

**Evaluación de las características fisicoquímicas y sensoriales de una bebida tipo
“masato” empleando levaduras aisladas de residuos agroindustriales**

Laura Katerine Guarín Lizarazo

Universidad Nacional Abierta y a Distancia
Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería
Programa de Maestría en Biotecnología Alimentaria

2022

**Evaluación de las características fisicoquímicas y sensoriales de una bebida tipo
“masato” empleando levaduras aisladas de residuos agroindustriales**

Laura Katerine Guarín Lizarazo

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:

Magister en Biotecnología Alimentaria

Modalidad Proyecto de Investigación

Director (a):

Laura María Reyes Méndez

Universidad Nacional Abierta y a Distancia

Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería

Programa de Maestría en Biotecnología Alimentaria

2022

Declaración de derechos de propiedad intelectual

Los autores de la presente propuesta manifestamos que conocemos el contenido del Acuerdo 06 de 2008, Estatuto de Propiedad Intelectual de la UNAD, Artículo 39 referente a la cesión voluntaria y libre de los derechos de propiedad intelectual de los productos generados a partir de la presente propuesta. Asimismo, conocemos el contenido del Artículo 40 del mismo Acuerdo, relacionado con la autorización de uso del trabajo para fines de consulta y mención en los catálogos bibliográficos de la UNAD.

Agradecimientos

Expreso mis agradecimientos a Dios por permitirme haber llegado hasta este punto, por otorgarme la fuerza y el soporte que he necesitado a lo largo de mi vida y mi carrera. A mis padres, quienes han estado presente con apoyo emocional y financiero desde que tengo memoria, motivándome siempre a seguir adelante, levantándose temprano y acostándose tarde solo por mí, a mis hermanas que siempre han estado conmigo, dándome fortaleza y ganas de continuar, gracias por hacerme sentir orgullosa de todo lo que he logrado, a David, que me he ha generado momentos de mucha felicidad y pasar momentos tan divertidos que ha hecho mis estudios más fáciles. A los docentes que me permitieron aprender lo que necesitaba para culminar este posgrado y me hicieron crecer como persona. A la Doctora Laura Reyes, quien fue un gran soporte para la realización de este proyecto, con consejos y ayuda que permitieron que el resultado fuera óptimo. Finalmente, quiero agradecerle a la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD) quien me permitió realizar mi proyecto de grado en sus laboratorios, con la ayuda de profesionales capacitados como Luis, que siempre me apoyó con los consejos necesarios en el momento oportuno.

Resumen

En años recientes, se ha buscado la manera de utilizar los residuos agroindustriales para obtener nuevos productos, materias primas e insumos, reduciendo así la huella de carbono generada en los procesos de transformación de alimentos, de esta forma, el objetivo de este proyecto se encaminó a evaluar el efecto de levaduras procedentes residuos agroindustriales sobre el proceso de fermentación de una bebida alcohólica y la determinación de las características fisicoquímicas y sensoriales de este producto. Para esto, se establecieron tres fases, en la fase uno se realizó el aislamiento de las levaduras de los residuos agroindustriales seleccionados (cáscaras de piña y yuca) empleando medios de cultivo selectivos, en la fase dos se realizó la bebida fermentada tipo “masato” y finalmente, en la fase tres se caracterizó la bebida. Se encontró que las levaduras aisladas de las cáscaras de piña y de yuca tenían carácter fermentativo y finalizaban el proceso en mayor tiempo comparado con las levaduras comerciales, otorgándole propiedades sensoriales con mayor aceptación por parte de los consumidores con el mismo grado de alcohol, el cuál fue establecido en 5% v/v. En conclusión, los residuos agroindustriales pueden ser empleados en el aislamiento de levaduras para elaboración de bebidas alcohólicas tradicionales tipo masato, con altos niveles de calidad y aceptación de los consumidores.

Palabras claves: Aprovechamiento industrial, Biotecnología, Bebidas artesanales, cinética, fermentación.

Abstract

In recent years, a way has been sought to use agro-industrial waste to obtain new products, raw materials, and supplies, thus reducing the carbon footprint generated in food transformation processes, in this way, the objective of this project was directed to evaluate the effect of yeasts from agroindustrial residues on the fermentation process of an alcoholic beverage and the determination of the physicochemical and sensory characteristics of this product. For this, three phases were established, in phase one the isolation of the yeasts from the selected agroindustrial residues (pineapple and cassava peels) was carried out using selective culture media, in phase two the fermented drink type "masato" was made. and finally, in phase three, the beverage was characterized. It was found that the yeasts isolated from pineapple and cassava peels had a fermentative character and finished the process in a longer time compared to commercial yeasts, giving them sensory properties with greater acceptance by consumers with the same degree of alcohol, which was set at 5% v/v. In conclusion, agroindustrial residues can be used in the isolation of yeasts to produce traditional masato-type alcoholic beverages, with high levels of quality and consumer acceptance.

Keywords: Industrial use, Biotechnology, Craft drinks, kinetics, fermentation.

Tabla de Contenido

Lista de Tablas	9
Lista de Figuras.....	10
Lista de Ecuaciones.....	12
Lista de Anexos.....	13
Lista de Símbolos y Abreviaturas	14
Introducción	15
Planteamiento del Problema	17
Objetivos	21
Objetivo General.....	21
Objetivos Específicos.....	21
Marco Teórico y Conceptual	22
Piña	22
Yuca	23
Residuos Agroindustriales	24
Fermentación Alcohólica.....	27
Parámetros Importantes en la Fermentación.....	31
<i>Cultivos Iniciadores</i>	31
<i>Oxígeno Molecular</i>	33
<i>Glicerol</i>	34
<i>Resistencia</i>	34
<i>pH</i>	35
<i>Temperatura</i>	35
<i>Tiempo de Fermentación</i>	36
<i>Sustratos</i>	36
Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.).....	37
Levaduras.....	38
Levaduras Empleadas en Procesos Fermentativos	38
Caracterización de las Levaduras <i>S. cerevisiae</i>	39

Modelo Cinético de Crecimiento Microbiano	40
Cinética de Crecimiento Microbiano	44
Antecedentes	46
Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales en la Obtención de Levaduras y Producción de Bebidas Alcohólicas.....	46
Productos Artesanales Fermentados	49
Materiales y Métodos.....	53
Materiales.....	53
Métodos.....	53
Fase 1: Aislamiento de las Levaduras.....	54
Fase 2: Elaboración del Masato	59
Fase 3: Caracterización de la Bebida Alcohólica	62
Resultados y Discusión	65
Fase 1. Aislamiento de las Levaduras.....	65
Rendimiento del Material Vegetal	65
Aislamiento de Levaduras.....	66
Fase 2: Elaboración del Masato	92
Elaboración del Masato.....	92
Fase 3: Caracterización Físicoquímica, Sensorial y Microbiológica de la Bebida Fermentada Tipo “Masato”	92
Caracterización Físicoquímica.....	92
Caracterización Microbiológica.....	97
Caracterización Sensorial.....	99
Selección de la Formulación Mejor Valorada	103
Conclusiones y Recomendaciones	105
Conclusiones	105
Recomendaciones	106
Referencias.....	107
Anexos	121

Lista de Tablas

Tabla 1. Levaduras en residuos agroindustriales y en frutos.	47
Tabla 2. Bebidas tradicionales o artesanales colombianas.	49
Tabla 3. Formulaciones para el desarrollo de la bebida fermentada “tipo masato” de acuerdo con tipo de levadura adicionada	59
Tabla 4. Formulación base de la bebida fermentada tipo “masato”	60
Tabla 5. Porcentaje promedio del rendimiento de la piña var Golden.....	65
Tabla 6. Porcentaje promedio del rendimiento de la yuca de mesa.....	66
Tabla 7. Evaluación de pH y °Brix a las 0 horas	75
Tabla 8. Evaluación de pH, °Brix, ° Alcohólico y Densidad óptica a las 8 horas	76
Tabla 9. Evaluación de pH, °Brix, ° Alcohólico y Densidad óptica a las 12 horas	77
Tabla 10. Evaluación de pH, °Brix, ° Alcohólico y Densidad óptica a las 24 horas	78
Tabla 11. Evaluación de pH, °Brix, ° Alcohólico y Densidad óptica a las 48 horas	79
Tabla 12. DO y UFC/mL de las levaduras obtenidas de la cáscara de yuca.....	85
Tabla 13. Parámetros cinéticos.	87
Tabla 14. DO y UFC/mL de las levaduras obtenidas de la cáscara de yuca.....	89
Tabla 15. Parámetros cinéticos.	91
Tabla 16. Caracterización fisicoquímica del masato a las 0 horas	93
Tabla 17. Caracterización fisicoquímica del masato a las 12 horas	94
Tabla 18. Caracterización fisicoquímica del masato a las 24 horas	94
Tabla 19. Caracterización fisicoquímica del masato a las 36 horas	95
Tabla 20. Caracterización fisicoquímica del masato a las 48 horas	96
Tabla 21. Peso de las características para análisis sensorial.....	99
Tabla 22. Resultados de la aceptación global de las diferentes formulaciones.	104

Lista de Figuras

Figura 1. Árbol de problemas	18
Figura 2. Piña Gold variedad MD2 empleada para el proceso de aislamiento.....	23
Figura 3. Yuca de mesa empleada para el proceso de aislamiento.....	24
Figura 4. Producción y consecuente generación de cáscaras de piña. Año 2014 - Año 2019	26
Figura 5. Producción y consecuente generación de cáscaras de yuca. Año 2018-2020	27
Figura 6. Ruta metabólica para la producción de etanol.....	29
Figura 7. Serie de producción de arroz mecanizado. Principales Departamentos II Semestre (2010-2020)	38
Figura 8. Fases de crecimiento microbiano	45
Figura 9. Metodología.....	54
Figura 10. Materias primas empleadas en el aislamiento de levaduras.....	55
Figura 11. Proceso de aislamiento de levaduras	56
Figura 12. Proceso de elaboración de la bebida fermentada tipo “masato”.....	61
Figura 13. Imágenes macroscópicas y microscópicas de levaduras aisladas de cáscara de piña y yuca.....	68
Figura 14. Imágenes macroscópicas de levaduras aisladas de cáscara de piña y yuca frente a referentes teóricos.....	69
Figura 15. Imágenes microscópicas de levaduras aisladas de cáscara de piña y yuca frente a referentes teóricos	71
Figura 16. Crecimiento de las levaduras aisladas al tercer día al 6,8 y 10% de etanol.	73
Figura 17. Variación del pH en función al tiempo.....	80
Figura 18. Variación de °Brix en función al tiempo.....	81

Figura 19. Variación de % etanol (v/v) en función al tiempo.....	82
Figura 20. Variación de la densidad óptica en función al tiempo.....	83
Figura 21. Crecimiento de las levaduras aisladas de la cáscara de yuca.	84
Figura 22. DO Vs UFC/mL, levaduras aisladas de la cáscara de yuca.....	86
Figura 23. Modelos cinéticos.....	87
Figura 24. Crecimiento de las levaduras aisladas de la cáscara de yuca.	88
Figura 25. DO Vs UFC/mL, levaduras aisladas de la cáscara de piña.	90
Figura 26. Modelos cinéticos.....	91
Figura 27. Recuento microbiológico.....	98
Figura 28. Características visuales.....	101
Figura 29. Sensación en boca.....	102
Figura 30. Preferencia en olor y sabor	103

Lista de Ecuaciones

Ecuación 1. Tasa de consumo de glucosa, método Quasi-Newton y Levenberg-Marguard	40
Ecuación 2. Tasa de consumo de maltosa, método Quasi-Newton y Levenberg-Marquard	40
Ecuación 3. Tasa de consumo de maltotriosa, método Quasi-Newton y Levenberg-Marquard...	41
Ecuación 4. Producción de biomasa	41
Ecuación 5. Producción de etanol	41
Ecuación 6. Ecuación integrada del Modelo de Monod.	42
Ecuación 7. Ecuación de Moser	42
Ecuación 8. Modelo de Moser para crecimiento microbiano.	43
Ecuación 9. Modelo de Teissier	43
Ecuación 10. Modelo de Teissier para crecimiento microbiano	43
Ecuación 11. Rendimiento del material vegetal.	55
Ecuación 12. Cálculo de °Brix	58
Ecuación 13 Sólido en el crisol	62
Ecuación 14 % de humedad	63
Ecuación 15 % de cenizas	63
Ecuación 16. Unidades formadoras de colonia por unidad de volumen	85

Lista de Anexos

Anexo 1. Encuesta realizada al panel.	121
--	-----

Lista de Símbolos y Abreviaturas

Símbolos

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
°C	Unidad de temperatura	C	<i>Grados Celsius</i>
s	Unidad de tiempo	S	<i>Segundos</i>
h	Unidad de tiempo	h	<i>Horas</i>

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>pH</i>	Potencial de hidrógeno.
<i>DO</i>	Densidad óptica
v/v	Relación volumen/volumen

Introducción

La producción de residuos agroindustriales es inevitable, debido a que esta se da por la transformación de las materias primas en productos con valor agregado, pero la alta producción de estos residuos ha generado en los últimos años una gran preocupación a nivel mundial, por lo que su empleo en otras industrias para reducir el impacto ambiental y aumentar los ingresos ha sido altamente estudiado (Cury, Aguas, Matinez, Olivero, & Chams, 2017).

Los residuos agroindustriales han sido ampliamente empleados como sustratos en la producción de bioetanol, productos lignocelulósicos y en la fermentación para producción de piensos para animales, pero en menor medida han sido utilizados para aislar las levaduras propias de estos productos (Moran, 2020; Comelli, 2019; Malagón, Garay, & Peña, 2017).

En los últimos años, se ha potenciado el uso de microorganismos aislados de residuos, principalmente para la producción de etanol, así como de enzimas; sin embargo, los microorganismos no solo participan en procesos de fermentación de los residuos, de hecho, se han aislado microorganismos de los desechos y empleado en la producción de metabolitos de interés alimentario (Cury, Aguas, Matinez, Olivero, & Chams, 2017; Moran, 2020; Comelli, 2019; Sosa, 2019).

Uno de los microorganismos que se pueden aislar son las levaduras, estas tienen la característica de promover la fermentación en la producción de bebidas alcohólicas. Se ha encontrado que las levaduras obtenidas de residuos agroindustriales son óptimas para la producción de cerveza, sin embargo, aún no existen estudios referentes al empleo de estas en productos artesanales (Amaya & Diaz, 2019).

Las levaduras pueden aislarse por diferentes métodos de los residuos, entre ellas se encuentran la extracción en solución de cloruro de sodio, por fermentación espontánea y por siembra directa (Villota, 2020; Sosa, 2019).

En Colombia, uno de los productos tradicionales más representativos es el masato, este se elabora con cereales como maíz y arroz con un alto contenido de azúcares y baja graduación alcohólica, se dice que está presente en la historia desde antes de la colonización en países como Colombia, Perú y Venezuela, con algunas variaciones (Holguín, 2010; Becerra, 2014; Ríos & Alemán, 2019).

Actualmente, el masato es fermentado con levadura comercial específica para pan, aunque también puede adicionarse un trozo de la cáscara de piña, una cantidad limitada de cerveza, una pequeña cantidad de chicha (otra bebida tradicional) o dejando un remanente de la producción anterior (M. Fuentes. & N. Lizarazo, comunicación personal, noviembre 25, 2020), es decir, no se cuenta con una levadura que sea específica para este producto, es por esto que la elaboración de esta bebida artesanal con levaduras aisladas insta a mejorar la calidad del masato, sin afectar el proceso actual que se lleva a cabo.

Este proyecto buscó evaluar el efecto de levaduras aisladas de residuos agroindustriales en el proceso de fermentación de una bebida tradicional tipo “masato” y sus características fisicoquímicas y sensoriales comparadas con una levadura comercial.

Planteamiento del Problema

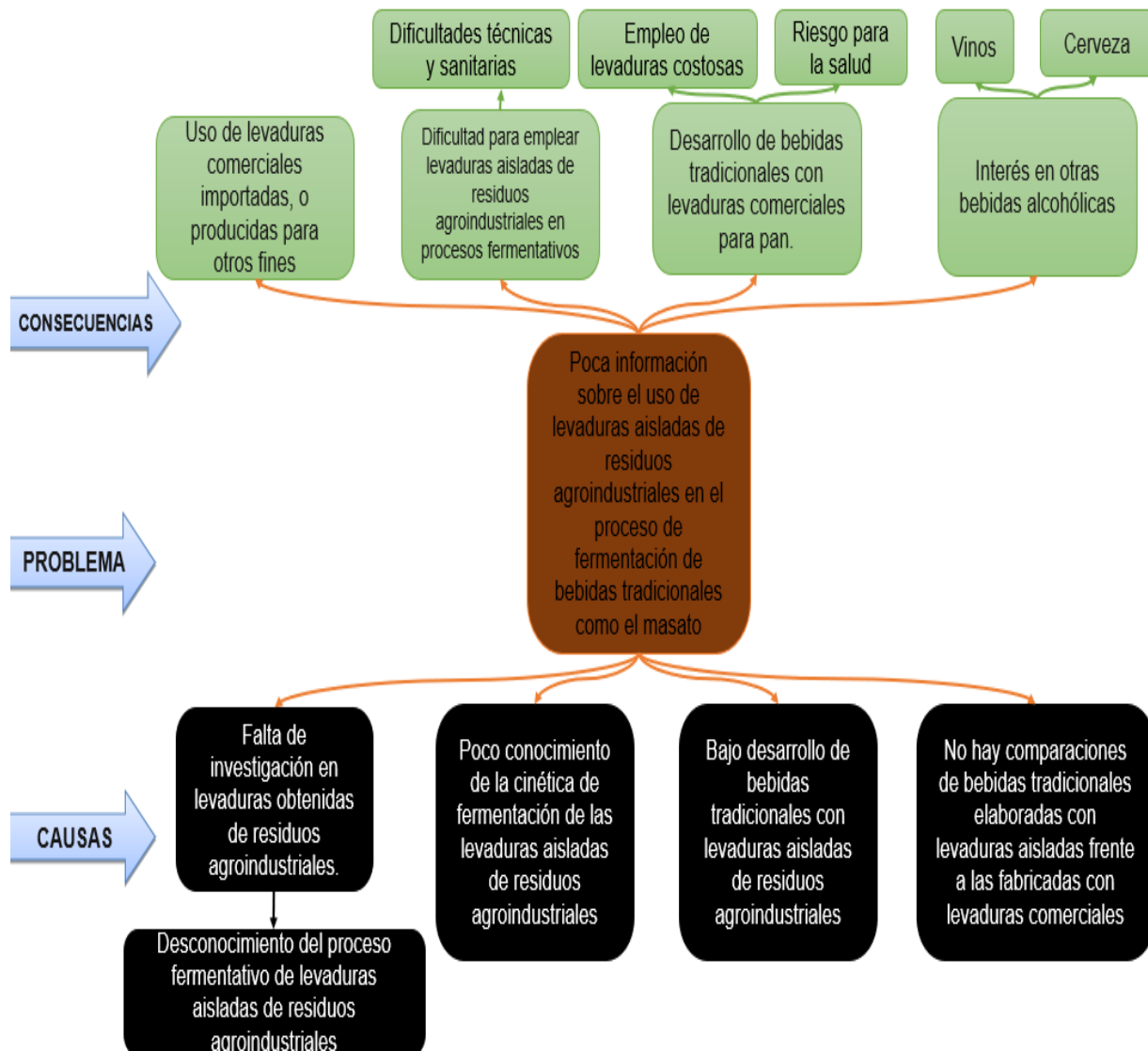
El masato es una bebida tradicional colombiana producto de la fermentación de arroz o maíz, esta se ha desarrollado principalmente de forma artesanal en las zonas rurales del país, por lo anterior, no se cuentan con procesos industrializados que permitan volúmenes de producción considerables para su comercialización en masa. Igualmente, al ser un producto artesanal, no se encuentran disponibles normativas que establezcan parámetros sanitarios y de calidad.

Adicionalmente, no se cuenta con lineamientos que definan condiciones óptimas de fermentación como tiempo, temperatura y levaduras específicas para dicho proceso.

Siendo así, la falta de industrialización del proceso de producción de masato en las zonas rurales, así como la ausencia de investigación de levaduras fermentativas específicas para esta bebida y el creciente interés de la industria hacia los vinos y las cervezas, ha generado un alto grado de apatía por parte de los organismos gubernamentales y por la industria alimentaria, siendo baja la cantidad de información sobre estandarización del proceso y producción en masa de bebidas tradicionales como el masato, el principal problema de esto es la falta de control sanitario en los productos, acarreando riesgos en la salud de los consumidores, adicional a esto, el producto presenta una vida útil muy corta; todo esto se esquematiza en la Figura 1.

Figura 1.

Árbol de problemas



Partiendo de lo expresado anteriormente, la pregunta de investigación que se planteó fue:

“¿El uso de levaduras aisladas de residuos agroindustriales, puede ser una alternativa potencialmente viable para la obtención de un producto fermentado tipo masato similar al producido artesanalmente con levaduras comerciales?”

Justificación

La industrialización de bebidas alcohólicas ha presentado avances significativos en los últimos años, siendo representativos en el campo de cervezas (gracias al auge de cervecerías artesanales que se ha presentado en Colombia como BBC) y vinos, sin embargo, este fenómeno no se ha presentado de la misma forma para las bebidas tradicionales y artesanales siendo sus causas principales: Bajo nivel de investigación de estas bebidas, índices bajos de industrialización y falta de ser objeto de estudio por parte de las autoridades (Moreno, 2021; Gunter, 2006).

Todo lo anterior ha traído como consecuencia una alta dificultad en la estandarización e industrialización de este tipo de bebidas, también se ha visto afectada la optimización del proceso productivo para la obtención de una bebida de calidad. De esta forma se cuenta con parámetros limitados para optimizar el proceso o para mejorar el producto (Gunter, 2006).

Para que se produzca la fermentación, es necesario que la bebida posea microorganismos que tengan esta capacidad y en las regiones rurales encontraron varias formas: Adición de levaduras comerciales para pan, cáscaras de piña (algunas con tratamiento y otras sin tratamiento), un sobrante de una producción anterior o una cerveza. Estos productos se agregan sin control y sin considerarse los parámetros de calidad e inocuidad alimentaria (Holguín, 2010; Becerra, 2014; Ríos & Alemán, 2019).

La producción de estas bebidas alcohólicas a nivel industrial debe estandarizarse, para esto, es necesario conocer todo acerca del proceso, especialmente de la fermentación y un punto clave es la cinética, que permite determinar la velocidad a la que se da la producción de etanol o se consumen los azúcares, conociendo los parámetros cinéticos de la fermentación, es posible saber el tiempo de reacción que se dará en el producto que se está fabricando (Bricio, Bricio, Arceo, Hernández, & López, 2017; Garduño, Martínez, López, & Ruiz, 2014).

El aprovechamiento de residuos agroindustriales ha crecido a través de los años, esto a causa de los costos que tiene su tratamiento cuando se consideran desperdicios totales, así como su impacto ambiental. Su uso ha ido en aumento en industrias alimenticias, especialmente como procesados para consumo animal, también han sido ampliamente utilizados como sustratos en el crecimiento microbiano, y como fuente de microorganismos que pueden ser beneficiosos en diferentes ramas, como tratamiento de aguas residuales, producción de alimentos y biomoléculas (Moran, 2020; Altamirano, 2013).

Esta investigación puede aportar conocimientos sobre los parámetros de producción y así una posible vía de industrialización de este proceso tanto a la comunidad académica como a los productores, partiendo de la evaluación de diferentes tipos de levaduras (aisladas de residuos agroindustriales) que pueden ser utilizadas en la fermentación y culminando con la evaluación del producto para consumo logrando que este sea competitivo y rentable.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto de levaduras procedentes de residuos agroindustriales sobre el proceso de fermentación y las características fisicoquímicas y sensoriales en una bebida fermentada tipo “masato”.

Objetivos Específicos

Aislar levaduras de cáscara de piña y yuca que sean aptas para la fermentación alcohólica del masato de arroz.

Analizar la cinética de fermentación de las levaduras aisladas de la cáscara de piña y de yuca.

Desarrollar una bebida tipo masato empleando levaduras aisladas de la cáscara de piña y yuca, así como levadura comercial.

Seleccionar la bebida fermentada tipo masato con las mejores características fisicoquímicas, de calidad y sensoriales desarrollada con levaduras de cáscara de piña, yuca y con una levadura comercial.

Marco Teórico y Conceptual

En esta sección se presentan los temas más importantes asociados al proyecto, entre los que se encuentran masato, levaduras, residuos agroindustriales y en general temas fundamentales utilizados para el desarrollo de este trabajo.

Piña

La piña (*Ananás comosus*) es una fruta tropical originaria del sureste de Brasil y Paraguay, aunque otros la referencian en Brasil y Uruguay, por lo que estaba en Sur América antes de la llegada de los españoles. (Garzón, 2016; DANE, 2016) Esta fruta pertenece a la familia de las bromeliáceas es de tipo herbáceo y perenne, su nombre se relaciona con el antiguo guaraní donde Na-na significaba fragancia-fragancia (Garzón, 2016; DANE, 2016)

Sus raíces sobresalen del suelo, su tallo es corto y cubierto por hojas dispuestas en forma de espiral de forma delgada y larga. El fruto es cilíndrico y usualmente se agrupan varios frutos. La pulpa (que es la consumible) está rodeada por brácteas que van de un color verde cuando no están maduras hasta un color amarillo en la maduración, esta es la llamada cáscara (DANE, 2016).

La piña Golden, Gold MD2 o Gold (ver figura 2), es una de las variedades (híbrida), junto con la Cayena Lisa, la Perolera y la Manzana. La primera, que es el objeto de este estudio, posee mayor contenido de azúcares que las demás variedades, además es más pequeña y es aceptada a nivel mundial, su forma es simétrica y uniforme. La pulpa es amarilla brillante, un gran atractivo de este producto (DANE, 2016).

Figura 2.

Piña Gold variedad MD2 empleada para el proceso de aislamiento.

**Yuca**

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un tubérculo procedente del trópico americano, este se ha convertido en la cuarta fuente más importante de energía después del arroz, la caña de azúcar y el maíz. Puede soportar sequías y suelos infértiles (DANE, 2016). Pertenece a la familia Euforbiaceae, subfamilia Crotonoideae y tribu Manihotae (Aguilar, y otros, 2017).

Esta planta ha sido ampliamente utilizada, esto se debe a que puede utilizarse tanto el tubérculo como la planta debido a su alto contenido de carbohidratos y proteínas. La raíz ha sido empleada para alimentación humana (harina, croquetas, alimento fresco, almidón) y animal

(forrajes), también se ha empleado a nivel industrial para obtener almidón, alcohol, pegantes, adhesivos, entre otros (DANE, 2016).

En Colombia se manejan 2 variedades: Yuca de mesa (ver figura 3) y yuca industrial. Para el presente trabajo se escogió la yuca de mesa, puesto que representa el 93% del mercado nacional (Ministerio de Agricultura, 2021; DANE, 2016).

Estas plantas pueden llegar a medir de 1.5 a 4.0 metros de altura, su pulpa es blanca o amarilla y la destinada a la alimentación se caracteriza por tener una gran cantidad de carbohidratos (almidón) (Aguilar et al., 2017).

Figura 3.

Yuca de mesa empleada para el proceso de aislamiento.



Residuos Agroindustriales

Colombia es un país que se destaca por la cantidad de recursos naturales y ambientales que posee y son estas condiciones las que le han ayudado a generar una gran industria frutícola y hortícola, los productos se destinan para consumo interno y externo, siendo el primero el más común; los productos de consumo interno tienen dos tipos de clientes: las industrias de

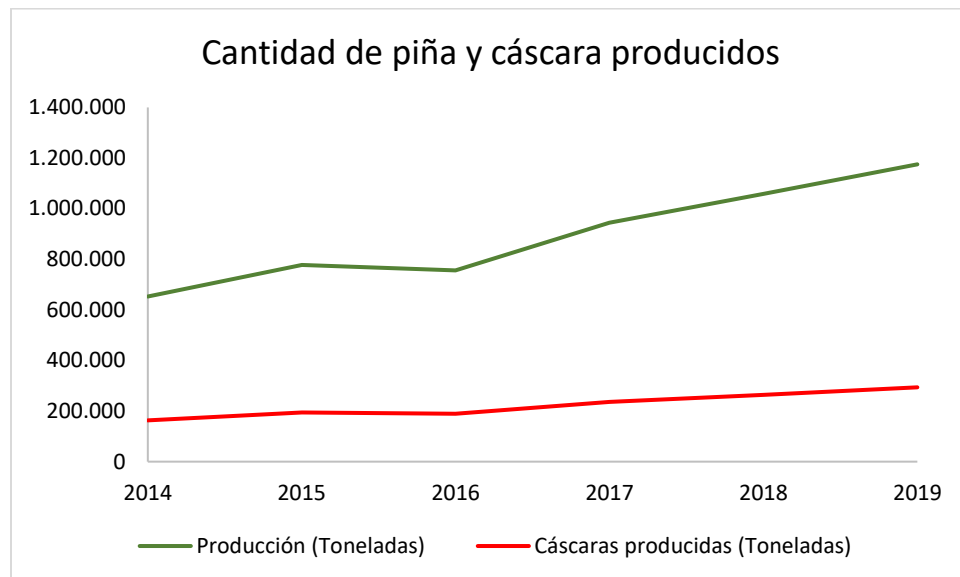
transformación y los consumidores directos, pero realmente ninguno ha sabido manejar los residuos que se generan (Martínez & Quintero, 2017).

Lo anterior supone un tema de suma importancia frente al impacto ambiental, social, económico y cultural que esto ha generado. En Colombia, se reglamentó la clasificación de residuos sólidos mediante la Resolución 2184 de 2019 y que entró en vigor el 1 de enero de 2021 considerando una bolsa verde para residuos orgánicos. Estos residuos se llevan a plantas de tratamiento donde se transforman en abonos o mejoradores de suelos, dependiendo del programa de aprovechamiento de cada municipio o distrito, sin embargo, solo algunos de ellos cuentan con un programa de aprovechamiento de residuos orgánicos por lo que la bolsa verde no es para todos los lugares del país y no se presenta la opción de los residuos como materias primas para procesos industriales (Ministerio de Ambiente, 2021).

De acuerdo con el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (2019), la producción de piña ha ido en aumento y por consiguiente la cantidad de residuos asociados a esta, fenómeno que puede apreciarse en la Figura 4, considerando que la cáscara es aproximadamente el 25% del peso total de la piña (Valles, 2021). En el año 2019, la producción de esta fruta se estimó en 1.174.995 Toneladas, la cantidad de residuos generados a partir de esta fruta se presenta en la Figura 4.

Figura 4.

Producción y generación de cáscaras de piña. Año 2014 - Año 2019



Nota. Adaptado de Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 2019.

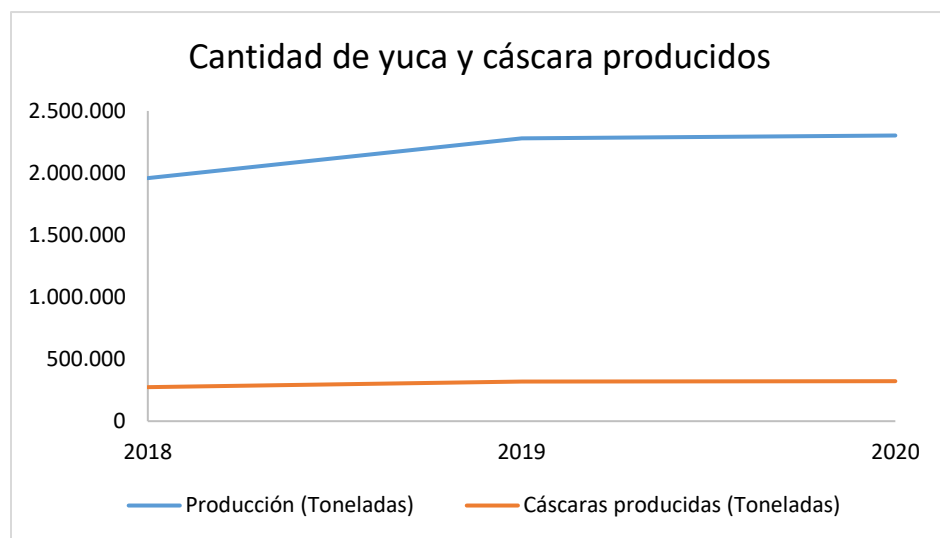
Existen diversos estudios donde se busca el aprovechamiento de la cáscara de piña, especialmente para alimentación de novillas u otros rumiantes, sin embargo, la cáscara de esta fruta no ha sido empleada como materia prima en la industria a pesar de tener un alto contenido en fibra dietética, también se suele emplear la piña junto con su cáscara para las formulaciones y no solo el residuo (Elizondo & Campos, 2014; Carías, 2015)

Los datos relativos a la yuca no son diferentes, entre los años 2015 y 2020 las áreas sembradas de este tubérculo aumentaron en un 7%, mientras que las áreas cosechadas aumentaron un 21%. De las dos variedades en Colombia, es la yuca de mesa la que se impone con una participación del 93% del mercado. La cantidad de cáscara generada por este producto es de aproximadamente 15%, lo que significó en el año 2020 más 300 mil toneladas de desechos.

La producción por año y la generación de cáscaras se presentan en la Figura 5 (Ministerio de Agricultura, 2021; Muñoz & Riera, 2020):

Figura 5.

Producción y generación de cáscaras de yuca. Año 2018-2020



Nota. Adaptado de Ministerio de Agricultura, 2021.

La yuca ha sido ampliamente empleada como sustrato para levaduras, pero su cáscara aún no ha sido considerada una materia prima en la industria alimentaria; estudios recientes han confirmado la importancia de este residuo para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con plomo y como aditivo para la alimentación animal (Tejada, Montiel, & Acevedo, 2016; Berkhout, 2021)

Fermentación Alcohólica

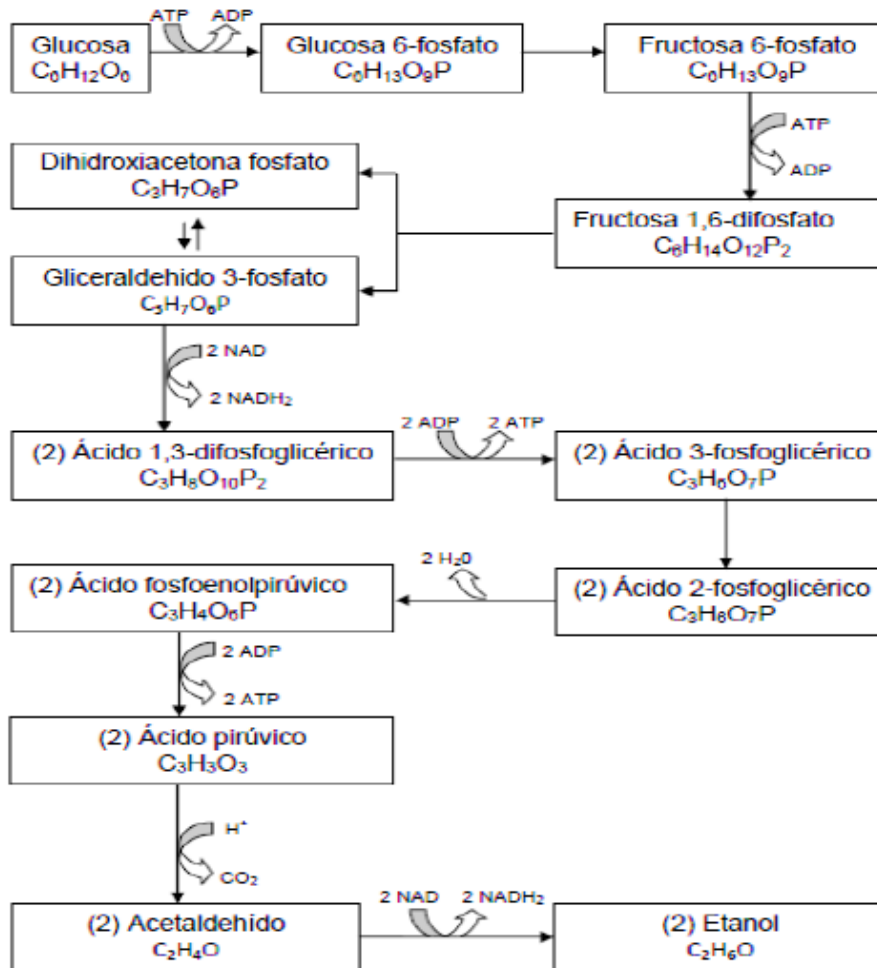
La fermentación es un proceso de transformación bioquímica de azúcares en metabolitos y Dióxido de carbono (CO₂). Este proceso ocurre en presencia de microorganismos. Existen diferentes tipos de fermentaciones dependiendo del metabolito producido: Las fermentaciones que producen lactato, se denominan fermentaciones lácticas; las que presentan acetato se

consideran fermentaciones acéticas; y las que producen etanol son llamadas fermentaciones alcohólicas, estas últimas inician cuando el microorganismo se pone en contacto con un medio de cultivo nutritivo que favorece su crecimiento y la producción de metabolito. (Fula, 2010; Reyes, 2015)

Existen diferentes tipos de microorganismos que son empelados en diferentes procesos industriales, por ejemplo, para la fermentación alcohólica las principales son las levaduras, estas a su vez presentan una afinidad mayor por la glucosa, sin dejar de asimilar sacarosa o maltosa (Fula, 2010). La fermentación alcohólica se presenta en ausencia de oxígeno (Reyes, 2015) y sigue la ruta metabólica expuesta en la Figura 6.

Figura 6.

Ruta metabólica para la producción de etanol



Nota. Por Argemí, 2016. Proyecto final de carrera. Diseño de un biorreactor para la fabricación de la cerveza

La glucólisis está dividida en 10 pasos, de los cuales, los 5 primeros requieren energía, y los demás liberan energía, los pasos se explican a continuación (OpenStax Biología CC BY 3.0, 2018):

- Paso 1: Se transfiere un grupo fosfato del ATP a la glucosa, convirtiéndola en Glucosa 6-fosfato
- Paso 2: Se produce la isomerización de la molécula anterior, esta se denomina Fructosa 6-fosfato
- Paso 3: Se transfiere otra molécula de fosfato a la Fructosa 6- fosfato, obteniendo así la Fructosa 1,6-difosfato.
- Paso 4: La molécula del paso anterior es altamente inestable, por lo que se da un fraccionamiento que da origen a dos azúcares de 3 carbonos: la Dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehído-3-fosfato
- Paso 5: A pesar de ser una reacción en equilibrio Dihidroxiacetona fosfato \leftrightarrow gliceraldehído – 3 – fosfato, este tiende al gliceraldehído-3-fosfato por lo que al final de la reacción todo el DHAP es transformado en gliceraldehído-3-fosfato.

Se debe tener en cuenta que en los pasos siguientes se libera energía, del mismo modo se puede apreciar que se empiezan a producir dos moléculas en cada caso debido al rompimiento dado en el paso 5.

Paso 6: En este se dan dos procesos; Primero se da la oxidación del Gliceraldehído-3-fosfato y segundo la reducción del NAD^+ en NADH y H^+ . Esta es una reacción exotérmica que permite la fosforilación de la molécula, dando origen al Ácido 1,3-difosfoglicérico.

- Paso 7: La molécula anterior dona uno de sus grupos fosfato al ADP y lo transforma en 1 molécula de ATP, generando el Ácido 3-fosfoglicérico.
- Paso 8: Se genera una transformación isomérica, se obtiene el Ácido 2-fosfoglicérico.

- Paso 9: La molécula anterior pierde un mol de agua generando así el Ácido fosfoenolpirúvico (PEP), una molécula altamente inestable.

- Paso 10: La molécula inestable libera su grupo fosfato generando el ácido pirúvico, también llamado Piruvato.

Con este paso se termina el proceso de glucólisis generando 2 moléculas de ATP, dos de NADH y 2 de piruvato; en un proceso anaerobio, con ayuda de la enzima Piruvato descarboxilasa, el piruvato se convierte el acetaldehído produciendo CO₂ y para que se dé la regeneración del NAD⁺, la enzima etanol deshidrogenasa transforma el acetaldehído en etanol.

Parámetros Importantes en la Fermentación

Para que la fermentación se pueda llevar a cabo, se presentan los siguientes parámetros adaptados a la *S. cerevisiae*:

Cultivos Iniciadores

El sustrato reacciona con el cultivo iniciador de *S. cerevisiae* para convertir el azúcar en etanol, esto en condiciones anaeróbicas (Ho et al., 2021); Englezos et al., aseguraban que la fermentación alcohólica “es la transformación de azúcares ... principalmente en etanol y dióxido de carbono”(2018), estas levaduras pueden ser nativas o inoculadas, Minebois et al., 2020, sugiere que, además de los dos productos anteriormente descritos, también se genera, como tercer subproducto importante: el glicerol.

La fracción restante se utiliza para la síntesis de biomasa y cientos de metabolitos adicionales, incluidos ácidos orgánicos (ácido acético, succinato) que generan sabores deseados en las bebidas (Pereira de Paula et al., 2021), metabolitos secundarios con sabor activo, que son compuestos volátiles como: ésteres, alcoholes fusel, alcoholes superiores, ácidos grasos, aldehídos, cetonas, fenoles volátiles y compuestos no volátiles como: azúcares, ácidos y

compuestos fenólicos (He, et al., 2021). Estos compuestos son lo que les confieren a las bebidas alcohólicas el perfil olfatométrico y demás propiedades sensoriales, otorgando calidad en el producto final (He et al., 2021; Papinello et al., 2020; Englezos et al., 2018)

La fermentación, como se dijo anteriormente, parte de la transformación de azúcares; las levaduras de la familia *Saccharomyces*, “son consideradas etanógenas, esto significa que son capaces de fermentar glucosa, fructosa, sacarosa... además pueden descomponer el ácido hexanóico (producto indeseado)” (Chua, Lu, & Liu, 2017). Para la *S. cerevisiae*, la glucosa es la principal fuente de carbono, de hecho, esta levadura suprime el consumo de la maltosa en condiciones de glucosa superiores a 8 g/L, (Pereira de Paula et al., 2021) y cuando descompone galactosa no presenta resultados tan eficientes como los presentados con la glucosa (Lawton & Alcaine, 2019).

La fermentación alcohólica puede darse con diferentes cultivos iniciadores (Minebois et al., 2020), según Miranda et al., 2015, en su trabajo “Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces spp.* nativas de viñedos en Querétaro, México”, existen tres principales; la fermentación espontánea, en la que las levaduras son empleadas para la fermentación, este es un proceso poco controlable y poco replicable, pero que genera sabores característicos a las bebidas; la fermentación mediante adición de levaduras seda (LSA), es un proceso industrial en el que las levaduras ya están seleccionadas, su proceso se puede replicar, escalar y controlar, pero que no genera tantos sabores y olores diferentes; por último, se encuentra la fermentación por levaduras seleccionadas, que es replicable, escalable y al mismo tiempo brinda características organolépticas especiales a las bebidas alcohólicas.

Según Minebois et al, (2020)., en su publicación “A time course metabolism comparison among *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* and *S. kudriavzevii* species in wine fermentation”, existen cuatro fases de fermentación:

Fase I: Fase aeróbica transitoria: Inicia con la inoculación y finaliza cuando se agota el oxígeno molecular y el proceso deja de ser aerobio a anaerobio.

Fase II: Fase de crecimiento exponencial delimitada por el contenido de nitrógeno: Inicia cuando el proceso comienza cuando no existe la presencia de oxígeno, la disponibilidad de N_2 es un factor crítico debido a que afecta la cinética de fermentación y la formación de metabolitos, su final se ve reflejado cuando la producción de biomasa disminuye, así como el contenido de N_2 .

Fase III: Fase estacionaria; en esta fase se presentan diferentes respuestas metabólicas después de la falta de N_2 . Cuando las células de levadura carecen de nitrógeno, la producción de los principales productos de la fermentación disminuye, estos son el etanol y el glicerol.

Fase IV: Fin de la fermentación: Se aprecia cuando la producción de CO_2 empieza a decrecer y comienza de nuevo el aumento en la concentración de los niveles de O_2 molecular en el medio.

Oxígeno Molecular

El oxígeno molecular (O_2) es uno de los factores más importantes en la fermentación alcohólica debido a que las células de las levaduras necesitan este oxígeno para la producción de esteroides y ácidos grasos insaturados, reflejados en la tolerancia al etanol, su capacidad fermentativa y la viabilidad de la levadura, incluso se recomienda la adición de este elemento al final de la fase de crecimiento celular para optimizar el proceso fermentativo (Yan et al., 2020)

Glicerol

A pesar de ser el etanol el metabolito principal de fermentación por la levadura *S. cerevisiae*, el glicerol se presenta también como un subproducto que proporciona una mejor percepción sensorial en las bebidas alcohólicas, aportando mayor suavidad en los productos (Minebois et al., 2020; Englezos et al., 2018)

Contenido de Nitrógeno (N₂)

Como se dijo anteriormente, la falta de nitrógeno afecta la producción de etanol y glicerol, estudios recientes han demostrado que la mezcla de N₂ complejo aumenta la biomasa de las células de la levadura en la fermentación del mosto con la *S. cerevisiae*, además, la adición del N₂ asimilable por levaduras mejora la complejidad aromática de las bebidas alcohólicas (He et al., 2021)

Resistencia

Las levaduras *S. cerevisiae*, compiten usualmente en los caldos de cultivo con las levaduras, pero a medida que el contenido de etanol comienza a incrementar, las cepas nativas van disminuyendo, no solo el contenido de etanol favorece a esta levadura, el porcentaje de O₂ disuelto y el factor killer (tolerancia a soportar las toxinas que ellas mismas producen para destruir a los demás microorganismos que compiten en el sustrato) también la ayudan en su competencia frente a los demás microorganismos. Esto se debe a su composición microcelular, puesto que está compuesta por proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, polifosfatos, lípidos y ácido nucleicos (Suárez et al., 2016; Rodríguez et al., 1998)

pH

Entre los diversos estudios realizados se ha reportado que las condiciones de pH óptimas para las levaduras están entre 4,5 y 6,5 (Ruiz et al, 2016; Liu et al., 2021; Capece et al., 2018; Villalpanda et al., 2017; Pinto et al., 2017; Chua et al., 2017; Karabagias et al., 2020)

Temperatura

Existen parámetros que intervienen en la producción de biomasa, uno de ellos es la temperatura (Papinello et al., 2020) a continuación, se presentan las temperaturas óptimas presentadas por diferentes autores; es necesario recalcar que este factor se va a ver afectado por el medio de cultivo y la *S. cerevisiae* empleada:

- De acuerdo con Ruiz et al., (2016) la Temperatura óptima de operación para la *S. cerevisiae* inmovilizada, es 30°C;
Según Liu et al. (2021) y Chua et al., (2017) esta temperatura es de 20°C
- Otros autores aseguran que se debe mantener una temperatura de 25°C (He et al., 2021; Herrera et al., 2019; Lawton & Alcaine, 2019; Minebois et al., 2020; Yan et al., 2020)
- Capece et al., (2018) plantea que la temperatura óptima de la inoculación es de 26°C, y de fermentación de 20°C
- Villalpanda, et al., (2017) , plantea una temperatura de 30°C, a pesar de no ser inmovilizada;
- Pinto et al (2017) y Han et al., 2020, trabajan bajo una temperatura de 26°C, para inoculación y fermentación
- Englezos et al., 2018, planteó una temperatura de 37°C
- Karabagias, et al., 2020, planteó una temperatura más baja, 15°C para la producción de bebidas funcionales (debido a la necesidad de mantener el contenido probiótico)

Tiempo de Fermentación

El tiempo de fermentación varía dependiendo de las condiciones del caldo de cultivo, pero estudios han demostrado que la fermentación realizada por la *S. cerevisiae* es más rápida que otras, por ejemplo, que la *S. pombe*, siendo que la primera presenta un tiempo de fermentación de 16 días, mientras que la segunda es de 18-20 días, bajo las mismas condiciones (He et al., 2021)

Otros estudios han demostrado la incidencia de diferentes factores en este tiempo, por ejemplo, la aireación, que, según Yan et al., (2020), es de 12 días sin aireación y 8 días con aireación bajo las mismas condiciones.

Sustratos

Algunos residuos generados en la industria son eliminados en gran cantidad a los rellenos sanitarios, generando problemas ambientales; se ha encontrado que los residuos alimenticios pueden ser en gran medida re-aprovechados como fuentes de carbono para las fermentaciones alcohólicas (Liu et al., 2021)

Teniendo en cuenta que las levaduras son organismos heterótrofos y necesitan fuentes de carbono orgánico, pueden crecer en diferentes tipos de hábitats como plantas, frutas, suelos, atmósfera, etc. (Miranda et al., 2015). Aprovechando lo mencionado anteriormente, las frutas son hábitats importantes para una gran variedad de especies de levaduras en la naturaleza debido a su alta concentración de azúcares simples (Ho et al., 2021).

Algunos estudios han demostrado que un desecho puede ser útil como sustrato si se acondiciona de la forma correcta para la levadura, como con suplementación con sales de amonio y/o aminoácidos libres que afecten significativamente el rendimiento en la fermentación de la levadura (Liu et al., 2021), se debe contar con una inoculación adecuada (Villalpanda et al.,

2017); los aminoácidos son conocidos por contribuir positivamente al sabor en las bebidas alcohólicas (Zhou et al., 2021)

Los medios de cultivo deben tener un aproximado de 20 g de glucosa: 6 g de levadura (Ruiz et al., 2016), según Karabagias et al., (2020) el contenido inicial de azúcares debe ser de 5% (p/v) y según Ruiz et al., 2016, este debe ser de 4,5% de azúcares reductores, pero las concentraciones van a depender de la bebida a preparar y el inóculo empleado (Han et al., 2020)

Arroz (*Oryza sativa* L.)

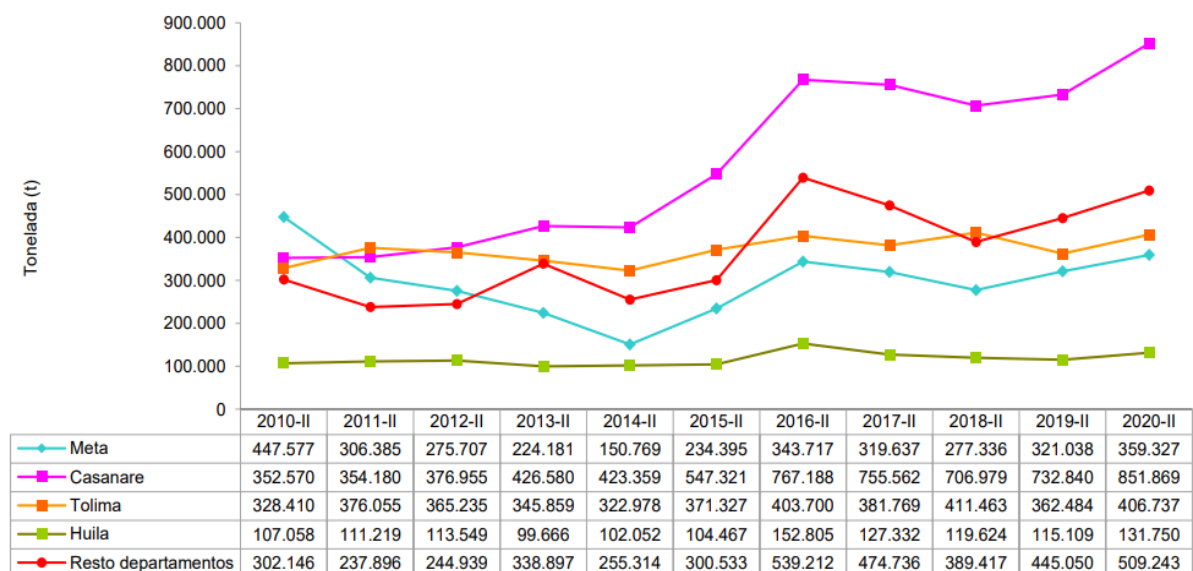
Se considera al arroz una de las plantas más antiguas, con referentes de hasta 3000 años a.C. Su origen se ha reportado en el sur de la India, en China y en el Sudeste Asiático, a Colombia llegó a través después de la llegada de los españoles. Sus tallos son redondos y huecos con nudos y entrenudos. El arroz blanco se obtiene cuando es descascarillado, es decir, que retira su cascarilla, en este proceso se pierden algunos nutrientes como la fibra (DANE, 2017).

Este cereal contiene una gran cantidad de almidones, siendo una buena fuente de energía, es bajo en grasa, no contiene colesterol y presenta bajas proporciones de vitaminas del grupo B y minerales como fósforo, hierro, potasio, calcio, magnesio y sodio (DANE, 2017).

En Colombia, de acuerdo con los datos reportados por el DANE, la producción de arroz mecanizado ha ido en aumento en las diferentes zonas arroceras del país, esto se puede apreciar en la Figura 7, donde, en Casanare, se pasaron de producir cerca de 369 mil toneladas a 851 mil toneladas en 10 años, mostrando así el potencial de este producto para la transformación industrial (DANE, Boletín Técnico. Encuesta Nacional de Arroz Mecanizado (ENAM), 2020).

Figura 7.

Serie de producción de arroz mecanizado. Principales Departamentos II Semestre (2010-2020)



Nota. Por DANE en Boletín técnico. Encuesta Nacional de Arroz Mecanizado (ENAM, 2020)

Levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares eucariotas que se reproducen en ambientes con alta cantidad de carbohidratos, sales minerales y ácidos grasos; su función en la industria de bebidas alcohólicas es fermentar los sustratos produciendo etanol, como el mosto en el vino o la cerveza; y aportando elementos esenciales a las bebidas. (Argemí, 2016).

Levaduras Empleadas en Procesos Fermentativos

A nivel industrial, existen diferentes tipos de levaduras empleadas en la fermentación alcohólica como *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* (Ruiz et al., 2016), todas con características específicas, variando según la bebida a elaborar (Parpinello et al., 2020). Estos microorganismos deben ser aptos para el consumo humano y soportar las estresantes condiciones de fermentación (Parpinello et al., 2020; Villalpanda et al., 2017), ejemplos de esto son las *S.*

eubayanus, levaduras que puede ser utilizadas en temperaturas inferiores a las soportadas por la *S. cerevisiae* (Parpinello et al., 2020); la *Schizosaccharomyces pombe*, que es utilizada especialmente en la elaboración de sidras (He et al., 2021); la *Kluyveromyces marxianus*, es una levadura capaz de convertir la lactosa en etanol (capacidad que no presenta la *S. cerevisiae*), lo que ha hecho que su uso sea empleado en elaboración de productos con valor agregado (como cerveza agria) a partir de residuos lácteos (Lawton & Alcaine, 2019), las levaduras *S. uvarum* y *S. kudriavzevii*, también son criofílicas, es decir, soportan muy bajas temperaturas, es por esto que son ampliamente utilizadas en las fermentaciones vinícolas (Minebois et al., 2020), otras levaduras utilizadas en fermentaciones alcohólicas son las *S. pastorianus* (Capece et al., 2018). Industrialmente, las levaduras más estudiadas para la producción de etanol son; *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis* y *Candida utilis* (Suárez et al., 2016). A pesar de tener tantos microorganismos en la industria, sigue siendo la *S. cerevisiae* la reina de las fermentaciones (Han et al., 2020).

Las levaduras, han demostrado su importancia en los procesos fermentativos, esto debido al perfil aromático que generan en los vinos y en las bebidas alcohólicas, los géneros no *Saccharomyces* (como los mencionados anteriormente) están incluidos en esta categoría y también son utilizadas en co-fermentaciones que otorgan bajos niveles de etanol, una tendencia en auge para productos como vinos. (Amengual, 2018; Gschaedler, 2017; Maturano et al., 2019)

Caracterización de las Levaduras *S. cerevisiae*

Macroscópica: Las levaduras son, generalmente, blancas o beige; se presentan generalmente colonias con márgenes regulares y consistencia cremosa (Uribe, 2007)

Microscópica: Las levaduras pueden ser esféricas, ovoideas, elipsoideas o alargadas, pueden oscilar de 1 a 9 μm de ancho y 2 a más de 20 μm de longitud dependiendo de factores como especie, nutrición, entre otros. (Carrillo & Audisio, 2007)

Modelo Cinético de Crecimiento Microbiano

Los modelos matemáticos que buscan interrelacionar datos experimentales, relacionados al crecimiento microbiano, son conocidos como modelos cinéticos de crecimiento microbiano, entre estas, la más estudiada es la Cinética de Monod, se sabe que la levadura *S. cerevisiae* sigue este modelo, así como otras levaduras de la familia *Saccharomyces spp.* (Calderón, 2017)

Modelo de MONOD

Este modelo matemático describe el proceso de fermentación para bebidas alcohólicas, Gee y Ramírez (1988 y 1984), propusieron un modelo para describir la tasa de consumo de azúcares reductores de glucosa (G), maltosa (M) y maltotriosa (N), así como la producción de biomasa y etanol, este modelo es conocido como relaciones de Monod, donde los modelos de crecimiento son obtenidos mediante: Modelo de Arrhenius (1886), Ratwosky (1982), Ratwosky (1983) y Hinshewood (1946). Las ecuaciones 1 a 6 describen este modelo (Bricio, Bricio, Arceo, Hernández, & López, 2017; Garduño, Martínez, López, & Ruiz, 2014):

$$\frac{dG}{dt} = -\frac{\mu_G * G}{k_G + G} * X \quad (1)$$

$$\frac{dM}{dt} = -\frac{\mu_M * M}{k_M + M} * \frac{k'_G}{k'_G + G} * X \quad (2)$$

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{\mu_N * N}{k_N + M} * \frac{k'_G}{k'_G + G} * \frac{k'_M}{k'_M + M} * X \quad (3)$$

$$\frac{dX}{dt} = Y_{XG} * \frac{\mu_G * G}{k_G + G} + Y_{XM} * \frac{\mu_M * M}{k_M + M} * \frac{k'_G}{k'_G + G} + Y_{XN} * \frac{\mu_N * N}{k_N + M} * \frac{k'_G}{k'_G + G} * \frac{k'_M}{k'_M + M} \quad (4)$$

$$E(t) = E_0(t) + Y_{EG}(G_0 - G) + Y_{EM}(M_0 - M) + Y_{EN}(N_0 - N) \quad (5)$$

Dónde:

G (mol/m³): Concentración de glucosa

M (mol/m³): Concentración de maltosa

N (mol/m³): Concentración de Maltotriosa

X (mol/m³): Concentración de biomasa

μ_i (h⁻¹): Tasa específica de absorción de azúcar.

K_i (mol/m³): Constante de Michaelis para el azúcar (i= G, M o N),

k'_i : Constante de inhibición para el azúcar.

E (mol/m³): Concentración de etanol

R_{xi} : Rendimiento estequiométrico de la biomasa por mol de azúcar reaccionado (i= G, M o N),

R_{Ei} : Rendimiento estequiométrico de etanol por mol de azúcar reaccionado (i= G, M o N).

R_{xi} y R_{Ei} son constantes.

Mediante la integración de este modelo, puede obtenerse la ecuación 6:

$$\mu_{m\acute{a}x} t = \frac{Y_{X/S}S_0 + Y_{X/S}K_S + X_0}{Y_{X/S}S_0 + X_0} \ln\left(\frac{X}{X_0}\right) + \frac{Y_{X/S}K_S}{Y_{X/S}S_0 + X_0} \ln\left(\frac{Y_{X/S}S_0}{Y_{X/S}S_0 + X_0 - X}\right) \quad (6)$$

Donde μ_{max} (h^{-1}), $Y_{X/S}$ (UFC/ g sustrato), S_0 (g/mL), K_S (g/mL), X (UFC/mL) y t (h), corresponden a la tasa de crecimiento específica máxima, rendimiento del sustrato con respecto a la biomasa, la concentración inicial de sustrato, la constante de saturación, la concentración de microorganismos y el tiempo, respectivamente (Calderón, 2017).

Modelo de MOSER

Este es una modificación del modelo de Monod, es empleado cuando la composición celular es independiente del tiempo de proceso y se representa por la ecuación 7 (Calderón, 2017):

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S^n}{K_S + S^n} \quad (7)$$

Esta ecuación se puede acoplar a el balance de masa y sustrato, obteniendo así la ecuación 8 (Calderón, 2017):

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \frac{\left(S_0 + \frac{X_0 - X}{Y_{XS}}\right)^n}{K_m + \left(S_0 + \frac{X_0 - X}{Y_{XS}}\right)^n} X \quad (8)$$

Donde $\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1}), $Y_{X/S}$ (UFC/ g sustrato), S_0 (g/mL), K_m (g/mL), X (UFC/mL) y n , corresponden a la tasa de crecimiento espec\u00edfica m\u00e1xima, rendimiento del sustrato con respecto a la biomasa, la concentraci\u00f3n inicial de sustrato, la constante de saturaci\u00f3n, la concentraci\u00f3n de microorganismos y una constante determinada experimentalmente, respectivamente.

Modelo de Teissier

Este modelo fue previo al modelo de Monod, introduciendo el concepto de deficiencia de crecimiento, y demostrando la relaci\u00f3n semilogar\u00edtmica entre la concentraci\u00f3n de biomasa y la velocidad de crecimiento. Este modelo es descrito en la ecuaci\u00f3n 9 (Calder\u00f3n, 2017):

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \left(1 - e^{\left(\frac{-S}{K_s}\right)} \right) \quad (9)$$

Este, tambi\u00e9n puede ser acoplado al balance de materia y sustrato, obteniendo as\u00ed la ecuaci\u00f3n 10 (Calder\u00f3n, 2017):

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \left(1 - e^{\left(\frac{-S_0 - \frac{X_0 - X}{Y_{XS}}}{K_m}\right)} \right) X \quad (10)$$

Donde μ_{max} (h^{-1}), $Y_{X/S}$ (UFC/ g sustrato), S_0 (g/mL), K_m (g/mL), X (UFC/mL) y n , corresponden a la tasa de crecimiento específica máxima, rendimiento del sustrato con respecto a la biomasa, la concentración inicial de sustrato, la constante de saturación, la concentración de microorganismos y una constante determinada experimentalmente, respectivamente.

Existen diferentes modelos, como el de Haldane (empleado en procesos Batch que estudia la adaptación del microorganismo en el medio y es útil cuando se presentan sustratos inhibitorios en el medio), el modelo de Contois (empleado en procesos anaeróbicos, donde se controla la velocidad de fermentación), el modelo de Amrane y Prigent (se caracteriza por la convergencia de los datos experimentales con los parámetros calculados, fue creado para describir la producción de ácido láctico a partir de lactosa), Modelo de Gompertz (fue creado para describir la mortalidad en la población humana, después fue capaz de describir la concentración de biomasa a través del tiempo), y el Modelo de Powell (este puede integrar la transferencia de masa de sustrato a través de la célula a la ecuación de Monod), entre otros (Calderón, 2017).

Cinética de Crecimiento Microbiano

La cinética de crecimiento se refiere a la presencia de microorganismos de una muestra a través del tiempo, como se presenta en la figura 8, existen 4 fases (Calderón, 2017; ComBase):

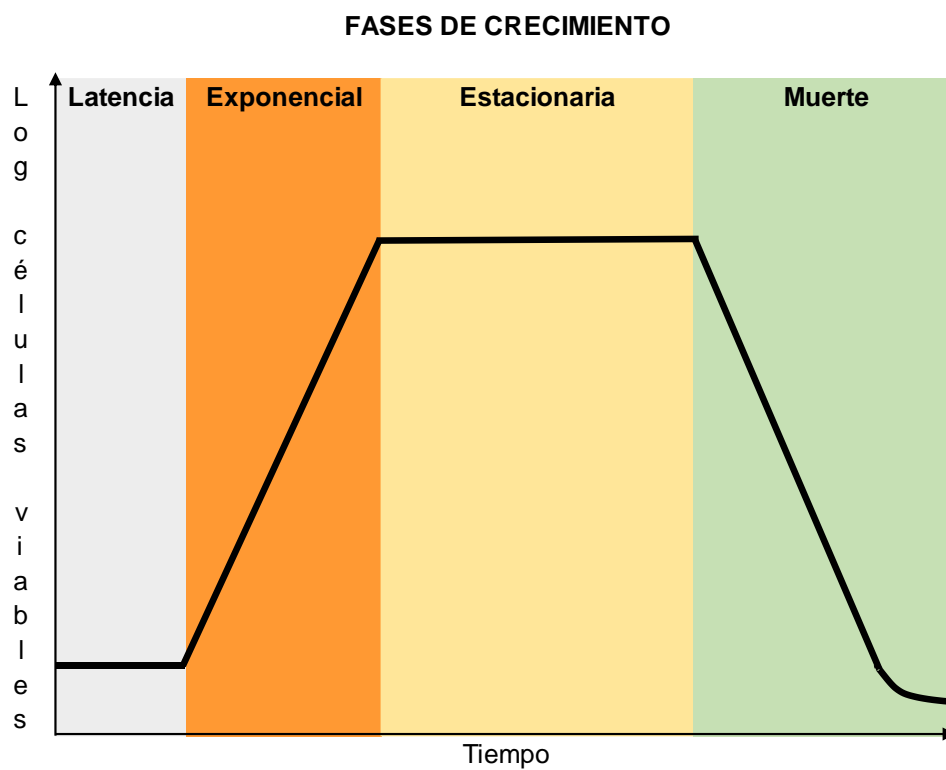
- Fase lag o de latencia: En esta, el microorganismo se adapta al medio, su característica es que las UFC/mL permanecen casi constantes.
- Fase logarítmica o exponencial: En esta, los microorganismos se multiplican rápidamente, esto se da mediante la progresión geométrica $2^0, 2^1, 2^2 \dots 2^n$. Mientras no se de ninguna limitante, esta fase se mantendrá. La forma en que se detiene esta fase suele

ser por la ausencia de nutrientes o aumento de componentes tóxicos para los microorganismos, así como la combinación de estos dos factores.

- Fase estacionaria: En esta no se presenta variación de microorganismos en el medio, usualmente en esta fase se ha agotado el sustrato, las células continúan con vida pero sin posibilidad de división.
- Fase de muerte: En esta, la cantidad de UFC/mL desciende debido a muerte celular.

Figura 8.

Fases de crecimiento microbiano



Nota. Por Software ComBase. Crecimiento bacteriano. Modelos predictivos de ComBase (ComBase, sf).

Antecedentes

El masato de arroz es considerado como una bebida tradicional colombiana, utilizado especialmente por la población rural para celebraciones, eventos y consumo en general; posee características como dulzor y suavidad. En la actualidad, estos masatos son realizados de forma tradicional y esto ha generado problemas sanitarios y gran recuento de microorganismos no deseados, tal como lo reporta Valencia et al., (2019) en su estudio “Línea base para aportar valor añadido a los productos a base de arroz fermentado artesanal “masato””, en el mismo, se encontró que tres muestras de masato, realizadas tradicionalmente, presentaban coliformes totales, *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, entre otros, las tres muestras se realizaron con formulaciones diferentes en distintos lugares de comercialización, en una de ellas se utilizó la cáscara de piña sin tratamiento y directamente en el masato, en las otras se adicionó levadura comercial (Valencia et al., 2019; Becerra, 2014; Holguín, 2010).

Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales en la Obtención de Levaduras y Producción de Bebidas Alcohólicas

Reducir la cantidad de residuos agroindustriales, ha sido uno de los focos de la investigación en los últimos años, es por esto que la utilización de cáscaras de alimentos (considerados desechos) para producción de levaduras ha presentado mayor desarrollo en los últimos años (Fula, 2010; Reyes, 2015).

Los residuos agroindustriales no solo generan problemas de contaminación, sino que también pueden ser un riesgo para la salud; la piña, por ejemplo, atrae a la mosca “peletera” (*Stomoxys calcitrans*), una mosca que afecta negativamente al ganado. Según lo reportado por Reyes, (2015), los desechos de la piña corresponden entre el 50-65% de su peso, de los cuales, el 32% es la cáscara.

En la zona de Boyacá, para la producción de masato, muchas veces no se utilizan levaduras comerciales para la fermentación, sino que se añade la cáscara de piña directamente al producto; en países como Chile, se ha utilizado la fermentación de cáscara de piña con agua y panela para iniciar procesos fermentativos (Valencia et al., 2019; Amengual, 2018)

La yuca ha sido ampliamente utilizada como fuente de carbono para la producción de etanol, tanto con cepas de control como con cepas nativas de *S. cerevisiae*. De hecho, estudios demuestran que sus residuos son mejor sustrato que la papa y la naranja para la producción de este metabolito. Se han registrado diferentes microorganismos en los productos fermentados de cereales, estos favorecen la degradación del almidón, haciendo que se dé la fermentación y mejorando el cuerpo del producto (Castellanos & Torres, 2017; Quintero et al., 2015; Reis et al., 2017; Fula, 2010)

En la actualidad, investigaciones han demostrado la presencia de diferentes microorganismos presentes en frutos y residuos agroindustriales, algunos ejemplos se presentan en la Tabla 1, donde por medio de diversos estudios se presenta qué microorganismo fue satisfactoriamente aislado:

Tabla 1.

Levaduras en residuos agroindustriales y en frutos.

Materia prima	Levaduras	Fuente
Exudado de cacao (Residuo)	<i>Saccharomyces, Candida, Pichia, Hansénula y Zygosaccharomyces</i>	(Vila, 2018)

Continuación Tabla 1.

Filósfera de mora (Residuo)	<i>Cryptococcus, Aureobasidium</i>	(Uribe, 2007)
Bagazo de caña de azúcar (Residuo)	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	(González et al., 2017)
Pomarroso (Fruto)	<i>Rhodotorula spp., Hanseniaspora spp., Brettanomyces spp., Candida spp., Kloeckera sp., Torulopsis sp.</i>	(Trujillo & Echeverry, 2015)
Viñedo (Residuos)	<i>Sacharomyces cerevisiae; S. paradoxus</i>	(Miranda et al., 2015)
Manzanas (Fruto)	<i>Sacharomyces spp.</i>	(León et al., 2020)
Yuca (En todo el proceso de fabricación)	<i>Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus vallismortis, Bacillus, cereus, Leuconostoc mesenteroides y Saccharomyces cerevisiae.</i>	(Chiquiza et al., 2016)
Naranja, mandarina, uva, piña, guayaba, sandía (Frutos y residuos)	<i>Sacharomyces spp.</i>	(Argote et al., 2015)

Productos Artesanales Fermentados

En Colombia, la diversidad cultural ha generado una gran variedad de alimentos, como las bebidas artesanales y tradicionales, entre ellas resaltan las bebidas fermentadas de arroz, maíz, raíces, entre otras. Históricamente, estas bebidas eran para la población indígena, después para la población rural y finalmente, se consume como una bebida elaborada en casa en ocasiones especiales, esto se debe a su contenido alcohólico bajo, sabor dulce y sensación suave en boca (Becerra, 2014)

Se debe tener en cuenta que el término masato, no es algo extendido a nivel Latinoamérica, de hecho, en Chile el masato (como se elabora en Colombia) es conocido como Chicha andina, y en Perú, la chicha hace referencia a una bebida no alcohólica (Arias, 2009)

Algunas bebidas artesanales que llevan un proceso fermentativo son la chica, el masato, el ñeque, el guarapo, entre otras; esto se presenta claramente en la Tabla 2.

Tabla 2.

Bebidas tradicionales o artesanales colombianas.

Materia prima	Bebida tradicional o artesanal	Fermentación	Referente
Maíz	Chicha	Maíz germinado, azúcar Entre 1-6 días °Brix finales: 13±2	(Becerra, 2014; Azanza

Continuación Tabla 2.

			& Chacón, 2018)
Harina de maíz y panela			
		Concentración de azúcar antes de agregar	
	Masato	levadura: 17%	
		°Brix finales: 14	
		t fermentación: 7 días	(Becerra, 2014)
Granos de arroz secos y azúcar			
Arroz	Masato	Concentración de azúcar antes de agregar	
		levadura: 17%	
		t fermentación: 7 días	
Yuca	Masato	Masa de yuca cocida	(Becerra, 2014; Arias, 2009)
		Fermentación: 3-4 días	
Panela y hierbas aromáticas como anís			
Caña de azúcar	Ñeque/ Chirrinchi	t fermentación: 7 días	(Tirado et al., 2015)
		Destilado	
	Guarapo	Jugo de caña de azúcar	(Becerra, 2014;

Continuación Tabla 2.

		Azúcar inicial: 75-92%	Armijos, 2016)
		Fermentación :1–3 días	
Miel			
Miel	Hidromiel	°Brix iniciales: 24° t fermentación: 17 días	(Herrera et al., 2019)

Masato

En Colombia, el masato es considerado una bebida tradicional que se elabora con cereales como el maíz o el arroz y tubérculos como la yuca, esta bebida presenta características como un alto grado de dulzor y baja concentración alcohólica, en el centro del país, es más común el uso de maíz y arroz, así como su combinación. Algunos autores han asegurado que esta bebida estaba presente antes de la colonización y ha permanecido en países como Colombia, Perú y Venezuela con algunas variaciones (Holguín, 2010; Becerra, 2014; Ríos & Alemán, 2019).

Esta bebida suele tomarse en festividades y por turistas en las zonas de Boyacá, Cundinamarca y Tolima, aunque también es comúnmente consumida en Santander. (Ríos & Alemán, 2019)

Tradicionalmente, el masato es fermentado con levadura comercial específica para pan, adicionando la cáscara de piña, cerveza, chica (otra bebida tradicional) o dejando un remanente de la producción anterior (M. Fuentes.; N. Lizarazo, comunicación personal, noviembre 25, 2020).

Es por esto que se han presentado problemas de salubridad y en el año 1948 se estableció la Ley 34 de 1948 y el decreto 4194; estos restringían la producción de bebidas fermentadas extraídas de la caña, maíz, arroz, cebada y otros cereales, son que “previamente los establecimientos o fábricas productores se hayan provisto de su correspondiente licencia otorgada por el Instituto Nacional de Higiene Samper-Martínez con exclusión de cualquiera otra autoridad y sin que llenen los requisitos de dicha Ley y del ... Decreto reglamentario.” (Ministerio de Higiene, 1948), esto rigió hasta 1991 (Cordero, 2010)

Materiales y Métodos

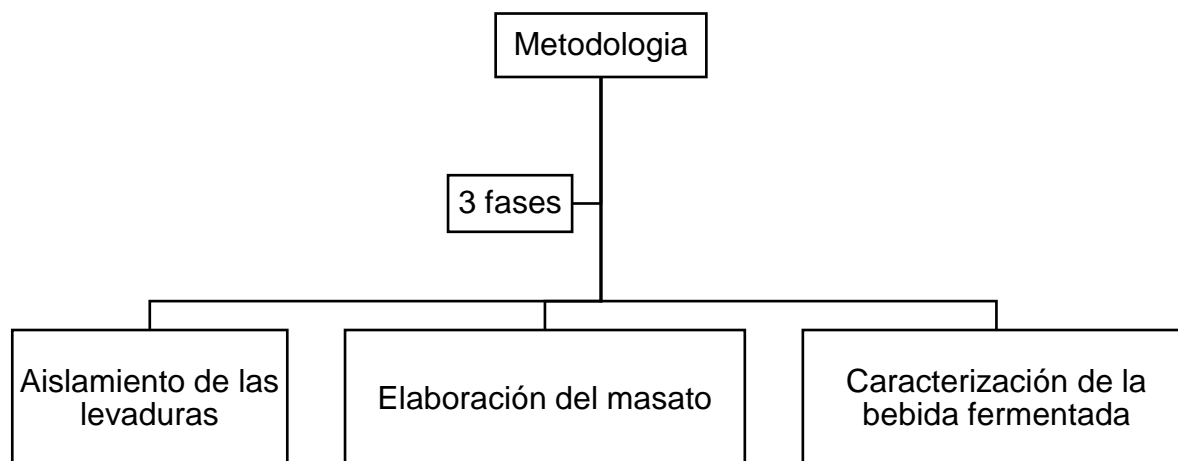
Materiales

Para el aislamiento de las levaduras se emplearon Agar (Scharlau), Extracto de levadura (Himedia), glucosa Anhídrida (PanReac AppliChem), Agar Papa Dextrosa (Difco), amoxicilina (La Santé), Agar Sabouraud con cloranfenicol (Scharlau), Agar Lisina (Merck). Para el enriquecimiento del caldo, se emplearon Sulfato de magnesio Anhídrido (Scharlau), Sulfato de Amonio (PanReac AppliChem) y Dihidrógeno fosfato de potasio (Scharlau). Como fuentes de carbono fueron empleadas la glucosa Anhídrida (PanReac AppliChem), Sacarosa (QM) y Fructosa Sol 10% (QM). Para las pruebas microbiológicas se emplearon Agar rosado de bengala (Scharlau), Agar de recuento de placa (PCA) (Scharlau) y Agar bilis glucosa rojo violeta (Himedia).

Para aislar las levaduras, se emplearon 3 piñas Golden y 3 yucas de mesa, obtenidas en el mercado local; en la elaboración de la bebida fermentada tipo “masato” se utilizó harina de arroz (Semillas del Patriarca), Levadura (*Levapan S. cerevisiae*), azúcar (Manuelita) y clavos y canela.

Métodos

Para el desarrollo de los objetivos propuestos se formuló la metodología expuesta en la figura 9, integrada por tres fases; aislamiento y caracterización de las levaduras, elaboración de la bebida fermentada y caracterización de la bebida fermentada tipo “masato”:

Figura 9.*Metodología****Fase 1: Aislamiento de las Levaduras***

En esta fase se realizó el aislamiento de las levaduras de la cáscara de la piña y de la yuca, para esto, se emplearon medios selectivos, las levaduras que crecieron se sembraron en un medio con etanol al 6, 8 y 10% para determinar su resistencia. Los pesajes mayores a 10 g se realizaron en la balanza Trúmax MIX-H y los menores, en la balanza analítica RADWAG Wagi Elektroniczne, además, todo el material fue esterilizado en el Autoclave All American modelo 75X y las cajas de Petri en la Incubadora Memmert.

Rendimiento del Material Vegetal

Fueron seleccionadas aleatoriamente tres piñas Golden maduras (Figura 10a), se pesaron y se separaron en corona, cáscara, pulpa, y pedúnculo. El rendimiento fue calculado en

porcentaje, de acuerdo con el peso de cada una de las partes. Para la yuca (Figura 10b), se separaron las cáscaras y la pulpa y se realizó el mismo procedimiento de pesado (Ecuación 11)

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso}_{\text{parte}}}{\text{Peso}_{\text{total}}} * 100 \quad (11)$$

Figura 10.

Materias primas empleadas en el aislamiento de levaduras.

a. Piña Golden MD2



b. Yuca de mesa



Aislamiento de Levaduras

Fueron tomados 20 g de las muestras de cáscara de piña y yuca previamente trituradas en el procesador de alimentos (Oster) (Figura 11a), las cuales fueron mezcladas en 50 mL de solución de cloruro de sodio al 7,5%, la Figura 11b presenta la mezcla realizada. De la muestra madre, se realizaron diluciones seriadas entre 10^{-1} a 10^{-4} (Figura 11c). Se realizaron inicialmente siembras por agotamiento en el medio YPD sólido, tal como se aprecia en la Figura 11d, y las placas fueron incubadas a 30°C por 7 días en la Incubadora Memmert UN110 Plus, se verificó el crecimiento por medio del Microscopio binocular 3B. Posterior a este primer crecimiento, se tomó una colonia de levaduras y se realizó una re-siembra en agar PDA y Agar Sabouraud con

cloranfenicol para limitar el crecimiento de bacterias; las placas fueron incubadas a 30°C por 3 días y 7 días respectivamente (Ferrer, 2018; Vila, 2018).

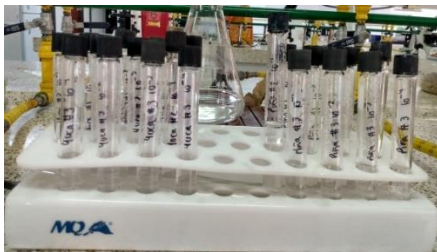
Figura 11.

Proceso de aislamiento de levaduras

- a. Cáscara de yuca y cáscara de piña trituradas b. Cáscara de yuca y de piña en la solución de NaCl al 7,5%.



- c. Diluciones seriadas



- d. Siembras realizadas en medio sólido.



Resistencia al Etanol

La resistencia de las levaduras al etanol fue realizada con colonias aisladas en el Agar Sabouraud con cloranfenicol, las cuales fueron sembradas por agotamiento en agar YPD con

adición de etanol al 6, 8 y 10%. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente observando el crecimiento de las levaduras por 3 días (Amaya & Diaz, 2019).

Afinidad de las Levaduras a una Fuente de Carbono

Para verificar el mejor medio para el crecimiento de levaduras se empleó el caldo YPD con amoxicilina (1 g/L), enriquecido con $MgSO_4$ (0.75 g/L), KH_2PO_4 (3.5 g/L), y $(NH_4)_2SO_4$ (7.5 g/L), la cantidad de glucosa, fructosa y sacarosa se estableció en 50 g/L y se determinó el crecimiento celular mediante la lectura de densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro Rigol, siguiendo la metodología descrita por Bañuelos et al., (2018).

Siembra Masiva

Para realizar la siembra masiva de las levaduras, primero se tomaron las células aisladas que presentaban resistencia al etanol y se sembraron en 10 mL de caldo YPD, luego se incubaron de forma estática por 24h a 20°C, posteriormente fueron sembradas en 100 mL de caldo YPD y después de 3 días en matraz agitado a 25°C se llevaron a 1L de caldo YPD. Todas las siembras se realizaron por triplicado a los tres tipos de azúcar (glucosa, fructosa y sacarosa) que se establecieron para determinar la afinidad de las levaduras a la fuente de carbono. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3500 rpm por 5 minutos (Centrífuga HETTICH MOD EBA) para obtener la levadura (Altamirano, 2013).

Afinidad al Sustrato.

La afinidad al sustrato se evaluó en medios de Glucosa, Fructosa y Sacarosa en medio YPD (50g/L) tanto para las levaduras aisladas de la cáscara de piña como de la yuca. Se midieron los grados alcohólicos (Refractómetro con compensación automática de temperatura (ATC), con un rango de 0 a 80%), la densidad óptica a 600 nm, se calcularon los °Brix mediante la ecuación 12, finalmente se verificó el pH (pHmetro Metrohm). Todas las mediciones se tomaron a las 0, 8, 12, 24, 48 horas (PCE, 2020; Zapata, Hoyos, & Quinchía, 2005).

$$\% vol = (0,6757 \times \text{°Brix}) - 2,0839 \quad (12)$$

Cinética de Fermentación de las Levaduras.

La cinética de fermentación se evaluó en medio YPD con Sacarosa (50g/L), tanto para las levaduras aisladas de la cáscara de piña como de la yuca. Se midió la densidad óptica y el crecimiento de la biomasa a través del tiempo, con estos datos experimentales se empleó la herramienta SOLVER en Excel para encontrar los parámetros cinéticos; además, se compararon los modelos matemáticos de Monod, Moser, y Tessier con los datos experimentales, buscando el modelo que más se adecuara al comportamiento de las levaduras obtenidas (Calderón, 2017).

Caracterización de las Levaduras.

Primero se realizaron las siembras en medios selectivos (YDP con amoxicilina, Agar Sabouraud con cloranfenicol, YDP con etanol), posteriormente se tomaron las levaduras que crecían en estos medios y que presentaban resistencia al etanol para su caracterización; esta se realizó de forma micro y macroscópicamente.

Fase 2: Elaboración del Masato

Para la elaboración de la bebida fermentada tipo “masato”, se siguió la metodología descrita por Maldonado, Rios, & Caballero (2016) con algunas modificaciones. Se desarrollaron 4 formulaciones variando el tipo de levadura: piña 0,5%, yuca 0,5%, comercial 0,5% y mezcla de piña y yuca 0,25% p/p (de cada una), estas formulaciones se presentan en la tabla 3.

Este proyecto buscó identificar las variaciones en las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales del masato empleando las diferentes levaduras, tanto las aisladas en la investigación, como una levadura comercial.

Tabla 3.

Formulaciones para el desarrollo de la bebida fermentada “tipo masato” de acuerdo con tipo de levadura adicionada

Formulación	Levadura Piña	Levadura Yuca	Levadura Comercial
F1	-	-	1 g/L
F2	-	1 g/L	-
F3	1 g/L	-	-
F4	0,5 g/L	0,5 g/L	-

Elaboración del Masato

Las cantidades empleadas en este proyecto fueron adaptadas a lo descrito por Maldonado et al., (2016) y empresa Molinos San José (2021), para obtener 6 Litros de masato para cada formulación, estas se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4.

Formulación base de la bebida fermentada tipo “masato”

Materia prima	Cantidad en la formulación	% en la formulación
Harina de arroz	480 g	6,00
Agua	6,3 L	78,77
Azúcar	1200 g	15,00
Levadura	6 g	0,08
Clavos y canela	12 g	0,15

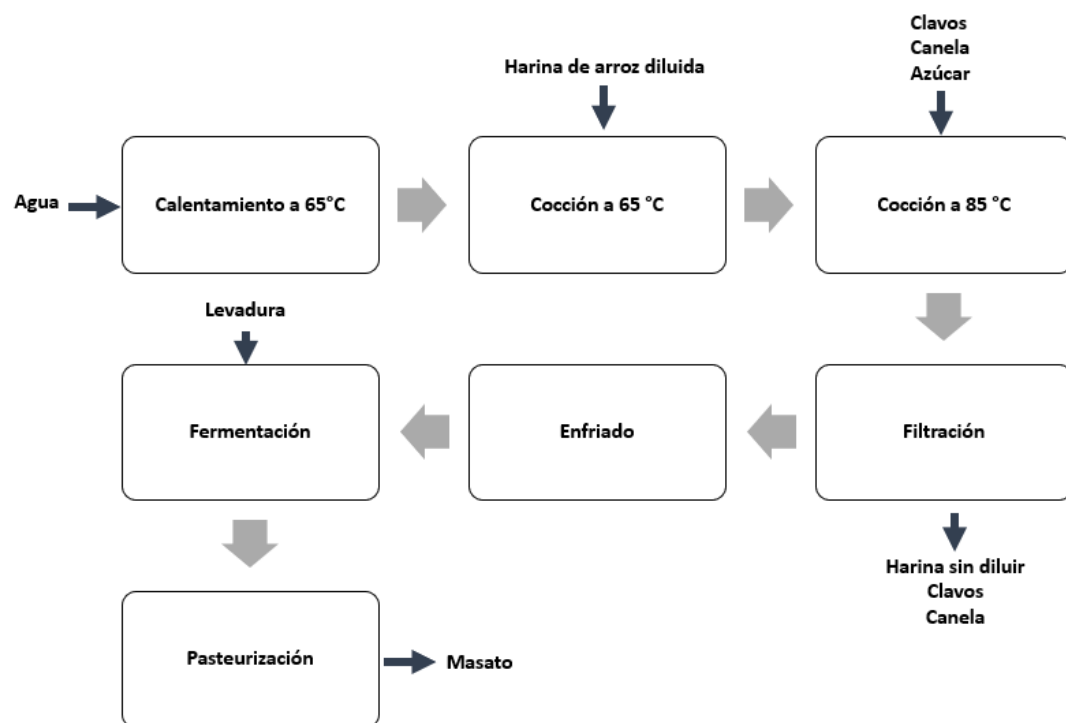
Nota. Adaptado de Maldonado, et al., 2016. Bebida fermentada a base de arroz con adición de probiótico. Y de Molinos San José. 2021. Envase Harina de arroz “Delicioso Masato”.

El primer paso fue el acondicionamiento del agua a 65°C, simultáneamente la harina de arroz fue diluida en agua a temperatura ambiente, después se adicionó la solución de harina al agua a 65°C e inició el proceso de cocción, este se llevó a cabo hasta que la temperatura alcanzó los 85°C, en ese momento se adicionaron los clavos, la canela y la sacarosa y se dejó reducir la mezcla hasta adquirir la consistencia típica del producto. Posteriormente, se retiró de la fuente de

calor y se filtró la bebida. Para la adición de la levadura en las proporciones indicadas en la Tabla 5, se disminuyó la temperatura hasta 30°C empleando baño de hielo. El proceso fermentativo se realizó a temperatura ambiente en proceso Batch hasta alcanzar los 5% v/v de etanol; finalmente, se realizó la pasteurización de las bebidas. Los anteriores pasos se esquematizan en la Figura 12 (Maldonado et al., 2016)

Figura 12.

Proceso de elaboración de la bebida fermentada tipo “masato”



Nota. Adaptado de Maldonado, et al., 2016. Bebida fermentada a base de arroz con adición de probióticos.

Actualmente no se encuentra una norma o legislación específica para masato, por lo cual el porcentaje de alcohol no está definido legalmente, sin embargo, estudios realizados por

Amengual (2018), muestran que los consumidores presentan preferencia por masatos con menor contenido alcohólico y mayor cantidad de azúcar, por lo que la fermentación se detuvo hasta obtener un grado de alcohol de 5% v/v.

Fase 3: Caracterización de la Bebida Alcohólica

En esta fase se realizaron los análisis fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales de la bebida elaborada en la fase 2. Debido a la capacidad fermentativa de estas levaduras, se tomaron las muestras a las 0, 8, 12, 24 y 48 horas de fermentación.

Caracterización Fisicoquímica

Para la determinación del grado de alcohol, Sólidos solubles (°Brix) y Gravedad específica: Se empleo el hidrómetro “Triple Scale Beer & Wine Hydrometer”,

pH: Para esta prueba se empleó el potenciómetro Metrohm, donde se agitaba de forma pausada y constante la muestra con el electrodo hasta que la lectura permanecía estable.

Contenido de Humedad: Se determinó por diferencia de pesos, entre el peso del crisol vacío, el peso del crisol con la muestra y el peso posterior al secado. Se empleó la incubadora Mermmet a 105°C por 24 horas. (Valencia L. , 2018).

Para el cálculo del porcentaje de humedad de utilizaron las ecuaciones 13 y 14:

$$\text{Peso final} - \text{Peso de crisol} = \text{Sólido en crisol} \quad (13)$$

$$\% \text{Humedad} = \frac{\text{Sólido} * 100}{\text{Muestra}} \quad (14)$$

Contenido de Cenizas: Para el análisis de cenizas se emplearon crisoles limpios y secos, se procedió a pesarlos, así como a adicionar la muestra a analizar, se llevaron al horno a 600°C por 1 hora y se procedió a disminuir la temperatura en reposo en el deshumidificador.

Posteriormente se pesaron los crisoles y mediante la Ecuación 15, se determinó el porcentaje de cenizas (Bolívar, 2020)

$$\%Cenizas = \frac{M_{cenizas}}{M_{muestra}} * 100 \quad (15)$$

Caracterización Microbiológica

La caracterización microbiológica se llevó a cabo por siembra en medios sólidos con diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} ; para el recuento de aerobios mesófilos se empleó el Agar de recuento de placa (PCA), su tiempo de incubación fue de 48 horas a 37°C ; en la determinación de coliformes totales se empleó el Agar bilis glucosa rojo violeta, con un tiempo de incubación de 24 horas a 37°C; finalmente, para el recuento de mohos se empleó el Agar rosado de bengala con un tiempo de incubación de 72 horas a temperatura ambiente

Análisis Sensorial

Se llevó a cabo una prueba afectiva de escala hedónica con un panel no entrenado y no experto de 32 personas, donde 21 eran hombres y 11 mujeres, con edades entre los 18 y 55 años. La encuesta se encuentra disponible en el Anexo 1.

Entre los parámetros evaluados, se encuentran: Visuales: como la aceptación general, el color, el brillo y la homogeneidad del color; Sensación en boca: consistencia, grumosidad,

pegajosidad, fluidez y suavidad; Olor: se analizó el aroma y la intensidad; Gusto: el sabor, dulzor, Acidez y la aceptación general (Amengual, 2018).

Análisis Estadístico

La evaluación de los resultados se realizó a través de análisis multivariado (ANOVA), estableciendo diferencias significativas entre los valores medios observados en cada una de las formulaciones a través del Test de Fisher a 95 % de confianza utilizando el paquete estadístico STATISTICA[®] v.8.0.

Resultados y Discusión

Fase 1. Aislamiento de las Levaduras

Rendimiento del Material Vegetal

En la tabla 5 se puede observar que aproximadamente el 34% de la piña son residuos, y de esos, el 15% es cáscara que puede ser reutilizada para el aislamiento de levaduras.

Tabla 5.

Porcentaje promedio del rendimiento de la piña var Golden.

Parte de la piña	Porcentaje (%)
Pulpa piña	66 ± 2,49
Cáscaras de piña	15 ± 1,41
Coronas	16 ± 2,16
Pedúnculo	3 ± 0,94

Resultados similares del rendimiento de la pulpa de piña (62% y 65,9%) fueron reportados por Valles (2021) y Tello, García, & Vásquez (2002) respectivamente. Por el contrario, el porcentaje de cáscara reportado por Valles (2021) (25,8%) es superior al obtenido en este proyecto (15%). Las diferencias pueden ser explicadas por el método de pelado empleado y del personal que realiza este proceso.

En la tabla 6, se puede observar que aproximadamente el 21% de la yuca son residuos, y de esos, el 14% es cáscara que puede ser reutilizada para el aislamiento de levaduras.

Tabla 6.

Porcentaje promedio del rendimiento de la yuca de mesa

Parte de la yuca	Porcentaje (%)
Cáscara sin tierra	14 ± 2,45
Pulpa yuca	79 ± 0,94
Tierra y residuos como las puntas	7 ± 2,62

De acuerdo con lo reportado por Muñoz & Riera (2020), la cáscara de la yuca representa el 15% de su peso total, un resultado muy similar al encontrado en la presente investigación. Así mismo Ulloa, (2012) reporta resultados similares, en donde la cáscara de la yuca representa entre el 9 y el 15% del tubérculo y posee una corteza de entre 0.5 y 2%; para esta investigación, no se discrimina entre la cáscara y la corteza.

Aislamiento de Levaduras

En la primera siembra se encontró que en el agar YPD crecieron levaduras y bacterias, por medio de una lectura microscópica con ayuda del azul de lactofenol se pudo demostrar la presencia de levaduras en la cáscara de piña, no siendo lo mismo para la cáscara de yuca.

En la segunda siembra en agar PDA, se presentó un crecimiento significativo de las levaduras de la piña en el medio, no siendo lo mismo para las levaduras de la yuca, de hecho, con esta siembra evidencia crecimiento de bacterias del género *Bacillus sp.*

En la tercera siembra en Agar Sabouraud con cloranfenicol se encontró que de la cáscara de piña crecieron levaduras, pero de la cáscara de yuca solo se formó una colonia en 8 días, esta colonia se dejó crecer a 35°C por ocho días más.

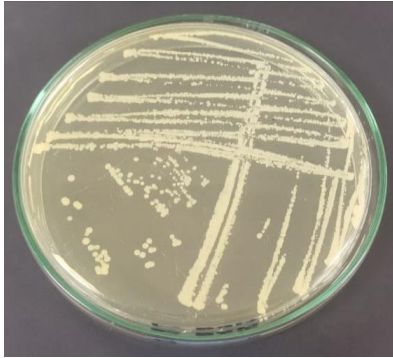
La identificación macroscópica y microscópica de las levaduras de la cáscara de piña y yuca se presentan a en la Figura 13, donde se tiene macroscópicamente la levadura aislada de la cáscara de piña (13a) y microscópicamente en la Figura 13b; también se presentan las levaduras aisladas de la cáscara de yuca de manera macro y microscópicamente (Figuras 13c y 13d respectivamente).

Las colonias obtenidas en esta investigación se compararon con trabajos realizados por Sánchez & Torres (2017), Salazar (2017) y Walteros (2019); encontrando que la morfología de las levaduras de la cáscara de piña presentan las características típicas de levaduras *Saccharomyces* al ser ovoides y blancuzcas con colonias muy definidas, en gran cantidad y alta tolerancia al etanol; las levaduras aisladas de la cáscara de yuca presentan una colonia similar a una *S. cerevisiae* colombiana.

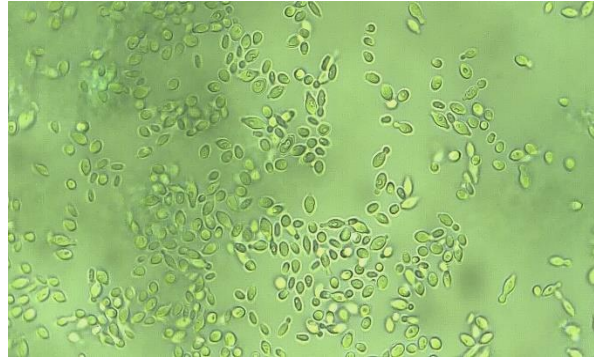
Figura 13.

Imágenes macroscópicas y microscópicas de levaduras aisladas de cáscara de piña y yuca

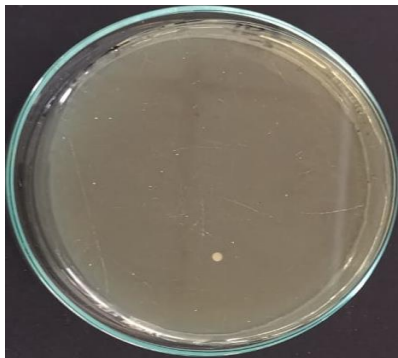
a. Imagen macroscópica levadura
cáscara de piña



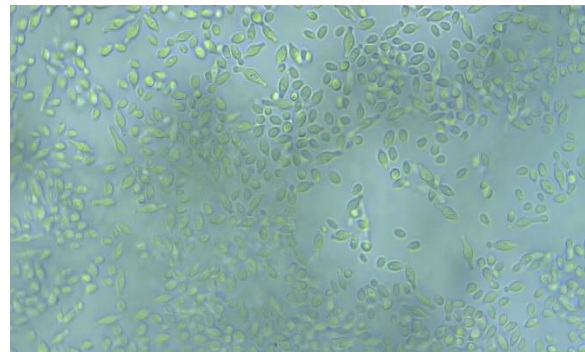
b. Imagen microscópica levadura cáscara
de piña



c. Imagen macroscópica levadura
cáscara de yuca



d. Imagen microscópica levadura cáscara
de yuca

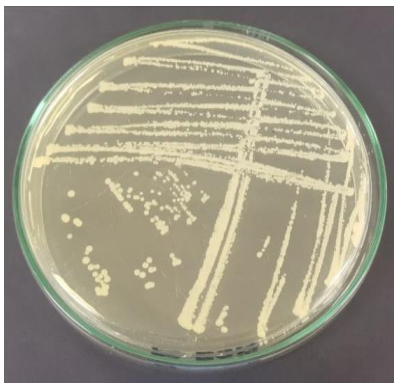


De manera macroscópica, estas imágenes pueden apreciarse en la Figura 14, donde se encuentran las levaduras aisladas de las cáscaras de piña (14a) y las cáscaras de yuca (14c) frente a referentes teóricos de *S. cerevisiae* (14b y 14d).

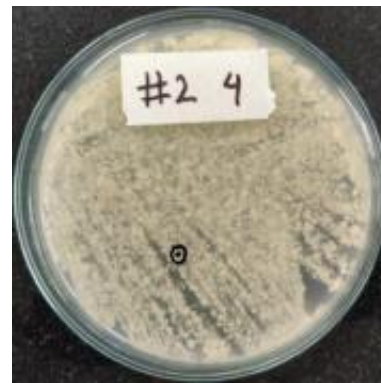
Figura 14.

Imágenes macroscópicas de levaduras aisladas de cáscara de piña y yuca frente a referentes teóricos.

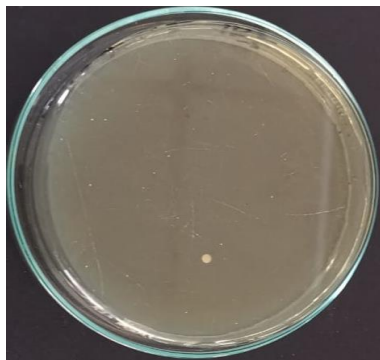
a. Imagen macroscópica levadura cáscara de piña



b. Imagen macroscópica levadura *S. cerevisiae*



c. Imagen macroscópica levadura cáscara de yuca



d. Imagen macroscópica levadura *S. cerevisiae*



Nota: Figura 14b: Por Walteros, 2019. Caracterización de cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* colombiana para su potencial uso en la producción de cerveza “Colombian Ale”;
Figura 14d: Por Selva, 2015. Caracterización de un cepario de levaduras para uso enológico mediante técnicas moleculares.

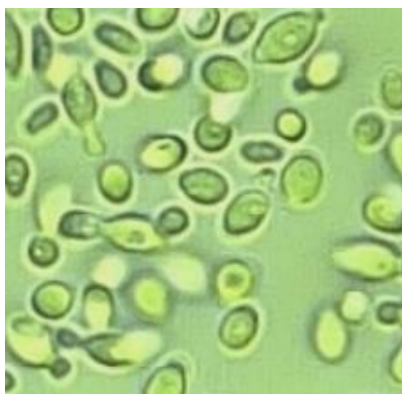
A nivel microscópico, se pueden observar de una forma más clara las similitudes entre las levaduras aisladas y los referentes teóricos. En la Figura 15, se presentan las imágenes microscópicas de las levaduras aisladas; se puede ver que en la Figura 15a, se está llevando a cabo la gemación en algunas células, las que no están en gemación son ovoides y muy similares a las presentadas en la Figura 15b, que fueron tomadas de investigaciones en cerveza (Walteros, 2019). La Figura 15c, presenta la imagen microscópica de la levadura aislada de la cáscara de piña, sin embargo, estas presentan una forma más alargada, por lo que se cree que son levaduras no *Saccharomyces*.

Contrario a las levaduras de la cáscara de piña, en la cáscara de yuca se presentan principalmente levaduras no *Saccharomyces*, esto se afirma a partir de la comparación morfológica y por colonias con los trabajos realizados por Heredia & Kwok (2015). Algunos estudios enfocados en la yuca han encontrado diferentes tipos de microorganismos en este tubérculo, entre los que se encuentran *S. cerevisiae*, *Leuconostoc mesenteroides ssp*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus vallismortis*, *Geotrichum capitatum*, *Leuconostoc dextranicum*, *Weisella paramesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus manihotivorans*, entre otros, esto claramente se da por la exposición al suelo que tiene el producto; así mismo, esto dificulta el aislamiento de las levaduras (Chíquiza, Montoya, Restrepo, & Orozco, 2016).

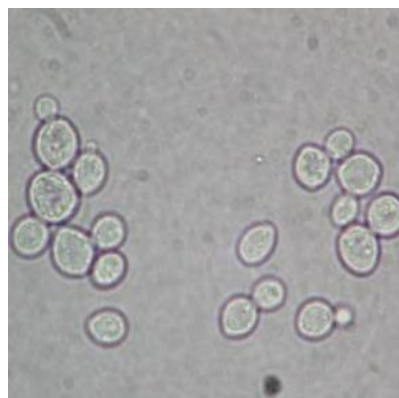
Figura 15.

Imágenes microscópicas de levaduras aisladas de cáscara de piña y yuca frente a referentes teóricos

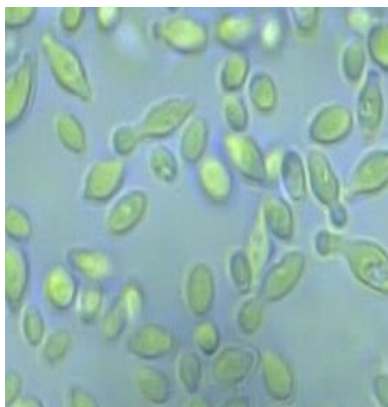
a. Imagen microscópica levadura cáscara de piña



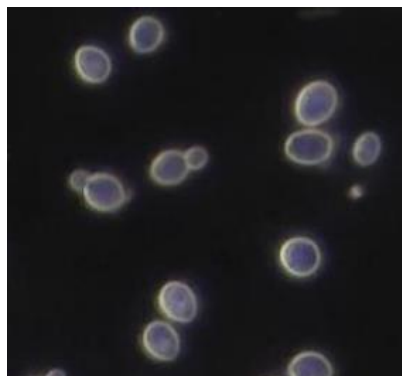
b. Imagen microscópica levadura *S. cerevisiae*



c. Imagen microscópica levadura cáscara de yuca



d. Imagen microscópica levadura *S. cerevisiae*



Nota. Imagen 15b y 15d: Por Walteros, 2019. Caracterización de cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* colombiana para su potencial uso en la producción de cerveza “Colombian Ale”

Resistencia al Etanol

Las levaduras de la cáscara de piña y de yuca sometidas a crecimiento en agar YPD con etanol al 6, 8 y 10% presentando crecimiento en las 2 primeras concentraciones principalmente; en menor grado se evidenció crecimiento al 10% de etanol. Se evidenció más claro el crecimiento en las levaduras aisladas de la cáscara de piña, como se aprecia en las Figuras 16a y 16c, sin embargo, las levaduras de la cáscara de yuca también presentaron un crecimiento favorable bajo estas concentraciones como se puede observar en las Figuras 16b y 16d. El crecimiento para las levaduras aisladas no fue óptimo a concentraciones de 10% de etanol, tal como se aprecia en las Figuras 16e y 16f.

A pesar de no tener un crecimiento favorable a concentraciones de 10% de etanol, se puede afirmar que las levaduras aisladas pueden ser empleadas en procesos fermentativos en donde la concentración final de etanol no sea superior al 8%.

La tolerancia de las levaduras aisladas tanto de la cáscara de piña como de la cáscara de yuca presenta un potencial para el desarrollo de bebidas fermentadas artesanales, considerando que ésta presenta un contenido alcohólico bajo, sabor dulce y sensación suave en boca (Becerra, 2014; Fula, 2010)

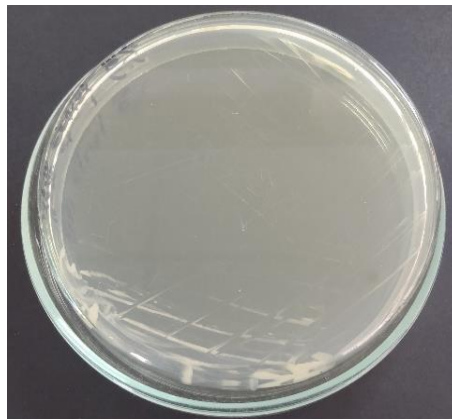
Figura 16.

Crecimiento de las levaduras aisladas al tercer día al 6,8 y 10% de etanol.

a. Levaduras aisladas de la cáscara de piña con 6% de etanol



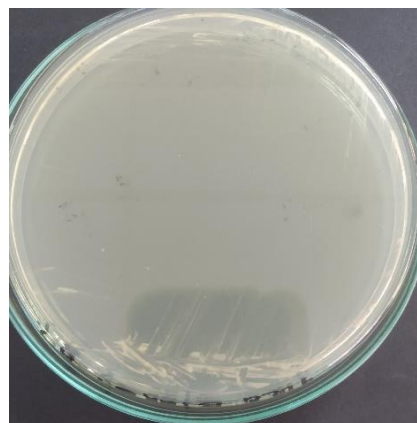
b. Levaduras aisladas de la cáscara de yuca con 6% de etanol



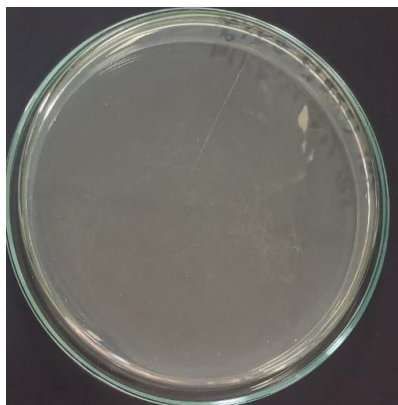
c. Levaduras aisladas de la cáscara de piña con 8% de etanol



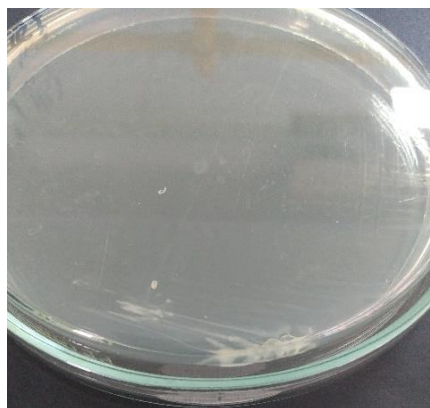
d. Levaduras aisladas de la cáscara de yuca con 8% de etanol



e. Levaduras aisladas de la cáscara de piña con 10% de etanol



f. Levaduras aisladas de la cáscara de yuca con 10% de etanol



Afinidad de las Levaduras a una Fuente de Carbono

Se evaluó la afinidad de las levaduras aisladas de las cáscaras de piña y yuca en caldo YDP con sacarosa, fructosa y glucosa, con el fin de establecer la cinética de fermentación. Los resultados de las evaluaciones en los tiempos 0, 8, 12, 24 y 48 horas se presentan desde la Tabla 9 hasta la Tabla 13, para determinar las diferencias significativas entre las fuentes de carbono seleccionadas, se empleó el Test de Fisher con un 95% de confianza en el Software STATGRAPHICS Centurion.

En la tabla 7, se presentan las condiciones iniciales del caldo YDP, encontrando que la adición de levaduras si afecta las condiciones iniciales, esto se concluye de las diferencias significativas que se presentan entre las levaduras aisladas frente a la misma fuente de carbono, a pesar de esto, las condiciones iniciales son muy similares para todos los tratamientos.

Tabla 7.*Evaluación de pH y °Brix a las 0 horas*

	Sustrato	Levadura aislada	pH	°Brix
t=0	Sacarosa	Piña	7,08 ± 0,08 ^c	5,30 ± 0,08 ^b
		Yuca	6,99 ± 0,02 ^b	5,20 ± 0,24 ^b
	Glucosa	Piña	6,58 ± 0,02 ^a	5,00 ± 0,22 ^b
		Yuca	6,56 ± 0,02 ^a	5,30 ± 0,22 ^b
	Fructosa	Piña	6,99 ± 0,01 ^b	3,23 ± 0,52 ^a
		Yuca	6,98 ± 0,01 ^b	3,63 ± 0,05 ^a

Nota: Los valores que contienen las mismas letras no presentan diferencias significativas, los que tienen letras diferentes si las presentan.

A las 8 horas, como se muestra en la Tabla 8, se encontró que el pH variaba dependiendo de la fuente de carbono, presentando diferencias significativas entre las tres fuentes; los °Brix presentaron diferencias significativas especialmente con el tratamiento Piña-fructosa, el grado alcohólico también presentó diferencias significativas, la mayor producción se obtuvo en los caldos con sacarosa, y en el caldo glucosa-yuca. La densidad óptica también presentó diferencias significativas.

Tabla 8.

Evaluación de pH, °Brix, ° Alcohólico y Densidad óptica a las 8 horas

	Levadura aislada	pH	°Brix	°Alcohólico	DO*	
				(v/v)		
t= 8h	Sacarosa	Piña	6,99 ±0,02 ^c	4,60± 0,36 ^b	14,67 ± 0,47 ^c	0,84±0,00 ^a
		Yuca	6,96 ±0,01 ^c	5,43± 0,31 ^c	15,00 ± 0,00 ^c	0,50±0,19 ^a
	Glucosa	Piña	6,50 ±0,03 ^a	4,57±0,54 ^{bc}	13,00 ± 0,00 ^b	1,27±0,04 ^c
		Yuca	6,52 ±0,05 ^a	4,57±1,03 ^{bc}	14,33 ± 0,47 ^c	0,90±0,10 ^{abc}
	Fructosa	Piña	6,88 ±0,00 ^b	3,13±0,17 ^a	9,33 ± 0,94 ^a	1,01±0,19 ^{bc}
		Yuca	6,89± 0,01 ^b	3,40±0,33 ^{bc}	9,33± 0,94 ^a	0,77±0,07 ^{ab}

Nota. *DO: Densidad óptica (600nm). Los valores que contienen las mismas letras no presentan diferencias significativas, los que tienen letras diferentes si las presentan.

A las 12 horas, con respecto al pH, los tratamientos no presentaron diferencias significativas, los °Brix sí presentaron diferencias significativas, pero lo más notable en la Tabla 9, es el contenido de etanol, puesto que se puede apreciar claramente la diferencia con los tres tipos de azúcares, donde la mayor producción se da con la Sacarosa. La densidad óptica presenta diferencias significativas, encontrando que la menor se da con la Fructosa-yuca.

Tabla 9.

Evaluación de pH, °Brix, ° Alcohólico y Densidad óptica a las 12 horas

	Levadura aislada	pH	°Brix	°Alcohólico	DO*	
				(v/v)		
t= 12h	Sacarosa	Piña	6,99 ± 0,05 ^a	4,70±0,99 ^{abc}	15,00 ± 0,00 ^c	0,86±0,00 ^a
		Yuca	6,97 ± 0,02 ^a	4,90 ±0,65 ^{bc}	15,00 ± 0,82 ^c	0,83±0,29 ^{ab}
	Glucosa	Piña	6,71 ± 0,36 ^a	5,61 ± 0,71 ^c	13,33 ±0,47 ^b	1,38±0,06 ^b
		Yuca	6,55 ± 0,09 ^a	4,27±0,12 ^{abc}	13,00 ±1,41 ^b	1,00±0,00 ^{ab}
	Fructosa	Piña	6,94 ± 0,02 ^a	3,30±1,13 ^{ab}	10,00 ±0,00 ^a	1,38±0,28 ^{ab}
		Yuca	6,91 ± 0,02 ^a	3,10 ± 0,71 ^a	9,67 ±0,47 ^a	0,63±0,10 ^{ab}

Nota. *DO: Densidad óptica (600nm). Los valores que contienen las mismas letras no presentan diferencias significativas, los que tienen letras diferentes si las presentan.

A las 24 horas, como se muestra en la Tabla 10, se mantienen las diferencias significativas, sin embargo, referente al contenido de alcohol se empiezan a nivelar los contenidos entre la sacarosa y glucosa, además se parecía una disminución del contenido de alcohol, característica de una fermentación que empieza a producir ácidos. Los °Brix también se empiezan a nivelar y la densidad óptica presenta variaciones diferentes que las presentadas a las 12 horas.

Tabla 10.

Evaluación de pH, °Brix, ° Alcohólico y Densidad óptica a las 24 horas

	Levadura aislada	pH	°Brix	°Alcohólico (v/v)	DO*	
						Sustrato
t= 24h	Sacarosa	Piña	6,92±0,00 ^a	4,35±1,25 ^{ab}	13,67±0,94 ^{bc}	0,94±0,01 ^{abc}
		Yuca	6,97±0,03 ^a	5,20± 0,43 ^b	14,67±0,94 ^c	0,28±0,02 ^a
	Glucosa	Piña	6,38±0,08 ^a	4,10±0,08 ^{ab}	12,00±0,82 ^b	0,97±0,12 ^c
		Yuca	6,28±0,10 ^a	4,57±0,78 ^{ab}	12,33±0,47 ^{bc}	0,67±0,07 ^{bc}
	Fructosa	Piña	6,95±0,03 ^a	2,43±0,82 ^a	10,00±0,82 ^a	0,48±0,04 ^{ab}
		Yuca	6,89±0,00 ^a	3,23±0,33 ^{ab}	10,00±0,00 ^a	0,31±0,04 ^{ab}

Nota. *DO: Densidad óptica (600nm). Los valores que contienen las mismas letras no presentan diferencias significativas, los que tienen letras diferentes si las presentan.

A las 48 horas, como se observa en la Tabla 11, el pH comienza a variar, ya sea por la producción de ácidos o por el avance en la fermentación, los °Brix se estabilizan aún más y se encuentra que la mayor cantidad de etanol es producida por la levadura de la cáscara de yuca en Sacarosa, seguida por la piña en sacarosa, siendo así que el sustrato más adecuado para las levaduras aisladas en este proyecto es la Sacarosa.

Tabla 11.

Evaluación de pH, °Brix, ° Alcohólico y Densidad óptica a las 48 horas

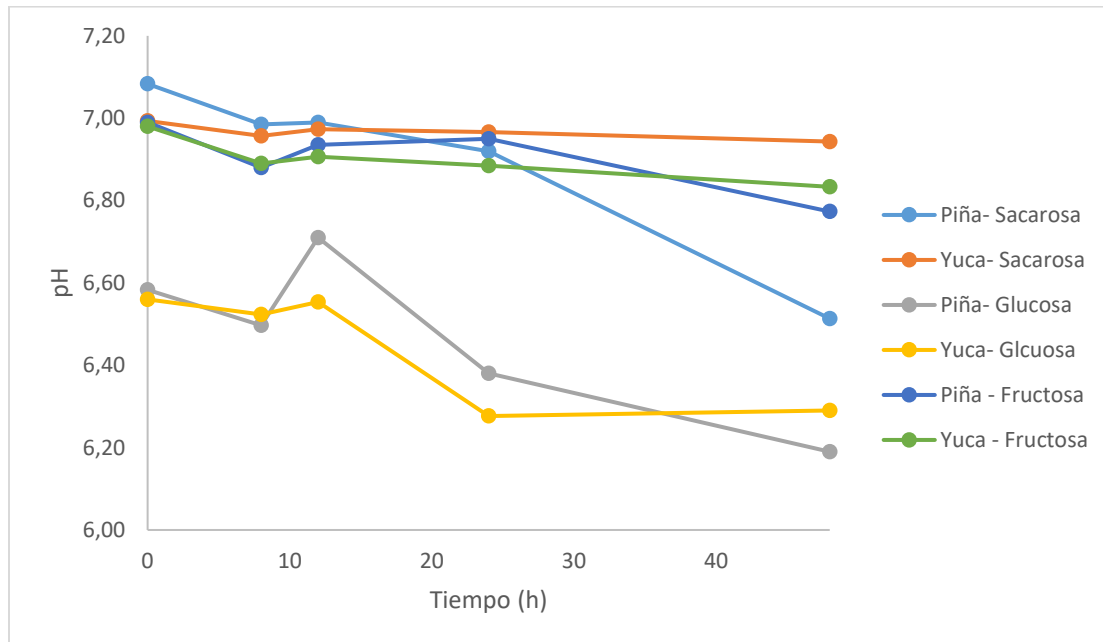
	Sustrato	Levadura	pH	°Brix	°Alcohólico	DO*
		aislada			(v/v)	
t= 48h	Sacarosa	Piña	6,51±0,27 ^{bc}	4,73±0,40 ^b	14,00±0,82 ^b	0,96±4,73 ^a
		Yuca	6,94±0,06 ^c	4,60±1,16 ^{ab}	15,33±0,47 ^c	0,76±4,60 ^a
	Glucosa	Piña	6,19±0,03 ^a	3,70±0,24 ^{ab}	10,67±0,47 ^{ab}	0,45±3,70 ^a
		Yuca	6,29±0,10 ^{ab}	4,10±1,20 ^{ab}	11,67±0,47 ^b	0,44±4,10 ^a
	Fructosa	Piña	6,77±0,16 ^{bc}	3,07±0,09 ^a	10,00±0,00 ^a	0,65±3,07 ^a
		Yuca	6,83±0,02 ^c	3,10±0,08 ^a	9,67±0,47 ^a	0,20±3,10 ^a

Nota. *DO: Densidad óptica (600nm). Los valores que contienen las mismas letras no presentan diferencias significativas, los que tienen letras diferentes si las presentan.

La variación de estos parámetros se observa desde la figura 17 hasta la Figura 20; donde en la Figura 17 se encuentra la variación del pH en función al tiempo, la mezcla presentó una disminución del pH en todas las formulaciones, esto se debe que en la fermentación los aminoácidos orgánicos pierden su carácter anfótero y se convierten en ácidos causado por la captura de nitrógeno que realiza la levadura; de esta forma, los resultados obtenidos se ajustan a lo reportado por Sigifredo & Stroppiano (2012). El potencial de hidrógeno no fue el mismo en el tiempo cero debido a la adición de las levaduras y al cambio de fuente de carbono, se encontró que este procedimiento afectó al pH inicial, sin embargo, los valores se mantuvieron entre 6,56 y 7,08, considerándose neutro.

Figura 17.

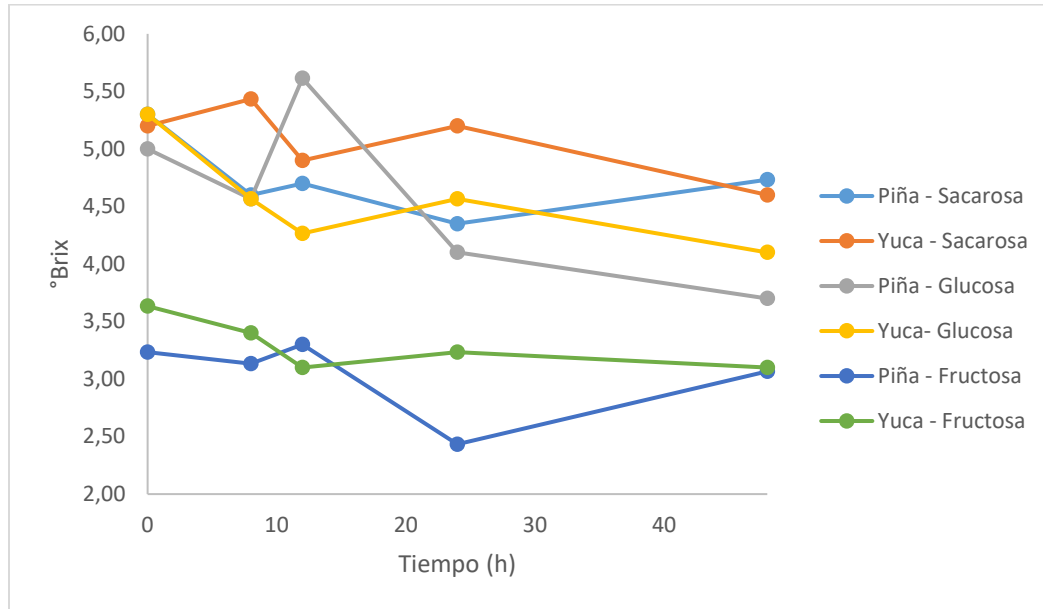
Variación del pH en función al tiempo



Respecto a la variación de los °Brix en función al tiempo, se puede ver que los datos varían de acuerdo con lo esperado, si bien disminuyen debido a que la levadura consume los azúcares para transformarlos en CO₂ y etanol, se puede apreciar en la Figura 18 que esto no es constante, esto se puede explicar por las condiciones en las que se realizó la prueba: las muestras estaban congeladas y fueron descongelándose a temperatura ambiente, por lo que a la hora de la medición, unas presentaban mayor cantidad de hielo que otras, esto pudo afectar los resultados (Sigifredo & Stroppiano, 2012).

Figura 18.

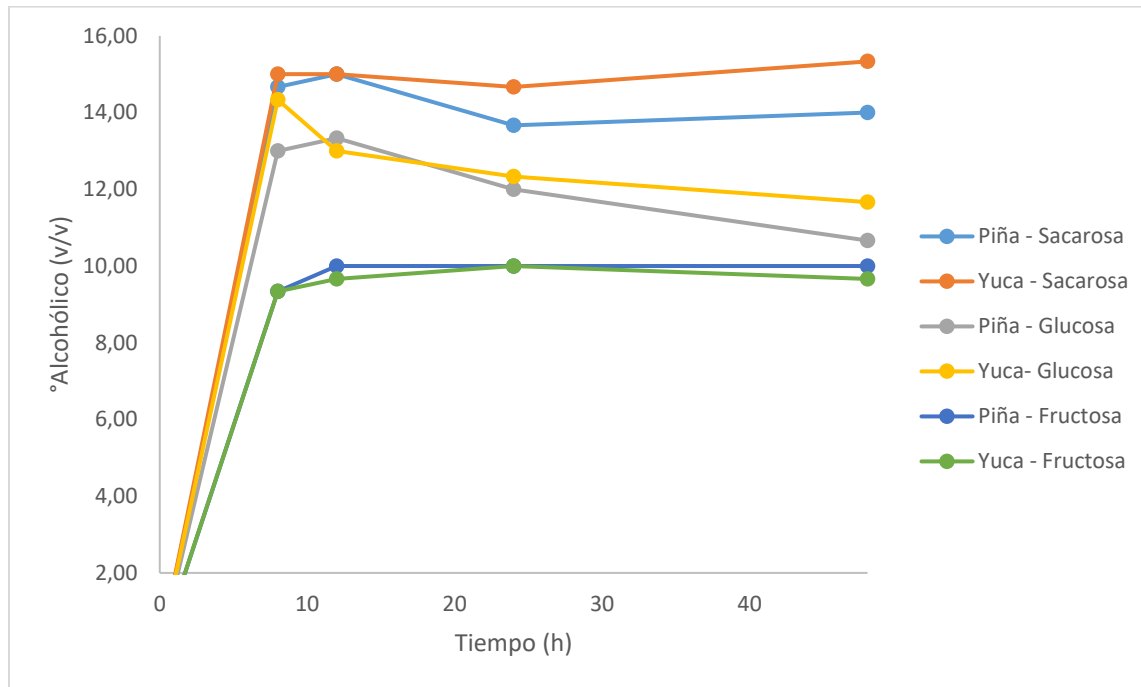
Variación de °Brix en función al tiempo



La variación de etanol se realizó con un refractómetro para medir el volumen del alcohol con compensación automática de temperatura (ATC), con un rango de 0 a 80% v/v. Se puede apreciar en la Figura 19 que la mayor cantidad de etanol se produjo en las primeras 8 horas de fermentación para todos los tratamientos, también que la mayor producción de etanol se logró con la levadura de yuca en el medio con sacarosa y la menor, la levadura aislada de la yuca con la fructosa. Además, se puede notar que los porcentajes más altos son los que tuvieron la sacarosa como sustrato.

Figura 19.

Variación de % etanol (v/v) en función al tiempo

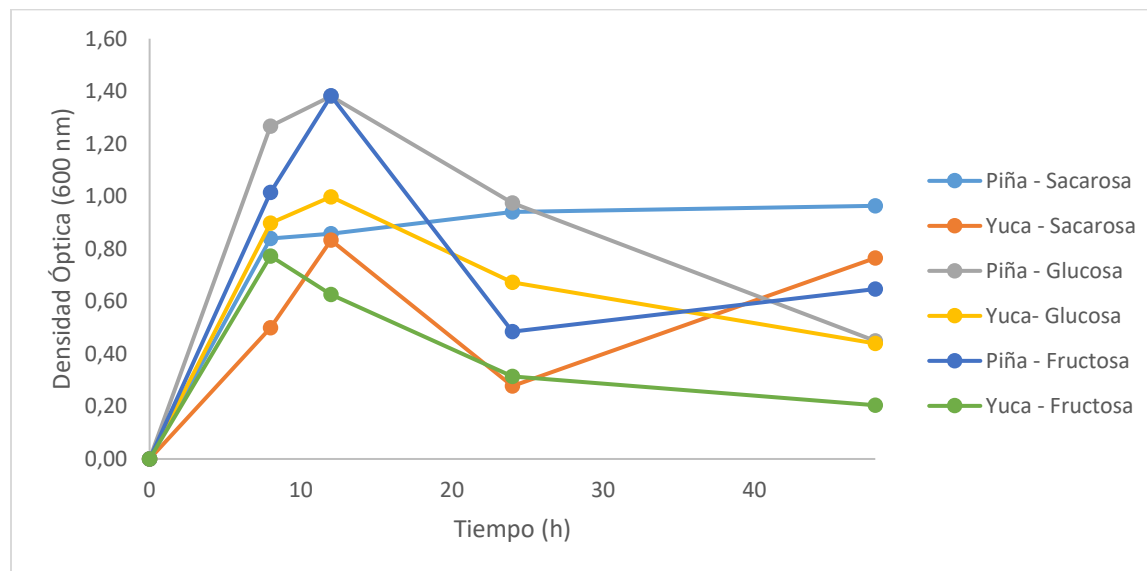


Al igual que la producción de etanol, los caldos enriquecidos presentaron mayor Densidad óptica a las 8 horas, esto se debe a que es cuando los microorganismos están reproduciéndose y llegan a un máximo (la fase de crecimiento), después de su muerte, las células se sedimentan, disminuyendo así su densidad óptica. Se aprecia en la Figura 20 que la mayor densidad óptica la obtuvo la yuca – sacarosa, seguida por la piña- sacarosa; lo que confirma que el sustrato más adecuado para las levaduras aisladas en este proyecto fue la sacarosa (Acebo & Hernández, 2013). Se puede también decir que a las 12 horas las levaduras dejaron de crecer, ya sea por

agotamiento de nutrientes o más probablemente (debido a la prueba de tolerancia al etanol realizada) se concentró demasiado etanol en la muestra (Angulo, y otros, 2013).

Figura 20.

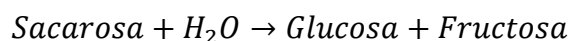
Variación de la densidad óptica en función al tiempo



Finalmente, la sacarosa es la que presenta mayor producción de etanol, por lo tanto, la fuente de carbono ideal entre las tres analizadas para las levaduras aisladas es este azúcar.

Cinética de Fermentación de las Levaduras.

La fermentación es un proceso de transformación bioquímica de azúcares en metabolitos y Dióxido de carbono (CO₂), los modelos matemáticos emplean principalmente la glucosa para los cálculos, debido a que el crecimiento microbiano se realizó en caldo YDP enriquecido con Sacarosa, fue necesario calcular la glucosa, tal como se muestra a continuación:



$$50 \text{ g Sacarosa/L} * \frac{1 \text{ mol sacarosa}}{342.3 \text{ g sacarosa}} * \frac{1 \text{ mol glucosa}}{1 \text{ mol sacarosa}} * \frac{180.16 \text{ g glucosa}}{1 \text{ mol glucosa}}$$

$$= 26,32 \text{ g glucosa/L}$$

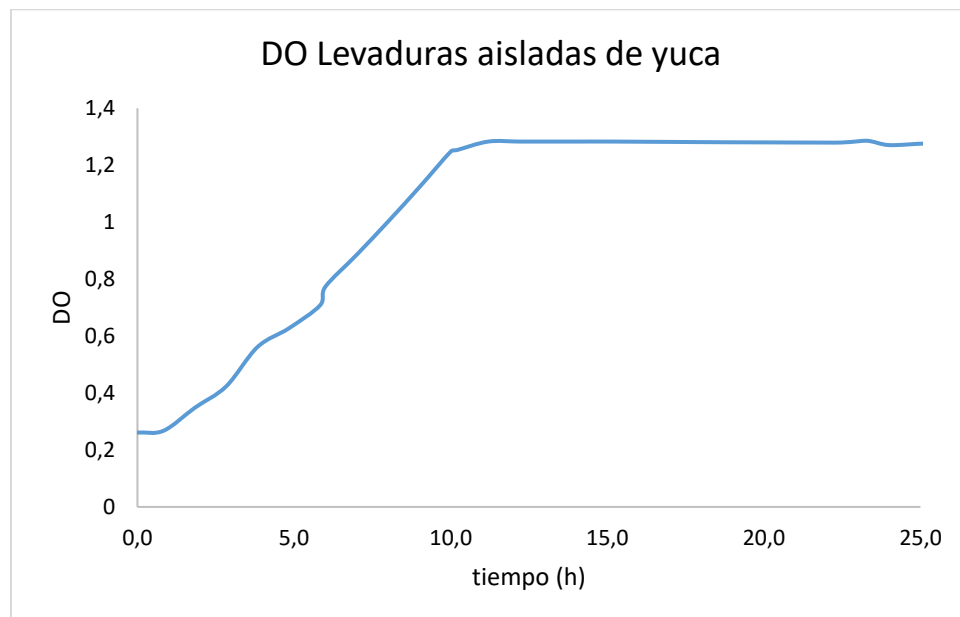
Por lo tanto, la concentración inicial de sustrato fue de 26,32 g/L. La temperatura de crecimiento fue de 30°C y se dejaron incubar por 24 h.

Levaduras de la Cáscara de Yuca

El crecimiento presentado por las levaduras obtenidas de la cáscara de yuca se presenta en la figura 21.

Figura 21.

Crecimiento de las levaduras aisladas de la cáscara de yuca.



En esta, el tiempo de latencia se presenta en los primeros 30 minutos, el crecimiento exponencial se da hasta las 10 horas y comienza el estado estacionario. Los datos obtenidos de

Densidad óptica y UFC/mL, se presentan en la Tabla 12, es importante saber que, debido al recuento en placa, la siembra escogida y las diluciones realizadas, las diferencias que se presentan entre las repeticiones son altas, esto se entiende desde la ecuación 16, que determina las unidades formadoras de colonia por unidad de volumen:

$$\frac{UFC}{mL} = (\text{Número de colonias entre 30 y 300}) * (\text{Inverso de la dilución}) * 0,5 \text{ mL} \quad (16)$$

Tabla 12.

DO y UFC/mL de las levaduras obtenidas de la cáscara de yuca.

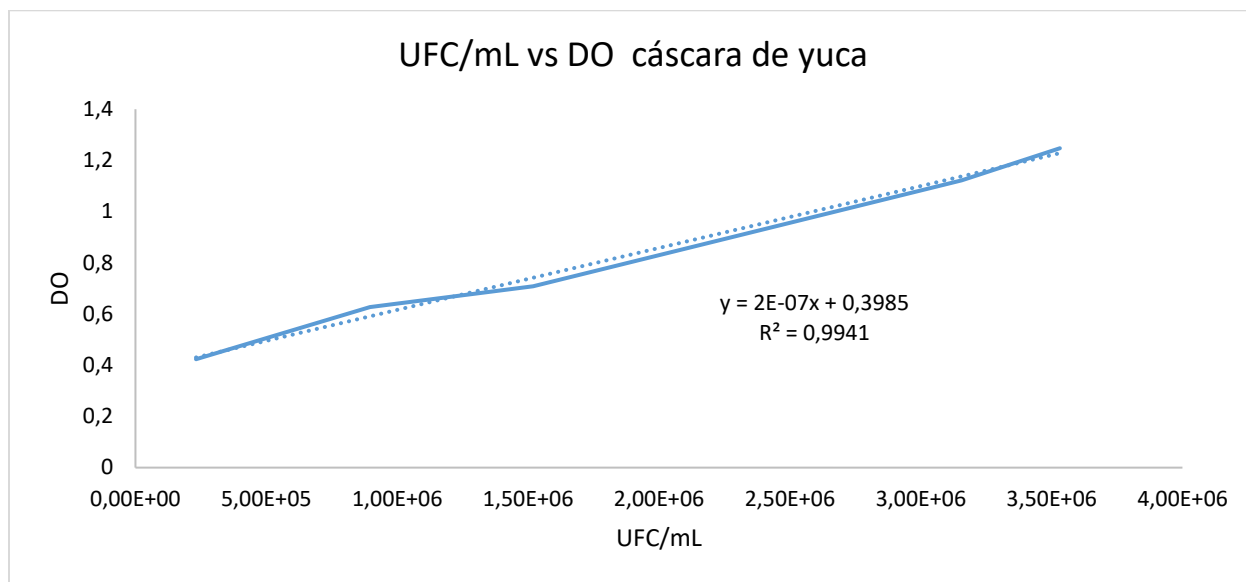
Tiempo (h)	DO	LN (UFC/mL)
0,0	0,2613±0,0002 ^a	8,6602±0,35 ^a
0,8	0,2676±0,0019 ^a	8,8225±0,12 ^a
2,8	0,4235±0,0018 ^b	12,3490±0,09 ^b
4,8	0,6475±0,0138 ^c	13,7047±0,06 ^c
5,8	0,7450±0,0469 ^d	14,1851±0,40 ^{cd}
9,0	1,1225±0,0030 ^e	14,8855±0,52 ^{de}
10,0	1,2142±0,0503 ^f	14,9765±0,59 ^e
24	1,2701±0,0003 ^g	14,9765±0,59 ^e
25,2	1,2760±0,0005 ^g	14,9508±0,58 ^e

Nota. *DO: Densidad óptica (600nm). Los valores que contienen las mismas letras no presentan diferencias significativas, los que tienen letras diferentes si las presentan.

Estos resultados fueron graficados en la Figura 22, donde mediante una regresión lineal se estableció la ecuación de la recta, siendo clave para relacionar la densidad óptica con el crecimiento microbiano.

Figura 22.

DO Vs UFC/mL, levaduras aisladas de la cáscara de yuca.



Los datos anteriores fueron clave a la hora de establecer las condiciones iniciales para determinar los parámetros cinéticos de los diferentes modelos matemáticos, así se tomó la fase exponencial para determinar $\mu_{m\acute{a}x}$:

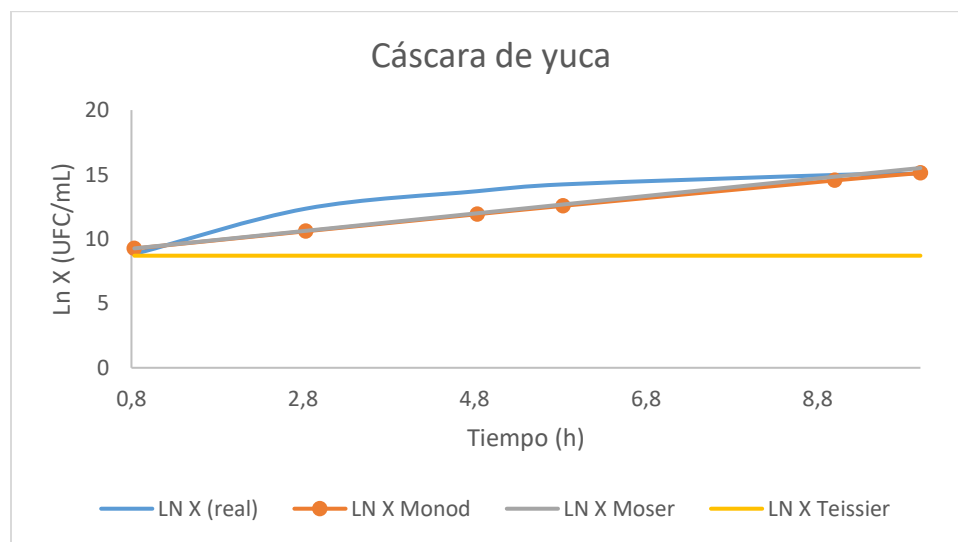
$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{\ln X_{fin\ fase\ exponencial} - \ln X_{inicio\ fase\ exponencial}}{t_{fin\ fase\ exponencial} - t_{inicio\ fase\ exponencial}} = \frac{\ln 3,53 * 10^6 - \ln 6,82 * 10^3}{10 - 0,8333}$$

$$\mu_{m\acute{a}x} = 0,6817$$

A partir de las ecuaciones de Monod, Moser y Teissier, se obtuvieron las constantes reportadas en la Tabla 13:

Tabla 13.*Parámetros cinéticos.*

Yuca			
Parámetro / Modelo	Monod	Moser	Teissier
ks	0,0005	1,94905E-06	160000
Y _{XS}	192454134,5	140987749	159046876,7
n	NA	1	NA
Porcentaje de error de mínimos cuadrados (%)	1,3	1,2	21,3

Figura 23.*Modelos cinéticos.*

De acuerdo con la Tabla 13 y la Figura 23, el modelo matemático que más se ajusta al modelo de crecimiento de las levaduras extraídas de la cáscara de yuca es el modelo de Moser, esto puede deberse a que el modelo en sí es una modificación del modelo de Monod (que se

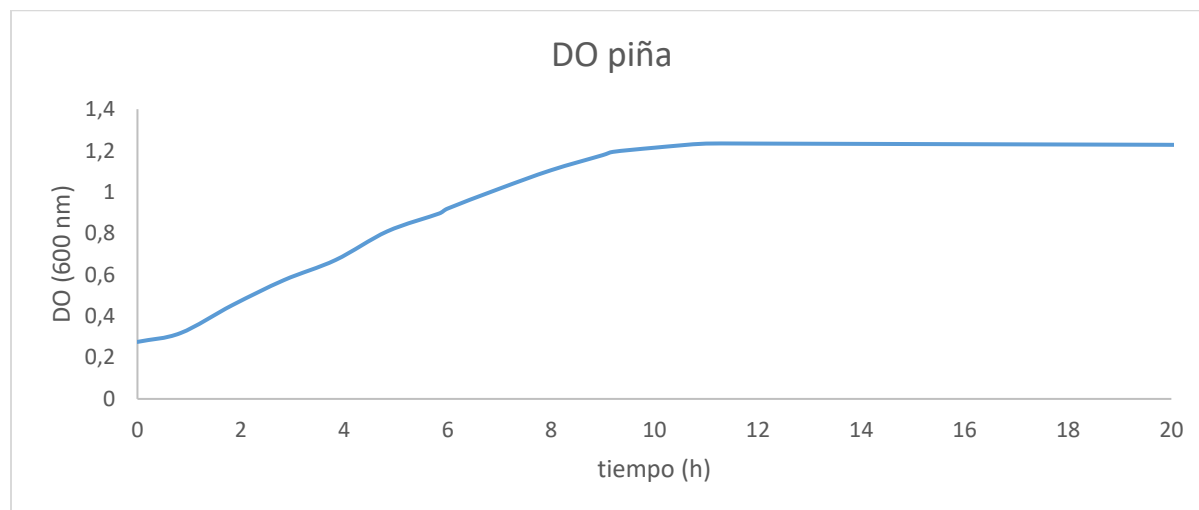
adapta al crecimiento de gran variedad de levaduras), pero que considera que la composición celular es independiente del tiempo de proceso, teniendo en cuenta la tasa de crecimiento específica máxima, el rendimiento del sustrato con respecto a la biomasa, la concentración inicial de sustrato, la constante de saturación, la concentración de microorganismos y una constante determinada experimentalmente.

Levaduras de la Cáscara de Piña

El crecimiento presentado por las levaduras obtenidas de la cáscara de piña se presenta en la figura 24.

Figura 24.

Crecimiento de las levaduras aisladas de la cáscara de piña.



En esta, el tiempo de latencia se presenta en los primeros 30 minutos, el crecimiento exponencial se da hasta las 10 horas y comienza el estado estacionario. Los datos obtenidos de Densidad óptica y UFC/mL, se presentan en la Tabla 14, es importante saber que al igual que lo sucedido con la yuca, el conteo es afectado por las diluciones, como lo expresa la ecuación 16.

Tabla 14.

DO y UFC/mL de las levaduras obtenidas de la cáscara de yuca.

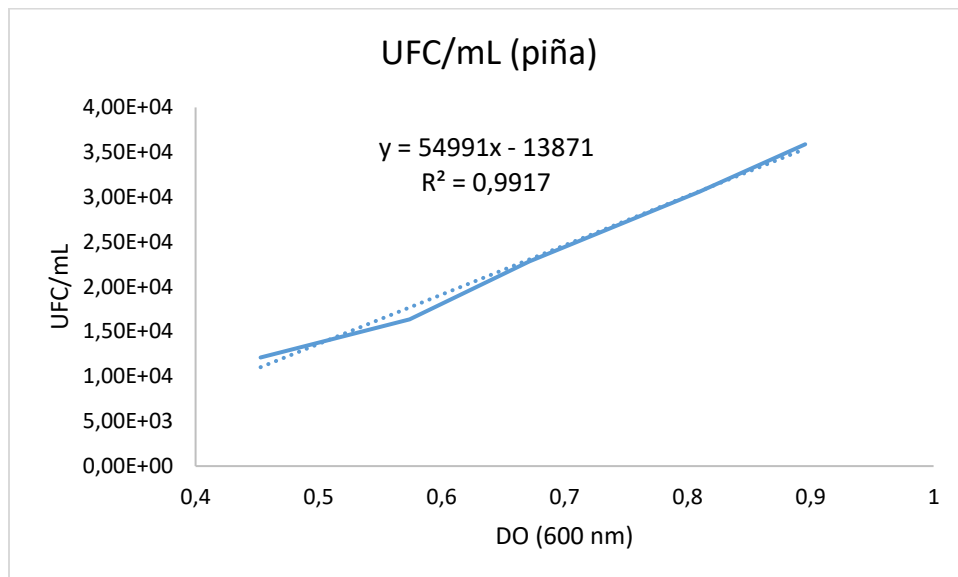
Tiempo (h)	DO	LN(UFC/mL)
0,0	0,2756±0,003 ^a	8,1723±0,10 ^a
0,8	0,3181±0,002 ^b	8,7085±0,03 ^{ab}
1,8	0,4528±0,011 ^c	9,4016±0,03 ^{bc}
2,8	0,5740±0,019 ^d	9,6987±0,12 ^{cd}
3,8	0,6713±0,048 ^e	10,0243±0,18 ^{cd}
4,8	0,8097±0,006 ^f	10,3287±0,04 ^d
5,8	0,8956±0,007 ^g	10,4844±0,11 ^d
10	1,2138±0,000 ^h	12,9288±1,14 ^e
24	1,2198±0,009 ^{hi}	13,0886±0,98 ^e
25,2	1,1755±0,048 ⁱ	13,2696±0,56 ^e

Nota. *DO: Densidad óptica (600nm). Los valores que contienen las mismas letras no presentan diferencias significativas, los que tienen letras diferentes si las presentan.

Estos resultados fueron graficados en la Figura 25, donde mediante una regresión lineal se estableció la ecuación de la recta, siendo clave para relacionar la densidad óptica con el crecimiento microbiano.

Figura 25.

DO Vs UFC/mL, levaduras aisladas de la cáscara de piña.



Los datos anteriores fueron clave a la hora de establecer las condiciones iniciales para determinar los parámetros cinéticos de los diferentes modelos matemáticos, así se tomó la fase exponencial para determinar $\mu_{m\acute{a}x}$:

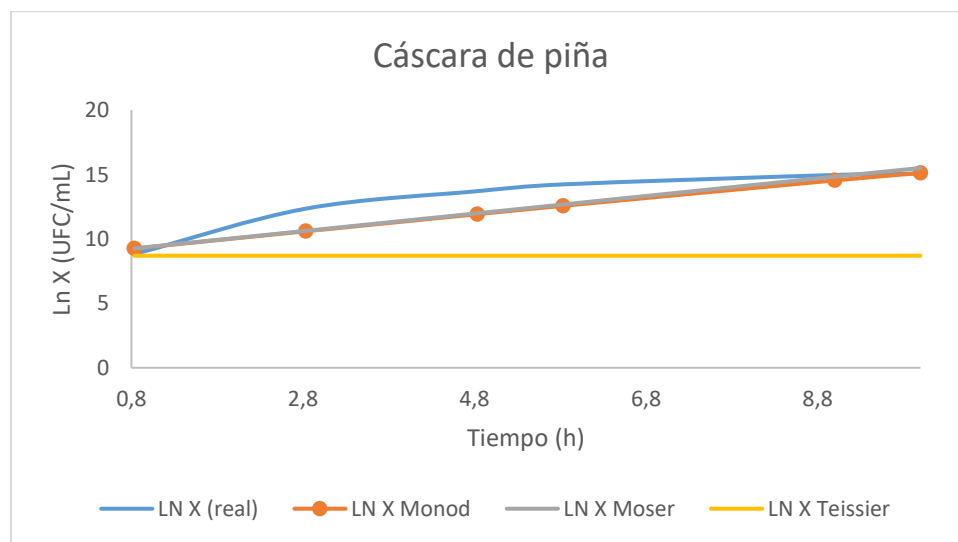
$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{\text{Ln } X_{fin \text{ fase exponencial}} - \text{Ln } X_{inicio \text{ fase exponencial}}}{t_{fin \text{ fase exponencial}} - t_{inicio \text{ fase exponencial}}} = \frac{\text{Ln } 3,59 * 10^4 - \text{Ln } 6,06 * 10^3}{5,83 - 0,8333}$$

$$\mu_{m\acute{a}x} = 0,3558$$

A partir de las ecuaciones de Monod, Moser y Teissier, se obtuvieron las constantes reportadas en la Tabla 15:

Tabla 15.*Parámetros cinéticos.*

Piña			
Parámetro / Modelo	Monod	Moser	Teissier
ks	0,000000001	1,37025E-06	127464
Y_{xs}	31580978	25211035,78	24446876,68
n	NA	1,647307055	NA
Porcentaje de error de mínimos cuadrados (%)	0,50	0,56	5,63

Figura 26.*Modelos cinéticos.*

De acuerdo con la Tabla 15 y la Figura 26, el modelo matemático que más se ajusta al modelo de crecimiento de las levaduras extraídas de la cáscara de piña es el modelo de Monod, esto puede deberse a que este modelo se ajusta a las levaduras de la familia *Saccharomyces*, de

acuerdo con lo encontrado a nivel microscópico y macroscópico en el presente proyecto, las levaduras aisladas pertenecen a esta familia.

Fase 2: Elaboración del Masato

Elaboración del Masato

En esta fase se siguió el diagrama planteado en la Figura 9, debido a lo establecido en la fase anterior, se demostró que solo era necesario 1 g/L para obtener la fermentación deseada, además se encontró que la levadura comercial logró fermentar el masato hasta el 5% v/v de etanol en 12 horas, contrario a esto, las levaduras aisladas de la cáscara de piña y yuca lo hicieron a las 48 horas.

Fase 3: Caracterización Físicoquímica, Sensorial y Microbiológica de la Bebida Fermentada Tipo “Masato”.

Caracterización Físicoquímica

En esta caracterización se buscó obtener un producto que cumpliera con lo establecido en el mercado, por lo que se compararon las levaduras aisladas con una levadura comercial. Las muestras se denominaron:

M1: Masato de piña

M2: Masato de yuca

M3: Masato con levadura comercial

M4: Masato con piña y yuca.

Para todas las muestras se estableció un porcentaje de etanol de 5% (v/v), la fermentación se llevó a cabo entre 21- 24°C. La determinación de etanol se realizó por densitometría debido a la viscosidad del producto y la cantidad de sólidos en suspensión.

Las tablas 16 a 20 muestran los resultados de esta caracterización:

En la Tabla 16, se encuentran las condiciones iniciales de fermentación del masato.

Tabla 16.

Caracterización fisicoquímica del masato a las 0 horas

	Formulación	% etanol	° Brix	pH	Gravedad específica
t=0	M1				
	M2				
	M3	0,00	36,43 ± 0,33	6,20± 0,29	1,12± 0,00
	M4				

A las 12 horas se midieron parámetros como % de etanol, °Brix, pH y gravedad específica, como se puede apreciar en la Tabla 17, la M3, masato con levadura comercial, ya presentaba un porcentaje de etanol más alto que las demás formulaciones, así como un pH más bajo, todo esto con diferencias significativas comparadas con las otras tres formulaciones.

Tabla 17.*Caracterización fisicoquímica del masato a las 12 horas*

	Formulación	% etanol	° Brix	pH	Gravedad específica
t=12 h	M1	1,00± 0,00 ^a	25,90±0,10 ^a	5,32± 0,02 ^a	1,11± 0,01 ^a
	M2	0,95± 0,05 ^a	26,50±0,50 ^a	5,37± 0,04 ^a	1,11± 0,01 ^a
	M3	3,00± 0,16 ^b	21,25±0,75 ^b	4,35± 0,03 ^b	1,08± 0,01 ^b
	M4	0,98± 0,03 ^a	26,60±0,40 ^a	5,35± 0,05 ^a	1,12± 0,00 ^a

Nota. Los valores que contienen las mismas letras no presentan diferencias significativas, los que tienen letras diferentes si las presentan.

Cuando se cumplieron las 24h, la levadura comercial alcanzó en nivel de alcohol deseado, como se expresa en la Tabla 18, por lo que se detuvo su fermentación por enfriamiento, las demás muestras continuaron con el proceso de fermentación, se puede apreciar que las diferencias significativas se dan entre las formulaciones realizadas con las levaduras aisladas y la levadura comercial. El porcentaje de humedad y el porcentaje de cenizas se midió para la M3 a las 24 horas, pero los resultados se exponen en la Tabla 18.

Tabla 18.*Caracterización fisicoquímica del masato a las 24 horas*

	Formulación	% etanol	° Brix	pH	Gravedad específica
t=24 h	M1	2,49± 0,49 ^b	24,65± 0,35 ^a	4,88± 0,03 ^a	1,11± 0,00 ^a

Continuación Tabla 18.

M2	1,51± 0,01 ^a	25,25± 0,25 ^a	4,86± 0,06 ^a	1,11± 0,00 ^a
M3	4,95± 0,05 ^c	21,00± 0,00 ^b	4,23± 0,01 ^b	1,09± 0,00 ^b
M4	2,02± 0,01 ^{ab}	25,35± 0,15 ^a	4,92± 0,02 ^a	1,11± 0,00 ^a

Nota. Los valores que contienen las mismas letras no presentan diferencias significativas, los que tienen letras diferentes si las presentan

A las 36 horas, se pudo apreciar que la muestra M4, que combinaba las dos levaduras había alcanzado el grado de alcohol deseado, tal como se presenta en la Tabla 19, pero se detuvo el proceso fermentativo a las 48 horas con las muestras M1 y M2, a pesar de esto, el pH y la gravedad específica no presentan diferencias significativas.

Tabla 19.

Caracterización fisicoquímica del masato a las 36 horas

	Formulación	% etanol	° Brix	pH	Gravedad específica
t=36 h	M1	3,81±0,00 ^b	22,50± 0,50 ^b	4,33±0,00 ^a	1,12± 0,03 ^a
	M2	3,01±0,01 ^a	22,94± 0,06 ^b	4,34±0,04 ^a	1,06± 0,04 ^a
	M4	5,02±0,02 ^c	20,15± 0,15 ^a	4,31±0,02 ^a	1,08± 0,00 ^a

Nota. Los valores que contienen las mismas letras no presentan diferencias significativas, los que tienen letras diferentes si las presentan

A las 48 horas finalizó el proceso de fermentación y como se observa en la Tabla 20, a pesar de haber alcanzado el grado de alcohol deseado a las 36 horas, la M4 no siguió fermentando, esto puede significar que llegó a la fase estacionaria. Como se ve en las tablas 18,

19 y 20, la levadura proveniente de la cáscara de piña presentó una producción mayor de etanol que la proveniente de la cáscara de yuca, esto contradiciendo lo expuesto en la afinidad al sustrato, sin embargo, teniendo en cuenta que el “masato” está elaborado con arroz, y este a su vez presenta almidones complejos para las levaduras, puede considerarse que las levaduras provenientes de la cáscara de piña tienen mayor facilidad de digerir estas moléculas que las procedentes de la cáscara de yuca, como no se presentan estudios previos respecto al uso de estas levaduras en alimentos, esto no puede asegurarse. No se presentan diferencias significativas en términos de gravedad específica, contenido de humedad, porcentaje de cenizas ni pH.

Tabla 20.

Caracterización fisicoquímica del masato a las 48 horas

	Formulación	% etanol	° Brix	pH	Gravedad específica	% Humedad	% Cenizas
t=48 h	M1	5,01±0,16 ^a	21,50±0,00 ^a	4,34±0,02 ^a	1,10±0,01 ^a	78,49±0,59 _a	0,02±0,01 ^a
	M2	4,87±0,11 ^a	20,50±0,00 ^b	4,23±0,20 ^a	1,08±0,01 ^a	77,88±0,21 _a	0,08±0,06 ^a
	M3	-	-	-	-	78,34±0,06 _{a*}	0,05±0,02 ^{a*}
	M4	5,02±0,02 ^a	20,00±0,00 ^c	4,17±0,05 ^a	1,09±0,00 ^a	77,77±0,09 _a	0,06±0,03 ^a

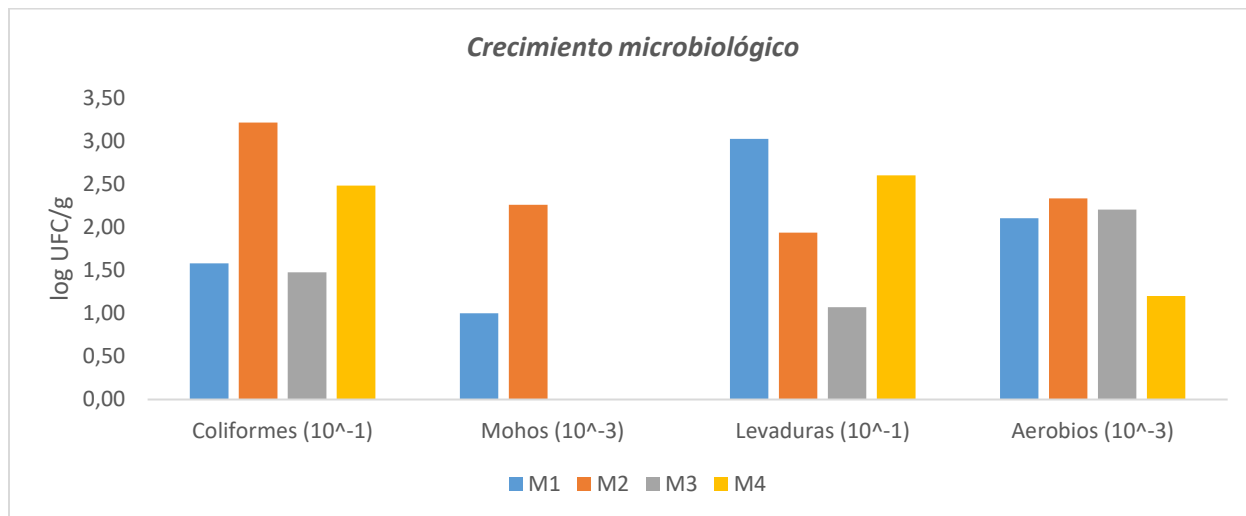
Nota. Los valores que contienen las mismas letras no presentan diferencias significativas, los que tienen letras diferentes si las presentan. * Valores presentados por M3 (levadura comercial) a las 24 horas.

A partir de los resultados de esta caracterización, se puede afirmar que el masato realizado con levaduras aisladas cumple con lo que se espera de un masato comercial. La eficiencia de las levaduras comerciales radica en que estas no presentan contaminantes, también, mediante el proceso de encapsulación las levaduras se compactan y se secan, generando que haya más células viables en 1 gramo seco de levadura comercial que en 1 gramo de levadura húmeda aislada.

Caracterización Microbiológica

La caracterización microbiológica se llevó a cabo por siembra en medios sólidos con diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , debido a que no hay normativas que regulen el masato, no se encuentra información para comparar el recuento microbiológico de este producto.

Sin embargo, se puede apreciar que la M3 es la que presenta menor cantidad de *coliformes totales*, esto se aprecia en la Figura 27, sin embargo, el comportamiento de los *Aerobios mesófilos* no es semejante; esto se puede dar por dos hechos, el primero, es que el aislamiento de levaduras no aisló solo un tipo de microorganismo, como se comentó anteriormente, también se obtuvo *B. cereus*, y segundo, el masato M3 tuvo un tratamiento de conservación térmica al detener su fermentación, además, al estar expuestos al ambiente, los masatos M1, M2 y M4, podrían tener mayor posibilidad de contaminación cruzada.

Figura 27.*Recuento microbiológico*

Con respecto al recuento de mohos y levaduras, se puede observar que la presencia de mohos es casi nula, pero las de levaduras hacen presencia en todas las muestras. Se puede establecer que la muestra M3 es la que menor contaminación microbiana presenta, contrario a las muestras M1 y M2, que son las que mayor contaminación por levaduras presentan, siendo también las únicas con presencia de mohos, las muestras M3 y M4 no presentaron crecimiento de estos microorganismos.

Al no tener un punto de referencia, solo se puede realizar una caracterización microbiológica y no determinar si el producto cumpliría para ser vendido al público. Además, se encontró que la bebida realizada con la levadura comercial presentaba una menor contaminación microbiológica, por lo que es necesario tener una reglamentación que busque controlar las bebidas artesanales para garantizar la salud de los consumidores.

Caracterización Sensorial

Se realizó la prueba hedónica con ayuda de la encuesta presente en el Anexo 1 a 32 panelistas no expertos ni entrenados, la encuesta consistía en 4 ítems: la aceptación visual, la sensación en boca, el olor y el gusto; con opción de elegir entre 1 y 5, donde:

- 1: Me desagrada totalmente
- 2: Me desagrada un poco
- 3: No me agrada ni me desagrada
- 4: Me agrada
- 5: Me agrada demasiado

Además de esto, las características presentaban un peso dependiendo de su importancia en la caracterización del producto, como se muestra en la Tabla 21:

Tabla 21.

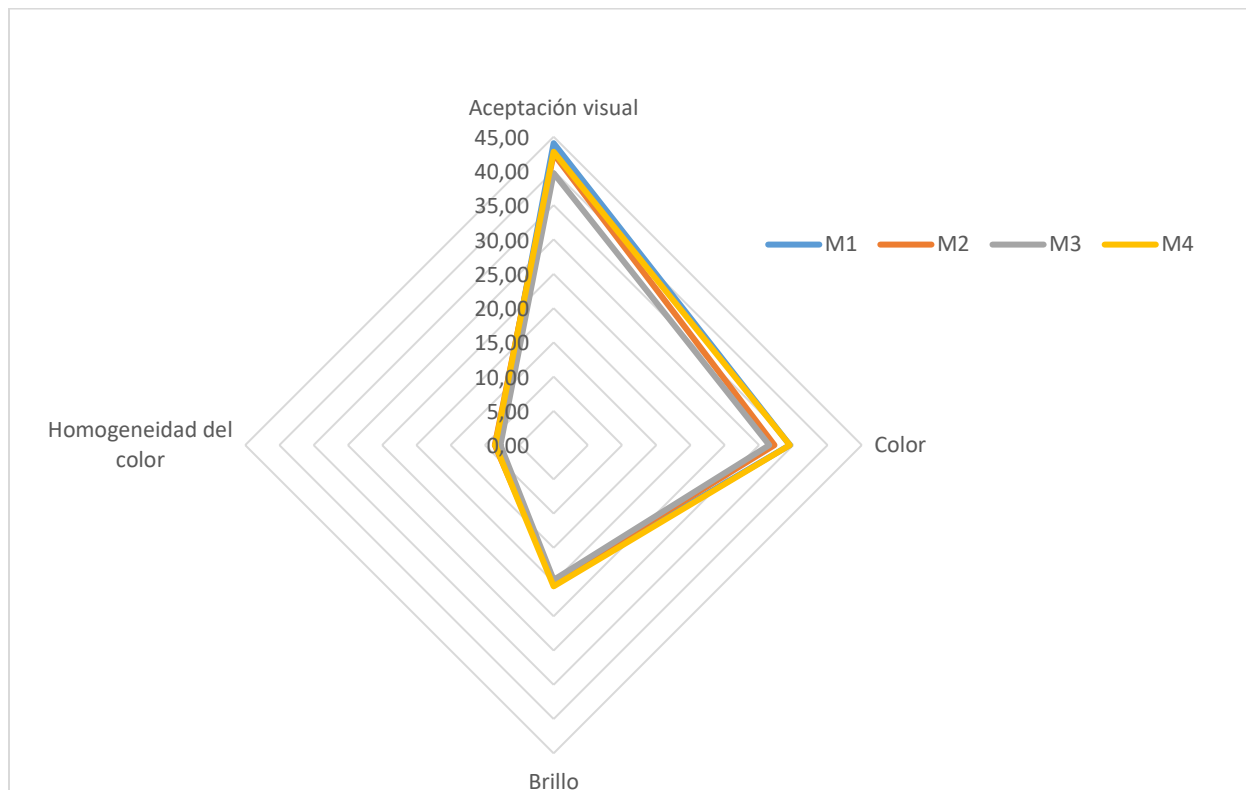
Peso de las características para análisis sensorial

Característica	Peso
Aceptación visual	10
Color	8
Brillo	5
Homogeneidad del color	2
Consistencia	10
Grumosidad	8
Pegajosidad	10

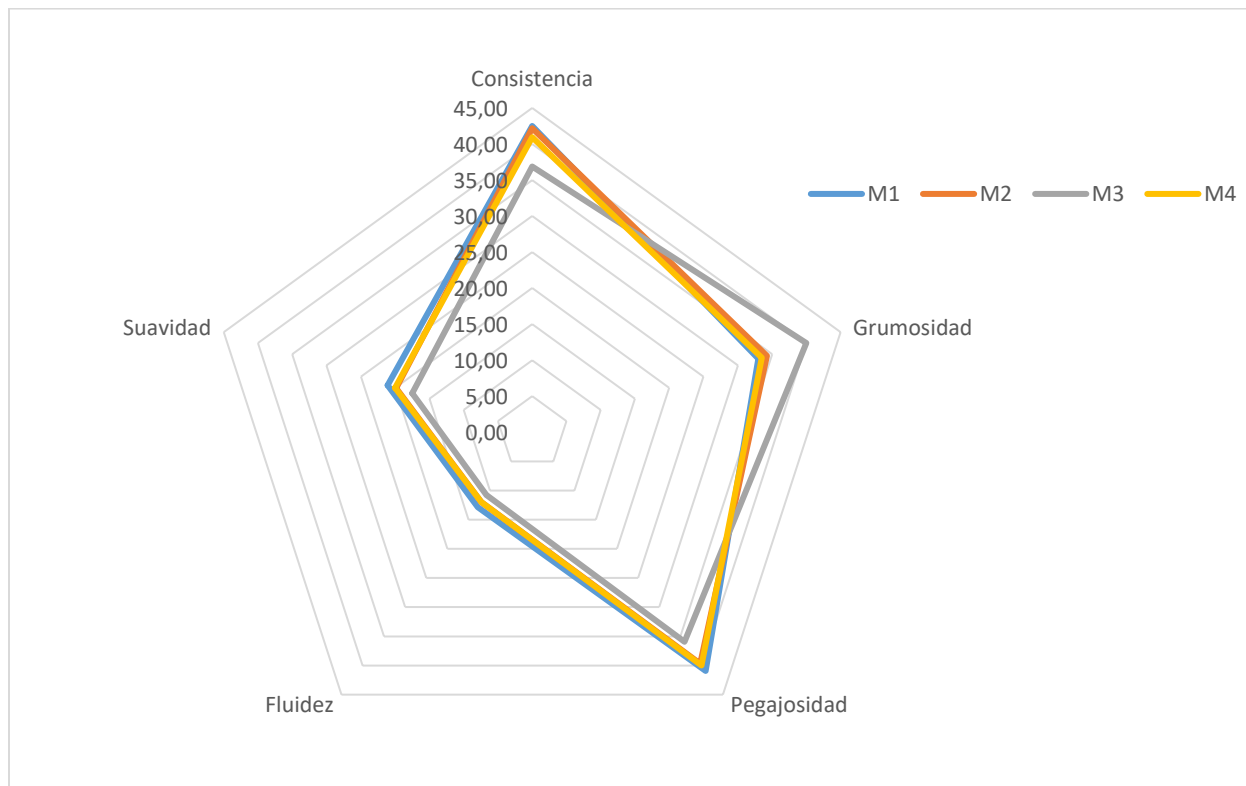
Continuación Tabla 21.

Fluidez	3
Suavidad	5
Aroma	10
Intensidad	3
Sabor	10
Dulzor	3
Acidez	3
Aceptación general	8

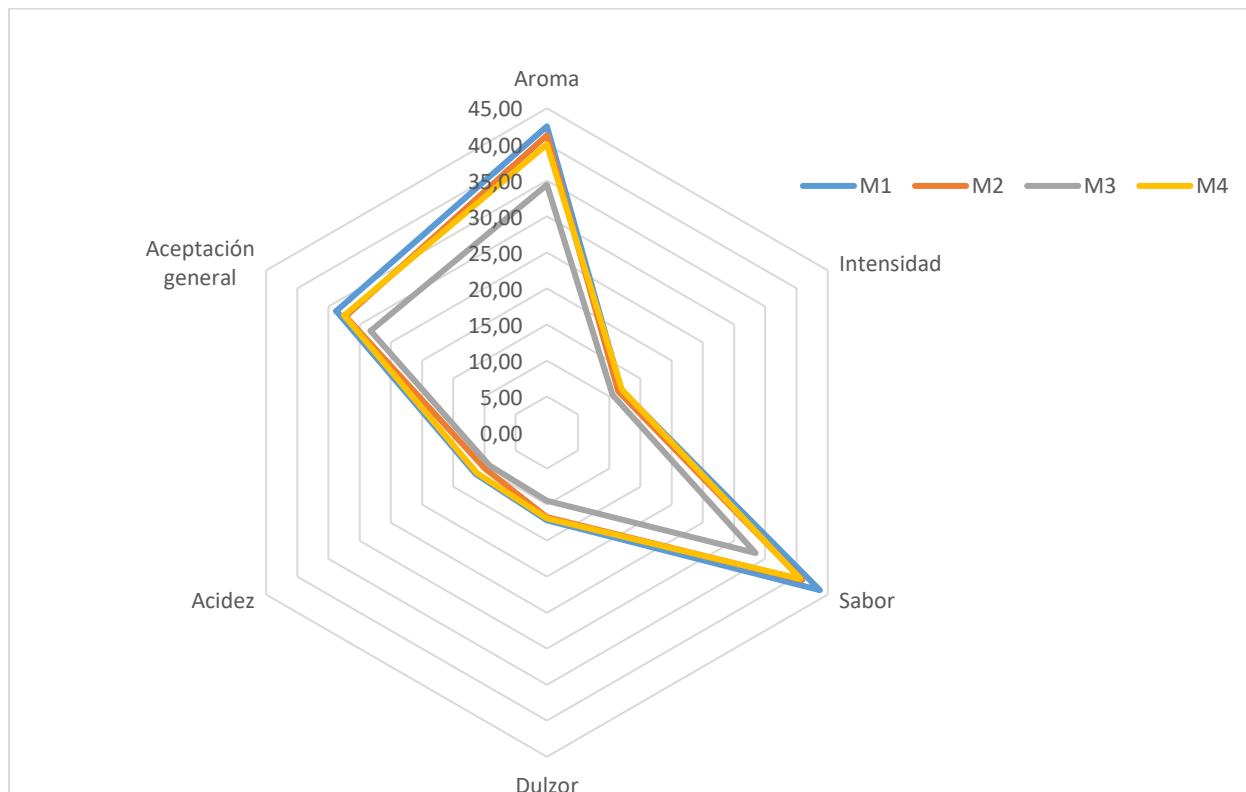
La encuesta fue realizada a 32 personas entre los 18 y los 55 años. Se realizó una caracterización visual, una se sensación en boca una de olor y una de sabor; respecto a la visual, de acuerdo con lo representado en la Figura 28, las 4 formulaciones se presentan muy cercanas, sin embargo, al estar la M1 más alejada del centro en la aceptación visual, se puede decir que fue la que mayor aceptación tuvo por parte de los encuestados, pero la preferencia por el color la tuvo la formulación M4, la homogeneidad del color presenta los valores más bajos puesto que su peso fue de tan solo 2 puntos, esto se debe a que los encuestados no eran expertos ni entrenados y determinar esta propiedad no era claro para algunos de ellos, como lo expresaron en la entrevista.

Figura 28.*Características visuales*

La sensación en boca fue otra de las características evaluadas, en la Figura 29, se puede ver que la formulación con mejor puntuación por ausencia de grumos fue la M3, en la consistencia fueron mejor valoradas las formulaciones M1 y M2; la M3 quedó de último lugar en aspectos como suavidad, fluidez y pegajosidad.

Figura 29*Sensación en boca*

Por último, se evaluaron tanto el olor como el sabor de esta bebida, como lo muestra la Figura 30, la bebida mejor evaluada fue la M1, puesto que tiene las valoraciones más altas en sabor, aroma y aceptación general, de nuevo, la M3 es la que más tendencia al centro tiene, por lo que es la menos favorita respecto a sabor y aroma. Las demás formulaciones se mantienen en el rango de aceptación.

Figura 30.*Preferencia en olor y sabor*

Con los datos anteriores, se puede decir que la formulación con mayor aceptación por los encuestados fue la M1, masato elaborado con levaduras aisladas de la cáscara de piña.

Selección de la Formulación Mejor Valorada

De acuerdo con los resultados obtenidos de la evaluación sensorial y presentados en las Figuras 28, 29 y 30, se logró determinar que la formulación M1 presentó mayor aceptación y que la M3 no generó tanto agrado, sin embargo, es necesario determinar si las diferencias son significativas para todas las características. Es por esto que se empleó el Test de Fisher con un intervalo de confianza del 95%, los resultados de esto se presentan en la Tabla 22, donde se

puede asegurar que la formulación con mayor aceptación fue la M1, pero no se presentan diferencias significativas con las demás levaduras aisladas, por el contrario, se presentan diferencias significativas con la formulación realizada con la levadura comercial.

Tabla 22.

Resultados de la aceptación global de las diferentes formulaciones.

Formulación	Promedio
M1	412,938 ± 55,31 ^a
M2	398,656 ± 65,81 ^a
M3	364,938 ± 83,65 ^b
M4	401,156 ± 56,35 ^a

Nota. Las letras iguales representan la ausencia de diferencias significativas, las letras diferentes denotan diferencias significativas.

Esto puede deberse a que las formulaciones realizadas con las levaduras aisladas de los residuos agroindustriales tenían un aroma menos astringente y un sabor más dulce que la formulación realizada con la levadura comercial, además la levadura comercial es una levadura panadera por lo que la bebida presentaba un olor parecido a pan.

Además, en la Tabla 22, se puede apreciar que la formulación M2 presenta un promedio más cercano a la formulación M4, por lo que puede suponerse que la levadura de la yuca tiene una mayor participación en la fermentación que la levadura de la piña.

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

Los residuos agroindustriales de piña y yuca pueden ser empleados para la extracción y aislamiento de levaduras con capacidad fermentativa aplicables a la industria alimentaria.

La cáscara de piña presenta mayor facilidad en el proceso de aislamiento de levaduras frente a la cáscara de yuca, esto puede deberse a la cantidad y calidad del microbioma presente en los residuos de yuca, haciendo de este un proceso más complejo.

La fermentación realizada en el medio YPD con las diferentes fuentes de carbono, demuestra que las levaduras aisladas de los residuos de piña y yuca favorecen su fermentación con sacarosa.

Las levaduras aisladas en el presente proyecto lograron tolerar hasta 10% v/v de etanol en el medio YPD, garantizando así la resistencia necesaria para la fermentación de la bebida tipo masato, sin embargo, el ideal se presentó hasta el 8% v/v de etanol.

Las levaduras aisladas de los residuos de piña son más cercanas al modelo de Monod, como las *S. cerevisiae*, por su parte, las levaduras aisladas de la cáscara de yuca son más semejantes al modelo de Moser.

La bebida desarrollada con las levaduras aisladas obtuvo mayor aceptación sensorial que la elaborada con la levadura comercial, tanto en términos de sabor, olor, y color.

A nivel microbiológico, el masato elaborado con la levadura comercial presentó menor crecimiento de aerobio mesófilos, coliformes, mohos y levaduras, como consecuencia de una fermentación más eficiente y una pureza mayor de la levadura.

Es posible elaborar una bebida tradicional tipo “masato” con levaduras aisladas de residuos agroindustriales, puesto que poseen tolerancia al etanol y capacidad fermentativa, así mismo, generan sabores y olores más frutales en el producto final generando mayor aceptación.

Recomendaciones

Realizar una caracterización molecular de los microorganismos encontrados en estos residuos para poder ampliar este campo de investigación.

Emplear estos microorganismos en otras matrices alimentarias, por ejemplo, en la cerveza y el vino.

Teniendo en cuenta que estos residuos son ampliamente utilizados como sustratos en la producción de enzimas, se recomienda estudiar la producción de enzimas con los microorganismos presentes en los residuos.

Referencias

- Acebo, D., & Hernández, A. (2013). Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 44, No. 1, enero-abril*.
- Aguilar, E., Rodríguez, A., Saborío, D., Morales, J., Chacón, M., Rodríguez, L., . . . Gómez, Y. (2017). Manual del cultivo de yuca. *Innovación para la seguridad alimentaria y nutricional en Centroamérica y Panamá*, 1-96.
- Altamirano, C. (2013). Optimización de un Método para la Producción de Biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la etapa de Fermentación del Mosto de Cerveza, desde un nivel de Laboratorio a un nivel Piloto. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 175.
- Amaya, N., & Diaz, L. (2019). Evaluación de perfiles fermentativos para al elaboración de cerveza artesanal por levaduras nativas. *Universidad de América*, 1-251.
- Amengual, G. (2018). Proceso de elaboración y testeo de chicha andina a partir de cáscara de piña. *Trilogía. Facultad de Administración y Economía*, 42-55.
- Angulo, C., Ruiz, O., Castillo, Y., Marrero, Y., Elías, A., Arazola, C., . . . Díaz, D. (2013). Dinámica de crecimiento y metabolitos producidos en la fermentación de la levadura *Candida norvegensis*. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 47, Número 2, 2013.*, 179-182.
- Argemí, M. (2016). Diseño de un biorreactor para la fabricación de la cerveza. *Universidad politécnica de Catalunya*, <http://hdl.handle.net/2117/102060>.

- Argote, F., Cuervo, R., Osorio, E., Delgado, J., & Samuel, H. (2015). Evaluación de la producción de etanol a partir de melaza con cepas nativas *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. Vol 13 N° 2 popayán July/Dec, 40-48.
- Arias, A. B. (2009). Identificación molecular de levaduras aisladas del masato, bebida fermentada tradicional de Perú. *Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. Acapulco.
- Armijos, M. (2016). Caracterización de microorganismos con capacidad fermentativa en el proceso de elaboración del guarapo. *Universidad Tecnológica Equinoccial*.
- Azanza, C., & Chacón, D. (2018). Análisis cultural y sensorial de la chicha de jora elaborada en la sierra norte ecuatoriana (Imbabura y Pichincha). *Universidad San Francisco de Quito USFQ*.
- Becerra, M. (2014). Bebidas fermentadas a partir de maíz y arroz: Elaboración control y conservación. *Alimentos Hoy*. Vol 22, No 31, 96-103.
- Berkhout, N. (2021). Cáscaras de yuca: De residuo a valioso alimento para el ganado. *All About Feed*, <https://es.allaboutfeed.net/cascaras-de-yuca-de-residuo-a-valioso-alimento-para-el-ganado/>.
- Bolívar, G. (2020). Determinación de cenizas: métodos y ejemplos. *Lifeder*, <https://www.lifeder.com/determinacion-de-cenizas/>.
- Bricio, E., Bricio, J., Arceo, S., Hernández, H., & López, F. (2017). Modelado de la fermentación de cerveza de alta graduación mediante modelos cinéticos. *Celaya, Universidad de Guanajuato*.

- Calderón, J. (2017). Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en la fermentación de un sustrato complejo. *Fundación Universidad de América*, 78.
- Capece, A., Romaniello, R., Pietrafies, A., Siesto, G., Pietrafesa, R., Zambuto, M., & Romano, P. (2018). Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. *International Journal of food microbiology*, Volume 284, 22-30.
- Carías, J. (2015). Elaboración de una harina de cáscara de piña (*Anana comosus* (L.) Merr) para su aplicación en un aharina alta en fibra con su respectiva evaluación nutricional y organoléptica. *Universidad de San Carlos de Guatemala*, 1-136.
- Carrillo, L., & Audisio, M. (2007). *Manual de microbiología de los Alimentos*. San Salvador de Jujuy : Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNJU, SS Jujuy.
- Castellanos, A., & Torres, G. (2017). Proteína celular en biomasa de la levadura producida a partir de residuos de cáscaras de naranja y papa para uso en la alimentación animal. *CITECSA. Volumen 8, número 13*, 24-49.
- Chiquiza, L., Montoya, O., Restrepo, C., & Orozco, F. (2016). Estudio de la Microbiota del Proceso de Producción de Almidón Agrio de Yuca. *Información tecnológica vol 27 No 5*, 3-14.
- Chiquiza, L., Montoya, O., Restrepo, C., & Orozco, F. (2016). Estudio de la Microbiota del Proceso de Producción de Almidón Agrio de Yuca. *Información tecnológica. vol.27 no.5 La Serena*, <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642016000500002> .

Chua, J., Lu, Y., & Liu, S. (2017). Biotransformation of soy whey into soy alcoholic beverage by four commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*. 262, 14-22.

ComBase. (s.f.). Software.

Comelli, R. (2019). Screening de microorganismos de interés para la producción de etanol de base celulósica. *Universidad Nacional del Litoral*, https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/5257/Resumen_Carboni_CienciasBiologicas.pdf.

Cordero, L. (2010). GUARAPO: LA BEBIDA DEL PUEBLO COLOMBIANO. *Universidad de Antioquía*, 79-91.

Cury, K., Aguas, Y., Matinez, A., Olivero, R., & Chams, L. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista colombiana de ciencia animal*, 122-132.

DANE. (2016). El cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Boletín mensual INSUMOS Y FACTORES ASOCIADOS A LA PRODUCCIÓN AGROPECUARIA*, 1-11.

DANE. (2016). Principales características del cultivo de la Piña (*Ananas comosus* L.). *Boletín mensual INSUMOS Y FACTORES ASOCIADOS A LA PRODUCCIÓN AGROPECUARIA*, 1-4.

DANE. (2017). Características que se destacan en el cultivo de arroz secano (*Oryza Sativa* L.) en Colombia. *Boletín mensual. INSUMOS Y FACTORES ASOCIADOS A LA PRODUCCIÓN AGROPECUARIA*, 1.3.

DANE. (2020). Boletín Técnico. Encuesta Nacional de Arroz Mecanizado (ENAM). *DANE*, 1-26.

- Dañuelos, K., García, A., Hernández, A., Padilla, I., & Torres, J. (2018). OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE LEVADURAS CON INTERÉS BIOTECNOLÓGICO. *Jóvenes en la ciencia. Volumen 4*.
- Elizondo, J., & Campos, C. (2014). Características nutricionales de la cáscara de piña ensilada con cantidades crecientes de urea y heno. *Nutrición Animal Tropical* 8(2), 51-71.
- Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Giacosa, S., Ortiz, A., . . . Cocolin, L. (2018). Volatile profiles and chromatic characteristics of red wines produced with *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food research international* 109, 298-309.
- Ferrer, M. (2018). Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* nativas de Alboraya para la producción de cerveza. *UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA*, 1-47.
- Fuentes, M., & Lizarazo, N. (25 de Noviembre de 2020). Masato. (L. Guarín, Entrevistador)
- Fula, A. (2010). Desarrollo de una bebida fermentada con adición de cocción de maíz. *Unidad Nacional de Colombia*.
- Garduño, A., Martínez, S., López, I., & Ruiz, A. (2014). Simulación del proceso de fermentación de cerveza artesanal. *Ingeniería investigación y tecnología, Volumen XV (número 2)*, 221-232.
- Garzón, J. (2016). Establecimiento y manejo de un cultivo de piña en la sede de la asociación de ingenieros agrónomos del llano en Villavicencio. *UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS* , 1-68.

- González, A., Del Angel, A., González, J., Rodríguez, N., & Bustos, G. (2017). Evaluación de levaduras nativas productoras de etanol presentes en el bagazo de caña de azúcar. *Ciencia UAT Volumen 11 No 2*, 80-92.
- Gunter, R. (2006). Contexto socio cultural del cosumo del amsato y la agrodiversidad en el distrito del Padre Felipe Luyando-Naranjillo. *Universidad Nacional Agraria de la Selva*, <https://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/UNAS/934/T.EPG-6.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Han, X., Zhao, Y., Hu, B., Yang, H., Peng, Q., & Tian, R. (2020). Influence of different yeast strains on the quality of fermented greengage (*Prunus mume*) alcoholic beverage and the optimization of fermentation conditions. *LWT*, 126.
- He, W., Liu, S., Heponiemi, P., Heinonen, M., Marsol, A., Ma, X., . . . Laaksonen, O. (2021). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* strains on chemical composition and sensory quality of ciders made from Finnish apple cultivars. *Food Chemistry*, 345.
- Heredia, K., & Kwok, E. (2015). Aislamiento e identificación de las taxa de levaduras presentes en el fruto de taxo (*Passiflora mollissima*), con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica. *Universidad Politécnica Salesiana*, 108.
- Herrera, J., León, L., Torres, Y., Cano, N., Herrera, A., & Cuenca, M. (2019). Evaluación y selección de levadura comercial para el proceso de fermentación alcohólica de hidromiel. *Publicaciones e Investigación Vol 13*, 13-30.
- Himedia. (2015). Violet Red Bile Glucose Agar w/o Lactose. *Ficha técnica*, 1-2.

- Ho, C., Chang, L., Syed, M., Fazry, S., Lazim, A., Hj, H., . . . Lim, S. (2021). Functional beverage production using acetous fermentation of soursop: Physicochemical, toxicity and organoleptic properties. *Food Bioscience*, 39.
- Holguín, M. (2010). Desarrollo de una bebida fermentada con adición de cocción de maíz. *Universidad Nacional de Colombia*.
- Karabagias, V., Karabagias, I., Prodomiti, M., Gatzias, I., & Badeka, A. (2020). Bio-functional alcoholic beverage preparation using prickly pear juice and its pulp in combination with sugar and blossom honey. *Food Bioscience*, 35.
- Lawton, M., & Alcaine, S. (2019). Leveraging endogenous barley enzymes to turn lactose-containing dairy by-products into fermentable adjuncts for *Saccharomyces cerevisiae*-based ethanol fermentations. *Journal of Dairy Science*, 102 (3), 2044-2050.
- León, A., Hernández, M., Miranda, D., Aldrete, J., Soto, L., & Martínez, R. (2020). Selection of native yeasts for the production of sparkling ciders from apple varieties established in Querétaro, Mexico. *Chapingo. Serie horticultura vol. 26 No 1*, 29-47.
- Liu, Y., Yuan, W., Lu, Y., & Liu, S. (2021). Biotransformation of spent coffee grounds by fermentation with monocultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* aided by yeast extracts. *LWT*, 138.
- Malagón, M., Garay, C., & Peña, N. (2017). Obtención de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. *Ediciones Universidad de América*, <http://hdl.handle.net/20.500.11839/6439>.

- Maldonado, M., Rios, C., & Caballero, P. (2016). Bebida fermentada a base de arroz con adición de probióticos. *Alimentech ciencia y tecnología alimentaria*.
- Martínez, M., & Quintero, J. (2017). Estado actual de los desperdicios de frutas y verduras en Colombia . *4to Congreso Internacional AmITIC 2017, Popayán, Colombia* . , 1-8.
- Minebois, R., Pérez, R., & Querol, A. (2020). A time course metabolism comparison among *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* and *S. kudriavzevii* species in wine fermentation. . *Food Microbiology*, *90*.
- Ministerio de Agricultura. (2021). Cadena Productiva de la Yuca. *Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales*, 1-23.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019). Cadena de la Piña. *Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales*, 1-19.
- Ministerio de Ambiente. (2021). Todo lo que deben saber los colombianos sobre el nuevo código de colores para la separación de residuos que empieza a regir el 1 de enero de 2021. *Abecé código de colores*, https://www.minambiente.gov.co/images/CODIGO_COLORES_VFF.pdf.
- Ministerio de Higiene. (1948). DECRETO 4194 DE 1948. *Suin Juriscol*, <http://www.suin-juriscol.gov.co/viewDocument.asp?ruta=Decretos/1543609>.
- Miranda, D., Ortiz, E., Arvizu, S., Ramiro, J., Aldrete, J., & Martínez, R. (2015). Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces* spp. nativas de viñeros en quétaró, México. *Agrociencia*, *49*, 759-773.

- Moran, A. (2020). Evaluación del crecimiento de la levadura oleaginosa *Clavispora lusitaniae* Hi2 y la producción de lípidos en un medio de cultivo formulado a partir de residuos agroindustriales. *Universidad Politécnica del Estado de Morelos*, <https://www.upemor.edu.mx/posgrados/documentos/tesis/T.4137-Moran-Mejia-Aime-Frida.pdf>.
- Moreno, N. (2021). Emprendimiento Cervecería Cacique. *Universidad Santo Tomás*, <http://hdl.handle.net/11634/31427>.
- Muñoz, S., & Riera, M. (2020). Residuos de la cáscara de yuca y cera de abejas como potenciales materiales de partida para la producción de bioplásticos. *Avances en Química*, 3-11.
- OpenStax Biología CC BY 3.0. (2018). Glucólisis. *OpenStax*.
- Papinello, G., Ricci, A., Folagatti, A., Patrignani, F., Lanciotti, R., & Versari, A. (2020). Unraveling the potential of cryotolerant *Saccharomyces eubayanus* in Chardonnay white wine production. *LWT*, 134.
- PCE. (2020). *Refractómetros tablas*. Obtenido de <https://www.pce-iberica.es/medidor-detalles-tecnicos/refractometros-tablas.htm>
- Pereira de Paula, B., Souza, L., Firmino, L., Fernandes, W., Ferreira, M., Fioravante, A., . . . Zarur, M. (2021). Technological features of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* for potential probiotic wheat beer development. *LWT*, 135.
- Pinto, J., Alvarenga, L., Oliveira, T., Schwan, R., Dias, D., & Queiroz, J. (2017). Elaboration and characterization of Japanese Raisin Tree (*Hovenia dulcis* Thumb.) pseudofruits fermented alcoholic beverage. *Food science and technology*, 37, 101-108.

- Quintero, L., Martínez, Y., Velasco, J., Arévalo, A., Muñoz, Y., & Urbina, N. (2015). Evaluación de residuos de papa, yuca y naranja para la producción de etanol en cultivo discontinuo utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. . *ION. Volumen 28 núm 1*.
- Reis, L., Caliari, M., Soares, S., Fiorda, F., & Costa, M. (2017). Utilization of residue from cassava starch processing for production of fermentable sugar by enzymatic hydrolysis. . *Food Science and Technology, 37 (1)*, 19-24.
- Reyes, K. (2015). Cuantificación de vinagre obtenido de cáscara de piña por medio de fermentación alcohólica y acética, y su incidencia en la productividad, en una empresa guatemalteca. . *Universidad de San Carlos de Guatemala*.
- Ríos, L., & Alemán, J. (2019). [LAS BEBIDAS TRADICIONALES DEL ALTIPLANO CUNDIBOYACENSE Y SU VINCULACIÓN CON EL TURISMO. *Universidad Externado de Colombia*, 1-205.
- Rodríguez, L., Abad, D., Gómez, J., Casanova, J., & Lema, C. (1998). Fenotipo Killer: Distribución en la comarca de la Ribeira sacra en las poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciencia y tecnología de lso laimentos Vol2.*, 33-37.
- Ruiz, A., Canedo, Y., Narváez, A., & Robles, J. (2016). Production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* Coimmobilized: proposal for the use of organic waste / Producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* Coinmovilizadas: propuesta para el uso de desechos orgánico. *Agrociencia, 50 (5)*, 551-563.

- Salazar, L. (2017). Aislamiento y caracterización de microorganismos durante el proceso de fermentación de *Theobroma cacao* L. de la variedad “chuncho” obtenida en Cuzco, Perú. *Universidad Peruana Cayetano Heredia*, 93.
- Sánchez, C., & Torres, J. (2017). Caracterización de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas en la producción de vino. *Jóvenes en la ciencia. Verano de la investigación científica*, 571-575.
- Scharlau. (2021). PCA (Plate count Agar). *Ficha técnica*, 1-3.
- Scharlau. (2021). Rose Bengal Agar. *Ficha técnica*, 1-2.
- Sigifredo, B., & Stroppiano, C. (2012). Análisis comparativo de la influencia de factores de estrés en levaduras industriales y levaduras de panificación. *Universidad Tecnológica Nacional Argentina*, 1-6.
- Sosa, F. (2019). Re-utilización de residuos agroindustriales para la producción de metabolitos de interés alimentario. *Congreso virtual: Desarrollo sustentable y desafíos ambientales "pensando alternativas para el abordaje ambiental"*, 402-417.
- Suárez, C., Garrido, N., & Guevara, C. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA*, 50(1), 20-28.
- Tejada, C., Montiel, Z., & Acevedo, D. (2016). Aprovechamiento de Cáscaras de Yuca y Ñame para el Tratamiento de Aguas Residuales Contaminadas con Pb(II). *Información Tecnológica. Vol. 27(1)*, 9-20.

- Tello, O., García, R., & Vásquez, O. (2002). Conservación de avertroa carambola; “CARAMBOLA”; por azúcar y calor. *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, 49-58.
- Tirado, D., Acevedo, D., & Montero, P. (2015). Caracterización del Ñeque, bebida alcohólica elaborada artesanalmente en la Costa Caribe Colombiana. *Información tecnológica*. Vol. 26(5), 81-86.
- Trujillo, L., & Echeverry, S. (2015). Aislamiento y caracterización de levaduras presentes en el fruto del *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L.M Perry (pomorroso) en la comuna 1 de la ciudad de Neiva- Huila. *Revista Ingeniería y región*. 13(1), 37-45.
- Ulloa, M. (2012). Desarrollo de biopolímeros a partir de almidón de corteza de yuca (*Manihot esculenta*). . *Escuela de Ingeniería Química. Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador*.
- Uribe, L. (2007). Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora. . *Pontificia Universidad Javeriana*.
- Valencia, G., Palacios, A., & López, Y. (2019). Base line to provide added value to fermented handcrafted rice based products "masato". . *Italian Journal of Food Science. 2019 Special Issue*, 79-89.
- Valencia, L. (2018). Determinación de propiedades termofísicas del fruto de maqui (*aristotelia chilensis* (molina) stuntz) deshidratado por diferentes métodos. *Universidad de Chile*, <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/173647>.

- Valles, A. (2021). Efecto de la concentración de pectinasas y temperatura de plicación en la clarificación de zumo de piña (*Annanas comosus* L.) como líquido de cobertura para la elaboración de conservas de carambola (*Averrhoa carambola* L.) en Pucallpa. *Universidad Nacional de Ucayali*, 105.
- Vila, E. (2018). Aislamiento y selección de levaduras nativas capaces de producir altos rendimientos de alcohol empleando como sustrato el exudado de cacao (*theobroma cacao* l.) clon ccn-51 en el distrito de San Alejandro. . *Universidad de Ucayali*.
- Villalpanda, A., Guzmá, M., Mesa, T., Cobo, Y., & Fiallo, C. (2017). Efecto del tratamiento magnético sobre la fermentación de vino base de azúcar crudo. *Tecnología Química*, 37(3), 606-620.
- Villota, S. (2020). Evaluación de la producción de carotenoides en levaduras nativas aisladas de la ciudad de Cali. *Universidad Santiago de Cali*, <https://repository.usc.edu.co/handle/20.500.12421/3542>.
- Walteros, C. (2019). Caracterización de cepas de levadura colombiana *Saccharomyces cerevisiae* para su potencial uso en la producción de cerveza "Colombian Ale". *Universidad de los Andes*, <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/44911/u831193.pdf?sequence=1>.
- Yan, G., Zhang, B., Joseph, L., & Waterhouse, A. (2020). Effects of initial oxygenation on chemical and aromatic composition of wine in mixed starters of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 90.

Zapata, J., Hoyos, M., & Quinchía, L. (2005). Parámetros cinéticos de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de un campo magnético variable de baja intensidad y alta frecuencia. *VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*, 39-44.

Zhou, W., Shu, Q., Zhang, X., & Chen, Q. (2021). Application of mixed-culture with *Lactobacillus brevis* and *Saccharomyces cerevisiae* to Chinese yellow rice wine brewing for ethyl carbamate regulation. *Food control*, 122.

Anexos

Anexo 1.

Encuesta realizada al panel.

Características sensoriales de la bebida		M1	M2	M3	M4
Vista	Aceptación visual				
	Color				
	Brillo				
	Homogeneidad del color				
Tacto	Consistencia				
	Grumosidad				
	Pegajosidad				
	Fluidez				
	Suavidad				
Olor	Aroma				
	Intensidad				
Gusto	Sabor				

Dulzor

Acidez

Aceptación general

Amengual, et al., 2018