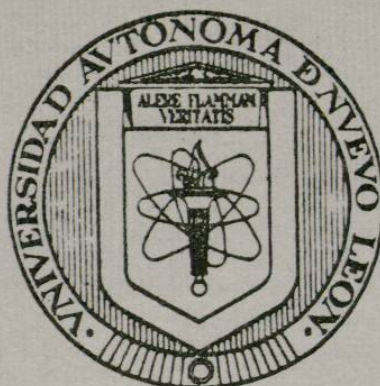


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE " CIENCIAS QUIMICAS "

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES



PREDICCIÓN DE LA TOLERANCIA DE UNA VARIEDAD DE Saccharomyces uvarum A LA ALTA CONCENTRACION DE ETANOL EN FERMENTACIONES DE MOSTOS CONCENTRADOS, MEDIANTE EL USO DE UN MODELO MATEMATICO SIMPLE.

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN " MICROBIO  
LOGIA INDUSTRIAL "

POR

Q.B.P. ORQUIDEA PEREZ GONZALEZ





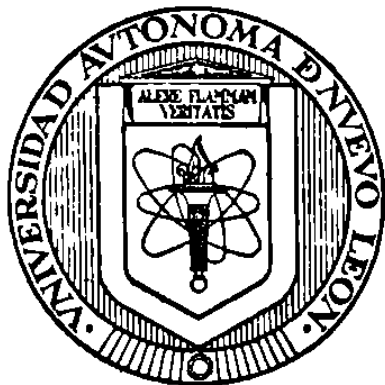


1080074569

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE " CIENCIAS QUIMICAS "

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES



PREDICCION DE LA TOLERANCIA DE UNA VARIEDAD DE Saccharomyces uvarum A LA ALTA CONCENTRACION DE ETANOL EN FERMENTACIONES DE MOSTOS CONCENTRADOS, MEDIANTE EL USO DE UN MODELO MATEMATICO SIMPLE.

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN " MICROBIO  
LOGIA INDUSTRIAL "

POR

Q.B.P. ORQUIDEA PEREZ GONZALEZ

TM  
RAISI  
P 4



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE " CIENCIAS QUIMICAS "

M.C. BLANCA A. NAJERA MARTINEZ

COORDINADOR DE LA ESCUELA DE GRADUADOS EN CIENCIAS.

La tesis elaborada por la Q.B.P. ORQUIDEA PEREZ GONZALEZ, intitulada " Predicción de la tolerancia de una variedad de Saccharomyces uvarum a la alta concentración de etanol en fermentaciones de mostos concentrados, mediante el uso de un modelo matemático simple ", ha sido aceptada como requisito parcial para optar al grado académico de,

M A E S T R O   E N   C I E N C I A S

ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

en virtud de haber cumplido integralmente con el reglamento de tesis vigente.

COMITE DICTAMINADOR DE LA TESIS

M.C. SERGIO S. FERNANDEZ DELGADILLO.  
Asesor de la Tesis.

M.C. LUIS GALAN WONG.  
Sinodal.

M.C. HILDA CORINA GARZA GONZALEZ.  
Sinodal

*Sergio S. Fernandez Delgadillo*

*Luis Galan Wong*

*Hilda Corina Garza Gonzalez*

Voto

*B*

M.C. BLANCA RODRIGUEZ URIBE.  
Coordinador de la maestría  
en Microbiología Industrial.

## R E S U M E N

En el presente trabajo se realizó una serie de fermentaciones en las que se utilizaron mostos semisintéticos de alta concentración ( 20,22 y 24 % de sólidos disueltos ) a temperaturas de 16, 18 y 20 grados centígrados para establecer mediante representaciones gráficas de ecuaciones matemáticas, la máxima concentración de carbohidratos que toleraría una levadura en función de la concentración de etanol generado durante el proceso fermentativo.

Durante el transcurso de las fermentaciones, se determinaron diferentes parámetros ( células muertas, niveles de glicógeno, células deficientes en respiración ) para observar la levadura en sus funciones fisiológicas y bioquímicas y ver si sufre alteraciones.

Por los resultados obtenidos en la serie de fermentaciones se concluyó que la levadura no se ve afectada bajo las condiciones a las que se ve sometida, aún en concentraciones de etanol hasta de un 7% volumen /volumen

Analizando los resultados obtenidos, mediante una función lineal, graficando velocidad de fermentación contra concentración de etanol, puede predecirse el nivel de tolerancia de una levadura al fermentar mostos con gravedades altas, con los cuales se obtuvo una concentración de etanol limitante de la fermentación de 144.16 g. de etanol / litro.

Además se concluye que un valor de 115 g. de etanol / litro, reduce la velocidad de fermentación a cero, bajo las condiciones de trabajo dadas, lo cual equivaldría a tener una concentración de azúcares en el mosto de aproximadamente 35.77 % de sólidos disueltos.

## INDICE GENERAL

Página

I.- Introducción	1
II.- Objetivo	10
III.- Materiales y métodos	11
III.1.- Microorganismo	11
III.2.- Medios de cultivo	11
III.3.- Fermentación	11
III.4.- Cinética de crecimiento	12
III.5.- Determinaciones realizadas a las células de levadura	12
III.5.a.- Determinación de células muertas	12
III.5.b.- Determinación de los niveles de glicógeno	12
III.5.c.- Células deficientes respiratorias	12
III.6.- Determinaciones realizadas a la fermenta- ción	13
III.6.a.- Determinación de la gravedad del mosto	13
III.6.b.- Cuantificación de etanol	13
III.6.c.- Análisis cromatográfico de carbohidratos	14
IV.- Resultados y discusiones	16
V.- Conclusiones	21
VI.- Referencias bibliográficas	22
VII.- Apéndice de tablas	26
VIII.- Apéndice de gráficas	30



## INDICE DE TABLAS

Página

- Tabla I.- Concentraciones de miel de maíz -  
como fuente de carbono y peptona-  
extracto de levadura como fuente  
de nitrógeno, utilizados en la ela  
boración de mosto semi-sintético. 27
- Tabla II.- Datos experimentales obtenidos du  
rante las fermentaciones de mostos  
concentrados, realizadas a diferene  
tes temperaturas. 28
- Tabla III.- % de viabilidad observada en las  
levaduras cosechadas de fermentacion  
es de mostos concentrados a tres -  
temperaturas máximas de fermentación. 29

## INDICE DE GRAFICAS

	Página
Gráfica 1.- Programa de temperaturas usadas en las fermentaciones de mostos de alta gravedad	31
Gráfica 2.- Caída del extracto ( grados Plato ) en fermentaciones de mostos concentrados a 16 °C, primera generación.	32
Gráfica 3.- Caída del extracto ( grados Plato ) en fermentaciones de mostos concentrados a 18°C, primera generación.	33
Gráfica 4.- Caída del extracto ( grados Plato ) en fermentaciones de mostos concentrados a 20°C, primera generación.	34
Gráfica 5.- Caída del extracto ( grados Plato ) en fermentaciones de mostos concentrados a 16°C, sexta generación.	35
Gráfica 6.- Caída del extracto ( grados Plato ) en fermentaciones de mostos concentrados a 18°C, sexta generación.	36
Gráfica 7.- Caída del extracto ( grados Plato ) en fermentaciones de mostos concentrados a 20°C, sexta generación.	37
Gráfica 8.- Caída del extracto en fermentaciones de mostos concentrados a tres temperaturas durante la primera y sexta generaciones.	38

Gráfica 9.- Efecto de la gravedad del mosto sobre la velocidad de fermentación.	39
Gráfica 10.- Efecto de la temperatura sobre la velocidad de fermentación.	40
Gráfica 11.- Relación entre extracto aparente y % de etanol contenido en la cerveza con la gravedad original del mosto	41
Gráfica 12.- Efecto de la temperatura de fermentación y la concentración de etanol sobre la velocidad de fermentación.	42
Gráfica 13.- Relación entre la gravedad original del mosto y la concentración de etanol ( % peso/volumen ) contenido en la cerveza.	43
Gráfica 14.-Efecto de la concentración de etanol sobre el grado real de fermentación en una representación parabólica.	44

## I.- INTRODUCCION.

El proceso de fermentación para producir alcohol es un arte muy antiguo, ya que en el año 6000 A.de C., los Sumerios y los Babilonios conocían la capacidad de las levaduras para producir alcohol.

Por otra parte las levaduras se han utilizado desde hace -- miles de años para la fabricación de alimentos fermentados, y actualmente se usan en procedimientos simples como: la fabricación de pan y bebidas alcohólicas, o bien en procedimientos tecnológicamente más complejos como: producción de alcohol a nivel industrial y la producción de biomasa, involucrandose en ello una gran variedad de sustratos carbonados, (melaza de caña, jugos de frutas, almidones sacarificados, etc.). Esto último ha venido a poner en evidencia la gran capacidad biosintética de estos microorganismos, así como su gran capacidad de adaptación a cambios de las condiciones ambientales.

De entre los productos de fermentación que involucran levaduras, uno de los de mayor consumo en el mundo, es la cerveza. Se llama cerveza a las "bebidas preparadas por fermentación de extractos de granos germinados". La fermentación de extractos de granos, constituía ya una técnica avanzada hace más de 6000 años, estas bebidas aparte de tener mejor sabor que el agua, tenían una menor posibilidad de contaminarse ya que su acidez y el contenido de sustancias antimicrobianas derivadas del lúpulo (resinas amargas como humulona, lupulona e isohumulona) impedían el desarrollo de microorganismos patógenos (1).

Normalmente, los cultivos de levadura cervecera toman los -- azúcares del mosto de acuerdo a su propio poder de penetración dichos azúcares son: glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa y -- maltotriosa, de estos azúcares, la glucosa penetra en la levadura sin gasto de energía previa a su ingestión, a diferencia de la maltosa que es la que se encuentra en una mayor concentración en el mosto, por lo que la célula toma glucosa en preferencia a la maltosa (2).

Siendo las levaduras el centro real de atención en este procedimiento, alrededor de ellas se ha generado una gran cantidad de estudios que han elucidado su fisiología y bioquímica y su relación con el medio ambiente, asegurándose así el crecimiento en óptimas condiciones y la eficiente transformación de -- azúcares en etanol.

Se conoce muy bien que diferencias pequeñas en la composición del medio, variaciones en la temperatura y alteraciones - - fisiológicas en el comportamiento de la levadura, pueden ejercer efecto significativo sobre la fermentación y el credimiento de la misma (3,4).

Tomando en cuenta las condiciones que se tienen que establecer para el crecimiento de la levadura, la agitación juega un papel muy importante; su rango máximo de crecimiento durante una fermentación varía con la velocidad de agitación, el tipo de agitación y la temperatura, así como también se ha observado que los valores para la velocidad de crecimiento y el crecimiento máximo varían inversamente con los niveles de bióxido de carbono disuelto durante la fermentación.

El oxígeno disponible también tiene un gran efcto sobre el

crecimiento y la fermentación de la levadura (5), los cambios en la suplementación del mismo también pueden ejercer efecto significativo sobre la fermentación y el crecimiento de la levadura (5).

La necesidad de una composición balanceada en el medio de cultivo y el control del contenido de ergosterol es crítica para la levadura (5). El ergosterol y los esteroides insaturados - fueron los primeros complementos que se utilizaron para estimular el crecimiento de la levadura bajo niveles reducidos de oxígeno (6,7). Con relación a lo anterior se ha estudiado también la importancia que tiene la presencia de aminoácidos en el mosto con la producción de alcoholes superiores en la cerveza (propanol, butanol, isobutanol, etc.) (8).

El desarrollo de la industria cervecera ha ido evolucionando respetando el proceso tradicional de producción pero considerando las necesidades que se tengan en su fabricación.

Actualmente es necesario que la producción de cerveza sea -- económica, que se obtenga en un corto tiempo y principalmente que se mantenga la calidad de la misma, por lo que muchos cerveceros proponen el uso de tecnología moderna.

Al realizar una comparación entre los métodos en los cuales - se utiliza la tecnología moderna, se ha visto que en estos -- últimos se tiene la ventaja de que se obtiene una mayor cantidad de producto con una disminución en el consumo de energía y la misma capacidad instalada de equipo.

Con el uso de los métodos modernos se cuenta con la posibilidad de utilizar una gran cantidad de adjuntos como son: los



materiales amiláceos, los granos no malteados, el jarabe de maíz, los licores de molienda, el ergosterol, los ácidos oléicos, etc., en la producción de cerveza; pero con la desventaja al utilizar los mismos, de que se puede obtener cerveza con una mayor cantidad de esteroides, los cuales pueden ocasionar diferencias en el sabor de la misma.

En la cervecería tradicionalista, son utilizados los mostos de 11 a 12 % de sólidos disueltos, los cuales son fermentados para producir cerveza de 4-5% vol/vol de etanol. Actualmente la industria cervecera toma como límite de concentración en los mostos de 16-18% de sólidos disueltos (9,10), ya que en los reportes que se tienen sobre las fermentaciones con mostos superiores al 18% de sólidos disueltos describen que se tienen problemas con la viabilidad de la levadura y además, se obtienen fermentaciones incompletas (11).

La toxicidad del etanol (11,12) y los niveles de alta presión osmótica (13) se consideran como los factores limitantes en la viabilidad y capacidad fermentativa de la levadura.

Se ha demostrado que un incremento combinado entre la cantidad de inóculo (14) y una suplementación nutricional (15) pueden permitir la rápida fermentación de mostos con sólidos disueltos por arriba del 28%. Al suplementar los mostos con nutrientes tales como el extracto de levadura (como una fuente de nitrógeno asimilable) y ergosterol (que proporciona esteroides y ácidos grasos insaturados) y además con un inóculo de  $20 \times 10^6$  ó  $30 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias/ml, dan como resultado en una fermentación durante 5 días a 15° C una producción de 15. vol vol de etanol (15).

Lo anterior sirvió de base a Casey y colaboradores, quienes - trabajando con una fuente de nitrógeno, ergosterol y ácidos - oléicos, lograron producir cerveza con un 16.2% vol/vol de - - etanol. En estas fermentaciones la viabilidad de las células - logró mantenerse bajo estas condiciones, demostrando con esto que, la cepa normal de levadura para cerveza tipo lager (levadura que al final de la fermentación se va al fondo del tanque) en condiciones normales y sin manipulación genética, es tolerante a concentraciones de 16-17% vol/vol de etanol (16).

La cerveza contiene aproximadamente un 93% de agua, y tiene - ventaja económica al reducir el volumen durante el proceso de fermentación diluirla después a su nivel normal durante el paso final de producción (17).

Para que el uso de mostos concentrados o de alta gravedad tenga ventajas económicas en la industria cervecera, es necesario que la cerveza resultante de fermentaciones con suplementos nutricionales tenga un balance de sus cualidades organolépticas, similar a la obtenida de manera tradicional. El sabor de la cerveza es determinado por la concentración y tipo de metabolititos secundarios (especialmente esteroides) que se generan durante la fermentación. Los esteroides de mayor importancia significativa en la industria cervecera (por sus aromas característicos) son: acetato de etilo (frutas), acetato de isoamilo y acetato de isobutilo (olor a plátano) caprilato o tilo (olo a mazana) (18), de estos esteroides, el acetato de etilo y acetato de isoamilo, que son influenciados por la concentración original de azúcares del mosto. Cuando se usan djuntos (adición de - materiales amiláceos diferentes a maza y/o cebada), se han - hecho fermentaciones con alta gravedad y la cerveza resultante

fue diluida a una concentración de azúcares original de 10 a 12% de sólidos disueltos, los niveles de esteres exceden a la concentración tradicional, alterando con esto el sabor de la cerveza (19 a 26).

En diferentes compañías de Estados Unidos de Norte América es común el uso de la tecnología para producir cerveza con la utilización de mostos concentrados con su subsecuente dilución hasta tener los niveles deseados de alcohol (27).

La mayoría de las cervezas que se fabrican con utilización de mostos de alta concentración, son del tipo ale (levadura que durante la fermentación sube a la superficie), ya que al fermentar los mostos de alta gravedad con cepas de levadura floculante o tipo lager, frecuentemente resultan con una atenuación pobre, y este fenómeno puede ser causado por una prematura sedimentación de la levadura (16).

En cuanto a la producción de etanol, se ha visto que cierto tipo de levaduras es capaz de producir más altos niveles de etanol que otras, lo cual es tomado en cuenta para la producción de sake y destilados (28). La producción de etanol en la fermentación industrial es limitada por la sensibilidad de la levadura a este producto, se han realizado diversas especulaciones sobre cual puede ser la causa de que el etanol le sea inhibitorio a la levadura y una de estas especulaciones menciona que se tiene una relación directa entre la toxicidad del etanol y su sitio específico de acción en la estructura celular (29 a 31). Los trastornos que provoca el etanol en la levadura producen un cambio en la composición de los lípidos de la membrana plasmática con un incremento en la producción de ácidos grasos insaturados (32 a 34). Estos cambios en la membrana plasmática ocasionan que el etanol actúe -

como un inhibidor no competitivo del transporte de la maltosa y la glucosa a través de la membrana plasmática (36, 37).

Para determinar la tolerancia de las levaduras al etanol, se han utilizado diferentes metodologías y diferentes cepas de levaduras y se ha observado que el etanol afecta los valores de fermentación y el crecimiento de éstas se inhibe por completo a un 12% vol/vol de etanol donde solo una reducción del 50% en la habilidad fermentativa ocurre (37).

Como se ha visto que al utilizar mostos concentrados, se desperdicia mucho ya que no todos los azúcares son fermentados, se han puesto en operación dos nuevos sistemas que incrementan la eficiencia del material cervecero en un promedio de 2.5% para un mosto de 16% de sólidos disueltos. El primer sistema involucra el reciclaje del mosto de alta gravedad que permanece en la tina de filtración una vez que se lleva la olla de ebullición con lúpulo, mientras que el segundo sistema ha automatizado la descarga de la tina de filtración (38).

En el proceso cervecero normal se presenta el problema de contaminación de la cerveza por bacterias ácido lácticas como Lactobacillus spp. y Pediococcus spp. (39 a 42), además de Flavobacterium proteus (43) y Enterobacter agglomerans (44) que resisten concentraciones de etanol por arriba del 5%, con lo cual se pueden contaminar la levadura cosechada para inóculo y extenderse a toda la planta de producción. Lo anterior fué tomado en cuenta por Mangus y colaboradores; los cuales realizaron un trabajo para observar la viabilidad de estas bacterias contaminantes utilizando mostos concentrados con alta producción de alcohol (hasta 16.4 vol/vol) y obtuvieron por resultado que la alta gravedad de fermentación disminuye

el rango de bacterias capaces de contaminar y descomponer la cerveza (45).

En un trabajo realizado por J.H.T. Luong se propone modelos para describir el patrón cinético de la inhibición de las levaduras por etanol, con los cuales se predice un valor de 112 gr/lt como valor máximo para la producción de etanol y un valor de inhibición para la capacidad de producción de etanol por las levaduras igual a 115 gr/lt.

Los modelos propuestos para crecimiento y producción de etanol son los siguientes:

$$\frac{\mu_i}{\mu_0} = 1 - \frac{P}{P_m} \qquad \frac{V_i}{V_0} = 1 - \frac{P}{P'_m}$$

En donde:

$\mu_i$  es el valor del dato máximo de crecimiento específico en presencia de etanol.

$\mu_0$  es el dato máximo de crecimiento específico.

P es la concentración de etanol.

$P_m$  es la concentración superior de etanol a la cual las células ya no crecen.

$P'_m$  es la concentración superior de etanol a la cual las células de levadura dejan de producir etanol.

$V_i$  es el dato específico de producción de etanol en la presencia de etanol.

$V_0$  es el valor máximo específico de producción de etanol en concentraciones de etanol iguales a cero.

En este trabajo se concluyó que el modelo cinético propuesto aparenta ser muy útil para representar la cinética de la fermentación de alcohol, pero los parámetros del modelo dependen de la especie microbiana, las condiciones fisiológicas del microorganismo y el estado del medio de cultivo (46).

El propósito de este trabajo es el de manejar los resultados obtenidos en fermentaciones con mostos semisintéticos de alta gravedad (20, 22 y 25% de sólidos disueltos) en el orden de predecir la máxima gravedad a la que la levadura ya no puede fermentar el mosto como consecuencia de la concentración del mismo sobre su fisiología.



## II.- OBJETIVO

Establecer mediante representaciones gráficas de ecuaciones matemáticas la máxima concentración de carbohidratos que -- toleraría una levadura en función de la concentración de - etanol generado durante un procedimiento fermentativo. Esto realizado bajo tres programas de temperatura con 16, 18 y 20° C como máximos alcanzados al tercer día de fermentación.

### III.- MATERIALES Y METODOS

#### 1.- MICROORGANISMOS

Se utilizó una cepa de Saccharomyces uvarum (carlbergensis). La cepa fué proporcionada por el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Cervecería Cuauhtémoc, S.A. A dicha cepa se le mantuvo previamente en tubos con agar inclinado y se le propagó por el método convencional (inóculos seriados - en volúmenes ascendentes) usando para ello mostos de 16% de sólidos disueltos obtenidos de la Cervecería Cuauhtémoc, S.A. Planta Monterrey.

#### 2.- MEDIO DE CULTIVO

Se usaron como medios de cultivo mostos semisintéticos de 20, 22 y 24% de sólidos disueltos. Para la obtención de -- dichos mostos se tomó en cuenta la cantidad de nitrógeno total y de azúcares fermentables (tomando en cuenta solo los azúcares fermentables para realizar un balance de carbonos) presentes en el mosto convencional.

Los mostos semisintéticos se elaboraron con peptona, -- extracto de levadura y miel de maíz a la cual se le determinó la cantidad y calidad de los azúcares presentes utilizando -- para ello la cromatografía líquida de alta presión. Las cantidades usadas en la elaboración de los mostos semisintéticos -- para obtener los grados plato (% de sólidos disueltos) deseados aparecen en la Tabla No. 1.

#### 3.- FERMENTACION

Las fermentaciones se realizaron en matraces Erlen Meyer de 500 ml (dos matraces para cada concentración de mosto),

conteniendo 250 ml de mosto e inoculados con  $18 \times 10^6$  células de levadura por ml de medio. Para la incubación de los matraces se uso una incubadora calibrada y regulada para seguir -- las temperaturas programadas previamente y que se muestran en la figura No. 1. Cuando la temperatura de los matraces llegó al máximo programado, esta se mantuvo hasta el octavo día en el cual se cosechó la levadura realizando con ella diferentes estudios para observar el efecto de la concentración de azúcar durante el transcurso de la fermentación, diariamente se tomaron muestras de la misma para las diferentes pruebas que se -- llevaron a cabo.

#### 4.- CINETICA DE CRECIMIENTO

La cinética de crecimiento se estimó al medir la turbidez provocada por la masa celular en un Espectrofotómetro Coleman Junior II (Beckman Instruments Inc) a 600 nm cada 24 horas - - durante el transcurso de la fermentación.

#### 5.- DETERMINACIONES REALIZADAS A LAS CELULAS DE LEVADURA

##### 5a- DETERMINACION DE CELULAS MUERTAS

El porciento de células muertas se determinó con el método de azul de metileno recomendado por la American Society of Brewing Chemists ( A.S.B.C. ) (47).

##### 5b- DETERMINACION DE NIVELES DE GLICOGENO

El glicógeno se cuantificó con el método recomendado por D.E. Quain y R.S. Tubb (48).

##### 5c- DETERMINACION DE CELULAS CON DEFICIE IC A RESPIRATORIA.

Para esta eterminación se utilizó un método recomendado por la A.S.B.C. en el cual se usa como indicador el Cloruro de

2, 3, 5, fenil tetrazolium (TTC) (49).

En este método, se siembran de 500 a 1000 células de levadura por extensión en cajas de petri conteniendo agar dextrosa, extracto de levadura y peptona; se incuban las cajas en posición invertida durante 3 días a 28-30° C; transcurrido este tiempo se recubren las cajas con una capa de agar con solución amortiguadora doble de fosfato y TTC; se incuban por 3 horas a temperatura ambiente y se observan, si en dichas placas se obtienen colonias blancas, estas son células que presentan deficiencia respiratoria, las colonias normales reducirán el TTC u se teñirán de rojo.

#### 6.- DETERMINACION REALIZADAS A LA FERMENTACION

##### 6a- DETERMINACION DE LA GRAVEDAD DEL MOSTO

En esta determinación, se utiliza un picnómetro de 10ml. previamente llevado a peso constante, con lo cual al ya conocer su peso exacto a 20° C; se toman 10 ml de muestra de cada fermentación y se pesa el picnómetro y por diferencia de peso utilizando para ello la fórmula de densidad se obtienen las gravedades del mosto.

La determinación de gravedad se realiza diariamente para poder cuantificar la caída de la misma en la fermentación.

##### 6b- CUANTIFICACION DE ETANOL

Se tomaron muestras al final de cada fermentación y dichas muestras se mantuvieron en congelación hasta el momento de su cuantificación para la cual se utilizó cromatografía de gases.

Las muestras antes de ser inyectadas en el cromatógrafo de gases recibieron un tratamiento previo para eliminar contaminantes. Este tratamiento consistió en hacerlas pasar a través de

una precolumna de 6 cm de longitud por 1/8 de pulgada de diámetro y empacada con lana de vidrio.

Después de este tratamiento se inyectaron 0.5 ml de muestra a un cromatógrafo de gases Beckman con detector de ionización de flama, nitrógeno como gas acarreador y columna de acero inoxidable de 2m de longitud y 1/8 de pulgada de diámetro; empacada con porapak Q; se uso n-propanol como estandar interno.

En todos los análisis cromatográficos se utilizaron las siguientes condiciones:

Flujo de nitrógeno: 30 ml/mn

Flujo de hidrógeno: 30 ml/mn

Flujo de aire: 30 ml/mn

Temperatura de la columna: 180° C isotérmica

Temperatura del inyector: 250° C

Temperatura del detector: 250° C

Detector de ionización de flama

Sensibilidad del detector de  $10^{-10}$

Velocidad de registro de 1 cm/mn

Volumen de muestra de 0.5 ml.

Estandar interno: n - propanol

#### 6c- ANALISIS CROMATOGRAFICO DE CARBOHIDRATOS

Para llevar a cabo lo anterior se uso un cromatógrafo para líquidos Beckman con columna de 7.5 mm de diámetro y 30 cm de largo empacada con esferogel e carbohidrato, un detector de índice de refracción Altex modelo 156 y un integrador Varian modelo 4270.

Para el análisis cromatográfico se utilizaron las siguientes condiciones:

Temperatura de la columna: 90° C

Velocidad de flujo: 0.6 ml/mn  
Detector de índice de refracción  
Volumen de muestra inyectada: 10  $\mu$ l  
Eluente: agua destilada  
Estandar interno: manitol



## RESULTADOS Y DISCUSIONES

Al ser analizados los resultados obtenidos en las gráficas No. 2 al No. 7 para la caída de la gravedad del mosto entre el 3° y 5° día, se puede observar que los mismos, muestran un patrón similar en la mayoría de los casos, con ligeras variaciones en la fermentación a 18° C.

El mismo patrón puede ser observado en la gráfica No. 8, así como también en ella se puede notar que los valores obtenidos en la primera y sexta generación son muy similares entre sí, sin verse afectados al ser utilizada la levadura en 6 fermentaciones consecutivas de aproximadamente 7% vol/vol de etanol -- final y a temperaturas hasta de 20° C.

A 20° C se tiene una atenuación menor que a 16° C y esto se debe quizá a que la alta temperatura afecta la fisiología de la levadura con la rápida acumulación del alcohol. Estos resultados coinciden con los reportados por E. Pfisterer y G. Stewart (17) quienes en su trabajo realizado observan que a temperaturas elevadas se tiene una floculación prematura de la levadura lo que ocasiona que no haya un consumo de los azúcares que se encuentran disueltos en el medio por lo que se tiene una atenuación en el mosto más lenta.

Considerando los resultados obtenidos en las gráficas anteriores, se calcularon los valores para la velocidad de fermentación que se encuentran enumerados en la Tabla No. 11.

En la gráfica No. 9 en la cual se representa el efecto de la gravedad del mosto sobre la velocidad de fermentación, se

muestra que al graficar la gravedad del mosto contra la velocidad de fermentación, puede observarse una línea recta horizontal por lo cual puede concluirse que a las concentraciones de mosto ensayadas (20-24° P) no hay un efecto de retardo en la asimilación de los azúcares y transformación bioquímica de los mismos.

Los resultados de la gráfica No. 10 en la cual se representa el efecto de la temperatura contra la velocidad de fermentación nos permite observar que al igual que la concentración del mosto, la temperatura no ejerce un efecto importante sobre la velocidad de fermentación a las gravedades ensayadas, aunque hay que aclarar que la cosecha de la levadura tiene que hacerse -- cuando muy tarde en el décimo día porque la levadura sumergida en la cerveza ( etanol 5-7% vol/vol) tiende a autolizarse acarreando como consecuencia una acumulación de materiales nitrogenados (Ac. nucléicos y proteínas) que pueden provocar un aumento en el pH de la cerveza (podría incrementarse de 4 a 6).

Al calcular los extractos aparentes de acuerdo a los resultados obtenidos y graficándolos, ellos permiten predecir niveles de etanol teóricos, y estos valores a su vez serán útiles para obtener algunos otros valores importantes en la evaluación del -- procedimiento fermentativo ( gráfica No 11 ).

La gráfica No. 12 que muestra el efecto de la concentración de etanol y la temperatura de fermentación sobre la velocidad de fermentación , permite observar que al aumentar la concentración de etanol en el medio de cultivo, disminuye la velocidad de fermentación, pudiendo extrapolar una línea recta, mediante la cual se puede establecer una ecuación matemática que - -

que nos permite predecir el punto de intersección con la abcisa correspondiendo este valor al momento en que la velocidad de fermentación de la levadura se reduce a 0. La concentración de alcohol sería: Ecuación de la recta  $Y = -0.12X + 0.173$

$$m = \frac{0.077 - 0.125}{8 - 4} = -0.012$$

$$x = \frac{-0.125}{-0.012} + 4$$

donde x es igual a la concentración de etanol a la cual se tiene una velocidad de fermentación con un valor de 0.

Con este modelo se obtiene un valor de 115.87 g. de etanol/l. Este resultado coincide con los valores de concentración de etanol inhibitorios para el crecimiento de la levadura y la velocidad de fermentación iguales a 115 g/l de etanol.

El valor anterior de concentración de etanol puede ser transformado a su concentración original de azúcares en el mosto mediante la ecuación  $Y = 0.328545x - 0.205273$  que fué obtenido de la gráfica No. 13, resultando ser de 35.77° P (% de sólidos disueltos).

La Tabla No. II, muestra los valores obtenidos para el grado real de fermentación, y el porcentaje de etanol obtenido, se puede notar en estos resultados que a los 16° C de temperatura de fermentación se obtiene el valor más alto de 52% para el grado real de fermentación; pero estos resultados no concuerdan con los valores que se obtuvieron para la producción de etanol, ya

que en estos resultados a mayor temperatura se tiene mayor producción de etanol, así como también hay mayor producción de etanol con valores más altos en la concentración del mosto. Esto mismo lo mencionan algunos investigadores (16) los cuales reportan que aumenta la producción de etanol al aumentar la concentración del mosto, hasta que se llega a tener en el medio concentraciones inhibitorias de etanol.

Por otro lado la gráfica No. 14 de concentración de etanol en el medio contra el grado real de fermentación pudiera interpretarse como una parábola con la concavidad hacia arriba, pero esto provocaría que en un determinado momento, al incrementarse la concentración de etanol, el grado real de fermentación disminuiría hasta un valor de 0 en el punto de intersección con la abscisa, pero matemáticamente el valor obtenido no es válido. De igual manera, al invertir la observación cuando la concentración de etanol se reduce, el grado real de fermentación se elevaría a valores altos y esto no concuerda con la realidad. El tipo de gráfica que se obtiene sería aplicable en el caso de los carbohidratos contra etanol, por lo cual la gráfica no puede ser utilizada para predecir comportamientos biológicos mediante modelos matemáticos. Tal vez, sea conveniente establecer que el grado real de fermentación tendría que ver con la composición del mosto o con la actividad biológica de la levadura (habilidad fermentativa) y no con la concentración de etanol acumulado en la fermentación.

De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla No. III, no hay influencia negativa del número de usos en fermentación sobre la viabilidad de las levaduras, a pesar de que estas han sido sometidas a temperaturas hasta de 25° C y niveles de

etanol de alrededor de 7% vol/vol, hay reportes que indican que a niveles de etanol de 8 a 10% vol/vol (agregado) reducen la -- habilidad fermentativa de las levaduras hasta en un 50% (50) - pero en este caso no ocurre tal cosa, lo cual puede deberse a -- que el nivel de etanol mencionado (7%) es acumulado por la levadura en el transcurso de la fermentación, esto coincide con lo reportado por otros investigadores (35, 36) que indican que el efecto nocivo del etanol tiene que ver con la permeabilidad de la membrana y la cantidad de alcohol presente en el citoplasma.

El glicógeno presente en la levadura es importante, ya que este compuesto le sirve a la misma como componente de reserva. Al llevar a cabo la determinación del glicógeno en la levadura, -- se obtienen valores que son aceptables para la misma, con lo cual podemos decir que la levadura no se ve afectada por las concentraciones del mosto y la concentración de alcohol que se obtiene.

Así como es importante el determinar el glicógeno presente en -- la levadura, también es importante el conocer si dicha levadura presenta deficiencias en su sistema respiratorio, ya que esto -- puede ocasionar que la célula sufra una alteración en su metabolismo con lo cual el producto final en la fermentación podría -- no ser el mismo que bajo condiciones normales, o bien se tendrían actividades fermentativas demasiado lentas.

Al analizar este parámetro durante el proceso fermentativo, -- nunca se obtuvieron levaduras que presentaran deficiencias respiratorias por encima de lo que se considera un valor normal -- hasta un 2 es aceptable en poblaciones nuevas de levaduras .

## C O N C L U S I O N E S

- 1.- La levadura no se ve afectada fisiológicay bioquímicamente con el uso de mostos con alta concentración (hasta un 24% de sólidos disueltos), temperaturas hasta de 20° C y una acumulación de niveles de etanol hasta de un 7% vol/vol.
- 2.- El valor predecible que reduce a 0 la velocidad de fermentación es de 115.87 g de etanol/l.
- 3.- Se predice un valor de 35.77% de sólidos disueltos como máxima concentración de azúcares que puede ser tolerada en el mosto.
- 4.- La viabilidad de la levadura no se ve afectada bajo las condiciones a las que se ve sometida en cada fermentación aunque se le haya utilizado por seis veces consecutivas.
- 5.- Mediante una función lineal, graficando velocidad de fermentación contra concentración de etanol, puede predecirse el nivel de tolerancia que tendría una levadura al fermentar mostos con gravedades altas con los cuales se obtuvieron concentraciones de alcohol hasta de 144.16 ml por litro.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Rose, A.H. Investigaci3n y Ciencia. 62 : 67 (1981)
- 2.- Stewart, G.G., J.Erratt, and I.Garrison. MBAA Technical Quarterly . 16 : 1 . (1979).
- 3.- Engan, S. . Journal of The Institute of Brewing . 76 : 254.(1970)
- 4.- Peynaud, E. and G. Guimberteau . Comptes Rendu, des Seances de Academie des Sciences . 24 : 336 . (1961).
- 5.- Ayräpää, T. . Brauwissenschaft . 48 . (1970)
- 6.- Andreasen, A.A. y J.J.B. Stier . Journal of Cell and Comparative Phisiology . 41 : 23 . (1953).
- 7.- Nordheim, W. . Brauw issenschaft . 48 . (1970),
- 8.- Lie, S. . Proceedings of The European Brewery Convention. 192 (1968)
- 9.- Hackstaff, B.W. . Master Brew. Assoc. Am.Tech.Quart. . 15 : 1-7 (1978).
- 10.- Whitear, A.L., and D. Crabb . The Brewer . 63 : 60-63 (1977)
- 11.- Day, A., E. Anderson, and P.A. Martin . Proceeding of The 15th Congress of European Brewing Convention . 377-391. (1975 .
- 12.- White, F.H. . Proceeding of the 15th Convention of The Society of Institute Brewing . 133-146 . (1978).
- 13.- Owades, J.L. . Master Vrew. Assoc. Am. Tech. Quart. . 19 . 163-16 . (19 1).
- 14.- Casey, G.P. and W. M. Ingledew . J. Am Soc. Brew. Chem. 21 : 1- - 153 . (1923),

- 15.- Casey, G.P., C.A. Magnus, and W.M. Ingledew . Biotech. 5 :  
429 - 434 . (1983).
- 16.- Casey, G.P., G.A. Magnus, and W.M. Ingledew . Applied and  
Envirom . Microbiology . 48 (3) : 639-649 . (1984).
- 17.- Pfisterer and G. Stewart . European Brewery Convention,  
Nice . 255-267 . (1975).
- 18.- Engan, S. . Brew. Dig. . 49 : 40 . (1974).
- 19.- Anderson, R.G. and B.H. Kirsop . Brew. Conv. Proc. Congr.  
15th, Nice . 242 . (1975).
- 20.- Anderson, R.G. and B.H. Kirsop . J. Inst. Brew. . 80 : 48 .  
(1974).
- 21.- Drost, B.W. . Eur. Brew. Conv. Fermentation Storage Symp. .  
767 . (1978).
- 22.- Palmer, A.K. and H.J. Rennie . Inst. Brew. . 80 : 447 . (1974)
- 23.- Skinner, K. . The Brewer . 63 : 3 . (1979).
- 24.- Wackerbauer, K. and G. Bender . Monatsschrift Braveri . 36 :  
210 . (1983).
- 25.- White, F.H. . Brew. Dig . 54 : 26 . (1979).
- 26.- Whiwort, C. . Eur. Brew. Conv. Fermentation and Storage Symp.  
. 155 . (1978).



- 27.- Schaus, O.O. . MBAA Tech. Quart. . 8 : 7 (1971).
- 28.- Casey, G.P. and W.M. Ingladew . Am Soc. Brew. Chem. . 43  
(2) : 75 . (1985)
- 29.- Beaven, M.J., C. Charpentier, and A. H. Rose . J. Gen.  
Microbiol. . 128 : 1427 - 1445 . (1982).
- 30.- Thomas, D.S. and A. H. Rose, J.A. Hossack, . Arch. Microbiol  
. 117 : 239 - 245 . (1978).
- 31.- Thomas, D.S. and A.H. Rose . Arch. Microbiol. . 122 : 49 - 55  
. (1979).
- 32.- Curatolo, W., S. Kanodia, and M.F. Robertson . Biochim.  
Biophys. . 734 : 336-341 . (1983).
- 33.- Dombek, K. M. and L.O. Ongram . J. Bacteriol. . 157 : 233-239  
. (1984).
- 34.- Ingram, L.O. and N.S. Vreeland . J. Bacteriol. . 144 : 481-488  
. (1980).
- 35.- Leao, C. and N. van Uden. Biotechnol. Bioeng. . 24 : 2601-2604  
. (1982).
- 36.- Loureiro - Dias, M.C. and J. M. Peinado . Biotechnol . 4 : 721-  
724 . (1982).
- 37.- Kalmokoff, M.L. and W.M. Ingladew . American Society of Brewing  
Chemist . Inc. . 43 : 4 . (1985).

- 38.- Schickerowsky, L.W. and I.F. Hancock . MBAA Technical Quarterly . 17 : 4 . (1980)
- 39.- Ault, R.G. . J. Inst. Brw. . 71 : 376 . (1965)
- 40.- Ingledew, W.M. . J.Am. Soc. Brew. Chem. . 37 : 145 . (1979)
- 41.- Rainbow, C. . Proc. Biochem. . 6 : 15 . (1971)
- 42.- Skinner, K. . The Brewer . 63 : 3 . (1977)
- 43.- Strandskov, F.B., H.W. Baker, and J.B. Bokelman . Wallerstein Lab. Commun . 16 : 261 . (1953)
- 44.- Van Vuueren, H.J.J., K.Kersters, J. de Ley, D.F. Toerien and R. Meisel . J. Inst. Brew. . 84 : 315 . (1978)
- 45.- Magnus, C.A., W.M. Ingledew, and G.P. Casey . American Soc. of Brew. Chem. Inc. . 44 : 4 . (1986)
- 46.- Luong, J.H.T. . Biotech. and Bioengineering . 27 : 280-285 . (1985)
- 47.- American Society of Brewing Chemists Methods of Analysis (7th Ed) Microbiology - 3 A. The Society, St. Paul, M.N. . (1975)
- 48.- Quain, D.E. and Tubb. J. Inst. Brew. . 89 (1) : 38-40 . (1983)
- 49.- American Society of Brewing Chemists, Methods of Analysis (7th Ed) Microbiology 3-C, The Society, St. Paul M.N. . (1975)
- 50.- Fernández, S., N. Machuca, M.G. González and J.A. Sierra . J. Am. Soc. Brew. Chem. . 40 : 15 . (1982)

APENDICE DE TABLAS

**TABLA I.- CONCENTRACIONES DE MIEL DE MAIZ COMO FUENTE DE CARBONO Y PEPTONA-EXTRACTO DE LEVADURA COMO FUENTE DE NITROGENO, UTILIZADOS EN LA ELABORACION DE MOSTOS SEMISINTETICOS.**

GRAVEDAD °P	INGREDIENTES (GRAMOS)			AGUA
	MIEL DE MAIZ	PEPTONA DE SOYA	EXTRACTO DE LEVADURA	
20	82.8	2.66	0.25	250
22	93.1	3.00	0.25	250
24	103.5	3.30	0.25	250

**TABLA II.- DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS DURANTE LAS FERMENTACIONES DE MOSTOS CONCENTRADOS REALIZADAS A DIFERENTES TEMPERATURAS.**

TEMPERATURA MAXIMA DE FERMENTACION °C	GRAVEDAD DEL MOSTO °P	GRADO REAL DE FERMENTACION %	% DE ETANOL PRODUCIDO (PROMEDIO)	VELOCIDAD DE FERMENTACION *
16	20	52	4.4	0.11
	22	48	5.4	0.10
	24	49	5.6	0.11
18	20	41	6.1	0.09
	22	41	7.1	0.09
	24	47	7.1	0.08
20	20	44	5.3	0.09
	22	39	6.3	0.09
	24	39	6.8	0.10

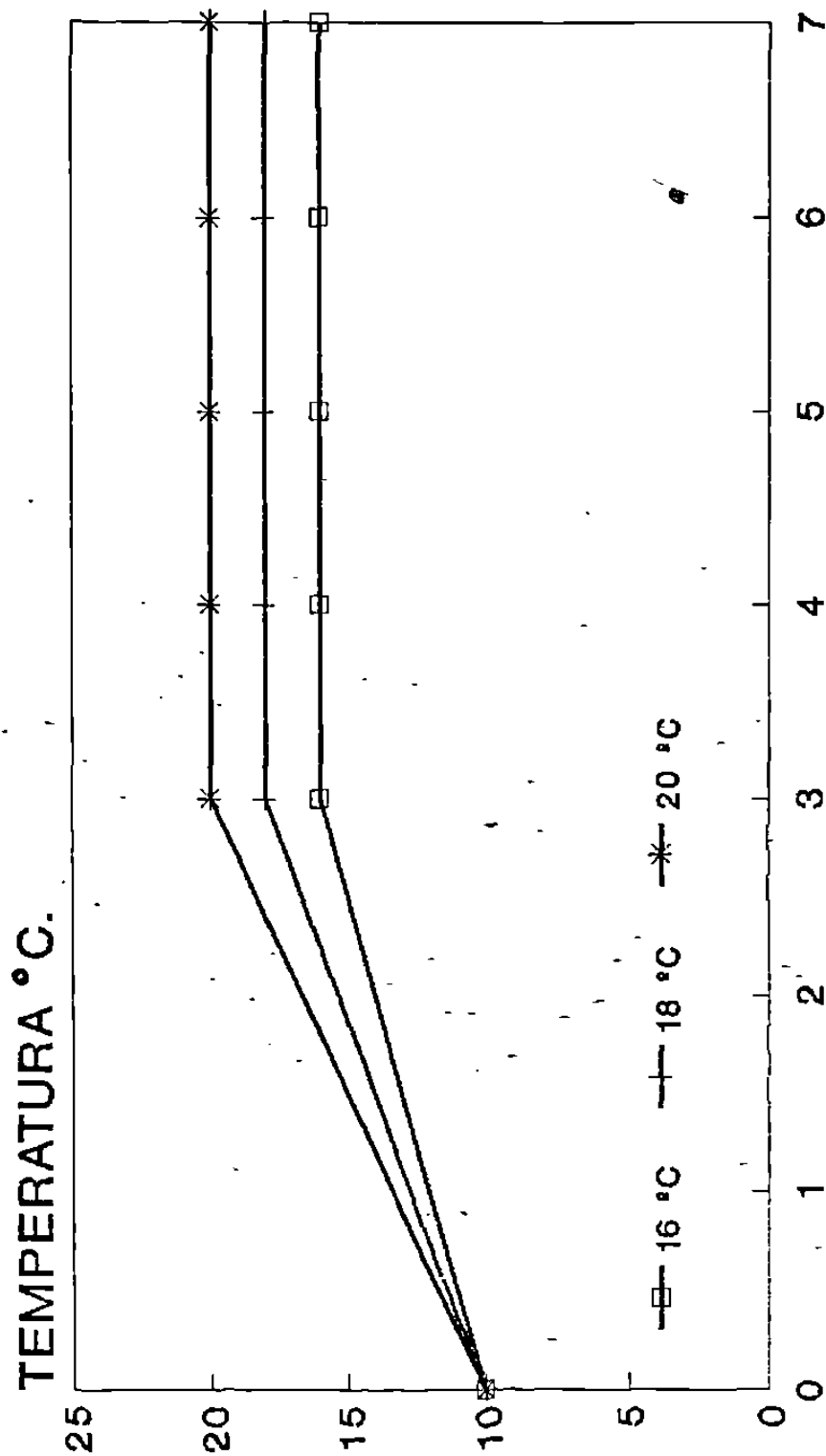
\* CALCULADA COMO DISMINUCION DE LA GRAVEDAD RESPECTO AL TIEMPO, ENTRE LOS DIAS 3° Y 5° DE LA PRIMERA FERMENTACION

**TABLA III.- % DE VIABILIDAD OBSERVADA EN LEVADURAS  
COSECHADAS DE FERMENTACIONES DE MOSTOS  
CONCENTRADOS A TRES TEMPERATURAS MAXIMAS  
DE FERMENTACION Y DESPUES DE VARIOS USOS  
CONSECUTIVOS.**

TEMPERATURA MAXIMA DE FERMENTACION	NUMERO DE USOS EN FERMENTACION	GRAVEDAD DEL MOSTO		
		20°P	22°P	24°P
16°C	2	87	92	94
	4	93	91	92
	6	91	93	91
18°C	2	94	93	94
	4	93	91	92
	6	92	92	92
20°C	2	97	97	97
	4	93	97	95
	6	97	96	97

APENDICE DE GRAFICAS

GRAFICA 1

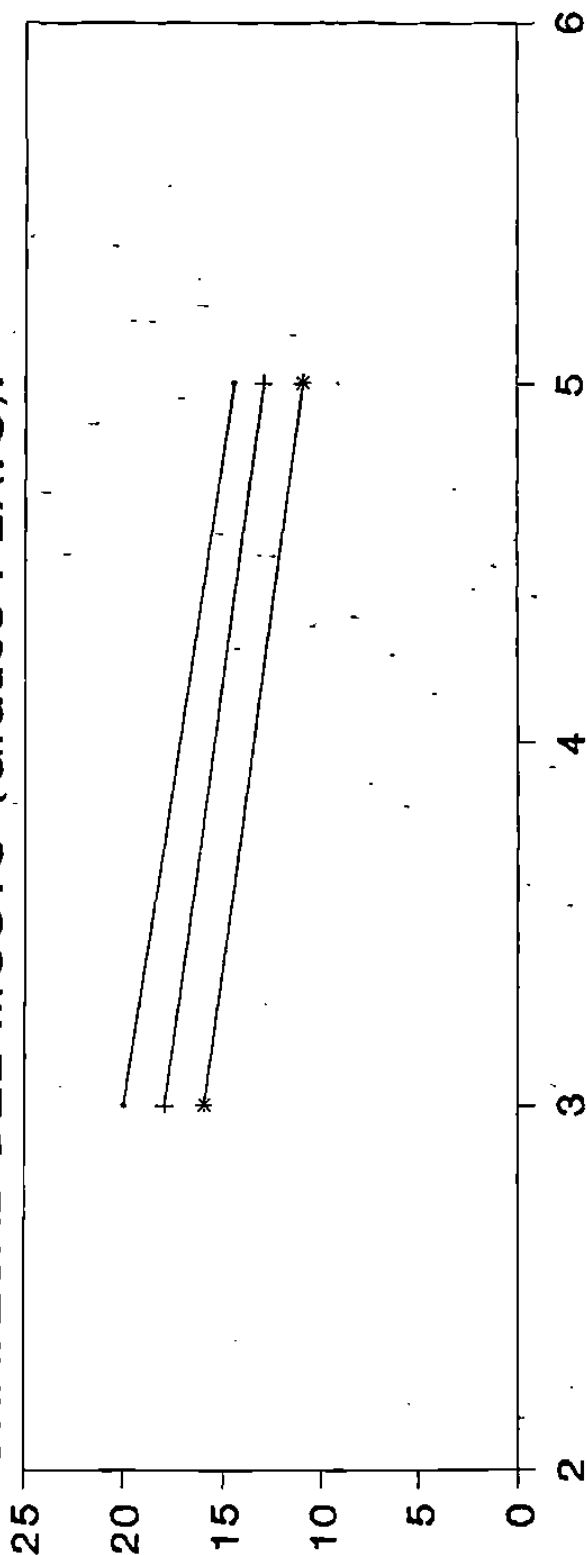


PROGRAMAS DE TEMPERATURA USADOS  
EN LAS FERMENTACIONES



# GRAFICA 2

GRAVEDAD DEL MOSTO (Grados PLATO).

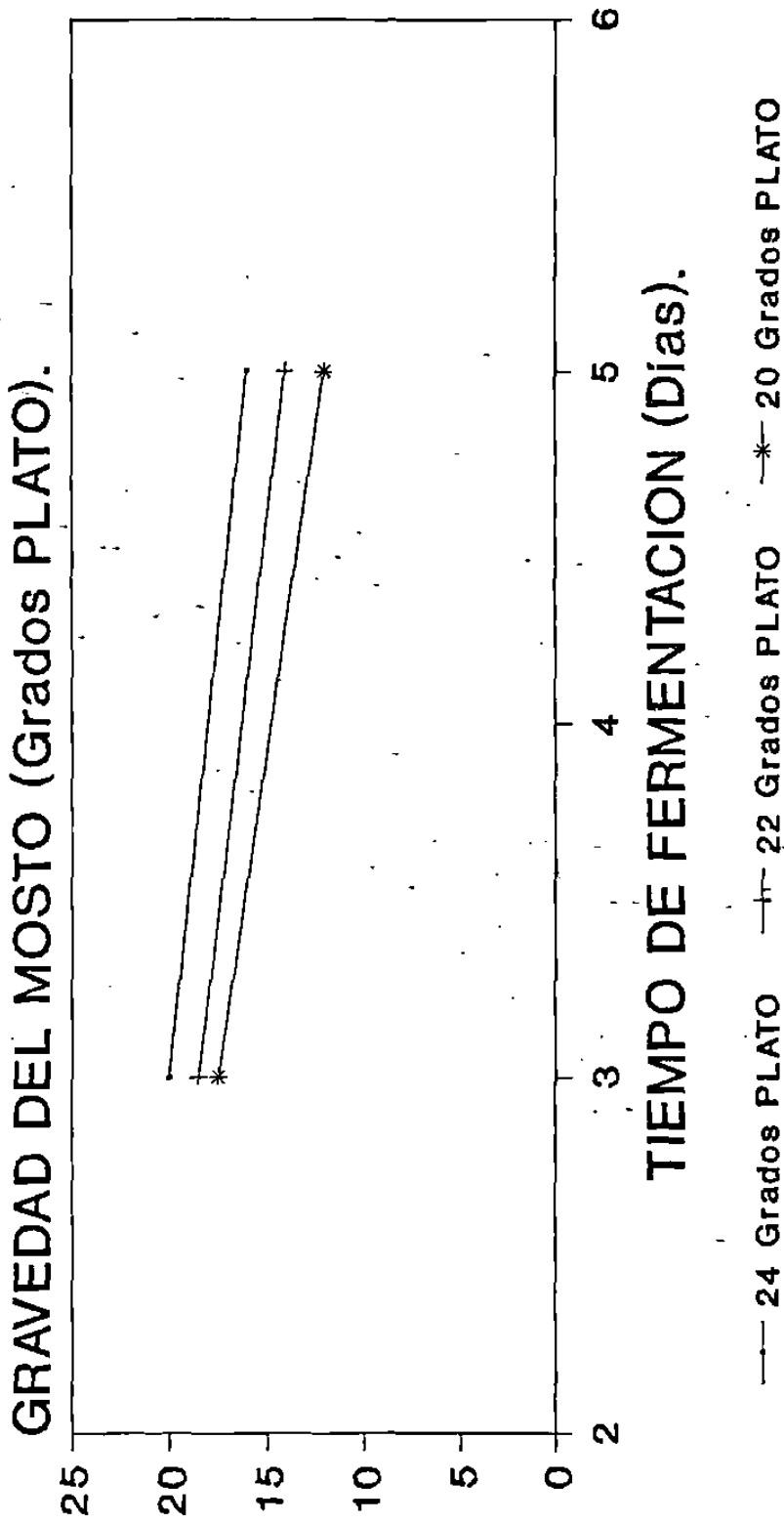


TIEMPO DE FERMENTACION (Días).

— 24 Grados PLATO    —+ 22 Grados PLATO    —\* 20 Grados PLATO

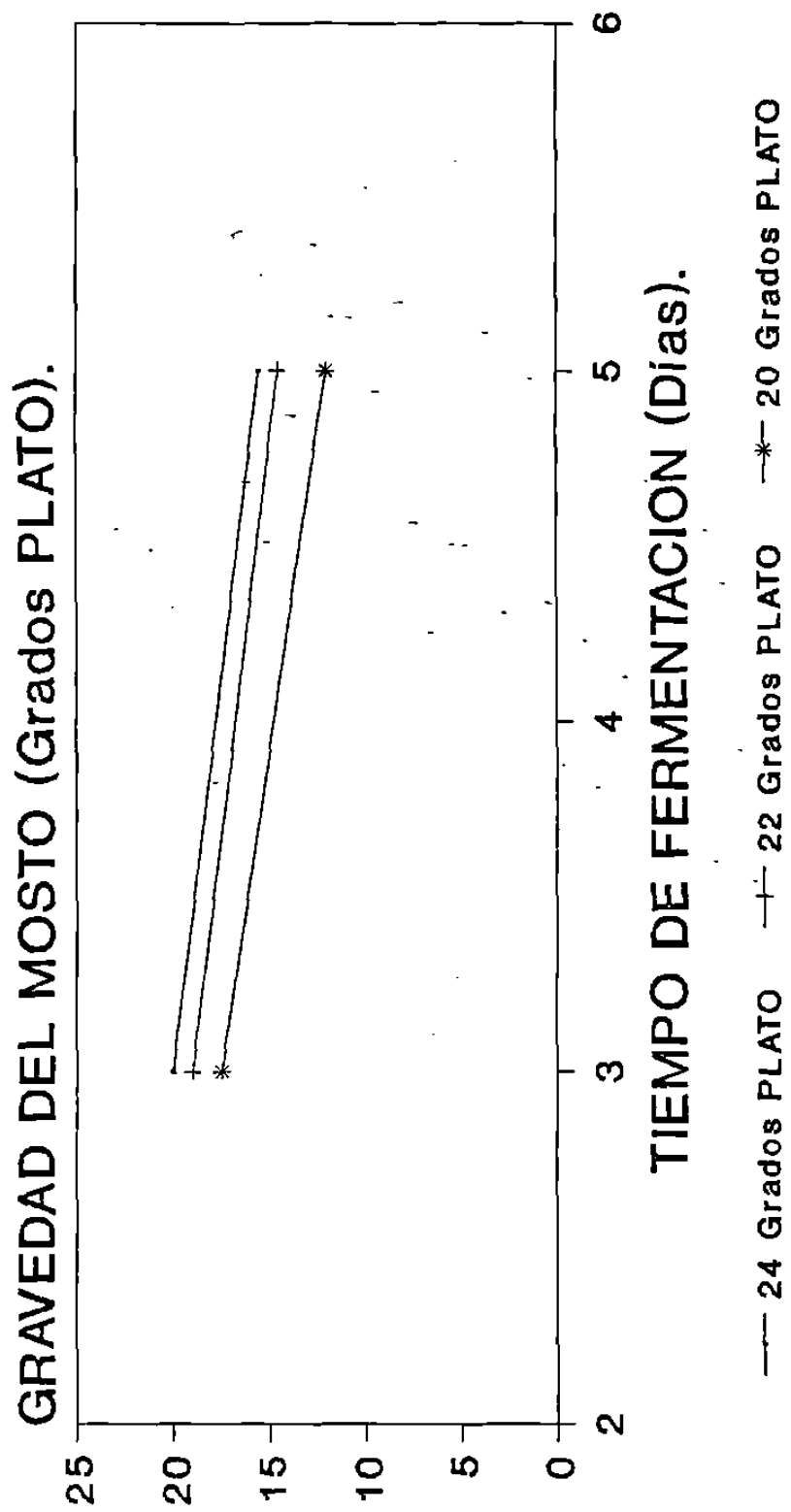
CAIDA DEL EXTRACTO ( Grados plato )  
EN FERMENTACIONES DE MOSTOS CONCENTRADOS  
A 16 Grados CENTIGRADOS, 1ª GENERACION.ª

GRAFICA 3



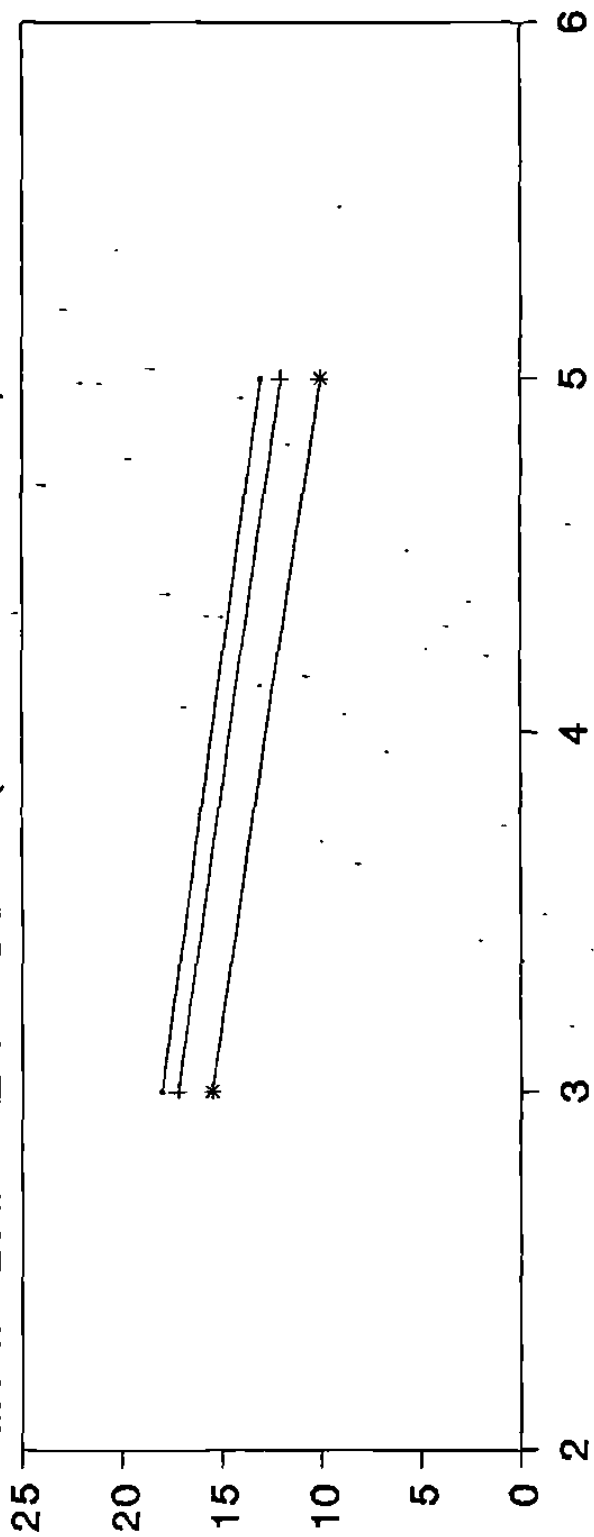
CAIDA DEL EXTRACTO ( Grados PLATO )  
EN FERMENTACIONES DE MOSTOS CONCENTRADOS  
A 18 Grados CENTIGRADOS, 1ª GENERACION.

GRAFICA 4



CAIDA DEL EXTRACTO ( Grados PLATO )  
EN FERMENTACIONES DE MOSTOS CONCENTRADOS  
A 20 Grados CENTIGRADOS, 1ª GENERACION.

GRAVEDAD DEL MOSTO (Grados PLATO).

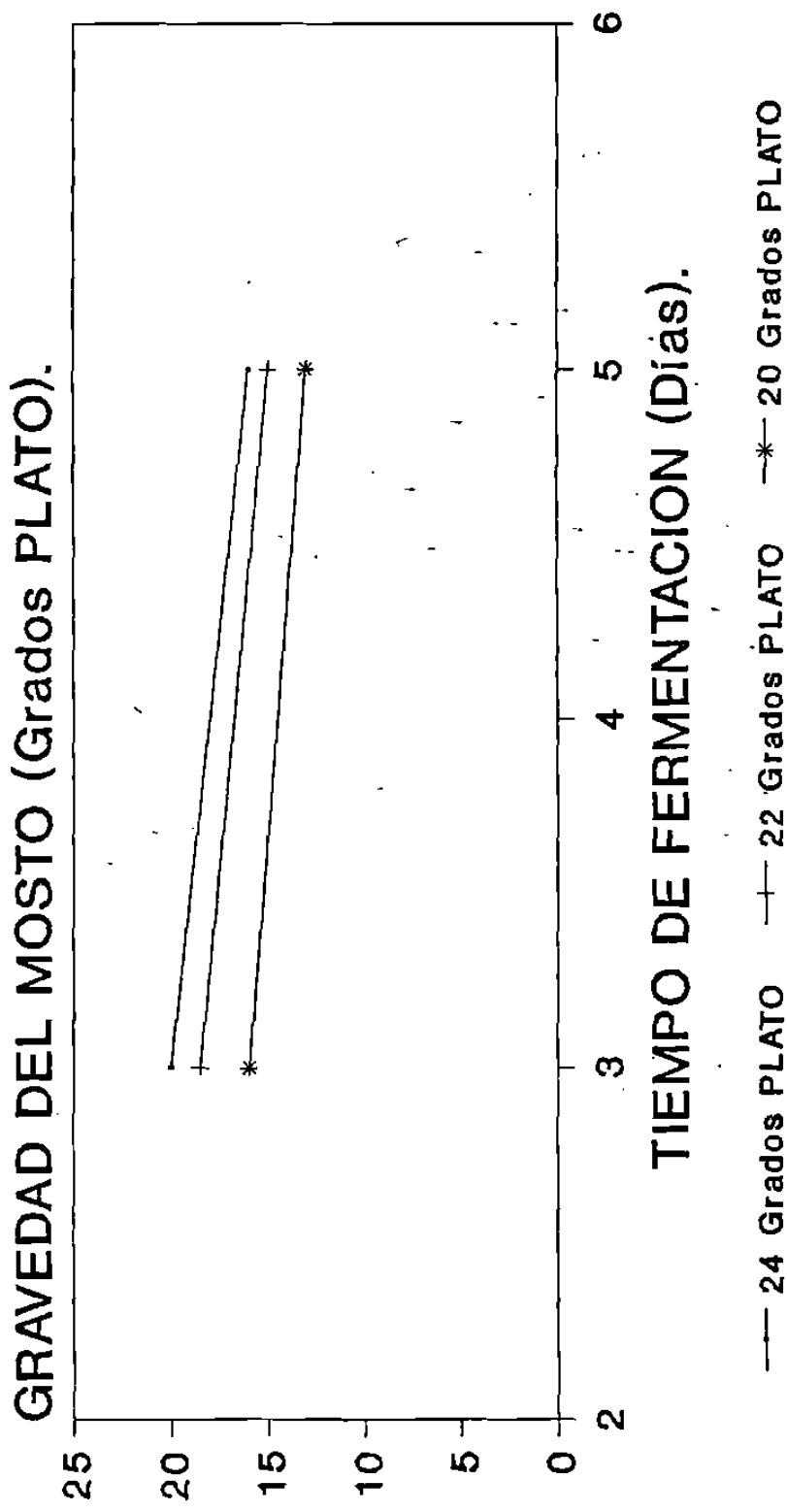


TIEMPO DE FERMENTACION (Días).

— 24 Grados PLATO ; —+ 22 Grados PLATO —\* 20 Grados PLATO

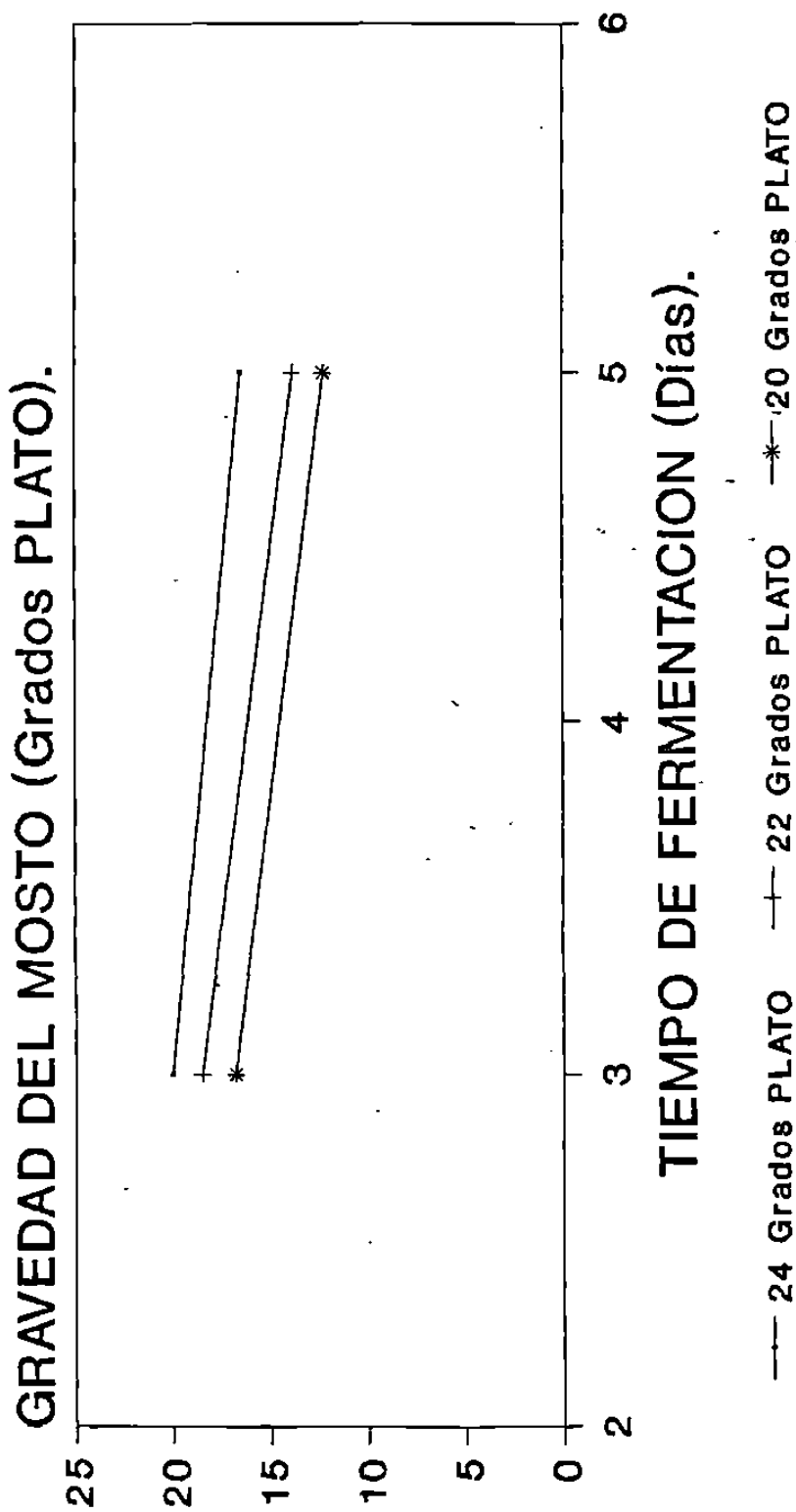
CAIDA DEL EXTRACTO ( Grados PLATO )  
EN FERMENTACIONES DE MOSTOS CONCENTRADOS  
A 16 Grados CENTIGRADOS, 6ª GENERACION.

**GRAFICA 6**

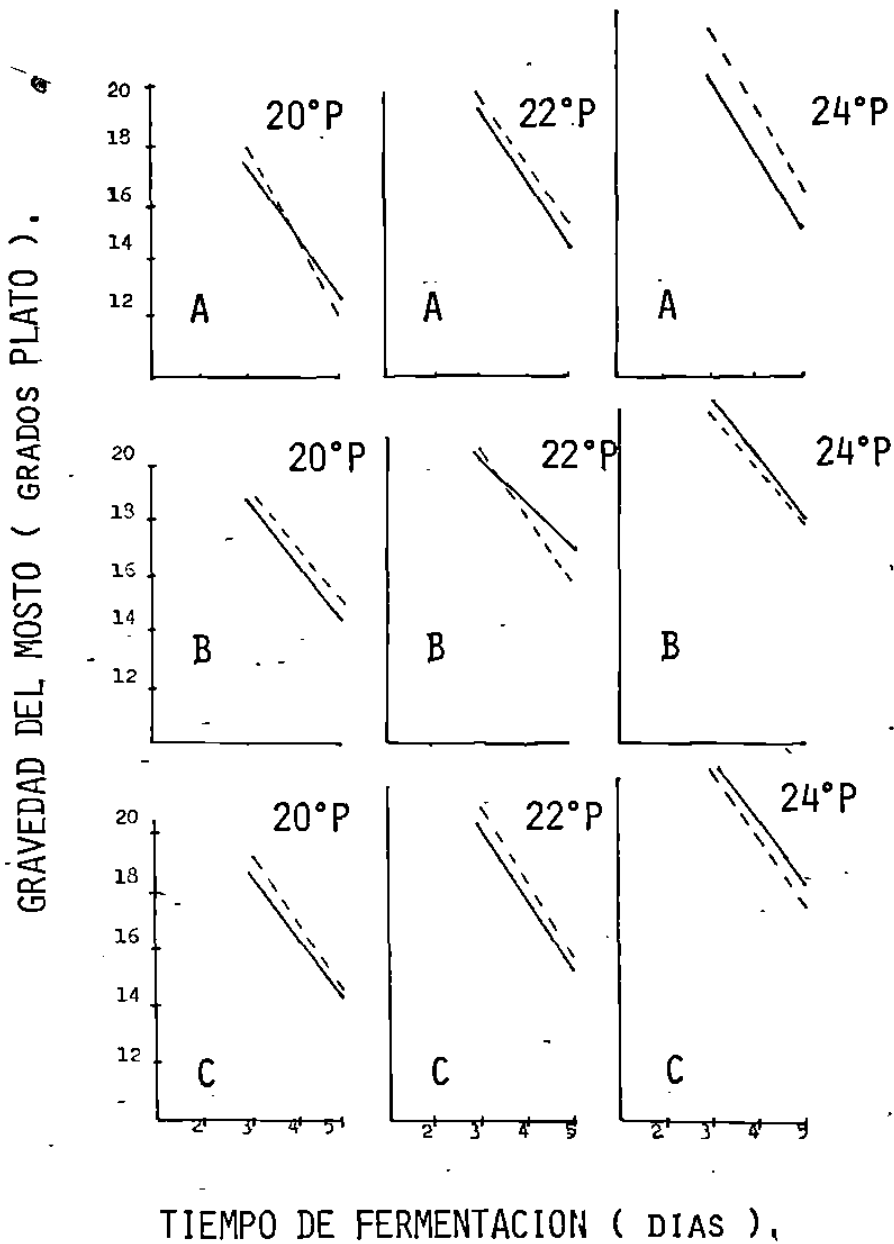


**CAIDA DEL EXTRACTO ( Grados PLATO )  
EN FERMENTACIONES DE MOSTOS CONCENTRADOS  
A 18 Grados CENTIGRADOS, 6ª GENERACION.**

GRAFICA 7

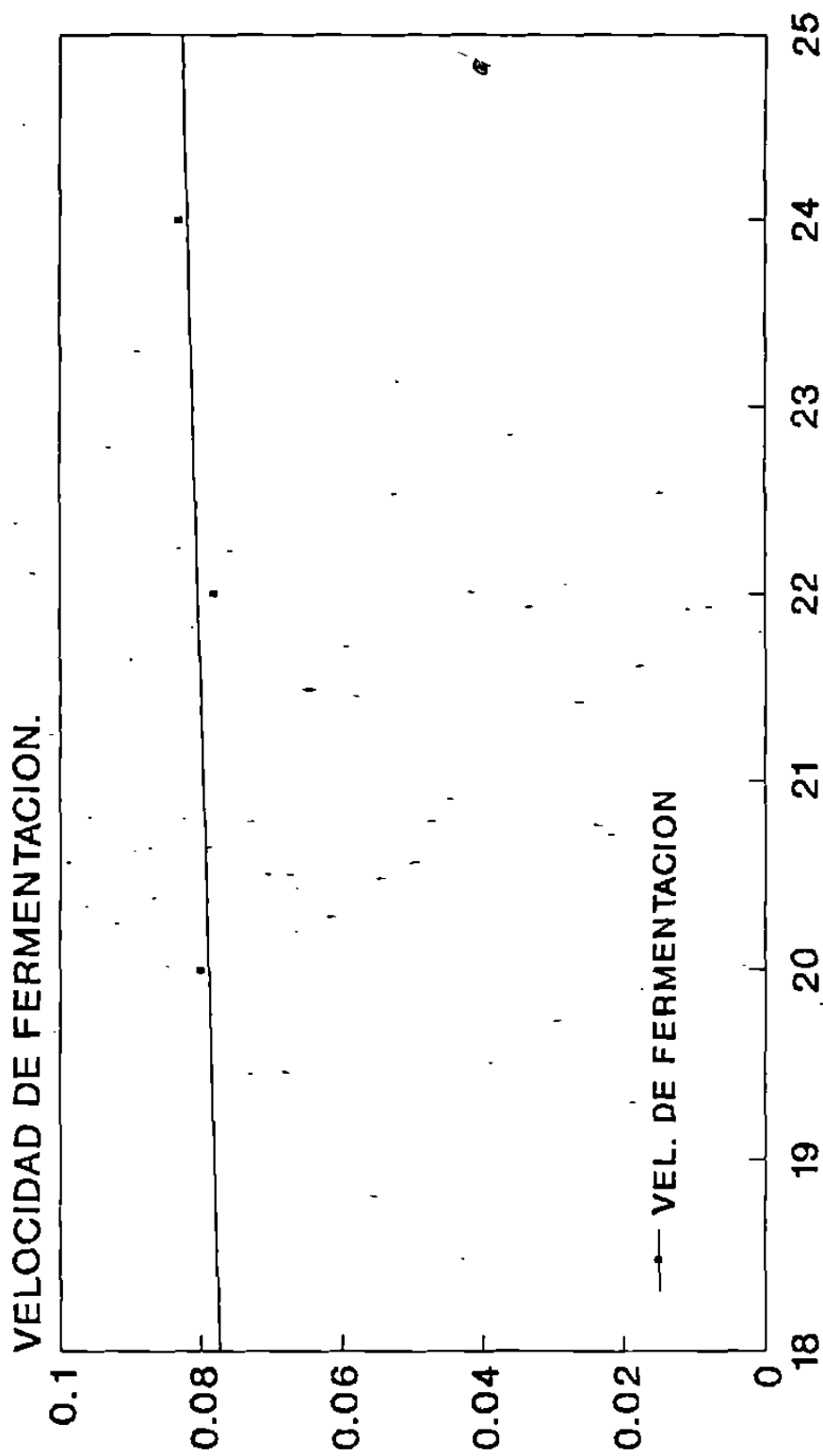


CAIDA DEL EXTRACTO ( Grados PLATO )  
EN FERMENTACIONES DE MOSTOS CONCENTRADOS  
A 20 Grados CENTIGRADOS, 6<sup>a</sup> GENERACION.



GRAFICA 8.- CAIDA DEL EXTRACTO EN FERMENTACIONES DE MOSTOS CONCENTRADOS A TRES TEMPERATURAS A, ( 16°C ) ; B, ( 18°C ) ; C, ( 20°C ), DURANTE LA PRIMERA ( --- ) Y SEXTA ( — ) GENERACIONES.

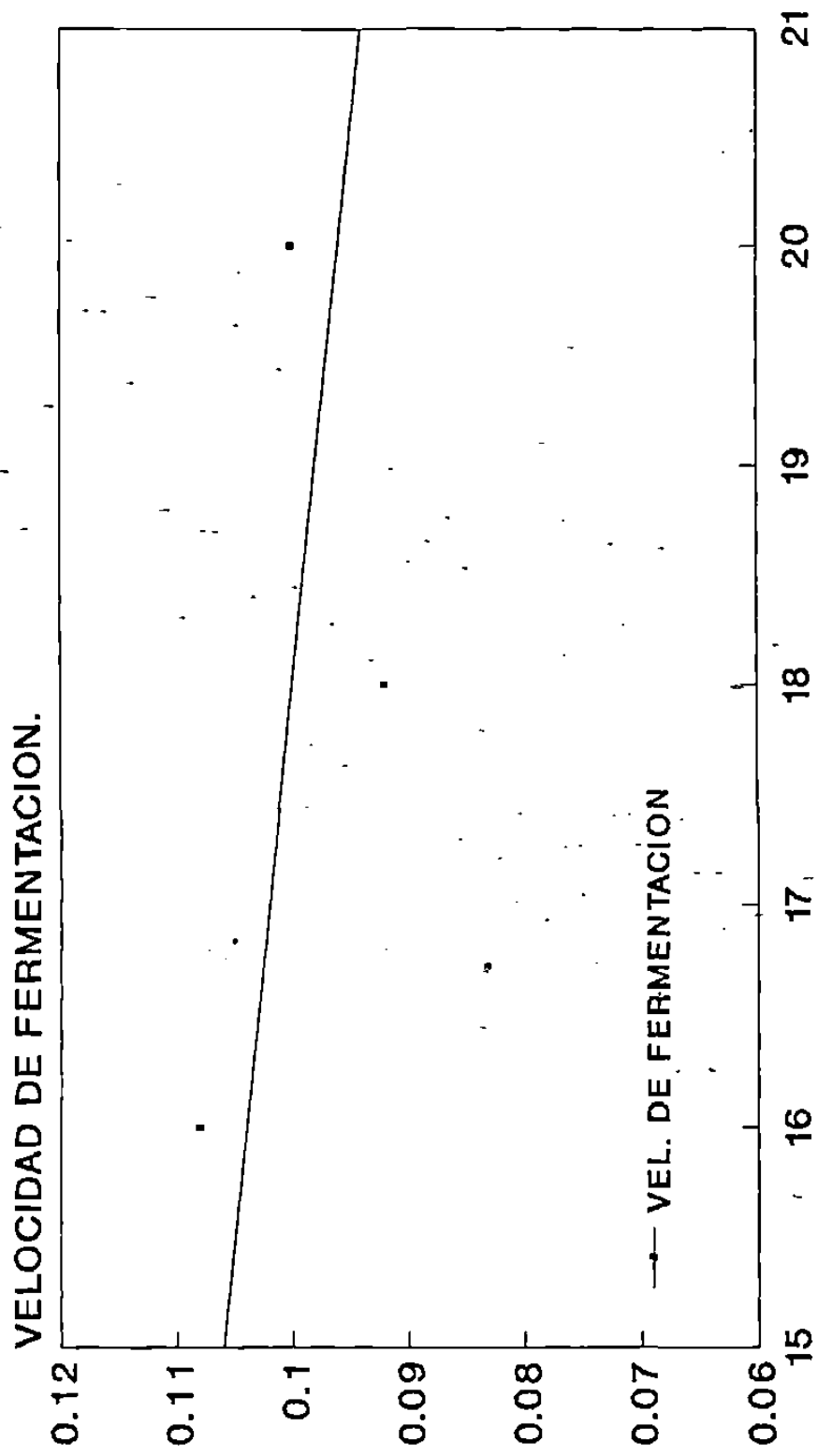
**GRAFICA 9**



**EFECTO DE LA GRAVEDAD DEL MOSTO  
SOBRE LA VELOCIDAD DE FERMENTACION.**

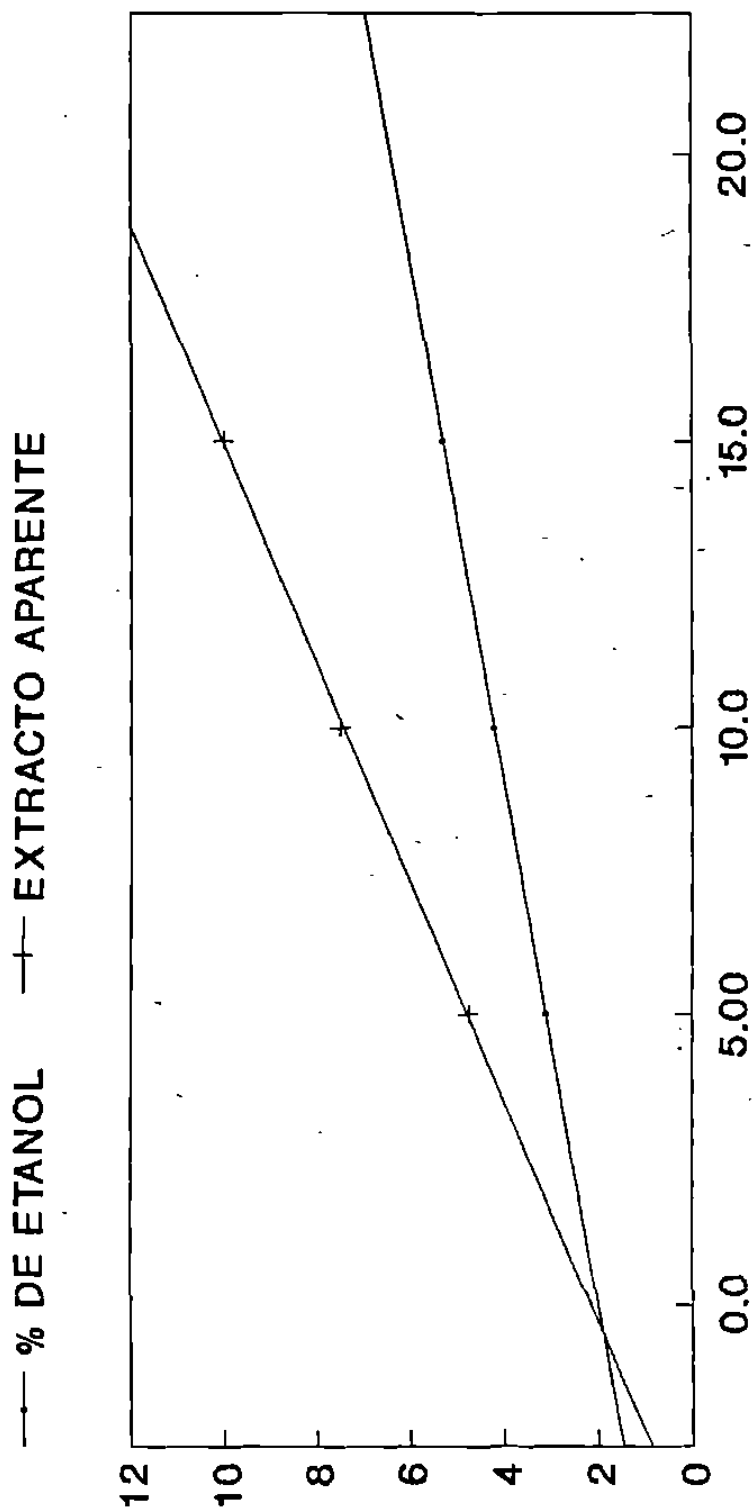


GRAFICA 10



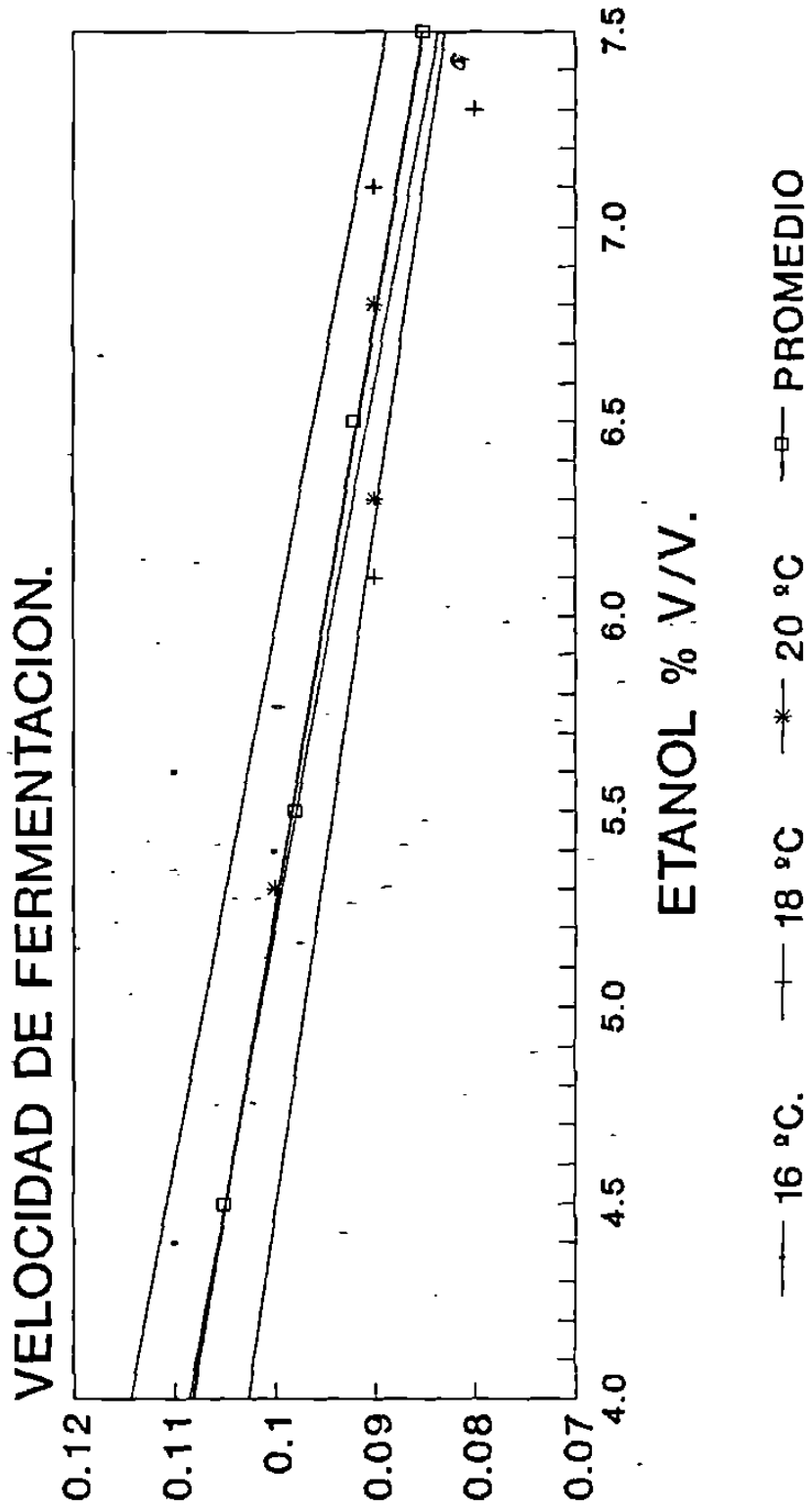
EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA VELOCIDAD DE FERMENTACION.

GRAFICA 11

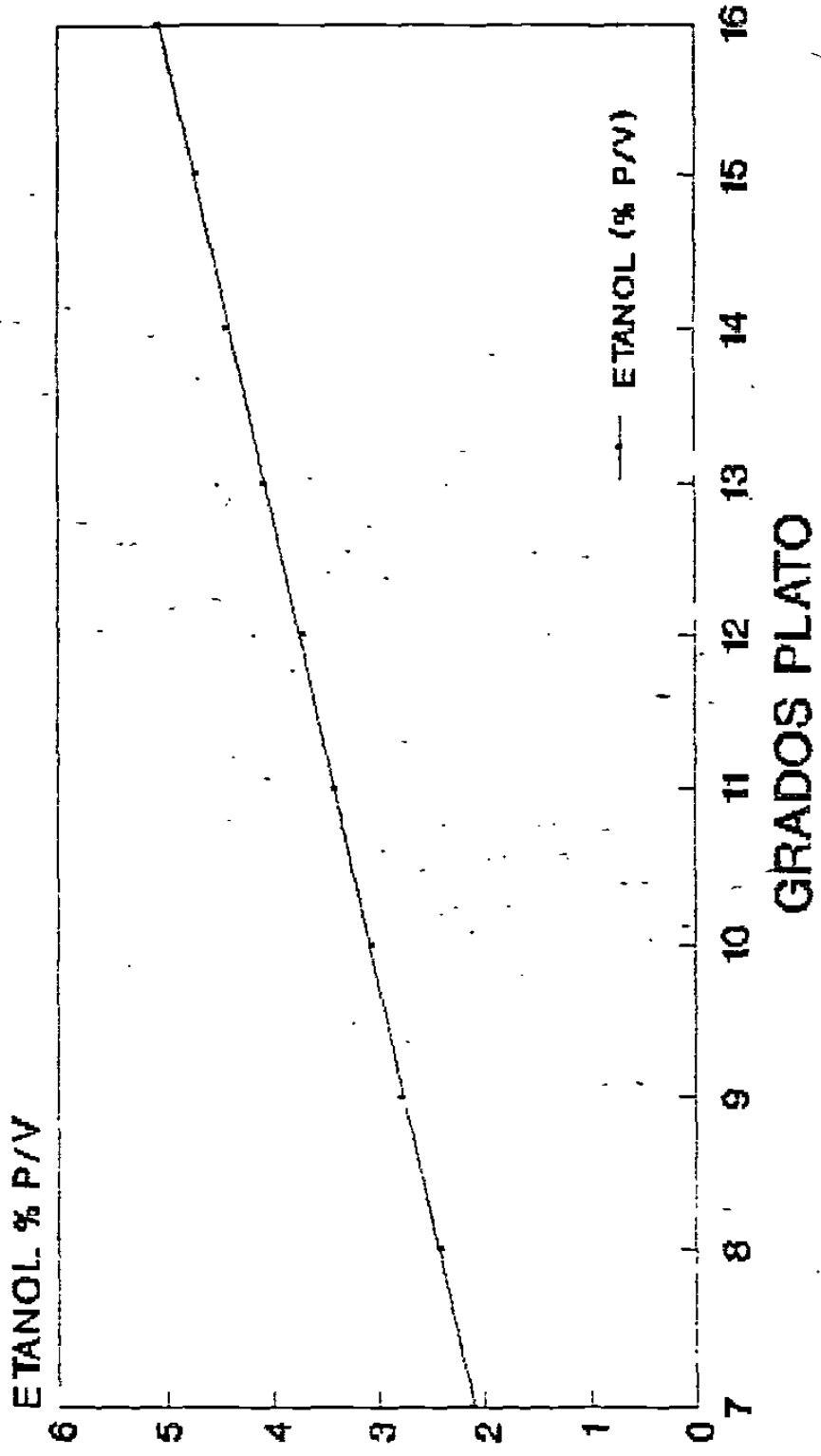


RELACION ENTRE EXTRACTO APARENTE Y % DE  
ETANOL DE LA CERVEZA CON LA GRAVEDAD  
ORIGINAL DEL MOSTO.

GRAFICA 12

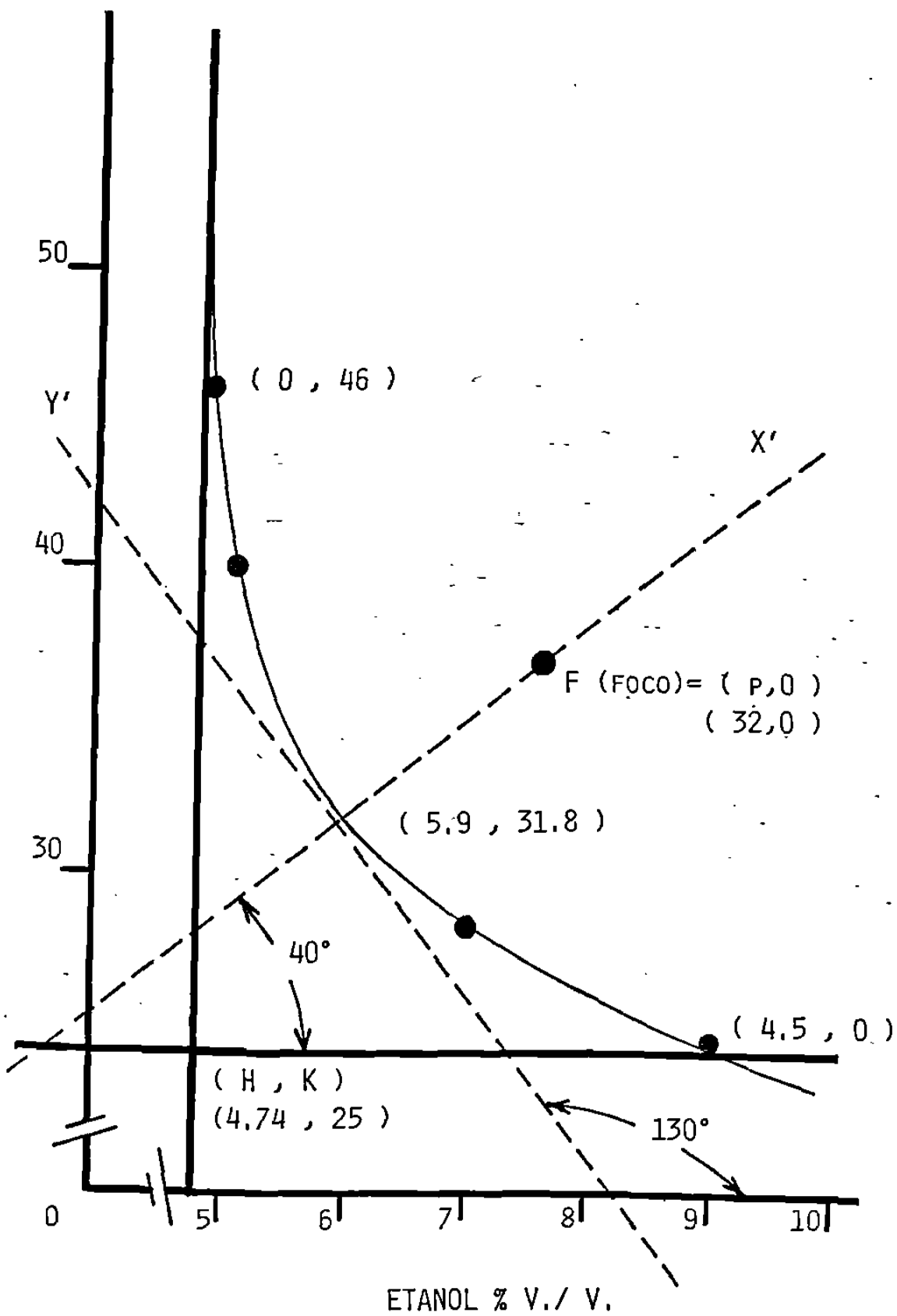


EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE FERMENTACION  
Y LA CONCENTRACION DE ETANOL SOBRE LA  
VELOCIDAD DE FERMENTACION.



RELACION ENTRE LA GRAVEDAD ORIGINAL DEL MOSTO Y LA CONCENTRACION DE ALCOHOL (% P/V ) CONTENIDO EN LA CERVEZA.

GRADO REAL DE FERMENTACION



GRAFICA 14.- EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ETANOL (X) SOBRE EL GRADO REAL DE FERMENTACIÓN (Y) EN UNA REPRESENTACIÓN PARABÓLICA.

