



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**  
**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la**  
**Producción**

“Determinación de parámetros óptimos de temperatura y pH  
para la producción de etanol grado alimenticio utilizando la  
levadura antártica CIBE 12.1-06”

**EXAMEN COMPLEXIVO**

Previo a la obtención del Título de:

**INGENIERO DE ALIMENTOS**

Presentada por:

Katty Zambrano Rosero

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2015

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por darme las fuerzas necesarias.

A mis padres y familiares, quienes me han dado su apoyo incondicional para poder cumplir la meta planteada.

Al Ph.D. Juan Manuel Cevallos, Director del Trabajo Final de Graduación, quien me brindó una ayuda altamente profesional y me guió para la realización del mismo.

Y a todas las personas que de una u otra manera colaboraron para el desarrollo del mismo.

# DEDICATORIA

A MIS PADRES

A MI FAMILIA

A MIS AMISTADES

# TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

---

Ing. Jorge Duque R.  
DECANO DE LA FIMCP  
PRESIDENTE

---

Dr. Juan Manuel Cevallos C., Ph.D.  
DIRECTOR DEL EXAMEN  
COMPLEXIVO

---

M.Sc. Grace Vásquez V.  
VOCAL

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

“La responsabilidad del contenido desarrollado en el presente Examen Complexivo me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

---

Katty Zambrano Rosero

## RESUMEN

En el centro de Investigación Biotecnológica del Ecuador (CIBE) se llevan a cabo investigaciones con microorganismos que viven en otros climas como la Antártida, buscando que al estar adaptados a este tipo de temperaturas extremas puedan llevar a cabo reacciones bioquímicas de interés para la industria.

Dentro de estas investigaciones que lleva adelante el CIBE, se identificó y aisló una levadura, la cual presentó evidencia de fermentación alcohólica. El presente trabajo buscó determinar los parámetros físicos de temperatura y pH, donde el agente estudiado maximiza la producción de CO<sub>2</sub>, y determinar si la fermentación produce alcoholes de grado alimenticio.

La levadura antártica fermentó los azúcares simples a una temperatura óptima inferior a la temperatura ambiente, y a un pH óptimo cercano a la neutralidad produciendo alcoholes de grado alimenticio.

En la primera parte se midió la producción de gas durante la fermentación anaeróbica a diferentes temperaturas. Luego de esto la levadura se sometió a un proceso de fermentación a diferentes valores de pH. Los resultados se sometieron a un análisis estadístico de regresión no lineal para determinar la

temperatura y pH óptimos, finalmente el producto de fermentación se analizó mediante cromatografía gaseosa para determinar la presencia de alcoholes tóxicos.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	ii
ÍNDICE GENERAL .....	iv
ABREVIATURAS .....	viii
SIMBOLOGÍA.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>CAPÍTULO 1</b>	
1. GENERALIDADES.....	4
1.1 Fermentación alcohólica en los alimentos.....	5
1.1.1. Ventajas de los alimentos fermentados.....	5
1.1.2. Sustratos y ciclos fermentativos.....	7
1.1.2.1. Sustratos.....	7
1.1.2.2. Ciclos fermentativos en alimentos.....	15
1.1.2.3. Otros ciclos fermentativos.....	22
1.1.3. Levaduras fermentativas en alimentos.....	24
1.1.3.1. Alimentos fermentados.....	26
1.1.3.2. Microorganismos fermentativos en bebidas.....	34



1.2. Generalidades de CIBE 12.1-06.....	40
1.2.1 Características morfológicas.....	47
1.2.2. Características bioquímicas y moleculares.....	49
1.2.3. Uso en la industria de los alimentos.....	50
1.2.4 Obtención de la cepa CIBE 12.1-06.....	52
1.2.5 Necesidades de investigación, hipótesis y objetivos.....	52

## **CAPÍTULO 2**

2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
2.1 Producción de gas.....	57
2.1.1 Materiales.....	58
2.1.1.1 Materiales aislamiento de la cepa CIBE 12.1-06.....	58
2.1.1.2 Materiales para la generación de gas por fermentación...59	
2.1.2. Métodos.....	60
2.1.2.1 Aislamiento de la cepa CIBE 12.1-06.....	60
2.1.2.2 Generación de gas por fermentación.....	61
2.2. Determinación de temperatura óptima	64
2.2.1. Materiales.....	64
2.2.2. Metodología para determinar la temperatura óptima de crecimiento.....	64
2.3 Determinación de pH óptimo.....	70
2.3.1. Materiales.....	70

2.3.2. Metodología para determinar pH óptimo de crecimiento.....	72
2.4 Determinación de la calidad de alcohol obtenido.....	74
2.4.1. Materiales.....	75
2.4.1.1. Materiales para la destilación de caldo de glucosa.....	75
2.4.1.2. Materiales para preparación de muestra jugo de uva Fermentado.....	76
2.4.1.3. Materiales para la determinación de tipo de alcohol en jugo de uva fermentado.....	77
2.4.1.4. Materiales para la determinación de contenido alcohólico por método volumétrico y gravimétrico en el jugo de uva fermentado.....	78
2.4.2. Métodos.....	79
2.4.2.1. Determinación de la calidad de alcohol en caldo de glucosa.....	79
2.4.2.2. Determinación de la calidad de alcohol en una fermentación de jugo de uva.....	81
<b>CAPÍTULO 3</b>	
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	87
3.1 Temperatura óptima.....	87
3.2 Ph óptimo.....	109
3.3 Calidad de alcohol.....	118

3.3.1 En el destilado de caldo de glucosa.....	118
3.3.2. En el destilado de jugo de uva fermentado.....	120
3.3.3. Determinación de porcentaje de alcohol presente en el jugo fermentado.....	125

## **CAPÍTULO 4**

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	127
--	-----

## **ANEXO 1**

## **BIBLIOGRAFIA**

## ABREVIATURAS

CIBE:	Centro de Investigación Biotecnológica del Ecuador
EMP:	Vía Embden-Meyerhof-Parnas
ADP:	Adenosin difosfato
ATP:	Adenosin trifosfato
NAD <sup>+</sup> :	Nicotinaminadenindinucleotido o Dinucleotido de nicotinamida y adenina forma oxidada
NADH:	Nicotinaminadenindinucleotido o Dinucleotido de nicotinamida y adenina forma reducida
TCA:	Ciclo de los ácidos tricarbónicos
Aw	actividad de agua
PDA:	Potato dextrosa agar
INEN:	Instituto Ecuatoriano de Normalización

## SIMBOLOGÍA

°C:	grado centígrado
μL:	micro litro ( $L * 10^{-06}$ )
ml:	mililitro ( $L * 10^{-03}$ )
cm <sup>3</sup> :	centímetro cubico
MJ:	mega joules ( $J * 10^{06}$ )
kb.:	kilo bases ( $10^3$ bases nitrogenadas)
g.:	gramo
L:	litro
°McFarland:	unidad de turbidez ( $3 * 10^8$ UFC/ml)
$\beta_1$ :	Constante que hace referencia a la pendiente de una recta y tiene como unidad cinética ( $\mu L$ gas/ día)
min.:	minuto
m.:	metro
mm:	milímetro ( $10^{-03}$ m)
rpm:	revoluciones por minuto
R:	factor de correlación
UFC:	unidades formadoras de colonias
HPO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	Fosfato
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
H <sub>2</sub> O	Agua
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Etanol
O <sub>2</sub>	Oxígeno
CH <sub>3</sub> COOH:	Ácido acético
HCL:	Ácido clorhídrico
NaOH:	Hidróxido de sodio
1 N:	Normalidad de la solución
pH:	Potencial de hidrogeno
CH <sub>3</sub> COCOO <sup>-</sup>	Piruvato
CoA	Coenzima A
CH <sub>3</sub> COCoA	Acetil CoA
HCOO <sup>-</sup>	Formiato
H <sub>2</sub>	Hidrogeno
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	Etanol
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	Ácido butanoico
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	Ácido hexanoico

V/V:	volumen/volumen
m/m:	masa/masa
%V:	Porcentaje en volumen

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Esquema Procesos Metabólicos previo a la Glicólisis.....	9
Figura 1.2	Glicólisis.....	12
Figura 1.3	Ciclo de Krebs.....	13
Figura 1.4	Fermentación Alcohólica.....	18
Figura 1.5	Fermentación Láctica.....	20
Figura 1.6	Fermentación Propiónica.....	21
Figura 1.7	Diagrama de Flujo del Proceso de Obtención del Queso Maduro.....	29
Figura 1.8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	34
Figura 1.9	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> .....	35
Figura 1.10	<i>Dekkera anómala</i> .....	36
Figura 1.11	<i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	38
Figura 1.12	<i>Cándida stellata</i> .....	39
Figura 1.13	<i>Saccharomyces bayanus</i> .....	40
Figura 1.14	CIBE 12.1-06.....	47
Figura 2.1	Disposición de tubo campana dentro del caldo de cultivo	63
Figura 2.2	Formación de gas en el caldo con cultivo.....	64
Figura 2.3	Muestras a diferentes temperaturas.....	65
Figura 2.4	Tabla de análisis de varianza y correlación.....	67
Figura 2.5	Matriz modelo para determinar los coeficientes de regresión polinómica .....	68
Figura 2.6	Equipo de destilación .....	80
Figura 2.7	Botellas con jugo fermentado y trampas de gas.....	82
Figura 3.1	µL de gas en caldo de Glucosa a 5°C y pH 3,25.....	90
Figura 3.2	µL de gas en caldo de Glucosa a 10°C y pH 3,25.....	91

Figura 3.3	$\mu\text{L}$ de gas en caldo de Glucosa a 16°C y pH 3,25.....	92
Figura 3.4	$\mu\text{L}$ de gas en caldo de Glucosa a 27°C y pH 3,25.....	93
Figura 3.5	$\mu\text{L}$ de gas en caldo de Glucosa a 5°C y pH 4,66.....	94
Figura 3.6	$\mu\text{L}$ de gas en caldo de Glucosa a 10°C y pH 4,66.....	95
Figura 3.7	$\mu\text{L}$ de gas en caldo de Glucosa a 16°C y pH 4,66.....	96
Figura 3.8	$\mu\text{L}$ de gas en caldo de Glucosa a 25°C y pH 4,66.....	97
Figura 3.9	$\mu\text{L}$ de gas en caldo de Fructosa a 5°C y pH 3,24.....	98
Figura 3.10	$\mu\text{L}$ de gas en caldo de Fructosa a 10°C y pH 3,24.....	99
Figura 3.11	$\mu\text{L}$ de gas en caldo de Fructosa a 16°C y pH 3,24.....	100
Figura 3.12	$\mu\text{L}$ de gas en caldo de Fructosa a 27°C y pH 3,24.....	101
Figura 3.13	$\mu\text{L}$ de gas en caldo de Fructosa a 5°C y pH 4,66.....	102
Figura 3.14	$\mu\text{L}$ de gas en caldo de Fructosa a 10°C y pH 4,66.....	103
Figura 3.15	$\mu\text{L}$ de gas en caldo de Fructosa a 25°C y pH 4,66.....	104
Figura 3.16	$\beta$ ( $\mu\text{L}/\text{día}$ ) vs. Temperatura para Glucosa.....	106
Figura 3.17	$\beta$ ( $\mu\text{L}/\text{día}$ ) vs. Temperatura para Fructosa.....	107
Figura 3.18	$\mu\text{L}$ vs. Día con pH 3,18 .....	111
Figura 3.19	$\mu\text{L}$ vs. Día con pH 4,14 .....	112
Figura 3.20	$\mu\text{L}$ vs. Día con pH 5,09 .....	113
Figura 3.21	$\mu\text{L}$ vs. Día con pH 6,8.....	114
Figura 3.22	$\beta$ ( $\mu\text{L}/\text{día}$ ) vs. pH en caldo de Glucosa a 20°C.....	116
Figura 3.23	Cromatografía del destilado de caldo de glucosa Fermentado.....	123
Figura 3.24	Cromatografía del destilado de jugo de uva fermentado.	124



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Esquema de las principales fermentaciones usadas en la Industria de los alimentos.....	16
Tabla 2	Esquema de otros ciclos fermentativos.....	22
Tabla 3	Aplicaciones industriales de fermentaciones alimentarias.....	25
Tabla 4	Clasificación del genero <i>Cándida sake</i> .....	48
Tabla 5	Capacidad fermentativa de <i>C. sake</i> en diferentes azucares...	49
Tabla 6	Ensayo de crecimiento de <i>C. sake</i> a diferentes temperaturas	49
Tabla 7	Características bioquímicas de la especie <i>C. sake</i> .....	50
Tabla 8	Micro litros de gas generados en caldo de Glucosa.....	88
Tabla 9	Micro litros de gas generados en caldo de Fructosa.....	89
Tabla 10	Análisis de varianza y correlación de la fermentación Glucosa 5°C y pH 3,25.....	90
Tabla 11	Análisis de varianza y correlación de la fermentación Glucosa 10°C y pH 3,25.....	91
Tabla 12	Análisis de varianza y correlación de la fermentación Glucosa 16°C y pH 3,25.....	92
Tabla 13	Análisis de varianza y correlación de la fermentación Glucosa 27°C y pH 3,25.....	93
Tabla 14	Análisis de varianza y correlación de la fermentación Glucosa 5°C y pH 4,66.....	94
Tabla 15	Análisis de varianza y correlación de la fermentación Glucosa 10°C y pH 4,66.....	95
Tabla 16	Análisis de varianza y correlación de la fermentación Glucosa 16°C y pH 4,66.....	96
Tabla 17	Análisis de varianza y correlación de la fermentación Glucosa 25°C y pH 4,66.....	97

Tabla 18	Análisis de varianza y correlación de la fermentación Fructosa 5°C y pH 3,24.....	98
Tabla 19	Análisis de varianza y correlación de la fermentación Fructosa 10°C y pH 3,24.....	99
Tabla 20	Análisis de varianza y correlación de la fermentación Fructosa 16°C y pH 3,24.....	100
Tabla 21	Análisis de varianza y correlación de la fermentación Fructosa 27°C y pH 3,24.....	101
Tabla 22	Análisis de varianza y correlación de la fermentación Fructosa 5°C y pH 4,66.....	102
Tabla 23	Análisis de varianza y correlación de la fermentación Fructosa 10°C y pH 4,66.....	103
Tabla 24	Análisis de varianza y correlación de la fermentación Fructosa 25°C y pH 4,66.....	104
Tabla 25	Constantes de modelos lineales $\beta$ ( $\mu\text{L}/\text{día}$ ) a varias Temperaturas.....	105
Tabla 26	Determinación de correlación de $\beta$ ( $\mu\text{L}/\text{día}$ ) vs. Temperatura para Glucosa.....	106
Tabla 27	Determinación de correlación de $\beta$ ( $\mu\text{L}/\text{día}$ ) vs. Temperatura para Fructosa.....	107
Tabla 28	Temperaturas donde se maximiza y minimiza la producción de gas en glucosa.....	108
Tabla 29	Temperaturas donde se maximiza y minimiza la producción de gas en fructosa.....	109
Tabla 30	Micro litros de gas generados en caldo de Glucosa a 20°C y diferentes pH.....	110
Tabla 31	Análisis de varianza y correlación de la fermentación a 20°C y 3,18 pH .....	111
Tabla 32	Análisis de varianza y correlación de la fermentación a	

	20°C y 4,14 pH .....	112
Tabla 33	Análisis de varianza y correlación de la fermentación a 20°C y 5,09 pH .....	113
Tabla 34	Análisis de varianza y correlación de la fermentación a 20°C y 6,8 pH .....	114
Tabla 35	Constante $\beta$ ( $\mu\text{L gas/día}$ ) de los modelos lineales a 20°C y diferentes pH.....	115
Tabla 36	Determinación de correlación de pH vs. $\beta$ ( $\mu\text{L/día}$ ) para Glucosa.....	116
Tabla 37	pH donde se maximiza y minimiza la producción de gas en glucosa.....	118
Tabla 38	Compuestos encontrados por cromatografía de gases en el destilado de caldo de cultivo de glucosa.....	119
Tabla 39	Compuestos encontrados por cromatografía de gases en el destilado del jugo de uva fermentado.....	121

# INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la industria de las bebidas alcohólicas, está encaminado a la identificación de nuevas cepas que aporten mejoras al desempeño de los procesos o mejores características a los productos sometidos a la fermentación alcohólica. De allí, que la identificación y caracterización de los microorganismos identificados que posean esta característica bioquímica es el primer paso de esta empresa.

La dinámica entre los parámetros de proceso, características del sustrato, la actividad del microorganismo sobre este sistema (proceso –sustrato), aportan determinadas características finales al producto; el sistema completo es complejo, desde el punto de vista de cuantas variables se tienen que controlar para obtener una mejora.

El sistema completo aportará una mejora a la industria, cuando toda la interacción de sus partes sea compatible con la ganancia de características deseadas del producto final, y los parámetros de proceso sean competitivos en la industria,

Dentro de este marco, en el que se busca identificar posibles mejoras a la industria de bebidas se han observado el comportamiento de dos parámetros que afectan directamente, tanto al proceso, como la actividad del

microorganismo estudiado, así como una de las características aportadas a un producto final en función de los parámetros que se determinen como “mejora”.

Para el efecto, el presente trabajo consta de 4 capítulos que abarcan sistemáticamente el marco teórico, la metodología a seguir para alcanzar el propósito mencionado para finalmente mostrar los resultados obtenidos seguidos de la discusión de los mismos.

En el capítulo 1 se describe el uso de la fermentación en la industria de los alimentos, el fundamento teórico de la respiración celular, y los diferentes tipos de sustrato y microorganismos usados. Además se enuncia las características del microorganismo CIBE 12.1 – 06, que es el centro del enfoque en el presente trabajo.

En el capítulo 2 se enunciarán los materiales y métodos a seguir en las diferentes etapas del proceso de experimentación que busca identificar la temperatura y pH, donde el microorganismo estudiado ejerce una mejor actividad fermentativa sobre el sustrato; esto sería caracterizando su actividad bioquímica sobre un sustrato conocido, mediante la aplicación de una regresión lineal y polinómica sobre un conjunto de datos que asocian generación de gas con el tiempo; además de determinar el tipo de alcohol

que se obtiene de esta actividad bioquímica bajo los parámetros de temperatura y pH identificados como “mejoras”.

En el capítulo 3 se expondrán y analizarán los resultados que se obtuvieron a partir de las metodologías propuestas en las diferentes etapas de experimentación.

Finalmente en el capítulo 4 se enlistan las respectivas conclusiones, observaciones y recomendaciones asociadas al presente trabajo.

# CAPÍTULO 1

## 1. GENERALIDADES

La humanidad emplea la fermentación alcohólica desde tiempos inmemoriales para la elaboración de cerveza (empleando cereales) y del vino (empleando el fruto de la vid: la uva en forma de mosto) fundamentalmente. Algunos procesos similares como el de la destilación alcohólica ya surgen en el año 1150 de la mano de Arnau de Vilanova (1).

Otro proceso del cual se tiene un registro más antiguo es la elaboración de pan en el antiguo Egipto, donde también interviene un proceso de leudamiento de la masa con una fermentación alcohólica de por medio (2)(3).

## **1.1. Fermentación Alcohólica en los Alimentos**

### **1.1.1. Ventajas de los alimentos fermentados**

El principio para el uso de la fermentación en los alimentos es que la materia prima en bruto, que en el caso de los alimentos contienen proteínas, carbohidratos y lípidos y que provienen de diferentes tipos de cultivos y animales, por medio del uso de agentes biológicos sean estos: bacteria, mohos o levaduras y con ello el empleo del equipo enzimático que estos organismos aportan, lleve a la obtención de un nuevo producto con nueva y mejoradas características organolépticas en sabor, textura, presentación e incluso efecto en la salud del consumidor o beneficios a partir del consumo de los mismos.

Entre los beneficios que aporta la fermentación en los alimentos se pueden nombrar algunos:

- Preservación de los alimentos, alarga su vida útil (6).
- Inhibición de patógenos (7).
- Inhibición de organismos indeseados.
- La fermentación siempre supone la descomposición de nutrientes en partes más sencillas que el organismo asimila mejor (38).



- Produce vitaminas, sobretodo del grupo B y C, incluso B12 (7).
- La fermentación destruye parte del ácido fítico de la corteza de los cereales, el cual impide la absorción de calcio, hierro y cinc (sobre todo la fermentación con levadura madre) (39).
- Se trata de una pre-digestión al igual que ocurre con la germinación. Los cereales y las leguminosas son alimentos concentrados de proteínas e hidratos de carbono complejos que deben ser sometidos a largos tiempos de cocción para poder ser asimilados. La fermentación y la germinación facilitan su digestión y aportan beneficios que no se puede obtener por métodos de cocción.
- Restauran y conservan la flora intestinal. Impiden el crecimiento de microorganismos patógenos y sus toxinas (40).
- Ayudan a la conservación de los alimentos, permitiendo que se conserven más tiempo (3).
- Los alimentos que han sido sometidos a fermentación láctica ayudan a la digestión de otros alimentos con los que se ingieren (7).
- Depurativos y alcalinizantes (aportan muchos minerales) (3)(41).

## **1.1.2. Sustratos y Ciclos fermentativos**

### **1.1.2.1. Sustratos**

Las sustancias que consume la levadura, con el fin de obtener energía a través de las diferentes rutas metabólicas, se obtienen a través de la hidrólisis de la materia orgánica donde reside el microorganismo, estas sustancias difunden al citosol a través de la pared celular.

Las sustancias que atraviesan la membrana plasmática fácilmente son liposolubles y lo hacen más lentamente si son hidrosolubles. Existen tres métodos de acceso: Difusión simple o transporte pasivo (la de los ácidos orgánicos no disociados), esta depende de un gradiente de concentración, el cual difunde de una concentración mayor a una concentración menor; difusión catalizada o transporte activo (como sucede con los azúcares y aminoácidos), el cual consume energía cuando una sustancia se mueve en contra de su gradiente de concentración además de la participación de enzimas específicas, permeasas; inclusión de sustancias a través de vesículas membranosas por el mecanismo de endocitosis o expelidas por la exocitosis, mecanismo que conlleva un gasto de energía en el proceso (4).

Una vez en el interior de la célula, el consumo de las sustancias por la levadura es secuencial y lógica; iniciando con las moléculas más simples como los azúcares, ya que pueden ingresar a la vía metabólica de forma inmediata, moléculas que necesiten algún “trabajo extra” en el caso de los disacáridos y polisacáridos como la maltosa y la maltotriosa, estas moléculas serán consumidas una vez que se lleve a cabo la hidrólisis correspondiente, hasta la reducción a moléculas de glucosa mediante el uso del equipo enzimático de la levadura y de esta manera pueda ingresar a la vía metabólica (1).

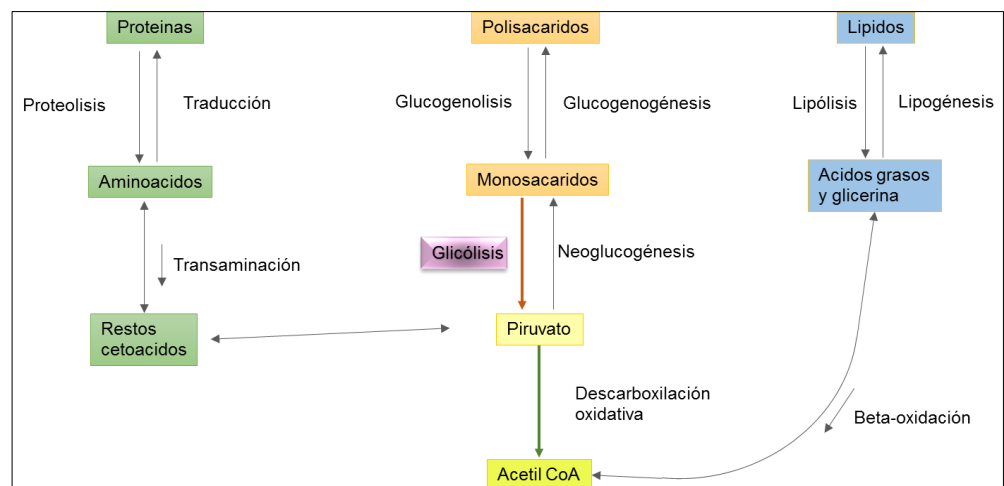
Los aminoácidos se absorben secuencialmente, primero un grupo del que forma parte el glutanato, la asparagina y la serina; luego otro en el que se encuentran la histidina y la leucina, y finalmente, tras un apreciable retraso, los pertenecientes a un tercer grupo en el que se hallan la glicocola y el triptófano (1).

### ***Respiración celular aeróbica***

Los mecanismos para obtener energía no varían en esencia, ya que los microorganismos deben degradar la materia orgánica disponible mediante reacciones bioquímicas a través del equipo enzimático que cada uno conlleva, y así una vez disponibles estas estructuras

“simples”, pueden entrar a los ciclos metabólicos para la obtención de energía necesaria para el microorganismo.

La materia orgánica que se interesa analizar proviene de los alimentos, sean estos de origen animal o vegetal, la composición básica de estos son en esencia carbohidratos, lípidos y proteínas. Cada uno de estos sustratos hasta ser hidrolizados a su forma más simple, cada uno de ellos por medio de una ruta bioquímica diferente, una vez que se obtienen las estructuras simples pueden hacer uso de la ruta bioquímica de respiración celular (5).



Fuente: (5 Bioquímica de los procesos metabólicos)

**FIGURA 1.1 ESQUEMA PROCESOS METABÓLICOS PREVIO A LA GLICOLISIS**

El recurso energético principal en los diferentes organismos es el monosacárido glucosa, que en organismos de origen animal se almacena como glucógeno y en organismos de origen vegetal se almacena como almidón. Esta molécula “simple” que se obtuvo por hidrólisis a partir de materia orgánica compleja, finalmente entra a una ruta metabólica llamada glicólisis (significa disolución del azúcar) o también conocida como la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) en honor a los científicos alemanes que la describieron por primera vez (5).

La glicólisis consta de diez reacciones y cada una de estas es catalizada por una enzima específica (FIGURA 1.2), dentro de estas reacciones el ciclo ADP - ATP sirve como un intermediario común en la transferencia del grupo fosforilo y la pareja redox  $\text{NAD}^+$  /  $\text{NADH}$  es un intermediario común de óxido-reducción; el fin de estas reacciones secuenciales es degradar la glucosa a piruvato (4).

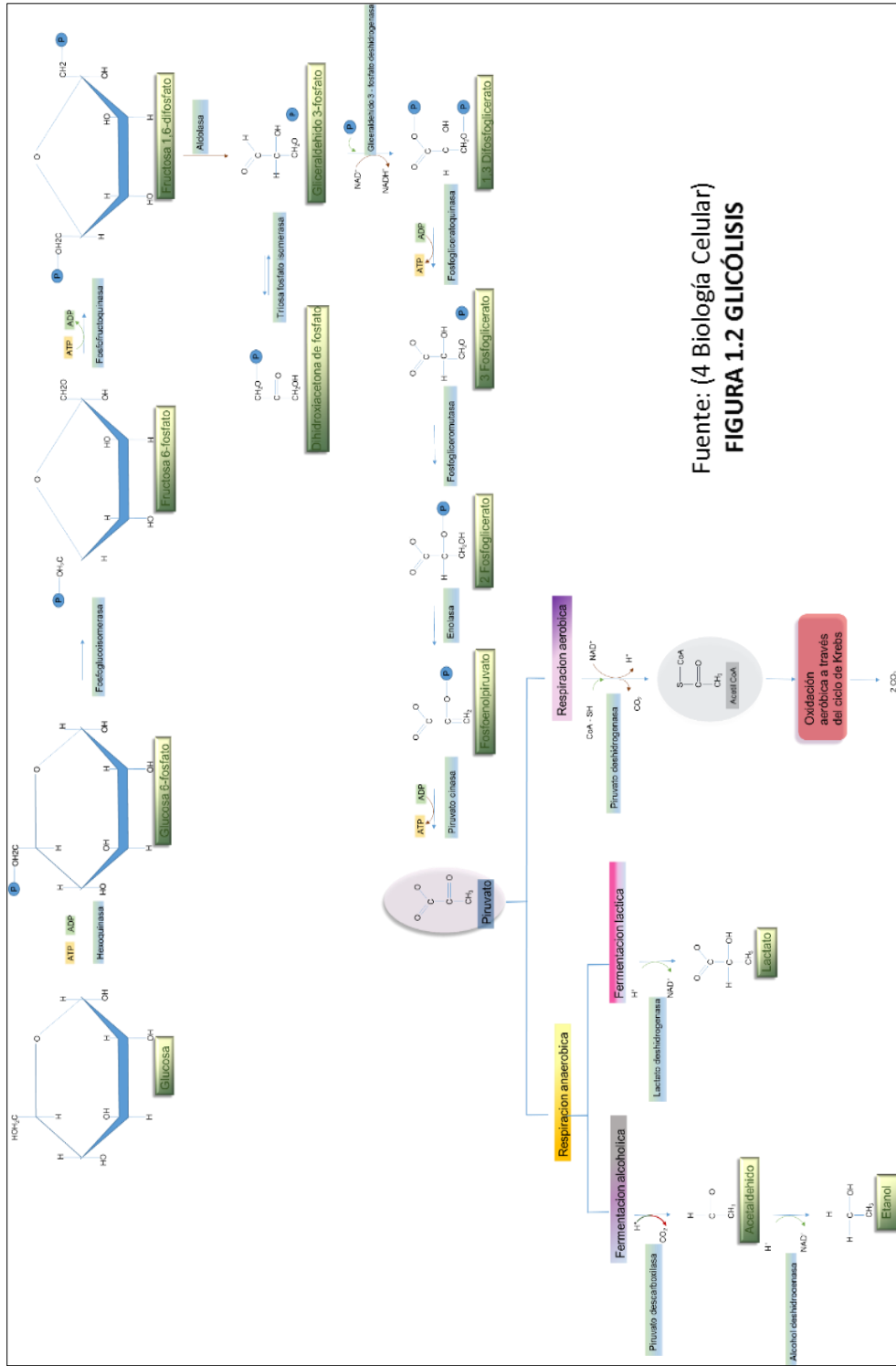
La glicólisis ocurre en 2 etapas. En la primera etapa la glucosa es fosforilada dos veces para esto se usan 2 moléculas de ATP y luego escinde en dos moléculas de fosfato triosa. En la segunda etapa cada molécula de fosfato triosa acepta fosfato inorgánico, ambas moléculas se procesa en la misma vía de reacción, y al final de esta

vía de reacción se forma el piruvato con la consecuente generación de 2 moléculas de ATP por cada molécula de piruvato generada. Así, aun cuando se formaran 4 moléculas de ATP al final de la glicólisis, la producción neta es de 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa (4).

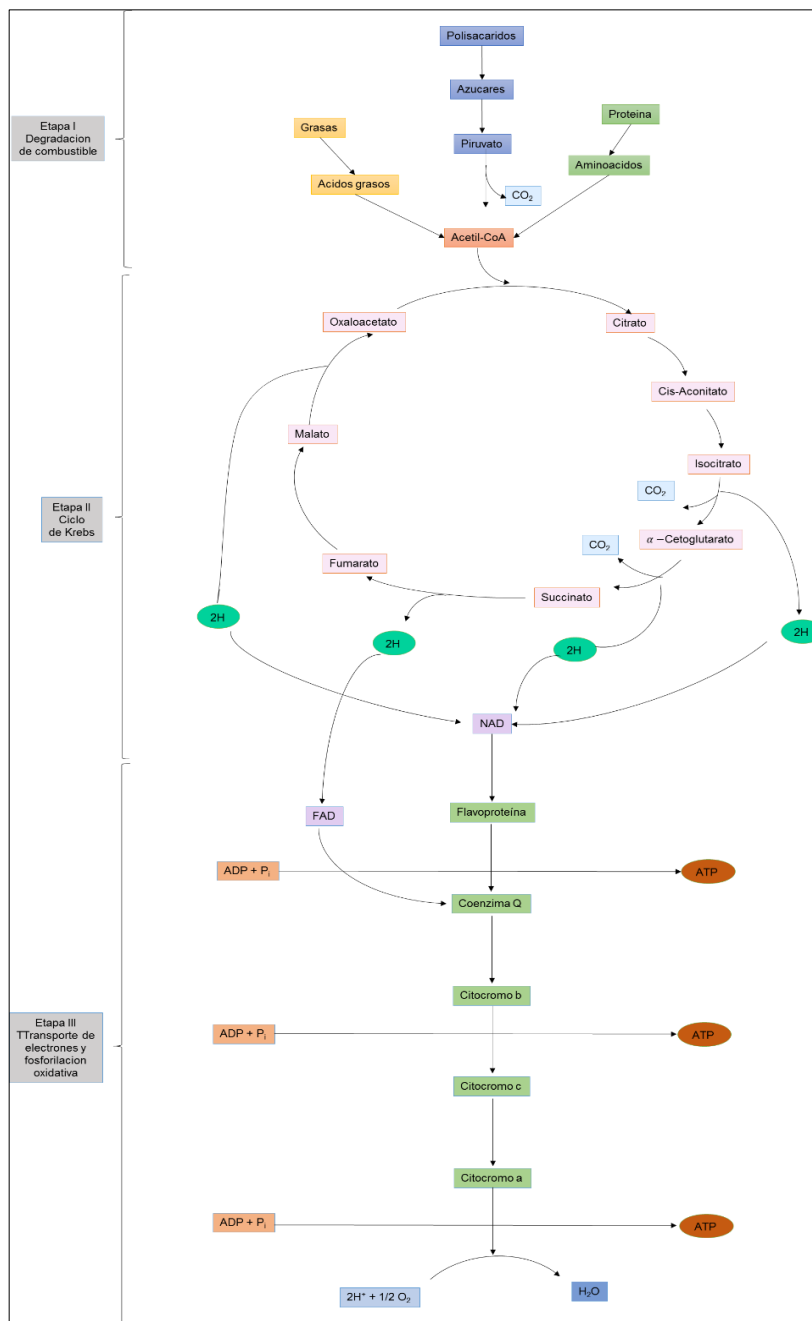
El piruvato constituye una encrucijada metabólica, ya que en condiciones anaeróbicas forma etanol o lactato, en cambio en condiciones aeróbicas el piruvato a través de la piruvato deshidrogenasa forma Acetil CoA y esta molécula entra al ciclo de Krebs (FIGURA 1.2) (1)(4).

En un metabolismo plenamente aeróbico, ninguna de las dos moléculas de piruvato se transforma en etanol; su producto fundamental es Acetil CoA, para alimentar el ciclo de Krebs también llamado ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) o ciclo del ácido cítrico (1).

Aunque la complejidad del ciclo de Krebs se ve dificultada por la síntesis de aminoácidos, la mayor parte del material que participa en una secuencia de ácidos orgánicos tetracarbonados, hasta que el ciclo se reinicie (FIGURA 1.3). Lo importante no es el desprendimiento de dos moléculas de dióxido de carbono, sino la



Fuente: (4 Biología Celular)  
**FIGURA 1.2 GLICÓLISIS**



Fuente: (4 Biología Celular)

**FIGURA 1.3 CICLO DE KREBS**



liberación de energía. Estas reacciones tienen lugar en las mitocondrias y liberan hidrogeniones que, con la participación de coenzimas como la nicotinadeninucleótido (NAD) y los componentes de la cadena respiratoria, terminan siendo oxidados por el oxígeno molecular.

La ruta oxidativa es compleja y en ella participan entre otras sustancias los citocromos, en cuya composición interviene el hierro. En la oxidación, se libera energía que es eficazmente captada para la síntesis de ATP. La oxidación (respiración) de una molécula de glucosa por la levadura genera 28 moléculas de ATP (2 en la ruta de EMP, otras 2 directamente en el ciclo TCA y 24 en la oxidación terminal del NADH y compuestos similares), que pueden ser utilizadas para los procesos biosintéticos y el mantenimiento de la célula. Una molécula de glucosa, al ser químicamente oxidada proporciona 2,9 MJ. Las 28 moléculas de ATP tienen una equivalencia energética de solo 0,854 MJ, por tanto, sólo se aprovecha un 29% de la energía total, el resto se disipa en forma de calor (1).

El metabolismo aeróbico es mucho más eficaz en términos energéticos que el anaeróbico. Requiere, menos glucosa para

satisfacer las necesidades de desarrollo y el mantenimiento del organismo (1).

No toda la glucosa se metaboliza por la ruta EMP, parte lo hace por una vía diferente, la ruta del monofosfato de hexosa, que no sólo libera energía sino que produce también pentosas, importantes para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos. Algunas levaduras, como la *Cándida utilis* (la especie utilizada para la producción de biomasa para uso alimenticio), usan más eficazmente esta ruta que la levadura de cerveza y pueden desarrollarse sobre pentosas, tan eficazmente como sobre hexosas (1).

### **1.1.2.2 Ciclos fermentativos en alimentos**

En la industria de alimentos los tipos de fermentaciones más usadas son: fermentación alcohólica y fermentación láctica. En la tabla se mencionan otras fermentaciones que también se puede encontrar en el ambiente industrial.

**TABLA 1**  
**ESQUEMA DE LAS PRINCIPALES FERMENTACIONES USADAS**  
**EN LA INDUSTRIA DE LOS ALIMENTOS**

<i>Fermentación alcohólica</i>	
$C_6H_{12}O_6 + 2 ADP + 2 H_3PO_4 \Rightarrow 2 H_3C-CH_2OH + 2 CO_2 + 2 ATP + 2 H_2O$	
<i>Fermentación homoláctica</i>	
$H_3C-CO-COOH$ Piruvato	$\Rightarrow$ (Lactato deshidrogenasa)
$H_3C-CHOH-COOH$ Ácido láctico	
<i>Fermentación heteroláctica</i>	
Hexosa	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> <math>\begin{array}{l} \rightarrow \\ \rightarrow \end{array}</math> </div> <div style="margin-right: 10px;"> <math>\begin{array}{l} \rightarrow \\ \rightarrow \end{array}</math> </div> <div> <math>\begin{array}{l} \text{Piruvato} \Rightarrow \text{Ácido láctico} \\ \text{Acetaldehído} \Rightarrow \text{Etanol} \end{array}</math> </div> </div>
<i>Propiónica</i>	
$\text{Ácido láctico} \Rightarrow \text{Piruvato}$	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"><math>\rightarrow</math></div> <div style="margin-right: 10px;"><math>\rightarrow</math></div> <div> <math>\begin{array}{l} \text{Ácido propiónico} \\ \text{Ácido acético} + CO_2 \end{array}</math> </div> </div>
<i>Acética</i>	
$\text{Etanol} + O_2 \Rightarrow \text{ácido acético} + H_2O$	
<i>Maloláctica</i>	
$\text{Ácido málico}$	$\Rightarrow$
$\text{Ácido láctico}$ Málico deshidrogenasa	

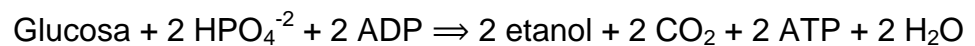
Elaborado por: Kattya Zambrano, 2014

Fuente:(6 Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos).

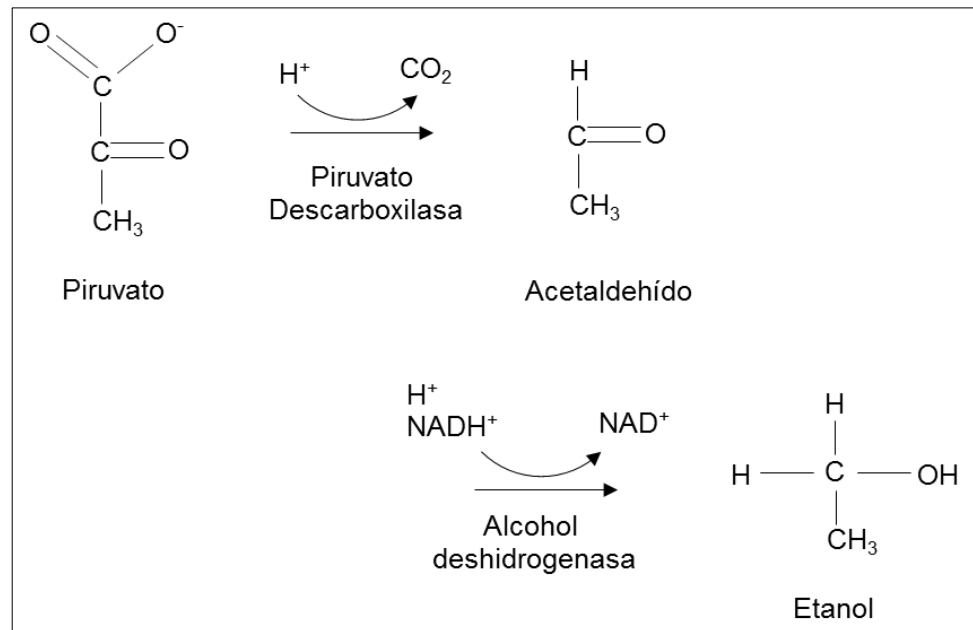
### ***Fermentación alcohólica***

En las levaduras y otros microorganismos, el piruvato en condiciones anaerobias se descarboxila en una reacción, y el intermediario se reduce a etanol en el segundo paso de la secuencia. Cada uno de estos pasos es catalizado por una enzima específica.

La conversión de glucosa en etanol es un proceso anaeróbico llamado fermentación alcohólica. La reacción neta de este proceso es:



La fermentación alcohólica es un proceso biológico de importancia considerable en la industria cervecera y la del pan. La producción de alcohol es la característica deseada para las levaduras usadas en la producción de cerveza, vino y licor; el CO<sub>2</sub> es el producto final de las levaduras utilizadas para la elaboración del pan (4).

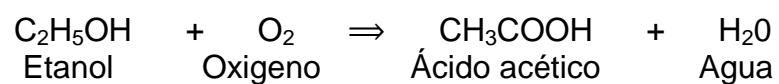


Fuente: (4 Biología Celular)

### FIGURA 1.4 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

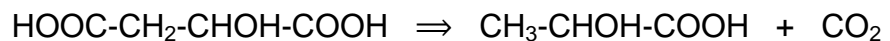
#### ***Fermentación acética***

En algunos casos como ocurre con las bacterias del género *Acetobacter* también conocidas como bacterias acéticas, se presenta la fermentación acética donde el etanol en presencia del oxígeno a través de la acción de las bacterias genera ácido acético y agua (12).



### ***Fermentación maloláctica***

Otro proceso fermentativo que se presenta principalmente en la pulpa de frutas es la fermentación maloláctica o conversión maloláctica, en este proceso el ácido málico se transforma en ácido láctico por medio de bacterias de origen láctico. Las bacterias que son capaces de generar este tipo de fermentación son las del género *Leuconostoc*, se alimentan del ácido málico (ácido dicarboxílico) y generan ácido láctico (ácido monocarboxílico) por medio de la acción de la enzima málico deshidrogenasa (6)(14).

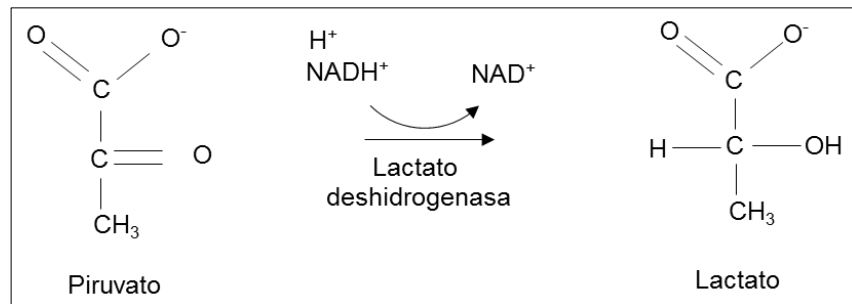


### ***Fermentación láctica***

La conversión del piruvato en lactato es catalizada por la lactato deshidrogenasa en muchos microorganismos y en las células de los organismos superiores, en condiciones relativamente anaeróbicas. El piruvato es reducido por el NADH, la coenzima de la deshidrogenasa, para formar lactato.

La reacción neta de la conversión de la glucosa en lactato durante el proceso anaeróbico de fermentación del ácido láctico es:





Fuente (4 Biología Celular)

### FIGURA 1.5 FERMENTACIÓN LÁCTICA

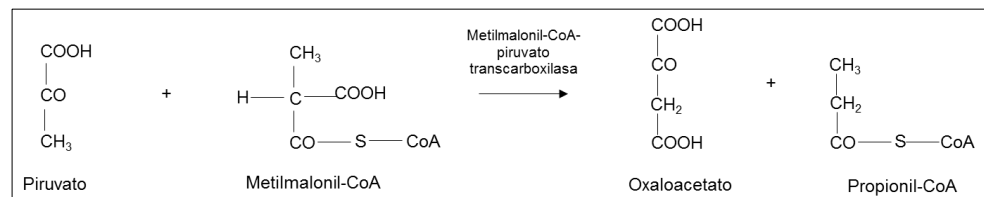
#### ***Fermentación propiónica***

La fermentación propiónica, se produce partiendo de la glucosa, sacarosa, lactosa e incluso ácido láctico o málico y así generar ácido propiónico bacterias que pueden realizar este tipo de fermentación son el *Clostridium propionicum* o *Bacteroides ruminicola* (10).

En la industria de alimentos este tipo de fermentación se observa en la fabricación de quesos Emmenthal, la producción de gas que genera este tipo de fermentación es la responsable de los “ojos” del queso. Los estudios taxonómicos de Van Niel permitieron definir el género *Propionibacterium* este género incluye todas las bacterias del grupo propiónico; estas bacterias están formadas por una familia de bacterias corineformes dentro de los bacilos gram positivos no esporógenos y tienen un perfil intermedio entre el grupo láctico, las

con bacterias y los actinomicetos. Los miembros del género *Propionibacterium* son anaerobios facultativos, ya que se desarrollan en medio anaerobio pero tolera la presencia del aire.

La diferencia bioquímica con respecto a las bacterias del ácido láctico, es la capacidad de usar el ácido láctico como sustrato (13).



**Fuente:** (13 Bioquímica de los microorganismos)

### FIGURA 1.6 FERMENTACIÓN PROPIÓNICA

La vía bioquímica que sigue el ácido láctico para formar ácido propiónico depende del tipo de microorganismo, en el caso de *Propionibacterium* y *Veillonella* además del ácido propiónico forma acetato, succinato y dióxido de carbono. En el caso del *Clostridium propiónicum* y *Megasphaera elsdenii* forma el ácido propiónico, acetato y dióxido de carbono dentro de los productos finales no se encuentra succinato (13).



### 1.1.2.3. Otros ciclos fermentativos

Existen otros ciclos fermentativos que pueden generar alteración o incluso producción de toxinas dentro de la industria de alimentos a continuación se describirá que tipo de reacción y que tipo de metabolitos genera.

**TABLA 2**

#### **ESQUEMA DE OTROS CICLOS FERMENTATIVOS**

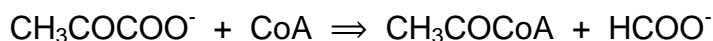
Acido mixta (fórmica)
Acetil CoA $\Rightarrow$ Ac. Fórmico (CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> ) + Etanol + Ac. Acético
Butanodiólica - acetoínica
Acido pirúvico $\Rightarrow$ Acetoína + Butanodiol
Butírica
Acetil CoA $\Rightarrow$ Ac. Acetoacético + butanol + acetona + Isopropanol +CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub>

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

Fuente: (9 CNTA Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria).

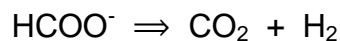
#### ***Fermentación ácido-mixta o fórmica***

Entre otras fermentaciones dentro de la respiración celular tiene la fermentación fórmica o acido mixta, existen géneros de la familia *Enterobacteriaceae* que además de producir ácido fórmico, elaboran otra serie de ácidos entre los grupos de fermentación además de gases y productos intermedios (10).



La característica de esta fermentación es la escisión del ácido pirúvico de la cual se obtiene ácido fórmico.

El ácido fórmico es un producto final mayoritario en esta fermentación, pero no se acumula debido a que algunas bacterias poseen la enzima hidrogenoliasa fórmica, que a su vez vuelve a escindir la molécula de ácido fórmico en dióxido de carbono e hidrogeno; la hidrogenoliasa fórmica se compone de dos enzimas: la deshidrogenasa fórmica y la hidrogenasa.



La formación de hidrógeno molecular como producto final de la fermentación de azúcares, es también característica de muchos endoesporulados de los géneros *Clostridium* y *Bacillus*. Sin embargo el mecanismo bioquímico es diferente, el hidrógeno se forma como producto directo de la escisión del ácido pirúvico (11).

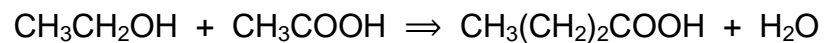
### ***Fermentación butanodiólica o acetoínica***

La fermentación butilenglicólica a partir del piruvato forma acetoina (acetil-metil-carbinol), es la base de la reacción Voges-Proskauer. Esta fermentación la presenta ciertas enterobacterias como

*Enterobacter*, *Serratia*, y *Klebsiella* también géneros como *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Vibrio* y *Aeromonas* (10).

### **Fermentación butírica**

La fermentación butírica es la conversión de los azúcares en ácido butírico por acción de bacterias de la especie *Clostridium* en ausencia de oxígeno, por ejemplo, el *Clostridio kluyveri* crece en una mezcla de etano y acetato como recurso de energía, y los grupos orgánicos de fermentación son el butirato y caproato además de la producción de hidrógeno. Las reacciones que representan la síntesis de estos ácidos grasos son (11):



### **1.1.3. Levaduras fermentativas en alimentos**

La acción de las levaduras sobre los alimentos produce un cambio en la composición de los mismos, este cambio es recomendable por los beneficios que produce: ya sea que diversifique los recursos alimenticios mediante la mejora de sus propiedades nutritivas y sensoriales, o permitir el uso prolongado de materias primas que inicialmente son más perecederas en comparación una vez que son transformadas por la acción de las mismas levaduras (6).

La fermentación de los alimentos aun en estos días sigue siendo utilizada por la industria alimentaria; es por eso que a través de la historia y junto al uso de técnicas biotecnológicas modernas, en la actualidad se ha identificado los microorganismos específicos que aportan características deseables a la materia prima sobre la cual actúa.

**TABLA 3**  
**APLICACIONES INDUSTRIALES DE FERMENTACIONES**  
**ALIMENTARIAS**

<i>Microorganismos</i>	<i>Materias primas</i>	<i>Alimentos fermentados</i>	
<i>Bacterias ácido lácticas.</i>	Carnes	Embutidos	
	Leches	Quesos Cheddar, Edam y Gouda	
	Verduras y frutas	Aceitunas de mesa	Choucroust (col fermentada)
			Encurtidos de pepinos.
			Dátiles madurados.
			Café tostado
<i>Bacterias ácido lácticas, mohos y levaduras</i>	Leches	Quesos Gruyere y Emmental.	
		Kefir (con levaduras)	
		Quesos enmohecidos como Roquefort, Camembert, Cabrales	
	Pescados	Salsas de pescados	
	Uvas	Vinos	
	Cebada	Cerveza	
	Manzana	Sidras	
	Melazas	Ron	
	Arroz	Sake	
	Trigo	Pan	
	Soja	Salsa de soja	

Elaborado por: Kattya Zambrano, 2014

Fuente: (6 Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos).

### 1.1.3.1. Alimentos fermentados

#### ***Kéfir y Koumiss***

El Kefir y el koumiss son bebidas a base de leche sometidas tanto a fermentación láctica como alcohólica, una de las características de esta bebida láctea es el contenido de dióxido de carbono que lo produce la levadura lo que la diferencia de otros productos fermentados de origen lácteo. Ambos productos son originarios de Rusia, repúblicas soviéticas y países de Europa del Este (7).

El inóculo utilizado en el kéfir es singular; es una simbiosis de microorganismos atrapados en una matriz de polisacárido, lo cual forma masas pequeñas del tamaño de un grano de arroz, así el inóculo se encuentra inmovilizado de tal forma que permite su reutilización al ser retirado por filtración. La matriz sobre la cual se sujeta el inóculo está formada por un polisacárido de glucosa y galactosa llamado kéfirano, y la flora dominante es reconocida como *Lactobacillus kéfir* (bacteria) y *Cándida kéfir* (levadura), además se han identificado la presencia de *Leuconostoc mesenteroides* ss. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* ss. *cremoris*, *Lactobacillus brevis*, *L. casei* ss. *casei*, *L. acidophilus*, *Lactococcus lactis* ss. *lactis*, además de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Solo entre el 5 y 10% de la población microbiana de los granos de kéfir son levaduras (7).

El producto se elabora a partir de leche de vaca, entera o descremada, cabra o borrega, también se usa mezcla de leche y suero de leche; el producto tiene una acidez de 0,7 a 1% de ácido láctico y contenido de etanol de 1% (7).

El koumiss se diferencia al kéfir en que se elabora originalmente con leche de yegua o por falta de oferta de este tipo de leche, se utiliza leche de vaca rebajada con suero lácteo para reducir el contenido de caseína; otra diferencia es que el inóculo usado no se encuentra confinado en una matriz sino que se distribuyen uniformemente, el contenido alcohólico es mayor (7).

Los microorganismos identificados en este producto son *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus*, *L. acidophilus* y *Kluyveromyces lactis* var. *Lactis* (levadura), también se puede encontrar *Cándida utilis*, *C. kéfir* o *S. cerevisiae*. Es un producto con 0.6 -1% de ácido láctico y 1 -3% de etanol (7).

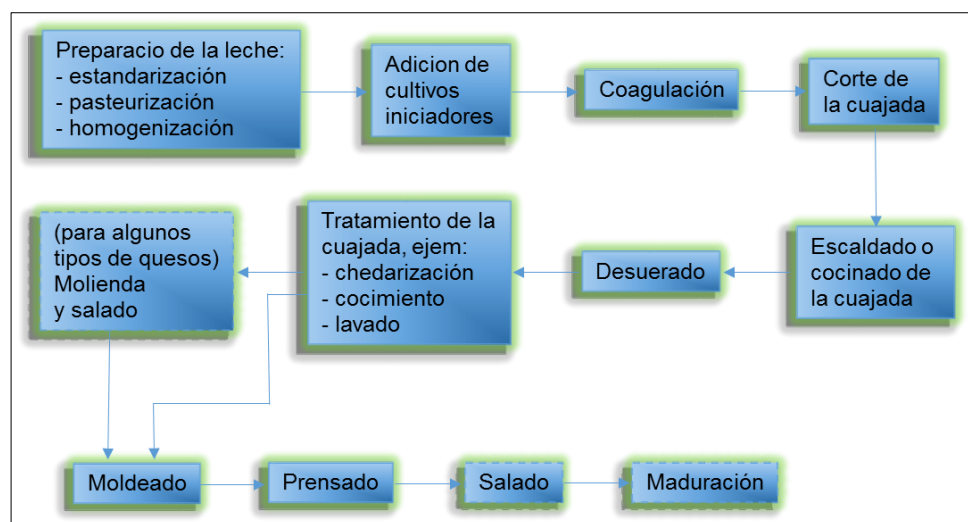
### **Quesos**

El codex alimentarius define este producto de la siguiente manera: “Se entiende por queso el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante: (a) coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche desnatada/descremada, leche parcialmente desnatada/descremada, nata (crema), nata (crema) de suero o leche de mantequilla/manteca, o de cualquier combinación de estos materiales, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los materiales lácteos ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso” (8).

Dentro de esta definición se menciona la maduración del producto, el cuajo, que es sometido a condiciones específicas de salado, temperatura, humedad y aireación; tales condiciones favorecen el

desarrollo de microorganismos naturales o inoculados durante el proceso que a través de su equipo enzimático generará cambios bioquímicos y organolépticos (7).

La variedad de quesos existentes en el mundo (alrededor de 1000) se debe a la amplia gama de parámetros usados en la producción de éstos. Aun así se puede esquematizar de forma general el proceso de obtención de quesos (7).



Fuente: (7 Biotecnología Alimentaria).

### FIGURA 1.7 DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DEL QUESO MADURO

La acción de los microorganismos sobre el cuajo se lleva a cabo en la etapa de maduración, donde el desarrollo de estos, la actividad



enzimática y la textura están fuertemente ligados al pH y a  $A_w$  del proceso (7).

Las levaduras y hongos se desarrollan mejor en medios ácidos, mientras que las bacterias prefieren un pH cercano a la neutralidad; por otro lado las levaduras y hongos resisten mejor medios con  $A_w$  baja no así las bacterias.

Las levaduras que aparecen en la producción de queso son: *Kluyveromyces* como el género dominante, también se mencionan los géneros *Debaryomyces* y *Saccharomyces*. La función principal de las levaduras es subir el pH del queso al consumir el lactato por vía oxidativa y producir compuestos de sabor por su capacidad enzimática (proteolítica, peptidásicas, lipolíticas y esterásicas) (7).

### **Vino**

Es una bebida de naturaleza alcohólica que proviene del jugo de la uva que se extrae por medio de presión; y que en ausencia de oxígeno (aire atmosférico) sufre una fermentación alcohólica para la obtención del producto final (16) (17).

La fermentación alcohólica se efectúa tradicionalmente con la microbiota presente en el fruto al momento de su cosecha, por lo general son microorganismos asociados a la *Saccharomyces cerevisiae*; esta microbiota es un cultivo mixto que puede añadir un sabor complejo al producto (17).

En la actualidad se elimina la microflora natural tratando al mosto con sulfito y añadiendo posteriormente un cultivo puro de una cepa determinada; en la elaboración de vino se utiliza la *Saccharomyces ellipsoideus*. Aunque tiene una morfología diferente en la mayoría de aspectos se parece mucho a la *Saccharomyces cerevisiae* (17).

### **Cerveza**

La cerveza se elabora por la fermentación del grano de cereal; tradicionalmente se ha usado cebada. El grano de cereal se calienta y se sacarifica con malta, esto quiere decir, la acción de las amilasas que contiene la malta sobre el almidón de los granos de cereal para obtener monómeros de azúcar; y así se obtiene el mosto cervecero (17).

Para la obtención de cerveza se utilizan dos tipos de levaduras *Saccharomyces carlsbergensis* para las cervezas tipo “lager” y

*Saccharomices cerevisiae* para las del tipo “ale”; en ambos casos por medio de la fermentación se produce CO<sub>2</sub> (17).

### **Sidra**

Es el término que se aplica al vino cuando se emplea jugo de manzana como materia prima. Las diferencias entre los diversos tipos de Sidras son: El contenido alcohólico, la presencia o no de dióxido de carbono, el grado de acidez, contenido de taninos y contenido de azúcares.

El método europeo para obtener sidra es que el proceso fermentativo se lleva a bajas temperaturas. Las manzanas se comprimen para extraer el jugo. Este es tratado con dióxido de azufre (50-100ppm); también se usan enzimas para mejorar la clarificación.

La flora asociada a la fermentación son: *Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima* (levaduras salvajes); el dominio de la fermentación la tienen otras cepas como *Saccharomyces cerevisiae* ss. *uvarum* y *cerevisiae*, y también de *Zygosaccharomyces florentinus*. Además de la producción de pectinasa por la

*Kluyveromyces marxianus var. marxianus* que juega un papel importante en la clarificación del producto (7).

La elaboración de sidra se efectúa por una fermentación maloláctica, esto es la transformación de ácido málico en ácido láctico por medio del uso posiblemente de 3 enzimas: málico deshidrogenasa, málica y maloláctica (6).

### **Sake**

En los países de la región asiática, se utiliza la amilasa de origen fúngico como el *Aspergillus orizae* para sacarificar el arroz, esto es que las enzimas amilasas tengan acción sobre el almidón para generar azúcares que puedan ser fermentados por acción de las levaduras. Conocido en Japón como “Sake” o en regiones de China como “Vino de arroz” (17).

### **Soja**

La salsa de soja originaria del lejano oriente es cada vez más usada en el mundo occidental. Su elaboración consta de una fermentación en dos etapas; la primera es una fermentación fúngica en sustrato sólido por medio de microorganismos del género *Bacillus* y/o *Aspergillus* tales como *Aspergillus soyae*, *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces rouxii*, *Cándida versitilis*, *Pediococcus halophilus*,

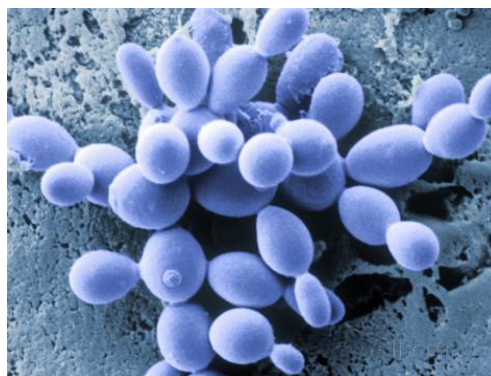
*Lactobacillus delbrueckii*, que no sean patógenos; y la segunda etapa se inicia agregando una salmuera al producto de la primera fermentación en esta etapa actúan levaduras y bacterias (15) (17).

Las características de este producto es una salsa café, salada de aroma y sabor característicos y con capacidad de potenciar sabores. De aquí nació la industria del glutamato mono sódico, nucleótidos potenciadores de sabor, producción industrial de enzimas (7).

#### 1.1.3.2. Microorganismos Fermentativos en Bebidas

##### ***Saccharomyces cerevisiae*.**

Se la encuentra en la micro biota de las frutas como la uva o la manzana se la conoce como levadura silvestre, por lo que corresponde a una especie no cultivada, Produce fermentación superficial (17) (24).

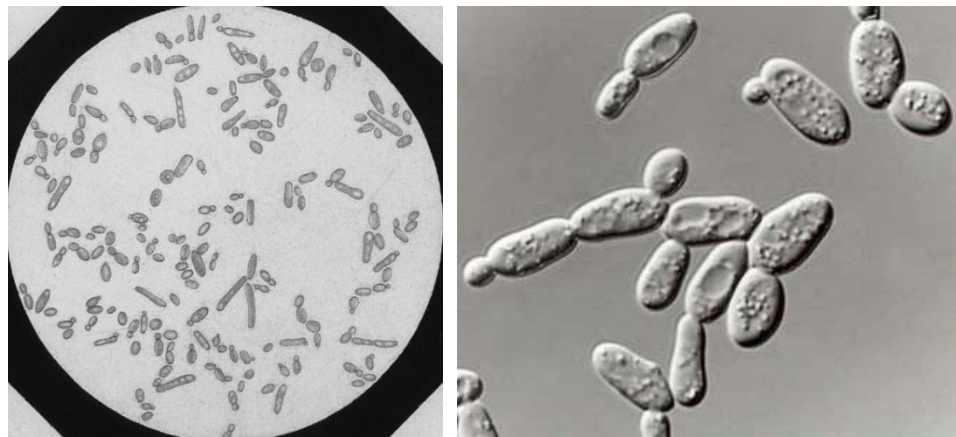


Fuente: (24 [www.allposters.com](http://www.allposters.com))

**FIGURA 1.8 SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

### ***Saccharomyces carlsbergensis***

Tiene como sinónimo la *Saccharomyces pastorianus*, son células ovals en forma de salchicha, su actividad fermentativa es de fondo. Levadura típica de la industria cervecera. Es resistente a altas concentraciones de alcohol y anhídrido sulfuroso (27).



Fuente (27 [www.wineserver.ucdavis.edu.com](http://www.wineserver.ucdavis.edu.com))

**FIGURA 1.9 SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS**

### ***Tóruas***

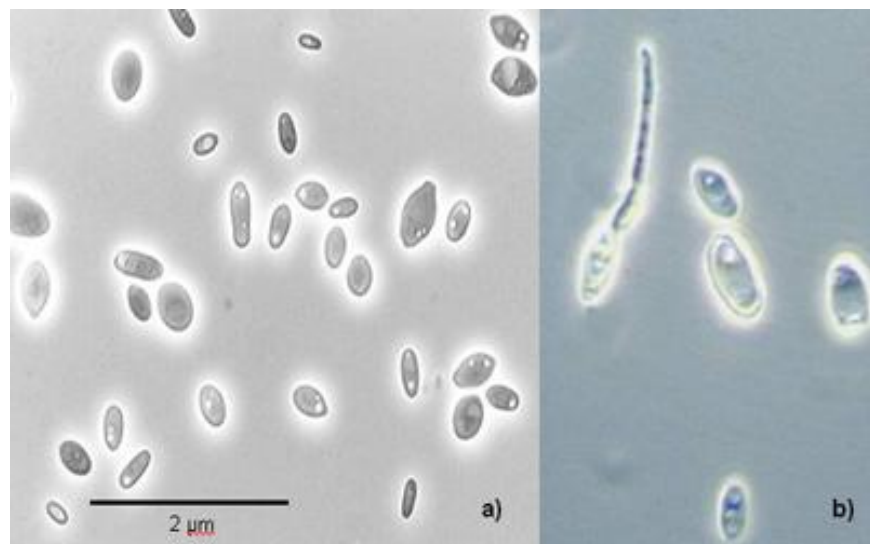
Se reproducen por gemación, de forma esférica u oval de distintos colores, su presencia en cervezas causa turbidez. No son *Saccharomyces*. Su actividad alcoholizante es escasa. Se encuentran en gran cantidad en mostos de uvas atacadas por podredumbre (1).

### ***Dekkera anomala***

También llamadas *Brettanomyces*, son asporógenas, de forma esféricas, ovales o alargadas; se desarrollan como unidad aislada o formando cadenas de células; imparte sabores y aromas fuertes en el vino que se describen como manta de caballo, corral, tirita y fecal.

Produce ácido acético en el vino lo que lleva a la pérdida de sabores y aromas. Fermentación tardía.

Genus/especies (alias): *Dekkera* (*Brettanomyces anomalus*, *anamorph*, *Brettanomyces*/ *Dekkera claussensii*, *Torulopsis cylindrical*, *Cándida beijinggensis*) (28).



Fuente (28 [www.wineserver.ucdavis.edu.com](http://www.wineserver.ucdavis.edu.com))

**FIGURA 1.10 DEKKERA ANOMALA**

***Saccharomyces ellipsoideus***

Es la auténtica levadura del vino, alto poder fermentativo. En la fermentación alcohólica primaria la glucosa y la fructosa del mosto son fermentadas hasta obtener etanol y CO<sub>2</sub>.

En la fermentación alcohólica secundaria que puede darse en botellas o en tanques el azúcar añadido se convierte en etanol y CO<sub>2</sub> y así produce vinos espumosos (1).

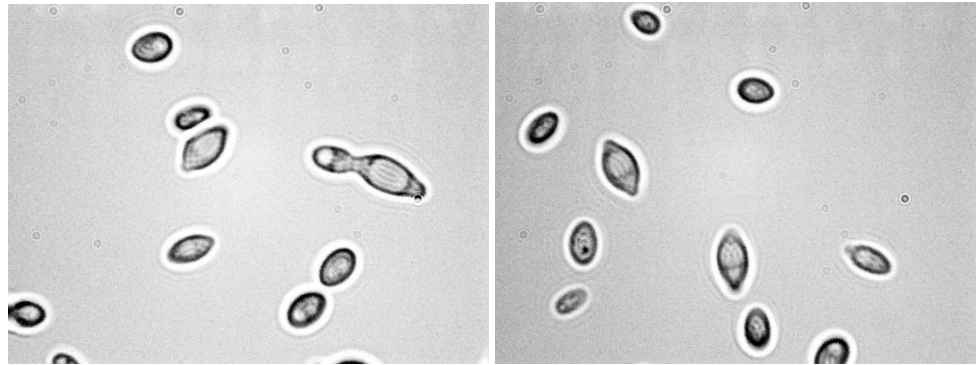
***Hanseniaspora uvarum***

Con forma de limón, ovoide o alargada. Se encuentra en las frutas, especialmente en las uvas, pero también se encuentran en el suelo, el agua dulce y salada, moluscos y mamíferos.

Tiene actividad temprana en la fermentación produciendo acetato de etilo.

Genus/especies (alias): *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata* anamorfa; *Kloeckera austriaca*, *Kloeckera brevis*, *Kloeckera lodderi*, *Hanseniaspora apiculata*) (29).





Fuente: (29 [www.wineserver.ucdavis.edu.com](http://www.wineserver.ucdavis.edu.com))

**FIGURA 1.11 HANSENIASPORA UVARUM**

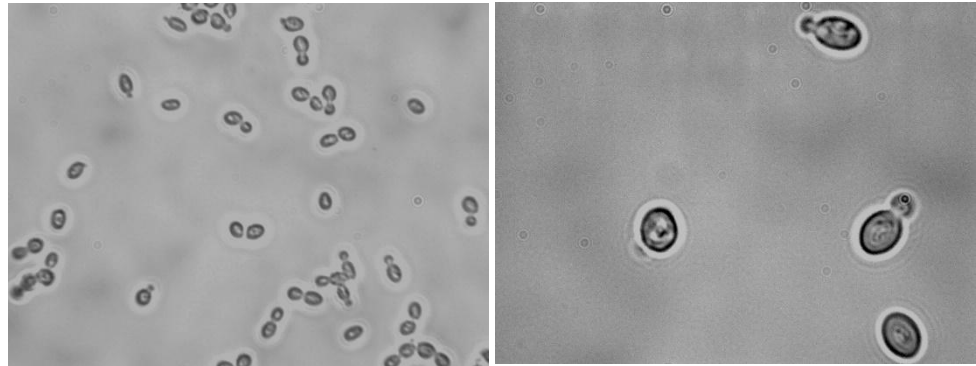
### ***Cándida stellata***

De forma esférica u ovoide, usualmente se encuentra como la unidad aislada pero también se la encuentra adherida una a otra en una formación de estrella, no forma hifa o pseudohifa.

Es un miembro de la flora natural de microorganismos en la superficie de las uvas, cede en número frente a otras especies de *Saccharomyces*. La *C. stellata* junto a otras especies de *Cándida* se han encontrado en los procesos de fermentación y es capaz de realizar la fermentación completa a vino.

Genus/species (aliases): *Cándida stellata* (*Saccharomyces stellatus*; *Torulopsis stellata*; *Cryptococcus stellatus*; *Cryptococcus bacillaris*;

*Saccharomyces bacillaris*; *Trouloopsis bacillaris*; *Brettanomyces italicus*) (25).



Fuente: (25 [www.wineserver.ucdavis.edu.com](http://www.wineserver.ucdavis.edu.com))

### **FIGURA 1.12 CÁNDIDA STELLATA**

#### ***Saccharomyces beticus***

Levadura en flor del vino de jerez, parte del etanol se oxida a acetaldehído, produciendo el aroma típico del jerez (17).

#### ***Saccharomyces bayanus*.**

Se encuentra en lugares remotos o aislados de la población humana, no así la *S. cerevisiae*. El patrón de cariotipo de la *S. cerevisiae* es reconocido por la banda cromosómica de 1600 kb, así como por 3 o más cromosomas pequeños en la región de 245-370 kb. A diferencia de *S. bayanus* que tiene una banda cromosómica de unos 1300 kb.

*S. bayanus* es generalmente galactosa negativo, a diferencia de *S. cerevisiae*.

Genus/especies (alias): *Saccharomyces bayanus*,  
 (*Saccharomyces uvarum*; *Saccharomyces globosus*,  
*Saccharomyces intermedius*, *Saccharomyces heterogenicus*,  
*Saccharomyces joannae*, *Saccharomyces tubiformis* (17) (26)



Fuente: (26 [www.wineserver.ucdavis.edu.com](http://www.wineserver.ucdavis.edu.com))

**FIGURA 1.13 SACCHAROMYCES BAYANUS**

## 1.2 Generalidades de CIBE 12.1-06

### **Levaduras**

La levadura puede crecer como anaerobio facultativo, es decir puede utilizar oxígeno u otro compuesto orgánico como aceptor final de electrones. La levadura en condiciones aeróbicas puede transformar azúcar en dióxido de carbono, agua y una producción

relativamente alta de nueva levadura, mientras que la levadura crecida anaeróbicamente tiene una velocidad relativamente lenta de crecimiento, que ahora se acopla a una alta conversión de azúcar en alcohol y dióxido de carbono (18) (19).

### ***Reproducción celular de levaduras***

Las levaduras se multiplican por gemación. Este evento se da cuando una zona de la pared forma una protuberancia (brote) en la superficie externa, y este se alarga agregando citoplasma al que se provee de pared. Al aumentar de volumen el brote, van emigrando a este los organelos de la célula madre, incluido un núcleo (tras su división). Finalmente, la gema alcanza su tamaño definitivo, lo que no implica necesariamente su separación de la célula madre. Es bastante frecuente encontrar largas cadenas de levaduras, debido a la no disyunción de las distintas células formadas (1) (19).

### ***Pared celular de las levaduras***

Las diferencias en la estructura química de las capas exteriores de la levadura son las responsables de que algunas cepas suban a la superficie hacia el final del proceso fermentativo, estas levaduras “altas” contrastan con las “bajas”, que se hunden y tienden a depositarse en la base del fermentador. Las levaduras “altas”

tienden a ser hidrófobas y a reunirse en el menisco, lo que no hacen las “bajas” (1)(23).

Las gemas de algunas cepas de levadura se separan con dificultad de la madre, por lo que forman cadenas constituidas por numerosas células y sedimentan más rápidamente (1)(23).

La aglomeración de las células hace que las levaduras se hagan visibles en el medio hacia el final de la fermentación, donde son llamadas floculantes, sin embargo una floculación temprana puede impedir que la fermentación se complete; cada una de las células es atraída por las demás para formar flóculos, probablemente compuesto por miles, o millones de células. Se cree que la atracción se debe, al menos en parte, a la formación de puentes de calcio entre grupos carboxílicos de células adyacentes, y en parte al establecimiento de puentes de hidrogeno, la capacidad de flocular está determinada genéticamente (1)(23).

La floculación puede ser inhibida por azúcares y favorecida por la sal; las cepas o razas floculantes sedimentan más rápidamente que las no floculantes o pulverulentas (1)(23).

Aparte de la mayor hidrofobia superficial entre las levaduras altas y las bajas existe otra diferencia y es que las levaduras altas operan generalmente en el intervalo de temperaturas de 15-22 °C y las bajas en el de 8-15 °C (1).

### ***Selección de levaduras para su uso en alimentos.***

La selección de cepas para la elaboración de bebidas fermentadas no es una tarea fácil ya que no esporulan fácilmente y producen pocas ascosporas viables.

Las tasas de diacetilo que imparten tanto el bouquet como el aroma, se ven influenciados en principio por las materias primas y las técnicas de elaboración, y por otro lado, el metabolismo de las levaduras; así se puede concluir que todo parámetro relacionado con la actividad metabólica de la levadura va a influir directamente en la formación de diacetilo, esto es: Materias primas (como sustrato de la levadura), los métodos y condiciones de producción en la fermentación y post-fermentación (temperatura y pH adecuados a la cepa empleada), y la infección de las bebidas por diversas bacterias y levaduras salvajes (1).

Otra de las exigencias de la fermentación es que la levadura crezca adecuadamente. Es obvio que la fermentación necesita un inóculo suficiente para una propagación eficaz, –ordinariamente una multiplicación por un factor de 3 a 5- durante una fermentación. Un factor de multiplicación más bajo crea dificultades técnicas y una propagación excesiva acarrea la incorporación, a la biomasa de la levadura de cantidades de hidrato de carbono que debían transformarse en etanol (1).

#### ***Mantenimiento de los cultivos de levadura***

El método consiste en sembrar con un asa, el cultivo puro o contaminado, en un medio sólido y estéril sobre una placa Petri. Una vez desarrolladas, se seleccionan las colonias, se recogen algunas y se siembran de nuevo en medio sólido; las posteriormente desarrolladas constituyen la colección utilizada para seleccionar luego la que convenga utilizar (1).

#### ***Levaduras salvajes.***

A las levaduras causantes de problemas en las fábricas de cerveza se les denomina salvajes. Algunas razas de *Saccharomyces cerevisiae* o de otras especies del mismo género; otras pertenecen a los géneros *Cándida*, *Pichia*, *Hansenula* o *Torulopsis* (10).

### ***El género Cándida***

El género *Cándida* comprende aproximadamente 200 especies que son la reunión de asporógenos anamórficos e imperfectas levaduras.

Después de la unión de los géneros *Torulopsis* con *Cándida*, este grupo contiene más de la tercera parte de las especies de levaduras (Meyer et al.,1984). Comprende las especies de levaduras que no han sido asignadas en otro género imperfecto.

Son predominantemente ascomicetos y 25 especies de levaduras que son basidiomicetos presentes en la naturaleza. El género *Cándida* incluye especies con y sin hifas, especialmente debido a la combinación del género *Torulopsis*, el cual es carente de pseudomicelio (Yarrow y Meyer, 1978) (30).

Una de las características de la especie *Cándida sake*, es que las proteínas solubles del citoplasma de las células son usadas para la identificación y clasificación de la especie *C. sake*. Las enzimas que son utilizadas por los organismos sirven como componentes estándar para su identificación (Kurtzman et al., 1983)(30)



Las especies del genero *Cándida* son cepas que muestran menores diferencias con respecto a ciertas características fisiológicas, en que el nombre genérico indica cierto grado de semejanza. (30)

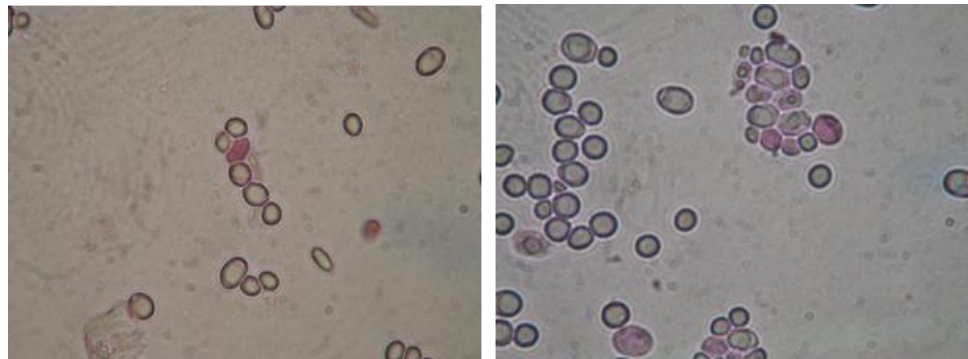
El nivel de bioseguridad que se le asigna a la *C. sake* es “nivel de bioseguridad 1” esto implica que las condiciones de trabajo a cumplir para el manejo, trabajo en laboratorio y almacenaje del microorganismo son los siguientes:

- El agente biológico (*C. sake*) presenta un peligro mínimo para el personal de laboratorio y ambiente.
- El acceso al área de trabajo no es restringido y el trabajo con el agente puede realizarse en mesas estándar de laboratorio.
- No se requiere equipo especial, tampoco diseño específico de las instalaciones; el edificio o el área de laboratorio no necesita estar aislada.
- Las precauciones tomadas con este nivel de bioseguridad son:  
Uso de guantes plásticos y protección facial.
- Los materiales de trabajo contaminados se pueden desechar en recipientes abiertos.
- Los procedimientos de descontaminación para este nivel de bioseguridad son: Lavarse las manos con jabón antibacteriano,

lavar todas las superficies expuestas del laboratorio con los desinfectantes (32) (33).

### 1.2.1 Características morfológicas

La morfología de las células de esta levadura varía de redonda a elíptica alargada, incluso podría observarse cilíndrica, y presenta una reproducción vegetativa por gemación multilateral.



Fuente: CIBE – Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 1.14 CIBE 12.1-06**

Las colonias que forma son de color blanco o cremoso, no presenta formación de carotenoides (pigmentos amarillos o naranjas), la superficie de la colonia puede o no presentar pseudohifas y la textura de la colonia semejante a la mantequilla (31).

La clasificación de la *Cándida sake* se presenta de la siguiente forma (31):

**TABLA 4**  
**CLASIFICACIÓN DEL GÉNERO CÁNDIDA SAKE**

<b>Clasificación</b>	
<b>División</b>	Ascomycota
<b>Subdivisión</b>	Saccharomycotina
<b>Clase</b>	Saccharomycetes
<b>Subclase</b>	Saccharomycetidae
<b>Orden</b>	Saccharomycetales
<b>Genero</b>	Cándida

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

Fuente: (31 [www.cbs.knaw.nl](http://www.cbs.knaw.nl))

Es importante destacar que la especie *C. sake* no se ha encontrado asociada con animales de sangre caliente (Hurtley et al., 1987). Además de la ingestión de las dosis aplicadas en bio-control de la referida cepa no representa ningún peligro toxicológico para la especie humana ya que no puede desarrollarse a temperatura de 37°C (temperatura corporal) y es rápidamente destruida en contacto con el jugo gástrico simulado.

Está muy bien adaptada a las bajas temperaturas, obteniéndose un buen desarrollo de su población a 1°C (30).

### 1.2.2. Características bioquímicas y moleculares

Los azúcares donde presenta actividad fermentativa, es decir producción de gas, son (31):

**TABLA 5**  
**CAPACIDAD FERMENTATIVA DE C. SAKE EN DIFERENTES**  
**AZUCARES**

D-Glucosa	+ / -
D-Galactosa	+ / -
Maltosa	+ / -
Sucrosa	+ / -
a,a-Trehalosa	+ / -
Lactosa	-
Raffinosa	-

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

Fuente: (31 [www.cbs.knaw.nl](http://www.cbs.knaw.nl))

La capacidad de asimilación y los ensayos de crecimiento presentan los siguientes registros en la literatura (31):

**TABLA 6**  
**ENSAYO DE CRECIMIENTO DE C. SAKE A DIFERENTES**  
**TEMPERATURAS**

1 °C	Forma gas
5 °C	Forma gas
10 °C	Forma gas
15 °C	Forma gas
19 °C	Forma gas
25 °C	Forma gas
30 °C	Forma gas
37 °C	No forma gas
40 °C	No forma gas
45 °C	No forma gas

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

Fuente: (31 [www.cbs.knaw.nl](http://www.cbs.knaw.nl))

La capacidad de asimilación que tiene la *C. sake* sobre diversos sustratos se muestra en la siguiente tabla (31):

**TABLA 7**  
**CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LA ESPECIE *C. SAKE***

Glucosa (+)	Ribitol (-/+)	Ribosa (-/+)
Insulina (-)	Galactitol (-)	Metanol (-)
Sucrosa (-/+)	D-Manitol (-/+)	Etanol (-/+)
Rafinosa (-)	D-Glucitol (-/+)	Glicerol (-/+)
Melobiosa (-)	Mio-Inositol (-)	Eritriol (-)
Galactosa (+)	DL-Lactato (-/+)	Etilamina (-/+)
Lactosa (-)	Succinato (+)	50% Glucosa (-)
Trehalosa (+)	Citrato (-/+)	Formación de almidón (-)
Maltosa (-/+)	D-Gluconato (-/+)	
Melisitosa (-/+)	D-Glucosamina (-/+)	Licuefacción de gelatina
Metil- $\alpha$ -D-glucósido (-/+)	N-Acetil-D-Glucosamina (+)	(-)
Almidón soluble (-)	Hexadecano (-/+)	Cicloheximida 0.1% (-)
Celobiosa (-/+)	Nitrato (-)	
Salicina (-/+)	Nitrito (-)	Cicloheximida 0.001% (-)
L-Sorbosa (-/+)	Libre de vitaminas (-/+)	
L-Rhamnosa (-)	2-Keto-D-Gluconato (-/+)	
D-Xilosa (-/+)	Xilitol (-)	
L-Arabinosa (-)	Cadaverina (-/+)	
D-Arabinosa (-)	L-Lisina (-/+)	

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014  
Fuente: (31 [www.cbs.knaw.nl](http://www.cbs.knaw.nl))

### 1.2.3. Uso en la industria de los alimentos

Las menciones de *Cándida sake* en la literatura consiste en describirla como una levadura salvaje o que pertenece a la microbiota de la materia prima procesada; la razón de su presencia en jugos vinos y cervezas es debido a que se encuentra ampliamente

distribuida sobre la superficies de la frutas en la mayoría de regiones a nivel mundial, además de estar presente en agua y suelos también de varias regiones glaciares.

Esta especie ha sido encontrada en el sake-moto que es la pasta de almidón que se fermenta para la elaboración del sake, mosto de uva y palo de salmón congelado en Japón, también en mosto de uva en Francia, tubería de mosto en una fábrica de cerveza además del suelo en Suecia y Bélgica, la savia del árbol de haya *Fangus sp.*, Chucrut y yema de huevo en los Países Bajos, agua y sedimentos de la Bahía de Chesapeake en los EEUU, tierra de pasto en Chile, agua, suelo y agua de mar de la Antártida, leche, superficie de frutas, jugo no pasteurizado de naranja (30) (31).

La *C. sake* ha sido identificada como contaminante del mosto o jugo de caña de azúcar (30).

Las cepas de la primera especie *Cándida austromarina*, que Kurtzman y Robnett identificaron en 1997 como *C. sake* no crece a temperaturas superiores a 18-21 °C; por otro lado existe una especie de *C. sake* que crece en un rango de temperatura que va

de 1-34 °C y es miembro heterogéneo de la especie *Cándida maltosa* (30)(31).

#### **1.2.4 Obtención de la cepa CIBE 12.1-06**

El continente antártico representa un reservorio microbiológico poco explorado, en especial respecto de las levaduras que allí habitan. Estos microorganismos poseen gran importancia ecológica y un alto potencial para aplicaciones biotecnológicas. El objetivo del CIBE es estudiar la diversidad de levaduras presentes en el territorio antártico, para lo cual en una primera etapa de investigación se recolectaron muestras de tierra y de agua procedentes de esta región.

Utilizando diferentes condiciones de cultivo se logró aislar gran cantidad microorganismos, los cuales fueron seleccionados y agrupados de acuerdo a sus características macro morfológicas.

En la naturaleza los microorganismos se encuentran en comunidades más o menos complejas. Por ello, una técnica esencial es la que permite la obtención de cultivos puros o axénicos, a partir de los cuales es posible un estudio sobre las

propiedades de un microorganismo concreto, ya que un cultivo puro es aquel que contiene un solo tipo de microorganismo.

Debido a que el grupo de estudio es levadura, se utilizó un medio de cultivo selectivo para levaduras como es el PDA (potato dextrosa agar), en la técnica utilizada en el laboratorio se obtuvo un cultivo puro por agotamiento por estrías.

Una vez identificada molecularmente se procedió a incubar en medios diferenciales y comprobar así sus propiedades bioquímicas; la cepa *Candida sake* comprobó su capacidad de fermentación alcohólica en 4 diferentes azúcares: Glucosa, fructosa, maltosa, glicerol, frente a un azúcar que no fermenta como la lactosa.

#### **1.2.5 Necesidades de investigación, hipótesis y objetivos.**

Las levaduras son cuantitativa y económicamente el grupo de microorganismos con más importancia en la industria alimentaria y fermentativa. Su tradicional aplicación se centra en la fabricación de varios productos como pan, vino, cerveza, cava, bebidas alcohólicas, sake, destilados, producción de biomasa, extractos autorizados, componentes del sabor y recientemente se está



realizando la producción de recombinados proteicos a través de expresiones genéticas.

La hipótesis del presente trabajo busca demostrar, que la levadura estudiada fermenta los azúcares simples a una temperatura óptima inferior a la temperatura ambiente y a un pH óptimo cercano a la neutralidad produciendo alcoholes de grado alimenticio.

El principal objetivo para ello es caracterizar la actividad fermentativa de la levadura en estudio, por medio de la identificación de temperatura y pH donde la generación de gas por fermentación sea máxima.

El tipo de alcohol que produce la cepa en estudio es un punto más de análisis, ya que según la calidad de alcohol que genera en el proceso de fermentación, y la resistencia del microorganismo al incremento de alcohol en el medio son factores que inciden en la aplicación biotecnológica del agente en estudio.

Además del principal objetivo del trabajo se podrá evaluar otras características de la fermentación tales como:

- ❖ Si tiene un alto porcentaje de fermentación.

- ❖ El tipo de resistencia a diversas temperaturas y pH.
- ❖ Qué tipo de metabolitos producirá.
- ❖ Que habilidad de flocular presenta.

# CAPÍTULO 2

## 2. MATERIALES Y METODOS

Para la realización de la fase experimental que determinaron los parámetros óptimos del proceso de fermentación, como son temperatura y pH, se ejecutaron una serie de etapas experimentales en secuencia que buscan consecutivamente la obtención de información para la conclusión de lo inicialmente expresado.

El primer paso para llevar a cabo el experimento es la obtención de la cepa en estudio por medio de técnicas de laboratorio de microbiología, y de esta forma asegurar la pureza de la cepa a utilizar, es decir que exista un solo tipo de célula en el inóculo (42).

A continuación se inóculó la cepa aislada en caldo cultivo restringido con un azúcar específico, el objetivo de esta etapa es evaluar la velocidad de producción de gas a diferentes temperaturas (43)(44).

Una vez que se determinó una temperatura óptima de crecimiento, se describe la velocidad de formación de gas a diferentes pH; este escenario se lo evalúa con el parámetro de temperatura de incubación previamente determinado.

Previo a la lectura por cromatografía de gases, se procedió a destilar la muestra (la muestra correspondiente al escenario caracterizado por los dos parámetros previamente determinados de temperatura y pH), para obtener alcohol puro, con el fin de determinar por medio de cromatografía de gases que tipo de alcohol se generó en el proceso de fermentación.

Dentro de las necesidades de investigación se menciona el uso tradicional de las levaduras en la industria de alimentos, es así, que en una etapa paralela de experimentación se inocula en jugo de uva la cepa estudiada y posterior a la fermentación se destila, esto con el fin de hacer una comparación con el tipo de alcohol obtenido además de determinar la cantidad de alcohol presente al final de la etapa de fermentación (45).

## **2.1 Producción de Gas**

Para obtener una muestra que genere fermentación alcohólica y de allí analizar la dinámica de generación de gas se necesita dos etapas: La primera es la obtención de una cepa pura, la segunda

parte es la siembra de la cepa en un caldo de cultivo con un azúcar específico.

### **2.1.1 Materiales**

#### **2.1.1.1 Materiales aislamiento de la cepa CIBE 12.1-06**

Los equipos, instrumentos, materiales y reactivos utilizados durante esta etapa de experimentación fueron los siguientes.

##### ➤ Materiales

- Cepa del banco de levaduras de CIBE.
- Cajas Petri
- Agar PDA
- Aceite de inmersión
- Solución cristal violeta 1%
- Solución de safranina 0,5%
- Solución diluida de yodo (Lugol) (1% I<sub>2</sub> + 2% IK)
- Etanol

##### ➤ Instrumentos

- Porta y cobre objeto

- Pinza

##### ➤ Equipos

- Microscopio óptico

- Cámara de flujo

### **2.1.1.2 Materiales para la generación de gas por fermentación**

Los equipos, instrumentos, materiales y reactivos utilizados durante esta etapa de experimentación fueron los siguientes.

#### ➤ Materiales

- Cepa purificada
- Tubos con tapa rosca
- Tubos de precipitación de eritropoyetina
- Pipeta Pasteur
- Pera pipeteadora
- Asa de siembra
- Plato de pesada
- Espátula
- Agitador magnético
- Tubos de vidrio pequeños
- Matraz aforado
- Pipeta

#### ➤ Equipos

- Agitador magnético
- Estufa agitador
- Balanza analítica

- Lector grados macfarlán
- Cámara
- Autoclave
- Reactivos
  - Sulfato de amonio
  - Fosfato mono potásico
  - Sulfato de magnesio
  - Glucosa
  - Fructosa
  - Agua ultra pura

### **2.1.2. Métodos**

#### **2.1.2.1 Aislamiento de la cepa CIBE 12.1-06**

Para la primera etapa del experimento, el método que se siguió para obtener el aislamiento de la cepa a fin de garantizar la pureza del inóculo y la correspondencia de los resultados obtenidos fue el siguiente:

- ❖ Para el efecto de la experimentación que se describe a continuación, partimos de una cepa del banco de levaduras que se almacena en el CIBE.

- ❖ Aunque existen numerosas técnicas de aislamiento, las más utilizadas emplean un medio de cultivo sólido sobre el que se desarrollan colonias macroscópicas como resultado del crecimiento y división de los microorganismos. Así el medio de cultivo sólido empleado fue PDA, y la técnica de aislamiento empleada sería agotamiento por estrías.
- ❖ Una vez aislada la colonia, se comprobó su capacidad de tinción mediante observación al microscopio con la técnica de tinción de Gram (42).
- ❖ Al comprobar la pureza de la cepa a emplear en el experimento, esta se sembró en masa en PDA.

#### **2.1.2.2 Generación de gas por fermentación**

La formación de gas en la fermentación está asociado a la generación de alcohol, ya que ambos son producto del proceso de respiración anaerobia en la célula; para determinar la velocidad de generación de alcohol se mide la generación de gas en un ambiente controlado con respecto al tiempo.

Para el efecto se preparó un caldo de cultivo con un azúcar específico, este se esterilizó en autoclave, previo a la siembra de la levadura se permite que el caldo de cultivo se enfríe.



Se sembró la cepa aislada y comprobada en el medio que se preparó y se procedió a realizar las lecturas en el tiempo; esto es, registrar el tamaño de la burbuja formada durante el proceso de fermentación. Para el efecto se realizaron las siguientes acciones:

❖ Se preparó el caldo de cultivo con azúcar específico de glucosa y fructosa; para esto se utilizó la siguiente relación, para 1 L de caldo de cultivo se usa:

- Azúcar 20 g
- Sulfato de magnesio 0.5 g
- Sulfato de amonio 0.5 g
- Fosfato monopotásico 1 g

❖ Se prepararon 10 tubos con caldo de cultivo de glucosa.

❖ Se llenaron 10 tubos de precipitación de eritropoyetina también con caldo de cultivo de glucosa usando una pipeta Pasteur.

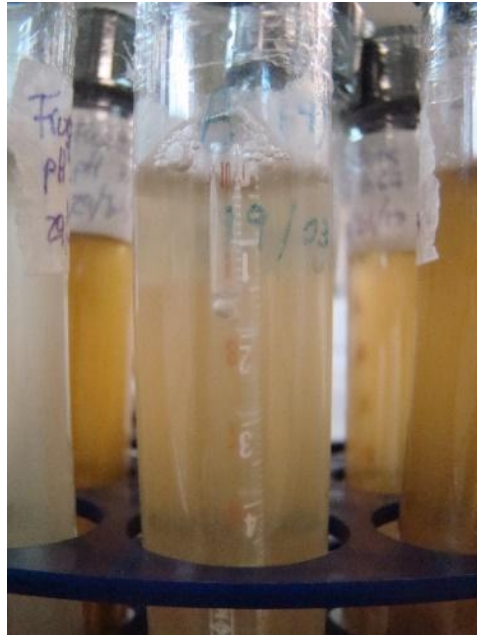
❖ Posteriormente se introdujeron el tubo de precipitación de eritropoyetina dentro del tubo de ensayo a manera de campana y se tapa el tubo de ensayo con tapa rosca.



Fuente: CIBE – Katty Zambrano, 2014

### **FIGURA 2.1 DISPOSICIÓN DE TUBO CAMPANA DENTRO DEL CALDO DE CULTIVO**

- ❖ Se repitió el mismo procedimiento mencionado anteriormente; esta vez se prepara el caldo de cultivo con fructosa.
- ❖ Los 20 tubos de ensayo debidamente rotulados se llevaron al autoclave a 120 ° C por 20 minutos.
- ❖ Una vez enfriados los tubos de ensayo con caldo de cultivo se procedió a inocular con la cepa estudiada.
- ❖ De la caja Petri donde se siembra en masa, se toma una pequeña parte de la biomasa de la superficie y se la disuelve en 20 ml de agua ultra pura.
- ❖ Se agita hasta disolver la biomasa en el agua y se procede a leer en el turbidímetro hasta obtener 0,5° Mcfarland (42).
- ❖ Se Inocula 1 ml de la solución con inoculo en cada uno de los tubos de ensayo, esto como cultivo de iniciación de la fermentación.



Fuente: CIBE – Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 2.2 FORMACIÓN DE GAS EN EL CALDO CON CULTIVO**

## **2.2. Determinación de temperatura óptima**

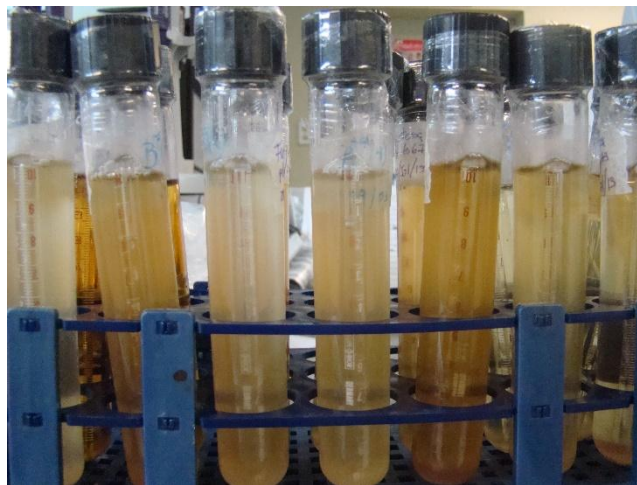
### **2.2.1. Materiales**

Los equipos utilizados en esta etapa de experimentación fueron:

- Nevera a 5°C
- Nevera a 10°C
- Nevera a 16°C
- Nevera a 25°C
- Estufa 30°C

### 2.2.2. Metodología para determinar la temperatura óptima de crecimiento

En el transcurso de los días se observó la formación de gas y fue visible como quedó atrapado en el tubo a manera de campana. La razón de crecimiento de la burbuja de gas en el tiempo (un registro por día) es lo que genera los datos a evaluar mediante la siguiente metodología:



Fuente: CIBE – Katty Zambrano, 2014

#### FIGURA 2.3 MUESTRAS A DIFERENTES TEMPERATURAS

- ❖ Con los datos registrados se realizó un análisis de regresión lineal por el método de los “mínimos cuadrados”.
- ❖ El análisis se realizó para cada uno de los escenarios; esto es, el conjunto de datos generados y registrados por cada temperatura evaluada corresponde a un escenario.

- ❖ Se graficó las lecturas registrada para cada uno de los tubos, día vs.  $\mu\text{L}$  gas; un gráfico para cada una de las temperaturas de trabajo.
- ❖ Se realizó una regresión lineal sobre cada conjunto de datos correspondientes a un escenario a fin de obtener una ecuación con la siguiente forma modelo:

$$y = \beta_0 + \beta_1(x)$$

Donde:

$$\beta_1 = \frac{\sum(x_i \cdot y_i) - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$\beta_0 = y_{prom} - \beta_1(x_{prom})$$

En el que:

- $y_{prom}$ : la media de los datos correspondientes desde  $y_1$  hasta  $y_n$
- $x_{prom}$ : la media de los datos correspondientes desde  $x_1$  hasta  $x_n$
- $\sum(x_i \cdot y_i)$ : la sumatoria de los productos desde  $x_1 \cdot y_1$  hasta  $x_n \cdot y_n$
- $n$ : el número de datos correlacionados
- $\sum x$ : la suma de los datos desde  $x_i$  hasta  $x_n$ .
- $\sum y$ : la suma de los datos desde  $y_i$  hasta  $y_n$ .

- $\sum x_i^2$ : la sumatoria de los datos desde  $x_1^2$  hasta  $x_n^2$
- $\sum y_i^2$ : la sumatoria de los datos desde  $y_1^2$  hasta  $y_n^2$
- ❖ Se realiza un análisis de varianza en el que se determina la correlación de los datos (valor R).

ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACION					
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	Fo	VALOR - P
REGRESION	$SCr = \beta_1 * \left( \sum xy - \frac{\sum x * \sum y}{n} \right)$	1	$CMr = \frac{SCr}{g.l.}$	$F_o = \frac{CMr}{CMe}$	$F(\alpha, 1, n - 2)$
ERROR	$SCe = S_{yy} - SCr$	n-2	$CMe = \frac{SCe}{g.l.}$		
TOTAL	$S_{yy} = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$	n-1			
$S_x^2$	$S_x^2 = \frac{\sum(x - x_{prom})^2}{n}$	Si $F_o > F$ ; el analisis es significativo			
$S_y^2$	$S_y^2 = \frac{\sum(y - y_{prom})^2}{n}$				
$S_{xy}$	$S_{xy} = \frac{\sum(x - x_{prom}) * (y - y_{prom})}{n}$	Si R es mayor a 0,9 existe buena correlacion de datos			
R	$R = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_x^2 * S_y^2}}$				

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 2.4 TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN**

- ❖ Del modelo lineal desarrollado para cada uno de los eventos, interesa la pendiente o lo que es lo mismo el valor  $\beta_1$  de cada una de las ecuaciones. Este valor indica la razón de crecimiento de la burbuja de gas vs. Tiempo; así se tendrá que la unidad de razón es  $\mu\text{L gas/día}$ .

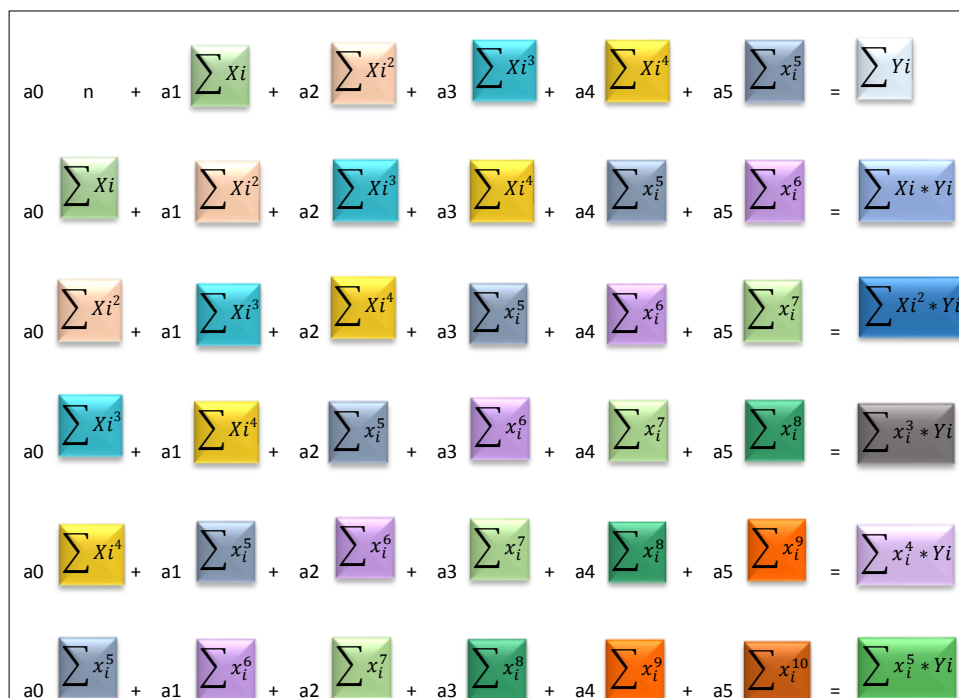
❖ Con el conjunto de datos  $\beta_1$ ( $\mu\text{L gas/día}$ ), que se corresponde a cada una de las temperaturas de trabajo, se realizó un gráfico  $\beta_1$  vs .temperatura.

❖ Con esta información se realizó una regresión polinómica, con la intención de encontrar un polinomio con modelo semejante a:

$$y = a_0 + a_1 \cdot x^1 + a_2 \cdot x^2 + \dots + a_n \cdot x^n$$

Donde:

$a_0, a_1, a_2 \dots a_n$ ; se encuentran mediante el sistema de matriz



Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 2.5 MATRIZ MODELO PARA DETERMINAR LOS COEFICIENTES DE REGRESIÓN POLINÓMICA**

- ❖ La regresión polinómica se inicia con el análisis de un polinomio de grado 2, se determina el factor de correlación utilizando las relaciones:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{Sr}{n-(m+1)}}$$

$$S_y = \sqrt{\frac{St}{n-1}}$$

$$R = \sqrt{R^2}$$

$$R^2 = \frac{St - Sr}{St}$$

- ❖ Si el valor R es menor a 0.9, se incrementa el grado del polinomio y se repite el análisis de regresión polinómica; se seguirá incrementando el grado del polinomio hasta encontrar un valor R mayor a 0.9.
- ❖ A la ecuación que se obtuvo de la regresión polinómica se le aplicó la primera derivada; esta nueva ecuación se iguala a 0 y se encuentran las raíces.
- ❖ Los valores encontrados son valores de temperatura.
- ❖ El valor "0" indica que no existe una inclinación de la recta en ese punto tangente con el polinomio original, es decir que la recta es una línea constante paralela al eje "x".



- ❖ Al interpretar gráficamente se tiene, que el polinomio tangente en un punto solo pueden darse en el punto máximo del polinomio o el punto mínimo del polinomio.
- ❖ Esto quiere decir que al encontrar las raíces de la derivada y estos valores sustituirlos en el polinomio original, se encontrará los valores máximos o mínimos de  $\beta_1 = \left( \mu L \text{ gas} / \text{dia} \right)$ , que puede generar el modelo de estimación que se encuentra por regresión polinómica.

## 2.3 Determinación de pH óptimo

### 2.3.1. Materiales

Los equipos, instrumentos, materiales y reactivos utilizados durante esta etapa de experimentación fueron los siguientes.

- Reactivos
  - Sulfato de amonio
  - Fosfato mono potásico
  - Sulfato de magnesio
  - Glucosa
  - Agua ultra pura
  - Solución HCl 1 N

- Solución NaOH 1N
- Materiales
- Tubos con tapa rosca
  - Tubos de precipitación de eritropoyetina
  - Pipeta Pasteur
  - Pera pipeteadora
  - Asa de siembra
  - Plato de pesada
  - Espátula
  - Agitador magnético
  - Tubos de vidrio pequeños
  - Pipeta
  - Matraz de Erlenmeyer
- Instrumentos
- Balanza analítica
- Agitador
- Lector grados macfarlán
- pH meter
- Equipos
- Autoclave
- Cámara de flujo

### **2.3.2. Metodología para determinar pH óptimo de crecimiento.**

La metodología usada para determinar el pH óptimo al generar gas en la fermentación se describe de la siguiente forma:

- ❖ Se prepara un caldo de cultivo base con glucosa tal como se lo indica en el ítem 2.1.2.2. y se separa en 5 diferentes matraz de Erlenmeyer.
- ❖ Utilizando el pH metro se ajusta cada una de las soluciones, con solución de HCl 1 N, o en caso de subir el pH se utiliza solución NaOH 1 N. De esta manera se tendrá muestras con 5 diferentes pH.
- ❖ Se preparan los tubos de ensayo junto con los tubos de precipitación de eritroproyectina a manera de campanas, para cada una de las muestras de pH.
- ❖ Las muestras se las identifica debidamente con un código de muestra, pH, y fecha de inoculación.
- ❖ Los tubos de ensayo debidamente rotulados se llevan a la autoclave a 120 °C por 20 minutos.
- ❖ Una vez fríos los tubos de ensayo con caldo de cultivo se procede a inocular con la cepa de ensayo.
- ❖ Se prepara el inóculo a partir de la caja Petri donde se siembra en masa; se toma una pequeña parte de la biomasa de la superficie y se la disuelve en 40 ml de agua ultra pura.

- ❖ Se agita hasta disolver la biomasa en el agua y se procede a leer en el turbidímetro hasta obtener 0,5° Mcfarland.
- ❖ Se inocula 1 ml de la solución con inóculo en cada uno de los tubos de ensayo, esto como cultivo de iniciación de la fermentación.
- ❖ En el transcurso de los días se observará la formación de gas y como queda atrapado en el tubo a manera de campana. La razón de crecimiento de la burbuja son los datos que se registran diariamente para realizar sobre ellos un análisis de esta etapa de experimentación.
- ❖ Para esta etapa, la temperatura de fermentación con que se trabaja este escenario, será la que se determinó en la fase anterior de experimentación.
- ❖ Se registró durante 10 días las lecturas generadas en los tubos de ensayo, esto se refiere al tamaño de la burbuja formada en la campana.
- ❖ Se graficó el conjunto de datos registrados para cada uno de los eventos; un gráfico para cada uno de los pH de trabajo.
- ❖ Se realizó una regresión lineal sobre cada conjunto de datos con el fin de obtener la pendiente de cada una de las ecuaciones; el método para encontrar los valores de interés es el mismo que se utilizó en la fase de “determinación de temperatura óptima” en el ítem 2.2.2.

- ❖ Con cada una de las pendientes halladas y que se corresponde a cada una de los pH de trabajo se realizó un gráfico, pH vs.  $\beta_1$ ; con esta información se realizó una regresión polinómica, hasta encontrar un valor R mayor a 0.9; la metodología para una regresión polinómica será la misma que se utilizó en la “determinación de temperatura óptima” en el ítem 2.2.2.
- ❖ A la ecuación que se obtuvo de la regresión polinómica se le aplicó la primera derivada.
- ❖ Se encuentran las raíces del polinomio de la derivada.
- ❖ Las raíces encontradas indican el valor de pH donde  $\beta_1$  es máximo o mínimo.

#### **2.4 Determinación de la Calidad de Alcohol Obtenido**

El tipo de alcohol obtenido se determinó en dos diferentes tipos de muestra, por medio de la lectura del cromatógrafo de gases sobre el alcohol que proviene de la muestra destilada.

La primera muestra fue el caldo de cultivo de glucosa que corresponde al pH en que se maximiza la producción de alcohol; y para la segunda muestra se utilizó jugo de uva al que se le inoculó la cepa estudiada y se permitió el proceso de fermentación.

Sobre la muestra de jugo de uva fermentado se realizó dos tipos de análisis: La determinación de tipo de alcohol y determinación de porcentaje de alcohol presente en la muestra por método volumétrico.

Previo a los análisis que se realizan sobre jugo de uva fermentado se debe preparar la muestra. Para la cromatografía la muestra debe ser destilada a temperatura controlada de 80°C; para el análisis de determinación de porcentaje de alcohol existente en la muestra, se somete a una destilación total de la muestra.

#### **2.4.1. Materiales**

##### **2.4.1.1. Materiales para la destilación de caldo de glucosa**

Para la primera muestra los equipos, instrumentos, materiales y reactivos utilizados durante esta etapa de experimentación fueron los siguientes.

- Materiales
  - Papel filtro
  - Beaker 100 ml
  - Matraz de destilación de 100 cm<sup>3</sup> de capacidad.
  - Trampa de arrastre.

- Condensador vertical
- Bureta de 10 cm<sup>3</sup>
- Termómetro
- Soporte universal
- Jeringa
- Instrumentos
- Platina calentadora
- Equipo
- Cromatógrafo de gases

#### **2.4.1.2. Materiales para preparación de muestra jugo de uva fermentado**

Para el segundo tipo de muestra en su primera etapa experimental, obtención del jugo de uva fermentado, se requieren los siguientes reactivos, materiales, equipos e instrumentos:

- Materia prima
- Uva
- Materiales
- Botella de vidrio 2L
- Tapón de caucho
- Tubo de vidrio
- Beaker

- Agua ultra pura
- Instrumentos
- Extractor de jugo
- Equipos
- Autoclave
- Cámara de flujo
- Nevera a 20°C

#### **2.4.1.3. Materiales para la determinación de tipo de alcohol en jugo de uva fermentado**

Una vez terminada la fase de fermentación, los equipos a utilizar en la etapa de destilación de la muestra son los siguientes:

- Materiales
- Matraz 1000 ml
- Balón de destilación de 1000 cm<sup>3</sup> de capacidad.
- Trampa de arrastre.
- Condensador vertical
- Bureta de 100 cm<sup>3</sup>
- Termómetro
- Soporte universal
- Jeringa
- Instrumentos



- Manta calefactora.
- Cromatógrafo de gases

#### **2.4.1.4. Materiales para la determinación de contenido alcohólico por método volumétrico y gravimétrico en el jugo de uva fermentado.**

Los materiales, instrumentos y equipos utilizados en la determinación de método volumétrico destilación son los siguientes:

- Materiales
  - Tubos con rosca
  - Balón de destilación de 1000 cm<sup>3</sup>
  - Torre de corrección.
  - Condensador vertical
  - Soporte universal
  - Matraz aforado de 100 cm<sup>3</sup>
  - Pipeta volumétrica de 50 cm<sup>3</sup>
  - Pipeta de transferencia de 50 cm<sup>3</sup>
  - Picnómetro
- Instrumentos y equipos
  - Centrifuga
  - Manta calefactora
  - Balanza analítica

- Cromatógrafo de gases

## **2.4.2. Métodos**

### **2.4.2.1. Determinación de la calidad de alcohol en caldo de glucosa**

En esta fase experimental se analiza la muestra que se obtiene en el escenario de temperatura óptima y pH óptimo, donde la generación de gas es máxima. El procedimiento a seguir fue el siguiente:

- ❖ Se filtró la muestra para retener la biomasa que se generó en el proceso de fermentación.
- ❖ Se colocó la muestra en un matraz con cuello esmerilado.
- ❖ Se conectó el matraz al equipo de destilación y se dispuso una bureta de 10 cm<sup>3</sup> para recibir el destilado.
- ❖ La temperatura del vapor de arrastre de la destilación no debe exceder los 80°C, que es la temperatura de ebullición del alcohol etílico.



Fuente: CIBE – Katty Zambrano, 2014

### **FIGURA 2.6 EQUIPO DE DESTILACIÓN**

❖ Una vez se obtienen  $2 \text{ cm}^3$  de destilado, se identificó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) en un equipo marca Agilent Technologies. Se utilizó una columna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm) con fenil dimetilpolisiloxano como fase estacionaria (0,25 micras de espesor de película) y helio como gas de arrastre (0,8 ml/min). Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron: Temperatura de inyección (100°C) modo splitless, temperatura del detector (280°C), la temperatura del horno se mantuvo en 50°C por 2 minutos, después se incrementó hasta 180°C a un gradiente de 5°C/min.

#### **2.4.2.2. Determinación de la calidad de alcohol en una fermentación de jugo de uva**

Para esta muestra de diferente naturaleza se necesita preparar la muestra en dos etapas:

- La primera etapa, consiste en inocular la levadura en jugo de uva y dejar actuar al microorganismo, para que realice el proceso de fermentación alcohólica.
- La segunda etapa, una vez que se complete el tiempo de fermentación sobre el jugo de uva, se prepara la muestra con la que se efectuará dos operaciones: Destilación de la muestra para realizar la lectura con el cromatógrafo de gases y destilar la muestra para determinar el porcentaje de alcohol de la muestra.

#### ***Inoculación en jugo de uva de la cepa en estudio***

- Se desinfectaron las uvas con una solución de kilol durante 5 minutos y se la separo del tallo.
- Las uvas seleccionadas se les extrajo el jugo con un equipo extractor que separo el jugo de la pulpa.
- El jugo de uva se pasteurizó en autoclave 15 minutos a 120°C.
- Una vez frío el jugo de uva pasteurizado, se trabajó dentro de la campana de flujo para inocular la cepa en estudio en el jugo de uva.

- El inóculo se preparó a partir de la biomasa de la caja Petri con la cepa en estudio verificada y agua ultra pura.
- Se preparó 5 ml de inóculo con 5 Mcfarland de turbidez.
- Se coloca el cultivo iniciador en la botella de jugo pasteurizado y se tapa con tapón de caucho al que se le adapta una trampa de agua, para evitar el ingreso de aire y permitir la salida de gas.
- El jugo de uva ya inoculado con la cepa se dejó fermentar 20 días a 20°C.



Fuente: CIBE – Kattya Zambrano, 2014

**FIGURA 2.7 BOTELLAS CON JUGO FERMENTADO Y TRAMPAS  
DE GAS**

***Determinación de calidad de alcohol que se obtiene de la fermentación del jugo de uva***

Una vez terminada la etapa de fermentación, se prepara la muestra de jugo fermentado para realizar la destilación, con la que se determinará el tipo de alcohol obtenido por medio de cromatografía de gases:

- ✓ La muestra se calienta y se agita por 5 minutos a 60°C, esto con el fin de ayudar a precipitar o inactivar la biomasa.
- ✓ Posterior a esto, se somete a centrífuga la muestra para separar la biomasa, los parámetros de trabajo de la centrífuga: 4°C, 12000 rpm durante 20 minutos.
- ✓ Se separa el sobrenadante que se obtiene de la centrífuga, trasvasándolo a otro recipiente.
- ✓ Se repite el procedimiento de destilación que se practicó con el caldo de glucosa y se menciona en el ítem 2.4.2.1.
- ✓ El destilado se identificó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), en un equipo marca Agilent Technologies. Se utilizó una columna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm) con fenil dimetilpolisiloxano, como fase estacionaria (0,25 micras de espesor de película) y helio como gas de arrastre (0,8 ml/min). Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron: Temperatura de inyección (100°C) modo splitless, temperatura del

detector (280°C), la temperatura del horno se mantuvo en 50°C por 2 minutos, después se incrementó hasta 180°C a un gradiente de 5°C/min.

### ***Determinación de contenido alcohólico por método volumétrico y gravimétrico***

Para la evaluación de la cantidad de alcohol presente en el jugo fermentado de uva, se utilizó el procedimiento de la norma INEN 2 322:2002 y se procedió de la siguiente forma:

- Se centrifugo el jugo fermentado para separar la biomasa, con los parámetros de 4°C, 12000 rpm durante 20 minutos.
- El líquido separado de la biomasa se calentó a 60°C por 5 minutos.
- Se pipetea 100 cm<sup>3</sup> de muestra des-gasificada (la muestra pierde el gas a 60°C) a 20 °C, colocar dentro de un balón de destilación, a continuación se añade 50 cm<sup>3</sup> de agua.
- Conectar el balón al equipo de destilación, y disponer de un matraz aforado de 100 cm<sup>3</sup> para recibir el destilado.
- Destilar alrededor de 96 cm<sup>3</sup>, a una velocidad uniforme entre 30 y 60 minutos.
- El destilado obtenido se mezcla bien. Ajustar a la temperatura de 20°C y completar el volumen con agua destilada.

- Basándonos en la norma técnica INEN 2 322:2002, se determina la cantidad de alcohol en la muestra por método volumétrico. Utilizando las siguientes formulas.

Donde:

*Alcohol % en volumen*

$$= \frac{(\text{alcohol \% volumen en el destilado})(\text{gravedad específica de la muestra})}{\text{gravedad específica del destilado}}$$

*Alcohol % en volumen*

$$= \frac{(\text{alcohol \% masa en el destilado})(\text{gravedad específica de la muestra})}{(\text{gravedad específica del alcohol etílico})}$$

O gravimétrico.

$$\text{Alcohol \% en masa} = \frac{\text{gr alcohol por } 100 \text{ cm}^3}{\text{gravedad específica de la muestra}}$$

Se determina la gravedad específica para el jugo fermentado y para el producto de la destilación, así se tiene que:

$$\text{Gravedad específica} = \frac{mc - mo}{ma - mo}$$

Donde:

- mo: masa del picnómetro vacío
- mc: masa del picnómetro con muestra a 20 °C
- ma: masa del picnómetro con agua a 20 °C



- El porcentaje de alcohol en volumen, o el porcentaje de alcohol en masa así como los gramos de alcohol en 100 cm<sup>3</sup> de destilado, se determina usando la tabla en el ANEXO 1 A partir de la gravedad específica del destilado.

# CAPÍTULO 3

## 3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Seguido a cada una de las fases experimentales se analizaron los datos generados para la caracterización del agente en estudio.

### 3.1 Temperatura Óptima

La producción de gas se observó por medio de la acción fermentativa de la levadura en estudio sobre sustrato de glucosa y fructosa; teniendo varios escenarios de fermentación caracterizados por diferentes temperaturas, de forma que se obtuvieron un conjunto de datos para cada uno de los eventos analizados.

Los datos se generaron registrando diariamente, el incremento de la burbuja de gas retenida dentro de los tubos de campana para los tubos con caldo de glucosa se tiene la siguiente tabla:

**TABLA 8**  
**MICRO LITROS DE GAS GENERADOS EN CALDO DE**  
**GLUCOSA**

	<i>pH 3,25</i>				<i>pH 4,66</i>			
	<b>5°C</b>	<b>10°C</b>	<b>16°C</b>	<b>27°C</b>	<b>5°C</b>	<b>10°C</b>	<b>16°C</b>	<b>25°C</b>
1	200	10	20	65	200	100	5	130
2	380	25	80	125	360	260	130	250
3	440	65	420	215	540	400	465	330
4	500	120	520	290	780	600	550	630
5	540	190	780	365	840	840		830
6	700	280	1000	410	1000	1000		1000
7	840	525		450				
8	1000	625		490				
9		705						

Elaborado por: Kattya Zambrano, 2014

De la misma forma, el registro diario se dio para la muestra inoculada en caldo de fructosa, los datos generados se muestran en la siguiente tabla:

**TABLA 9**  
**MICRO LITROS DE GAS GENERADOS EN CALDO DE**  
**FRUCTOSA**

	<i>pH 3,25</i>				<i>pH 4,66</i>		
	<b>5°C</b>	<b>10°C</b>	<b>16°C</b>	<b>27°C</b>	<b>5°C</b>	<b>10°C</b>	<b>25°C</b>
1	200	100	30	40	300	80	265
2	280	200	130	120	580	120	515
3	440	340	250	250	680	170	845
4	560	420	390	380	700	320	1000
5	700	600	590	400	740	700	
6	860	680	850	450	750	940	
7	1000	720	1000	480		1000	
8		1000		490			
9				500			

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

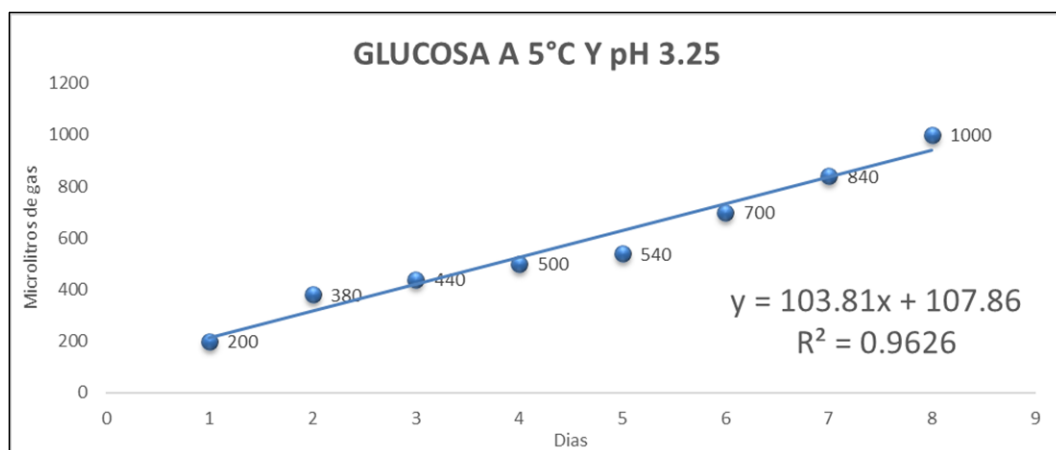
Con los datos se generó un análisis de regresión lineal para cada uno de los eventos mostrados en las tablas.

A continuación se muestran las tablas de análisis de varianza con un nivel de confianza de 95% y se calculó el coeficiente de correlación junto a los gráficos de tendencia lineal que se corresponde a cada evento.

**TABLA 10**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN**  
**GLUCOSA 5°C Y pH 3,25**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	Valor P ( $\alpha = 0,05$ )
<b>Regresión</b>	452609.52	1	452609.52	154.38	1,65*10 <sup>-5</sup>
<b>Error</b>	17590.47	6	2931.74		
<b>Total</b>	470200	7			
$S_x^2$		5.25		Siendo Fo mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye q existe una relación lineal para el modelo analizado	
$S_y^2$		58775			
$S_{xy}$		545			
<b>R</b>		0.98111			

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



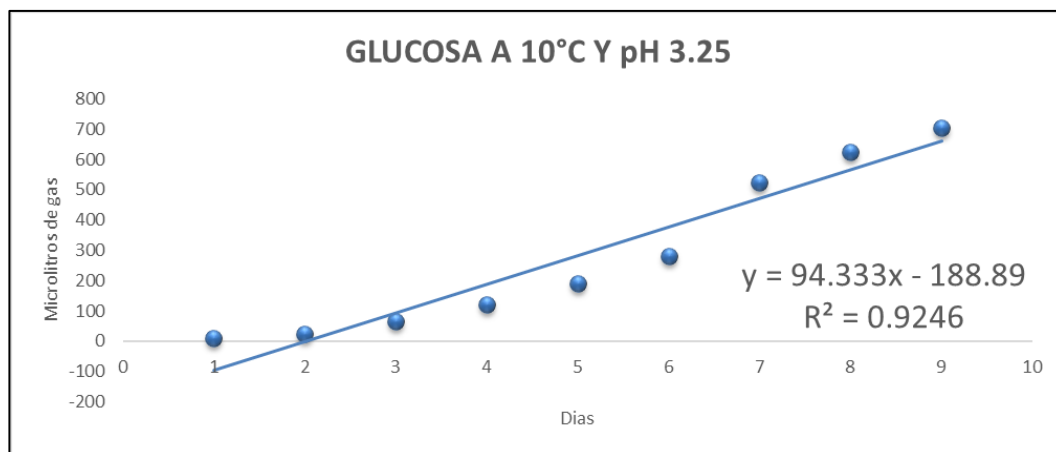
Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.1  $\mu$ L DE GAS EN CALDO DE GLUCOSA A 5°C Y pH 3,25**

**TABLA 11**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN**  
**GLUCOSA 10°C Y pH 3,25**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	Valor P ( $\alpha = 0,05$ )
<b>Regresión</b>	533926.66	1	533926.66	85.8622	$3.52 \cdot 10^{-5}$
<b>Error</b>	43528.88	7	6218.41		
<b>Total</b>	577455.55	8			
$S_x^2$		6.66		Siendo Fo mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existe una relación lineal para el modelo analizado	
$S_y^2$		64161.72			
$S_{xy}$		628.88			
<b>R</b>		0.9615			

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



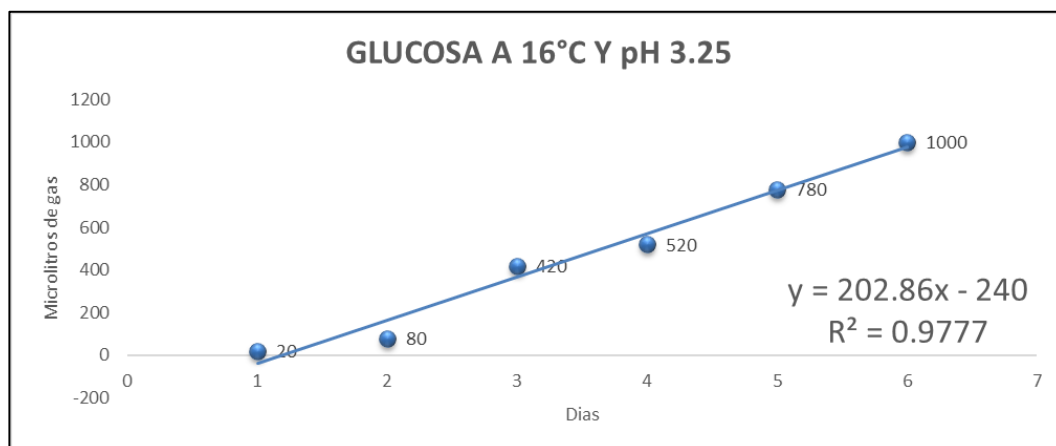
Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.2  $\mu$ L DE GAS EN CALDO DE GLUCOSA A 10°C Y pH 3,25**

**TABLA 12**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN**  
**GLUCOSA 16°C Y pH 3,25**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	Valor P ( $\alpha = 0,05$ )
<b>Regresión</b>	720142.85	1	720142.85	175.03	0.0001886
<b>Error</b>	16457.14	4	4114.28		
<b>Total</b>	736600	5			
$S_x^2$		2.9116		Siendo Fo mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye q existe una relación lineal para el modelo analizado	
$S_y^2$		122766.66			
$S_{xy}$		591.66			
<b>R</b>		0.9887			

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



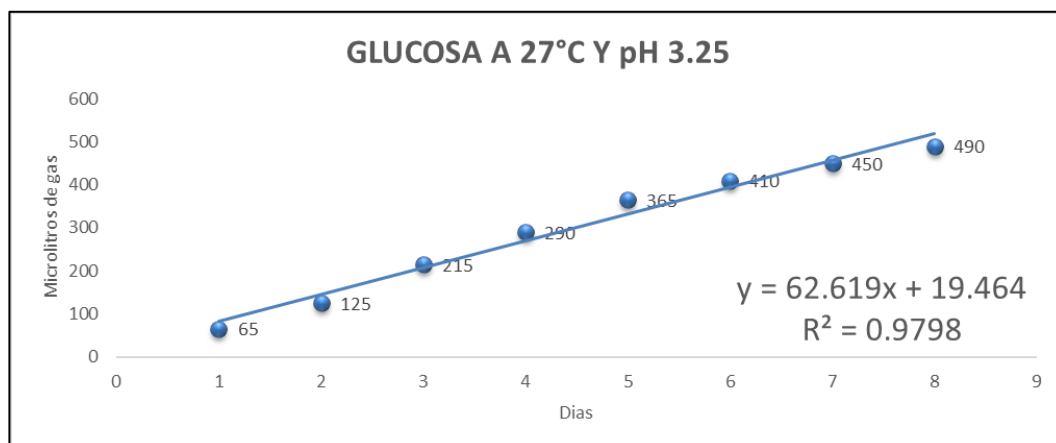
Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.3  $\mu$ L DE GAS EN CALDO DE GLUCOSA A 16°C Y pH 3,25**

**TABLA 13**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN**  
**GLUCOSA 27°C Y pH 3,25**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	Valor P ( $\alpha = 0,05$ )
<b>Regresión</b>	164688.09	1	164688.09	290.6769	2.605*10 <sup>-6</sup>
<b>Error</b>	3399.40	6	566.56		
<b>Total</b>	168087.5	7			
$S_x^2$		5.25		Siendo Fo mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye q existe una relación lineal para el modelo analizado	
$S_y^2$		21010.93			
$S_{xy}$		328.75			
<b>R</b>		0.9898			

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

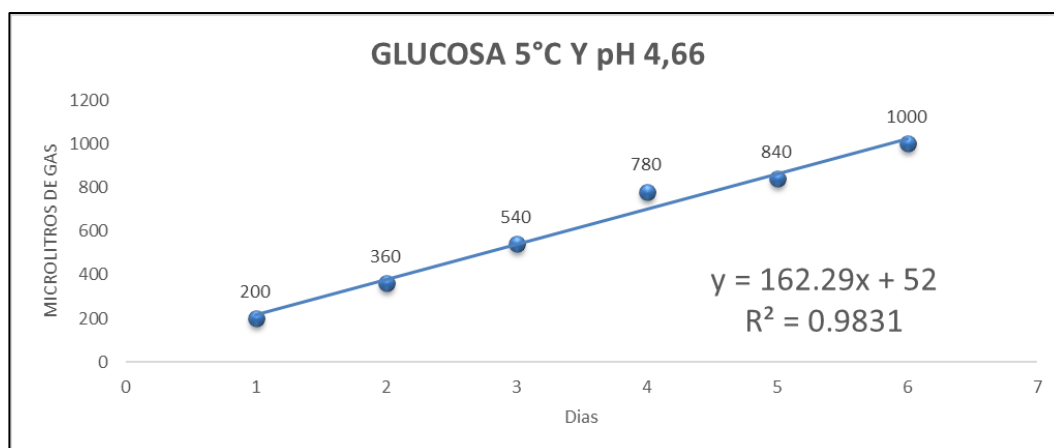
**FIGURA 3.4  $\mu$ L DE GAS EN CALDO DE GLUCOSA A 27°C Y pH 3,25**



**TABLA 14**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN**  
**GLUCOSA 5°C Y pH 4,66**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	Valor P ( $\alpha = 0,05$ )
<b>Regresión</b>	460891.42	1	460891.429	233.11	0.00010733
<b>Error</b>	7908.5714	4	1977.14		
<b>Total</b>	468800	5			
$S_x^2$			2.9166	Siendo Fo mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye q existe una relación lineal para el modelo analizado	
$S_y^2$			78133.33		
$S_{xy}$			473.333		
<b>R</b>			0.9915		

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



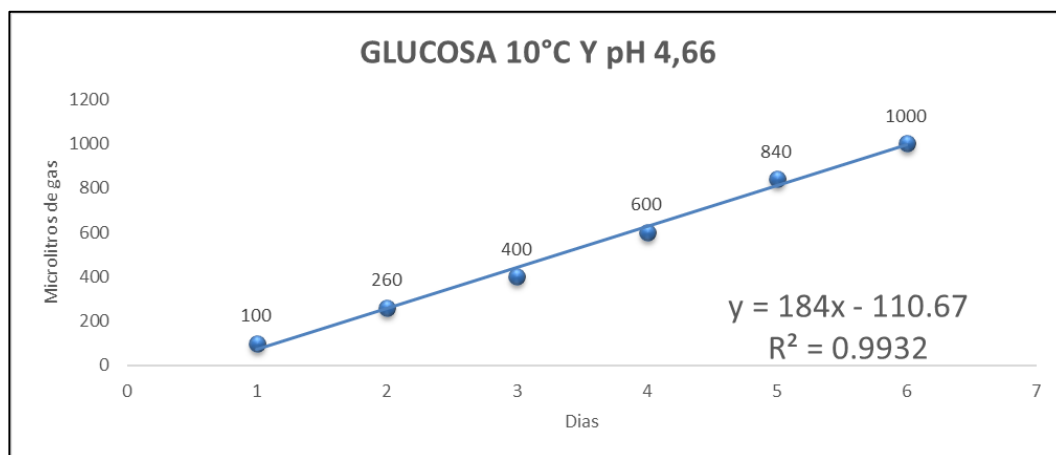
Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.5  $\mu$ L DE GAS EN CALDO DE GLUCOSA A 5°C Y pH 4,66**

**TABLA 15**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN**  
**GLUCOSA 10°C Y pH 4,66**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	Valor P ( $\alpha = 0,05$ )
<b>Regresión</b>	592480	1	592480	584.68	$1.73 \cdot 10^{-5}$
<b>Error</b>	4053.3333	4	1013.33		
<b>Total</b>	596533.33	5			
$S_x^2$			2.91	Siendo Fo mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye q existe una relación lineal para el modelo analizado	
$S_y^2$			99422.22		
$S_{xy}$			536.66		
<b>R</b>			0.9965		

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



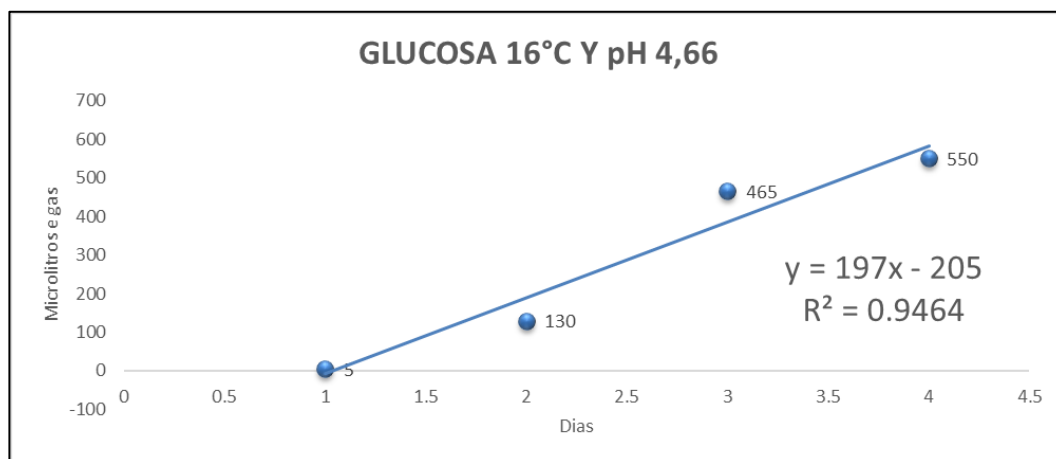
Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.6  $\mu$ L DE GAS EN CALDO DE GLUCOSA A 10°C Y pH 4,66**

**TABLA 16**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN**  
**GLUCOSA 16°C Y pH 4,66**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	Valor P ( $\alpha = 0,05$ )
<b>Regresión</b>	194045	1	194045	35.35	0.02714
<b>Error</b>	10980	2	5490		
<b>Total</b>	205025	3			
$S_x^2$		1.25		Siendo Fo mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye q existe una relación lineal para el modelo analizado	
$S_y^2$		51256.25			
$S_{xy}$		246.25			
<b>R</b>		0.972854			

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



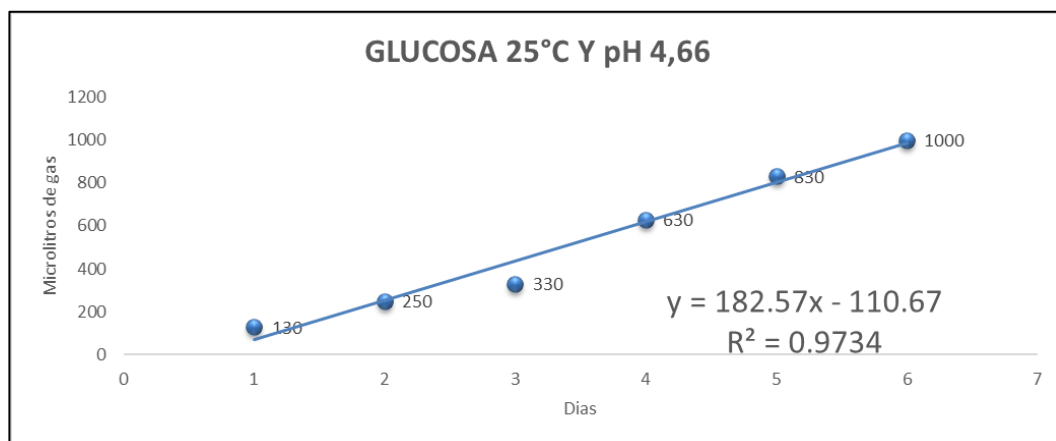
Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.7  $\mu$ L DE GAS EN CALDO DE GLUCOSA A 16°C Y pH 4,66**

**TABLA 17**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN**  
**GLUCOSA 25°C Y pH 4,66**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	Valor P ( $\alpha = 0,05$ )
<b>Regresión</b>	583315.71	1	583315.714	146.12	0.0002686
<b>Error</b>	15967.61	4	3991.90		
<b>Total</b>	599283.33	5			
$S_x^2$			2.9166	Siendo Fo mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye q existe una relación lineal para el modelo analizado	
$S_y^2$			99880.55		
$S_{xy}$			532.5		
<b>R</b>			0.9865		

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



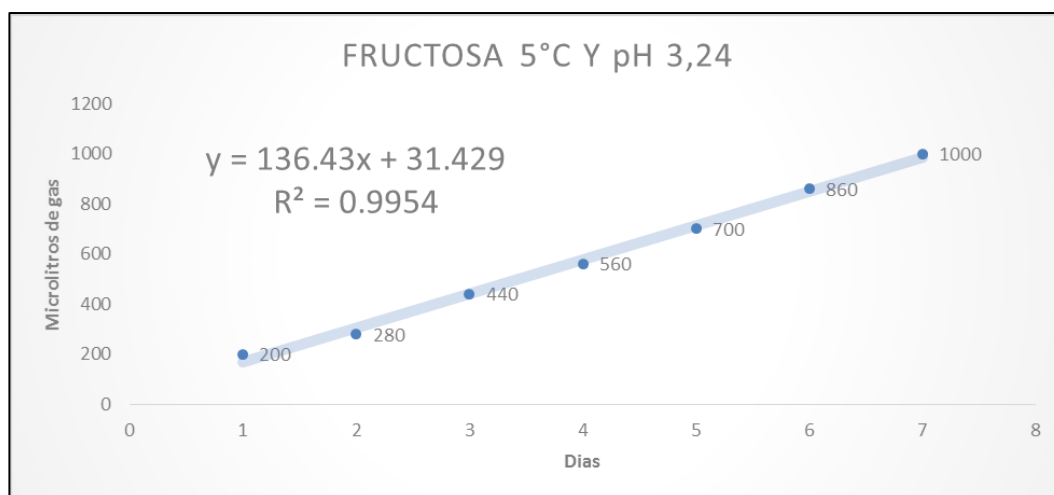
Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.8  $\mu$ L DE GAS EN CALDO DE GLUCOSA A 25°C Y pH 4,66**

**TABLA 18**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN**  
**FRUCTOSA 5°C Y pH 3,24**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	Valor P ( $\alpha = 0,05$ )
<b>Regresión</b>	521157.14	1	521157.14	1092.24	4.76*10 <sup>-7</sup>
<b>Error</b>	2385.71	5	477.14		
<b>Total</b>	523542.85	6			
$S_x^2$		4		Siendo Fo mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye q existe una relación lineal para el modelo analizado	
$S_y^2$		74791.83			
$S_{xy}$		545.71			
<b>R</b>		0.9977			

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



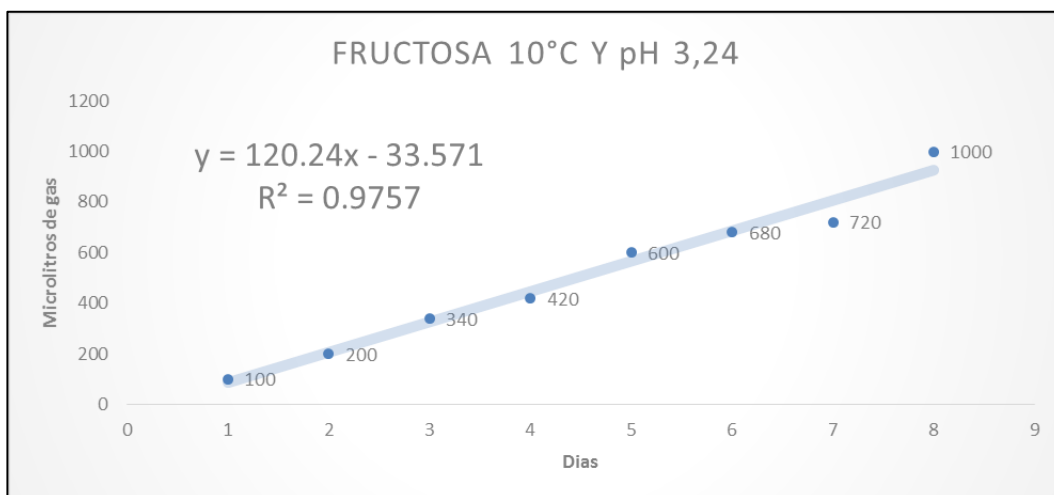
Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.9  $\mu$ L DE GAS EN CALDO DE FRUCTOSA A 5°C Y pH 3,24**

**TABLA 19**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN**  
**FRUCTOSA 10°C Y pH 3,24**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F <sub>o</sub>	Valor P (α = 0,05)
<b>Regresión</b>	607202.38	1	607202.38	240.51	4.54*10 <sup>-6</sup>
<b>Error</b>	15147.61	6	2524.60		
<b>Total</b>	622350	7			
$S_x^2$		5.25		Siendo F <sub>o</sub> mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye q existe una relación lineal para el modelo analizado	
$S_y^2$		77793.75			
$S_{xy}$		631.25			
<b>R</b>		0.9877			

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



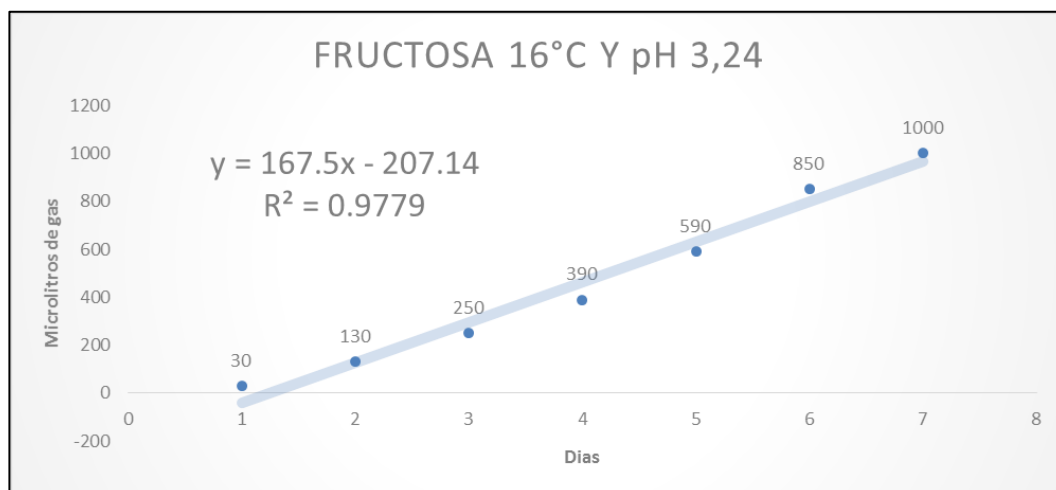
Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.10 μL DE GAS EN CALDO DE FRUCTOSA A 10°C Y pH 3,24**

**TABLA 20**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN**  
**FRUCTOSA 16°C Y pH 3,24**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	Valor P ( $\alpha = 0,05$ )
<b>Regresión</b>	785575	1	785575	221.06	$2.48 \cdot 10^{-5}$
<b>Error</b>	17767.85	5	3553.57		
<b>Total</b>	8033.42	6			
$S_x^2$		4		Siendo Fo mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye q existe una relación lineal para el modelo analizado	
$S_y^2$		114763.26			
$S_{xy}$		670			
<b>R</b>		0.9888			

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



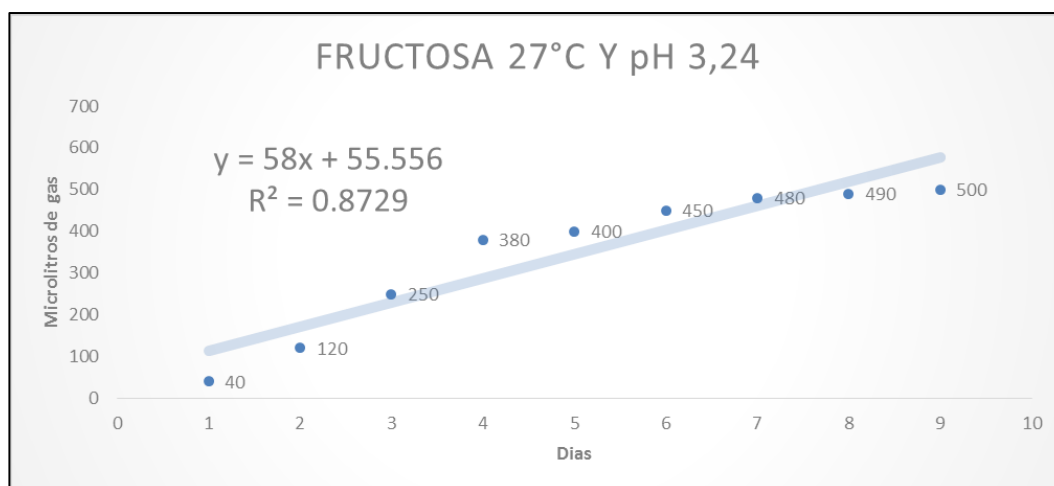
Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.11  $\mu$ L DE GAS EN CALDO DE FRUCTOSA A 16°C Y pH 3,24**

**TABLA 21**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN**  
**FRUCTOSA 27°C Y pH 3,24**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	Valor P ( $\alpha = 0,05$ )
<b>Regresión</b>	201840	1	201840	48.08	0.0002243
<b>Error</b>	29382.22	7	4197.46		
<b>Total</b>	231222.22	8			
$S_x^2$			6.66	Siendo Fo mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye q existe una relación lineal para el modelo analizado	
$S_y^2$			25691.35		
$S_{xy}$			386.66		
<b>R</b>			0.9343		

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

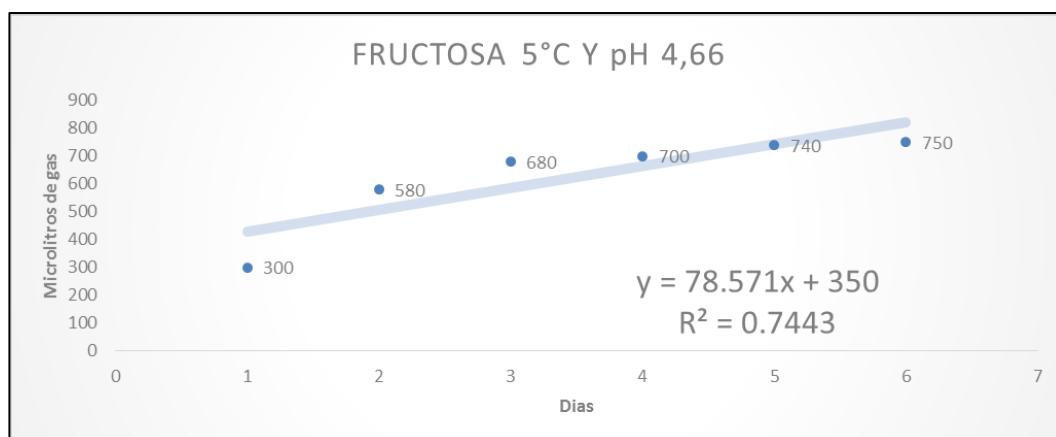
**FIGURA 3.12  $\mu$ L DE GAS EN CALDO DE FRUCTOSA A 27°C Y pH 3,24**



**TABLA 22**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN**  
**FRUCTOSA 5°C Y pH 4,66**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	Valor P ( $\alpha = 0,05$ )
<b>Regresión</b>	108035.71	1	108035.71	11.64	0.0269
<b>Error</b>	37114.28	4	9278.57		
<b>Total</b>	145150	5			
$S_x^2$			2.9166	Siendo Fo mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye q existe una relación lineal para el modelo analizado	
$S_y^2$			24191.66		
$S_{xy}$			229.16		
<b>R</b>			0.8627		

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



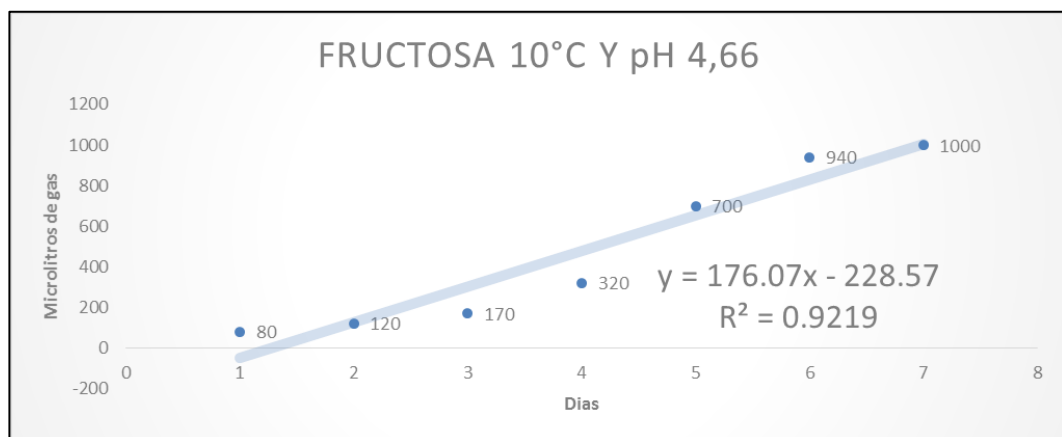
Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.13  $\mu$ L DE GAS EN CALDO DE FRUCTOSA A 5°C Y pH 4,66**

**TABLA 23**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN**  
**FRUCTOSA 10°C Y pH 4,66**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F <sub>o</sub>	Valor P ( $\alpha = 0,05$ )
<b>Regresión</b>	868032.14	1	868032.14	59.02	0.00059574
<b>Error</b>	73539.28	5	14707.85		
<b>Total</b>	941571.42	6			
$S_x^2$		4		Siendo F <sub>o</sub> mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye q existe una relación lineal para el modelo analizado	
$S_y^2$		134510.20			
$S_{xy}$		704.28			
<b>R</b>		0.96			

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



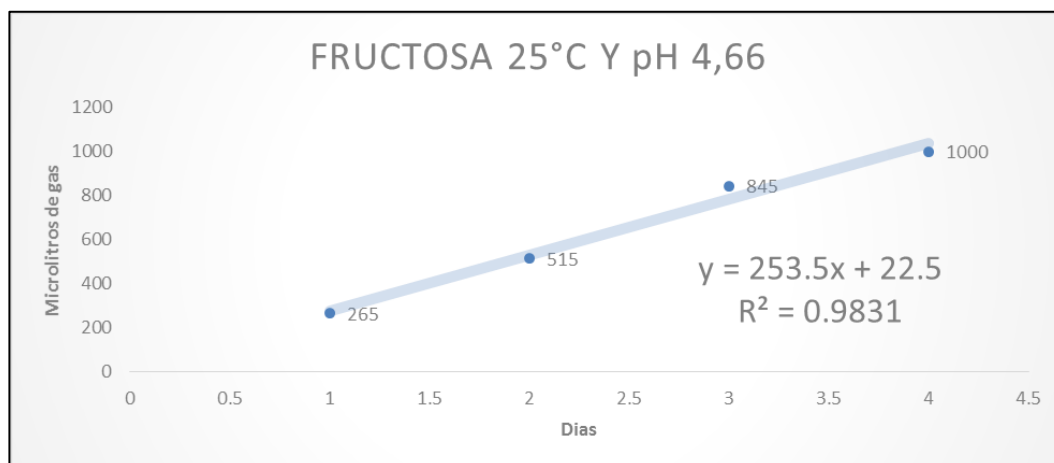
Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.14  $\mu$ L DE GAS EN CALDO DE FRUCTOSA A 10°C Y pH 4,66**

**TABLA 24**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN**  
**FRUCTOSA 25°C Y pH 4,66**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	Valor P ( $\alpha = 0,05$ )
<b>Regresión</b>	321311.25	1	321311.25	116.68	0.008461
<b>Error</b>	5507.5	2	2753.75		
<b>Total</b>	326818.75	3			
$S_x^2$			1.25	Siendo Fo mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye q existe una relación lineal para el modelo analizado	
$S_y^2$			81704.68		
$S_{xy}$			316.87		
<b>R</b>			0.9915		

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.15  $\mu$ L DE GAS EN CALDO DE FRUCTOSA A 25°C Y pH 4,66**

Como se observan en las figuras desde 3.1 hasta la figura 3.15, la tendencia de los datos generados fue predominantemente lineal.

De las ecuaciones que se obtienen, interesa la constante " $\beta_1$ " o pendiente del modelo lineal, ya que esta representa la relación entre, la generación de gas con respecto al tiempo, para cada uno de los eventos analizados; en la siguiente tabla se recoge la información de  $\beta_1$  para los eventos analizados.

**TABLA 25**  
**CONSTANTES DE MODELOS LINEALES  $\beta$  ( $\mu\text{L}/\text{DÍA}$ ) A VARIAS**  
**TEMPERATURAS**

pH	Temperatura (°C)	$\beta$ Glucosa	$\beta$ Fructosa
3,25	5	103,81	136,42
	10	94,33	120,23
	16	202,86	167,5
	27	62,61	58
4,66	5	162,29	78,57
	10	184	176,07
	16	197	
	25	182,57	253,5
3,25 y 4,66	30	0	0

Elaborado por: Kattya Zambrano, 2014

Con los datos se generó un análisis de regresión polinómica, un análisis para el caso del caldo de cultivo con glucosa y otro análisis para el caldo de cultivo de fructosa.

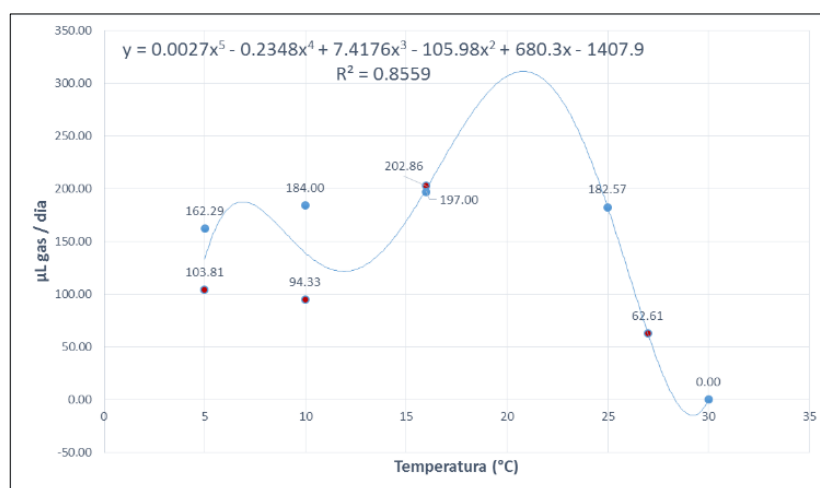
A continuación se muestran las tablas de determinación del coeficiente de correlación, junto a los gráficos de tendencia polinómica que se corresponde a cada evento.

**TABLA 26**

**DETERMINACIÓN DE CORRELACIÓN DE  $\beta$  ( $\mu\text{L/DÍA}$ ) VS. TEMPERATURA PARA GLUCOSA**

$S_{y/x}$	<b>43.77</b>
$S_y$	<b>70,6</b>
$R^2$	<b>0,8558</b>
R	<b>0,9251</b>

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



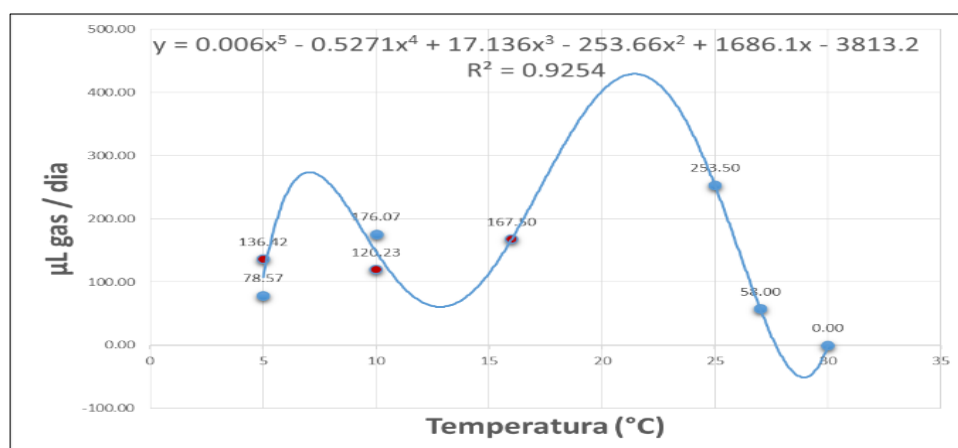
Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.16  $\beta$  ( $\mu\text{L/DÍA}$ ) VS. TEMPERATURA PARA GLUCOSA**

**TABLA 27**  
**DETERMINACIÓN DE CORRELACIÓN DE  $\beta$  ( $\mu\text{L}/\text{DÍA}$ ) VS.**  
**TEMPERATURA PARA FRUCTOSA**

$S_{y/x}$	<b>40,20</b>
$S_y$	78,6836
$R^2$	0,9254
R	0,9619

Elaborado por: Kattya Zambrano, 2014



Elaborado por: Kattya Zambrano, 2014

**FIGURA 3.17  $\beta$  ( $\mu\text{L}/\text{DÍA}$ ) VS. TEMPERATURA PARA FRUCTOSA**

Los valores R que son los coeficientes de correlación múltiple para los modelos matemáticos de Glucosa y Fructosa son respectivamente 0,9251 y 0,9619; ambos valores indican que el modelo matemático de estimación es muy próximo a los valores de experimentación.

Al determinar la confianza de los modelos matemáticos, se toma la primera derivada de cada uno de los polinomios y se encuentran las raíces; las raíces del polinomio de la primera derivada indican las temperaturas donde, al evaluar en el polinomio original se encuentran los valores máximos y mínimos del valor  $\beta$  ( $\mu\text{L gas/día}$ ). Se muestran los polinomios característicos que modelan la velocidad de fermentación en el caldo de glucosa:

$$y_{Glucosa} = 0,0027x^5 - 0,2348x^4 + 7,4176x^3 - 105,98x^2 + 680,3x - 1407,9$$

$$\left(\frac{dy}{dx}\right)_{Glucosa} = 0,0135x^4 - 0,9392x^3 + 22,2528x^2 - 211,96x + 680,3$$

Al evaluar en el polinomio original las temperaturas encontradas por medio de la primera derivada, se tiene los siguientes valores:

**TABLA 28**  
**TEMPERATURAS DONDE SE MAXIMIZA Y MINIMIZA LA**  
**PRODUCCIÓN DE GAS EN GLUCOSA**

	<b>Temperatura (°C)</b>	<b><math>\beta_{polinomio}</math></b>
<b>Máximos</b>	6,8672	187,22
	19,2695	<b>222,93</b>
<b>Mínimos</b>	12,1876	115,05
	31,2461	-733,89

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

Se muestran los polinomios característicos que modelan la velocidad de fermentación en el caldo de fructosa:

$$y_{Fructosa} = 0,006x^5 - 0,5271x^4 + 17,136x^3 - 253,66x^2 + 1686,1x - 3813,2$$

$$\left(\frac{dy}{dx}\right)_{Fructosa} = 0,03x^4 - 2,1084x^3 + 51,408x^2 - 507,32x + 1686,1$$

Al evaluar en el polinomio original las temperaturas encontradas por medio de la primera derivada, se tiene los siguientes valores:

**TABLA 29**  
**TEMPERATURAS DONDE SE MAXIMIZA Y MINIMIZA LA**  
**PRODUCCIÓN DE GAS EN FRUCTOSA**

	<i>Temperatura (°C)</i>	<i><math>\beta_{polinomio}</math></i>
<b>Máximos</b>	7,04	275,14
	21,4373	<b>423,62</b>
<b>Mínimos</b>	12,8514	58,34
	28,9427	-55,50

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

### 3.2 pH óptimo

Del análisis anterior se determinó que la temperatura donde se maximiza la variable  $\beta$  ( $\mu\text{L gas/día}$ ), es 19,27°C para glucosa y 21,43°C para fructosa; la siguiente etapa de experimentación incluye la variable pH, esta vez se establece el escenario con temperatura constante y pH variable. Así se tendrá los siguientes



escenarios: caldo de glucosa inoculado con la levadura en estudio y temperatura de fermentación 20° como parámetros estables de los escenarios estudiados; y pH del caldo de glucosa ajustado a 5 diferentes valores.

Los datos se generaron por registro diario del incremento del volumen de la burbuja de gas retenida dentro de los tubos de campana, en la siguiente tabla se observan los registros de esta etapa de experimentación.

**TABLA 30**  
**MICRO LITROS DE GAS GENERADOS EN CALDO DE**  
**GLUCOSA A 20°C Y DIFERENTES pH**

	<b>3,18</b>	<b>4,14</b>	<b>5,09</b>	<b>6,28</b>	<b>6,8</b>
<b>1</b>	10	30	40	0	60
<b>2</b>	260	400	140	0	260
<b>3</b>	420	520	330	0	480
<b>4</b>	750	770	510	0	780
<b>5</b>	1000	1000	810	0	960
<b>6</b>			1000	0	1000

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

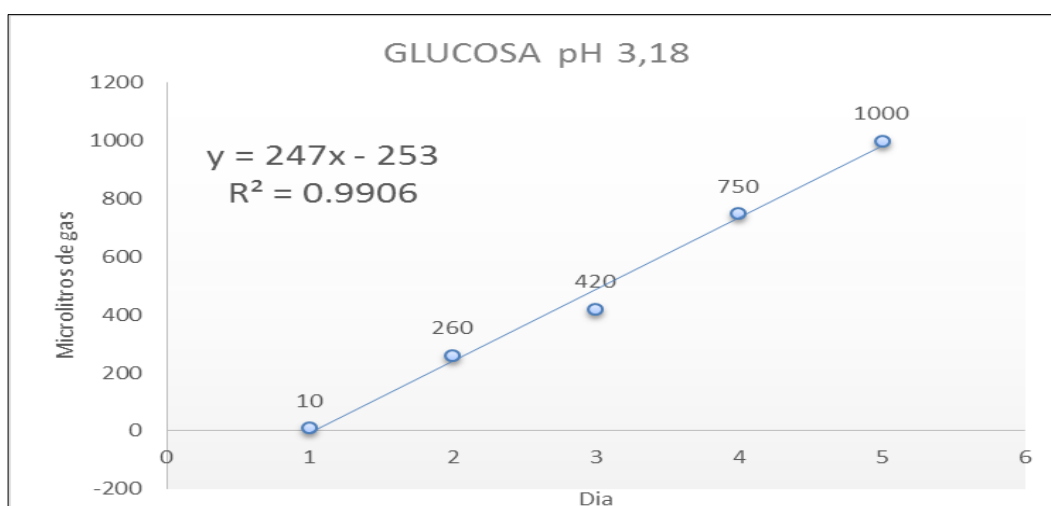
De los datos generados, se realiza una regresión lineal y un análisis de varianza y correlación, para cada grupo de datos que corresponden a un evento esto con el fin de validar los modelos

matemáticos que se obtienen; así se obtendrán las siguientes tablas.

**TABLA 31**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN A**  
**20°C Y 3,18 pH**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	Valor P ( $\alpha = 0,05$ )
Regresión	610090	1	610090	316,11	0,00038
Error	5790	3	1930		
Total	615880	4			
	$S_x^2$	2		Siendo Fo mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye q existe una relación lineal para el modelo analizado	
	$S_y^2$	123176			
	$S_{xy}$	494			
	R	0,9952			

Elaborado por: Kattya Zambrano, 2014



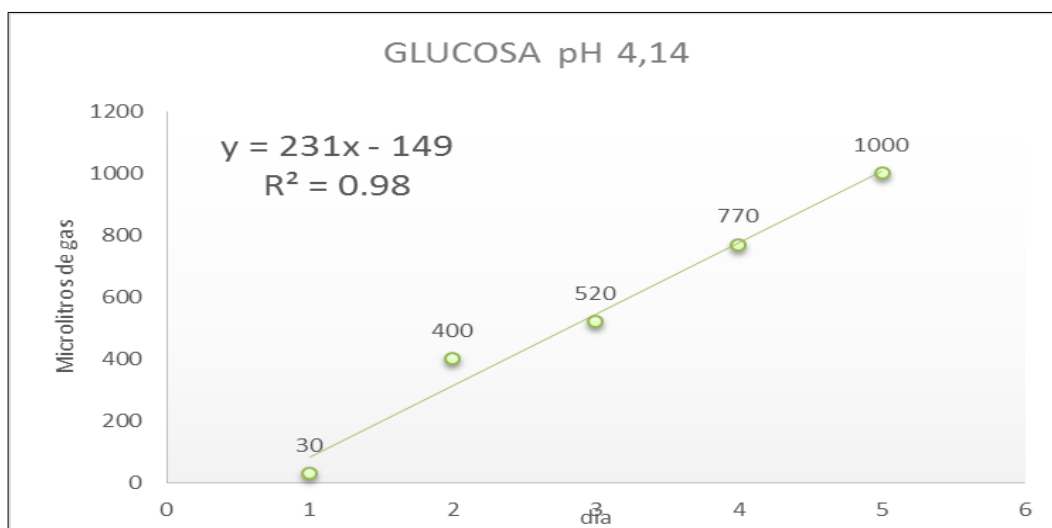
Elaborado por: Kattya Zambrano, 2014

**FIGURA 3.18  $\mu$ L VS. DÍA CON pH 3,18**

**TABLA 32**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN A**  
**20°C Y 4,14 pH**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	Valor P ( $\alpha = 0,05$ )
Regresión	533610	1	533610	146,73	0,00121
Error	10910	3	3636,66		
Total	544520	4			
$S_x^2$		2		Siendo Fo mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye q existe una relación lineal para el modelo analizado	
$S_y^2$		108904			
$S_{xy}$		462			
R		0.9899			

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



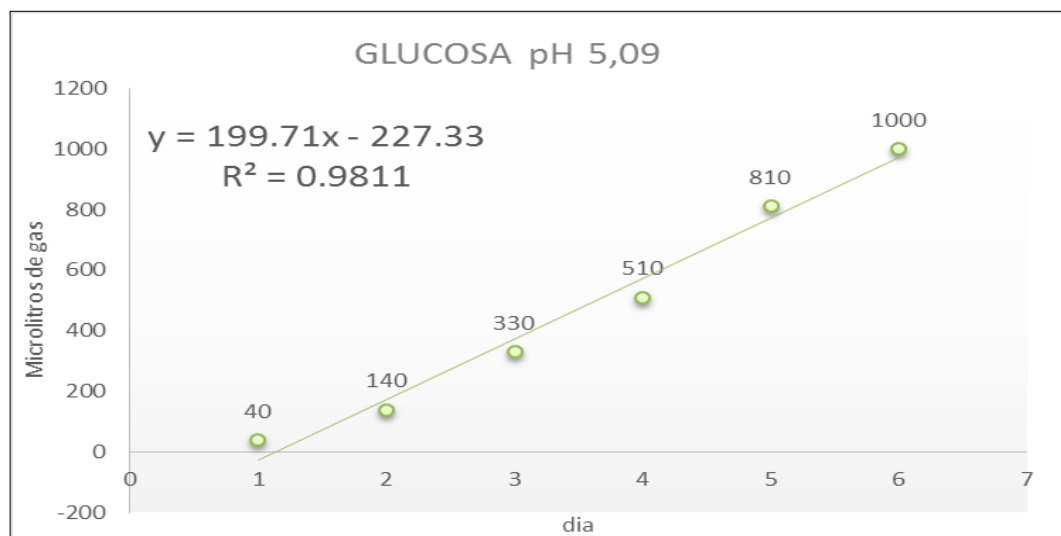
Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.19  $\mu\text{L}$  VS. DÍA CON pH 4,14**

**TABLA 33**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN A**  
**20°C Y 5,09 pH**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	Valor P ( $\alpha = 0,05$ )
Regresión	698001,4	1	698001,4	207,09	0,0001355
Error	13481,9	4	3370,476		
Total	711483,3	5			
$S_x^2$			2,91	Siendo Fo mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye q existe una relación lineal para el modelo analizado	
$S_y^2$			118580,6		
$S_{xy}$			582,5		
R			0,9904		

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



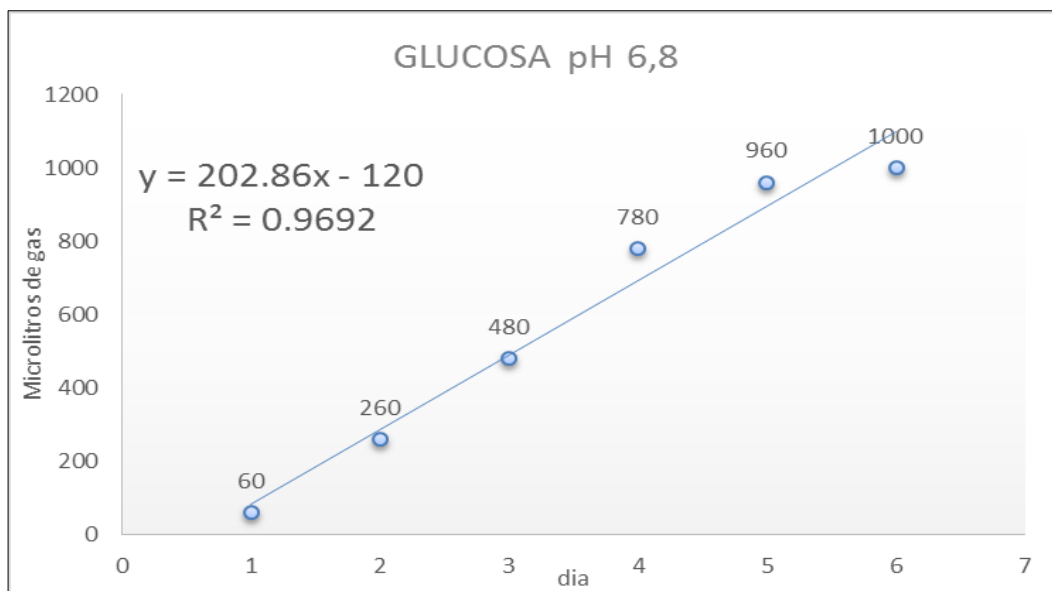
Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.20  $\mu$ L VS. DÍA CON pH 5,09**

**TABLA 34**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA Y CORRELACIÓN DE LA FERMENTACIÓN A**  
**20°C Y 6,8 pH**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	Valor P ( $\alpha = 0,05$ )
Regresión	720142,9	1	720142,9	126,03	0,0003586
Error	22857,14	4	5714,28		
Total	743000	5			
	$S_x^2$		2,91	Siendo Fo mayor al valor P se rechaza la hipótesis nula y se concluye q existe una relación lineal para el modelo analizado	
	$S_y^2$		123833,3		
	$S_{xy}$		591,66		
	R		0,9844		

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.21  $\mu$ L VS. DÍA CON pH 6,8**

Como se observan en las figuras 3.18 hasta la figura 3.21, la tendencia de los datos generados fue predominantemente lineal.

De las ecuaciones que se obtienen, interesa la constante " $\beta_1$ " o pendiente del modelo lineal; ya que esta representa la relación entre, la generación de gas con respecto al tiempo ( $\mu\text{L gas / día}$ ), para cada uno de los eventos analizados; en la siguiente tabla se recoge la información de  $\beta_1$  para los eventos analizados.

**TABLA 35**  
**CONSTANTE  $\beta$  ( $\mu\text{L GAS/DÍA}$ ) DE LOS MODELOS LINEALES A**  
**20°C Y DIFERENTES pH**

<b><i>pH</i></b>	<b><i><math>\beta</math> (<math>\mu\text{L gas/día}</math>)</i></b>
3,18	247
4,14	231
5,09	199,71
6,2	0
6,8	202,86

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

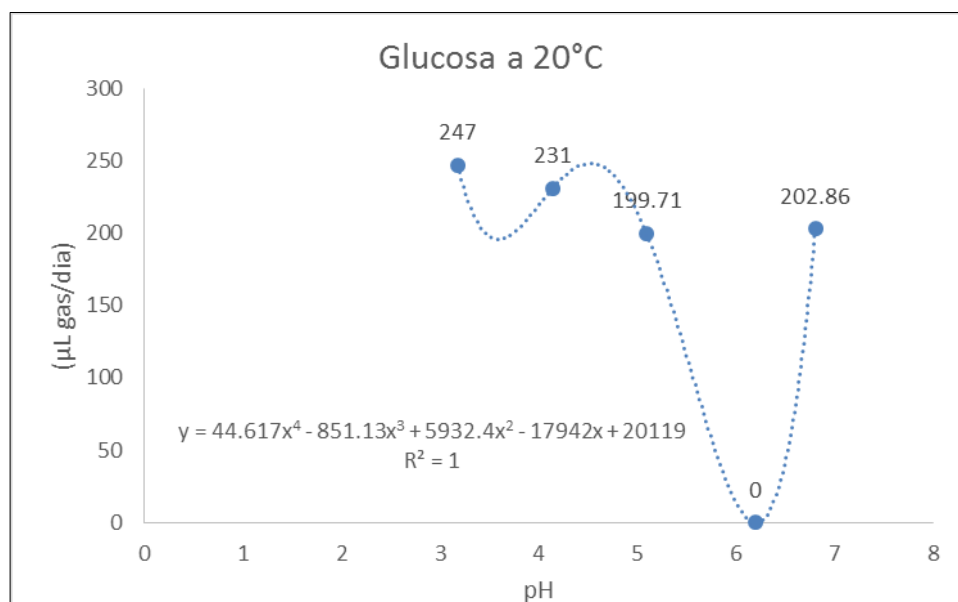
Con los datos se generó un análisis de regresión polinómica, dentro de los eventos se registró que a pH 6,2 no hubo formación de gas en absoluto, se toma el dato como 0 para incluirlo en el análisis.

A continuación se calculó el coeficiente de correlación junto a los coeficientes de tendencia polinómica, que corresponde a esta etapa de experimentación.

**TABLA 36**  
**DETERMINACIÓN DE CORRELACIÓN DE pH VS.  $\beta$  ( $\mu\text{L}/\text{DÍA}$ )**  
**PARA GLUCOSA**

$S_{y/x}$	43.77
$S_y$	70,6
$R^2$	0,8558
<b>R</b>	0,9251

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014



Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.22  $\beta$  ( $\mu\text{L}/\text{DÍA}$ ) VS. pH EN CALDO DE GLUCOSA A 20°C**

El valor R que es el coeficiente de correlación múltiple para el modelo matemático de producción de gas por la fermentación de la levadura en estudio, en caldo de Glucosa a 20°C es “1”; este valor indica que el modelo matemático de estimación es muy próximo a los valores de experimentación.

Al determinar la confianza del modelo matemático, se toma la primera derivada del polinomio y se encuentran las raíces. Las raíces del polinomio de la primera derivada indican los pH donde, al evaluar en el polinomio original se encuentran los valores máximos y mínimos del valor  $\beta$  ( $\mu\text{L gas/día}$ ).

Se muestra el polinomio característico que modela la velocidad de fermentación en el caldo de glucosa a 20°C.

$$y_{Glucosa} = 44,617x^4 - 851,3x^3 + 5932,4x^2 - 17942x + 20119$$

$$\frac{dy}{dx} = 178,46x^3 - 2553,9x^2 + 11864,8x - 17942$$

Al evaluar en el polinomio original los valores de pH encontrados por medio de la primera derivada, tiene los siguientes valores:



**TABLA 37**  
**pH DONDE SE MAXIMIZA Y MINIMIZA LA PRODUCCIÓN DE**  
**GAS EN GLUCOSA**

	<i>pH</i>	<i><math>\beta_{polinomio}</math></i>
<b>Máximos</b>	3,602	187,39
	4,483	<b>232,17</b>
<b>Mínimos</b>	6,225	-41,20

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

### 3.3 Calidad de alcohol

Del análisis de cromatografía gases acoplada a espectrometría de masas se detectó lo siguiente:

#### 3.3.1 En el destilado de caldo de glucosa

Los compuestos enlistados en la siguiente tabla son los que se identificaron: metano deuterado, etanol, 2-metil-butanal, 1-butanol-3-metil e Iso amil alcohol. Todos compuestos presentes en la fermentación alcohólica.

**TABLA 38**  
**COMPUESTOS ENCONTRADOS POR CROMATOGRAFÍA DE**  
**GASES EN EL DESTILADO DE CALDO DE CULTIVO DE**  
**GLUCOSA**

<b>PICO</b>	<b>COMPUESTO</b>	<b>TIEMPO DE RETENCIÓN</b>
<b>1</b>	Metano deuterado	1.653
<b>2</b>	Etanol	1.741
<b>3</b>	Etanol	2.068
<b>4</b>	Etanol	2.138
<b>5</b>	Etanol	2.327
<b>6</b>	2-Metil-butanal	2.719
<b>7</b>	1-butanol, 3-metil	3.41
<b>8</b>	Iso-amil-alcohol	3.461
<b>9</b>	Iso-amil-alcohol	3.5339

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

La formación de metano en la fermentación está asociado a la formación de sulfuro de hidrogeno y estos son oxidados a di sulfuros durante la manipulación aeróbica, en el momento que el jugo es expuesto a ambiente aeróbico (34).

La presencia de etanol en la fermentación anaerobia es lo que se espera, ya que es un producto directo de la fermentación alcohólica por medio de microorganismos que usan esta vía metabólica, para la respiración celular en medio anaerobio (4).

El 2-Methylbutanal es producto de la oxidación de alcoholes pesados (34).

1-butanol, 3-metil es un alcohol que se presenta en bebidas destilada y se forma por la hidrolisis de su acetato correspondiente, además de ser responsable del aroma en el destilado (34).

El Iso-amil-alcohol es parte de los productos de la destilación del mosto, es arrastrado en este proceso como uno de los últimos compuestos extraídos e imparte características no deseables (34).

### **3.3.2. En el Destilado de Jugo de Uva Fermentado**

Los compuestos enlistados en la siguiente tabla son los que se identificaron: dióxido de carbono, acetaldehído, carbazato de etilo, etanol, 1-propanol, 2-metil, N-metil-2,2,2-trifluorocetamina, 1-butanol, 3-metil, isoamilalcohol. Todos compuestos presentes en la fermentación alcohólica a excepción de dos compuestos procedentes de los pesticidas en campo que son carbazato de etilo y N-metil-2,2,2-trifluorocetamina.

**TABLA 39**  
**COMPUESTOS ENCONTRADOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES EN**  
**EL DESTILADO DEL JUGO DE UVA FERMENTADO**

<b>PICO</b>	<b>COMPUESTO</b>	<b>TIEMPO DE RETENCIÓN</b>
1	Dióxido de carbono	1.526
2	Acetaldehído	1.593
3	Carbazato de etilo	1.856
4	Carbazato de etilo	1.891
5	Carbazato de etilo	1.965
6	Carbazato de etilo	2.006
7	Carbazato de etilo	2.043
8	Carbazato de etilo	2.057
9	Carbazato de etilo	2.089
10	Etanol	2.329
11	Etanol	2.364
12	1-Propanol, 2-metil	2.574
13	1-Propanol, 2-metil	2.886
14	N-Methyl-2,2,2-trifluoroacetamida	3.528
15	1-Butanol, 3-metil-	3.583
16	Iso-amil-alcohol	3.624
17	Iso-amil-alcohol	3.952
18	1-Hexanol	6.402

Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

El dióxido de carbono se encuentra como parte del producto en la reacción de conversión de azúcares a alcohol por parte de los microorganismos que fermentan alcohólicamente (4).

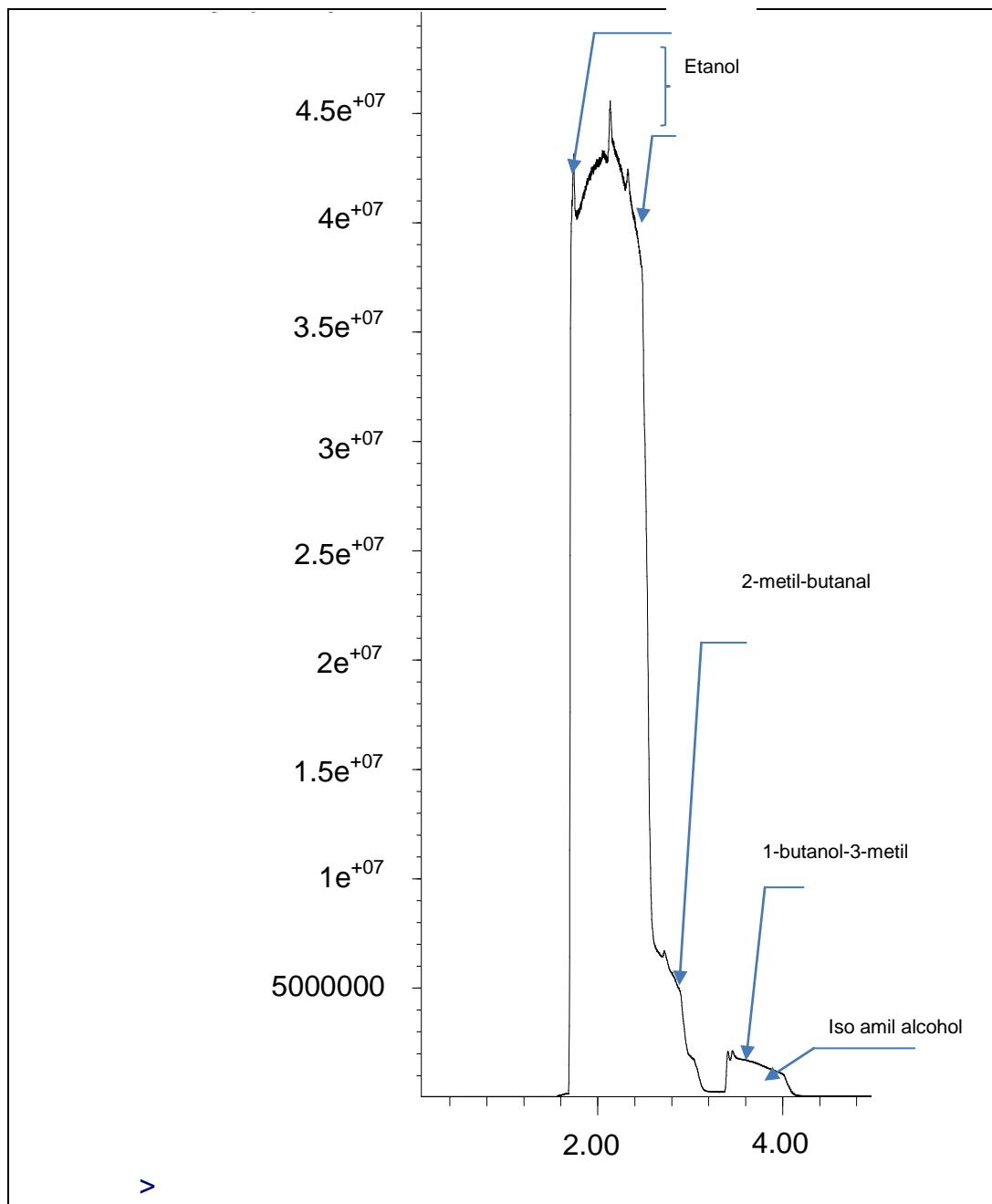
El acetaldehído es un intermediario de la conversión de piruvato a etanol, y se puede encontrar en las bebidas fermentadas o en sus destilados. No siempre es deseado en altos niveles ya que las

características que imparte no son apreciadas por todos los mercados. (4)(34).

El carbazato de etilo es un pesticida usado en los tratamientos de cosecha, el hecho que es soluble en etanol para su uso, puede explicar por qué sufrió el arrastre en la extracción de los alcoholes (35).

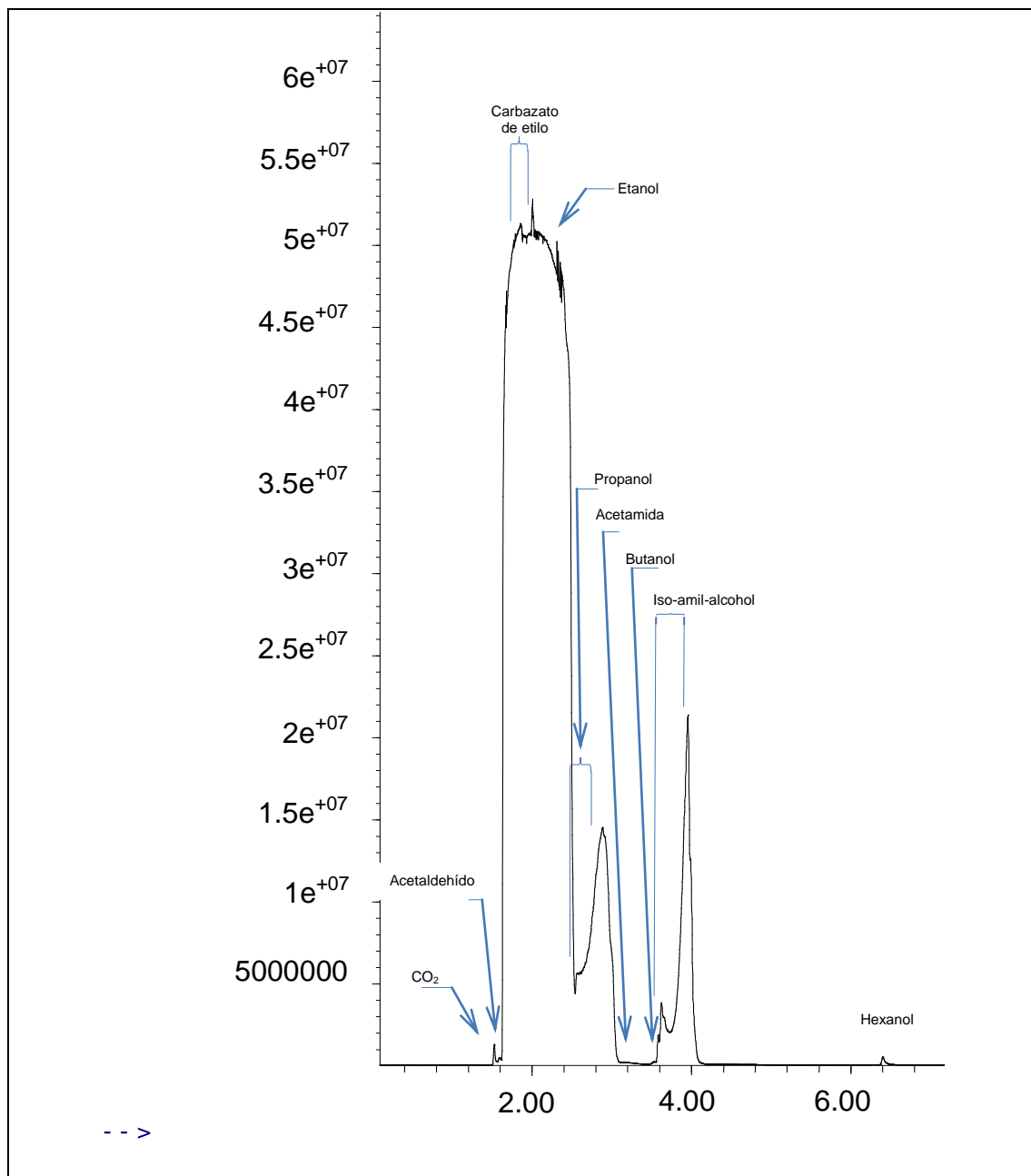
El 1-Propanol, 2-metil se encuentra en bebidas destiladas y diferentes vinos, y es uno de los volátiles más abundantes que se forman en el proceso de cocido de productos como el tequila (34).

N-Methyl-2,2,2-trifluoroacetamida es un intermediario en la síntesis de químicos para la agricultura (36)(37).



Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.23 CROMATOGRFÍA DEL DESTILADO DE CALDO DE  
GLUCOSA FERMENTADO**



Elaborado por: Katty Zambrano, 2014

**FIGURA 3.24 CROMATOGRFÍA DEL DESTILADO DE JUGO DE UVA  
FERMENTADO**

### 3.3.3. Determinación de porcentaje de alcohol presente en el jugo fermentado

La determinación se realiza por medio volumétrico y gravimétrico; así se tienen los siguientes cálculos:

Picnómetro vacío	32,3850
Picnómetro con agua	82,2667
Picnómetro con jugo fermentado	84,2557
Picnómetro con producto destilado	82,01

$$Gr_{pf} = \frac{84,2557 - 32,3850}{82,2667 - 32,3850} = \frac{51,8708}{49,8817} = 1,03987$$

$$Gr_{dest} = \frac{82,01 - 32,3850}{82,2667 - 32,3850} = \frac{49,625}{49,8817} = 0,99485$$

Así se tiene:

Gravedad especifica producto	1,03987
Gravedad especifica destilado	0,99485



Sabiendo la gravedad específica del destilado, por tabla se tiene las siguientes constantes:

% alcohol V/V	3,6
% alcohol m/m	2,86
Gr alcohol/100 cm <sup>3</sup>	2,84
Gravedad específica del alcohol etílico a 20°C	0,791

Según la norma INEN para determinación de alcohol se tiene:

$$\% \text{ masa} = 2,84 / 0,99485 = 2,85$$

$$\% \text{V} = 2,86 * 1,03987 / 0,791 = 3,76$$

$$\% \text{V} = 3,6 * 1,03987 / 0,99485 = 3,76$$

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

- ✓ Se estableció que la actividad óptima fermentativa de la cepa CIBE 12.1-06 se alcanzó a 19.2°C y pH 4.48, siendo el sustrato fructosa el que presentó mayor generación de gas.
- ✓ En el sustrato jugo de uva se obtuvo un 3.76% V/V de alcohol. Por sus características morfológicas y comportamiento pulverulento de la cepa CIBE se catalogó como levadura de fermentación “alta”.
- ✓ En la determinación de tipos de alcoholes por cromatografía de gases no se detectó alcoholes nocivos. Se identificó etanol como alcohol predominante en el destilado obtenido de cada sustrato y butanol en el destilado de caldo de glucosa. El destilado de jugo de

uva fermentado se percibió notas aromáticas frutales, lo cual se debe a la presencia de alcoholes de 3, 4 y 6 carbonos.

### **Recomendaciones**

- Se sugiere evaluar las causas por las que no se dio la conversión completa a etanol, considerando la presencia inhibidora del alcohol u otros metabolitos producto de la fermentación; así también la edad del inóculo.
  
- El aspecto turbio del jugo de uva fermentado obtenido con la cepa CIBE 12.1-06 se puede mejorar mediante la aplicación de un auxiliar tecnológico como enzimas o agentes floculantes, también por la aplicación de métodos físicos como filtración por membranas.
  
- Se recomienda realizar una evaluación físico-química y sensorial del jugo de uva fermentado.
  
- Se recomienda analizar la actividad fermentativa de la cepa CIBE 12.1-06 en otros sustratos (carbohidratos complejos).

- Durante la experimentación se observó a pH 6 un incremento significativo de la producción de biomasa. Según estudios reportados esta puede ser aprovechada como agente de bio-control a bajas temperaturas.

# **ANEXO 1**

<b>Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria</b>	<b>BEBIDAS ALCOHOLICAS. CERVEZA. DETERMINACION DE ALCOHOL.</b>	<b>NTE INEN 2 322:2002 2002-12</b>
<p style="text-align: center;"><b>1. OBJETO</b></p> <p>1.1 Esta norma establece los métodos de ensayo para determinar el contenido de alcohol en la cerveza.</p> <p style="text-align: center;"><b>2. PREPARACION DE LA MUESTRA</b></p> <p>2.1 Eliminar el CO<sub>2</sub>, para lo cual, la muestra se transfiere a un erlenmeyer cuyo volumen debe ser mayor al de la muestra y llevar a una temperatura de 15°C a 20°C.</p> <p>2.2 Eliminar el gas, agitar el recipiente, al principio suavemente y después vigorosamente, hasta que no se observe desprendimiento de gas de la cerveza.</p> <p>2.3 Si la muestra contiene materiales en suspensión, filtrar el líquido libre de CO<sub>2</sub> a través de papel de filtro, cubriendo el embudo con un vidrio de reloj para reducir la evaporación.</p> <p style="text-align: center;"><b>3. DISPOSICIONES ESPECÍFICAS</b></p> <p>3.1 La determinación del contenido de alcohol se puede efectuar por cualquiera de los métodos establecidos. Los métodos <i>Volumétrico</i> y <i>Gravimétrico</i> deben ser usados como dirimientes en caso de divergencia.</p> <p style="text-align: center;"><b>4. METODOS DE ENSAYO</b></p> <p><b>4.1 Método Volumétrico</b></p> <p><b>4.1.2 Equipos</b></p> <p>4.1.2.1 Balón de destilación, de 500 cm<sup>3</sup> de capacidad.</p> <p>4.1.2.2 Trampa de arrastre que conecta el balón de destilación (ver 4.1.2.1) y el condensador vertical (4.1.2.3). Se recomienda una trampa tipo Kjeldahl esférica o cilíndrica.</p> <p>4.1.2.3 Condensador vertical, tipo Graham, Liebig o Allihn, con una camisa de 400 mm de longitud como mínimo. El tubo de condensación interior debe terminar en un adaptador lo suficientemente largo de manera que llegue justo debajo de la línea de aforo del recipiente recolector.</p> <p>4.1.2.4 Balón volumétrico, de 100 cm<sup>3</sup> ± 0,1 cm<sup>3</sup> de capacidad, para ser destinado como recipiente recolector del destilado.</p> <p>4.1.2.5 Equipo necesario para determinar la gravedad específica (ver anexo A).</p> <p>4.1.2.6 Pipeta volumétrica, de 100 cm<sup>3</sup>.</p> <p>4.1.2.7 Pipeta de transferencia, 100 cm<sup>3</sup> ± 0,1 cm<sup>3</sup>.</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p> <p><small>DESCRIPTORES: Bebidas espirituosas, alcoholes, fermentación, bebida alcohólica, bebida, cerveza, método, ensayo, contenido de alcohol.</small></p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Casilla 17-01-3199 - Baquerizo Moreno ES-29 y Almagro - Quito-Ecuador - Prohibida la reproducción

**4.1.3 Procedimiento**

4.1.3.1 Pipetear exactamente 100 cm<sup>3</sup> de cerveza desgasificada a 20°C, colocar dentro del balón de destilación; a continuación añadir 50 cm<sup>3</sup> de agua. (Se puede utilizar un balón volumétrico de 100 cm<sup>3</sup> para medir la cerveza que se vierte en el balón de destilación). Los 50 cm<sup>3</sup> de agua se pueden añadir en pequeñas porciones para enjuagar el balón volumétrico, los que se añaden también al balón de destilación.

4.1.3.2 Conectar el balón al equipo de destilación, y disponer de un balón volumétrico de 100 cm<sup>3</sup> para recibir el destilado. ( No se debe colocar un embudo en el recipiente recolector).

4.1.3.3 El balón empleado como recolector se rodea con hielo o hielo con agua.

4.1.3.4 La temperatura del agua de refrigeración que sale por el condensador no debe ser superior a 25°C.

4.1.3.5 Destilar alrededor de 96 cm<sup>3</sup> a una velocidad uniforme y en un tiempo entre 30 y 60 minutos.

4.1.3.6 El destilado obtenido se mezcla bien. Ajustar la temperatura a 20°C y completar a volumen con agua destilada.

4.1.3.7 A continuación determinar la gravedad específica a 20°C/20°C.

4.1.3.8 De acuerdo al método seleccionado para evaluar la gravedad específica (ver Anexo A), en la tabla 1, leer los gramos de alcohol por 100 cm<sup>3</sup> que corresponden a la gravedad específica del destilado.

**4.1.4 Cálculos**

4.1.4.1 El porcentaje de alcohol por masa en cerveza se calcula mediante las ecuaciones siguientes:

a) Alcohol, porcentaje en volumen, en cerveza = alcohol, % en volumen en el destilado.

b) Alcohol, porcentaje en masa, en cerveza = g de alcohol por 100 cm<sup>3</sup> de destilado/gravedad específica de la cerveza.

4.1.4.2 El contenido de alcohol se reporta como porcentaje en masa o en volumen, con dos cifras decimales.

**4.1.4.3 Ejemplo.**

- Gravedad específica de la cerveza = 1,00924

- Gravedad específica del destilado = 0,99311

- Porcentaje de alcohol, en volumen de la cerveza = 4,78 (a partir de la gravedad específica equivalente del destilado de la tabla 1)

- Gramos de alcohol en 100 cm<sup>3</sup> de destilado = 3,77 (de la tabla 1.)

- Porcentaje de alcohol en masa de la cerveza = 3,77/1,00924 = 3,74

**4.2 Método Gravimétrico****4.2.1 Equipos**

4.2.1.1 Balanza analítica de precisión, con sensibilidad  $\pm 0,1$  g.

4.2.1.2 Balón de destilación, de 500 cm<sup>3</sup> de capacidad.

(Continúa)

- 4.2.1.3 Recipiente recolector tarado (balón) de 100 cm<sup>3</sup> a 125 cm<sup>3</sup> de capacidad.
- 4.2.1.4 Trampa de arrastre y condensador vertical como en el método 4.1.
- 4.2.1.5 Equipo necesario para determinar la gravedad específica (ver Anexo A).
- 4.2.2 Procedimiento
- 4.2.2.1 Pesar 100 g de cerveza desgasificada y transferir al balón de destilación.
- 4.2.2.2 Añadir 50 cm<sup>3</sup> de agua al recipiente de pesada para lavarlo y añadir ésta al balón de destilación.
- 4.2.2.3 Conectar el balón al condensador vertical y destilar el alcohol de acuerdo con el método 4.1.
- 4.2.2.4 Recibir el destilado en el recipiente recolector tarado.
- 4.2.2.5 Mezclar bien el destilado y completar a 100 g con agua destilada.
- 4.2.2.6 Determinar la gravedad específica del destilado a 20°C/20°C de acuerdo con el método empleado para evaluar la gravedad específica (ver Anexo A).
- 4.2.2.7 En la tabla 1 leer el porcentaje de alcohol en masa (y en volumen) correspondiente a la gravedad específica del destilado.

4.2.3 Cálculos

4.2.3.1 Alcohol, en porcentaje en masa, en la cerveza = alcohol, porcentaje en masa, en el destilado.

$$\text{Alcohol, en \% en volumen, en la cerveza} = \frac{(\text{alcohol, \% en masa} \times \text{gravedad específica de la cerveza})}{\text{gravedad específica del alcohol etílico } 20^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}}$$

$$= \frac{(\text{alcohol, \% en masa} \times \text{gravedad específica de la cerveza})}{(0,791)}$$

o,

$$\text{Alcohol, en \% en volumen, en la cerveza} = \frac{(\text{alcohol, \% en volumen en el destilado} \times \text{gravedad específica de la cerveza})}{\text{gravedad específica del destilado}}$$

4.2.3.2 El contenido de alcohol se reporta como porcentaje en masa o en volumen, con dos cifras decimales.

4.2.3.3 Ejemplo.

- Gravedad específica de la cerveza = 1,01041
- Gravedad específica del destilado = 0,99328
- Alcohol, % en masa del destilado = 3,71 (tabla 1)
- Alcohol, % en volumen del destilado = 4,66 (tabla 1)
- Alcohol, % en volumen en la cerveza = (3,71 x 1,01041)/0,791 = 4,74 ó,
- Alcohol, % en volumen en la cerveza = (4,66 x 1,01041)/0,99328 = 4,74

(Continúa)



## ANEXO A

## MÉTODOS PARA DETERMINAR LA GRAVEDAD ESPECÍFICA DE LA CERVEZA

## A.1 Método picnométrico

## A.1.1 Resumen

A.1.1.1 Empleando el picnómetro, comparar la masa de un volumen determinado de cerveza, previamente preparada, con la masa del mismo volumen de agua a la temperatura de 20°C/20°C.

## A.1.2 Procedimiento

A.1.2.1 Pesar un picnómetro vacío y seco, previamente lavado con mezcla sulfocrómica, luego con agua y secar en una estufa a 100°C por una hora.

A.1.2.2 Llenar el picnómetro con agua y colocar en un baño atermador a 20°C, por media hora.

A.1.2.3 Retirar del baño, secar cuidadosamente, ajustando el volumen, si es necesario, y pesar.

A.1.2.4 Verter el agua, lavar el picnómetro unas tres veces con la muestra de cerveza y,

A.1.2.5 Llenar con la muestra de cerveza, colocar en el baño atermador por media hora.

A.1.2.6 Sacar el picnómetro del baño, secarlo cuidadosamente y pesar.

## A.1.3 Cálculos

A.1.3.1 La gravedad específica de la cerveza se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$\text{Gravedad específica } 20^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C} = \frac{m_c - m_o}{m_a - m_o}$$

En donde:

$m_o$  = Masa del picnómetro vacío.

$m_c$  = Masa del picnómetro con la muestra de cerveza a 20°C.

$m_a$  = Masa del picnómetro con agua a 20°C.

## A.2 Método del densímetro digital

## A.2.1 Resumen

A.2.1.1 El densímetro digital simplifica la determinación de la densidad de una manera precisa de líquidos y gases reduciendo el procedimiento a la medida electrónica de un período de tiempo en el que la densidad se calcula automáticamente mediante un procesador aritmético.

A.2.1.2 La medida se basa en el cambio de la frecuencia natural de un oscilador vacío cuando se llena con diferentes líquidos o gases. Su uso para determinar la gravedad específica de la cerveza (o del mosto) ha sido reportado y demuestra ser comparable al uso del picnómetro.

## A.2.2 Equipos

A.2.2.1 Densímetro digital calibrado a 20°C con agua y aire.

(Continúa)

TABLA 1.

Gravedad específica 20°C/20°C	% v/v	% m/m	G/100 cm <sup>3</sup>	Gravedad específica 20°C/20°C	% v/v	% m/m	G/100 cm <sup>3</sup>	Gravedad específica 20°C/20°C	% v/v	% m/m	G/100 cm <sup>3</sup>
1,000 00	0,00	0,00	0,00	0,998 66	0,90	0,71	0,71	0,997 33	180	143	1,43
0,999 97	0,02	0,02	0,02	863	0,92	0,73	0,73	730	182	145	1,45
994	0,04	0,03	0,03	860	0,94	0,74	0,74	727	184	146	1,46
991	0,05	0,05	0,05	857	0,96	0,76	0,76	725	186	148	1,48
988	0,05	0,05	0,05	854	0,98	0,77	0,77	722	188	148	1,48
0,999 85	0,10	0,08	0,08	0,998 51	1,00	0,79	0,79	0,997 19	1,90	1,51	1,51
982	0,12	0,10	0,10	848	1,02	0,81	0,81	716	1,92	1,53	1,53
979	0,14	0,11	0,11	845	1,04	0,82	0,82	713	1,94	1,54	1,54
976	0,15	0,13	0,13	842	1,06	0,84	0,84	710	1,96	1,56	1,56
973	0,15	0,14	0,14	839	1,08	0,85	0,85	707	1,98	1,57	1,57
0,999 70	0,20	0,16	0,16	0,998 36	1,10	0,87	0,87	0,007 04	2,00	1,59	1,59
967	0,22	0,18	0,18	833	1,12	0,89	0,89	701	2,02	1,61	1,61
964	0,24	0,19	0,19	830	1,14	0,90	0,90	698	2,04	1,62	1,62
961	0,25	0,21	0,21	827	1,16	0,92	0,92	695	2,06	1,64	1,64
958	0,25	0,22	0,22	824	1,18	0,93	0,93	692	2,08	1,65	1,65
0,999 55	0,30	0,24	0,24	0,998 21	1,20	0,95	0,95	0,996 89	2,10	1,67	1,67
952	0,32	0,26	0,26	818	1,22	0,97	0,97	686	2,12	1,69	1,69
949	0,34	0,27	0,27	815	1,24	0,98	0,98	683	2,14	1,70	1,70
945	0,36	0,29	0,29	813	1,26	1,00	1,00	681	2,16	1,72	1,72
942	0,38	0,30	0,30	810	1,28	1,01	1,01	678	2,18	1,73	1,73
0,999 39	0,40	0,32	0,32	0,998 07	1,30	1,03	1,03	0,996 75	2,20	1,75	1,75
936	0,42	0,34	0,34	804	1,32	1,05	1,05	672	2,22	1,76	1,76
933	0,44	0,35	0,35	801	1,34	1,06	1,06	669	2,24	1,78	1,78
930	0,45	0,37	0,37	799	1,36	1,08	1,08	667	2,26	1,79	1,79
927	0,45	0,38	0,38	796	1,38	1,09	1,09	664	2,28	1,81	1,81
0,999 24	0,50	0,40	0,40	0,997 92	1,40	1,11	1,11	0,996 61	2,30	1,82	1,82
921	0,52	0,41	0,41	789	1,42	1,13	1,13	658	2,32	1,84	1,84
918	0,54	0,43	0,43	786	1,44	1,14	1,14	655	2,34	1,85	1,85
916	0,55	0,44	0,44	783	1,46	1,16	1,16	652	2,36	1,87	1,87
913	0,55	0,45	0,45	780	1,48	1,17	1,17	649	2,38	1,88	1,88
0,999 10	0,60	0,47	0,47	0,997 77	1,50	1,19	1,19	0,996 46	2,40	1,90	1,89
907	0,62	0,49	0,49	774	1,52	1,21	1,21	643	2,42	1,92	1,91
904	0,64	0,50	0,50	771	1,54	1,22	1,22	640	2,44	1,93	1,92
901	0,65	0,52	0,52	769	1,56	1,24	1,24	638	2,46	1,95	1,94
898	0,65	0,53	0,53	766	1,58	1,25	1,25	635	2,48	1,96	1,95
0,998 95	0,70	0,55	0,55	0,997 63	1,60	1,27	1,27	0,996 32	2,50	1,98	1,97
892	0,72	0,57	0,57	760	1,62	1,29	1,29	629	2,52	2,00	1,99
889	0,74	0,58	0,58	757	1,64	1,30	1,30	626	2,54	2,01	2,00
886	0,75	0,60	0,60	754	1,66	1,32	1,32	624	2,56	2,03	2,02
883	0,75	0,61	0,61	751	1,68	1,33	1,33	621	2,58	2,04	2,03
0,998 80	0,80	0,63	0,63	0,997 48	1,70	1,35	1,34	0,996 18	2,60	2,06	2,05
877	0,82	0,65	0,65	745	1,72	1,37	1,36	615	2,62	2,08	2,07
874	0,84	0,66	0,66	742	1,74	1,38	1,37	612	2,64	2,09	2,08
872	0,85	0,68	0,68	739	1,76	1,40	1,39	609	2,66	2,11	2,10
869	0,85	0,69	0,69	736	1,78	1,41	1,40	606	2,68	2,12	2,11
0,998 63	2,70	2,14	2,13	0,994 75	3,60	2,86	2,84	0,003 49	4,50	3,58	3,55
600	2,72	2,16	2,15	472	3,62	2,88	2,86	346	4,52	3,60	3,57
597	2,74	2,17	2,16	469	3,64	2,89	2,87	344	4,54	3,61	3,58
595	2,75	2,19	2,18	467	3,66	2,91	2,89	341	4,56	3,63	3,60
592	2,75	2,20	2,19	464	3,68	2,92	2,90	339	4,58	3,64	3,61
0,998 59	2,80	2,22	2,21	0,994 61	3,70	2,94	2,92	0,993 36	4,60	3,66	3,63
586	2,82	2,24	2,23	458	3,72	2,96	2,94	333	4,62	3,68	3,65
583	2,84	2,25	2,24	455	3,74	2,97	2,95	330	4,64	3,69	3,66
580	2,85	2,27	2,26	453	3,76	2,99	2,97	328	4,66	3,71	3,68
577	2,85	2,28	2,27	450	3,78	3,00	2,98	325	4,68	3,72	3,69
0,998 74	2,90	2,30	2,29	0,994 47	3,80	3,02	3,00	0,993 22	4,70	3,74	3,71
571	2,92	2,32	2,31	444	3,82	3,04	3,02	319	4,72	3,76	3,73
568	2,94	2,33	2,32	441	3,84	3,05	3,03	316	4,74	3,77	3,74
566	2,95	2,35	2,34	439	3,86	3,07	3,05	314	4,76	3,79	3,76
563	2,95	2,36	2,35	436	3,88	3,08	3,06	311	4,78	3,80	3,77

(Continúa)

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) HOUGH J.S., Biotecnología de la cerveza y de la malta, Editorial Acribia, Zaragoza-España. 1990, pág. 1, 109-141
- 2) MEDINA F.X., La alimentación mediterránea: historia, cultura, nutrición, Icaria Editorial, Barcelona-España, pág. 52
- 3) BELLO GUTIERREZ J., Calidad de vida, Alimentos y Salud Humana: Fundamentos científicos, Ediciones Díaz Santos, España, 2005, pág. 52, 53
- 4) AVERS CHARLOTTE J. Biología Celular, Iberoamérica, México, pág. 76, 77, 80, 138-143, 266
- 5) MELO RUIZ V., Bioquímica de los procesos metabólicos, Reverte, Barcelona-España, 2007, pág. 61, 62, 77, 84, 171, 179, 201, 292, 326.
- 6) BELLO GUTIERREZ J., Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos, Díaz Santos S.A., España, 2000, pág. 472-476
- 7) GARCIA GARIBAY M., QUINTERO RAMIREZ R., LOPEZ-MUNGUIA C., Biotecnología alimentaria, Limusa, México, 2004, pág. 51, 147, 178, 179, 180, 183, 236, 300, 301, 314
- 8) NORMA GENERAL DEL CODEX PARA EL QUESO; CODEX STAN 283-1978, disponible en <http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&c>

d=1&ved=0CCEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.codexalimentarius.org%2Finput%2Fdownload%2Fstandards%2F175%2FCXS\_283s.pdf&ei=Lx\_yVN-yLvSKsQTNmoCYAQ&usg=AFQjCNE-IFN-xVmz5dxTfxja62UpnXUa7Q&bvm=bv.87269000,d.aWw

- 9) *VIRTO RESANO R., Responsable técnico científico I+D+i del CNTA Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria, ponencia disponible en [www.aetc.es/documentos/category/66-ponencias-ii-foro-fec.html](http://www.aetc.es/documentos/category/66-ponencias-ii-foro-fec.html)?*
- 10) *PUMAROLA BUSQUETS, Microbiología y parasitología medica; Masson S.A., Barcelona-España, 1987, pág. 15, 73, 74*
- 11) *VILLANUEVA J.R., Microbiología, Reverte S.A., España, 1992, pág. 471,528*
- 12) *HERNANDEZ A., Microbiología industrial, pág. 161*
- 13) *PARES R.,JUAREZ A., Bioquímica de los microorganismos Reverte S.A., 1997, pág. 40, 90, 91*
- 14) *MIRA DE ORDUÑA R., LIU S.-Q. , PATCHETT M.L., PILONE G.J., Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria, Microbiology letters, Wiley online library, 2006, puede encontrarlo en <http://www.ajevonline.org/content/36/4/290.abstract>,*
- 15) *Norma regional para la pasta de soja fermentada. CODEX STAN 298R-2009, puede encontrarlo en*

[http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CCwQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.maff.go.jp%2Fj%2Fccasia%2Fabout\\_ccasia%2Fpdf%2Fstan298r.pdf&ei=RiXyVMjPE-eMsQTVtoG4CQ&usg=AFQjCNFleA8mAFM82PeYbuHRY\\_ZFaE7pjw&bvm=bv.87269000,d.aWw](http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CCwQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.maff.go.jp%2Fj%2Fccasia%2Fabout_ccasia%2Fpdf%2Fstan298r.pdf&ei=RiXyVMjPE-eMsQTVtoG4CQ&usg=AFQjCNFleA8mAFM82PeYbuHRY_ZFaE7pjw&bvm=bv.87269000,d.aWw)

- 16) ALBERTI F.D., Elaboración de vinos naturales y artificiales sin el empleo de sustancias nocivas a la salud, Maxtor, Barcelona-España, 1905, pág. 7
- 17) INGRAHAM J.L., INGRAHAM C.A. Introducción a la microbiología II; Reverte S.A., Barcelona-España, 1998, pág. 735-739
- 18) PASCUAL ANDERSON M.D.R., CALDERON V., Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas, Díaz Santos, Madrid-España, 2000, pág. 137, 142
- 19) TORTORA G.T., Introducción a la microbiología; Panamericana S.A., Argentina, 2007, pág. 611-619
- 20) CAMPBELL N.A., Biología, Panamericana, Buenos Aires-Argentina, 2007, pág. 613, 614, 616, 618
- 21) AUDESIRK T., AUDESIRK G., BYERS B., Biología: la vida en la tierra, Pearson, 2003, pág. 356
- 22) BLOUIN J., PEYNAUD E., Enología practica: conocimiento y elaboración del vino, Mundi-Prensa, 2003, pág. 44
- 23) PAEZ ESCOBAR V., Bebidas fermentadas, ReCiTeIA, 2010, pág. 10

- 24) Imagen obtenida de [http://www.allposters.com/-sp/Baker-s-or-Brewer-s-Yeast-Saccharomyces-Cerevisiae-with-Some-Budding-SEM-Posters\\_i9014836\\_.htm](http://www.allposters.com/-sp/Baker-s-or-Brewer-s-Yeast-Saccharomyces-Cerevisiae-with-Some-Budding-SEM-Posters_i9014836_.htm)
- 25) Imagen obtenida de [http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/candida\\_stellata.html](http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/candida_stellata.html)
- 26) Imagen obtenida de [http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/saccharomyces\\_bayanus.html](http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/saccharomyces_bayanus.html)
- 27) Imagen obtenida de <http://www.datuopinion.com/saccharomyces-pastorianus>
- 28) Imagen obtenida de [http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/dekkera\\_anomala.html](http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/dekkera_anomala.html)
- 29) Imagen obtenida de [http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/hanseniaspora\\_uvarum.html](http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/hanseniaspora_uvarum.html)
- 30) AREVALO CHAVEZ S.M., Optimización de la producción del agente de biocontrol *Cándida sake* (CPA-1), Tesis doctoral, pág. 43-45
- 31) CBS-KNWA Fungal Biodiversity Centre An Institute of Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, tomado del banco de datos, puede encontrarse en,

- 32) <http://www.cbs.knaw.nl/Collections/Biolomics.aspx?Table=Yeasts+2011>
- 33) ATCC product sheet *Cándida sake* (ATCC 22021). Puede encontrarse en, [http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.atcc.org%2F~%2Fps%2F22021.ashx&ei=MzXyVO\\_UNqnIsQSU6oL4Ag&usg=AFQjCNEaDOMMqDppWsnk-VJeU0KfAZyig&bvm=bv.87269000,d.aWw](http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.atcc.org%2F~%2Fps%2F22021.ashx&ei=MzXyVO_UNqnIsQSU6oL4Ag&usg=AFQjCNEaDOMMqDppWsnk-VJeU0KfAZyig&bvm=bv.87269000,d.aWw)
- 34) ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, Manual de bioseguridad en el laboratorio, Biblioteca OMS, 2005, pág. 2, 3, 9-20
- 35) LEA ANDREW, PIGGOTT JOHN, Fermented Beverage Production, 2003, second edition, pág. 127, 219, 225, 357, 358, 398, 22, 173
- 36) GILES D.P., KERRY J.C., KOZLIK A., PALMER B.H., SHUTLER S.W., WILLIS R.J., Less Pesticide compounds, compositions and methods, 1984, puede encontrarse en <http://www.google.com/patents/US4432994>
- 37) RAEPPEL C, NIEF M, FABRITIUS M, RACAULT L, APPENZELLER BM, MILLET M., Simultaneous analysis of pesticides from different chemical classes by using a derivatisation step and gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, Volumen 1218, 2011, pág. 8123-8129.

- 38) Hoja técnica de N-methyl-222-trifluoroacetamide de halocarbon.com puede encontrarse en [http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0CDkQFjAD&url=http%3A%2F%2Fwww.halocarbon.com%2Fhalocarbon\\_media%2FN-Methyl-222-Trifluoroacetamide\\_211.pdf&ei=oDryVJrKHai\\_sQSyzYDIAg&usg=AFQjCNFs0xkqdJbxkuIOZ3YJV-K7HVfd8Q&bvm=bv.87269000,d.aWw](http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0CDkQFjAD&url=http%3A%2F%2Fwww.halocarbon.com%2Fhalocarbon_media%2FN-Methyl-222-Trifluoroacetamide_211.pdf&ei=oDryVJrKHai_sQSyzYDIAg&usg=AFQjCNFs0xkqdJbxkuIOZ3YJV-K7HVfd8Q&bvm=bv.87269000,d.aWw)
- 39) SANANES L., Alimentación fisiológica, Libros en red, 2006, pág. 246
- 40) FAO, Utilización de alimentos tropicales: cereales, 1990, pág. 96.
- 41) SILLA SANTOS M.H., Dieta mediterránea y alimentos funcionales: seguridad alimentaria, Editorial de la UPV, Valencia, 2004, pág. 63.
- 42) PANPLONA J., Salud por los alimentos, Safeliz S.L., Madrid-España, 2006, pág. 185
- 43) GAMAZO C., LOPEZ GONI I., DIAZ R., Manual práctico de microbiología, Masson, Barcelona-España, 2005, pág. 10, 28, 45, 205
- 44) SOLIS CUESTA F., LINARES SICILIA M.J., Identificación de levaduras Capítulo 11, Revista Iberoamericana de Micología, 2007, pág. 11
- 45) CEVALLOS J. M., DEANN E., FRIEDRIH L., DNYLUK M., SIMONNE A., Growth of Clostridium perfringens during Cooling of Refried



Beans, Journal of Food protection, 2012, Vol. 75, No. 10, pp 1783-1790

- 46) NORMA INEN, Bebidas alcohólicas: Cerveza: Determinación de alcohol, NTE INEN 2 322:2002