

**EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE LA FOTOESTIMULACIÓN EN LA
FERMENTACIÓN DEL MOSTO CERVECERO A ESCALA LABORATORIO**

ANDRÉS GABRIEL BELTRÁN SANTOS

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTA D.C**

2016

**EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE LA FOTOESTIMULACIÓN EN LA
FERMENTACIÓN DEL MOSTO CERVECERO A ESCALA LABORATORIO**

ANDRÉS GABRIEL BELTRÁN SANTOS

**Proyecto integral para optar al título de
INGENIERO QUÍMICO**

Directora

ADRIANA INÉS PÁEZ MORALEZ

Microbióloga

Grupo de investigación

Biotecnología BIOTECFUA

FUNDACION UNIVERSIDAD AMERICA

FACULTAD DE INGENIERIAS

PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA

BOGOTA D.C

2016

Nota de aceptación

Firma Docente Investigador

Firma Docente Jurado 1

Firma Docente Jurado 2

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. JAIME POSADA DÍAZ

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos.

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA

Vicerrectora Académica y de Posgrados.

Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Secretario General

Dr. JUAN CARLOS POSADA GARCÍA-PEÑA

Decano de Facultad de ingenierías.

Ing. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI

Director de investigaciones

Ing. ARMANDO FERNÁNDEZ

Director Programa de Ingeniería Química.

Ing. LEONARDO DE JESÚS HERRERA GUTIERREZ

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

A Dios, por permitirme guiarme en el camino y darme la fuerza para superar cada barrera.

A Nancy y Wilson, mis padres por siempre estar presente en los momentos difíciles y darme el apoyo necesario para seguir adelante.

A mis tíos, por brindarme el apoyo para finalizar esta etapa.

A mis amigos, por acompañarme en las dificultades y en los logros.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCION	17
OBJETIVOS	18
1. GENERALIDADES	19
1.1 FABRICACIÓN DE CERVEZA	19
1.1.1 Materias primas	19
1.1.1.1 Cebada malteada	19
1.1.1.2 Agua	19
1.1.1.3 Lúpulo	19
1.1.1.4 Levadura	20
1.1.1.5 Adjuntos	20
1.2 PROCESO CERVECERO	20
1.2.1 Fermentación cervecera	20
1.2.2 Proceso Fermentativo	20
1.2.2.1 Fermentadores cilindro-cónicos	23
1.2.2.2 Diseño y construcción	23
1.2.3 Condiciones de fermentación	23
1.2.3.1 Composición del mosto	23
1.2.3.2 Temperatura	24
1.2.3.3 Aireación del mosto	24
1.2.3.4 Porcentaje de alcohol	25
1.2.3.5 Densidad	26
1.2.3.6 Luz	26
1.3 FACTORES QUE AFECTAN LA FERMENTACIÓN	26
1.3.1 Metabolismo Levaduras	26
1.3.1.1 Glicólisis	28
1.3.1.2 Fermentación alcohólica	28
1.3.1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
1.3.2 Luz	30
1.3.2.1 Irradiación en microorganismos	31
1.3.2.2 Led	32
1.3.2.3 Foto-fermentación	33
1.4 FOTOBIORREACTORES	33
1.4.1 Tipos de fotobiorreactores	34
1.4.2 Parámetros de diseño	34
1.4.3 Requerimientos de luz	35
2. METODOLOGIA	36
2.1 GENERALIDADES DEL PROCESO	36

2.1.1	Condiciones fermentativas a nivel planta	36
2.1.2	Fermentación del mosto	36
2.1.3	Caracterización de la levadura	37
2.1.4	Activación e inoculación de levadura a nivel de planta	37
2.1.5	Caracterización del fermentador	38
2.1.6	Muestreo a nivel de planta	39
2.2	SELECCIÓN DEL FOTOBIORREACTOR	39
2.2.1	Dimensionamiento del fotobiorreactor	40
2.2.2	Selección del sistema de iluminación LED	40
2.2.2.1	Primer modelo de iluminación	41
2.2.2.2	Segundo modelo de iluminación	42
2.2.2.3	Tercer modelo de iluminación	42
2.2.2.4	Medición de iluminancia	43
2.2.3	Fermentador sin iluminación	43
2.3	MONTAJE Y PRE EXPERIMENTACION	44
2.3.1	Carga de muestra al fotobiorreactor	44
2.3.2	Activación e inoculación de la levadura	45
2.3.3	Monitoreo de temperatura	45
2.4	ANALISIS DEL PROCESO FERMENTATIVO A ESCALA LABORATORIO	45
2.4.1	Muestreo	46
2.4.2	Recuento en cámara de Neubauer	46
2.4.3	Evaluación del consumo de sustrato	48
2.4.4	Curva patrón de glucosa	48
2.4.5	Curva de calibración de azúcares reductores	49
2.4.6	Análisis de grados Brix	50
2.4.7	Determinación del grado alcohólico	51
3.4.8	Comparación de las fermentaciones	51
3.	RESULTADOS Y DISCUSION	52
3.1	GENERALIDADES DEL PROCESO	52
3.1.1	Fermentación del mosto	54
3.1.2	Caracterización de la levadura	54
3.2	SELECCIÓN DEL FOTOBIORREACTOR	55
3.2.1	Matriz de selección del tipo de fotobiorreactor	55
3.2.1.1	Área expuesta de iluminación	57
3.2.1.2	Control del proceso	57
3.2.1.3	Facilidad de comparación	57
3.2.1.4	Control de contaminación	57
3.2.2	Dimensionamiento del fotobiorreactor	59
3.2.3	Selección del material	62
3.3	SELECCIÓN DEL SISTEMA DE ILUMINACION LED	62
3.3.1	Matriz de selección del sistema de iluminación	62
3.3.2	Iluminancia promedio	63
3.3.3	Monitoreo de temperatura	64

3.3.4 Control incidencia de la luz externa	64
3.4 MONTAJE Y PRE EXPERIMENTACION	66
3.4.1 Activación e inoculación de la levadura	66
3.4.2 Monitoreo de temperatura	66
3.5 ANALISIS DEL PROCESO FERMENTATIVO A ESCALA LABORATORIO	67
3.5.1 Muestro	67
3.5.2 Recuento en cámara de Neubauer	68
3.5.3 Curva patrón de glucosa	70
3.5.4 Curva de calibración de azúcares reductores	71
3.5.5 Porcentaje de alcohol	73
3.5.6 Análisis de grados Brix	73
3.5.7 Comparación de fermentaciones	75
4. CONCLUSIONES	79
5. RECOMENDACIONES	80
BIBLIOGRAFIA	81
ANEXOS	86

LISTA DE GRAFICAS

	pág.
Gráfica 1. Tasa de incremento de la levadura fotoestimulada.	32
Gráfica 2. Emisión de luz LED según longitud de onda	35
Gráfica 3. Temperatura del proceso fermentativo	67
Gráfica 4. Crecimiento celular	69
Gráfica 5. Curva de calibración de glucosa	70
Gráfica 6. Consumo de azúcares reductores totales	72
Gráfica 7. Grados de alcohólico de las dos fermentaciones	73
Gráfica 8. Consumo de azúcares de los dos biorreactores	74

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Clasificación de los LED	33
Cuadro 2. Caracterización de levadura	55
Cuadro 3. Parámetros de selección del tipo de fotobiorreactor	56
Cuadro 4. Rango de dificultad	56
Cuadro 5. Matriz de selección del fotobiorreactor	58
Cuadro 6. Parámetros de selección de iluminación	63
Cuadro 7. Iluminancia del fotobiorreactor	63
Cuadro 8. Matriz de selección de los modelos de iluminación	65
Cuadro 9. Rendimiento promedio de las fermentaciones	76

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Proceso de elaboración de la cerveza	22
Figura 2. Ruta metabólica de la glicólisis	29
Figura 3. Reacción de la fermentación alcohólica	30
Figura 4. Tipos de fotobiorreactores. (a) Tipo fermentador; (b) Panel plano; (c) tubular horizontal	34
Figura 5. Proceso de producción de cerveza a nivel planta	36
Figura 6. Fermentación del mosto. (a) Pre-enfriamiento del mosto; (b) Carga del mosto al fermentador	37
Figura 7. Activación de levadura a nivel planta	38
Figura 8. Fermentador utilizado a nivel planta	39
Figura 9. Primer modelo de iluminación	41
Figura 10. Segundo modelo de iluminación	42
Figura 11. Tercer modelo de iluminación	42
Figura 12. Medición de iluminancia. (a) Fotobiorreactor vacío; (b) Fotobiorreactor cargado	43
Figura 13. Frasco de vidrio de borosilicato para fermentación tradicional	44
Figura 14. Biorreactores cargados con mosto	45
Figura 15. Muestras de mosto de las dos fermentaciones	46
Figura 16. Procedimiento (a) Toma de muestra (b) Conteo en cámara de Neubauer para evaluar la curva de crecimiento (c) lectura en microscopio	47
Figura 17. Dimensiones de la cámara de Neubauer	48
Figura 18. Procedimiento curva de azúcares reductores. (a) Preparación de muestras; (b) Lectura en espectrofotómetro	50
Figura 19. Procedimiento. (a) Carga de muestra; (b) Lectura en refractómetro	51
Figura 20. Diagrama de flujo proceso de elaboración de cerveza	52
Figura 21. Diseño básico fotobiorreactor tipo fermentador	59
Figura 22. Dimensiones del fotobiorreactor	60
Figura 23. Dilución de muestras. (a) Diluciones 1:10; (b) Diluciones 1:100	68
Figura 24. Técnica de DNS	71

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Metodología para la determinación de azúcares por refractometría (°Brix)	87
Anexo B. Cuantificación de azúcares reductores por técnica DNS (ácido 3, 5 Dinitro salicílico)	88
Anexo C. Preparación de reactivo DNS (ácido 3, 5 Dinitro salicílico)	89
Anexo D. Correlación °Brix – Densidad – Grado Alcohólico	90

GLOSARIO

AIREACIÓN: proceso utilizado ya sea para mezclar, circular, o disolver aire dentro de un líquido u otra sustancia.

AZÚCARES REDUCTORES: aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo (grupo funcional) intacto, y que a través del mismo pueden reaccionar como reductores con otras moléculas.

CÁMARA DE NEUBAUER: instrumento utilizado en medicina y biología para realizar el recuento de esporas y células en un medio líquido, que puede ser; un cultivo celular, sangre, etc.

CLARIFICACIÓN: proceso para hacer que una sustancia sea menos densa o espesa.

FASE DE WHIRPOOL: en el mundo de la cerveza se denomina a la técnica de limpieza y clarificado del mosto ya hervido.

FERMENTACIÓN: proceso natural que ocurre en determinados compuestos o elementos a partir de la acción de diferentes actores y que se podría simplificar como procesos de oxidación incompleta.

FOTOBIOREACTOR: es un biorreactor que incorpora algún tipo de fuente de luz para proporcionar una fuente de energía fotónica al reactor.

FOTOESTIMULACIÓN: activación de un órgano biológico u organismo por medio de luz.

GRADOS BRIX: (símbolo °Bx) miden el cociente total de sacarosa disuelta en un líquido. Los grados Brix se miden con un refractómetro.

GLICÓLISIS: (del griego glycos, azúcar y lysis, ruptura), es la vía metabólica encargada de oxidar la glucosa con la finalidad de obtener energía para la célula.

ILUMINANCIA: o nivel de iluminación se define como el flujo luminoso que incide sobre una superficie. Su unidad de medida es el Lux.

INOCULACIÓN: introducción de una sustancia en un organismo.

INTENSIDAD LUMÍNICA. en fotometría se define como la cantidad de flujo luminoso que emite una fuente por unidad de ángulo sólido.

IRRADIACIÓN: emisión de radiaciones luminosas, térmicas, magnéticas o de otro tipo.

LED: (del acrónimo inglés *LED, light-emitting diode*: diodo emisor de luz) componente optoelectrónico pasivo y, más concretamente, un diodo que emite luz.

LEVADURA: hongo unicelular que produce enzimas capaces de provocar la fermentación alcohólica de los hidratos de carbono.

LUX: (símbolo lx) unidad derivada del Sistema Internacional de Unidades para la iluminancia o nivel de iluminación. Equivale a un lumen /m².

LUXÓMETRO: (también llamado luxmetro o light meter), instrumento de medición que permite medir simple y rápidamente la iluminancia real y no subjetiva de un ambiente. La unidad de medida es el lux (lx).

MACERACIÓN: mantener sumergida alguna sustancia sólida en un líquido a la temperatura ambiente para extraer de ella las partes solubles.

MALTOSA: azúcar vegetal y animal, compuesto por dos moléculas de glucosa, que se encuentra en el almidón y el glucógeno; se emplea como nutriente y edulcorante, y como medio de cultivo.

MOSTO DE CERVEZA: harina molida de la malta. En la elaboración de la cerveza es el líquido que se aromatiza con lúpulo para ser infundido y posteriormente fermentado.

Saccharomyces cerevisiae: hongo unicelular, un tipo de levadura utilizado industrialmente en la fabricación de pan, cerveza y vino.

SUSTRATO: especie química que se considera, de forma explícita, objeto de la acción de otros reactivos. Por ejemplo, un compuesto cuya transformación es intervenida por un catalizador.

WHIRPOOL: técnica de limpieza y clarificado que consiste en agitar el mosto en forma de remolino formando una fuerza centrípeta que permita la extracción de los compuestos sólidos de lúpulo.

RESUMEN

La evaluación de nuevas tecnologías de fermentación en cerveza artesanal aplicando procesos fotosintéticos como la implementación de fuentes de luz LED, permitiendo analizar el metabolismo de las levaduras cerveceras y a su vez el rendimiento del proceso fermentativo en presencia de irradiación artificial, en comparación con la fermentación tradicional en ausencia de luz.

El presente proyecto se basó en el análisis comparativo de consumo de sustrato, crecimiento celular y producción de alcohol de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* tipo Safale S-04, en el medio de cultivo mosto cervecero durante LA fermentación de 1 L de cerveza artesanal tipo American Pale Ale a nivel laboratorio.

El proceso de foto-fermentación se realizó en un fotobiorreactor tipo fermentador con volumen de 1,343 L. El fotobiorreactor se construyó en acrílico transparente y se adecuó a un modelo de iluminación con fuente de luz LED el cual obtuvo una iluminancia promedio de 65000 Lux. La fermentación en ausencia de luz se llevó a cabo en un frasco de vidrio de borosilicato con capacidad de 1 L.

El tiempo de fermentación para los dos biorreactores fue de 4 días, a una temperatura de 20 ± 3 °C, presión atmosférica (25 psi) y una concentración de inóculo de 0,8 g/L, ajustando las condiciones establecidas en la planta cervecera EL DORADO ARTESANIAS LIQUIDAS S.A.S.

Los resultados obtenidos para los dos procesos en cuanto a consumo de sustrato (3,88 g/L - 18 ° Brix), densidad celular ($1,7 \times 10^7$ ufc/mL) y grado alcohólico (4,5 % ABV), generaron un porcentaje de rendimiento promedio del 2,33 % mayor para el proceso foto-fermentativo en comparación con la fermentación tradicional.

El bajo rendimiento del fotobiorreactor fue causado por factores que influyeron a lo largo del proceso como la variación de la temperatura, adecuación del sistema de oxigenación y contaminación del mosto.

INTRODUCCION

Algunos de los mayores retos en el desarrollo de procesos fermentativos cerveceros, consisten en mejorar la eficiencia en cuanto al tiempo de fermentación del mosto mediante la manipulación de la intensidad lumínica. Evaluando nuevas tecnologías con base en la foto-estimulación con fuentes de luz artificiales que permitan acelerar el metabolismo de las levaduras.

Con el fin de evaluar la eficiencia del proceso fermentativo aplicando luz artificial, se construyen fotobiorreactores que permiten analizar el comportamiento de las levaduras con la luz a través del tiempo, así como las condiciones adecuadas para que el proceso obtenga un mejor rendimiento en comparación con una fermentación común.

Los estudios realizados de foto-estimulación en microorganismos como las levaduras han sido poco profundizados, lo que abre campo a ideas innovadoras en cuanto a diseño y construcción de fotobiorreactores que permitan mejorar el proceso de fermentación, sin alterar las características esenciales que posee una buena cerveza.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficiencia de la foto-estimulación con fuente de luz LED en el tiempo de fermentación del mosto cervecero.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer los parámetros del medio de cultivo mosto cervecero en el proceso de fermentación a escala laboratorio.
2. Caracterizar los parámetros y el diseño del foto-fermentador a escala laboratorio.
3. Evaluar el rendimiento obtenido al final del proceso de fermentación utilizando fuente de luz LED en comparación con la fermentación común.

1. GENERALIDADES

1.1 FABRICACION DE CERVEZA

La fabricación de cerveza se puede sintetizar en tres procesos bioquímicos esenciales: La formación de enzimas por parte del malteado de la cebada, la degradación enzimática del almidón en azúcares y la fermentación del azúcar a alcohol y CO₂. Estas tres transformaciones bioquímicas son controladas a condiciones adecuadas durante los procesos de maceración, cocción, fermentación y maduración, que son los responsables de dar las propiedades específicas para cada una de las clases de cervezas existentes en la actualidad.

1.1.1 Materias Primas. Para la fabricación de cerveza se requieren cinco materias primas: cebada malteada, lúpulo, agua, levadura y adjuntos. El conocimiento de las propiedades de las materias primas, de su influencia sobre el proceso y sobre el producto final, proporciona el fundamento para su tratamiento y procesamiento.¹

1.1.1.1 Cebada malteada. La cebada malteada es la materia prima principal para la fabricación de cerveza. Esta se produce a partir de la germinación controlada de la cebada en la cual las enzimas del grano se activan para producir almidón, azúcares, proteínas y otros micronutrientes necesarios para ser hidrolizados durante la maceración.²

1.1.1.2 Agua. El agua compone el 90% del contenido de la cerveza, las características y propiedades del agua influyen en la calidad. Por tal razón, es necesario establecer pre-tratamientos y análisis de calidad previos al proceso.³

1.1.1.3 Lúpulo. El lúpulo (*Humulus lupulus*) es una planta perteneciente a la familia de las *cannabaceae*. En la fábrica de cerveza se utilizan las inflorescencias de las

plantas femeninas. Estas contienen las resinas amargas y los aceites etéreos que le suministran a la cerveza los componentes amargantes y aromáticos.⁴

¹ KUNSE, Wolfgang. Materias Primas. En: Tecnología Para Cerveceros y Malteros. Alemania: VLB Berlín, 2006. p. 34-46.

² SANCHEZ, Anabel M. Fermentación de la malta empleando un sistema semicontinuo en el proceso de elaboración de cerveza. Trabajo de grado Ingeniería de alimentos. Huajapan de León: Universidad Tecnológica de la Mixteca, 2011. 134 p.

³ SUAREZ Díaz, M. Cerveza: Componentes y propiedades. Trabajo fin de máster Biotecnología alimentaria. España: Universidad de Oviedo, 2013. 99 p.

⁴ Asociación de Cerveceros Caseros Españoles (ACCE). Guía Básica Sobre El Lúpulo. [online]. SIL OFL 1.1. [Murcia, España]: ACCE, nov. 2012 [consultado el 10 feb, 2016]. Disponible

1.1.1.4 Levadura. La levadura es un sacaromisetos unicelular capaz de producir energía de forma anaerobia. Esta se encarga de metabolizar el azúcar del mosto en alcohol y CO₂ durante el proceso de fermentación. El tipo de levadura utilizada es *Saccharomyces cerevisiae* influye sobre el sabor y carácter de la cerveza.⁵

1.1.1.5 Adjuntos. Son cereales sin maltear con un alto contenido de almidón, los cuales son degradados enzimáticamente por el potencial de la malta, además de ser coadyuvantes en cuanto al sabor y carácter de la cerveza, dentro de los principales se encuentran maíz, arroz y sorgo.⁶

1.2 PROCESO CERVECERO

La producción de cerveza se puede dividir en tres grandes etapas: Elaboración del mosto, producción de cerveza y envasado. La figura 1 muestra el proceso de elaboración de cerveza a nivel planta.

1.2.1 Fermentación cervecera. Para la transformación del mosto en cerveza, los azúcares contenidos en el mosto deben ser fermentados por las enzimas de la levadura, a etanol y dióxido de carbono. Durante este proceso se forman subproductos, que influyen de forma substancial en el sabor, olor y propiedades de valoración de la cerveza

Los procesos de fermentación se realizan en cavas o en tanques cilindro-cónicos de acero inoxidable y dependen de tres parámetros básicos: a) Composición del mosto (presencia y concentración de diversos nutrientes para la levadura, pH, concentraciones de oxígeno disuelto y temperatura). b) Levadura (cantidad, tipo de cepa, siembra, pureza y viabilidad) y c) Condiciones de proceso (tiempo, volumen, presión, forma y tamaño del recipiente e intensidad lumínica)⁷.

1.2.2 Proceso fermentativo. El mosto proveniente de la olla de cocción a alta temperatura, es enfriado a través de intercambiadores de calor, aireado mediante inyección de oxígeno e introducido al tanque de fermentación hasta alcanzar la temperatura y demás condiciones adecuadas para que la levadura pueda

desde Internet en: <http://www.cerveceros-caseros.com/index.php/articulos/ingredientes/229-introduccion-al-lupulo>.

⁵ GARZÓN, Sandra. Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. Tesis de grado Químico Industrial. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de tecnologías. Escuela de tecnología química, 2009. 132 p.

⁶ HOUGH, J. s. Biotecnología de la cerveza y de la malta (J. González Burgos Trans.). Primera ed. Zaragoza: Acribia S.A., 1990. 202 p.

⁷ KUNSE, Wolfgang. Materias Primas. En: Tecnología Para Cerveceros y Malteros. Alemania: VLB Berlín, 2006. p. 76-84.

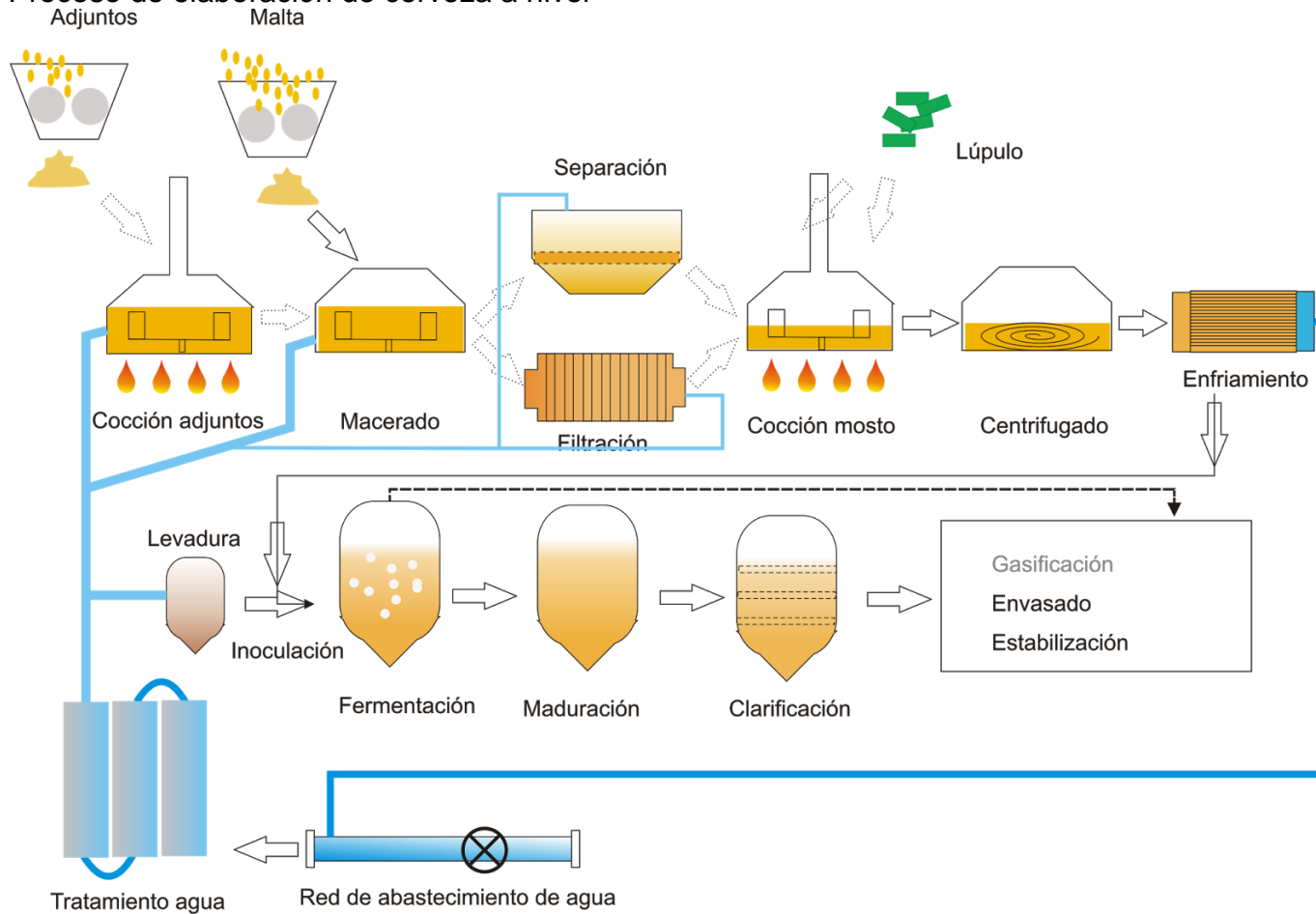
metabolizar el extracto fermentable. Una vez el mosto haya alcanzado la capacidad estándar del tanque, se le adiciona la levadura previamente inoculada y se mantiene un control estricto de las condiciones a través de sistemas de instrumentación acoplados al tanque como termómetros, barómetro, chaquetas de enfriamiento y válvulas de salida. Alcanzado el grado de fermentación o grado de atenuación aparente, el mosto es transportado hacia los tanques de maduración.⁸

Existen dos clases de fermentación de acuerdo con el tipo de levadura y la clase de cerveza que se desea fabricar. Es denominada una baja fermentación, cuando la levadura trabaja a temperaturas en el intervalo de 6 °C a 10 °C y un tiempo estimado de 8 a 10 días, en donde se precipita hacia el fondo del tanque. Esta clase de fermentación se aplica para cervezas tipo lager. En la alta fermentación, se utilizan levaduras que actúan a temperaturas de 18 °C a 25 °C y tienden a ascender hacia la superficie del mosto. Este proceso se aplica para cervezas tipo ALE o cervezas a base de trigo.⁹

⁸ GARCIA G., Mariano y Quintero, Rodolfo. Cerveza. Biotecnología Alimentaria. México D.F.: Ed. Limusa, 1993. 69-87 p.

⁹ HORNSEY, Jan S. Malteado. En: Elaboración de cerveza, microbiología, bioquímica y tecnología. España: Acribia S.A., 2002. p. 31-33.

Figura 1. Proceso de elaboración de cerveza a nivel



Fuente. JUANCO, Miguel. Proceso de fermentación. 2015. Disponible en: <http://caeliacerea.blogspot.com.co/>

1.2.2.1 Fermentadores cilindro-cónicos. Este tipo de fermentadores son los más utilizados actualmente en la industria cervecera, ofrecen ventajas operacionales y de seguridad en las etapas de fermentación y maduración de la cerveza.

1.2.2.2 Diseño y construcción. En el diseño de los tanques cilindro-cónicos se debe tener en cuenta: altura, diámetro, espacio para ascenso de la capa de espuma, así como su instalación y disposición.

Los fermentadores se construyen con la parte superior cilíndrica y la parte inferior de forma cónica, con el fin de lograr una extracción completa de la levadura. El material utilizado es acero inoxidable al cromo-níquel tipo V2A, con una rugosidad media aritmética de mínima de 0,8 Ra, para evitar que bacterias y pequeñas levaduras queden depositadas en las fisuras y causen posible contaminación.¹⁰

El tamaño de los tanques cilindro-cónicos puede ser hasta 40 metros de altura y 10 metros de diámetro, dependiendo de la capacidad productiva. La altura del mosto debe ser de 23 metros como máximo en relación a la composición de productos secundarios.¹¹

La relación entre el diámetro y la altura del mosto varía de 1:1 a 1:5, con el fin de obtener homogeneidad de volumen y contenido. Es importante tener el espacio para el ascenso de la capa de espuma y la cantidad de CO₂ que se forman durante el proceso. Básicamente se establece que el volumen de espacio en los tanques de fermentación es 18 a 25 % de la cantidad de mosto al inicio de la fermentación.¹²

1.2.3 Condiciones de fermentación. El proceso fermentativo depende básicamente del comportamiento de las levaduras en relación con el consumo de azúcares presentes en el mosto de la malta. El metabolismo de la levadura depende de las condiciones del proceso a la cual se trabaje. La temperatura, la presión, el nivel de acidez, el porcentaje de oxígeno, la concentración de azúcares fermentables y la intensidad lumínica son variables importantes a analizar para un correcto proceso fermentativo.¹³

1.2.3.1 Composición del mosto. Los azúcares fermentables más abundantes son la maltosa que representa el 50 a 60% de los azúcares fermentables, la maltotriosa (15% a 20%) y la glucosa (10 % a 15%). Los tres componentes son

¹⁰ KUNSE, Wolfgang. Tanques cilindro-cónicos. En: Tecnología Para Cerveceros y Malteros. Alemania: VLB Berlín, 2006. p. 101-111.

¹¹ SAURINA S., Rubén. Diseño de una micro-planta de fabricación de cerveza y estudios de técnica de producción. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Barcelona: Universidad Politécnica de Catalunya. Departamento de Ingeniería Química, 2015. 106 p.

¹² KUNSE, Op. Cit., p. 117

¹³ VOGEL, Wolfgang Elaboración casera de la cerveza. España: Acribia, 2003. p. 15-29.

hidrolizados por las levaduras en forma secuencial según el tamaño de la molécula. La fracción no fermentable de los azúcares son las dextrinas, beta-glucanos y pentosas como por ejemplo la arabinosa y la xilosa que inciden sobre el sabor de la cerveza¹⁴. La concentración de azúcares reductores presentes en el mosto determina la velocidad del proceso fermentativo, un incremento en la concentración puede generar una saturación hacia la levadura y posterior inactivación.

1.2.3.2 Temperatura. La temperatura es una variable determinante dentro del proceso fermentativo. En general las condiciones de temperatura varían de acuerdo con el tipo de levadura empleada. Las levaduras de alta fermentación como *Saccharomyces cerevisiae* se activan a temperaturas entre 18° y 25°C, y permanecen activas de 4 a 6 días. Las levaduras de baja fermentación (*Saccharomyces carlsbergensis*),¹⁵ se activan a temperaturas más bajas, entre 6° y 10°C, y tienen un periodo de actividad entre 8 y 10 días.

La influencia de la temperatura sobre el poder fermentativo afecta el porcentaje de etanol que una cepa de levadura es capaz de producir. Cuando se fermenta a temperatura baja o moderada, las fermentaciones son lentas y el grado alcohólico alcanzado es mayor que a temperaturas superiores a los 30°C.

A temperaturas inferiores, la levadura sufre una excreción por choque térmico donde se expulsan aminoácidos y nucleótidos, atenuando e inoculando la levadura durante la fermentación. A temperaturas de 37°C a 40° C, ocurre ruptura total del microorganismo¹⁶.

La fermentación alcohólica es un proceso exotérmico, que sistemas de instrumentación y control dentro del tanque de fermentación como termómetros que permitan el monitoreo de la temperatura durante el proceso.

1.2.3.3 Aireación del mosto. La velocidad de fermentación y propagación de la levadura dependen estrictamente de la aeración del mosto. El consumo de oxígeno por parte de la levadura ayuda a la síntesis de ácidos grasos que forman el componente principal de las membranas celulares.

¹⁴ SANCHEZ, Anabel M. Fermentación de la malta empleando un sistema semicontinuo en el proceso de elaboración de cerveza. Trabajo de grado Ingeniería de alimentos. Huajapan de León: Universidad Tecnológica de la Mixteca, 2011. 134 p.

¹⁵ SUAREZ Díaz, M. Cerveza: Componentes y propiedades. Trabajo fin de máster Biotecnología alimentaria. España: Universidad de Oviedo, 2013. 99 p.

¹⁶ SARMIENTO Forero, S. Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de grado Microbiólogo industrial. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias, 2007. 120 p.

La concentración teórica de oxígeno presente en el mosto debe ser de 3 litros de aire por hectolitro de mosto. Sin embargo, el burbujeo y la distribución no uniforme requiere un ingreso mínimo de 8 a 9 mg de O₂ por litro de mosto.¹⁷ La concentración en g/L para cada compuesto a diferente temperatura, se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Aireación del mosto.

Compuesto	0°C	5°C	10°C	15°C	20°C
Oxígeno	47,4	41,5	36,8	33,0	30,0
Aire	28,0	25,0	22,0	20,0	18,0
Nitrógeno	22,5	20,0	18,1	16,5	15,2
CO ₂	1658	1378	1159	987	851

Fuente. KUNSE, Wolfgang. Aireación. En: Tecnología Para Cerveceros y Malteros. Alemania: VLB Berlín, 2006.

Alcanzado el porcentaje de aireación, no se debe oxigenar más el mosto, para evitar desviar el proceso alcohólico de las levaduras hacia una metabolización de azúcares por vía respiratoria, produciendo mayor cantidad de células. Una aireación del mosto a elevadas temperaturas conlleva una fuerte oxidación, que influye negativamente sobre el color y el sabor de la cerveza¹⁸.

1.2.3.4 Porcentaje de alcohol. Los alcoholes se pueden formar por diferentes vías: a) Por el metabolismo de los aminoácidos generando una serie de reacciones catabólicas que comienzan con una transaminación que transforma el aminoácido, siendo luego descarboxilado y reducido. b) Por la ruta de los hidroxiácidos de los intermediarios cetoácidos; c) Por síntesis del azúcar a través de la ruta del acetato.¹⁹

La formación de alcoholes superiores es estimulada por incremento de la temperatura, disminución de la concentración de aminoácidos en el mosto y temperatura al inicio de la fermentación por encima de 8 °C. La formación de alcoholes superiores mayores a 100 mg/L deteriora el sabor y la digestibilidad de la cerveza.²⁰ Las levaduras se ven afectadas por el alcohol en relación a reduciendo el crecimiento celular exponencial.

¹⁷ KUNSE, Wolfgang. Aireación. En: Tecnología Para Cerveceros y Malteros. Alemania: VLB Berlín, 2006. p. 247-250.

¹⁸ HOUGH, J. s. Biotecnología de la cerveza y de la malta (J. González Burgos Trans.). Primera ed. Zaragoza: Acribia S.A., 1990. 202 p.

¹⁹ KUNSE, Wolfgang. Fermentación. En: Tecnología Para Cerveceros y Malteros. Alemania: VLB Berlín, 2006. p. 223-230.

²⁰VILLARINO, Antonio L. Biblioteca de publicaciones científicas internacionales sobre el consumo de la cerveza y su posible relación con la salud de la población. En: Cerveza y salud. España, noviembre, 2000. p. 5-11.

El contenido de alcohol depende del tipo de cerveza que se elabore, por lo general varía de 4,7% a 7,0% en volumen, un contenido más alto es alcanzado por la levadura sin inconvenientes.

1.2.3.5 Densidad. La densidad inicial es la cantidad de azúcar que está disuelta en el mosto antes de que empiece su fermentación, mientras que la densidad final es la cantidad de azúcar disuelto que presenta la cerveza cuando la fermentación ha finalizado. La densidad se mide con un densímetro, a razón de que todo cuerpo sumergido en un líquido, desplaza un volumen de líquido similar a su peso. La densidad puede expresarse en grados plato (°P), Brix o en densidad específica. La densidad específica es relativa al peso de un litro de líquido con el azúcar disuelto. La densidad específica del agua pura es 1,000, por lo tanto, se indica que un mosto tiene una densidad específica de 1,045, es decir, existen 45 gramos de azúcar disueltos en un litro de líquido, ya sea al inicio o al final de la fermentación.²¹ Estas variables están estrechamente ligadas con el grado alcohólico de la cerveza. El grado alcohólico es el número de volúmenes de etanol disueltos en 100 volúmenes de bebida.²²

1.2.3.6 Luz. La presencia de luz natural durante el proceso fermentativo es un factor que puede incidir negativamente debido a que los componentes de la luz como los rayos ultravioletas (UV), desintegran las levaduras presentes en el mosto e inhiben la reproducción celular.

La incidencia de la luz afecta también el sabor y la calidad de la cerveza, porque genera 3-methyl-2-buteno-1-tiol, un compuesto que produce un olor característico, es por esta razón que a nivel industrial se fabrican botellas de color oscuro para proteger el producto final.²³

1.3 FACTORES QUE AFECTAN LA FERMENTACIÓN

1.3.1 Metabolismo de las levaduras. Las levaduras utilizadas en la industria cervecera pertenecen al género *Saccharomyces cerevisiae*, es un organismo anaerobio que se reproduce por germinación.²⁴ Las funciones principales de la

²¹ CARRILLO, Raúl y Martínez, O. Eficiencia en la fermentación de mosto para cerveza de súper alta densidad. La Habana: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, 2011. p. 78-82.

²² TINTO, A., SANCHEZ F., VIDAL, M. y VIJANDE, P. La cerveza artesanal. España: CerveArt. Sabadell, 2006. 256 p.

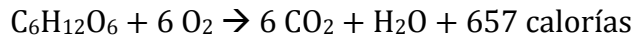
²³ COLIN S, Burns. Mechanism for Formation of the Lightstruck Flavor in Beer Revealed by Time-Resolved Electron Paramagnetic Resonance. En: CHEMISTRY: A EUROPEAN JOURNAL. 2003. vol. 7, no. 21, p. 3-4

²⁴ [Anónimo]. Levaduras. [online]. Versión 1.1. [Buenos Aires, Argentina]: Versión 1.1, 2000 [consultado el 13 nov, 2015]. Disponible desde Internet en: <http://www.cervezadeargentina.com.ar/articulos/levaduras.html>

levadura durante el proceso fermentativo consisten en degradar los azúcares y metabolizar los hidratos de carbono, grasas y minerales presentes en el mosto.

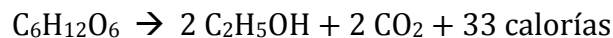
La fermentación de los azúcares consta de una a fase de aireación en el cual la levadura se reproduce aeróbicamente, absorbiendo el oxígeno del aire, degradando los azúcares del mosto utilizados como fuente de carbono para producir anhídrido carbónico y agua, generando un alto contenido de energía como se muestra en la ecuación 1.

Ecuación 1. Reacción general de glicólisis.



Durante la vía aerobia la relación de consumo de azúcares es de 1 g de levadura por cada 100 g de azúcar. Los azúcares transformados tienen que estar en su forma más simplificada como monosacáridos, es decir, las moléculas de sacarosa y fructosa sufren una glicólisis previa para poder ser degradados por vía anaerobia en la fermentación alcohólica. En esta fase ocurre una reacción incompleta donde el azúcar consumido se transforma en alcohol y CO₂, con un menor desprendimiento de energía como se muestra en la ecuación 2.

Ecuación 2. Reacción de fermentación alcohólica.



En el metabolismo proteico la levadura absorbe las fuentes de nitrógeno presentes en el mosto en forma de aminoácidos de bajo peso molecular por procesos desanimación, descarboxilación y reducción, obteniendo alcoholes superiores como producto secundario de la fermentación. Un buen abastecimiento de aminoácidos consta de 200 a 2030 mg/L de alfa-aminonitrógeno libre.²⁵

La absorción de grasas por parte de la levadura también es indispensable en la formación de fosfolípidos que componen la membrana celular. Están presentes en el mosto en forma de ácidos grasos saturados e insaturados.²⁶ Para que ocurra el proceso de degradación se requiere la presencia de oxígeno, en caso de no abastecer de suficientes ácidos grasos insaturados, puede inhibir la capacidad de absorción de la membrana y a la vez detenerse el consumo de aminoácidos. El consumo de hidratos de carbono se produce en la fase aerobia, el hidrato de carbono como el glicógeno, se establece como fuente de reserva dentro de la

²⁵ GUZMAN Romero, Raúl A. Obtención de licor mediante la destilación del fermentado de piña y pera. Trabajo de grado Ingeniero Químico Industrial. México, D.F.: Instituto Politécnico Nacional. Facultad de Ingeniería Química, 2013. 156 p.

²⁶ SANCHÍS, La cerveza. Aspectos microbiológicos. Trabajo de grado Microbiólogo. Lleida: Universidad Tecnológica de Lleida, 218 p.

levadura para producir energía antes de la fermentación por vida anaerobia.²⁷ De los minerales, la levadura requiere en mayor concentración fósforo y azufre. El fósforo proviene de la malta en forma de fosfatos y el azufre como sulfato orgánico, pero también como aminoácido con contenido de azufre (cisteína y metionina).²⁸

1.3.1.1 Glicólisis. La conversión de glucosa en ácido pirúvico efectuada por la levadura, a través de diferentes procesos bioquímicos intermedios, los cuales son catalizados por una enzima específica y bajo la intervención de las coenzimas NAD Y NADH⁺.²⁹ En la primera fase de la glicólisis se requiere energía en forma de ATP a ADP. La degradación del compuesto azucarado inicia en los procesos de isomerización y fosforilación por transferencia del grupo fosfato hacia la molécula de azúcar en donde se invierte energía. El producto generado presenta lisis en los procesos de reducción de la glucosa 6 fosfato hasta formar dos moléculas de gliceraldehído. En la fase de generación el gliceraldehído sufre reacciones de oxidación, deshidratación e isomerización en donde el ADP es transformado a ATP por medio de fosforilación para finalmente convertirse en las dos moléculas de ácido pirúvico. La ganancia neta de energía son dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADH por molécula de glucosa. Las diferentes fases del glicólisis se expresan en la figura 2.

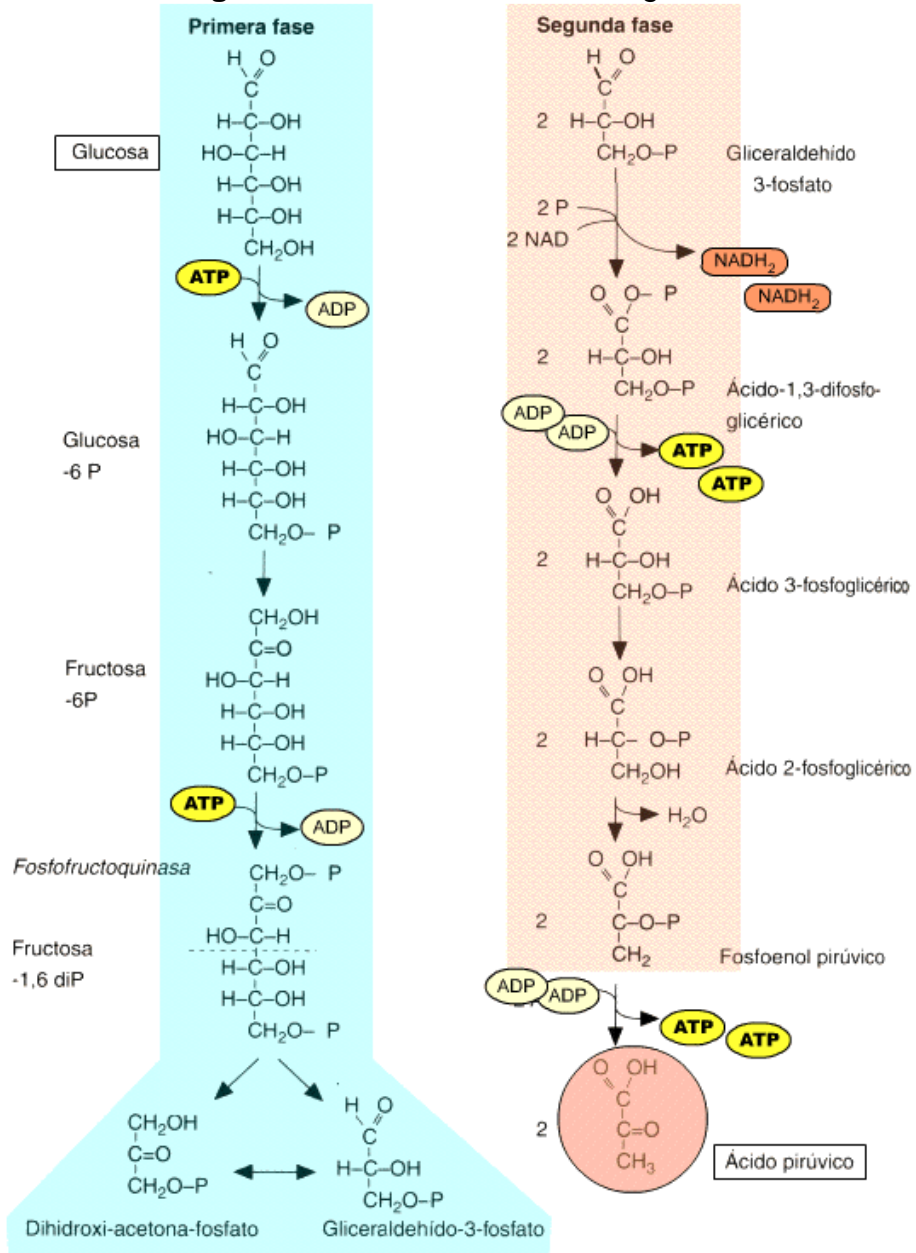
1.3.1.2 Fermentación Alcohólica. La fermentación alcohólica constituye una de las rutas metabólicas alternativas del piruvato, generado durante el metabolismo de glicólisis. En esta última etapa el piruvato es descarboxilado a CO₂ y acetaldehído por la acción de la enzima carboxilaza que finalmente es reducido por la enzima deshidrogenasa hasta alcohol etílico. Durante la reacción mostrada en la figura 3 ejercen acción las coenzimas NADH a NAD y se libera gas carbónico en forma de CO₂.

²⁷ HOUGH, J. s. Biotecnología de la cerveza y de la malta (J. González Burgos Trans.). Primera ed. Zaragoza: Acribia S.A., 1990. 202 p.

²⁸ NIETO Galarza, Hernán. Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol. Trabajo de grado Ingeniero en Biotecnología. Sangolqui: Departamento de ciencias de la vida. Escuela politécnica del ejército, 2009. p. 67-73.

²⁹ TOMAS, Rosa. Mecanismos moleculares y bioquímicos implicados en la adaptación de *Saccharomyces cerevisiae* a las bajas temperaturas de fermentación. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Tarragona: Universidad de Rovira. Facultad de Bioquímica, 2010. 237 p.

Figura 2. Ruta metabólica de la glicólisis.



Fuente: Glucólisis, el ciclo del citosol. (2011). Recuperado en Marzo, 2016, de: <http://www.biologia.edu.ar/metabolismo/met3glicolisis.html>

Figura 3. Reacción de la fermentación alcohólica



Fuente: Respiración celular. (2010). Recuperado el 31 de marzo de: <http://respiracioncelulardecimo.blogspot.com.co/>

1.3.1.3 *Saccharomyces cerevisiae*. El nombre *Saccharomyces* significa azúcar en hongos, que pertenece al género de las levaduras de la familia *Saccharomycetaceae* cuya colonia es de color crema, apariencia húmeda y brillante. Sus dimensiones son: 2.5 a 10 micras de ancho y 4.5 a 21 micras de largo; su forma es generalmente esferoidal, elipsoidal o cilíndrica.³⁰

Su función es fermentar azúcares como glucosa, sacarosa, galactosa y maltosa, además de ser fuente de enzimas como la invertasa. Para poder realizar este proceso requieren fuentes de carbono presentes en los azúcares fermentables, fuentes de nitrógeno como sulfato amónico, urea y aminoácidos, además de vitaminas como la biotina.

1.3.2 Luz. La luz natural en los procesos de fermentación de cervezas no es recomendable, debido a que la presencia de los rayos UV generan un rompimiento en la estructura celular de las levaduras, alterando el crecimiento celular y deteniendo el proceso.³¹

Sin embargo, el metabolismo de las levaduras durante el proceso de fermentación en presencia de diodos emisores de luz artificial (LED), favorece la producción de metabolitos en algunos microorganismos fúngicos, y da lugar al estudio en levaduras.

³⁰ GARZON, Sandra. Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. Tesis de grado Químico Industrial. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de tecnologías. Escuela de tecnología química, 2009. 132 p.

³¹ ROBERTSON, J. Visible light alters yeast metabolic rhythms by inhibiting respiration. USA: PNAS, 2013. p. 57-62

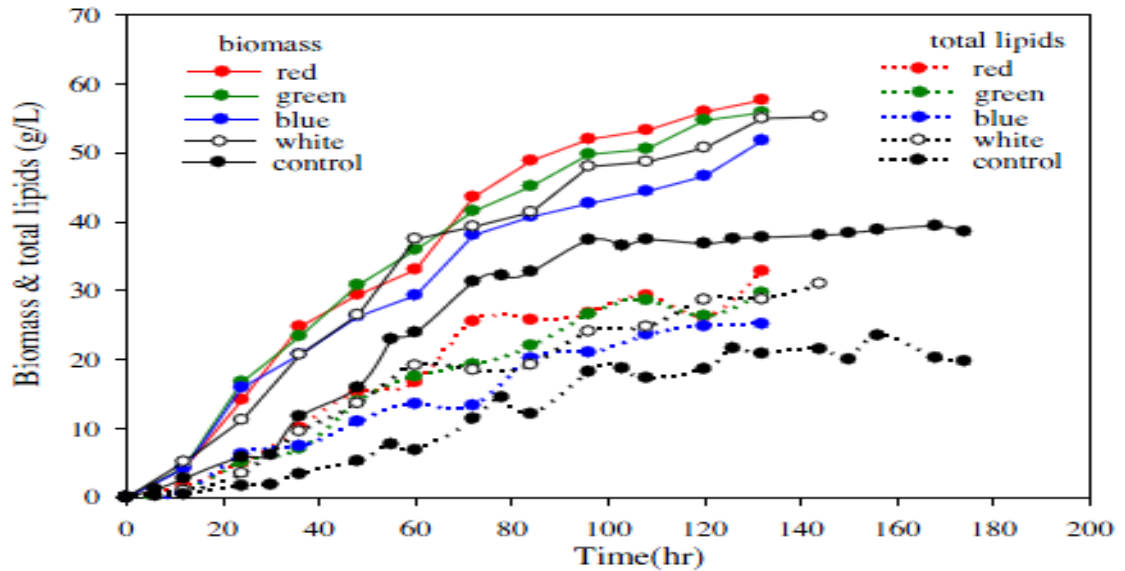
1.3.2.1 Irradiación en microorganismos. La habilidad de los organismos fotótrofos para utilizar la energía lumínica disponible depende principalmente de su capacidad para absorber los largos de onda disponibles; lo cual está a su vez determinado por su contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofilas, bacterioclorofilas, ficobilinas, carotenoides). Los microorganismos fotótrofos (algas, cianobacterias y bacterias fotosintéticas) difieren unos de otros en la composición de pigmentos y por consiguiente en su habilidad para absorber diferentes largos de onda.³²

Las levaduras son organismos fotosintéticos que absorben luz durante la respiración celular para poder reproducirse. La presencia de luz en las levaduras incide en la transferencia de electrones durante la respiración celular y afecta el metabolismo. Levaduras como la *Rhodotorula glutinis*, al ser irradiada por fuentes de luz artificial como los diodos emisoros (LED) de color rojo, aumenta la tasa de crecimiento en cuanto a su concentración de biomasa y la producción de lípidos, como se muestra en la gráfica 1.³³

³² LOPEZ Ayala, Fredy. Diseño y montaje de un fotobiorreactor para producción de microalgas. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico-químicas, 2010. 89 p.

³³ HONG-WEI, Yen y YA-CHUN Yang. The effects of irradiation and microfiltration on the cells growing and total lipids production in the cultivation of *rhodotorula glutinis*. Bioresour Technology, 2012. 539 p.

Gráfica 1. Tasa de incremento de la levadura fotoestimulada.



Fuente: HONG-WEI, Yen y YA-CHUN, Yang. The effects of irradiation and microfiltration on the cells growing and total lipids production in the cultivation of *rhodotorula glutinis*. Bioresour Technology, 2012.

1.3.2.2 LED. Un Diodo Emisor de luz (LED), es un componente optoelectrónico pasivo de luz casi monocromática debido a que el espectro de luz que genera es muy angosto. La luz se genera cuando se polariza directamente a este diodo haciendo fluir una corriente eléctrica a través de él. La longitud de onda de la luz emitida depende del material el cual esté fabricado el diodo; puede variar de luz ultravioleta, pasando por luz visible y luz en el infrarrojo.³⁴

Los tipos de LED se clasifican según material, color y longitud de onda descritos en el cuadro 1.

³⁴ PRADILLA Godoy, Silvia. Estudio de la incidencia luminosa en la producción de microalgas en un fotobiorreactor a escala laboratorio. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico-químicas, 2010. p. 57

Cuadro 1. Clasificación de los LED.

Compuesto	Color	Longitud de onda
Arseniuro de galio(GaAs)	Infrarrojo	940nm
Arseniuro de galio y aluminio(AlGaAs)	Rojo e infrarrojo	880nm
Arseniuro fosforo de galio (GaAsP)	Rojo	635nm
Fosforo de galio y aluminio e indio	Naranja y amarillo	620nm, 595nm
Compuesto	Color	Longitud de onda
Fosforo de galio (GaP)	Verde	565nm
Nitruro de galio (GaN)	Verde agua	525nm
Nitruro de galio e indio (InGaN)	Azul	470nm
Diamante (C)	Ultravioleta	< 400nm

Fuente: ESTRADA-HERNÁNDEZ, A. Mediciones en LED's de alta intensidad. En: Simposio de Metrología 22-23 de octubre de 2008. Santiago de Querétaro, México.

1.3.2.3 Foto-fermentación. Es el proceso en condiciones anaeróbicas, donde se transforman los azúcares del mosto por acción de las levaduras en presencia de energía lumínica capturada de una fuente de luz natural o artificial para producir alcohol y CO₂.³⁵

1.4 FOTOBIOREACTORES

Un fotobiorreactor es un sistema que proporciona un medio ambiente artificial, cuyo parámetro principal es la penetración de luz, para el crecimiento de cultivos de microorganismos fotosintéticos y se realiza una conversión química a partir de energía lumínica.³⁶

Los fotobiorreactores ejercen algunas ventajas con respecto a los sistemas abiertos como, por ejemplo: menor área de construcción, mayor control de

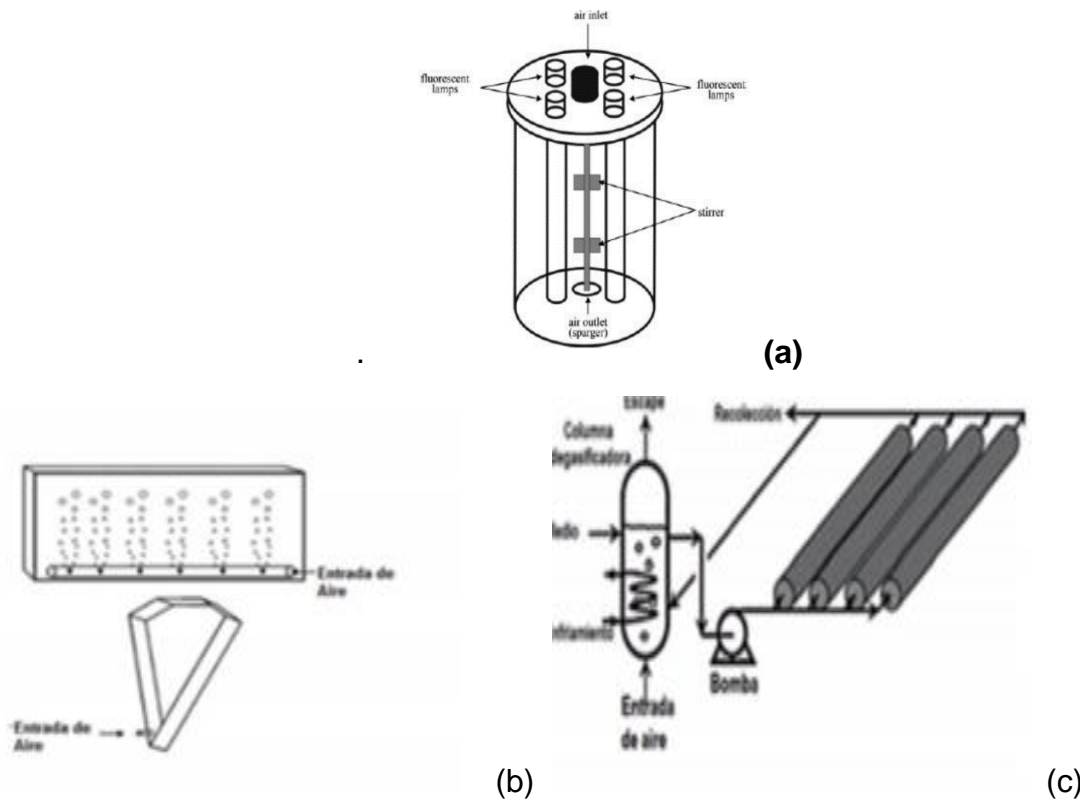
³⁵ CALDERON C., Sara. Evaluación de la influencia lumínica sobre producción de biomasa y lípidos a partir de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de panel plano a escala banco. Trabajo de grado Ingeniería Química. Bogotá, D.C.: Fundación Universidad América. Facultad de Ingenierías. Programa Ingeniería Química, 2013. p. 54

³⁶ LOPEZ Ayala, Fredy. Diseño y montaje de un fotobiorreactor para producción de microalgas. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico-químicas, 2010. 89 p.

variables de crecimiento, área de contaminación nula, eficiencia en utilización de fuentes de luz y costo de cosecha bajo.³⁷

1.4.1 Tipos de fotobiorreactores. Actualmente en la industria existen tres tipos básicos de fotobiorreactores: Tubular, panel plano y tipo fermentador (ver figura 4). En los procesos fermentativos de cervezas y vinos se utiliza el tipo fermentador, que requiere un sistema de iluminación netamente artificial en comparación con los dos restantes.

Figura 4. Tipos de fotobiorreactores. **(a)** Tipo fermentador; **(b)** Panel plano; **(c)** Tubular Horizontal



Fuente: Carvalho, A. P. Microalgs Reactors, 2006

1.4.2 Parámetros de diseño. En el diseño de un fotobiorreactor tipo fermentador, es necesario tener en cuenta varios parámetros como tipo de fuente de luz, características del sistema de iluminación, volumen, capacidad, sistemas externos de escape de gases y control de temperatura. Estos parámetros se relacionan

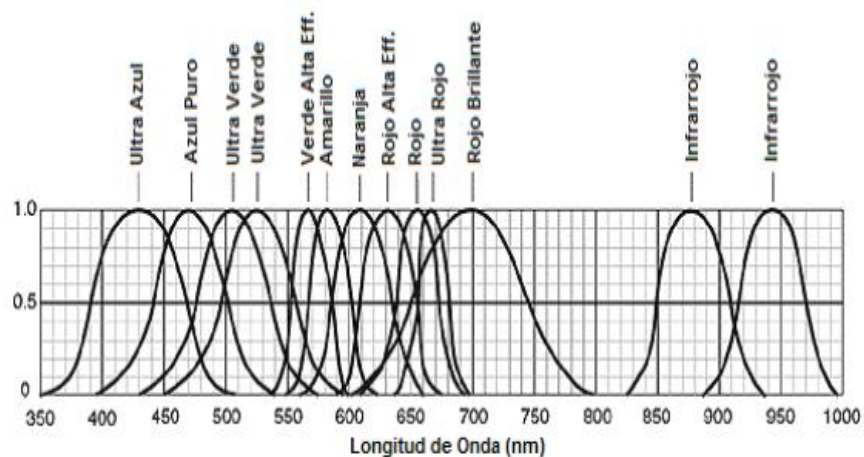
³⁷ CORDOBA, L y RUBIO, D. Evaluación de la producción de hidrógeno en un fotobiorreactor mediante la microalga *Chlorella vulgaris*. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bogotá: Fundación Universidad de América. 2011, p. 35-48.

directamente con la eficiencia del fotobiorreactor en el proceso, además de los costos de construcción y operación.³⁸

1.4.3 Requerimientos de luz. La eficiencia del LED es una relación de la cantidad de fotones que puede emitir para generar luz y depende de la capacidad del material para absorber o reflejar fotones que se propagan a través de él.³⁹

La energía contenida en un fotón de luz es proporcional a su longitud de onda y también a su color como se muestra en la gráfica 2.

Gráfica 2. Emisión de luz LED según longitud de onda



Fuente: ESTRADA-HERNÁNDEZ, A. Mediciones en LED's de alta intensidad. En: Simposio de Metrología 22-23 de octubre de 2008. Santiago de Querétaro, México.

³⁸ RUBIO Fernández, Diego. Diseño de un fotobiorreactor airlift a escala banco. Bogotá, D.C.: Revista Elementos. Número 4, Junio de 2014. p. 124-145.

³⁹ CORDOBA, L y RUBIO, D. Evaluación de la producción de hidrógeno en un fotobiorreactor mediante la microalga *Chlorella vulgaris*. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bogotá: Fundación Universidad de América. 2011, p. 35-48.

2. METODOLOGIA

2.1 GENERALIDADES DEL PROCESO

La micro cervecería EL DORADO ARTESANIAS LIQUIDAS ubicada en la localidad de Engativá, establece una capacidad de producción mensual de 500 litros de cerveza artesanal tipo American Pale Ale. Con el fin de establecer las principales condiciones y generalidades del proceso se realizó una revisión bibliográfica de los diferentes parámetros a considerar en la producción de cervezas estilo Pale Ale. Además, se efectuó una visita a la planta donde se establecieron las generalidades del proceso y se describieron las principales operaciones unitarias involucradas dentro de la elaboración de la cerveza a nivel planta

2.1.1 Condiciones fermentativas a nivel planta. Con el fin de determinar las condiciones de fermentación a nivel laboratorio, se realizó una visita a la planta para conocer los procesos involucrados en la elaboración de la cerveza como son : tipo de malta, pre-tratamiento del agua, tiempo de fermentación, capacidad de producción, características del tipo de cerveza y control de factores externos, a través de toma de datos. La figura 5 muestra los diferentes tanques donde se lleva a cabo el proceso a nivel planta.

Figura 5. Proceso de producción de cerveza a nivel planta.



2.1.2 Fermentación del mosto. En la planta se describieron las principales condiciones de operación como temperatura, presión, volumen de carga y concentración de inóculo de levadura; además de las condiciones del mosto a la entrada del tanque fermentador. La figura 6 muestra el enfriamiento del mosto producido por un intercambiador de calor de placas y la carga de mosto para iniciar el proceso fermentativo.

Figura 6. Fermentación del mosto. **(a)** Pre-enfriamiento del mosto; **(b)** Carga de mosto al fermentador



(a)



(b)

2.1.3 Caracterización de la levadura. Se determinaron las condiciones de crecimiento adecuadas para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, mediante una revisión bibliográfica donde se establece la taxonomía, principales análisis de microorganismos y condiciones de fermentación.

2.1.4 Activación e inoculación de levadura a nivel de planta. Para establecer la concentración de levadura a inocular, se tomaron los datos tomados directamente a nivel planta y se realizó una revisión bibliográfica de la densidad celular apropiada de levadura para fermentar.

Figura 7. Activación de levadura a nivel planta.



Para la activación de la levadura se llevó a cabo a partir de una concentración de un gramo de levadura en 100 mL de agua, agitando continuamente hasta homogeneizar. Una vez obtenida la dilución, se inoculó la solución en 20 litros de mosto a un tanque con capacidad de 50 L mostrado en la figura 7, separado del tanque principal de fermentación durante las primeras 8 horas. Finalmente, se inoculó la mezcla del mosto al tanque de fermentación que contiene 480 L de mosto cervecero. Realizando una revisión bibliográfica de la densidad de células apropiada de levadura *Saccharomyces Cerevisiae* fue de 1×10^8 UFC / ml.⁴⁰

2.1.5 Caracterización del fermentador. La caracterización del fermentador se generó a través de medición de datos tomados directamente de la planta, con el fin de conocer las principales dimensiones y especificaciones del fermentador, permitiendo de esta manera ejercer un escalamiento de los parámetros a nivel laboratorio en cuanto al diseño del fotobiorreactor.

⁴⁰ HOYOS R., Margarita. Parámetros cinéticos de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de un campo magnético variable de baja intensidad y alta frecuencia. Medellín: VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 2005. p. 39-44.

Figura 8. Fermentador utilizado a nivel planta.



Como se muestra en la figura 8, la fermentación del mosto se realiza en un fermentador cilindro-cónico de acero inoxidable tipo AISI – 304 con capacidad de 500 L. El control de presión dentro del tanque se mide a través de un barómetro externo ubicado en la parte superior del tanque. El control de la temperatura se mantiene por medio de un serpentín interno y el monitoreo se realiza con un termómetro externo ubicado en la parte inferior. El tanque también consta de un sistema de inyección de vapor a través de tubería externa, una válvula de entrada del mosto ubicado en el centro del tanque y una válvula de escape ubicada en la parte inferior.

2.1.6 Muestreo a nivel de planta. Se tomó una muestra de 2 litros de mosto en un erlenmeyer previamente esterilizado con ácido peracético. El muestreo se realizó después de la fase de Whirlpool, cuando el mosto sale del intercambiador de calor a una temperatura de 25 a 30 ° C antes de ser cargado al fermentador sin inoculación. Una vez tomada la muestra, el erlenmeyer se envasa herméticamente y se mantiene refrigerado a 10°C.

2.2 SELECCIÓN DEL FOTO-BIORREACTOR

Una vez establecidas las condiciones a nivel planta, se procede a seleccionar el fotobiorreactor a utilizar para el proceso fermentativo a escala laboratorio sintetizando mediante una matriz de selección teniendo en cuenta criterios principales como son:

- Control de densidad celular
- Área expuesta a la iluminación
- Control de contaminación
- Escalamiento
- Adecuación de sistemas externos
- Control de temperatura
- Facilidad de adecuación fotosintética
- Facilidad de análisis comparativo
- Facilidad de muestreo
- Trabajo con volúmenes pequeños

2.2.1 Dimensionamiento del fotobiorreactor. Para el dimensionamiento del fotobiorreactor la relación entre el diámetro y la altura del mosto varía de 1:1 a 1:5 con el fin de obtener homogeneidad en cuanto al volumen y contenido. También es importante establecer un espacio para el ascenso de la capa de espuma y la cantidad de CO₂ que se forman durante el proceso. Básicamente se establece que el volumen de espacio en los tanques de fermentación es 18 a 35 % de la cantidad de mosto al inicio de la fermentación.⁴¹

De acuerdo a lo planteado se realiza el cálculo del volumen total, el volumen de trabajo, el volumen de espacio libre de mosto y la geometría del fotobiorreactor seleccionado.

2.2.2 Selección del sistema de iluminación LED. La forma de iluminación se diseñó de acuerdo con lo planteado por Vanderlei Bagnato, donde expresa que es posible iluminar en la superficie y al interior del tanque fermentador. Se pueden aplicar fuentes de luz de diferente origen (LED, UV o fluorescente), método de distribución y fotoperiodo.⁴²

El sistema de iluminación se seleccionó partiendo de tres diferentes modelos adecuados al fotobiorreactor. Los modelos de iluminación se establecen a partir de una tira flexible de LED marca MAXIM LIGHTING compuesta por 300 LED 's con una potencia de 24 W y una intensidad de 2 A.⁴³

⁴¹ KUNSE, Wolfgang. Tecnología Para Cerveceros y Malteros. Alemania: VLB Berlín, 2006. p. 231-238.

⁴² DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION USP. Uso de la foto-estimulación para acelerar la fermentación en el proceso de producción de cerveza de barril. Inventor: V. SALVADOR BAGNATO. Int. CL.: C12C 11/00. Fecha de solicitud, 29 diciembre, 2010 Brasil, patente de investigación. RPI 2206. 16, abril, 2013.

⁴³ ERMEC. Tiras flexibles WATERPROOF [online]. LSV OFL 1.1. [Bogotá, Colombia]: WATERPROOF, ene. 2013 [consultado el 25 oct, 2016]. Disponible desde Internet en: <http://www.ermec.com/catalogos/2009/CAT-ERMEC-ILU-TIRAS-FLEXIBLES.pdf>

La fuente de luz LED se seleccionó porque presentó las siguientes características:

- Bajo consumo energético.
- Fácil conexionado.
- Tamaño compacto.
- Luz homogénea.
- No irradia luz UV ni IR.
- Flexibilidad.
- Resistencia a Rayos UV.

Se realizó una medición con el luxómetro para determinar la eficiencia fotosintética a través de la iluminancia. Con base en las mediciones se realizó una matriz de selección tomando en cuenta otros parámetros como son: iluminancia promedio, área expuesta de iluminación, control de temperatura, control de incidencia de luz externa y control de contaminación.⁴⁴

2.2.2.1 Primer modelo de iluminación. En el primer modelo de iluminación (ver figura 9) se utilizó una cinta de 4,65 m que corresponde a 278 LED's, ubicada de forma radial y distribuida uniformemente alrededor del cilindro interno del fotobiorreactor con un volumen 692, 7 cm³. De esta forma se logró una irradiación completa desde el interior hacia las paredes externas del fotobiorreactor sin ejercer contacto con el mosto.

Figura 9. Primer modelo de iluminación.



⁴⁴ CORDOBA, L y RUBIO, D. Evaluación de la producción de hidrógeno en un fotobiorreactor mediante la microalga *Chlorella vulgaris*. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bogotá: Fundación Universidad de América. 2011, p. 35-48.

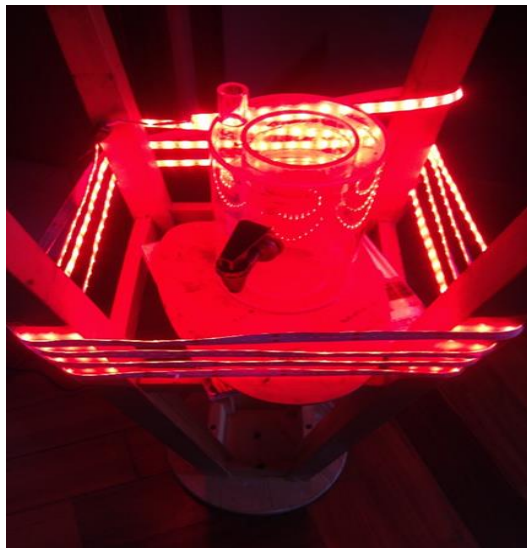
2.2.2.2 Segundo modelo de iluminacion. El segundo modelo (ver figura 10) de iluminacion es diseñó a partir de una cinta LED de 5 m que corresponde a 300 LED ´s, ubicada de forma radial y distribuida uniformemente alrededor del cilindro externo del fotobiorreactor, a una distancia de 0,5 cm por vuelta, con el fin de lograr una cobertura completa del volumen externo del fotobiorreactor ($2035,8 \text{ cm}^3$). De esta forma, la irradiación se establece desde la superficie externa hacia las paredes del cilindro interno del fotobiorreactor.

Figura 10. Segundo modelo de iluminación.



2.2.2.3 Tercer modelo de iluminación. En el tercer modelo de iluminacion (ver figura 11), se utilizó 5 m de cinta distribuida uniformemente alrededor de una plataforma cuadrangular con un area de $0,64 \text{ m}^2$, a una distancia de 40 cm del fotobiorreactor, tomando un espacio entre cintas de 3 cm con el fin de exponer a la irradiacion únicamente el volumen de mosto contenido al interior del fotobiorreactor (1000 cm^3).

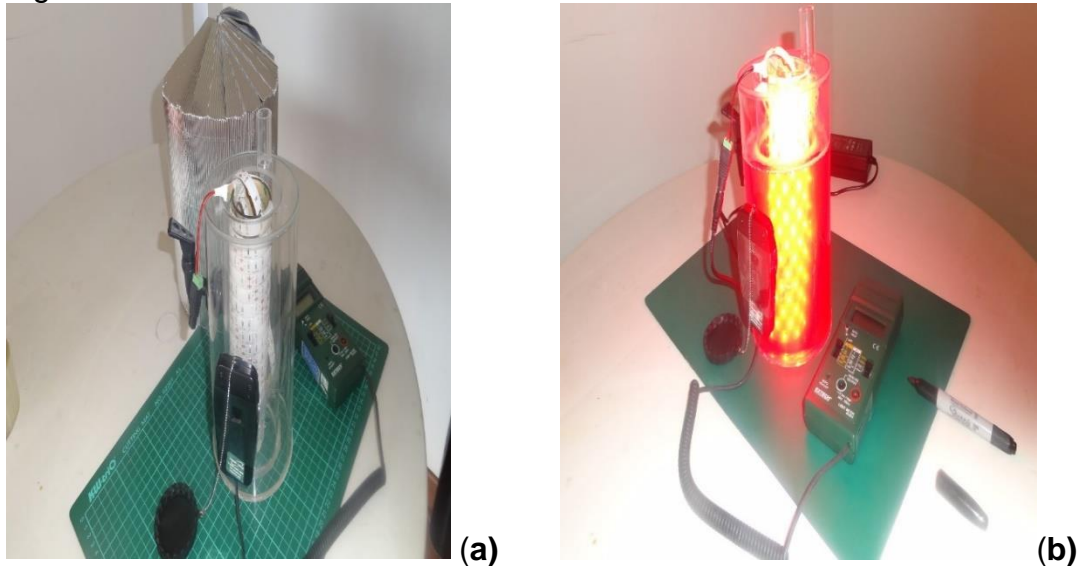
Figura 11. Tercer modelo de iluminación.



2.2.2.4 Medición de Iluminancia. El nivel de iluminancia indica la cantidad de flujo o nivel de iluminación de la fuente de luz LED en relación con una superficie determinada, su unidad de medida se expresa en Lux (Lx) y se mide por medio un luxómetro.⁴⁵

Para el caso de estudio, se tomó la pared externa del fotobiorreactor como superficie de medida y se acopló el fotosensor del luxómetro en el mismo punto para los tres modelos. Se realizaron dos mediciones de iluminancia para cada modelo, inicialmente con el fotobiorreactor completamente vacío y posteriormente con el fotobiorreactor cargado con mosto a manera de pre-experimentación, como se muestra en la figura 12.

Figura 12. Medición de iluminancia. **(a)** Fotobiorreactor vacío; **(b)** Fotobiorreactor cargado.



2.2.3 Fermentador sin iluminación. La construcción del fotobiorreactor se llevó a cabo con base en los resultados obtenidos en la matriz de selección, mientras que la fermentación tradicional a nivel laboratorio se realiza en un frasco de vidrio de borosilicato con volumen de un litro, bajo las mismas condiciones (ver figura 13).

⁴⁵ ESTRADA-HERNANDEZ, A. Mediciones en LED's de alta intensidad. En: Simposio de Metrología 22-23 de octubre de 2008. Santiago de Querétaro, México.

Figura 13. Frasco de vidrio de borosilicato para fermentación tradicional.



2.3 MONTAJE Y PREXPERIMENTACION

El montaje se realizó a partir de la carga de muestra a los dos fermentadores, el proceso de activación e inoculación de levadura y el monitoreo de temperatura a lo largo del tiempo de fermentación.

2.3.1 Carga de muestra al fotobiorreactor. Según la metodología planteada, el mosto producido es dividido en dos tanques de fermentación con el mismo volumen, portando la misma cantidad de sustrato (azúcar)⁴⁶. En consecuencia, la muestra de 2 L de mosto tomada previamente a nivel planta, se distribuyó de manera equitativa cargando 1 L de mosto refrigerado en el frasco fermentador y el volumen restante en el fotobiorreactor iluminado. Los dos biorreactores fueron previamente esterilizados con ácido peracético y se ubicaron bajo las mismas condiciones de temperatura y en ausencia de luz natural como se muestra en la figura 14.

⁴⁶ DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION USP. Uso de la foto-estimulación para acelerar la fermentación en el proceso de producción de cerveza de barril. Inventor: V. SALVADOR BAGNATO. Int. CL.: C12C 11/00. Fecha de solicitud, 29 diciembre, 2010 Brasil, patente de investigación. RPI 2206. 16, abril, 2013.

Figura 14. Biorreactores cargados con mosto.



2.3.2 Activación e inoculación de la levadura. Para este caso, se inoculó el mismo tipo de levadura en la misma cantidad.⁴⁷ La concentración de levadura se escaló de acuerdo con las propiedades de fermentación establecidas en la literatura y los datos obtenidos de inoculación a nivel planta. De esta forma, se tomaron 0,8 gramos de levadura seca en 8 mL de agua destilada a 25 °C, agitando durante 30 minutos hasta homogeneizar. Posteriormente se tomaron 8 mL del inóculo y se distribuyeron 4 mL para a cada uno de los biorreactores.

2.3.3 Monitoreo de temperatura. Una vez cargado e inoculado el mosto a los dos biorreactores, se ubicaron en un cuarto oscuro sin presencia de luz natural y se monitoreó la temperatura cada 6 horas por un periodo de 4 días para cada proceso con un termómetro externo.

2.4 ANALISIS DEL PROCESO FERMENTATIVO A ESCALA LABORATORIO

Con el fin de evaluar el rendimiento del proceso fermentativo a nivel laboratorio se tomaron muestras durante 4 días en cada uno de los biorreactores. Posteriormente se elaboró un recuento de levaduras en cámara de Neubauer, análisis de grados Brix por refractometría y determinación de azúcares reductores

⁴⁷ DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION USP. Uso de la foto-estimulación para acelerar la fermentación en el proceso de producción de cerveza de barril. Inventor: V. SALVADOR BAGNATO. Int. CL.: C12C 11/00. Fecha de solicitud, 29 diciembre, 2010 Brasil, patente de investigación. RPI 2206. 16, abril, 2013.

por técnica de DNS⁴⁸. Los resultados generados durante la experimentación permitieron una comparación entre la fermentación tradicional y la fotofermentación.

2.4.1 Muestreo. Para establecer los parámetros de crecimiento de levadura se tomaron muestras de 2 mL para cada uno de los biorreactores en tubos tapa rosca de 4 mL (ver figura 15), antes y después de la inoculación (tiempo 0) y cada 6 horas durante 4 días. Las muestras fueron refrigeradas a 5 °C y posteriormente procesadas para analizar la concentración celular por conteo en cámara de Neubauer y el sobrenadante se conservó para calcular la concentración de azúcares reductores por la técnica del DNS.

Figura 15. Muestras de mosto de las dos fermentaciones.



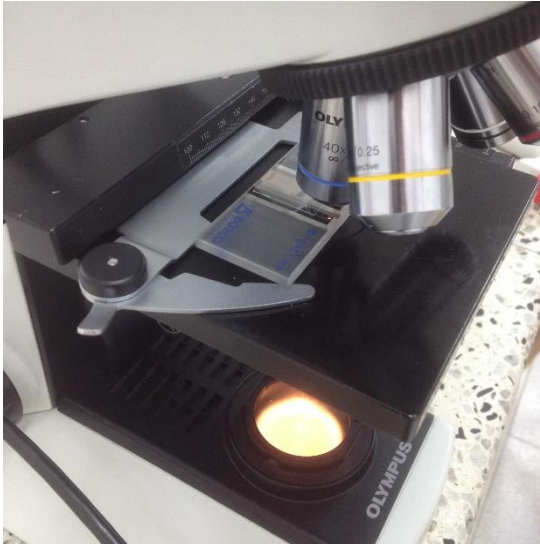
2.4.2 Recuento en cámara de Neubauer. La curva de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvo a partir de la técnica de recuento en cámara de Neubauer, que consiste en introducir 20 μ L de la muestra previamente diluida en la cámara de Neubauer y con ayuda del microscopio se realizó el conteo de células por cada cuadrante.

⁴⁸ MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 1959. 8 p.

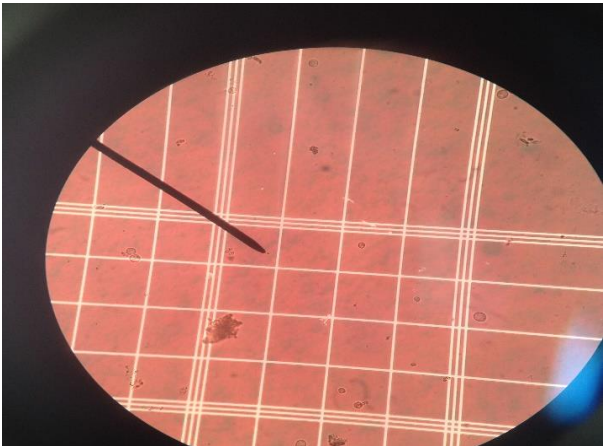
Figura 16. Procedimiento. **(a)** Toma de muestra; **(b)** Conteo en cámara de Neubauer para evaluar la curva de crecimiento; **(c)** lectura en microscopio.



(a)



(b)



(c)

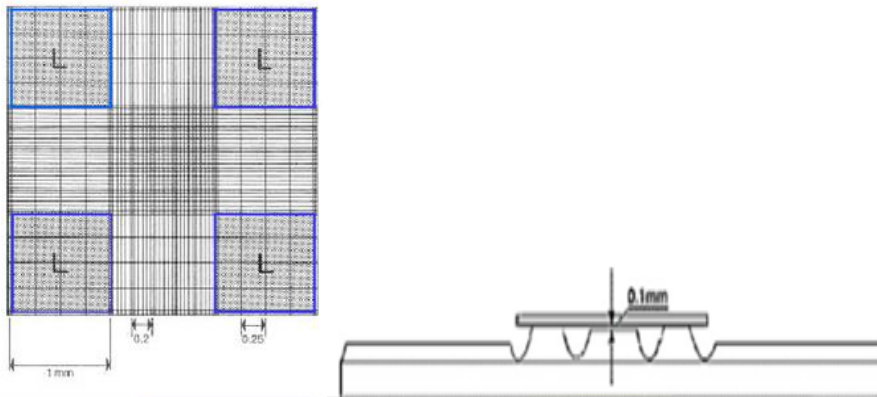
A partir de los datos obtenidos se calculó el número de células para cada muestra, de acuerdo con la ecuación 3.

Ecuación 3. Crecimiento celular en UFC / mL

$$\text{No. de Células} = \text{No. células} \times (\text{factor de dilución})^{-1} \times \text{área de la cámara}$$

La ecuación 3 relaciona el número de células contadas directamente al microscopio con el inverso del factor de dilución y las dimensiones de la cámara (Ver Figura 17).

Figura 17. Dimensiones de la cámara de Neubauer.



Fuente. ALTAMIRANO C., Carlos A. Optimización de un método para la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la etapa de fermentación del mosto de cerveza, 2013.

2.4.3 Evaluación del consumo de sustrato. Para determinar el consumo de sustrato se realizó la cuantificación de los azúcares reductores mediante la técnica del DNS (Acido 3, 5 Dinitro Salicílico),⁴⁹ (ver anexo B). Mediante la curva de calibración se relacionó la absorbancia, (leída en un espectrofotómetro marca Génesys 20, Helios Gamma a 540 nm) y la concentración de azúcares [g/L].

El método DNS se realizó comparando los resultados con la curva patrón de glucosa, para obtener la curva correspondiente y determinar los equivalentes de azúcares reductores.

2.4.4 Curva patrón de glucosa. Se preparó la solución DNS compuesta por 8 g de sodio; 5 g de ácido dinitrosalicílico; 150 g de tartrato de sodio y potasio (ver anexo B); completando a 500 mL de agua y evitando su exposición a la luz. Posteriormente se prepararon concentraciones de glucosa partiendo de una solución estándar de 20 g/L (ver tabla 1), se añadieron 0, 25 mL de solución DNS a cada una de las concentraciones, completando con 2,5 mL de agua destilada.

⁴⁹ MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 1959. 8 p.

La absorbancia de cada muestra se leyó a 540 nm en el espectrofotómetro y se graficaron los datos obtenidos en relación con la concentración m realizando un ajuste por regresión lineal.

Posteriormente se preparó la curva patrón a partir de diferentes concentraciones de glucosa (ver tabla 1), en un rango de 1 a 12 g/L, con el fin de alcanzar el rango de concentración de azúcar disponible para su lectura.

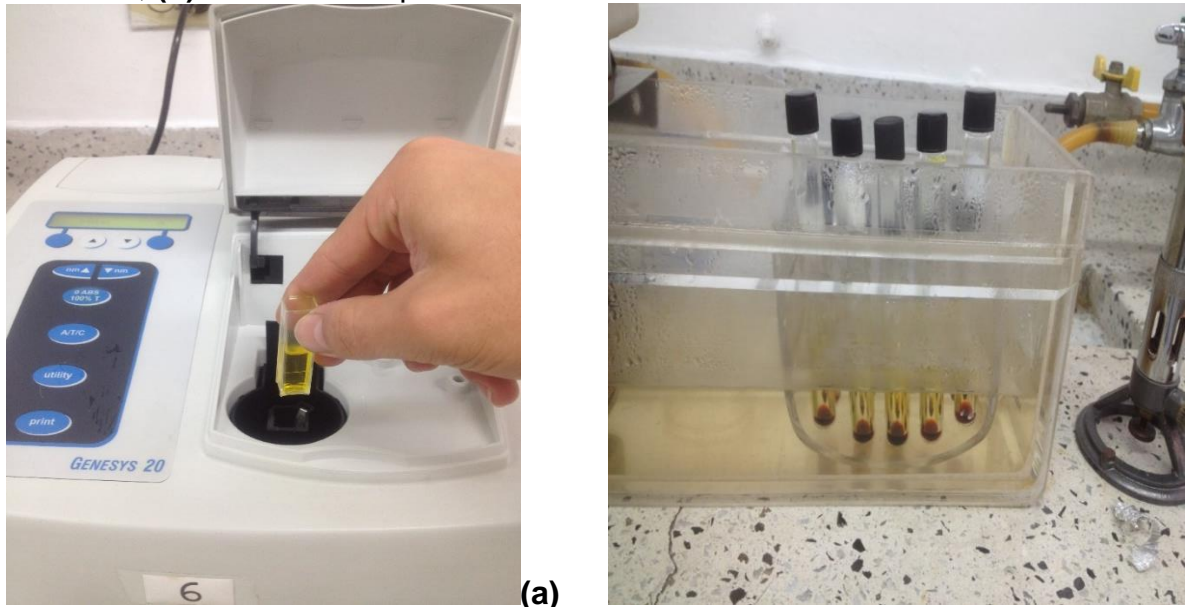
Tabla 1. Preparación de soluciones de glucosa

Número de dilución	Volumen de Stock glucosa (mL)	Volumen de agua (mL)	Concentración final del tubo (g/L)
1	0	1	0
2	0.05	0.95	1
3	0.1	0.9	2
4	0.2	0.8	4
5	0.3	0.7	6
6	0.4	0.6	8
7	0.5	0.5	10
8	0.6	0.4	12

2.4.5 Curva de calibración de azúcares reductores. Se elaboró una curva de calibración aplicando la técnica de DNS planteada por Miller⁵⁰, en donde se tomaron 0,25 mL de cada muestra previamente diluida con suero fisiológico y se agregaron 0,25 mL de solución de DNS en tubos falcon tapa rosca protegidos de la luz con papel aluminio, las muestras fueron calentadas en baño de maría durante 5 minutos y después enfriadas durante el mismo periodo de tiempo para detener la reacción, finalmente se añadieron 2,5 mL de agua destilada a cada muestra y se leyó la absorbancia a 540 nm.

⁵⁰ MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 1959. 8 p.

Figura 18. Procedimiento curva de azúcares reductores. **(a)** Preparación de muestras; **(b)** Lectura en espectrofotómetro.



(b)

Se ajustaron gráficamente los datos de acuerdo con la ecuación lineal obtenida en la curva patrón de glucosa, obteniendo dos curvas de calibración para cada uno de los biorreactores y se realizó un análisis comparativo de consumo de azúcares de las dos fermentaciones a través del tiempo.

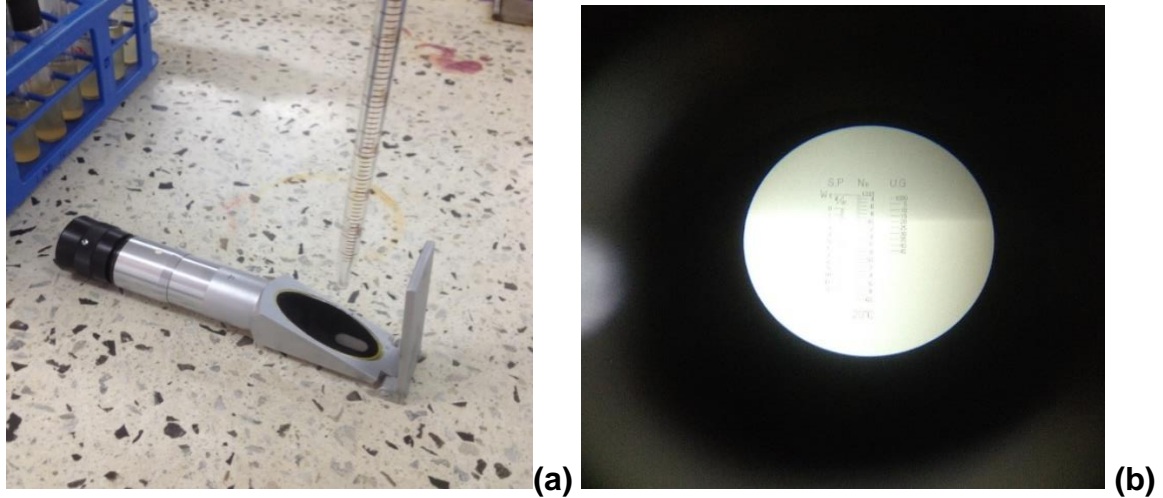
2.4.6 Análisis de grados Brix. Se determinaron los grados Brix de cada muestra a través de medición directa por técnica de refractometría,⁵¹ utilizando un refractómetro marca NATIONAL 13856 calibrado a 20 °C (ver anexo A).

Posteriormente se realizó una revisión bibliográfica para obtener la densidad de cada muestra a través del tiempo a partir de tablas de relación densidad - grados Brix expresadas en la literatura (ver anexo D).

Con los datos obtenidos se relacionó el consumo de azúcares para cada una de las dos fermentaciones, estableciendo una comparación entre los biorreactores.

⁵¹ RUBIO Fernández, Diego. Diseño de un fotobiorreactor airlift a escala banco. Bogotá, D.C.: Revista Elementos. Número 4, Junio de 2014. p. 124-145.

Figura 19. Procedimiento. **(a)** Carga de muestra; **(b)** Lectura en refractómetro.



2.4.7 Determinación del grado alcohólico. El grado de alcohol se determinó con base en los datos obtenidos de la tabla de correlación grados Brix – densidad, tomados para cada muestra y se aplicó la siguiente fórmula.⁵²

Ecuación 4. Porcentaje de alcohol por volumen.

$$\% \text{ ABV} = (\text{DF} - \text{DI}) \times 131,25$$

Donde % ABV = porcentaje de alcohol por volumen

DF = densidad final en g/L

DI = densidad inicial en g/L

Una vez establecido el % ABV (porcentaje de alcohol por volumen) para cada muestra según los cálculos, se graficó una comparación entre el % ABV de la foto fermentación y la fermentación en ausencia de luz a través del tiempo.

2.4.8 Comparación de las fermentaciones. Con base en la información recopilada, se obtuvo el rendimiento promedio de acuerdo con los rendimientos obtenidos en intervalos de tiempo de 6 horas para cada uno de los parámetros (Crecimiento celular, consumo de azúcares reductores totales, consumo de azúcares por grados Brix y grado de alcohol).

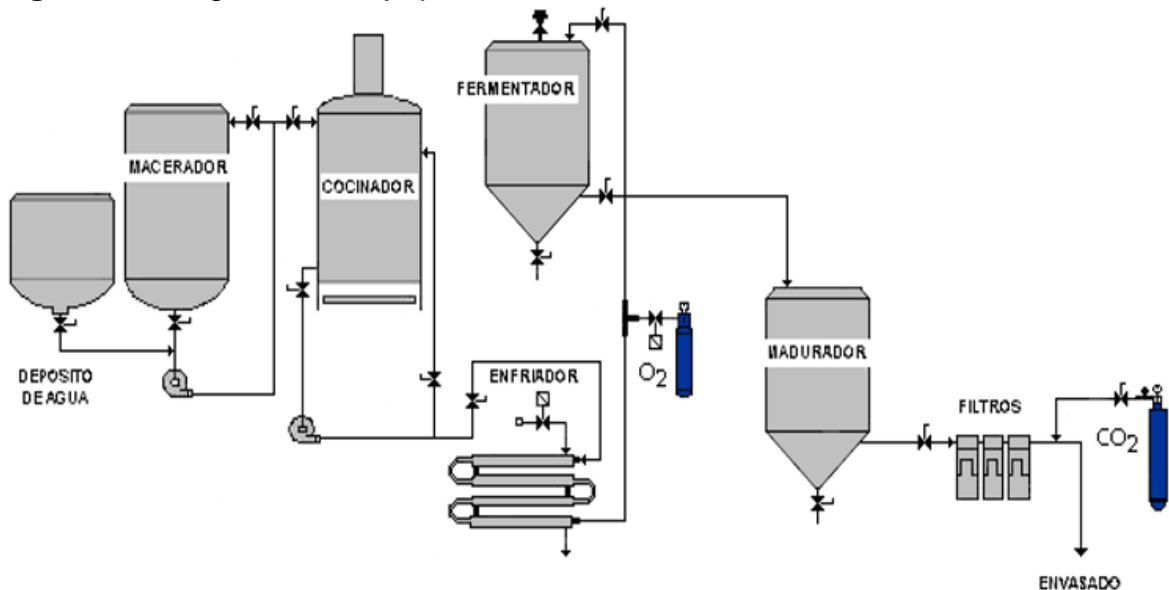
⁵² ESPINAR, Galo R. Diseño y construcción de un equipo con adaptación de tecnología para elaboración de cerveza artesanal. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Guayaquil: Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química. 2013. 181 p.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 GENERALIDADES DEL PROCESO

De acuerdo con el diagrama de flujo (ver figura 20) diseñado, se concluye que el proceso de elaboración de cerveza consta de operaciones unitarias esenciales antes de iniciar la fermentación, como son: pre-tratamiento del agua, maceración, cocción, enfriamiento de mosto, inoculación de levadura, enfriamiento de mosto, maduración y envasado de la cerveza.

Figura 20. Diagrama de flujo proceso de elaboración de cerveza.



Fuente: ALTAMIRANO C., Carlos A. Optimización de un método para la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la etapa de fermentación del mosto de cerveza, desde un nivel de laboratorio a un nivel piloto, 2013.

La micro cervecería EL DORADO ARTESANIAS LIQUIDAS, ubicada en la localidad de Engativá, elabora a nivel planta cerveza artesanal tipo American Pale Ale.

En su fabricación se emplea como base la malta pale de dos carriles, malta cristal o caramelo a fin de añadir complejidad y carácter a la cerveza. El proceso consiste en la producción de 500 litros de cerveza tipo American Pale Ale, para ello utiliza como materia prima 116, 34 Kg de malta caramelizada y 709 L de agua. La malta es molida a través de un molino de rodillos mientras que el agua pasa por un pre-tratamiento de filtración con carbón activado para cumplir con los estándares de calidad requeridos para el consumo.

El agua para la elaboración de este tipo de cerveza debe presentar un contenido en sulfatos entre 150 ppm a 350 ppm de SO_4^{2-} , estableciendo la dureza del agua utilizada. Mientras que el contenido de carbonatos varía entre 50-150 ppm de CO_3^{2-} aumentando el pH y neutralizando la acidez de la malta.⁵³

El macerado se realiza mediante una infusión sencilla entre 66 y 68 °C, siendo opcional la realización de un escalón previo a los 40 °C que puede mejorar la activación de coenzimas. Temperaturas cercanas a los 50 °C afectan el contenido de espuma y cuerpo de la cerveza.⁵⁴ La maceración se da lugar en un tanque a una temperatura de 60 °C a 65 °C y presión atmosférica, debido a que estas condiciones favorecen un mayor porcentaje de absorción de azúcares. Al final de la maceración, el mosto es previamente filtrado y clarificado dentro del mismo tanque mediante un sistema de falso fondo y recirculación.

En la fase de cocción el mosto es calentado hasta ebullición (98 °C) agregando el lúpulo con el fin de eliminar compuestos bacterianos e incentivar la actividad enzimática. El lúpulo utilizado es el Cascada, sin embargo, pueden emplearse perfectamente otros tipos de origen americano como Chinook, Centenal y Amarillo, siendo el aroma y sabor a lúpulo lo más característico del estilo Pale Ale.⁵⁵ Durante la fase de cocción del mosto se realizan adiciones de lúpulo al inicio, a la mitad del hervido y una vez concluido. En la fase de Whirlpool las partículas sólidas disueltas en el mosto son eliminadas por agitación permanente, logrando una limpieza y a la vez disminución de temperatura apropiada para la fase de fermentación.

La levadura a emplear para la elaboración de la American Pale Ale puede ser casi cualquier levadura ALE de alta fermentación, para el caso en particular se utiliza levadura tipo *Fermentis Safale S-04* debido a su atenuación y una baja proporción de aromas afrutados.

La temperatura de fermentación puede darse en un rango de los 15 °C a los 22 °C aproximadamente, teniendo presente que con temperaturas más bajas se

⁵³ Asociación de Cerveceros Caseros Españoles (ACCE). Pale Ale Americana. [online]. [SIL OFL 1.1](#). [Murcia, España]: ACCE, nov. 2012 [consultado el 10 sept, 2016]. Disponible desde Internet en: http://cerveceros-caseros.com/index.php?option=com_content&view=article&id=44:pale-ale-americana&catid=5:documentos-tecnicos&Itemid=12

⁵⁴ ALTAMIRANO C., Carlos A. Optimización de un método para la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la etapa de fermentación del mosto de cerveza, desde un nivel de laboratorio a un nivel piloto. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Lima: Universidad Mayor de San Marcos. Facultad de Química, 2013. 175 p.

⁵⁵ ESPINAR, Galo R. Diseño y construcción de un equipo con adaptación de tecnología para elaboración de cerveza artesanal. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Guayaquil: Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química. 2013. 181 p.

obtendrán cervezas con mayor predominio del carácter cítrico en el sabor, mientras que las fermentadas a temperaturas mayores acentuarán el lúpulo con más aromas afrutados.⁵⁶ Este tipo de cerveza producida a nivel planta, tiene un tiempo de fermentación de 4 a 5 días previos al inicio de la maduración.

Para proceso de maduración es de 25 días, donde la cerveza es filtrada por medio de un sistema de recirculado y carbonatada naturalmente dentro de la misma botella.

El estudio e implementación de nuevas tecnologías como la irradiación de levaduras mediante fuentes de luz LED en el proceso de fermentación es aplicado actualmente en plantas cerveceras como la cervecería KIRSHEN, ubicada en San Carlos, Brasil, ha logrado mejorar el rendimiento del proceso fermentativo en un 20 %.⁵⁷

Por tal razón, la investigación puede ser aplicada a las condiciones fermentativas de la planta EL DORADO ARTESANIAS LIQUIDAS S.A.S., con el fin de disminuir tiempo de fermentación establecido (4 a 5 días), generando beneficios para la empresa como: reducción en el tiempo de producción, aumento de la capacidad productiva y ahorro en los costos de operación.

3.1.1 Fermentación del mosto. En la fase de fermentación, el mosto sale del tanque de Whirlpool a 80 °C fue enfriado mediante un intercambiador de calor de placas hasta una temperatura 30 °C y posteriormente cargado al tanque de fermentación. La temperatura indicada fue de 20 °C y la presión de 25 psi. El tiempo de fermentación fue de 4 días alcanzando un índice de grados Brix de 16 °C.

Durante las primeras 12 horas la presión aumentó hasta 35 psi y la temperatura alcanzó un límite de 23 °C, generando el mayor consumo de azúcares, incrementando el crecimiento celular de la levadura y reaccionando exotérmicamente debido a la ruta metabólica glicólisis.⁵⁸

3.1.2 Caracterización de la levadura. Para el proceso fermentativo se utilizó levadura *Fermentis Safale S-04*, la taxonomía. Los principales análisis y condiciones de fermentación se describen en el cuadro 2.

⁵⁶ Asociación de Cerveceros Caseros Españoles (ACCE). Pale Ale Americana. [online]. SIL OFL 1.1. [Murcia, España]: ACCE, nov. 2012 [consultado el 10 sept, 2016]. Disponible desde Internet en: http://cerveceros-caseros.com/index.php?option=com_content&view=article&id=44:pale-ale-americana&catid=5:documentos-tecnicos&Itemid=12

⁵⁷ OLIVERA, Marcos. Una cerveza brillante. En: *Pesquisa*. 2013. vol. 204, no. 240. 3 p.

⁵⁸ KANG, Jin-Won. Increasing fermentable sugar yields by high-pressure treatment during beer mashing. En: *Journal-Institute of Brewing*. Diciembre 2015, Vol.1

Cuadro 2. Caracterización de levadura.

LEVADURA FERMENTIS SAFALE S-04	
TAXONOMIA	
Reino	Fungí
Cepa	Ale
Especie	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>
Orden	<i>Sacaromicetales</i>
Género	<i>Saccharomyces</i>
División	<i>Ascomycota</i>
ANALISIS *	
% peso seco	94 - 96.5
Células viables al encasado	6 x 10 ⁹ ufc / mL
Bacteria totales	5 ufc / mL
Bacterias Acido acéticas	1 ufc / mL
% Atenuación aparente	7500%

Fuente: Lesafre group. *Fermentis* of Safale S-04 levadura seca tipo ale. Recuperado el 21 de marzo de 2016 de: <http://www.babrew.com.ar/notas%5CSafale%20S-04%20-%20Spanish.pdf>

La tabla muestra que para la elaboración del estilo Pale Ale se usará levadura *Fermentis Safale S-04*, también seleccionada para elaboración de Ales inglesas por su característica fermentación rápida y su capacidad de formar un sedimento compacto al final de la fermentación debido a su alta floculación, ayudando a mejorar la claridad de la cerveza. Es una levadura apta para gran variedad de tipos de cerveza y recomendable para fermentación en tanques cilindro-cónicos. Su rango de temperaturas de fermentación es de 12-25 °C, pero su rango ideal es de 15-20 °C. El fabricante recomienda una dosificación de 50 a 80 g/hl.⁵⁹

3.2 SELECCIÓN DEL FOTOBIOREACTOR

Para la selección del tipo apropiado de fotobiorreactor se tuvieron en cuenta los 3 modelos de fotobiorreactores utilizados en la industria para procesos fotosintéticos como son: tubular horizontal, tubular vertical y tipo fermentador.

3.2.1 Matriz de selección del tipo de fotobiorreactor. Se realizó una matriz de selección (Ver cuadro 5) de los tres tipos de fotobiorreactores, calificando los

⁵⁹ CERDAN, Marcelo. Levadura para la producción de cerveza. Porto Alegre: Fermentis, División de SI Lesafre. 2010, 54 p.

diferentes parámetros del 1 al 10 de acuerdo con el nivel de importancia (NI)⁶⁰, estableciendo el área expuesta de iluminación como el de mayor incidencia dentro del proceso fermentativo.

Los parámetros a tener en cuenta para la selección del fotobiorreactor de acuerdo con su nivel de importancia (NI), se describieron en el cuadro 3.

Cuadro 3. Parámetros de selección del tipo de fotobiorreactor

Parámetro	Nivel de importancia (NI)
Área expuesta de iluminación	10
Control de temperatura	9
Control de contaminación	8
Escalamiento	7
Facilidad de análisis comparativo	6
Facilidad de adecuación fotosintética	5
Control de densidad celular	4
Facilidad de muestreo	3
Adecuación de sistemas externos	2
Trabajo en volúmenes pequeños	1

Para cada fotobiorreactor se estableció un rango (Alto o fácil, medio, bajo o difícil) diferente para cada parámetro a analizar⁶¹, en consecuencia, se calificó el rango en una escala del 1 al 3 como se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 4. Rango de dificultad

Rango	Calificación
Alto o Fácil	3
Medio	2
Bajo o Difícil	1

El ponderado para cada fotobiorreactor es el producto entre el nivel de importancia y la calificación de acuerdo al rango (ver ecuación 5).

⁶⁰ TANCO, Martín. Metodología para la aplicación del diseño de experimentos (DoE) en la industria. Universidad de Navarra. 221 p.

⁶¹ RUBIO Fernández, Diego. Diseño de un fotobiorreactor airlift a escala banco. Bogotá, D.C.: Revista Elementos. Número 4, Junio de 2014. p. 149-154.

Ecuación 5. Ponderado de cada parámetro

$$Ponderado = Nivel\ de\ importancia\ (NI) \times Calificación$$

La ponderación final se calculó como la sumatoria del ponderado de cada fotobiorreactor, el cual estableció el resultado de la matriz (ver ecuación 6).

Ecuación 6. Ponderación final para cada fotobiorreactor

$$Ponderación\ final = \sum Ponderado$$

Para elaborar la matriz se tuvieron en cuenta los parámetros que afectan el comportamiento del fotobiorreactor durante el proceso fermentativo, como:

3.2.1.1 Área expuesta de iluminación. Esta permite maximizar la cantidad de diodos emisores de luz presentes durante el proceso fermentativo, además de brindar una distribución homogénea evitando zonas oscuras en el fotobiorreactor donde la levadura no pueda interactuar con la luz y así disminuir los errores de experimentación.⁶²

3.2.1.2 Control de proceso. Para obtener datos confiables es necesario controlar todas las variables que influyen en la fermentación alcohólica principalmente la temperatura, presión y densidad celular.⁶³

3.2.1.3 Facilidad de comparación Se debe seleccionar un fotobiorreactor que permita fácilmente establecer una comparación del proceso foto-estimulado con el proceso tradicional en ausencia de luz.

3.2.1.4 Control de contaminación. Este parámetro establece que el diseño adecuado del fotobiorreactor evita la incursión de otro tipo de microorganismos como levaduras salvajes que puedan alterar o destruir el proceso metabólico de las levaduras⁶⁴ y así generar una obtención errónea de los datos y toma de muestras.

⁶² CORDOBA, L y RUBIO, D. Evaluación de la producción de hidrógeno en un fotobiorreactor mediante la microalga *Chlorella vulgaris*. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bogotá: Fundación Universidad de América. 2011, p. 67-68.

⁶³ GARCIA, Cristian. Diseño de un sistema de bombeo y de desgasificación para un fotobiorreactor utilizado en la producción de biomasa y ácidos grasos a partir de microalgas. Trabajo de grado Ingeniero Mecánico. Cali: Universidad Autónoma de Occidente. Facultad de Ingeniería. Departamento de Energética y Mecánica, 2011. p. 60-67.

⁶⁴ PRADILLA Godoy, Silvia. Estudio de la incidencia luminosa en la producción de microalgas en un fotobiorreactor a escala laboratorio. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico-químicas, 2010. p. 77

Cuadro 5. Matriz de selección del fotobiorreactor

Parámetros	NI	Tipo de fotobiorreactor								
		Tubular horizontal			Tubular vertical			Fermentador		
		Rango	Calificación	Ponderado	Rango	Calificación	Ponderado	Rango	Calificación	Ponderado
Control de densidad celular	4	MEDIO	2	8	BAJO	1	4	MEDIO	3	12
Área expuesta a la iluminación	10	MEDIO	2	20	BAJO	1	10	ALTO	3	30
Control de contaminación	8	ALTO	3	24	ALTO	3	24	BAJO	1	8
Escalamiento	7	DIFICIL	1	7	MEDIO	2	14	MEDIO	2	14
Adecuación de sistemas externos	2	BAJO	1	2	BAJO	3	6	MEDIO	2	4
Control de temperatura	9	MEDIO	2	18	MEDIO	2	18	ALTO	3	27
Facilidad de adecuación fotosintética	5	DIFICIL	1	5	MEDIO	2	10	MEDIO	3	15
Facilidad de análisis comparativo	6	DIFICIL	1	6	MEDIO	2	12	ALTO	3	18
Facilidad de muestreo	3	DIFICIL	1	3	DIFICIL	1	3	MEDIO	2	6
Trabajo con volúmenes pequeños	1	DIFICIL	1	1	FACIL	3	3	FACIL	3	3
Ponderación final		94			104			122		

Los resultados de la matriz reflejaron que el fotobiorreactor tipo fermentador es el más adecuado para realizar el análisis del proceso fermentativo foto-iluminado, porque obtuvo la mayor ponderación final (122), a razón del área expuesta de iluminación, análisis comparativo, facilidad de escalamiento y viabilidad en cuanto a control de proceso.

La selección de este tipo de fotobiorreactor corroboró lo planteado por Larroche, quien estableció que los fotobiorreactores son sistemas expandidos que ofrecen intercambio de gases abiertamente además de ser usados para estudios de

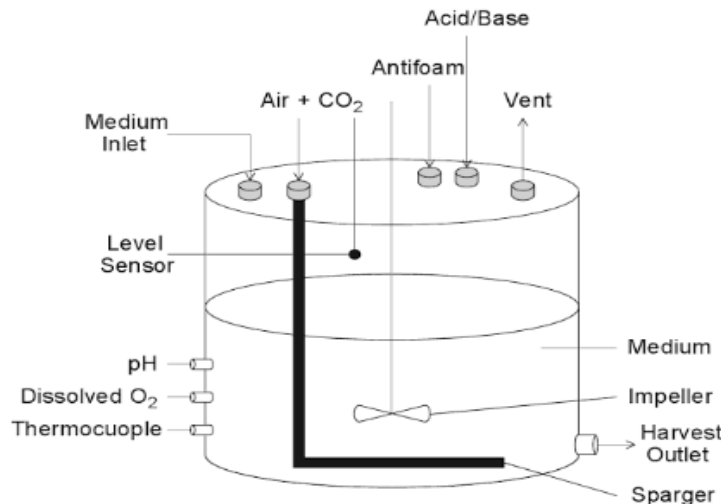
optimización, la mayor ventaja es el control y monitoreo exacto y preciso de los parámetros operativos durante la fermentación.⁶⁵

Una desventaja de seleccionar este tipo de fotobiorreactores es que el escalamiento hacia un volumen mayor está restringido debido a los altos costos de construcción.⁶⁶

3.2.2 Dimensionamiento del fotobiorreactor. El fotobiorreactor se dimensionó con base en el diseño básico de un fotobiorreactor tipo fermentador para microalgas (ver figura 21) planteado por Larroche, donde expresa que la penetración de la luz, escalamiento, transferencia de oxígeno son parámetros cruciales para el desarrollo del fotobiorreactor, además de establecer competitividad y viabilidad económica.⁶⁷

Según lo anterior, el diseño del biorreactor se asemejó al planteado por el cumpliendo y adaptando los parámetros propuestos a las condiciones de fermentación del proceso cervecero a escala laboratorio.

Figura 21. Diseño básico del fotobiorreactor tipo fermentador



Fuente. LARROCHE, C., y PANDEY, A Current developments in biotechnology and bioengineering: Bioprocesses, bioreactors and controls. Londres: Elsevier, 2016.

⁶⁵ LARROCHE, C., y PANDEY, A. (2016). Current developments in biotechnology and bioengineering: Bioprocesses, bioreactors and controls. Londres: Elsevier, 2016. 850 p.

⁶⁶ CALDERON C., Sara. Evaluación de la influencia lumínica sobre producción de biomasa y lípidos a partir de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de panel plano a escala banco. Trabajo de grado Ingeniería Química. Bogotá, D.C.: Fundación Universidad América. Facultad de Ingenierías. Programa Ingeniería Química, 2013. p. 54

⁶⁷ LARROCHE. Op. cit., p. 124

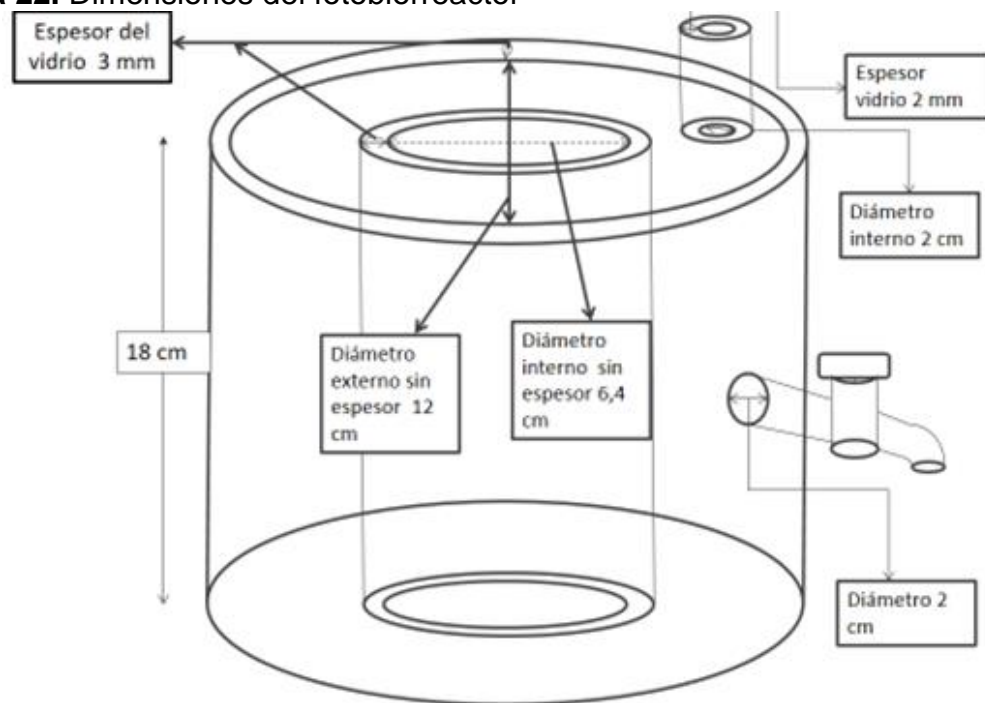
El fotobiorreactor apropiado para la foto-fermentación es el tipo fermentador, cuya geometría es cilíndrica. Por lo que se siguió la ecuación 7 para determinar su volumen.

Ecuación 7. Volumen total del fotobiorreactor.

$$\text{Vol. total del fotobiorreactor} = \pi * r^2 * h$$

Se diseñó el fotobiorreactor en forma de cilindro hueco, teniendo en cuenta la relación diámetro-altura, los sistemas externos de válvula de toma de muestra y válvula de salida de gases (ver figura 22). Posteriormente se determinó el volumen de operación, así como el volumen de espacio de fermentación (ver ecuación 8)

Figura 22. Dimensiones del fotobiorreactor



Ecuación 8. Volumen total del fotobiorreactor.

$$\text{Vol. total del fotobiorreactor} = \pi \times (r_1)^2 \times h \quad (6)$$

$$\text{Vol. total del fotobiorreactor} = \pi \times (6,3 \text{ cm})^2 \times 18 \text{ cm} = 2244,5 \text{ cm}^3$$

$$2244,5 \text{ cm}^3 \times \frac{0,001}{1 \text{ cm}^3} = 2,245 \text{ L}$$

Ecuación 9. Volumen del cilindro interno.

$$\text{Vol. cilindro interno} = \pi \times r_2 \times h \quad (7)$$

$$\text{Vol. cilindro interno} = \pi \times (3,5 \text{ cm})^2 \times 18 \text{ cm} = 692,7 \text{ cm}^3$$

$$2035,8 \text{ cm}^3 \times \frac{0,001}{1 \text{ cm}^3} = 0,693 \text{ L}$$

Ecuación 10. Volumen del cilindro externo

$$\text{Vol. Cilindro externo} = \pi * r_3 * h$$

$$\text{Vol. cilindro externo} = \pi \times (6 \text{ cm})^2 \times 18 \text{ cm} = 2035,8 \text{ cm}^3$$

Ecuación 11. Volumen de válvula de salida de CO₂

$$\text{Vol. válvula} = \pi * r_4 * h_2$$

$$\text{Vol. válvula} = \pi \times (1 \text{ cm})^2 \times 3 \text{ cm} = 9,4247 \text{ cm}^3 = 9,4247 \text{ cm}^3 \times \frac{0,001 \text{ L}}{1 \text{ cm}^3} = 0,9 \text{ L}$$

Ecuación 12. Volumen de operación.

$$\text{Vol. de operación} = \text{Vol. cilindro externo} - \text{Vol. cilindro interno}$$

$$\text{Vol. de operación} = 2,036 \text{ L} - 0,693 \text{ L} = 1,343 \text{ L}$$

Ecuación 13. Porcentaje de volumen de espacio

$$\% \text{ Vol. de espacio} = (\text{vol. de operación} - \text{vol. de carga de mosto}) * 100\%$$

$$\% \text{ Vol. de espacio} = 1,343 \text{ L} - 1 \text{ L} = (0,343 \text{ L}) * 100 \% = 34,3 \%$$

Donde: r_1 , radio del cilindro externo

r_2 , radio del cilindro interno

r_3 , radio del cilindro externo sin espesor

r_4 , radio de la válvula

h_1 , altura del cilindro

h_2 , altura de la válvula

La relación entre el diámetro y la altura del mosto varía de 1:1 a 1:5 con el fin de obtener homogeneidad en cuanto al volumen y contenido. Es importante establecer un espacio para el ascenso de la capa de espuma y la cantidad de CO₂ que se forman durante el proceso. Básicamente el volumen de espacio en los

tanques de fermentación es 18 a 35 % de la cantidad de mosto al inicio de la fermentación.⁶⁸

La determinación del volumen de operación del fotobiorreactor cumplió con la hipótesis, debido a que el volumen de espacio vacío es tanque es del 34,3 % teniendo en cuenta que se carga un litro de mosto. Dejando suficiente espacio para la generación de espuma y transferencia de CO₂.

3.2.3 Selección del material. El material más favorable para la construcción del fotobiorreactor es la fibra de vidrio debido a su índice de transparencia, estabilidad química, durabilidad y resistencia,⁶⁹ sin embargo, la fabricación este tipo de material resulta costoso debido a la geometría cilindro–hueca y adecuación de válvulas externas.

Por tal razón se decidió el acrílico, ya que es un material similar al vidrio con menos cualidades en cuanto a transparencia, durabilidad y resistencia; pero es económico y de fácil adecuación en los sistemas externos.⁷⁰

3.3 SELECCIÓN DEL SISTEMA DE ILUMINACIÓN LED

Se decidió utilizar los LED's de color rojo según lo planteado por investigaciones como la de Ya-Chun Yang⁷¹, donde las longitudes de onda que determinan el color de la luz en los LED's, aumentan la tasa de concentración de biomasa y la producción de lípidos. Siendo el color rojo el que establece el mayor consumo de biomasa (55 g/L).

3.3.1 Matriz de selección del sistema de iluminación. Se realizó una matriz de selección (Ver cuadro 8) de los tres modelos de iluminación establecidos previamente, calificando los diferentes parámetros de 1 a 5 de acuerdo con el nivel de importancia (NI),⁷² estableciendo la iluminancia como el de mayor incidencia

⁶⁸ KUNSE, Wolfgang. Materias Primas. En: Tecnología Para Cerveceros y Malteros. Alemania: VLB Berlín, 2006. p. 203-213.

⁶⁹ LOPEZ R., Tatiana y TORRES C., Carlos. Evaluación de desempeño del fotobiorreactor airlift para la producción de biomasa y lípidos a escala banco. Trabajo de grado Ingeniería Química. Bogotá, D.C.: Fundación Universidad América. Facultad de Ingenierías. Programa Ingeniería Química, 2013. p. 43-49

⁷⁰ LOPEZ Ayala, Fredy. Diseño y montaje de un fotobiorreactor para producción de microalgas. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico-químicas, 2010. 89 p.

⁷¹ HONG-WEI, Yen y YA-CHUN Yang. The effects of irradiation and microfiltration on the cells growing and total lipids production in the cultivation of *rhodotorula glutinis*. Bioresour Technology, 2012. 539 p.

⁷² TANCO, Martín. Metodología para la aplicación del diseño de experimentos (DoE) en la industria. Universidad de Navarra. 221 p.

dentro del proceso fermentativo. Los parámetros a tener en cuenta para la selección del fotobiorreactor de acuerdo a su nivel de importancia (NI) fueron:

Cuadro 6. Parámetros de selección de iluminación

Parámetro	Nivel de importancia (NI)
Iluminancia promedio	5
Área expuesta de iluminación	4
Control de temperatura	3
Control de incidencia de luz externa	2
Control de contaminación	1

El rango de dificultad (alto o fácil, medio, bajo o difícil) y su respectiva calificación (1, 2 y 3) se aplicó a los tres modelos de iluminación de la misma forma que en la matriz de selección del tipo de fotobiorreactor descrita anteriormente (ver cuadro 5).

El ponderado y la ponderación final para cada modelo de iluminación se calculó de forma similar a lo establecido anteriormente para el cálculo de la matriz de selección del tipo de fotobiorreactor (ver ecuaciones 5 y 6).

3.3.2 Iluminancia promedio. Este parámetro se consideró como el de mayor nivel de importancia (NI), debido a que establece la intensidad de luz en relación un área específica expresada en lumen⁷³. En consecuencia, el modelo seleccionado de mayor iluminancia promedio expone una irradiación considerable sobre las paredes del fotobiorreactor y a su vez, sobre el mosto contenido en el interior. Se realizó la medida de iluminancia para cada uno de los tres modelos a través del luxómetro y se calculó la iluminancia promedio, los resultados se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Iluminancia del fotobiorreactor.

Modelos de Iluminación	E fotobiorreactor vacío (Lx)	E fotobiorreactor cargado (Lx)	E promedio (Lx)
Modelo 1	120.000	181.000	61.000
Modelo 2	172.000	240.000	68.000
Modelo 3	131.000	196.000	65.000

⁷³ RUBIO Fernández, Diego. Diseño de un fotobiorreactor airlift a escala banco. Bogotá, D.C.: Revista Elementos. Número 4, Junio de 2014. p. 149-155.




Según el cuadro anterior, el segundo modelo de iluminación establece la mayor iluminancia promedio (68.000 Lux) en comparación con los otros dos diseños.

3.3.3 Monitoreo de temperatura. Las levaduras son microorganismo mesófilos, es decir que se reproducen bajo un rango inferior a los 50 °C, a temperaturas superiores se produce muerte celular.⁷⁴ Como la fermentación es un proceso exotérmico, se debe mantener un control de temperatura en un valor cercano al óptimo para el crecimiento celular.

3.3.4 Control de incidencia de luz externa. La luz visible natural afecta el metabolismo de la levadura, debido a que los rayos UV presentes producen afectaciones en la membrana celular además de inhibición de los citocromos que participan en el transporte de electrones para la fosforilación oxidativa

⁷⁴ GARZÓN, Sandra. Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. Tesis de grado Químico Industrial. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de tecnologías. Escuela de tecnología química, 2009. 132 p.

Cuadro 8. Matriz de selección de los modelos de iluminación.

Parámetros	NI	Modelos de iluminación									
		Modelo 1			Modelo 2			Modelo 3			
					Rango	Calificación	Ponderado	Rango	Calificación	Ponderado	Característica
Iluminancia Promedio	5	Bajo	1	5	Bajo	3	15	Medio	2	10	
Área expuesta a la iluminación	4	Bajo	1	4	Alto	3	12	Medio	2	8	
Control de temperatura	3	Medio	2	6	Bajo	1	3	Alto	3	9	
Control de incidencia de luz externa	2	Medio	2	4	Difícil	1	2	Medio	2	4	
Control de contaminación	1	Bajo	1	1	Bajo	1	1	Alto	3	3	
Ponderación final				20			33			34	

Se concluye que el segundo modelo tuvo la mayor iluminancia promedio, sin embargo, el tercer modelo fue el seleccionado ya que obtuvo una mayor ponderación final (34), debido a su viabilidad en cuanto a monitoreo de temperatura, contaminación y baja incidencia de luz visible externa, los cuales son parámetros necesarios para un correcto proceso de fermentación a escala laboratorio. (ver cuadro 8)

3.4 MONTAJE Y PREEXPERIMENTACION

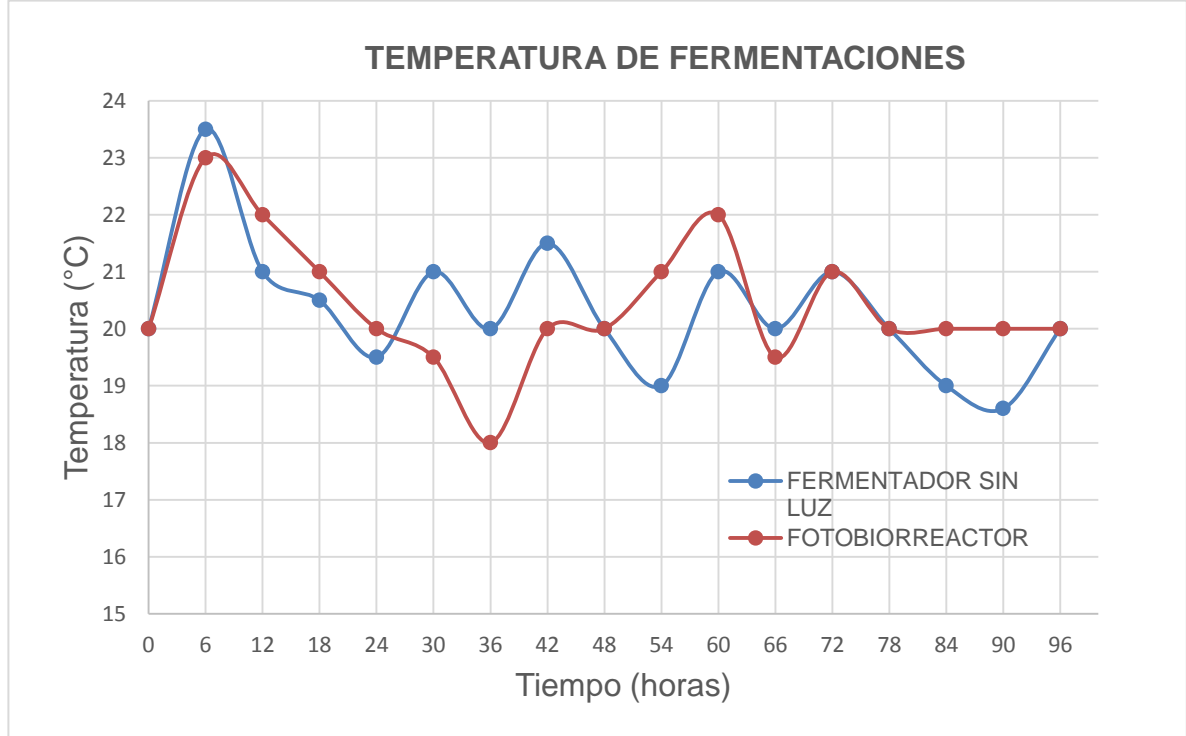
3.4.1 Activación e inoculación de la levadura. En la fase de activación se establece que la levadura seca en un volumen de agua estéril o mosto 10 veces superior a su propio peso, a una temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para la inoculación se realizó un cálculo (ver ecuación 14) escalando la concentración de levadura de acuerdo con la dosis establecida por la literatura de 80 g/HL de mosto. En consecuencia, cumpliendo con los parámetros, se tomaron 0,8 g de levadura seca en 8 mL de agua destilada a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, agitando durante 30 minutos hasta homogeneizar. Posteriormente se tomaron 8 mL del inóculo distribuidos de 4 mL para a cada uno de los biorreactores mediante una pipeta de 10 mL.

Ecuación 14. Concentración de levadura a inocular los biorreactores

$$1\text{ L de mosto} \times \frac{80\text{ g levadura seca}}{1\text{ HL de mosto}} \times \frac{1\text{ HL}}{100\text{ L}} = 0,8\text{ g/L}$$

3.4.2 Monitoreo de temperatura. Se midió la temperatura de cada muestra mediante un termómetro externo cada 6 horas durante 4 días. Posteriormente se analizó la variación de la temperatura a lo largo del tiempo como se describe en la gráfica 3.

Gráfica 3. Temperatura del proceso fermentativo



Los resultados de la gráfica 3 muestran que existe una variación de 1 a 3 °C con respecto a la temperatura ideal de fermentación (20 °C). Durante las primeras 12 horas se refleja una variación de 21 a 23 °C, a razón de un aumento en el consumo de azúcares por parte de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

A temperaturas mayores se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento con la temperatura de cultivo, hasta que se alcanza la temperatura óptima en la que la velocidad es máxima. Por encima de esta temperatura óptima, la velocidad de crecimiento decae bruscamente y se produce la muerte celular. El incremento de la velocidad de crecimiento con la temperatura se debe al aumento generalizado de la velocidad de las reacciones enzimáticas con la temperatura⁷⁵.

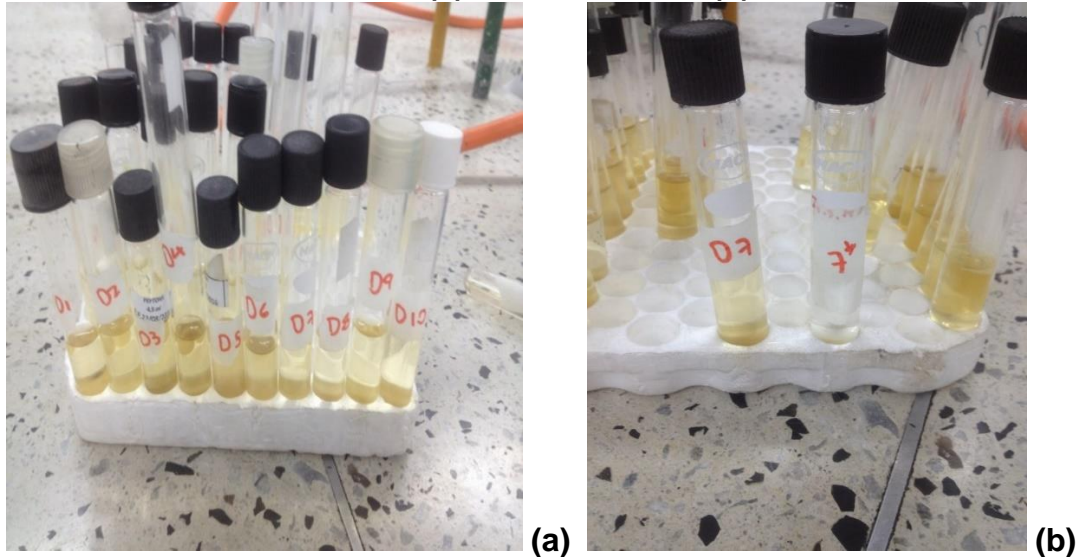
3.5 ANALISIS DEL PROCESO FERMENTATIVO A ESCALA LABORATORIO

3.5.1 Muestreo. El muestreo se efectuó cada 6 horas durante 4 días, y se estableció la concentración inicial de levadura a inocular, tomando la alícuota de levadura activada y se trasladándola al microscopio para realizar el recuento en cámara de Neubauer. Debido a que las muestras se encontraron muy

⁷⁵ NIETO Galarza, Hernán. Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol. Trabajo de grado Ingeniero en Biotecnología. Sangolqui: Departamento de ciencias de la vida. Escuela politécnica del ejército, 2009. p. 23- 36.

concentradas y con sólidos suspendidos se realizaron diluciones en una proporción de 1:10, tomando 0,5 mL de muestra y añadiendo 4,5 mL de suero fisiológico. Para las muestras 7 y 8 se realizó una doble dilución 10^{-2} como se muestra en la figura 23.

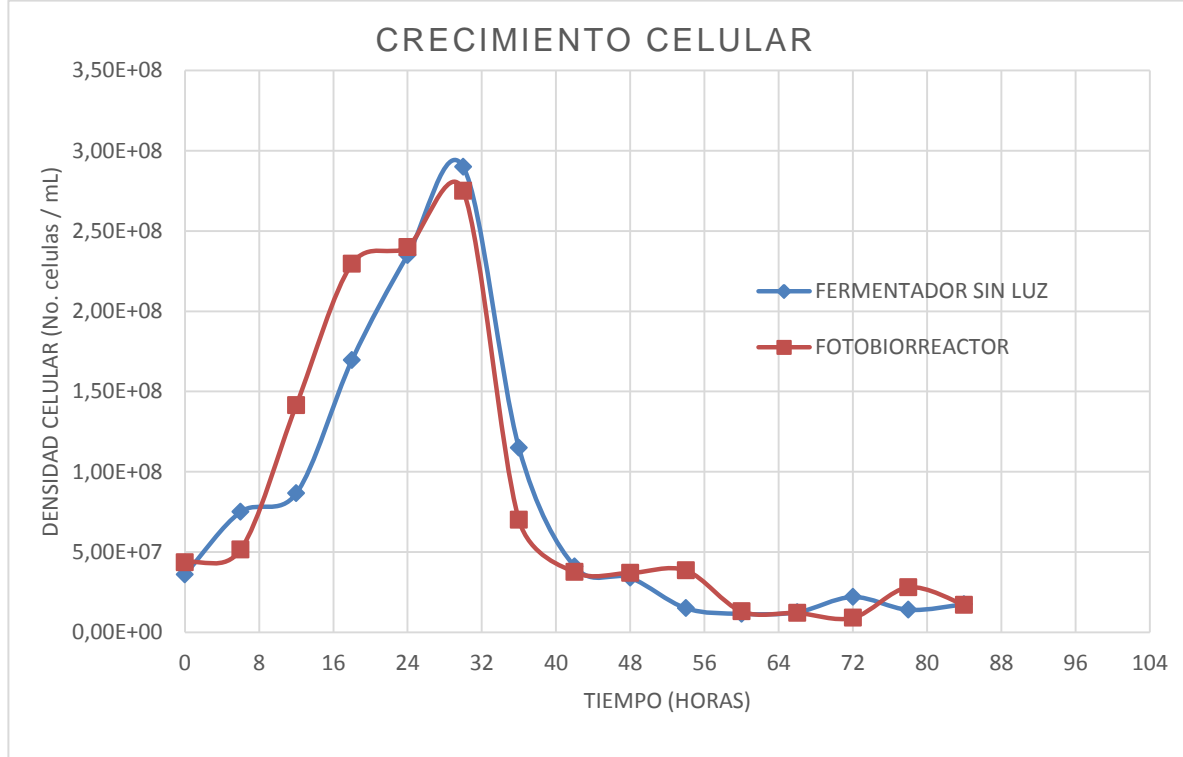
Figura 23. Dilución de muestras. **(a)** Diluciones 1:10; **(b)** Diluciones 1:100



A partir de las diluciones se realizaron los métodos analíticos de recuento en cámara de Neubauer, evaluación de consumo de sustrato por técnica DNS y análisis de grados Brix.

3.5.2 Recuento en cámara de Neubauer. Se realizó la técnica de recuento en cámara de Neubauer para cada una de las muestras, obteniendo la curva de crecimiento de densidad celular en relación con el tiempo de fermentación para el fotobiorreactor y el reactor en ausencia de luz, además de obtener la curva de crecimiento promedio de los dos fotobiorreactores, que se muestra en la gráfica 4.

Gráfica 4. Crecimiento celular



De acuerdo con la gráfica 4, se analizó que el crecimiento celular no se ve afectado por la intervención de la luz durante la fase de exponencial y de adaptación, corroborado en anteriores publicaciones científicas, donde establecen que *S. cerevisiae* puede responder a la luz con consecuencias fisiológicas y metabólicas que son evidentes casi inmediatamente después de la irradiación.

Posteriormente después de las 24 horas, se evidencia un decrecimiento en la densidad celular debido a que el efecto de la luz probablemente está mediado por la inhibición de citocromos que contienen y participan en el transporte de electrones para la fosforilación oxidativa.⁷⁶

La levadura SAFALE S-04 se evidenció un crecimiento exponencial durante las primeras 12 horas para los dos procesos fermentativos, por lo tanto se corroboró lo por UYASZEWSKI⁷⁷, S. la cual expone que cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* tipo Y185 expuestos a la luz (5.400 Lx) pasaron por una fase de adaptación a la luz durante 2 a 3 días, después crecieron casi tan rápidamente

⁷⁶ ROBERTSON, J. Visible light alters yeast metabolic rhythms by inhibiting respiration. USA: PNAS, 2013. p. 67-72.

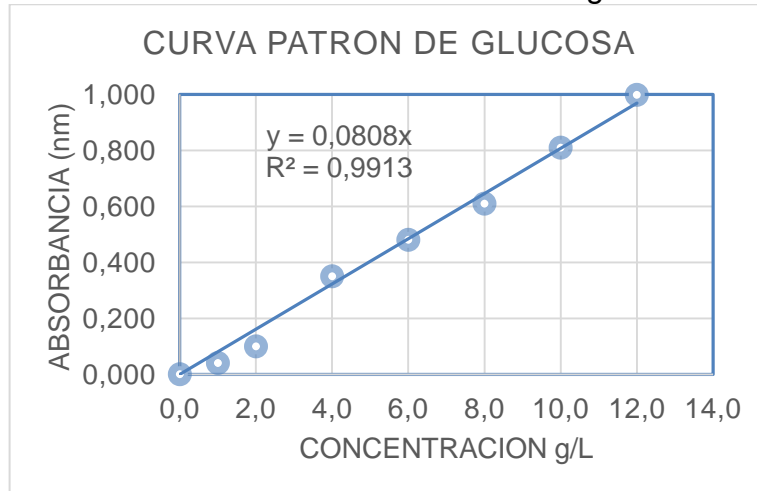
⁷⁷ UYASZEWSKI, S. Light effects in yeast: Evidence for participation of cytochromes in photoinhibition of growth and transport in *Saccharomyces cerevisiae* cultured at low temperatures. Journal of Bacteriology, Mayo de 1979. p. 523-529.

como las células cultivadas en la oscuridad. Este periodo de adaptación a la luz se reflejó también en el transporte de electrones.

El crecimiento celular ocurrió en menor tiempo en el proceso irradiado en comparación con el proceso en ausencia de luz; sin embargo, no se estableció una diferencia significativa en comparación con otras levaduras como *Rhodotorula glutinis* donde la irradiación pudo mejorar el crecimiento celular de 54 g/L en comparación con el control (sin irradiación) de 38 g/L. Finalmente, se corroboró la hipótesis planteada por Bagnato⁷⁸, mencionando que el proceso foto-iluminado promovió una mayor reproducción celular.

3.5.3 Curva patrón de glucosa. Con los datos obtenidos de absorbancia para cada una de las concentraciones de glucosa se elaboró la curva de calibración descrita en la gráfica 5.

Gráfica 5. Curva de calibración de glucosa



De la gráfica anterior, se realiza el ajuste de regresión lineal y se obtiene la siguiente ecuación:

Ecuación 15. Ajuste lineal curva patrón de glucosa

$$Y = 0,808X + 2,0962 \times 10^{-3}$$

⁷⁸ DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION USP. Uso de la foto-estimulación para acelerar la fermentación en el proceso de producción de cerveza de barril. Inventor: V. SALVADOR BAGNATO. Int. CL.: C12C 11/00. Fecha de solicitud, 29 diciembre, 2010 Brasil, patente de investigación. RPI 2206. 16, abril, 2013.

De la gráfica 5, se concluye que la metodología planteada por curva patrón de glucosa generó una buena calibración a razón del coeficiente de determinación r^2 de 0,9913, obteniendo la ecuación lineal aplicada al método DNS.

3.5.4 Curva de calibración de azúcares reductores. Siguiendo la metodología planteada por Miller⁷⁹ se prepararon las muestras de los dos biorreactores, a partir de diluciones 1:10 generando un cambio de color diferenciable del blanco (ver figura 24).

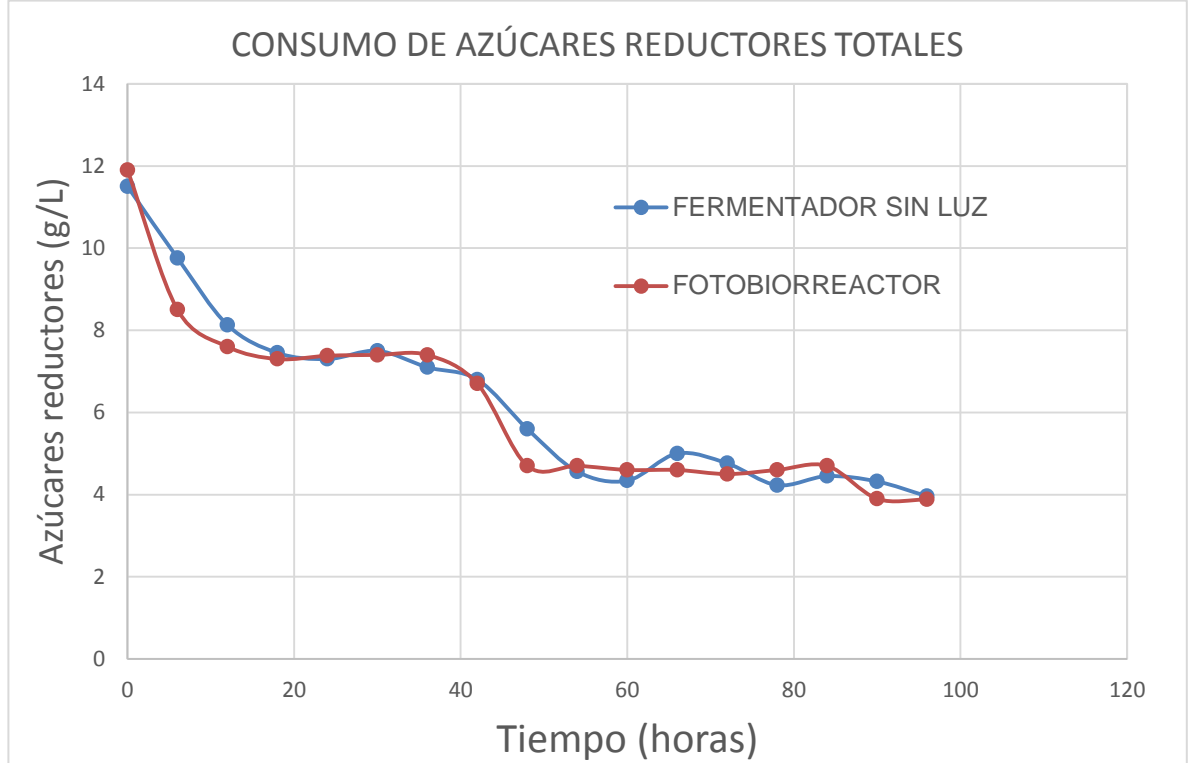
Figura 24. Técnica de DNS.



A partir de la segunda dilución se tomaron los datos de absorbancia para cada muestra en los dos biorreactores y se realizaron la curva de concentración de azúcares para cada fermentación mostradas en la gráfica 6, estableciendo una correlación entre los datos de absorbancia y el ajuste lineal obtenido en la curva de calibración de glucosa (ver ecuación 15).

⁷⁹ MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 1959. 458 p.

Gráfica 6. Consumo de azúcares reductores totales.



El consumo de azúcares reductores generados en los dos procesos fermentativos, evidenció el incremento del consumo de azúcares reductores por parte de la levadura *Fermentis Safale S-04* durante las primeras 12 horas. En la fase de crecimiento exponencial, es decir en las 8 horas iniciales, se generó un mayor consumo de azúcares fermentables, en la fermentación irradiada (3,5 °Brix), en comparación con el proceso en ausencia de luz (2,4 °Brix).

En cuanto al desarrollo metabólico de las levaduras se comprobó lo planteado en investigaciones previas, donde establecen que los citocromos son componentes celulares pigmentados que se conocen por absorber fotones y son una parte integral de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria de prácticamente todas eucariotas, incluyendo levaduras⁸⁰.

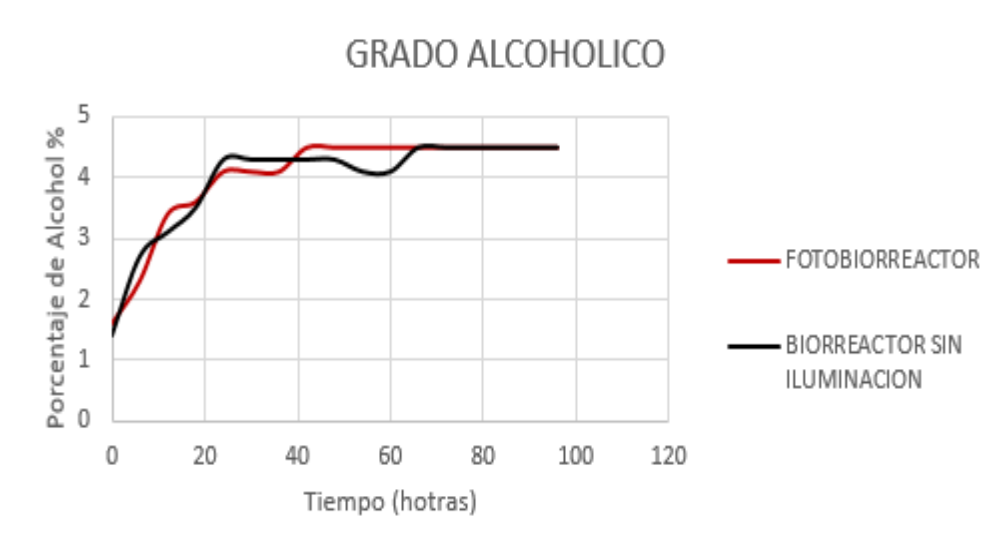
La diferencia relacionada al consumo de azúcares reductores en promedio es significativamente baja (0,45 g/L) para este estudio en particular, en comparación con otras investigaciones realizadas en otras cepas de levaduras como el de Hong-Wei, donde establece una comparación del consumo de glucosa y producción de biomasa de la levadura *Rhodotorula glutinis* irradiada bajo tres

⁸⁰ HOYOS R., Margarita. Parámetros cinéticos de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de un campo magnético variable de baja intensidad y alta frecuencia. Medellín: VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 2005. p. 39-44

diferentes fuentes de luz LED y en ausencia de luz mostrando una diferencia de consumo de glucosa promedio de (48 g/L).

3.5.5 Porcentaje de alcohol. Mediante una correlación de datos entre los grados Brix obtenidos (ver anexo D) y la densidad celular en g/L, se calcula el grado alcohólico para cada una de las muestras en los dos biorreactores. El grado alcohólico presente en los dos procesos fermentativos muestra en la gráfica 7.

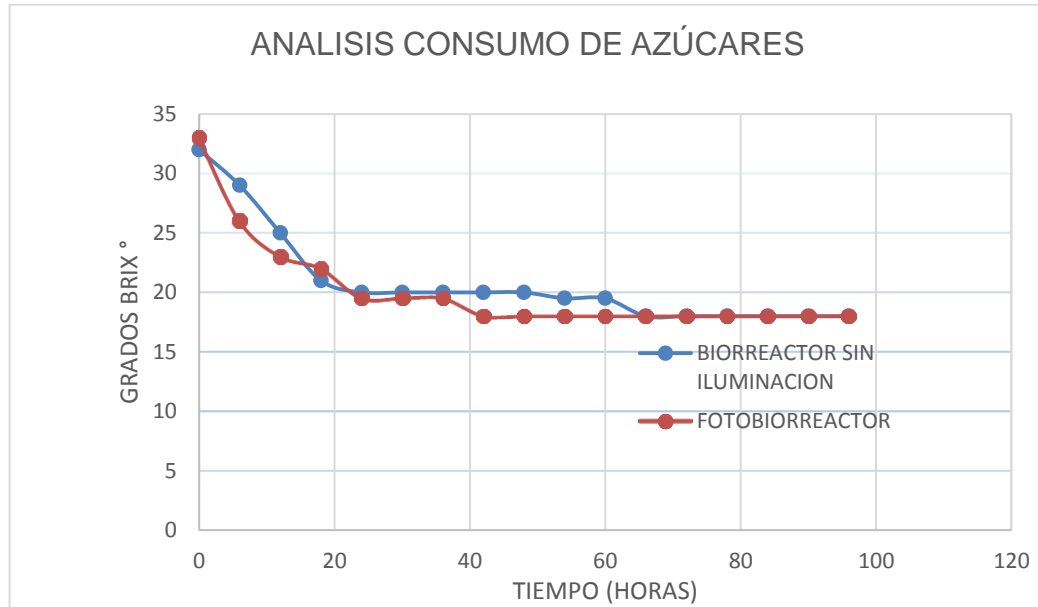
Gráfica 7. Grado alcohólico de las dos fermentaciones



La gráfica 8 reflejó un crecimiento continuo del porcentaje de alcohol a medida que transcurrió el tiempo de fermentación. Se observó que el proceso no inicia en ausencia de alcohol, pues siempre se cuenta con un pequeño contenido inicial, generado al contacto previo que tuvo la levadura con el mosto durante el proceso de llenado y carga; o también por el alcohol contenido de la levadura desde su cultivo o tratamiento previo en la inoculación y carga. También se estableció que el fotobiorreactor llegó a un porcentaje de alcohol de 4,5 en menor tiempo que el reactor sin iluminación, siendo más eficiente para el proceso fermentativo. Se confirmó que la producción de alcohol ocurre más rápidamente cuando hay incidencia de luz, logrando obtener el grado alcohólico antes de iniciar el proceso de maduración.

3.5.6 Análisis de grados Brix. Para evaluar la concentración de azúcares presentes durante los dos procesos fermentados, se realizaron mediciones de grados Brix a través del refractómetro de todas las muestras previamente diluidas para cada uno de los biorreactores y se analizó gráficamente el consumo a través del tiempo (ver gráfica 8).

Gráfica 8. Consumo de azúcares de los dos biorreactores.



De la gráfica 8, se dedujo que la concentración inicial de mosto es diferente para los dos procesos fermentativos, generando un rango de error en relación al punto inicial de la fermentación. En las primeras 12 horas se evidenció que el biorreactor foto-iluminado consume un mayor porcentaje de azúcares (10 °Brix), en comparación con el biorreactor sin iluminación (8 °Brix). Sin embargo, de la hora 18 a la hora 36 aproximadamente, se generó lo contrario; el consumo de azúcares es mayor para la fermentación sin iluminación manteniéndose constante en 19,5 °Brix.

Este comportamiento se vio influenciado por los cambios de temperatura dentro del proceso, lo cual impidió el metabolismo de la levadura e inhibió la absorción de azúcares. En la hora 42 se generó la fase final del metabolismo de la levadura, donde el consumo de azúcares en el fotobiorreactor se mantuvo en 18 °Brix, dos unidades por debajo de la fermentación en ausencia de luz (20 °Brix); concluyendo que el consumo de azúcares del fotobiorreactor se estabilizó y culminó en menor tiempo en comparación con el fermentador en ausencia de luz.

El consumo de azúcares se mantiene constante en 18 °Brix final del proceso, demostrando que se encontró dentro del rango previamente establecido a nivel planta (16 – 18 °Brix).

Se estableció que el comportamiento del fotobiorreactor a nivel laboratorio, fue similar en comparación con el estudio realizado por Bagnato⁸¹, donde evaluó el

⁸¹ DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION USP. Uso de la foto-estimulación para acelerar la fermentación en el proceso de producción de cerveza de barril. Inventor: V. SALVADOR BAGNATO. Int. CL.: C12C 11/00. Fecha de solicitud, 29 diciembre, 2010 Brasil, patente de investigación. RPI 2206. 16, abril, 2013.

consumo de grados Brix en un tanque fermentador cervecero foto-iluminado con LED, generando un porcentaje del 9,46 % mayor para la foto-fermentación en comparación con la fermentación tradicional.

3.5.7 Comparación de fermentaciones. Se calculó el porcentaje rendimiento promedio de los 4 parámetros analizados gráficamente (crecimiento celular, consumo de azúcares reductores totales, consumo de grados °BRIX y grado alcohólico) y se compararon de rendimientos entre los dos fermentadores de la siguiente forma:

El porcentaje de rendimiento en cuanto al crecimiento celular para cada fermentador se calculó cada 6 horas aplicando la ecuación 16, la cual compara el crecimiento en ufc/ml en una hora específica con el crecimiento inicial en la hora 0.

Ecuación 16. Rendimiento en cuanto a crecimiento celular

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{(\text{No. Células} / \text{mL})_{t = t} - (\text{No. Celulas} / \text{mL})_{t = t_0}}{(\text{No. Celulas} / \text{mL})_{t = t_0}} * 100$$

Donde, $t = t$, es el tiempo en cualquier intervalo de 6 horas.

$t = t_0$, es el tiempo inicial del proceso

El porcentaje de rendimiento en cuanto al consumo de sustrato para cada fermentador se calculó cada 6 horas aplicando la ecuaciones 17 y 18, la cual compara el consumo en °Brix o g/L en una hora específica con el consumo inicial en la hora 0.

Ecuación 17. Rendimiento de azucares reductores totales

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{(\text{Azucares red. g/L})_{t = t} - (\text{Azucares red. g/L})_{t = t_0}}{(\text{ART g/L})_{t = t_0}} * 100$$

Ecuación 18. Rendimiento de consumo de azúcares en grados Brix

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{(\text{°Brix})_{t = t} - (\text{°Brix})_{t = t_0}}{(\text{°Brix})_{t = t_0}} * 100$$

El porcentaje de rendimiento en cuanto al grado alcohólico para cada fermentador se calculó cada 6 horas aplicando la ecuación 19, la cual compara el consumo el porcentaje de alcohol en una hora específica con el porcentaje de alcohol inicial en la hora 0.

Ecuación 19. Rendimiento de grado alcohólico

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{(\% \text{Alcohol})_{t = t} - (\% \text{Alcohol})_{t = t_0}}{(\text{No. Celulas} / \text{mL})_{t = t_0}} * 100$$

El porcentaje de rendimiento promedio para cada fermentador se calculó como la sumatoria de cada uno de los rendimientos dividido la cantidad según la ecuación 20.

Ecuación 20. Rendimiento promedio

$$\% \text{ Rendimiento promedio} = \frac{\sum \% \text{ rendimiento}}{\text{No. de } \% \text{ rendimientos}}$$

El rendimiento promedio total calculó la diferencia en porcentaje de rendimiento promedio en relación al número de parámetros estudiados como se expresa en la ecuación 21:

Ecuación 21. Rendimiento promedio total

$$\% \text{ Rendimiento promedio total} = \frac{\sum \text{dif. } \% \text{ rendimiento}}{\text{No. de parámetros}}$$

Donde, dif. % rendimiento, es la diferencia entre los rendimientos promedios entre el fotobiorreactor y el fermentador sin luz, para cada parámetro. De acuerdo a las ecuaciones planteadas, se elaboró un cuadro comparativo estableciendo la diferencia de rendimientos entre el fotobiorreactor y el fermentador en ausencia de luz como se muestra en el cuadro 9.

Cuadro 9. Rendimiento promedio de las fermentaciones

Parámetros	Rendimiento promedio (%)		
	FOTOBIORREACTOR	FERMENTADOR SIN LUZ	DIFERENCIA
CRECIMIENTO CELULAR (número de células/ mL)	47,45	45,63	1,82
CONSUMO DE AZUCARES (g/L)	40,02	34,89	5,13
CONSUMO DE AZÚCARES (°BRIX)	45,03	43,35	1,68
GRADO ALCOHOLICO (%)	54,45	53,76	0,69
% Rendimiento promedio total			2,33

Se concluyó que el rendimiento del proceso fermentativo es mayor en un 2,33 % para la fermentación con incidencia de luz LED, en comparación con la fermentación tradicional, demostrando que es un resultado significativamente bajo

en comparación con el estudio planteado por Bagnato⁸², el cual aplicó la foto-estimulación a nivel planta obteniendo un rendimiento promedio del 15,5 %.

La diferencia entre los rendimientos de las dos fermentaciones fue mínima, y pudo deberse a diferentes factores que influyeron durante el proceso de fermentación a nivel laboratorio. En primer lugar, la variación de la temperatura a lo largo del tiempo de fermentación afectó el crecimiento celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual alcanzó una densidad celular promedio de $2,9 \times 10^8$ células / mL en un rango de temperatura de 18 a 24 °C durante las primeras 24 horas. Mientras que en investigaciones planteadas previamente, la misma levadura fermentada a nivel laboratorio a una temperatura de 20 a 25 °C, produjo una biomasa de concentración celular de 180 a 220 $\times 10^7$ células / mL en el mismo rango de tiempo.⁸³ Concluyendo que entre menor sea la variación de temperatura y se encuentre más cercano a la temperatura óptima, el crecimiento celular va ser mayor.

En segundo lugar, el control de las condiciones operativas fue un factor influyente dentro del rendimiento de la fermentación. Estudios previos en la levadura Fermentis Safale S-04 demostraron que la adecuación de un sistema para suministrar oxígeno estéril al mosto de cerveza y una eficiente agitación mecánica para asegurar que el oxígeno se disperse y se solubilice por todo el cultivo de propagación dentro del biorreactor, logrando un consumo de azúcares reductores en promedio de 10 g/L.⁸⁴

Para el fotobiorreactor estudiado el consumo de azúcares promedio fue de 7,5 g/L inferior al estudio realizado por Nieto⁸⁵, concluyendo que es necesario adecuar un sistema de control de oxigenación y agitación al fotobiorreactor para lograr un mayor consumo de azúcares por parte de la levadura.

⁸² DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION USP. Uso de la foto-estimulación para acelerar la fermentación en el proceso de producción de cerveza de barril. Inventor: V. SALVADOR BAGNATO. Int. CL.: C12C 11/00. Fecha de solicitud, 29 diciembre, 2010 Brasil, patente de investigación. RPI 2206. 16, abril, 2013.

⁸³ ALTAMIRANO C., Carlos A. Optimización de un método para la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la etapa de fermentación del mosto de cerveza, desde un nivel de laboratorio a un nivel piloto. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Lima: Universidad Mayor de San Marcos. Facultad de Química, 2013. 175 p.

⁸⁴ NIETO Galarza, Hernán. Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol. Trabajo de grado Ingeniero en Biotecnología. Sangolquí: Departamento de ciencias de la vida. Escuela politécnica del ejército, 2009. p. 67-73.

⁸⁵ Ibid., p. 85.

En tercer lugar, el periodo de irradiación constante a lo largo del proceso fermentativo incidió sobre el rendimiento del fotobiorreactor, debido a que en experimentaciones a nivel planta realizadas en la microcervecera Kirshen, se implementaron periodos foto-iluminados y periodos de oscuridad durante la etapa de fermentación, logrando un rendimiento del 15,5 % en cuanto a consumo de grados Brix.⁸⁶ ; Mientras que para el fotobiorreactor estudiado a nivel laboratorio fue del 1, 68 %.

Finalmente, está demostrado que los contaminantes bacterianos como las bacterias ácido lácticas y levaduras salvajes, establecen un efecto competitivo por el substrato, conduciendo a un menor rendimiento de alcohol o la introducción de productos indeseables y generando la inhibición del crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*⁸⁷.

Los efectos de los contaminantes bacterianos en la producción de alcohol hacen que se requiera de un manejo higiénico industrial adecuado, así como la adición de agentes controladores de ésta contaminación durante el proceso de fermentación.⁸⁸

En consecuencia un control de proceso erróneo de experimentación a lo largo de la foto-fermentación a nivel laboratorio, pudo haber generado una contaminación del mosto e ingreso de contaminantes bacterianos, el cual se vio directamente influenciado en el desarrollo metabólico de la levadura y a su vez en el rendimiento del fotobiorreactor, además de una posible toma de muestras contaminadas.

⁸⁶ DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION USP. Uso de la foto-estimulación para acelerar la fermentación en el proceso de producción de cerveza de barril. Inventor: V. SALVADOR BAGNATO. Int. CL.: C12C 11/00. Fecha de solicitud, 29 diciembre, 2010 Brasil, patente de investigación. RPI 2206. 16, abril, 2013.

⁸⁷ RAMIREZ, Paola R. Detección por la contaminación de bacterias lácticas en cerveza tipo ale elaborada por la compañía cervecera KUNTSMAN. Trabajo de grado Licenciado en Ingeniería de Alimentos. Valdivia: Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Ingeniería en Alimentos, 2004. 127 p.

⁸⁸ BAYONA, M., y ARDUA, M. Determinación de bacterias contaminantes en el proceso de producción de alcohol etílico y su relación con la floculación de *Saccharomyces cerevisiae*. Bogotá, D.C.: Revista Colombiana de Biotecnología, Diciembre de 2002. Vol IV. p. 64-71.

4. CONCLUSIONES

- ✓ Las parámetros de fermentación establecidos a nivel planta como la temperatura (20 ° C), presión (25 psi), concentración de inoculo (0,8 g/L) y tiempo de fermentación (4 días), fueron implementados a nivel laboratorio logrando un crecimiento prolongado de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de $2,9 \times 10^8$ UFC/mL en el medio de cultivo mosto cervecero.
- ✓ El diseño del fotobiorreactor más adecuado para la fermentación a escala laboratorio fue el tipo fermentador cilindro-hueco, construido en acrílico transparente con volumen de un 1 L ; debido al control de contaminación y monitoreo de la temperatura, obteniendo una ponderación final de acuerdo con la matriz de selección de 122.
- ✓ El tercer modelo de iluminación, donde se utilizó una cinta LED de 5 m distribuida en un área cuadrangular exterior de $0,64 \text{ m}^2$, a una distancia de 40 cm del fotobiorreactor; fue el más apropiado para el análisis y posterior comparación entre las fermentaciones a escala laboratorio; obteniendo una iluminancia promedio de 65000 Lux.
- ✓ El porcentaje de rendimiento promedio total del fotobiorreactor en grado alcohólico fue del 54,45% .
- ✓ La variación de temperatura a lo largo del proceso fermentativo (20 ± 4 °C), afectó el metabolismo de la levadura generando una inhibición e impidiendo el crecimiento celular a partir del segundo día de fermentación (7×10^7 UFC/mL y 1×10^8 UFC/mL para el fermentador y el fotobiorreactor respectivamente).
- ✓ El fotoperiodo de iluminación constante durante los 4 días de fermentación y la incidencia de luz UV, afectó el rendimiento del fotobiorreactor en cuanto a consumo de azúcares fermentables (1,68 °Bx), en comparación con otras experimentaciones a nivel planta donde utilizaron fotoperiodos intermitentes cada 24 horas, obteniendo un consumo de azúcares en promedio de 15 °Brix.
- ✓ La contaminación del mosto por parte de posibles bacterias o levaduras salvajes presentes en el medio ambiente, además de un control de proceso inadecuado, afectó directamente el rendimiento del fotobiorreactor obteniendo una disminución en el crecimiento celular en promedio de $1,2 \times 10^7$ UFC/mL para los dos fermentadores.

5. RECOMENDACIONES

- ✓ El escalamiento de las condiciones de fermentación a nivel laboratorio puede ser aplicado a otras variedades de cerveza producidas a nivel planta, analizando el comportamiento de levadura, ya sea de alta fermentación (Ale) o baja fermentación (Lager), en diferentes medios de cultivo mosto cervecero
- ✓ El proceso foto-fermentativo estudiado en este caso particular, puede ser escalado e implementado a nivel planta piloto, evaluando el rendimiento del proceso fermentativo en comparación con los resultados obtenidos a nivel laboratorio.
- ✓ El modelo de iluminación seleccionado generó una variación de temperatura de 20 ± 4 °C, abriendo campo a la implementación de una posible mejora o adecuación en el diseño del fotobiorreactor, con el fin de mantener la temperatura constante y cercana al valor adecuado para el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (20 ° C).
- ✓ El proceso foto-fermentativo se analizó únicamente durante la primera etapa de la fermentación en cervezas, no toma en cuenta las características del producto final, abriendo campo hacia nuevas investigaciones a nivel laboratorio para procesos como el de la maduración.

BIBLIOGRAFIA

ALTAMIRANO C., Carlos A. Optimización de un método para la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la etapa de fermentación del mosto de cerveza, desde un nivel de laboratorio a un nivel piloto. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Lima: Universidad Mayor de San Marcos. Facultad de Química, 2013. 175 p.

Asociación de Cerveceros Caseros Españoles (ACCE). Guía Básica Sobre El Lúpulo. [online]. SIL OFL 1.1. [Murcia, España]: ACCE, nov. 2012. Disponible desde Internet en: <http://www.cerveceros-caseros.com/index.php/articulos/ingredientes/229-introduccion-al-lupulo>.

BAYONA, M., y ARDÚA, M. Determinación de bacterias contaminantes en el proceso de producción de alcohol etílico y su relación con la floculación de *Saccharomyces cerevisiae*. Bogotá, D.C.: Revista Colombiana de Biotecnología, diciembre de 2002. 95 p.

CALDERÓN C., Sara. Evaluación de la influencia lumínica sobre producción de biomasa y lípidos a partir de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de panel plano a escala banco. Trabajo de grado Ingeniería Química. Bogotá, D.C.: Fundación Universidad América. Facultad de Ingenierías. Programa Ingeniería Química, 2013. 135 p.

CARRILLO, Raúl y MARTÍNEZ, O. Eficiencia en la fermentación de mosto para cerveza de súper alta densidad. La Habana: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, 2011. 124 p.

CERDÁN, Marcelo. Levadura para la producción de cerveza. Porto Alegre: Fermentis, División de SI Lesafre. 2010. 45 p.

COLIN S, Burns. Mechanism for Formation of the Lightstruck Flavor in Beer Revealed by Time-Resolved Electron Paramagnetic Resonance. En: CHEMISTRY: A EUROPEAN JOURNAL. 2003. 5 p.

CÓRDOBA, L y RUBIO, D. Evaluación de la producción de hidrógeno en un fotobiorreactor mediante la microalga *Chlorella vulgaris*. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bogotá: Fundación Universidad de América Facultad de Ingenierías. Programa Ingeniería Química. 2011. 145 p.

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION USP. Uso de la foto-estimulación para acelerar la fermentación en el proceso de producción de cerveza de barril. Inventor: V. SALVADOR BAGNATO. Int. CL.: C12C 11/00. Fecha de solicitud, 29 diciembre, 2010 Brasil, patente de investigación. RPI 2206. 16, abril, 2013.

ERMEC. Tiras flexibles WATERPROOF [online]. LSV OFL 1.1. [Bogotá, Colombia]: WATERPROOF, ene. 2013. Disponible desde Internet en: <http://www.ermec.com/catalogos/2009/CAT-ERMEC-ILU-TIRAS-FLEXIBLES.pdf>

ESPINAR, Galo R. Diseño y construcción de un equipo con adaptación de tecnología para elaboración de cerveza artesanal. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Guayaquil: Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química. 2013. 181 p.

ESTRADA-HERNÁNDEZ, A. Mediciones en LED's de alta intensidad. En: Simposio de Metrología 22-23 de octubre de 2008. Santiago de Querétaro, México.

GARCÍA G., Mariano y Quintero, Rodolfo. Cerveza. Biotecnología Alimentaria. México D.F.: Ed. Limusa, 1993. 120 p.

GARCÍA, Cristian. Diseño de un sistema de bombeo y de desgasificación para un fotobiorreactor utilizado en la producción de biomasa y ácidos grasos a partir de microalgas. Trabajo de grado Ingeniero Mecánico. Cali: Universidad Autónoma de Occidente. Facultad de Ingeniería. Departamento de Energética y Mecánica, 2011. 134 p.

GARZÓN, Sandra. Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. Tesis de grado Químico Industrial. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías. Escuela de Tecnología Química, 2009. 145 p.

GUZMÁN Romero, Raúl A. Obtención de licor mediante la destilación del fermentado de piña y pera. Trabajo de grado Ingeniero Químico Industrial. México, D.F.: Instituto Politécnico Nacional. Facultad de Ingeniería Química, 2013. 156 p.

HONG-WEI, Yen y YA-CHUN Yang. The effects of irradiation and microfiltration on the cells growing and total lipids production in the cultivation of *rhodotorula glutinis*. Bioresour Technology, 2012.

HORNSEY, Jan S. Malteado. En: Elaboración de cerveza, microbiología, bioquímica y tecnología. España: Acribia S.A., 2002. 340 p

HOUGH, J. s. Biotecnología de la cerveza y de la malta. (J. González Burgos Trans.). Primera ed. Zaragoza: Acribia S.A., 1990. 202 p.

HOYOS R., Margarita. Parámetros cinéticos de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de un campo magnético variable de baja intensidad y alta frecuencia. Medellín: VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 2005. 130 p.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACION. Documentación. Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. Sexta actualización. Bogotá: El Instituto, 1988.

_____. Referencias bibliográficas, contenido, forma y estructura. NTC 5613. Bogotá: El Instituto, 2008.

_____. Referencias documentales para fuentes de información electrónica. NTC 4490. Bogotá: El Instituto, 1998.

KANG, Jin-Won. Increasing fermentable sugar yields by high-pressure treatment during beer mashing. En: Journal-Institute of Brewing. Diciembre 2015, Vol.1

KUNSE, Wolfgang. Tecnología Para Cerveceros y Malteros. Alemania: VLB Berlín, 2006. 960 p.

LARROCHE, C., y PANDEY, A. (2016). Current developments in biotechnology and bioengineering: Bioprocesses, bioreactors and controls. Londres: Elsevier, 2016. 221 p.

LÓPEZ Ayala, Fredy. Diseño y montaje de un fotobiorreactor para producción de microalgas. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico-químicas, 2010. 89 p.

LÓPEZ R., Tatiana y TORRES C., Carlos. Evaluación de desempeño del fotobiorreactor airlift para la producción de biomasa y lípidos a escala banco. Trabajo de grado Ingeniería Química. Bogotá, D.C.: Fundación Universidad América. Facultad de Ingenierías. Programa Ingeniería Química, 2013. 95 p.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 1959.

NIETO Galarza, Hernán. Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol. Trabajo de grado Ingeniero en Biotecnología. Sangolquí: Departamento de ciencias de la vida. Escuela politécnica del ejército, 2009. 115 p.

PRADILLA Godoy, Silvia. Estudio de la incidencia luminosa en la producción de microalgas en un fotobiorreactor a escala laboratorio. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico-químicas, 2010. 114 p.

RAMÍREZ, Paola R. Detección por la contaminación de bacterias lácticas en cerveza tipo ale elaborada por la compañía cervecera KUNTSMAN. Trabajo de grado Licenciado en Ingeniería de Alimentos. Valdivia: Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Ingeniería en Alimentos, 2004. 127 p.

ROBERTSON, J. Visible light alters yeast metabolic rhythms by inhibiting respiration. USA: PNAS, 2013.

RUBIO Fernández, Diego. Diseño de un fotobiorreactor airlift a escala banco. Bogotá, D.C.: Revista Elementos. Número 4, junio de 2014.

SÁNCHEZ, Anabel M. Fermentación de la malta empleando un sistema semicontinuo en el proceso de elaboración de cerveza. Trabajo de grado Ingeniería de alimentos. Huajapan de León: Universidad Tecnológica de la Mixteca, 2011.

SANCHÍS, La cerveza. Aspectos microbiológicos. Trabajo de grado Microbiólogo. Lleida: Universidad Tecnológica de Lleida, 2010. 218 p.

SARMIENTO Forero, S. Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de grado Microbiólogo industrial. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, 2007. 120 p.

SAURINA S., Rubén. Diseño de una micro-planta de fabricación de cerveza y estudios de técnica de producción. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Barcelona: Universidad Politécnica de Catalunya. Departamento de Ingeniería Química, 2015. 106 p.

SUÁREZ Díaz, M. Cerveza: Componentes y propiedades. Trabajo fin de máster Biotecnología alimentaria. España: Universidad de Oviedo, 2013. 99 p.

TANCO, Martín. Metodología para la aplicación del diseño de experimentos (DoE) en la industria. España: Universidad de Navarra, 2009. 221 p

TINTÓ, A., SÁNCHEZ F., VIDAL, M. y VIJANDE, P. La cerveza artesanal. España: CerveArt. Sabadell, 2006. 256 p.

TOMAS, Rosa. Mecanismos moleculares y bioquímicos implicados en la adaptación de *Saccharomyces cerevisiae* a las bajas temperaturas de fermentación. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Tarragona: Universidad de Rovira. Facultad de Bioquímica, 2010. 237p.

UYASZEWSKI, S. Light effects in yeast: Evidence for participation of cytochromes in photoinhibition of growth and transport in *Saccharomyces cerevisiae* cultured at low temperatures. *Journal of Bacteriology*, mayo de 1979.

VILLARINO, Antonio L. Biblioteca de publicaciones científicas internacionales sobre el consumo de la cerveza y su posible relación con la salud de la población. En: *Cerveza y salud*. España, noviembre, 2000. 25 p.

VOGEL, Wolfgang. *Elaboración casera de la cerveza*. España: Acribia, 2003. 65 p.

XU, Zhaojun y TSURUGI, K. A potential mechanism of energy-metabolism oscillation in an aerobic chemostat culture of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation Of European Biochemical Societies*, 2006. 273 p

ANEXOS

ANEXO A

METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES POR REFRACTOMETRÍA (°BRIX)

PRINCIPIO

El método se basa en la medición del índice de refracción de la muestra diluida y su relación con el contenido de sólidos disueltos (Brix). El contenido de sólidos disueltos de las soluciones azucaradas se determina utilizando un refractómetro que tiene la conversión directa a valores de Brix.

Equipos y materiales

- Gotero
- Refractómetro digital NATIONAL 13856 calibrado a 20°C (
- Termómetro calibrado a 20 °C
- Frasco Lavador
- Papel suave para limpieza de los lentes
- Embudo 6.5

Reactivos

- Agua destilada
- Muestra de mosto diluida 1:10

Procedimiento

Adicionar agua destilada en la unidad óptica del refractómetro para la verificación del cero. Tomar muestra de mosto a 20 °C en gotero y colocar una gota sobre el lente de refractómetro, cerrar la unidad óptica. Establecer la lectura en presencia de luz. Limpiar el lente con agua destilada y secar con el papel de limpieza. Repetir el procedimiento para cada muestra de mosto.

ANEXO B

CUANTIFICACION DE AZÚCARES REDUCTORES POR TECNICA DNS (ACIDO 3, 5 DINITRO SALICÍLICO)

Para realizar la curva de calibración de azúcares reductores se establece la siguiente metodología:

- Se toman 0,25 ml de muestra de mosto diluida y 0,25 ml de solución DNS
- Agitar en tubos vortex protegidos con papel aluminio
- Llevar a ebullición durante 5 minutos
- Frenar reacción con hielo durante 5 minutos
- Adicionar 2,5 ml de agua en cada uno de los tubos
- Leer absorbancia en espectrofotómetro a 540 nm ajustado el blanco de prueba.

ANEXO C

PREPARACIÓN DE REACTIVO DNS (ACIDO 3, 5 DINITRO SALICÍLICO)

Para 1000 ml del reactivo DNS se establece la siguiente metodología:


1. Pesar en balanza analítica los siguientes compuestos:
 - Ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS) 10 g
 - Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado 300 g
 - NaOH 16 g
2. Preparar 200 ml de solución de NaOH [2N]: los 16 g de NaOH ya pesados se transfieren a un balón de 200 ml y se afora con agua destilada.
3. Llevar todo a un volumen final de 1000ml, primero la solución de NaOH, después el tartrato y por último el DNS, aforar con agua destilada y someter a agitación vigorosa para eliminar aglomeraciones.
4. Almacenar en envase de vidrio ámbar, porque el DNS es foto sensible.

ANEXO D

CORRELACION ° BRIX - AZÚCARES REDUCTORES - GRADO ALCOHOLICO

Densidad	Grado Baumé	Grado Brix	Alcohol probable
1000	0		
1001	0.14		
1002	0.28		
1003	0.43		
1004	0.57		
1005	0.71		
1006	0.85		
1007	1.00		
1008	1.14		
1009	1.28		
1010	1.42		
1011	1.56		
1012	1.70	0.20	0.11
1013	1.84	0.47	0.23
1014	1.98	0.73	0.43
1015	2.12	1.10	0.59
1016	2.27	1.26	0.70
1017	2.41	1.53	0.88
1018	2.55	1.80	1.06
1019	2.68	2.06	1.18
1020	2.82	2.33	1.35
1021	2.91	2.59	1.47
1022	3.10	2.86	1.65
1023	3.24	3.13	1.82
1024	3.37	3.39	1.94
1025	3.51	3.66	2.21
1026	3.65	3.92	2.30
1027	3.79	4.19	2.41
1028	3.92	4.46	2.69
1029	4.06	4.72	2.77
1030	4.20	5.00	2.95
1031	4.33	5.27	3.06
1032	4.47	5.54	3.24
1033	4.60	5.80	3.42
1034	4.74	6.07	3.54
1035	4.88	63.3	3.71
1036	5.01	6.6	3.7
1037	5.15	6.9	4.0
1038	5.28	7.2	4.2

Densidad	Grado Baumé	Grado Brix	Alcohol probable
1101	13.23	23.9	14.1
1102	13.34	24.2	14.3
1103	13.46	24.4	14.4
1104	13.58	24.7	14.6
1105	13.69	25.0	14.7
1106	13.81	25.2	14.9
1107	13.93	25.5	15.0
1108	14.05	25.8	15.2
1109	14.16	26.0	15.3
1110	14.28	26.3	15.5
1111	14.40	26.6	15.7
1112	14.52	26.8	15.9
1113	14.64	27.1	16.0
1114	14.75	27.4	16.2
1115	14.87	27.6	16.3
1116	14.99	27.9	16.4
1117	15.11	28.2	16.6
1118	15.23	28.4	16.7
1119	15.34	28.7	16.9
1120	15.46	29.0	17.1
1121	15.57	29.2	17.3
1122	15.68	29.5	17.4
1123	15.80	29.8	17.6
1124	15.91	30.1	17.7
1125	16.03	30.3	17.9
1126	16.14	30.6	18.0
1127	16.26	30.9	18.2
1128	16.37	31.1	18.3
1129	16.48	31.4	18.5
1130	16.60	31.6	18.7
1131	16.71	31.9	18.8
1132	16.82	32.2	19.0
1133	16.93	32.5	19.1
1134	17.05	32.7	19.3
1135	17.16	33.0	19.5
1136	17.27	33.2	19.6
1137	17.39	33.5	19.8
1138	17.50	33.8	19.9
1139	17.61	34.1	20.1


 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

**AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL
LUMIERES**

Yo **Andres Gabriel Beltrán Santos** en calidad de titular de la obra **"Evaluación de la incidencia de la foto-estimulación en la fermentación del mosto cervecero a escala laboratorio"**, elaborada en el año 2016, autorizo al **Sistema de Bibliotecas de la Fundación Universidad América** para que incluya una copia, indexe y divulgue en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres, la obra mencionada con el fin de facilitar los procesos de visibilidad e impacto de la misma, conforme a los derechos patrimoniales que me corresponde y que incluyen: la reproducción, comunicación pública, distribución al público, transformación, en conformidad con la normatividad vigente sobre derechos de autor y derechos conexos (Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, entre otras).




Al respecto como Autor manifiesto conocer que:

- La autorización es de carácter no exclusiva y limitada, esto implica que la licencia tiene una vigencia, que no es perpetua y que el autor puede publicar o difundir su obra en cualquier otro medio, así como llevar a cabo cualquier tipo de acción sobre el documento.
- La autorización tendrá una vigencia de cinco años a partir del momento de la inclusión de la obra en el repositorio, prorrogable indefinidamente por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales del autor y podrá darse por terminada una vez el autor lo manifieste por escrito a la institución, con la salvedad de que la obra es difundida globalmente y cosechada por diferentes buscadores y/o repositorios en Internet, lo que no garantiza que la obra pueda ser retirada de manera inmediata de otros sistemas de información en los que se haya indexado, diferentes al Repositorio Digital Institucional – Lumieres de la Fundación Universidad América.
- La autorización de publicación comprende el formato original de la obra y todos los demás que se requiera, para su publicación en el repositorio. Igualmente, la autorización permite a la institución el cambio de soporte de la obra con fines de preservación (impreso, electrónico, digital, Internet, intranet, o cualquier otro formato conocido o por conocer).
- La autorización es gratuita y se renuncia a recibir cualquier remuneración por los usos de la obra, de acuerdo con la licencia establecida en esta autorización.
- Al firmar esta autorización, se manifiesta que la obra es original y no existe en ella ninguna violación a los derechos de autor de terceros. En caso de que el trabajo haya sido financiado por terceros, el o los autores asumen la responsabilidad del cumplimiento de los acuerdos establecidos sobre los derechos patrimoniales de la obra.

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

- Frente a cualquier reclamación por terceros, el o los autores serán los responsables. En ningún caso la responsabilidad será asumida por la Fundación Universidad de América.
- Con la autorización, la Universidad puede difundir la obra en índices, buscadores y otros sistemas de información que favorezcan su visibilidad.

Conforme a las condiciones anteriormente expuestas, como autor establezco las siguientes condiciones de uso de mi obra de acuerdo con la **licencia Creative Commons** que se señala a continuación:

	Atribución- no comercial- sin derivar: permite distribuir, sin fines comerciales, sin obras derivadas, con reconocimiento del autor.	<input checked="" type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial: permite distribuir, crear obras derivadas, sin fines comerciales con reconocimiento del autor.	<input type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial – compartir igual: permite distribuir, modificar, crear obras derivadas, sin fines económicos, siempre y cuando las obras derivadas estén licenciadas de la misma forma.	<input type="checkbox"/>


Licencias completas: http://co.creativecommons.org/?page_id=13

Siempre y cuando se haga alusión de alguna parte o nota del trabajo, se debe tener en cuenta la correspondiente citación bibliográfica para darle crédito al trabajo y a su autor.

Para constancia se firma el presente documento en Bogotá D.C, a los 9 días del mes de Noviembre del año 2016.

EL AUTOR:

Autor 1

Nombres	Apellidos
Andrés Gabriel	Beltrán Santos
Documento de identificación No	Firma
1.016.060.678	

Nota: Incluya un apartado (copie y pegue el cuadro anterior), para los datos y la firma de cada uno de los autores de la obra.