide con la floculación de levaduras en donde las células se depositan en el fondo del tanque.

2.4.2. Cinética del proceso de crecimiento celular

El crecimiento y desarrollo celular es un factor para tener en cuenta al momento de diseñar cualquier tipo de fermentador o biorreactor en general. Por ende, el estudio de la cinética y su descripción realizada mediante modelos matemáticos debe ser correctamente estudiada para aumentar indicadores de eficiencia y productividad.

En [22], se muestran diversas ecuaciones para describir y cuantificar el crecimiento celular. Las ecuaciones son mostradas en la Tabla 2.1. Estos modelos son los más utilizados por su simpleza y precisión al momento de hacer los cálculos y también están implementados en diversos programas de simulación que se mencionarán posteriormente. Todas estas ecuaciones son derivadas de la ecuación de Monod, y son usadas para realizar el diseño del biorreactor. Además, se menciona que uno de los mayores problemas al momento de utilizar estas ecuaciones de crecimiento celular es hallar el correcto valor de K_S (constante de velocidad media) ya que este tiende a ser muy

pequeño. Los valores de K_s y de μ_m (razón máxima específica de crecimiento) se obtienen mediante experimentación midiendo las velocidades de crecimiento específicas a distintas concentraciones de sustrato en donde se encuentra el mosto que se fermentará.

Para seleccionar el modelo de crecimiento adecuado y lograr una correcta caracterización del sistema de fermentación cervecera, los parámetros abajo expuestos deben ser cuidadosamente seleccionados. Por ejemplo: el sustrato serían los azúcares y los productos serían etanol y dióxido de carbono. Según [21] se debe también monitorear los parámetros de pH, temperatura y la concentración de oxígeno en el sistema, con la finalidad de poder llevar a cabo una fermentación que consiga las propiedades organolépticas deseadas y no dañe los microorganismos.

Tipo de Modelos	Nombre de la Ecuación	Ecuación	Aplicación
Crecimiento Limitado por el Sustrato	Ecuación de Monod	$\mu_g = \frac{\mu_m S}{K_s + S}$ <p>Donde</p> <p>μ_g: es la razón de crecimiento específico</p> <p>K_s: es la constante de saturación o constante de velocidad media (g/L)</p> <p>S: Es la concentración del sustrato (g/L)</p> <p>μ_m: Es la razón máxima específica de crecimiento (h^{-1})</p>	<p>Para sistemas en donde se asume que existe solo una especie química que limita el crecimiento del microorganismo.</p> <p>De acuerdo a [23] este modelo también sirve para procesos con crecimiento lento y una densidad poblacional baja del microorganismo.</p>
Inhibición de Crecimiento	Inhibición de Sustrato No competitiva	$\mu_g = \frac{\mu_m}{(1 + \frac{K_s}{S}) + (1 + \frac{S}{K_I})}$ <p>Donde</p>	<p>Cuando existe una concentración de sustrato elevada</p>

		<p>μ_g : es la razón de crecimiento específico</p> <p>K_S: es la constante de saturación o constante de velocidad media (g/L)</p> <p>S: Es la concentración del sustrato (g/L)</p> <p>μ_m: Es la razón máxima específica de crecimiento (h^{-1})</p> <p>K_I: Es la constante cinética de Inhibición de Sustrato (g/L)</p>	
	Inhibición de Sustrato Competitiva	$\mu_g = \frac{\mu_m S}{K_S \left(1 + \frac{S}{K_I}\right) + S}$ <p>Donde</p> <p>μ_g : es la razón de crecimiento específico</p> <p>K_S: es la constante de saturación o constante de velocidad media (g/L)</p> <p>S: Es la concentración del sustrato (g/L)</p> <p>μ_m: Es la razón máxima específica de crecimiento (h^{-1})</p> <p>K_I: Es la constante cinética de Inhibición de Sustrato (g/L)</p>	Cuando existe una concentración de sustrato elevada
	Inhibición de Producto Competitiva	$\mu_g = \frac{\mu_m S}{K_S \left(1 + \frac{P}{K_P}\right) + S}$ <p>Donde</p>	Cuando existe una concentración de producto elevada

		<p>μ_g : es la razón de crecimiento específico</p> <p>K_s: es la constante de saturación o constante de velocidad media (g/L)</p> <p>S: Es la concentración del sustrato (g/L)</p> <p>μ_m: Es la razón máxima específica de crecimiento (h^{-1})</p> <p>K_p: Es la constante cinética de Inhibición de Producto (g/L)</p> <p>P: Es la concentración de Producto (g/L)</p>	
	Inhibición de Producto No Competitiva	$\mu_g = \frac{\mu_m}{(1 + \frac{K_s}{S}) + (1 + \frac{P}{K_p})}$ <p>Donde</p> <p>μ_g : es la razón de crecimiento específico</p> <p>K_s: es la constante de saturación o constante de velocidad media (g/L)</p> <p>S: Es la concentración del sustrato (g/L)</p> <p>μ_m: Es la razón máxima específica de crecimiento (h^{-1})</p> <p>K_p: Es la constante cinética de Inhibición de Producto (g/L)</p> <p>P: Es la concentración de Producto (g/L)</p>	Cuando existe una concentración de producto elevada

Tabla 2.1. Ecuaciones de Crecimiento Celular más utilizadas. Adaptada de [22] y [23]

2.4.3. Simulación de la Cinética de Crecimiento

Después de una revisión de literatura se encontró algunos softwares de acceso libre desarrollados para simulación de la cinética como los que se muestran a continuación.

En [24], se diseñó un paquete de simulación llamado AnaBioPlus . Este paquete consistía en dos programas: OptimusFerm y SimulaFerm. El primero, permite estimar parámetros cinéticos por medio de un método de evolución diferencial para construir el modelo de crecimiento a partir de data experimental de un proceso fermentativo cultivado por lotes. El segundo, realiza simulaciones a partir de las concentraciones iniciales de sustrato y producto, asimismo de los coeficientes de rendimiento de las células. Su resultado es la obtención de valores cuantitativos de crecimiento celular, formación de producto y consumo de sustrato para procesos de cultivo por lotes, semicontinuos y continuos. Estos programas contienen alrededor de 32 modelos cinéticos de crecimiento celular incluyendo los de la tabla 2.1. Los resultados muestran que AnaBioPlus es una herramienta muy útil y precisa para el análisis de bioprocesos.

2.5. Alternativas de recirculación de levaduras

En la recirculación de levaduras que se realiza de manera automatizada mediante la inmovilización celular, la finalización de un ciclo fermentativo es seguida inmediatamente por el siguiente ciclo debido a que el lecho de inmovilización es un parte móvil; esta estrategia permite que el tiempo de cada ciclo sea determinado por el microorganismo que experimenta la fermentación bajo condiciones específicas de crecimiento. Por el contrario, una recirculación manual, provoca que se corte o prolongue el ciclo, lo que resulta en un lavado del sustrato o un mayor tiempo de fermentación [25].

2.5.1. Repitching artesanal

En [26], se propone un método para recircular las levaduras de manera manual utilizando frascos de vidrio esterilizados. Este método, es utilizado para volúmenes de producción pequeños como la fabricación de cerveza artesanal a escala de micro cervecerías o consumo personal. El resultado de este método propuesto es básicamente dos trasvasamientos del material purgado del fermentador. Previamente, se deben

esterilizar los frascos para disminuir las posibilidades de contaminación que puedan sufrir las levaduras que se pretenden reciclar. Luego de hacer el trasvasamiento, se deja reposar la mezcla y se deja que la gravedad actúe separándose así las fases por decantación. Se forman tres fases y las primeras dos (contando desde la tapa del recipiente) son las que se trabajan. Para el segundo trasvasamiento se realiza lo mismo y ya se guardan las fases de interés para su recirculación a un nuevo proceso de fermentación. En este estudio no se ha contemplado la posibilidad de contaminación al momento de realizar el trasvasamiento. Para que el repitching funcione a nivel industrial se necesitaría encontrar una manera de poder aislar a las células de cualquier tipo de contaminación y que no demore un tiempo excesivo realizar la separación.

2.5.2. Inmovilización celular

2.5.2.1 Definición de inmovilización

Según [22], la inmovilización celular es la restricción del movimiento de una célula en un espacio determinado. Como cualquier otra técnica esta posee ventajas y desventajas. Una de las ventajas más resaltantes es que permite la reutilización de las células y elimina los costos de recuperación y recirculación celular. Sin embargo, una de las principales limitaciones es que el producto de interés debe ser excretado por las células. Por otro lado, la inmovilización celular resulta, generalmente, en sistemas con limitaciones difusivas importantes, esto resulta en un entorno en el cual es muy difícil controlar las condiciones micro ambientales. Esto hace que el sistema tenga una alta heterogeneidad y las concentraciones de producto varíen espacialmente. Existen dos clases de inmovilización, activa y pasiva [22], que serán abordadas a continuación. El enfoque de esta investigación es en la fermentación alcohólica.

2.5.2.2 Tipos de inmovilización

2.5.2.2.1. Inmovilización activa

Esta, consiste en el atrapamiento o enlazamiento celular por medio de fuerzas químicas y/o físicas [22].

El tipo más utilizado de inmovilización activa es el físico y es por medio del atrapamiento en matrices porosas [22]. Existen numerosos tipos de matrices que pueden ser utilizadas tales como los polímeros porosos (agar, alginatos, quitosano, colágeno, gelatina, entre otros), láminas metálicas porosas, poliuretano, sílica gel, poliestireno y triacetatos celulósicos [22]. La polimerización es un método bastante simple, porque la solución polimerizadora se mezcla con las células en suspensión y luego la polimerización ocurre formando un bloque que luego puede ser tamizado para obtener partículas homogéneas.

Existen otros métodos de atrapamiento tales como: la encapsulación, reactores con membranas, adsorción de células en superficies inertes, etc. [22]. En cuanto al enlazamiento, existe el enlazamiento covalente (que se utiliza más en la inmovilización de enzimas) que no es tan utilizado para inmovilización celular [22].

2.5.2.2.2. Inmovilización Pasiva

La inmovilización pasiva es similar a la activa. La diferencia es que ésta consiste en dejar que se produzcan naturalmente múltiples películas de células (bio películas) en superficies inertes de soporte, denominadas, en inglés, *Biofilms* [22]. Uno de los mayores factores que afecta la performance de la fase biótica es el espesor de la biopelícula. Las películas que sean delgadas tendrán una conversión muy baja debida a una concentración de biomasa baja [22]. Nuevamente, las variaciones espaciales producto de la complejidad del control de las condiciones micro ambientales se hacen presentes y dificultan el proceso. Por otro lado, las películas gruesas generan que las condiciones también varíen y adicionalmente afectan la fisiología de la célula [22].

2.5.2.3. Inmovilización de levaduras para fermentación alcohólica

Habiendo definido previamente el mecanismo de inmovilización celular, se mostrarán a continuación investigaciones recientes sobre inmovilización de levaduras utilizadas en la fermentación de azúcares para la producción de alcohol.

En [27], se estudió el potencial de aplicación de partículas micro encapsuladas de alginato de calcio y partículas de polietenol como medio de inmovilización celular de levadura de tipo *Saccharomyces cerevisiae* para un proceso de fermentación alcohólica por lotes a partir de hidrolizados de maíz. En la Figura 2.5, se puede observar la microencapsulación de las partículas de ambos materiales bajo el microscopio. Al lado izquierdo se observan las partículas de polietenol y al lado derecho las de alginato de calcio. Se puede ver que la geometría de las partículas es esférica lo cual hace que haya una mayor área de contacto entre las células que realizarán la fermentación y el sustrato.

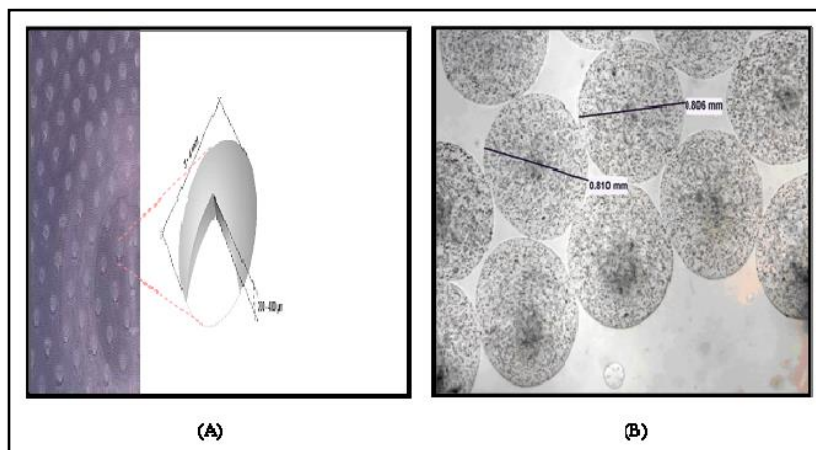


Figura 2.5. Imágenes de las partículas inmovilizadas de polietenol (lado izquierdo de la figura) y alginato de calcio (lado derecho de la figura). [27]

Los resultados indican que el alginato de calcio obtuvo la velocidad de fermentación más rápida a comparación del polietenol y además la densidad celular era mayor en el primero bajo las mismas condiciones experimentales. Esta densidad celular mayor se traduce en una cantidad mayor de células y este incremento origina que se pueda digerir una mayor cantidad de azúcares y por ende producir una cantidad mayor de etanol. Esto se puede visualizar en las Figuras 2.6 y 2.7. Se observan las gráficas de Concentración de Alcohol vs Tiempo para distintas concentraciones de inóculo en ambos medios de inmovilización. Como ya se mencionó el medio de alginato de calcio permite

producir una concentración de etanol más elevada al final del proceso (últimas diez horas) a comparación de las de polietenol. Sin embargo, la utilización del alginato de calcio para múltiples lotes no fue factible. Las partículas del alginato se comenzaron a desintegrar al segundo lote nada más. Por otro lado, el polietenol demostró mejores propiedades mecánicas y de estabilidad, pero con una producción de etanol menor. En [27] se menciona también que las partículas de polietenol han sido utilizadas para la fermentación de cerveza por Bezbradica et al. [28] y se obtuvieron resultados parcialmente similares a los de Rakin et al. [27] debido a que se comprobó la resistencia mecánica de estas partículas pero los rendimientos de etanol fueron mayores en [27].

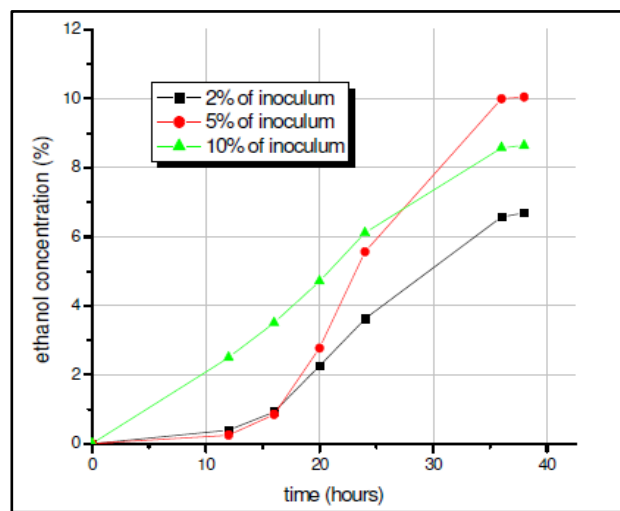


Figura 2.6. Gráfica de Concentración de Etanol vs Tiempo para las partículas de alginato de calcio. [27]

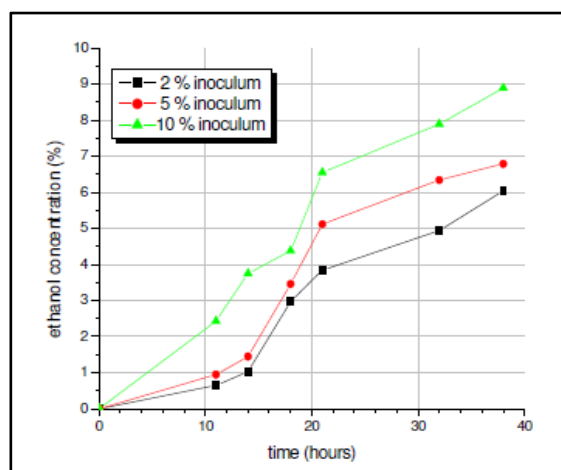


Figura 2.7. Gráfica de Concentración de Etanol vs Tiempo para las partículas de polietenol. Tomada de [27]

Por otro lado, en [29] se investigó la performance de la fermentación continua de etanol en un Reactor de Lecho Fluidizado Magnéticamente Estabilizado (MSFBR por su nombre en inglés) con células de *Saccharomyces cerevisiae* en matrices de alginatos con ferrita de manganeso-zinc. Los resultados mostrados en la Tabla 2.2 afirman que se consiguió un rendimiento teórico de etanol del 96.3% a partir de melaza de caña y 95.3% a partir de glucosa. En este tipo de reactor, se ajusta la intensidad del campo magnético para mover o direccionar las partículas magnéticas dentro de este con una baja caída de presión a través del lecho, la eliminación de una posible mezcla de sólidos y la posibilidad de operar a contracorriente y a velocidades de flujo elevadas. Esta investigación ha provisto de información fundamental para la posible implementación de este reactor en la industria.

Reactor	Sustrato	Ratio de Dilución (1/h)	Productividad de Etanol (g/Lh)	Conversión(%)	Rendimiento Teórico(%)	Referencia
C	Glucosa	0.4	21.8	60.0-63.0	96.0	Ivanova et al. (1996)
C*	Glucosa	0.4	26.7	91.4	95.3	El presente trabajo
A	Melaza	0.2	24.4	80.0	62.0	Sheoran et al. (1998)
B	Melaza	0.4	16.0	-	70.0	Baptista et al. (2006)
B*	Melaza	0.2	12.7	90.4	92.1	El presente trabajo
C*	Melaza	0.2	14.0	95.0	96.3	El presente trabajo
C*	Melaza	0.2	25.6	90.6	92.3	El presente trabajo
A, un reactor de lecho empacado; B, un reactor de lecho fluidizado; C, un reactor de lecho fluidizado magnéticamente estabilizado						
*Estos experimentos fueron llevados a cabo con una concentración de azúcar de 150 g/L						

Tabla 2.2. Tabla comparativa de resultados obtenidos. Adaptada de [29]

Por otro lado más aún, en [30] se estudió el efecto de la inmovilización celular de *Saccharomyces cerevisiae* en lechos de alginato de calcio y lechos de alginato de calcio cubiertos con quitosano para la fermentación alcohólica de glucosa y sucrosa. El proceso por lotes fue llevado a cabo en agitadores orbitales. Los resultados arrojaron rendimientos

de etanol del 78% y del 74.3% para la glucosa y sucrosa respectivamente utilizando células libres. Para los lechos de alginato de calcio, se obtuvieron rendimientos de $64.5 \pm 3.4\%$ para la fermentación a partir de glucosa y $64.5 \pm 8.6\%$ para la fermentación a partir de sucrosa. En la Figura 2.8 se muestran los ciclos de fermentación uno, tres y cinco de azul, rojo y verde respectivamente en las gráficas a) y b) que capturaban los efectos del consumo de glucosa y de la producción de etanol respectivamente. Se puede observar que para la producción de etanol el tercer ciclo es el que cuenta con un mayor rendimiento, esto puede deberse a que, durante el primer ciclo, las células están en un período de adaptación y pueden estar sufriendo estrés causado por la inmovilización según [30]. De otro modo, un consumo de sustrato más elevado no necesariamente se traduce en un incremento en el rendimiento de etanol en este caso. Esto se debe a que la fase de adaptación de las levaduras es un paso limitante para el crecimiento y por ende en la producción de etanol. En la Figura 2.8, se puede observar en la gráfica a) que alrededor de las dos horas de fermentación el consumo de sustrato para los ciclos tres y cinco es el mismo, pero en la figura b) la producción de etanol del tercer ciclo es mayor que la del quinto. Probablemente, estas levaduras ya se encuentran cerca de la fase de muerte y/o el etanol está inhibiendo el crecimiento. Es por eso que la productividad disminuye. Además, el crecimiento celular dentro de los orificios en los lechos debe contribuir al aumento de la concentración de etanol en ciclos posteriores. Esto tiene relación con la cinética de crecimiento celular en un sistema por lotes mostrada en la Figura 2.4 del presente documento. Adicionalmente, alrededor de la cuarta hora se alcanzó la concentración máxima de etanol.

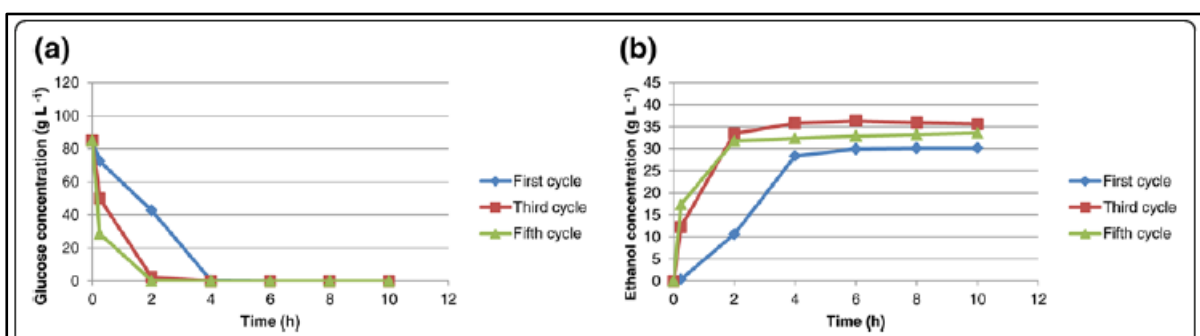


Figura 2.8. Evolución de los ciclos uno, tres y cinco de fermentación de glucosa utilizando lechos de alginato de calcio como medio inmovilizador de células de *Saccharomyces cerevisiae*. [30]

Para el caso de la sucrosa con los lechos de alginato de calcio, se observa un comportamiento similar mostrado en la Figura 2.9. Los ciclos fueron de diez horas cada uno y alrededor de la décima hora se alcanzó la concentración máxima de etanol para los lechos de alginato de calcio.

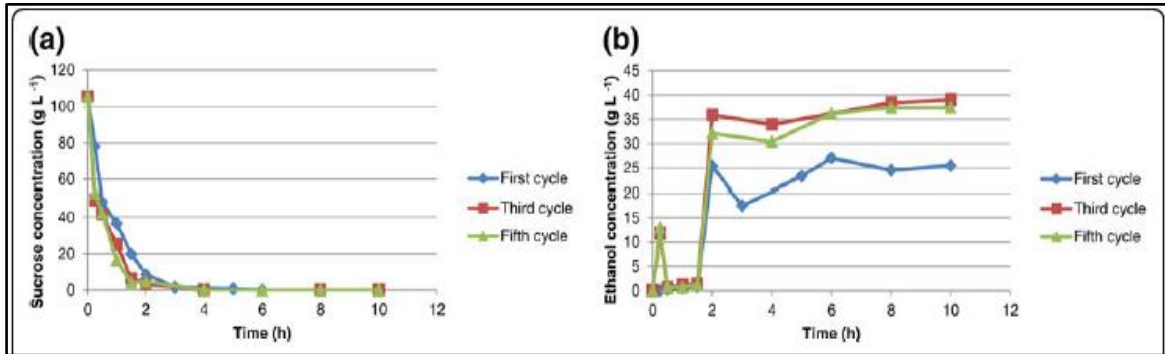


Figura 2.9. Evolución de los ciclos uno, tres y cinco de fermentación de sucrosa utilizando lechos de alginato de calcio como medio inmovilizador de células de *Saccharomyces cerevisiae*. [30]

Para los lechos de alginato de calcio cubiertos con quitosano, se obtuvieron rendimientos de $61.1 \pm 2.8\%$ para la fermentación a partir de glucosa y $62.1 \pm 12.8\%$ para la fermentación a partir de sucrosa. En la Figura 2.10 se pueden observar los ciclos de fermentación uno, tres y cinco de azul, rojo y verde respectivamente en las gráficas a) y b) que capturaban los efectos del consumo de glucosa y de la producción de etanol respectivamente. Se puede observar que el consumo de sustrato es más lento en el primer ciclo y por ende la producción también. Los ciclos fueron de diez horas cada uno y alrededor de la sexta hora se alcanzó la concentración máxima de etanol para los lechos de alginato de calcio cubiertos con quitosano. Se halló también que la capacidad de cada lecho era de aproximadamente ocho ciclos o lotes de diez horas, luego de estos los lechos comenzaban a romperse haciendo que ya no estén aptos para ser utilizados nuevamente.

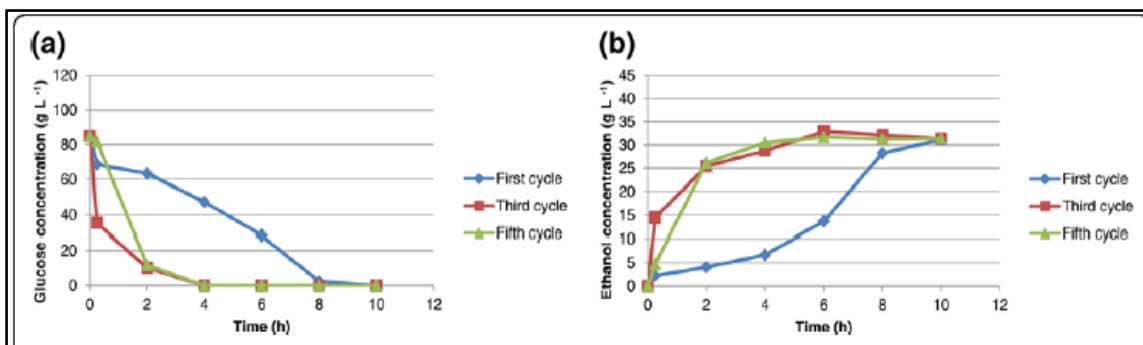


Figura 2.10. Evolución de los ciclos uno, tres y cinco de fermentación de glucosa utilizando lechos de alginato de calcio cubiertos con quitosano como medio inmovilizador de células de *Saccharomyces cerevisiae*. [30]

En la Figura 2.11 se pueden observar los ciclos de fermentación uno, tres y cinco de azul, rojo y verde respectivamente en las gráficas a) y b) que capturaban los efectos del consumo de sucrosa y de la producción de etanol respectivamente. Se puede observar que el consumo de sustrato es bastante irregular en el primer ciclo y por ende la producción también. A diferencia de los demás casos el consumo más elevado de sustrato fue en el último ciclo. Alrededor de la cuarta hora se alcanzó la concentración máxima de etanol para los lechos cubiertos con quitosano excepto en el primer ciclo.

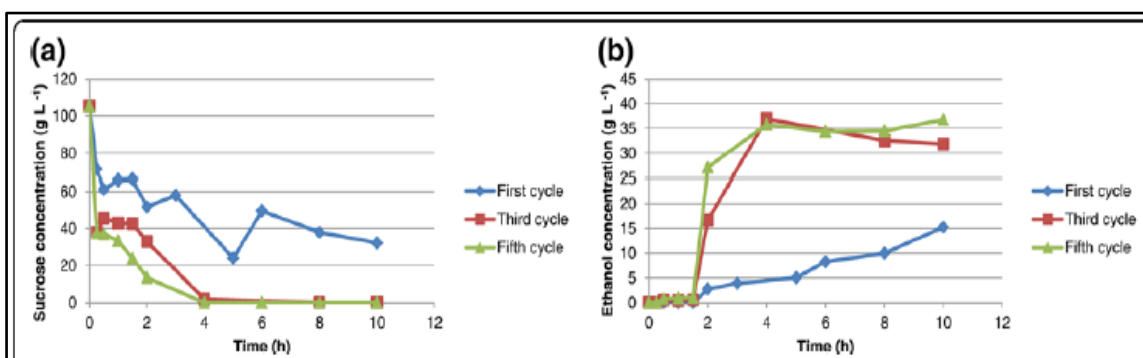


Figura 2.11. Evolución de los ciclos uno, tres y cinco de fermentación de sucrosa utilizando lechos de alginato de calcio cubiertos con quitosano como medio inmovilizador de células de *Saccharomyces cerevisiae*. [30]

Por otro lado, en [31] se utilizó el bagazo del fruto de anacardo como medio inmovilizador de células de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de etanol por fermentación a partir del jugo del fruto de anacardo. Los resultados mostraron eficiencias

de alrededor de 85.3-98.52% en cuanto al etanol y estabilidad operacional. Finalmente, se pudo demostrar que el bagazo del fruto de anacardo es un soporte eficiente para la inmovilización de la levadura en cuestión y por ende para la producción de etanol. En la Figura 2.12 se puede observar la comparación entre un sistema sin inmovilizar (convencional, de células libres) y uno inmovilizado utilizando el mismo sustrato. Existió la presencia de una especie no deseada, el glicerol, pero según los investigadores no tuvo ningún efecto significativo en la fermentación.

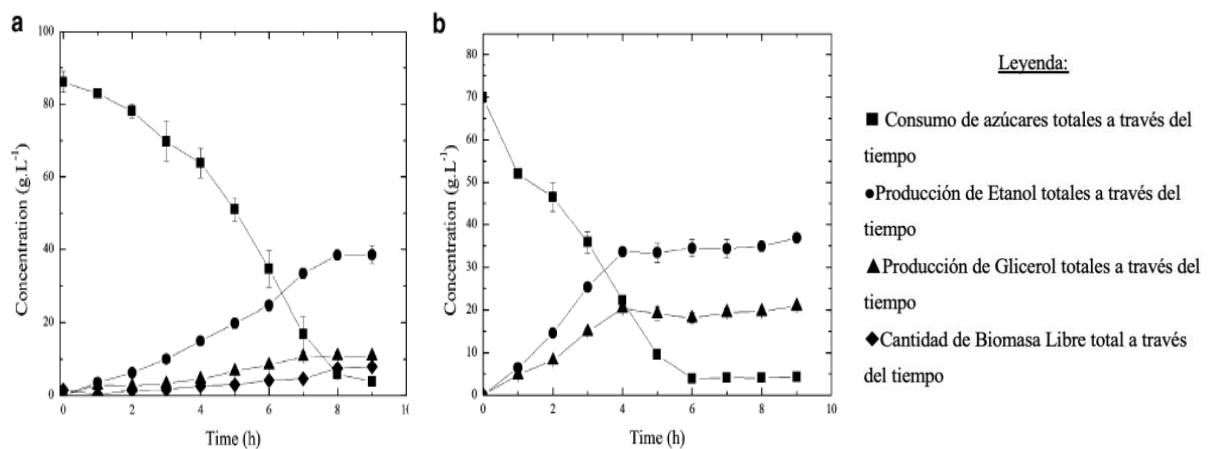


Figura 2.12. Comparación de la fermentación alcohólica de jugo de fruto de anacardo con a) células libres y b) células de *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas con el bagazo del fruto de anacardo. Adaptada de [31]

Como se puede ver en la Figura 2.12, el sistema de células libres tardó aproximadamente nueve horas en consumir el 95% del azúcar total. En contraste, el 94% del azúcar total se consumió después de aproximadamente seis horas en el sistema inmovilizado. Esto es aproximadamente 1.5 veces más rápido que el sistema con células libres debido a que las levaduras ya se encuentran adaptadas y el tiempo para producir etanol es menor cuando las células se encuentran en esta fase. A pesar de las limitaciones difusivas, las levaduras que ya se encuentran adaptadas, pueden conseguir mejores resultados que el caso de fermentación convencional (células libres) debido a los motivos expuestos anteriormente. Podemos decir entonces, que el tiempo de fermentación prima sobre las limitaciones difusivas microambientales.

Por último, en [32] se estudió la producción de bioetanol a partir de harina de maíz utilizando simultáneamente sacarificación enzimática y fermentación alcohólica con células inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta investigación realizaba las pruebas en un sistema por lotes y las células fueron inmovilizadas utilizando atrapamiento en matrices de alginato de calcio. Los resultados mostraron un rendimiento teórico de etanol del 98.08%. A diferencia de las investigaciones anteriormente abordadas se optimizó el proceso añadiendo sales minerales como activadores de la levadura y esto se tradujo en un incremento de la producción de etanol. En la Tabla 2.3 se puede observar una tabla de resultados obtenidos en la investigación con diferentes medios (suplementados con sales y sin suplementar) y se puede observar que los medios suplementados tuvieron un mejor rendimiento como ya se mencionó.

Tipo de Proceso	Concentración de Etanol (% w/w)	Rendimiento de etanol Yps (g de etanol/ g de almidón)	Porcentaje del rendimiento teórico de etanol (%)	Productividad Volumétrica P (g/L.h)	Glucosa Utilizada (%)*
SHF sin medio de suplementación	8.01 ± 0.16	0.43 ± 0.009	76.79 ± 1.54	1.67 ± 0.03	86.25 ± 0.06
SHF con adición de minerales	8.41 ± 0.17	0.45 ± 0.008	80.64 ± 1.47	1.75 ± 0.05	88.64 ± 0.07
SSF sin medio de suplementación	9.42 ± 0.12	0.51 ± 0.007	90.32 ± 1.52	1.96 ± 0.03	97.72 ± 0.09
SSF con adición de minerales	10.23 ± 0.11	0.55 ± 0.004	98.08 ± 1.50	2.13 ± 0.04	99.08 ± 0.05

*La glucosa utilizada (%) fue calculada como la razón de la masa consumida de glucosa sobre la masa inicial de glucosa

Tabla 2.3. Tabla de resultados de la producción de bioetanol a partir de harina de maíz utilizando simultáneamente sacarificación enzimática y fermentación alcohólica con células inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* para medios suplementados y sin suplementar. Adaptada de [32]

Las técnicas evaluadas, a excepción del repitching artesanal, en el presente capítulo son bastante costosas y requieren de inmovilización celular para poder realizar la recirculación según [4], [7] y [22]. Uno de los principales problemas es el estrés mecánico de la matriz de inmovilización, que se convierte en un paso limitante para el proceso de recirculación. Es por ese motivo que el repitching artesanal parece ser la alternativa más prometedora para efectos de recirculación de la corriente de purga

proveniente de los reactores de fermentación de los procesos de elaboración de cerveza. Este método también presenta oportunidades de mejora, siendo entre ellas la más relevante la alta probabilidad de contaminación celular que existe al momento de realizar la recirculación utilizando esta técnica. El costo de emplear esta técnica es muy bajo y mejorar los problemas que presenta es bastante sencillo, por lo cual esta técnica resulta ser la que presenta un mayor potencial como se mencionó anteriormente.

CONCLUSIONES

De la presente revisión bibliográfica se puede concluir que los avances realizados en cuanto a la recirculación de levaduras para la producción de cerveza artesanal no han sido significativos, por ende se cuenta con una propuesta muy disruptiva e innovadora que representa una oportunidad de mejora con las ventajas comparativas asociadas al servicio de la compañía que utilice en su proceso el sistema de recirculación de levaduras cerveceras según ciertos parámetros que se mencionarán a continuación entre otros que serán profundizados líneas abajo.

1. El tipo de producto (cerveza ale o lager) está íntimamente ligado al tipo de levadura que se utilice, así como también a la temperatura a la cual se lleve a cabo el proceso de fermentación. Por otro lado, la calidad de la cerveza producida se ve influenciada por las demás operaciones y procesos unitarios que se llevan a cabo durante el proceso tales como la molienda, la cocción en distintas etapas y maceración.
2. En relación a la geometría de los equipos para la fermentación, se verificó a partir de la revisión de la literatura que los reactores de forma cilindro-cónica son los más usados a nivel industrial pues favorecen la decantación de los sólidos (entre ellos los microorganismos fermentadores) para su posterior purga y recirculación.
3. Para la realización de una etapa de recirculación, la preservación de las propiedades y capacidad fermentativa de los microorganismos es un factor crucial. Estos no deben ser sometidos a un estrés que pueda afectar su fisiología, por lo tanto, la temperatura debe ser monitoreada y controlada rigurosamente. El estrés microbiano no solo produce daño o muerte celular, si no también son afectadas variables como la velocidad de crecimiento y la aparición de otras vías metabólicas por medio de las cuales las levaduras producen especies químicas como cetonas, aldehídos y ésteres que perjudican la calidad de la cerveza, sobre todo en relación con las propiedades organolépticas del producto.

4. En un proceso fermentativo industrial, los parámetros que se monitorean habitualmente son las concentraciones de sustrato y producto (azúcares y etanol), el pH del medio y la temperatura en el fermentador. Estos parámetros permiten modelar la cinética del crecimiento celular. La presencia (o ausencia) de interacciones de sustrato o producto afecta la cinética, y por ende el modelo de crecimiento inhibiéndolo de manera competitiva o no competitiva. El hecho de que exista inhibición de sustrato o de producto genera que la ecuación que se utiliza para modelar la cinética contenga términos adicionales con el fin de que los resultados capturen estos efectos de inhibición.
5. Por otro lado, se encontró que los mecanismos de recirculación existentes para procesos de fermentación son el *repitching* artesanal y la inmovilización celular. La inmovilización celular es utilizada para aumentar la productividad y aprovechar la capacidad fermentativa que poseen las levaduras. Esta técnica tiene muy buenos resultados ya que se aprovechan las levaduras que todavía son viables en su totalidad. Por otro lado, esta técnica permite que el tiempo entre un ciclo fermentativo y otro sea muy pequeño ya que muchas veces el lecho es una parte móvil. Sin embargo, para la producción de cerveza artesanal todavía no se logra adaptar un método que utilice esta técnica. La principal limitación de la inmovilización celular son las propiedades mecánicas de los medios que se utilizan para realizar la inmovilización. Para efectos de la recirculación se ha elegido utilizar el principio del *repitching* artesanal ya que cuenta con limitaciones más manejables como la contaminación y no se requiere de la fabricación de lechos inmovilizadores. La aplicación de esta técnica conjugada con el diseño de un proceso, que considere la geometría del fermentador, un sistema de decantadores, impulsores de fluido y tanques de almacenamiento a fin de llevar a una escala industrial la implementación de un sistema de recirculación que permitan aumentar la productividad de la fermentación.
6. Así también, se determinó que según los equipos encontrados en el proceso de fabricación de cerveza, en un sistema de recirculación de microorganismos los equipos auxiliares necesarios serían bombas, chaquetas de enfriamiento, sensores de densidad para medir la concentración de sustrato, sensores de alcohol para medir la concentración de producto, sensores de pH para evitar la formación de

subproductos no deseados y sensores de temperatura que permitan controlar este parámetro con lazos de control ligado a sensores de nivel, evitando de esta manera cambios repentinos de esta variable. Todo esto con el fin de conseguir un correcto entendimiento del sistema con el que se pretende trabajar y unas condiciones de operación favorables para los microorganismos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] "Craft Beer Market Worth \$502.9 Billion By 2025 | Growth Rate: 19.9%", Grandviewresearch.com, 2017. [Online]. Available: <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-craft-beer-market>. [Accessed: 09- Apr- 2019].
- [2] T. Young, "Britannica Academic", *Academic.eb.com*, 2017. [Online]. Available: <https://academic.eb.com/levels/collegiate/article/beer/106004>. [Accessed: 08- Apr- 2019].
- [3] X. Turc Castellà, "Diseño de una planta de fabricación de cerveza artesanal", Bachiller, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial de Barcelona, 2018.
- [4] W. Kunze and H. Manger, *Tecnología para cerveceros y malteros*, 1st ed. Berlin: VLB Berlin, 2006.
- [5] "Yeast for Professional Brewers - Inland Island Yeast", *Inland Island Yeast*, 2019. [Online]. Available: <https://inlandislandyeast.com/order/order-professional-brewers/>. [Accessed: 09- Apr- 2019].
- [6] JENKINS, C. Serial repitching fermentation performance and functional biomarkers. In K. A. SMART (Ed.), *Brewing Yeast Fermentation Performance* (Segunda ed). Oxford, UK: Blackwell Science, 2003, pp. 257-265
- [7] K. Toribio, ""EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD COMO STARTER DE *Saccharomyces pastorianus* ssp. *carlsbergensis* PARA LA PRODUCCIÓN DE CERVEZA TIPO LAGER""", Título Profesional en Biología, Universidad Nacional Agraria La Molina, 2015.
- [8] J. Goldman, "Fermentation Resurrection: Reusing Yeast", *Craft Beer & Brewing*, [Online]. 2017. Available: <https://beerandbrewing.com/fermentation-resurrection-reusing-yeast/>. [Accessed: 09- Apr- 2019].
- [9] W. Warnasooriya, "Modeling and Simulation of the Beer Fermentation Process and Temperature Control", Maestría, Universidad de Moratuwa Sri Lanka, 2011.

- [10] Charles W. Baker & Ayed S. Amr “Independence of Malting Quality and Barley Flour Particle Size”, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, pp.87-92, 1978.
- [11] GEA LAUTERSTAR® lauter tun technology", GEA engineering for a better world, 2020. [Online]. Available: <https://www.gea.com/en/products/brewery-systems/brewhouse/lauding/lauderstar.jsp>. [Accessed: 24- Jul- 2020].
- [12] K. Min-ki, "A manufacturing device for craft beer", KR101817480B1, 2017.
- [13] G. Xinchu, "Efficient fermentation equipment for craft beer", CN107674797A, 2018. A, 2018.
- [14] I. MacLennan and B. Dudley, "Brewing apparatus and method", US9719060B1, 2017.
- [15] S. Dee and W. Webber, "Fermentation temperature management", US20130340624A1, 2013.
- [16] J. Joseph and B. Callanan, "Beer brewing system and method", US20140017354A1, 2014.
- [17] D. Sicard and J. L. Legras, “Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex,” *Comptes Rendus - Biol.*, vol. 334, no. 3, pp. 229–236, 2011.
- [18] R. G. Sanchez, N. Solodovnikova, and J. Wendland, “Breeding of lager yeast with *Saccharomyces cerevisiae* improves stress resistance and fermentation performance,” *Yeast*, vol. 29, no. 8, pp. 343–355, Aug. 2012.
- [19] P. M. Doran, “Homogeneous Reactions,” in *Bioprocess Engineering Principles*, 2nd ed., Elsevier, 2013, pp. 635–636.
- [20] Ingledew, W. M & Ethanol Technology Institute. *The alcohol textbook : a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries*, 5th ed. Nottingham University Press, 2009
- [21] M. Argemí, “Diseño de un biorreactor para la fabricación de la cerveza,” pp. 1–84, 2016.

- [22] M. Shuler, F. Kargi, and M. Delisa, "How Cells Grow," in *Bioprocess Engineering Basic Concepts*, 3rd ed., Pearson, 2017, pp. 191–196.
- [23] M. P. Zacharof and R. W. Lovitt, "Modelling and simulation of cell growth dynamics, substrate consumption, and lactic acid production kinetics of *Lactococcus lactis*," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 18, no. 1, pp. 52–64, 2013.
- [24] C. M. Oliveira et al., "Anabioplus: A new package for parameter estimation and simulation of bioprocesses," *Brazilian J. Chem. Eng.*, vol. 34, no. 4, pp. 1065–1082, 2017.
- [25] J. Wang, "Development of a Self-Cycling Fermentation Approach to Improve Productivities for Ethanol Production", Doctor of Philosophy, University of Alberta, 2020.
- [26] J. Goldman, "Fermentation Resurrection: Reusing Yeast | Craft Beer & Brewing," 2017. [Online]. Available: <https://beerandbrewing.com/fermentation-resurrection-reusing-yeast/>. [Accessed: 13-Mar-2019].
- [27] M. Rakin, L. Mojovic, S. Nikolic, M. Vukasinovic, and V. Nedovic, "Bioethanol production by immobilized *Sacharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* cells," *African J. Biotechnol.*, vol. 8, no. 3, pp. 464–471, 2009.
- [28] D. Bezbradica, B. Obradovic, I. Leskosek-Cukalovic, B. Bugarski, and V. Nedovic, "Immobilization of yeast cells in PVA particles for beer fermentation," *Process Biochem.*, vol. 42, no. 9, pp. 1348–1351, 2007.
- [29] C. Z. Liu, F. Wang, and F. Ou-Yang, "Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in magnetic particles," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 2, pp. 878–882, 2009.
- [30] J. C. Duarte, J. A. R. Rodrigues, P. J. S. Moran, G. P. Valença, and J. R. Nunhez, "Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation," *AMB Express*, vol. 3, pp. 1–8, 2013.
- [31] A. M. Pacheco, D. R. Gondim, and L. R. B. Gonçalves, "Ethanol production by fermentation using immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in cashew apple bagasse," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 161, no. 1–8, pp. 209–217, 2010.

[32] S. Nikolić, L. Mojović, M. Rakin, and D. Pejin, “Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*,” *Fuel*, vol. 88, no. 9, pp. 1602–1607, 2009.