UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL

SEDE UNIVERSITARIA DE ATENAS

ÁREA DE TECNOLOGÍA

CARRERA DE INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

DISEÑO DE UN MÉTODO VIABLE PARA LA PROPAGACIÓN DE LEVADURA (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*), EN LA PRODUCCIÓN DE PAN

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

NATALIA GÓMEZ ALFARO

LEONARDO ROJAS ZAMORA

OSCAR VÍQUEZ CHAVES

ATENAS, COSTA RICA

2016

UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL

SEDE UNIVERSITARIA DE ATENAS

ÁREA DE TECNOLOGÍA INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

DISEÑO DE UN MÉTODO VIABLE PARA LA PROPAGACIÓN DE LEVADURA (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*), EN LA PRODUCCIÓN DE PAN

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

NATALIA GÓMEZ ALFARO

LEONARDO ROJAS ZAMORA

OSCAR VÍQUEZ CHAVES

ATENAS, COSTA RICA

2016

DECLARACIÓN JURADA

Yo Natalia Gómez Alfaro portadora de la cédula de identidad número 206840054, Leonardo Rojas Zamora portador de la cédula de identidad número 206010122 y Oscar Víquez Chaves portador de la cédula de identidad número 206200237, estudiantes de la Universidad Técnica Nacional, UTN, en la carrera de Ingeniería en Tecnología de Alimentos, conocedores de las sanciones legales con que la Ley Penal de la República de Costa Rica castiga el falso testimonio y el delito de perjurio que pueda ocasionarse ante la Directora de Carrera y quienes constituyen el Tribunal Examinador de este trabajo de investigación, juramos solemnemente que este trabajo de investigación es una obra original respetando las leyes y que ha sido elaborada siguiendo las disposiciones exigidas por la Universidad Técnica Nacional, UTN, sí como los derechos de autor.

En fe de lo anterior, firmamos en la ciudad de Atenas, al día 1 del mes de setiembre, del dos mil dieciséis.

_____

Natalia Gómez Alfaro
Cédula 206840054

_____

Leonardo Rojas Zamora
Cédula 206010122

_____

Oscar Víquez Chaves
Cédula 206200237

DEDICATORIA

A Dios por el don de la vida, salud y ser la fuerza primordial.

“*Enseñarás a volar, pero no volarán tu vuelo.*

Enseñarás a soñar, pero no soñarán tu sueño.

Enseñarás a vivir, pero no vivirán tu vida.

Sin embargo...

*En cada vuelo, en cada vida, en cada sueño, perdurará siempre la huella del camino enseñado.***”**

Madre Teresa de Calcuta

AGRADECIMIENTOS

En primer plano a Dios por todas las bendiciones y oportunidades brindadas.

A la empresa Premezclas Industriales para Panadería, S.A., en especial a Enrique y Yazmin por confiarnos este proyecto y sus aportes para el desarrollo del mismo.

A Carolina y Yuliana por su ayuda brindada y disponibilidad en las pruebas preliminares y de campo para el progreso del proyecto.

A Jimmy y María José por su tiempo, interés y orientaciones académicas.

RESUMEN GERENCIAL

Mediante la realización de este proyecto se pretende identificar y ejecutar la propagación de levadura para la elaboración de pan. En la actualidad las industrias de este gremio importan la levadura para el total de la producción ofertada en el mercado.

No existen datos a nivel nacional de implementación efectiva en este tipo de operación unitaria; sin embargo, otras industrias como la cervecera y vinícola sí realizan algo parecido, es decir, lograr la reproducción de esta materia prima tan importante. Esto a partir de la identificación del medio y sustrato adecuado con la finalidad de favorecer la disponibilidad, bajar costos y evitar la dependencia de las importaciones.

Primeramente, se deben conocer las características de la levadura actual, la cual es hidratada y adaptada a un sistema de distribución que permita su uso en la elaboración de melcochón, de manera automática.

Una vez conocidas estas características, se mejora el ambiente de la levadura en cuanto a nutrientes, agua, temperatura, aireación y se delimitan las condiciones que *Saccharomyces cerevisiae* requiere para aumentar su número mediante sus propios mecanismos biológicos, donde se cuantificó el incremento de células a partir del aumento de biomasa en el tiempo.

La variable más importante en las evaluaciones resultó ser la concentración de melaza en el medio para deducir el crecimiento de la levadura de interés, en donde la menor concentración de esta azúcar rindió los mejores resultados en el diseño del método de propagación buscado. Se emplea una ecuación lineal basada en el programa estadístico “R comander”, se pudo deducir el tiempo requerido en el tiempo requerido para generar biomasa necesaria para llevar a cabo la producción de pan.

Las mediciones anteriores se realizaron a pequeña escala, guardando las relaciones necesarias para tener un nuevo punto de partida: el mejor medio y condiciones para poder elaborar el producto comercial buscado, el melcochón.

Ya confeccionado el pan se compararon sus características de volumen, con las levaduras propagadas a distintas concentraciones de melaza y finalmente se comparó con el melcochón tradicional elaborado con levadura hidratada, el cual presentó mediciones más amplias a partir de una cepa creada en medios controlados y de mayor concentración de biomasa, pues únicamente fue hidratada para desarrollar el proceso fermentativo en el pan.

TABLA DE CONTENIDO

Declaración Jurada iii

Dedicatoria iv

Agradecimientos v

Resumen Gerencial vi

Tabla de Contenido viii

Índice de Tablas x

Índice de Fórmulas x

Índice de Ilustraciones: x

Índice de Apéndices xi

Índice de Anexos xi

I. INTRODUCCIÓN 1

1.1 Objeto de estudio 1

1.2 Justificación 2

1.3 Antecedentes 4

1.4 Situación actual 7

1.5 Objetivos 9

1.5.1 Objetivo General 9

1.5.2 Objetivos específicos 9

1.6 Hipótesis 10

1.7 Alcances y limitaciones 11

1.8 Referencia institucional 12

II. Marco Teórico 13

2.1 Características principales de la levadura 13

2.2 Usos de la levadura en la industria de panificación 15
2.3 Fuentes nutritivas para la levadura en panificación 15
2.4 Consideraciones para lograr propagar la levadura 17
2.5 Análisis estadístico 20
2.6 Elaboración del pan con levadura 21
III. Marco Metodológico 24
3.1 Localización 24
3.2 Materiales y equipos 24
3.3 Procedimiento 27
3.3.1 Descripción de la levadura que se desea reproducir (levadura patrón) 27
3.3.2 Procedimiento elaboración del pan con la levadura patrón 30
3.3.3 Propagación de la levadura 31
3.3.4 Análisis estadístico 33
3.3.5 Procedimiento elaboración del pan con la levadura propagada 34
IV. Análisis de Resultados 35
4.1 Caracterización de la levadura patrón 35
4.2 Propagación de la levadura 38
4.3 Elaboración del pan con la levadura propagada 43
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 47
5.1 Conclusiones 47
5.2 Recomendaciones 47
VI. Bibliografía 48
VII. Apéndices 52
VIII. Anexos 57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales empleados en el proyecto 25

Tabla 2. Equipos empleados en el proyecto 26

Tabla 3. Procedimiento de determinación de sólidos totales en levadura... 28

Tabla 4. Procedimiento de uso del pH-metro Hanna 2213 29

Tabla 5. Formulación empleada en la elaboración de pan..... 30

Tabla 6. Resumen de caracterización de levadura patrón 36

Tabla 7. Variación de sólidos (g) en el tiempo con mezclas a distinto % melaza 39

ÍNDICE DE FÓRMULAS

Fórmula 1. Cálculo del porcentaje de sólidos en formulación de levadura usando un método de centrifugación..... 32

Fórmula 2. Ecuación lineal del "R comander" 42

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES:

Ilustración 1. Condiciones para el medio de crecimiento de la levadura..... 18

Ilustración 2. Porción de corte transversal del pan obtenido con la levadura patrón 38

Ilustración 3. Comparación de los atributos de melcochones variando la concentración de melaza en su fórmula 45

ÍNDICE DE APÉNDICES

Apéndice 1. Resumen de prueba preliminar para determinar mejor fórmula para la propagación de levadura 52

Apéndice 2. Resumen de procedimiento para pruebas de actividad (funcionalidad) de la levadura 53

Apéndice 3. Procedimiento de prueba funcional de desplazamiento de agua por el CO_2 de la levadura 54

Apéndice 4. Resultados de pruebas de desplazamiento de CO_2 con distintos sustratos 55

Apéndice 5. Desplazamiento de CO_2 con levadura en pasta (madre) 56

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ficha técnica de la levadura en pasta utilizada 57

Anexo 2. Ficha técnica de la Melaza líquida 59

Anexo 3. Ficha técnica de la harina fuerte 60

Anexo 4. Balanza de precisión Veritas 61

Anexo 5. Fermentador portátil marca Salva 61

Anexo 6. Horno eléctrico marca Salva 62

Anexo 7. pH-metro Hanna 2213 62

Anexo 8. Termómetro digital de espiga Delta trak 11050 63

Anexo 9. Centrífuga Gallenkamp Junior 63

Anexo 10. Tubo cónico plástico para centrífuga 63

Anexo 11. Sólidos presentes en las muestras de levadura hidratada (patrón) 64

Anexo 12. Datos de pH de muestras de levadura patrón 64

Anexo 13. Mediciones del pan elaborado con la levadura patrón..... 64

I. INTRODUCCIÓN

Este capítulo comprende una reseña de la importancia de la levadura en la panificación, su origen y cómo llegó a ser una materia prima de interés mundial, así como los inicios del arte de hacer pan hasta llegar a Costa Rica, así como la relevancia en la población al ser uno de los alimentos de mayor trayectoria, donde su calidad en gran medida obedece a la levadura.

1.1 Objeto de estudio

Desde la antigüedad la levadura se ha utilizado en la transformación y elaboración de alimentos y bebidas alcohólicas. En el año 4000 a.C. existe constancia de la fabricación de pan en el antiguo Egipto, donde los panaderos mezclaban cerveza con harina de trigo para la elaboración de masas, esto empezó a ser habitual en Europa y comienza a emerger la industria productora de cepas de levadura para panadería y se desarrolla investigación de S*accharomyces cerevisiae* para mejorar la obtención de productos menos amargos y con mejor sabor (Hernández, 2003, pág. 4).

Este mismo autor (2005, pág. 39) indica que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es una especie que crece en forma anaerobia facultativa, ya que también puede tener fases aeróbicas y produce enzimas capaces de descomponer diversos sustratos mediante la fermentación alcohólica tanto para la producción de pan como vinos o cervezas.

La producción de levadura es un proceso de múltiples etapas y se vuelve muy complejo de desarrollar por las plantas dedicadas a la panificación, motivo por el cual la misma es adquirida en las industrias que se dedican a la producción exclusiva de levadura, por lo que en las plantas industrializadas dedicadas a la elaboración de pan, el único proceso que se realiza respecto a la levadura, es un método de hidratación, en donde la levadura pasa de estar en forma de pasta a formar una crema (Víquez, 2014).

En Costa Rica la propagación de levadura en la industria panificadora es un proceso ausente, debido a que las empresas actualmente mantienen una dependencia de su compra e importación, por lo cual se evidencia la importancia en la investigación del tema y la exploración de los factores para el desarrollo de la reproducción de *Saccharomyces cerevisiae* (Espeleta, 2015).

Con esta investigación de la propagación de la levadura se espera conocer las condiciones óptimas para que el producto a obtener posea características lo más similares posible a las presentes en la levadura de origen, lo cual se prueba en el producto final.

Para esto se propone establecer un procedimiento que garantice el desarrollo de la levadura. El mismo consiste en colocar una concentración inicial de levadura, brindarle condiciones adecuadas, hasta obtener las características necesarias para elaborar el producto de interés.

Dado que se trata de un proyecto experimental las pruebas se corrieron en un laboratorio, por lo que si requiere aumentar la escala de producción, una empresa panificadora podrá basarse en este estudio con datos confiables y aplicables a esta industria.

1.2 Justificación

A pesar de las tendencias mundiales de consumir menor cantidad de carbohidratos, el pan sigue siendo un alimento básico para la mayoría de la población en el orbe, el consumo del mismo representa en algunos casos más del 80% del consumo alimentario en algunas sociedades (Bamforth, 2005).

Entre los ingredientes del pan, la levadura representa del 1-6 %, dependiendo del peso de la harina y otros factores. La levadura que se usa en mayores proporciones es la que viene en pasta prensada con 28-32% de sólidos y la levadura en crema, la cual contiene aproximadamente un 18% de sólidos (Bamforth, 2005).

Cualquier producto alimenticio que presente características especiales como ser nutritivo, económicamente accesible, de alta disponibilidad y oferta (por ejemplo el pan), representa sin duda un impacto importante dentro de la seguridad alimentaria de cualquier grupo de la población, principalmente si se diera alguna recesión económica, de ahí que si pequeños y medianos productores nacionales, lograran implementar la propia replicación de su levadura, existiría mayor oportunidad de crecimiento para ellos, desmonopolizando la dependencia externa.

El lograr desarrollar un sistema adecuado que permita la propagación de una de las principales materias primas del pan como lo es la levadura, traería muchos beneficios a la industria que así lo realice, sería una menor inversión en el rubro de compras que permita un mejor flujo de caja para invertir o desarrollar otras áreas o procesos dentro de la misma compañía, con lo que de manera indirecta permita mejorarse el ambiente de trabajo, instalaciones, orden, sistemas productivos, maquinaria y equipos, entre otros. Representando más fuentes de empleo, estabilidad y surgimiento de nuevos negocios con capital nacional que reactive la economía del país.

Es justificable en cualquier tipo de industria el desarrollo de prácticas que minimicen los costos, o más bien optimicen los resultados sin que se deteriore la calidad e inocuidad (aspecto muy importante en sistemas alimenticios), así como la disponibilidad de producto sin depender tanto de importaciones para satisfacer las necesidades del nicho de mercado demandante, considerando que en Costa Rica no se reporta que la industria panificadora realice algún tipo de replicación de levadura para producir pan.

La levadura que se utiliza en el país para la panificación a nivel industrial, debe ser importada vía terrestre desde Guatemala, México, Estados Unidos o Suramérica, por lo que el costo de la misma se incrementa por el acarreo. Por otro lado cualquier conflicto que existiera entre los países por los que se debe transitar con el producto en cuestión, podría provocar atrasos en los medios de transporte y por ende el desabastecimiento de esta materia prima en el país,

asimismo el riesgo de nuevos impuestos pondría en riesgo la producción final (Víquez, 2014).

La levadura se debe transportar a temperaturas de congelación (entre -20 y -10 °C), por lo que cualquier eventual pérdida de la cadena de frío desencadenaría la activación de la misma. Además se ve afectada por las altas temperaturas a las que se expone en el proceso de recepción, esto hace que se provoque la muerte de algunas células, acción que repercute en su actividad, calidad y efectividad en el momento de la utilización de la misma. El transporte aéreo podría disminuir estos riesgos por ser más rápido, sin embargo su alto costo no aplica para el tipo de producto que se desarrolla (Víquez, 2014).

Por estas razones la producción de levadura a nivel nacional podría venir a ser una solución ante alguna de estas situaciones e incluso ser el nacimiento de un gran negocio, el cual hasta el momento no se ha llevado a cabo.

1.3 Antecedentes

En el exterior se ha industrializado la reproducción de levadura y se ha calculado que la producción mundial sobrepasa los 2.000.000 de toneladas anuales (COSMOS, 2016), por ejemplo en Chile con la levadura fresca y seca para exportación, donde también emplean la melaza como sustrato y complementan con minerales y vitaminas. Para 1996 la producción anual rondaba las 34.900 toneladas (CONAMA, 1998, págs. 5-6).

Este mismo autor (1998), destaca que de esa producción, aproximadamente 26.500 toneladas se producen en la Región Metropolitana, que equivale a 7.950 toneladas al año de levadura en base seca. Con respecto a las exportaciones, se estima aproximadamente 5.000 toneladas anuales de levadura, expresada como levadura seca. Mientras tanto Lezcano (2012, pág. 5), destacó que en Argentina para el año 2010, se produjeron 53.500 toneladas de levadura para panificación, de las cuales 21.000 fueron exportadas y 3500 importadas, para un consumo per cápita estimado en 900 g.

En Costa Rica no existe una empresa dedicada a la propagación de levadura para la panificación, por ende los estudios sobre este tema no han llegado muy lejos o están del todo nulos. En 1987, Billy Rodríguez Sancho (pág. 23), llevó a cabo su proyecto de graduación en la producción de levaduras usando una columna de burbujeo. Según los datos observados, el método utilizado dio buenos resultados, obteniendo un rendimiento del 30% con base a la cantidad de melaza que se usó como sustrato, que fue un 15,5% más de lo que se logró en un tanque aireado.

Debido a la falta de estudio de este tema para panificación a partir de la levadura, en Costa Rica se debe tomar como referencia lo hecho en la industria cervecera, donde sí realizan replicación de la levadura. En los orígenes foráneos de dicha Industria se utilizaba la levadura obtenida de la fabricación de cerveza, hasta que finalmente se establecieron las plantas de producción de levadura durante el siglo XIX. Es posible que la primera planta de producción comenzara a operar en Holanda en 1780 con el llamado proceso Dutch que era anaerobio y que tenía sólo rendimiento del 4 al 6% con respecto a la materia prima usada (OAS, 2014).

Con la introducción de la aireación en el proceso de producción, que tiene lugar en 1879, se aumentan considerablemente los rendimientos, que pasan a ser del 50 al 60% del teórico. La última etapa importante de modificación de la tecnología tiene lugar con la alimentación controlada de azúcar a los mostos en fermentación, cambio introducido por un científico danés, Sak y un alemán, Hayduck, en 1919 (OAS, 2014).

Los procesos de producción utilizaban granos como materia prima, hasta que su elevado costo produjo el reemplazo por las melazas de remolacha o de caña de azúcar con las cuales pueden alcanzarse rendimientos cercanos al 100% del teórico. Actualmente se está tratando de encontrar otras fuentes de materias primas alternativas a las melazas, como el suero de leche hidrolizado (OAS, 2014).

Florida Ice and Farm, mejor conocida como cervecería Costa Rica, tiene un método de propagación de levadura definido, el cual consiste en hacer un cultivo de las células de dicho microorganismo bajo variables controladas en función del tiempo, donde se da la reproducción. Cada replicación de levadura va pasando a recipientes cada vez más grandes, hasta que se encuentre en la cantidad y condiciones aceptables para ser usada en la fermentación de cerveza (Víquez, 2014).

El uso de la levadura obtenida por propagación en cerveza es muy diferente al que se daría en la replicación de levadura para usar en pan, debido a que en la fermentación de la cerveza, al final del proceso la levadura es recuperada y utilizada nuevamente en el medio que es acuoso hasta el final, mientras que en este caso, debe permanecer hasta la masa del pan para generar la fermentación, por esta razón no se recobraría. De ahí que la cantidad de levadura que se debe tener disponible en la industria de la panificación es mayor que en la cervecera (Gutiérrez, 2014).

Según los últimos datos disponibles a nivel internacional (2009-2010), Alemania es el país donde más pan se consume, con 106 kg por persona por año, es seguido por Chile y Argentina en donde se consume 90 y 86 kg de pan por persona por año (EFE, 2012).

Estos datos dan una idea del consumo de levadura que se da a nivel internacional, ya que en los países que existe un mayor consumo de pan el promedio es de 94 kg de pan por persona por año. Tomando como base que el pan tiene aproximadamente un 6% de levadura (prensada), se puede decir que por persona por año se consume 5,64 kg de levadura, esto en Europa y Suramérica según los datos mencionados por el autor anterior.

En el caso de Costa Rica y en promedio del resto de Centroamérica, el consumo de pan es mucho menor, en donde se tiene un consumo per cápita de 22 kg y de 40 kg respectivamente. Esto da como resultado un consumo de

levadura de 1,32 kg para Costa Rica y de 2,40 kg para el resto de la región (CentralAmericaData, 2014).

Para la elaboración de pan una alternativa es la reproducción de la levadura por medio de propagación, la cual consiste como en la gran mayoría de microorganismos benéficos, en colocar una concentración inicial de levadura, en un medio con las condiciones aptas tanto en alimento como temperatura y disposición de oxígeno (Víquez, 2014).

1.4 Situación actual

En Costa Rica se menciona un estudio realizado en el comportamiento del crecimiento de microorganismos *Saccharomyces cerevisiae*, por medio de una columna de burbujeo, el cual comparó tanto el crecimiento como el rendimiento en la obtención de biomasa. Este estudio se desarrolló en el año de 1987 (Rodríguez) donde la técnica y los resultados dan pie a que en la actualidad se puedan obtener efectos similares o incluso mejores.

Para llevar acabo dicho estudio, se realizaron cuatro corridas experimentales en laboratorio, esto en una columna de burbujeo de 0,116 m^3 de capacidad y además seis corridas en tanque aireado de 0,03 m^3, esto con el objetivo de tener una comparación con otro sistema de proceso y determinar cuál es más eficiente (Rodríguez, 1987, págs. 15-20).

En este mismo estudio, las pruebas de los cultivos se realizaron con una duración de 6 horas, tiempo en el cual se controló la temperatura, el pH, los grados brix (°B) y el flujo de aire que se incorpora en el sistema. Como resultado de interés para determinar la propagación de la levadura se estableció la concentración de biomasa que se generó en determinadas condiciones. Además como sustrato se usó melaza de caña de azúcar y como nutrientes urea y monofosfato de calcio.

Se dice que en condiciones de operación proporcionales, usando concentraciones de sustrato, inoculo y nutrientes iguales, tanto en la columna de burbujeo como en el tanque aireado y comparando la cantidad de biomasa obtenida de cada uno, se determina que la columna de burbujeo genera los mejores resultados, donde se percibe un comportamiento exponencial en el crecimiento de los microorganismos.

El rendimiento en la producción de levadura en columna de burbujeo, el cual se calculó en base a la cantidad de melaza que se introdujo en el sistema como sustrato, fue de un 30%, mientras que en el tanque aireado fue de un 14,5%, lo cual hace ver que es necesario introducir cierta cantidad de aire al sistema.

El proceso se dio en cuatro etapas, siendo la primera un procedimiento de la materia prima (tratamiento de la melaza), que se diluyó a 45 °B, se decantó y se sometió a un proceso térmico a 80°C; en la segunda etapa se preparó adecuadamente el inoculo requerido, la tercera correspondió al cultivo y puesta en marcha del proceso de reproducción, la cuarta etapa es donde se dio la recuperación de la levadura producida.

El tiempo considerado aceptable para que se diera el crecimiento adecuado de la levadura fue de 6 horas, esto a nivel de pruebas, pero como recomendación final del estudio se dice que el tiempo más adecuado debe ser entre 12 y 14 horas, esto para que se logre establecer una cinética adecuada y completa de crecimiento de los microorganismos (Rodríguez, 1987, pág. 28).

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General

Desarrollar un método de propagación de levadura (*Sacharomyces cerevisiae*), tomando en cuenta sus sólidos, para ser usada como materia prima en la elaboración de pan.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Describir la levadura actual tomando como principal atributo los sólidos totales y su influencia en la circunferencia final del pan horneado, lo cual se tomará como patrón, así como el pH del medio.

2. Realizar la propagación de levadura utilizando melaza como sustrato variable, en condiciones de temperatura y tiempo constantes hasta lograr la cantidad de sólidos de la levadura patrón.

3. Elaborar pruebas de funcionalidad mediante la elaboración de melcochón con la levadura propagada.

1.6 Hipótesis

Dado que el pan ha sido uno de los alimentos de mayor consumo dentro de la población a lo largo de la historia principalmente en países subdesarrollados, esta industria ha crecido en los últimos tiempos para lograr satisfacer la demanda constante y creciente, situación a la que Costa Rica no es ajena.

De manera conjunta a lo anterior se podría dar la oportunidad de negocio y activación de la economía brindando la opción de crecer a pequeños y medianos empresarios dentro del gremio de la panificación. Igualmente las empresas o industrias panificadores más consolidadas podrían ver justificadas sus ampliaciones en procura de no verse rezagados en cuanto a la oferta que les exige el mercado creciente, cambiante y globalizado, donde contar con reducción de costos por lograr reproducir algún porcentaje de una materia prima, haría aumentar su disponibilidad.

Con todo esto se generarían diversas fuentes de empleo, beneficiando muchos sectores directa e indirectamente involucrados en lo largo de la cadena de manufactura. A pesar de tratarse de un producto final que se puede catalogar como accesible para toda la población, su producción a gran escala conlleva una serie de inversiones que deben ser constantes, ya que su sistema productivo así lo exige, además de ser un producto de vida útil no tan prolongada. De ahí que cualquier optimización dentro de las operaciones unitarias de proceso puede generar grandes cambios en las utilidades finales.

A pesar del gran consumo de levadura, así como de la dependencia, disponibilidad, cantidad y tiempo de entrega de proveedores, esta materia prima se continúa trayendo de otros países, por lo que de lograr idear la mejor manera para proliferar la cepa de interés será de gran relevancia para la industria panificadora que así lo implemente en su sistema productivo.

1.7 Alcances y limitaciones

Este proyecto está dirigido a que se pueda realizar en la industria de panificación nacional. Dado que las pruebas preliminares para definir las mejores condiciones se desarrollaron en el laboratorio de la planta docente de la UTN, se procedió con el desarrollo de los objetivos en el mismo sitio, donde se procuraron mantener las condiciones lo más similares posible a las de la empresa, permitiendo a su vez traspasar la experiencia, conocimientos y metodologías durante el desarrollo del proyecto a dicha compañía. De esta manera el método desarrollado puede ejecutarse tanto a nivel de laboratorio como industrial.

Algunas de las limitaciones observadas van de la mano con la falta de documentación y estudios en propagación, específicamente de levadura para panificación, aunque hay expertos de la industria panificadora, empresas consolidadas y trabajos realizados con la levadura, no hay evidencia investigativa en los objetivos planteados.

Por otro lado, para realizar las pruebas de campo hubo que adaptarse a los materiales y tipo de equipos disponibles en el laboratorio, donde aspectos como humedad relativa, temperatura y sistema de aireación continuo fueron difíciles de controlar a cabalidad.

1.8 Referencia institucional

Tanto las pruebas preliminares como las que llevaron a la obtención de los resultados de los objetivos se realizaron en el laboratorio de la planta docente de la Universidad Técnica Nacional (UTN), sede Atenas, que nació en el año 2008 como la quinta universidad pública de Costa Rica, a partir de la fusión de varias instituciones parauniversitarias. Esta sede procede de la antigua Escuela Centroamericana de Ganadería, la cual, desde hace varios años se encargaba de la formación de estudiantes en el campo agropecuario en el nivel de diplomado.

El eventual seguimiento de este proyecto se realizaría en la planta Premezclas Industriales para Panadería, S.A., creada en 1990 por la familia Pacheco Musmanni. Ha sido pionera en la formulación e industrialización de pan; introducen en el mercado costarricense el concepto de premezclas, panes crudos congelados, panes prehorneados congelados y panes terminados congelados. En el año 2011 pasa a ser parte de Florida Ice & Farm, lo ha repercutido en el aumento de sus índices de producción y sostenibilidad ambiental al ser la primer empresa privada en certificarse como carbono neutral.

II. MARCO TEÓRICO

A continuación se presenta la información bibliográfica consultada para la realización del proyecto de propagación de levadura; parte de los detalles y consideraciones, así como sus condiciones y aspectos por considerar para su desarrollo y poder elaborar el pan.

2.1 Características principales de la levadura

Las levaduras son organismos pertenecientes al reino de los hongos, solamente pueden alimentarse de materia ya preformada y están distribuidas en casi todos los hábitats naturales (Ferrer, 2009), ya que son organismos unicelulares que pueden obtener la energía que necesitan de manera aeróbica por respiración o de manera anaeróbica mediante la fermentación (Ortiz Avram, 2010, pág. 20).

Las levaduras conocidas comprenden 39 géneros y 349 especies que se distinguen por sus propiedades genéticas, morfológicas y bioquímicas; sin embargo solamente existen tres géneros que tienen aplicación comercial: *Sacharomyces, Candida y Kluveromyces* (Alpizar, 2010).

Las proteínas de la levadura no solamente son importantes por sus características nutricionales, sino también por los aportes funcionales como: potenciador de sabor, saborizante, agente espesante y péptido reductor de la harina conocido como glutatión (Alpízar, 2010, pág. 2).

Como lo indica la ficha técnica del Anexo 1 la levadura patrón empleada fue "***Saccharomyces cerevisiae*, estas son propagadas en condiciones controladas de laboratorio donde luego son mezcladas con melaza clarificada y esterilizada, agua y aire para pasar por un proceso de fermentación, separación y enfriamiento para obtener una crema consistente que finalmente se prensa, hasta obtener la levadura fresca**".

Respecto a la reproducción, según Ferrer (2009), las levaduras se multiplican asexualmente como células individualizadas que se dividen por gemación (fisión). Mientras que sexualmente mediante unas estructuras llamadas ascas, que contienen hasta ocho esporas. Estas asco-esporas, pueden fusionarse entre sí y originar un nuevo individuo que podrá multiplicarse a través de una división vegetativa.

Este organismo ha sido utilizado para fermentar azúcares del arroz, trigo, cebada y maíz para la producción de bebidas alcohólicas y en la industria de panificación para expandir o aumentar la masa. Sus extractos suelen usarse como suplemento vitamínico ya que están constituidas en un 50% por proteínas y son fuente importante de vitaminas B, niacina y ácido fólico (Ferrer, 2009).

Para que las levaduras puedan digerir estos azúcares es necesaria la intervención previa de ciertas enzimas, las cuales son proteínas de cadena larga que actúan como catalizadores que aceleran reacciones sin sufrir ningún cambio en ellas. Son producidas de manera natural por plantas, animales y microorganismos, pero por sí mismas no son organismos vivientes. Las enzimas son muy activas de modo que solo se requieren en pequeñas cantidades; también son altamente específicas, o sea que una enzima solamente cataliza una sola reacción. Cada enzima tiene su propio rango de pH y temperatura óptimos, de lo que depende el progreso de su reacción, al igual que el tiempo y la concentración de estas (Lallemand, 1998).

En esta misma revista (1998) se indica que las enzimas tienen los nombres de los compuestos sobre los cuales trabajan (Carbohidrasas, Lipasas, Proteasas) y por el tipo de reacciones que catalizan (Oxidasas, Hidrolasas). La mayoría de las enzimas comerciales son producidas por microorganismos, así que su género y especie es también importante para identificarlas.

Una vez que las levaduras van a continuar con el proceso de fermentación de los azúcares, se logra su reproducción al permitir la conformación del cultivo de microorganismos; para lograrlo se deben proporcionar las condiciones físicas,

químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada. Se entiende por crecimiento celular al aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo (Altamirano, 2013, pág. 39).

2.2 Usos de la levadura en la industria de panificación

Las poblaciones de levaduras crecen de forma explosiva acumulando grandes números en un periodo de tiempo muy reducido, entender cómo se produce el crecimiento microbiano es importante para poder controlarlo y además poder potenciar sus beneficios y aplicaciones (Altamirano, 2013, pág. 38).

Según indicaron Ferrer (2009) y Ortiz (2010), la razón del uso de la levadura en la industria panadera es la fermentación de los azúcares presentes en la harina o adicionada a la masa, ya que son las encargadas de metabolizar sus componentes. Su uso para fermentar el pan tuvo origen en Egipto hace unos 6000 años y fue extendiéndose lentamente hasta el resto del mundo occidental.

Esta fermentación origina dióxido de carbono (CO_2) y etanol. El CO_2 queda atrapado en pequeñas burbujas que se pueden observar según la esponjosidad del pan y que hacen expandir la masa; esto se logra cuando la harina húmeda se mezcla con la levadura y se deja en reposo durante unas horas en un lugar a temperaturas tibias y con alta humedad relativa, que permita a la levadura llevar a cabo su proceso bioquímico normal. La harina no contiene casi en sí misma azúcar, pero hay en ella algunos enzimas capaces de degradar el almidón que produce suficiente azúcar como para permitir la subida de la masa (Ferrer, 2009). El alcohol producido se desprendería durante el proceso de cocción debido a que presenta un punto de ebullición alrededor de 78°C, menor al de la temperatura alcanzada dentro de los hornos panificadores (UNAM, 2010).

2.3 Fuentes nutritivas para la levadura en panificación

Dado que la levadura es un ser vivo, de acuerdo con las condiciones del medio y fuentes nutritivas, así será su comportamiento, ya sea para reproducirse,

lo que conllevaría el aumento de biomasa, o bien en fermentar el combustible al que tenga acceso y consecuentemente la generación de mayor CO_2 y etanol, tal como se indicó en 1996 en un artículo de la revista Lallemand. La reproducción vía respiración es importante porque es alrededor de 18 veces más eficiente que el de vía fermentación al convertir azúcar en levadura.

La tendencia del microorganismo en cuestión al reproducirse vía respiración es cuando hay disponibilidad y constancia de oxígeno, efecto conocido como Pasteur, mientras que la vía fermentativa es favorecida en la presencia de mayores cantidades de azúcar, también conocido como efecto Crabtree. La combinación de ambos en *Saccharomyces cervisiae* es la razón por la cual los productores comerciales emplean la aireación y dosis incrementales de alimento, para mantener un alto nivel de O_2 y menos azúcar en el proceso productivo (Lallemand, 1996, pág. 1).

Una de las fuentes de energía más importantes para la levadura es el carbono ya que es su constituyente principal, presente en los carbohidratos, que además les prestan oxígeno, hidrógeno y energía metabólica. De sus fuentes más comunes se incluyen melazas de caña, glucosa, sacarosa y lactosa, e incluso los alcoholes y ácidos orgánicos. Un indicador primordial para seleccionar esta fuente, es la velocidad de metabolización que puede influenciar la formación de biomasa y la generación de metabolitos (Hernandez A. , 2003, pág. 22).

La melaza industrial es una de las fuentes de hidratos de carbono más utilizadas como fuente energética en este tipo de procesos, ya que aporta tanto carbohidratos como minerales y vitaminas, necesarias para el crecimiento de la levadura. Es importante resaltar que dentro de lo minerales que contiene están: magnesio, calcio, hierro, sodio, potasio, zinc, fósforo, sodio y vitaminas, entre otros (USDA, 2016).

Según Hernandez (2003, pág. 23), otra fuente de importancia es el nitrógeno que también forma parte de la composición de los microorganismos. Algunos son capaces de utilizar el nitrógeno de origen orgánico (el que se

encuentra en los aminoácidos de las proteínas, la urea, las pirimidinas y las purinas), mientras que otros utilizan el nitrógeno inorgánico (el gas amonio, las sales de amonio, los nitratos, los nitritos y el nitrógeno molecular).

Otro requerimiento nutricional lo constituye el fosforo presente en los fosfatos, los cuales son reguladores del pH (buffers) y se agregan en exceso para que no se agoten durante el proceso. Este compuesto contribuye en el crecimiento celular y es muy importante componente estructural de la pared celular (Hernandez A. , 2003, pág. 24). Como lo informó USDA en el 2016, la melaza también contiene este mineral.

Una vez conocidos los principales requerimientos nutricionales que necesitan los microorganismos, como fuentes necesarias para vivir y los ambientales que se basan en pH y temperatura de cultivo, se continúa con la etapa de la preparación del medio (Hernandez A. , 2003, pág. 24).

Uno de los aspectos por considerar en este punto, es el contenido de azúcares (procedente en su mayoría de la melaza de caña de azúcar), pues cuando alcanza niveles entre 20-30%, la levadura mostraría un nivel de actividad invertasa reducido. La cual metaboliza la sacarosa en glucosa y fructosa. Si el nivel es alto, se produce una rápida liberación de glucosa en el medio extracelular de la levadura, con el consiguiente aumento de la presión osmótica en el exterior celular lo que impide o retarda el crecimiento celular y por tanto su capacidad fermentativa (Hernández M. J., 2005, pág. 15).

2.4 Consideraciones para lograr propagar la levadura

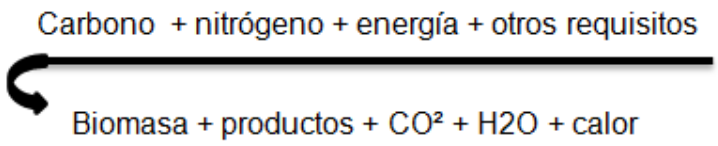
La propagación consiste en el aumento del número de células de la levadura a nivel de laboratorio, logrado a partir de la trasferencia del contenido de una vigorosa fermentación en un recipiente, hasta lograr obtener la cantidad de levadura requerida para la producción en un tanque fermentador (Ortiz Avram, 2010, pág. 25).

Sumándole a lo nutricional mencionado en la sección anterior, es resaltable que cualquier cambio en las condiciones de crecimiento como temperatura, presión osmótica, intoxicación alcohólica, infección bacteriana o alcalinización del medio, afectará su propagación; a este estado de alteración se lo denomina normalmente estrés (Sigifredo, 2012, pág. 1). Por lo tanto los medios de cultivo utilizados intervienen en el éxito o fracaso de un proceso industrial. Su selección depende principalmente del tipo de microorganismo empleado y del producto por alcanzar (Hernández A. , 2003, pág. 25).

En la concentración final por obtener, depende el tipo de sustrato que se utilice; en un medio sintético que contiene glucosa, se obtienen rendimientos de 10 a 20 g/L de biomasa, mientras que en uno con melazas de caña o remolacha, el rendimiento es de 60 a 100 g/L de biomasa; el aumento comparativo en cada uso es significativo y mayor complemento aún si le agrega el bajo costo de las melazas (Hernandez A. , 2003, pág. 26).

El microorganismo se hace crecer en un medio de composición típica promedio y, con base en los resultados, se calculan los rendimientos de crecimiento y de producción de metabolitos. A partir de estos datos y la composición elemental, se plantea una ecuación estequiométrica que permita ir optimizando el medio de cultivo, la cual se denota en la siguiente ilustración:

Ilustración 1. Condiciones para el medio de crecimiento de la levadura



Fuente: Hernández A. , 2003, pág. 27.

A nivel experimental en laboratorio, una vez identificada la cepa de levadura de interés, sus células son cultivadas para lograr la propagación y fermentación. Se pretende la producción de levadura a partir de pequeñas cantidades (desde la cepa cultivada hasta la levadura empleada en la producción normal). Las levaduras se mantienen en medios nutritivos líquidos bien oxigenados por varias

tandas; se incrementa su volumen paulatinamente para conseguir tantos ciclos de células como sean necesarios (Ortiz Avram, 2010, pág. 12).

Dado que el agua es una de las principales materias primas en procesos de propagación microbiológica, es necesario que sea incolora, inodora y libre de sabores indeseables o sustancias químicas como amoniaco, nitratos y pesticidas e iones tóxicos inorgánicos. Los análisis microbiológicos de agua rutinarios aseguran la ausencia de bacterias patógenas para se logre cumplir con las exigencias legales de potabilidad de agua (Ortiz Avram, 2010, pág. 18).

El tratamiento previo de la melaza consiste en disolverla en agua y luego se esteriliza por calor, para impedir el desarrollo de microorganismos diferentes a la levadura. Una vez estéril, la melaza se agita por medio de la introducción de aire comprimido estéril y se deja reposar con el fin de que las sustancias mucilaginosas (viscosas) sedimenten. Después, el líquido sobrenatante se separa por decantación, se le agregan sales de amonio, y se le ajustan el pH a 4,5 y la temperatura a 21°C; así se convierte en el medio de cultivo en el que se desarrollará la levadura (Hernandez A., 2003, págs. 28-29).

Para lograr lo anterior y evitar recontaminación del medio de cultivo, es necesario que los sustratos cuenten con calidad microbiológica, pues al tratarse de un medio de cultivo se presta para que otras células patógenas o de deterioro se aprovechen del medio, provenientes del aire, tanques de fermentación, utensilios, materias primas, entre otros (Ortiz Avram, 2010, pág. 18).

Según Ortiz (2010), en cualquier prueba experimental si el sistema estuviera completamente hermético, el riesgo de recontaminación sería mínimo, no obstante en las condiciones experimentales en la que no se pueda garantizar el control total del ambiente, podría haber crecimiento de microorganismos indeseados. Por ello, definir y controlar los tiempos de exposición, hidratación y fermentación, siendo el tiempo y temperatura las variables a medir, así como la asepsia de operarios, utensilios y equipos, son cruciales para mantener el crecimiento microbiano de interés.

La reproducción de la levadura se realiza normalmente en recipientes de fermentación grandes, que contienen melazas como sustrato. La cantidad de levadura que se utiliza en la inoculación de cepas madre es de cerca del 7,5-10%. Conforme avanza el proceso, es necesario suministrarles una mayor cantidad de oxígeno; de otra forma, el medio se tornará anaerobio y la levadura en lugar de reproducirse, convertiría los azúcares en alcohol y CO_2 (H ernandez A. , 2003, pág. 179).

No obstante para lograr obtener levaduras maduras, es decir listas para utilizar, podría variar entre tres horas y media a seis, siempre que se hayan ajustado los pH adecuados previamente, los cuales podrían variar entre 3,8 y 4,6 para este tipo de levaduras (Agriflex, 2015).

2.5 Análisis estadístico

Una de la herramientas para dar validez estadística a mediciones eventuales de biomasa, es la varianza y desviación estándar como base para la determinación del Anova, el cual es el análisis de la varianza de los datos, lo que permite contrastar una hipótesis nula (H_o) de que las medias de “K” poblaciones (K >2) son iguales, frente a la hipótesis alternativa (H_a) de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado. Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales, en los que interesa comparar los resultados de “K”, ya sean tratamientos o factores con respecto a la variable dependiente o de interés (Universidad de Barcelona, 2016).

Respecto a lo anterior, definido en el 2016 por este mismo autor, las hipótesis deben presentar estas características:

H_o: Las medias de los tratamientos son iguales.

H_a: Al menos dos medias son diferentes.

Para que esto sea posible, se debe partir de los siguientes tres supuestos:

a. La población de donde se toma la muestra presenta una distribución normal.
b. El total de las muestras sobre las que se realiza el análisis son independientes.
c. Todas las poblaciones tienen igual varianza (homoscedasticidad).

Según el autor anterior y Rodríguez (2016), para que el método Anova brinde resultados confiables, se parte del supuesto que si el último resultado (*p value*) es menor a 0,05, se acepta la hipótesis alternativa ($H_{a)}$.

Otra herramienta estadística confiable para este tipo de estudios es la regresión lineal, que consiste en identificar la relación lineal existente entre los datos para poder obtener una ecuación lineal entre estos y sus variables, para así poder hacer cualquier ajuste en las variables y saber el resultado en el tiempo. Para el análisis de estos datos mediante la regresión lineal, el programa estadístico “R comander” es el recomendado (Rodríguez J. , 2016).

Una vez obtenida la ecuación lineal, es importante determinar e interpretar el coeficiente de correlación lineal, que puede estar entre -1 y 1. Cuando es igual a 1 representaría una relación lineal perfecta positiva entre las variables analizadas, es decir que todos los puntos se encuentran sobre una línea recta, por lo que al aumentar “x”, también “y”. Si este resultado se acerca a cero hace que la relación entre las variables disminuya, mientras que al ser igual a cero, hace nula dicha relación (Gómez, 2012, pág. 598).

2.6 Elaboración del pan con levadura

Una vez lograda la reproducción de levadura descrita anteriormente, se prosigue con su uso en la fermentación del pan, donde ocurren seis eventos bioquímicos, siendo la levadura el principal actor junto con las enzimas; los cuales se mencionan a continuación:

a. La inversión de la sacarosa. La levadura posee una enzima, llamada invertasa, capaz de desdoblar la sacarosa agregada a la harina, en glucosa y fructosa.

b. La conversión de almidón en dextrinas y maltosa. La harina de trigo tiene dentro de sus componentes enzimas que hidrolizan el almidón en polisacáridos más pequeños, como las dextrinas y la maltosa. Las enzimas que se encargan de este proceso se conocen como α-amilasa y β-amilasa.

c. La conversión de la maltosa en glucosa. La levadura tiene otra enzima, la maltasa, que es capaz de hidrolizar la maltosa en dos unidades de glucosa.

d. La utilización de glucosa y fructosa. La levadura también posee un complejo enzimático llamado zimasa, que es el encargado de convertir la glucosa y la fructosa, producidas a partir de la inversión de la sacarosa agregada y de la hidrolisis del almidón en etanol y dióxido de carbono.

e. La modificación de la estructura de las proteínas del gluten. Las proteínas del gluten se modifican por acción de las enzimas llamadas proteasas; gracias a ello, se pueden formar las complejas redes capaces de retener el gas producido.

f. La producción de ácidos orgánicos. Durante la fermentación del pan se producen por vías diferentes de la glucolisis, pequeñas cantidades de algunos ácidos orgánicos, como el láctico, el butírico, el acético y el succínico. Esto hace que le pH se mantenga en su valor original, la fermentación seguiría otras rutas bioquímicas y produciría glicerina y ácido acético en cantidades excesivas, además el etanol y el dióxido de carbono (Hernandez A. , 2003, págs. 183-184).

El producto final tras el uso de la levadura sería el pan, dicha palabra proviene del latín *panis* y significa masa horneada, hecha con harina y agua que se fermenta por la levadura y se cocina (Deconceptos, 2014).

Para poder asignarle a un producto el nombre de pan, es necesario que contenga levadura, las cuales pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*

y derivan históricamente de cepas de levadura utilizadas en la industria cervecera, de hecho hasta el siglo XIX las levaduras de panadería se obtenían directamente de la fábrica de cerveza más cercana (Ferrer, 2009).

Conforme se fue avanzando en este arte, se vio la necesidad de contar con otros mecanismos leudantes, entre 1830 y 1850 los comúnmente conocidos polvos de hornear fueron los protagonistas en el mercado, siendo los sustitutos de la “perlasa”, que era un tipo de potasa refinada. Esta perlasa, fue a su vez la antecesora del uso de bicarbonato de sodio para esponjar la masa (Maglione, 2009).

La harina de trigo es importante en el pan dado que contiene un conjunto de proteínas conocidas como el gluten (90% de proteína, 8% de lípidos y 2% de carbohidratos) que la facultan para producir masas viscoelásticas. El gluten es la glucoproteína elástica amorfa que se compone de prolamina o gliadinas (disolvente y encargadas de la vizcocidad) y gluteninas (asociadas con la elasticidad de la masa), encontradas en la semilla del trigo y representan el 80% de las proteínas. Estas características permiten atrapar el CO_2 producido durante la fermentación, favoreciendo el incremento del volumen en el pan. (Alpízar, 2010, pág. 29).

Dada la producción masiva para la fabricación de pan, la producción comercial de levadura prensada se vio en aumento simultáneamente. Ferrer en 2009 indicó que una panificadora grande y moderna puede utilizar muchos cientos de kilogramos de levadura diariamente, ya que aproximadamente se utilizan unos 2 kg de levadura para esponjar unos 130 kg de harina. Gran parte de la levadura de panadería que se fabrica actualmente se seca bajo condiciones controladas que mantienen la viabilidad de sus células, tratamiento que facilita su transporte y almacenamiento. Gracias a las levaduras se producen otros cambios más sutiles en las propiedades físicas y químicas de la masa que afectan a la textura y al sabor del pan; permite cambiar o manipular ciertas cualidades organolépticas (Víquez, 2014).

III. MARCO METODOLÓGICO

Este apartado describe los elementos utilizados en el desarrollo del proyecto, donde se muestran los pasos para llevar a cabo el cumplimiento de los objetivos planteados. Se detallan las particularidades presentadas en cada eslabón, al partir de la caracterización de la levadura patrón y la elaboración del pan con esta. Esto, para tener un punto de comparación en cuanto a sólidos, principalmente para la levadura propagada. Esta sería analizada en el tiempo que varía la concentración de melaza, para finalmente elaborar pan; de la misma, manera el elaborado con la levadura patrón, contrasta sus circunferencias.

3.1 Localización

El proyecto de graduación se realizó en la planta docente de Tecnología de Alimentos de la UTN Sede Atenas, Alajuela, Costa Rica. En este lugar se desarrollaron las pruebas de crecimiento y funcionales de la levadura patrón, así como la confección del pan.

3.2 Materiales y equipos

Se utilizaron todos los materiales y equipos que se emplean en la institución para el desarrollo de sus operaciones requeridas, los cuales se muestran en la tabla 1 y 2.

3.2.1 Materiales

La siguiente tabla describe de manera general los principales atributos de las materias primas necesarias para llevar a cabo el proyecto.

Tabla 1. Materiales empleados en el proyecto

Materiales	Descripción / Características
Levadura en pasta (anexo 1)	La cepa utilizada para producir la levadura fresca es la *Saccharomyces cerevisiae*. Es importada desde Guatemala por Levaduras Universal, S.A.
Melaza líquida (anexo 2)	Apariencia: Líquido, viscoso color negro-café. Olor: Característico a dulce de caña. Sabor: Dulce característico. pH: 4.0-4.5 Grados Brix: 60-65
Harina fuerte (anexo 3)	Aspecto: Polvo fino, libre de insectos Color: Blanco a cremoso Olor y sabor: característico. Sin olores ni sabores extraños Absorción: 58% Mín. Humedad: 14.4% Máx. Estabilidad: 7% Min. Proteína: 12.3% Mín. Ceniza: 0.68% Máx.
Agua de Acueductos y Alcantarillados.	Sería el medio de disolución para realizar esta mezcla que es el cultivo para las levaduras. Esta no debe presentar dureza o metales pesados, o bien exceso de cloro que pudiera afectar la reproducción de las levaduras. Igualmente debe cumplir con la potabilidad que exige la legislación.
Reactivos de calibración de pH-metro	Solución buffer 4,01± 0,01 pH a 25° C/ 77° F Solución buffer 7,01± 0,01 pH a 25° C/ 77° F Agua destilada Cloruro de potasio KCl

Fuente: Pinova, 2015 y UTN, 2015.

3.2.2 Equipos

En la tabla 2 se resumen las principales características del equipo básico para llevar a cabo las pruebas necesarias del proyecto; indican el nombre y modelo, así como una descripción puntual de lo más relevante.

Tabla 2. Equipos empleados en el proyecto

Equipo	Modelo	Descripción
Balanza de precisión (anexo 4)	Veritas modelo ES422	Variación de 0,01 g, plato de acero inoxidable, frente del visor sellado y canal de seguridad para derrames, indicadores de estabilidad y error. Calibración externa digital. Capacidad 420 g.
Fermentador portátil (anexo 5)	Salva Modelo: AR 22	Ajustable a la operación, tanto la temperatura como Humedad, carcasa de inoxidable, puerta de vidrio. Se puede utilizar como: Cámara de fermentación y conservación controlada. Rango de temperatura de trabajo entre -2ºC y 40ºC.
Horno de convección eléctrico (anexo 6)	Salva	Capacidad de 9 latas 60x40 cm. Programable. Horno de convección para cocción por aire forzado. Rápido alcance de la temperatura de cocción. Salida de vapores orientable. Con productor de vapor por inyección de agua directamente a la turbina.
pH–metro (anexo 7)	Hanna 2213	Rango: 0-14 pH. Incertidumbre: ± 0,01 pH y temperatura de 20°C (68°F) con incertidumbre máxima de 0,4°C. Puede ajustarse con la temperatura al momento medición.
Termómetro espiga (anexo 8)	Delta Trak 11050	Digital de espiga, Mide en °C y °F. Se calibra a 0°C (32°C). Rango: -40°F a 311°F. Registra máximos y mínimos medidos. Certificado NSF. Resistente al agua. Código FDA: 4-302.12 (B)
Centrífuga (anexo 9)	Gallenkamp Junior	Capacidad para 4 tubos de 60 mL. Cinco velocidades.
Vernier Stainless	Rango 100mm	De acero inoxidable, rectificado. Graduación microfina negra sobre acabado en cromo satinado para lectura fácil. Escala 1/20mm
Cinta métrica	Rango 1 metro	Flexible, se puede arrollar. Hecha de plástico, con números grabados en la superficie.
Tubo de centrífuga (anexo 10)	Cónico pd1002	Capacidad de 50 mL. Con tapa. Graduados, con fondo cónico transparente. Fabricado en Polipropileno, incluye tapón azul estriado de PP, cierre hermético hasta 6000 RPM. Se puede esterilizar en Autoclave 121°C. Pantalla blanca para escritura. Color transparente

Fuente: UTN, 2016.

3.3 Procedimiento

3.3.1 Descripción de la levadura que se desea reproducir (levadura patrón)

Para iniciar el análisis de la principal materia prima en estudio de este proyecto se estudiaron las características de su ficha técnica (ver anexo 1), así como particularidades, respecto a su origen, condiciones de almacenamiento, transporte y mantenimiento para su uso ya hidratada a nivel industrial.

Se obtuvieron varias muestras de los tanques de hidratación de la empresa, a las cuales se les determinaron los sólidos totales para conocer las condiciones necesarias por buscar (ver anexo 11 y aplicar los pasos de la tabla 3); además, se midió su pH (ver anexo 12) y se aplicaron los pasos descritos en la tabla 4).

Respecto al tanque de hidratación mencionado, se adicionó agua a la levadura en pasta, la cual se mantuvo en agitación constante por cierto tiempo determinado, bajo temperaturas de refrigeración. Esta es la materia prima empleada como tal en la elaboración del melcochón comercial. Para fines de este proyecto es la mencionada: levadura patrón.

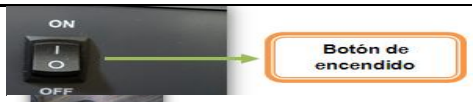
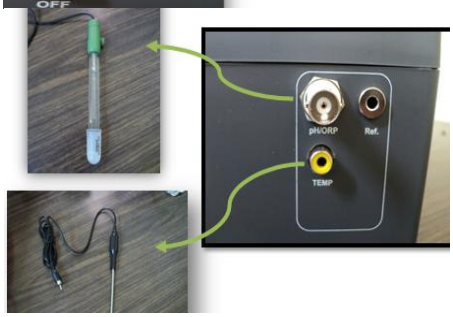
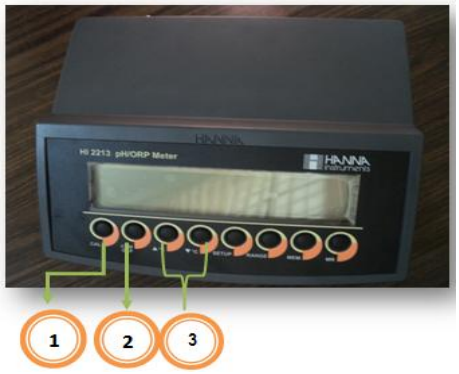
Por cada vez que se realizó una hidratación de levadura de diferente lote se tomó una muestra hasta completar 5 mediciones; a cada una de estas muestras se les realizaron análisis de sólidos totales y pH mediante los procedimientos denotados en las tablas 3 y 4 (esto se utilizó tanto para las evaluaciones de la levadura patrón como para el medio de cultivo desarrollado):

Tabla 3. Procedimiento de determinación de sólidos totales en levadura

Paso	Descripción		
1	Pesaje de tubo 1	Se pesa en la balanza el tubo vacío para centrífuga de 50 mL con su respectiva tapa.	
2	Mezclar	Antes de que la muestra sea tomada la levadura contenida en el tanque de almacenamiento de levadura se debe agitar vigorosamente, lo que permite obtener una muestra representativa.	
3	Toma de muestra	Se vierte el medio de cultivo de levadura hasta la marca de 30 mL en el tubo y se tapa.	
4	Pesaje de tubo 2	Se pesa nuevamente el tubo con la tapa y el contenido del medio de cultivo.	
5	Centrifugado	Se colocan los tubos con el medio de cultivo en la centrífuga, de forma opuesta para garantizar equilibrio y correcto centrifugado. Se ajusta el equipo en velocidad3 durante 5 minutos.	
6	Decantación	Se vierte el líquido sobrenatante de cada tubo.	
7	Pesado 3	Se pesa cada tubo con los sódidos obtenidos.	
8	Cálculo	Se consolidan los datos obtenidos en los pasos anteriores y se realiza la fórmula 1 para obtener el porcentaje de sólidos totales.	

Fuente: Florida Ice & Farm, 2014.

Tabla 4. Procedimiento de uso del pH-metro Hanna 2213

Paso	Descripción	
1	Conecte el enchufe el cable de alimentación de corriente en el aparato y luego al enchufle.	
2	Verifique el estado del pHmetro y su electrodo.	
3	Cerciórese de que el pHmetro este limpio, de lo contrario: saque el electrodo, enjuáguelo con agua destilada y séquelo suavemente con una servilleta de papel.	
4	Conecte todos los accesorios del pHmetro en los sitios correspodientes (1:electrodo 2:sonda de temperatura).	
5	Encienda el equipo en el botón negro ubicado en la parte trasera en la esquina inferior izquierda del equipo.	
6	Calibre el pH con las soluciones buffer disponibles: presione la tecla CAL (1) y elija por medio de los botones con flechas (3) la solución buffer con la que realizará la calibración, sumerja el electrodo, (previamente enjuagado con agua destilada y secado con papel toalla), y presione la tecla de confirmación (2) en cuanto la lectura se haya estabilizado, enjuague el electrodo con agua destilada y seque con toalla de papel, repita los pasos con las otras soluciones.	
7	Una vez calibrado el pHmetro, realice la medicion de las muestras, sumerja el electrodo de tal forma que logre el mayor contacto sin dañar la membrana o rozar las paredes del recipiente.	
8	Evite en todo momento golpear o tocar la membrana del electrodo directamente y agite suavemente la muestra durante la medición, espere a que se estabilice.	
9	Anote el dato de pH y temperatura.	
10	Retire el electrodo de la solución muestra y repita el paso 3.	
11	Repita el paso 6 para asegurar su resultado o continúe con la siguiente muestra.	
12	Al finalizar, apague el equipo.	
13	Realice la limpieza del electrodo descrita en el paso 3 y guárdelo en la solucion de KCl 3M.	
14	Nunca deje el electrodo expuesto al aire o al agua de forma indefinida, siempre debe guardarse en la solución de KCL 3M para evitar daños en la membrana.	

Fuente: UTN, 2016.

3.3.2 Procedimiento elaboración del pan con la levadura patrón

Como parte de la caracterización de la levadura se elaboró el melcochón con la fórmula descrita en la tabla 5, de la cual se realizaron 5 unidades de 300 g cada una.

Tabla 5. Formulación empleada en la elaboración de pan

Ingredientes	Cantidad (g)
Harina fuerte	1000
Agua	550
Levadura	70
Manteca	30
Sal	20
Azúcar	20
Mejorante	10

Fuente: propia, 2016.

El mezclado inicia con la adición de los ingredientes secos al tazón, luego el agua y la manteca. Se enciende la mezcladora, a una velocidad de “1” por un minuto, esto para que se dé la hidratación de los ingredientes secos. Una vez finalizado este tiempo, se pasa a velocidad “2” por un tiempo de 4 minutos. En esta segunda etapa de mezclado, se promueve la formación del gluten y la obtención de las características viscoelásticas de la masa.

Al pasar este tiempo, se saca la masa y se divide en pedazos de 300g, se bolea y se deja reposar por 10 minutos, luego se forma, se deja reposar por 5 minutos y por último se le da el largo deseado. Se coloca en las bandejas acanaladas para su posterior fermentación.

El tiempo de fermentación así como de horneo se mantuvieron constantes, de 2 horas y 27 minutos respectivamente. Además la temperatura de fermentación fue de 35°C con una humedad relativa de 80% y la temperatura de horneo inicial fue de 185°C, con 6 segundos de vapor y posteriormente de 165°C.

Una vez elaborado el producto de interés se procedió a medir sus principales características físicas, las cuales consisten en: circunferencia, largo y alto; la circunferencia y altura, son las características que van a determinar el volumen del pan que se quiere igualar con la levadura propagada.

Para medir el largo y la circunferencia, se usó una cinta métrica flexible, mientras que para medir la altura, se utilizó un vernier.

En la medición de la altura, se buscó el punto que a la vista fuera el más alto en el pan y se procedió a efectuar la medición con el vernier.

En la medición del largo de los melcochones, se dio la vuelta al pan y la parte que estaba expuesta a la bandeja que lo contiene, quedó para arriba. Se mide de extremo a extremo, para evitar la interferencia de la curvatura del melcochón, la cual afectaría la medición del largo.

Para determinar la circunferencia, se procedió a pasar la cinta métrica por la parte del pan que a la vista es más alta (la misma de la altura) y se tomó como resultado lo indicado en el instrumento de medición.

3.3.3 Propagación de la levadura

Partiendo de lo indagado en pruebas preliminares y resumido en los apéndices, se realizaron ensayos durante varios meses para conocer las mejores condiciones y desarrollar un medio más sostenible para la levadura y por ende su propagación, mediante el diseño de una fórmula que así lo permitiera.

Una vez definida la fórmula, la variable por considerar dentro de los ingredientes fue la concentración de melaza. Se crean mezclas con 5, 10, 15 y 20% de esta y se comparan sus sólidos cada hora, tras haber realizado el inóculo en las condiciones propicias y ponerlas a consumir dicho sustrato a temperatura controlada de 35°C y recurrente agitación manualmente; esto, para lograr incorporar oxígeno al medio y favorecer que las levaduras se faculten para propagarse y no se concentren en la fermentación de las fuentes de carbono que

se da básicamente por ausencia de O_2 en el medio y altas concentraciones de azúcar.

Logrando lo anterior se procedió determinar los materiales y equipo que permitieran ir midiendo en el tiempo, la variación de masa de la mezcla formulada en las condiciones establecidas. En dicho trascurso no se agregó más sustratos que sirvieran de alimento a la levadura.

Ya inoculada la levadura y adaptada al medio nutritivo, se realizaron las disoluciones de medio litro cada una, con la variación del porcentaje de melaza. Se procede a medir el incremento de células de levadura, conocido como biomasa; esto mediante el aumento de los sólidos de cada mezcla de 5, 10, 15 y 20% de melaza respectivamente, cada hora, hasta completar un total de siete.

Para llevar a cabo este proceso de separación de sólidos, fue necesario contar con una centrífuga y tubos de plástico de 50 mL con tapa. En cada uno de los tubos se adicionaron 30 mL de las diferentes fórmulas mencionadas y se procedió a colocarlos en la centrífuga descrita en la tabla 2, durante 5 minutos, graduada en velocidad 3.

Por medio de la diferencia de densidades (sólidos-líquido) y la fuerza centrífuga, se logró separar ambas fases entre sí. Una vez segregados, se decantó el líquido sobrenatante y quedan solamente sólidos, los cuales se pesaron. Luego se realizaron los cálculos correspondientes con la siguiente fórmula:

Fórmula 1. Cálculo del porcentaje de sólidos en formulación de levadura usando un método de centrifugación.

$$\% \text{ sólidos} = \frac{m3 - m1}{m2 - m1} \times 100$$

m1: masa en g del tubo vacío
m2: masa en g del tubo con la muestra de levadura
m3: masa en g del tubo luego de centrifugar y decantar el sobrenadante (1)

En la fórmula anterior se estimó el porcentaje de sólidos de cada muestra, al comparar las masas en gramos del tubo, el tubo y tapa con la muestra hasta 30

mL y la masa de los sólidos tras su centrifugación, sin el líquido sobrenatante, el cual se desechaba tras cada separación de sólidos. Esto se realizó con cada una de las muestras de las cuatro distintas concentraciones de melaza durante cada hora hasta completar las siete horas en total de estas pruebas.

3.3.4 Análisis estadístico

Para analizar los datos obtenidos en las mediciones indicadas en la propagación de la levadura, se usó la varianza y desviación estándar como base para la determinación del Anova, donde se establecieron dos hipótesis:

H_o: Las medias de los tratamientos son iguales.

H_a: Al menos dos medias son diferentes.

Permitiendo contrastar la H_o (hipótesis nula) de que las medias de “K” poblaciones, cuando “K” fue mayor que 2, fueran iguales. Esto frente a la H_a (hipótesis alternativa) de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado. Una vez obtenido lo anterior se procedió con el análisis de resultados experimentales y se comparan los resultados de “K” (tratamientos o factores) con respecto a la variable dependiente o de interés. Una vez analizados los datos con el Anova, la H_a se acepta solamente si el “*p value*” es menor a 0,05.

Si la H_a se resultara favorecida (diferentes medias entre sí), se podría escoger cualquiera para seguir el proceso de propagación; para ello se seleccionaría la muestra que presentara mayor crecimiento de sólidos.

Si por el contrario el resultado se inclinara a la $H_{o,}$ se interpretaría que todos los resultados serían iguales, por ende no habría distinción entre las diferentes mezclas a distinta concentración de melaza.

Una vez obtenidos estos resultados, se hace necesario determinar cuál es el tiempo al que se debe someter este medio ante las condiciones establecidas,

para que se obtengan los mismos resultados en cuanto a contenido de sólidos, mediante regresión lineal. Se identifica la relación lineal entre los datos para poder obtener una ecuación lineal entre ellos y sus variables. Para poder ajustar las variables y saber el resultado en el transcurso del tiempo futuro, que no se haya abarcado en las pruebas, se usa el programa estadístico “R comander” para el análisis de los resultados de esta sección, en la que intervinieron dos variables; al manipular una de ellas se logró la obtención de la otra (permite además obtener la correlación entre ambas). Estas variables para efectos del estudio fueron tiempo y sólidos.

3.3.5 Procedimiento elaboración del pan con la levadura propagada

Para finiquitar el desarrollo de las pruebas de crecimiento, se procedió a elaborar pan con la fórmula descrita en la tabla 5, de la cual se realizaron 5 unidades de 300 g cada una, por cada una de las concentraciones por analizar; la variable por considerar fue la variación de la concentración de melaza en la fórmula, tal como se viene describiendo en los pasos anteriores.

La fórmula utilizada corresponde a un tipo de pan baguette cuyas características se asemejan al pan melcochón de la industria panificadora. Por ello, los datos en cuanto a evaluación de lavadura con esta fórmula, podrían ser muy semejantes en los del melcochón, que por razones de confidencialidad no se puede mostrar.

Los pasos de la elaboración del pan son los mismos que se emplearon en la descripción del primer objetivo, en el apartado de elaboración de pan, al usar la levadura patrón, pero en este caso, con la levadura propagada. Lo que se busca con la elaboración del melcochón es determinar cuál de los medios expuestos a las diferentes concentraciones de melaza, propicia una mayor producción de levadura y por ende de CO_2. Una vez desarrollado el pan, se procedió a su medición en tres características: largo, alto y circunferencia.

IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En cuanto a esta sección se presentan los resultados obtenidos tras realizar los pasos expuestos en el capítulo tercero. Responde a la resolución de los objetivos y aplica lo desplegado en la teoría sustentada, para desglosar el análisis de los datos obtenidos. La respuesta del proyecto planteado, específicamente de cada uno de los objetivos sobre el cual gira este trabajo, se muestra en este capítulo.

4.1 Caracterización de la levadura patrón

La levadura que se utiliza en la planta de producción proviene de Guatemala. El producto es obtenido a partir de células de *Saccharomyces cerevisiae* de una cepa específica; estas son propagadas en condiciones controladas de laboratorio, donde luego son expuestas a nutrientes y condiciones propicias para el crecimiento. Una vez que la levadura está lista, se pasa a un sistema de prensado que da como resultado la levadura fresca en pasta, que se utiliza para el proceso de fermentación de pan en la compañía de panificación; esta tiene un pH de 4 a 6. La levadura llega a la empresa en cajas de 25 Kg (granel), viene en la presentación de “pasta” la cual consiste en una masa quebradiza con color y olor característico a levadura, se almacena en un cuarto con una temperatura de 2-5 °C por un periodo no mayor a 24 horas.

La vida útil de este producto es de 30 días a partir de su fabricación, además debe ingresar a la compañía con el 50 % de su vida útil como mínimo y no se aceptan más de dos lotes diferentes por entrega. Es de suma importancia cuidar y asegurar la cadena de frío tanto en el transporte desde Guatemala hasta el almacenamiento y dosificación en la empresa.

La siguiente tabla resume los resultados obtenidos en las caracterizaciones expuestas en los anexos 11, 12 y 13, en los que se contemplaron los sólidos, pH

y circunferencia del pan obtenido de la levadura patrón en diferentes muestras enunciadas en dichos anexos.

Tabla 6. Resumen de caracterización de levadura patrón

Sólidos (%)	pH	Circunferencia del pan (cm)
69,11	5,24	25,50
67,45	4,65	25,50
70,93	5,15	23,50
69,18	5,08	25,00

Fuente: propia, 2016

Debido al sistema de distribución y aplicación de la levadura en la compañía mencionada, es necesario que sufra de un cambio físico, para que pueda ser transportada por medio de tuberías y bombeo hasta las diferentes mezcladoras, en donde se lleva a cabo el proceso de combinación de ingredientes y desarrollo de la masa. Por esta razón, se produce una hidratación en proporciones determinadas de levadura y agua. Una vez que la levadura ha sido hidratada, el pH baja y queda aproximadamente en 5 como lo denota la tabla anterior en su parte central (ver anexo 12).

Esta hidratación se ejecuta en tanques de acero inoxidable, dotados de aspas capaces de agitar constantemente los ingredientes citados, hasta que se logra una mezcla completamente homogénea, la cual está lista para ser utilizada en el proceso. Esta levadura hidratada se mantiene a una temperatura de 2-5°C por el tiempo necesario hasta que sea consumida por completo según el proceso de producción.

Se define que la característica de mayor importancia de la levadura patrón, es la cantidad de sólidos que presenta. Ya que estos van a ser la propiedad por igualar con la experimentación que se desarrolló, mostrado en la primera columna de la tabla 6 (ver anexo 11).

Por medio de estos datos se determinó que los sólidos presentes en la levadura que utiliza la empresa, en la actualidad rondan 67-71 %. Esta cantidad

de sólidos que se interpreta como células de levadura, logran la fermentación de productos crudos-congelados, prehorneados-congelados y terminados congelados. Esta cantidad de levadura es capaz de producir una fermentación estable, incluso seis meses después de la elaboración de la masa y la mantiene en congelación.

Otro de los atributos caracterizados de la levadura en pasta utilizada, es su capacidad de producir una buena fermentación. La cual se entiende como la factibilidad a producir CO_2 suficiente para lograr un crecimiento en el pan en el tiempo esperado. Este cual depende de las condiciones atmosféricas en el momento del proceso así como, las condiciones de los equipos de fermentación en los diferentes puntos de venta. Sin embargo, la fermentación se debe realizar en un tiempo entre 2 y 2,5 horas con una temperatura de fermentación de 35°C y humedad relativa del 80%.

Al elaborar melcochón con esta levadura hidratada con 69% de sólidos, se obtuvo un pan con ciertas características de altura y circunferencia deseadas y buscadas con el desarrollo de levadura que se propuso.

En la ilustración a continuación se aprecia una porción del pan obtenido con la levadura patrón. Este pan se llevó acabo utilizando la fórmula base, en la cual se agregó 70g de levadura líquida, la cual según la cantidad de sólidos que aporta tiene 48,3 g de levadura; se consideran como sólidos totales las células de levadura.

Ilustración 2. Porción de corte transversal del pan obtenido con la levadura patrón

Fuente: propia, 2016.

Utilizando la levadura patrón para la elaboración del pan, dio como resultado un mayor volumen respecto al pan elaborado con la levadura propagada (esto se discute más adelante). Así como características de miga particulares, las cuales al ser más abiertas, presentaban alveolos más grandes, producto de una producción de CO_2 con mayor vigorosidad. Esta se logró al existir más células de levadura actuando y metabolizando los azúcares presentes en la masa para convertirlos en los subproductos de la fermentación anaerobia. Los datos tabulados en el anexo 13, identifican y puntualizan por medio de la circunferencia, el volumen del pan desarrollado con la levadura patrón.

Comparando la circunferencia obtenida en el laboratorio, con la conseguida en los panes que se producen actualmente en la empresa, hubo una diferencia promedio de 0,9 cm. El melcochón elaborado en el laboratorio, es un modelo muy cercano a lo que se produce y comercializa en la actualidad. Por esta razón, se considera aceptable la medición obtenida en el pan elaborado en el laboratorio, el cual por razones de confidencialidad se elaboró bajo una fórmula diferente a la que se utiliza en empresa panificadora.

4.2 Propagación de la levadura

Como resultado de la ejecución de las pruebas de laboratorio, las cuales se llevaron a cabo utilizando cuatro fórmulas a las que solamente se les varió la

cantidad de melaza, se obtuvieron los datos de la siguiente tabla, cuyo análisis determinó la existencia del crecimiento de la levadura en los medios antes descritos.

Tabla 7. Variación de sólidos (g) en el tiempo con mezclas a distinto % melaza

Tiempo	5% melaza	10% melaza	15% melaza	20% melaza
Hora 0	35,57	38,59	40,69	39,57
Hora 1	34,55	39,48	37,45	39,74
Hora 2	35,24	39,23	39,40	38,37
Hora 3	38,68	38,96	38,90	38,44
Hora 4	39,97	39,18	38,78	39,09
Hora 5	39,93	39,84	39,13	39,12
Hora 6	40,71	38,80	39,18	39,15
Promedio	37,81	39,15	39,08	39,07
Desviación estándar	2,60	0,42	0,96	0,52
Varianza	6,75	0,18	0,91	0,27
Variación de sólidos	14%	1%	-4%	-1%

Fuente: propia, 2016.

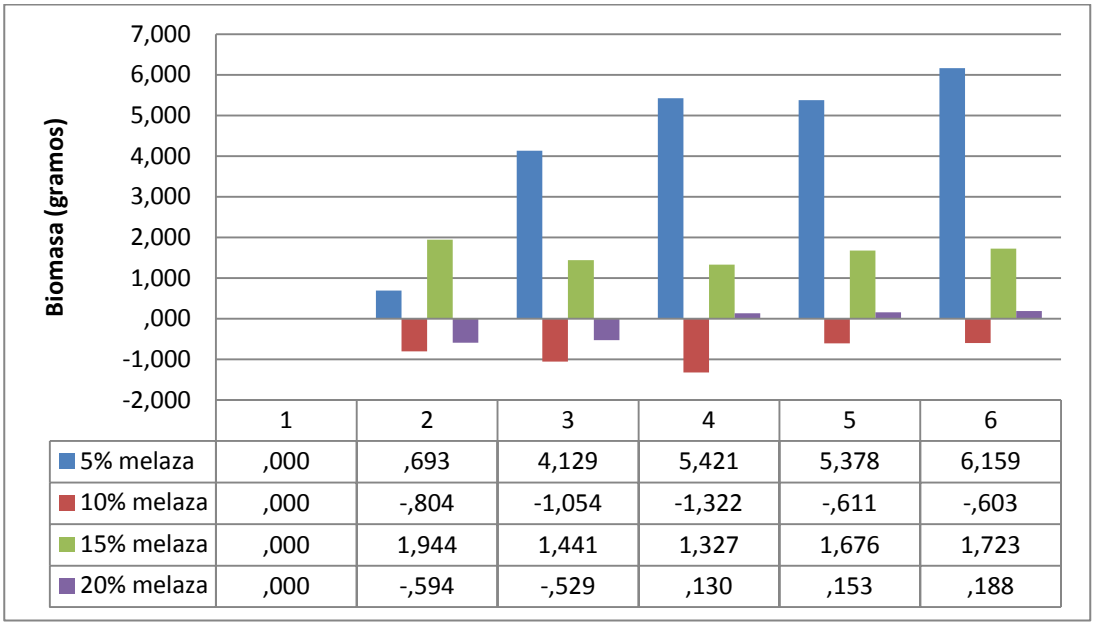
En la tabla 7 se muestra el promedio, la desviación estándar y la varianza de las mediciones de los sólidos (considerado biomasa en este caso) a partir de mezclas a diferentes concentraciones de melaza en el trascurso del tiempo. Dichos cálculos fueron necesarios para llevar a cabo el desarrollo del método estadístico Anova, el cual permitió identificar la relación entre las pruebas con distintas concentraciones de melaza.

Al utilizar el Anova, el resultado del *p value* fue de 0,008, lo cual es menor a 0,05, que como se indicó anteriormente es el límite para decir que todos los *p value* menores a este número aceptan la hipótesis alternativa (H_a), es decir, al menos dos medias son diferentes.

La levadura que se desarrolló con 5% de melaza tuvo un crecimiento de sólidos del 14%, por ende fue la escogida como la mejor opción para el desarrollo de levadura.

Se define la presencia de sólidos como una de las variables más importantes para estimar la propagación de las células de levadura. Se considera la biomasa como el incremento de estas células, a partir de distintas concentraciones de melaza en cuatro pruebas. En los gráficos 1 y 2 se aprecian las tendencias de la propagación al complementar lo obtenido con el método Anova.

Gráfico 1. Variación de la Biomasa (en gramos) en el tiempo a diferentes concentraciones de melaza



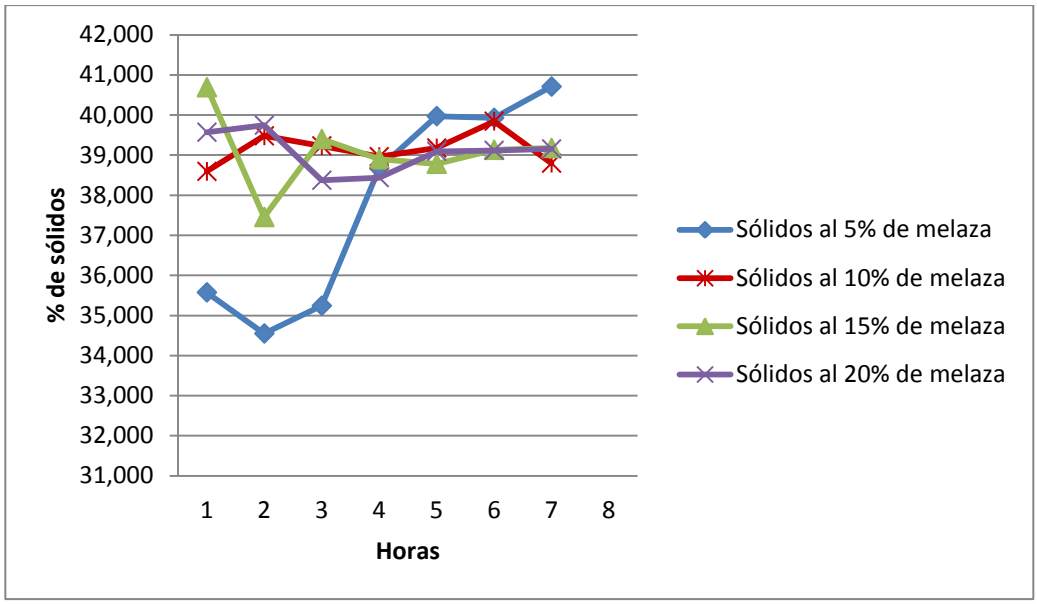
	1	2	3	4	5	6
5% melaza	,000	,693	4,129	5,421	5,378	6,159
10% melaza	,000	-,804	-1,054	-1,322	-,611	-,603
15% melaza	,000	1,944	1,441	1,327	1,676	1,723
20% melaza	,000	-,594	-,529	,130	,153	,188

Fuente: propia, 2016.

El resultado obtenido con la formulación con menor cantidad de melaza (5%) pudo garantizar rendimiento adecuado de las levaduras propagadas, puesto que hubo ganancia de biomasa en una relación sobresaliente en las mediciones en tubos de 30 mL al cabo de 7 horas, donde existió un incremento de biomasa de 6,16 g en 30 mL tras el centrifugado realizado cada hora. En proporciones mayores, pero equivalentes, serían aproximadamente 205 g de biomasa en 1 L. Esto representa el mejor resultado de incremento de biomasa respecto a las demás mezclas con mayores porcentajes de este derivado de la caña de azúcar; es sustentado por Hernandez en el 2003 (pág. 26).

Analizando el comportamiento mencionado en el tiempo, el porcentaje de sólidos también presentó un incremento constante en la composición con menor porcentaje de melaza, como lo muestra el siguiente gráfico:

Gráfico 2. Porcentaje de sólidos a diferentes concentraciones de melaza



Fuente: propia, 2016.

En el gráfico anterior se resumen los datos obtenidos en las pruebas, donde se puede observar que al mantener la fórmula constante, variando únicamente la concentración de melaza en cuatro disoluciones por separado, el incremento en biomasa se obtuvo en la fórmula con menor concentración de melaza (5%). Las muestras con mayor contenido de melaza presentaron menor incremento de biomasa, por la presión osmótica que el ingrediente variable ejerció sobre las células de levadura; esto provoca su muerte o inactivación.

En las dos primeras horas de pruebas se presentó una variación en la cantidad de sólidos, ya que al inicio la levadura tiene mucha disponibilidad de alimento. Se da una producción elevada de CO_2 y provoca la producción de espuma en la etapa de adaptación. La presencia de dicha espuma hace más

inexactas las mediciones de sólidos, ya que aumenta la cantidad de aire en la muestra y da datos con alta variabilidad.

Como se ha podido ver, la prueba con 5% de melaza es la que dio mejor resultado en la propagación de levadura, aun así, el tiempo que se dejó el medio en crecimiento, no fue el suficiente para lograr tener una concentración de sólidos igual a la de la levadura patrón (67-71%). Esto se puede relacionar tanto en los datos de circunferencia del pan elaborado con la levadura del medio al 5% y el que se elaboró con la levadura líquida obtenida directamente de la empresa, así como por medio de las ilustraciones de las rebanadas de pan.

Mediante una relación lineal se evaluaron los datos de la prueba al 5% de melaza. Por medio del programa “R comander” se analizaron los datos de la prueba al 5% de levadura. Los sólidos y el tiempo, son las variables contempladas y se obtiene una ecuación lineal de la siguiente forma:

Fórmula 2. Ecuación lineal del "R comander"

$$S = 1.11\,T + 33.64 \tag{2}$$

Donde S = Sólidos totales y T = tiempo

Según los datos de la caracterización de la levadura patrón, esta tiene entre 67-71% de sólidos totales. Esto se convierte en los sólidos por obtener por medio de la propagación y se establece un promedio de los datos (dentro de ese rango), de 69 %, el cual se sustituye por *S* en la ecuación anterior.

$$69 = 1.11\,T + 33.64$$

$$69 - 33.64 = 1.11\,T$$

$$T = \frac{69 - 33.64}{1.11}$$

$$T = 31.85$$

Al sustituir los sólidos deseados en la ecuación anterior, se logró obtener el tiempo que requiere el medio de cultivo con 5% de melaza en las condiciones

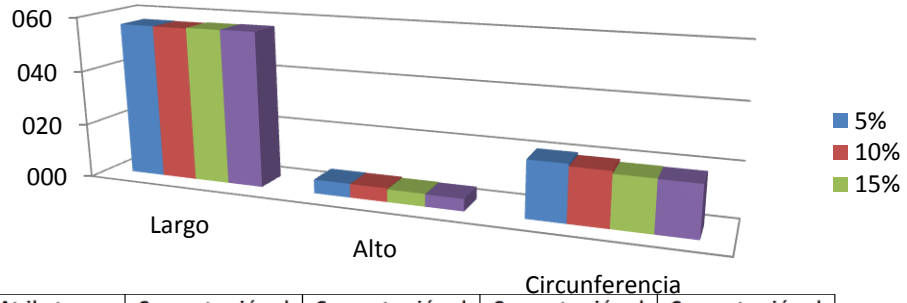
antes mencionadas, siendo de 31,85 horas. La correlación de estas variables (sólidos y tiempo) fue de 0,76, donde al estar más cercano a uno, entre ambas existe un alto grado de correlación.

Se considera que este es un tiempo aceptable, ya que permitiría reproducir un tanque de levadura cada 1,32 días. Considerando que la empresa trabaja seis días por semana y por tiempo, se tendría la capacidad de producir 4,5 tanques de levadura; esto es significativo para la empresa.

4.3 Elaboración del pan con la levadura propagada

Basados en la formulación de la tabla 5, se siguió el procedimiento descrito en la metodología del objetivo 1. En el gráfico 3 se comparan las mediciones obtenidas usando las diferentes concentraciones de melaza en la elaboración de pan y se muestran las tendencias de las características medibles de largo, alto y circunferencia.

Gráfico 3. Comparación de panes elaborados con levadura expuesta a diferentes concentraciones de melaza



Atributo	Concentración al 5%	Concentración al 10%	Concentración al 15%	Concentración al 20%
Largo	56,63	56,5	56,74	56,86
Altura	5,10	5,02	4,64	4,46
Circunferencia	20,50	19,6	18,62	18,46

Fuente: propia, 2016.

En el atributo de largo, se determinó que este va de 56,50 a 56,86 cm, en donde se pudo distinguir una diferencia de 0,36 cm; esto indica que el contraste en largo no es significativo. Esta variación depende del momento de formación

del melcochón y no se le puede o debe atribuir esta diferencia en longitud a un efecto de la levadura.

En el caso de altura, se observó que va de 4,46 a 5,10 cm, siendo la medición menor la que representó el medio con una concentración de melaza mayor (20%), lo cual tiene una relación directa con la levadura contenida en ese medio. Al estar la levadura expuesta a una mayor concentración de melaza, sufrió un proceso de estrés que le minimizó su reproducción, al existir menor cantidad de levadura en el medio, mientras al ser adicionada a los demás ingredientes para elaborar el pan, se obtuvo como resultado menor generación de CO_2, lo cual interviene en el volumen del pan, propiciando los resultados de menor altura y volumen.

La altura mostró una tendencia constante de decrecimiento, ya que el medio que se expuso a una concentración de 5% de melaza presentó la mayor altura. Hace suponer que en ese medio existe mayor cantidad de levadura, debido a que en esa concentración la melaza actuó como una fuente de alimento para la levadura y esta direccionó su metabolismo hacia la producción de biomasa; con esto aumentó la cantidad de levadura en el medio. Al adicionar este medio, con mayor concentración de levadura a los demás ingredientes formadores de pan, se logró generar mayor cantidad de CO_2. Dadas estas condiciones se puede decir que conforme la concentración de melaza en el medio aumentó, la altura del pan disminuyó; esto es un efecto inversamente proporcional.

La circunferencia tiene un comportamiento similar a la altura. En el gráfico 3 se puede observar cómo las dimensiones del diámetro de los melcochones, disminuyó constantemente conforme la concentración de melaza en el medio fuese mayor. Este efecto se da por la mayor cantidad de CO_2, cuya mayor concentración y efecto se explicó en el atributo de la altura.

En la siguiente ilustración se presenta evidencia de lo mencionado previamente, respecto a los atributos considerados en la elaboración del pan a distintas concentraciones de melaza, basados en la fórmula de la tabla 5.

Ilustración 3. Comparación de los atributos de melcochones variando la concentración de melaza en su fórmula

Fuente: propia, 2016.

Según el gráfico 3 los datos no presentan variaciones muy marcadas, pero en la imagen anterior se puede observar que el pan elaborado con el medio expuesto a una concentración de melaza del 20%, es más pequeño, se percibe plano y con una diferencia en circunferencia respecto al que se hizo con el medio de 5% de melaza. En el caso del medio expuesto a 15% de melaza, es similar al de 20% y el de 10% más similar al de 5%. No obstante, se aprecia una tendencia marcada respecto a estas valoraciones a distintas concentraciones de melaza.

Esta disminución visual gradual en la circunferencia, se debe a que, conforme aumentó la concentración de melaza en el medio, se generó menos cantidad de CO_2 en la fermentación. Por ello, una vez más se ve el efecto de la no producción de levadura a concentraciones altas de melaza, y se puede decir que el mejor resultado en cuanto a producción de levadura, es el que se hizo a menor concentración de melaza.

Se pudo observar una miga cerrada, con alveolos uniformes, lo cual permite interpretarse como un pan compacto, el cual tiene la capacidad de poder generar mayor volumen en caso de que se obtuviera una mayor generación de CO_2.

Cabe destacar que la cantidad de levadura que se agregó no es la misma del patrón, debido a que se adicionó un medio con una concentración de 34% de levadura, (20% inicial más 14% de la levadura propagada), lo cual corresponde a 23,8 g, En la prueba del melcochón patrón, se usó la levadura utilizada en la empresa en la que se tiene una concentración de sólidos 2,03 veces mayor, los cuales corresponden exclusivamente a levadura.

Esta cantidad de levadura que tiene de más la levadura patrón, dio como resultado un pan de mayor volumen, cuyo promedio de circunferencia fue 24,9 cm, con mayor cantidad de alveolos y una miga más abierta; todo esto en el mismo tiempo y condiciones de fermentación que los melcochones que se hicieron con la levadura propagada.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Las características de la levadura patrón, para realizar las replicaciones, fueron entre 67-71% de sólidos, pH muy cercano a 5,16 y una circunferencia en el pan elaborado con la misma de 24,9 cm.

La fórmula que presentó mayor incremento de biomasa (14% de sólidos) durante la propagación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae,* fue la que se hizo con 5% de melaza, pues los sólidos en los medios de mayor concentración de melaza (10, 15 y 20 %), fueron menores.

El tiempo estimado para que la levadura propagada alcance la cantidad de sólidos de la levadura patrón fue de 31,85 horas.

El pan elaborado con la levadura en el medio expuesto a 5% de melaza tuvo una circunferencia de 20,5 cm, siendo levemente mayor que la de los panes hechos con levadura propagada a partir de medios con 10, 15 y 20% de melaza.

5.2 Recomendaciones

Es importante no saturar el medio de la levadura con sales o exceso de carbohidratos para evitar situaciones de estrés que limiten su adaptación al medio y por ende su reproducción.

Es necesario contar con aireación continua y no exceder los niveles de azúcar para favorecer el crecimiento de biomasa (células de levadura) y evitar que el metabolismo de la levadura se incline a la producción de CO_2.

Se recomienda utilizar el tiempo estimado (31,85 horas) para alcanzar los sólidos totales requeridos en el proceso (69%), como dato de importancia para un eventual estudio de factibilidad económica de implementación de este proyecto.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Agriflex. (2015). *Características funcionales en la producción de levadura líquida.* Recuperado el oct de 2015, de Instalaciones de almacenamiento, transporte y dosificación: http://www.agriflex.it/es/productos/fermentadores/completa+instalaci+n+para+la+producci+n+de+levadura+natural+l+quida/hcDocumento/id/41/caracter-sticas-funcionales.html

Alpízar, D. (2010). *Evaluación de diferentes productos alimenticios elaborados con dos derivados de levadura para aumentar su valor nutricional y funcional sin detrimento de su calidad sensorial.* San Jose: Tesis para optar el Título Profesional de Licenciatura en Tecnologia de Alimentos, UCR.

Altamirano, C. (2013). *Optimización de un Método para la Producción de Biomasa de Saccharomyces cerevisiae empleada en la etapade Fermentación del Mosto de Cerveza, desde un nivel deLaboratorio a un nivel Piloto.* Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Químico, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de química, ingeniería química e ingeniería, Lima.

Bamforth, C. W. (2005). *Alimentos, fermentación y microorganismos.* Zaragoza: Acribia, S.A.

CACIA. (2006). Normalización y reglamentación son una prioridad. *Camara Costarricense de Industria Alimentaria CACIA*, 15 y 25.

CACIA. (2011). *Cámara Costarricense de la Industria Alimentaria.*

CentralAméricaData. (06 de 05 de 2014). *El pan es buen negocio en Costa Rica*. Recuperado el 03 de 06 de 2014, de http://www.centralamericadata.com/es/article/home/El_pan_es_buen_negocio_en_Costa_Rica.

CONAMA. (1998). *Comisión Nacional del Medio Ambiente.* Recuperado el 10 de junio de 2014, de GUÍA PARA EL CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN INDUSTRIAL: http://ww2.educarchile.cl/UserFiles/Planificaciones/1/43272_179206_Fabricaci%C3%B3n%20de%20levaduras.pdf.

COSMOS. (2016). *Información Técnica y Comercial de las Levaduras para panificación*. Recuperado el 9 de abr de 2016, de http://www.cosmos.com.mx/wiki/czvw/levaduras-para-panificacion.

Deconceptos. (2014). *Concepto de pan.* Recuperado el 5 de julio de 2014, de http://deconceptos.com/ciencias-naturales/pan.

EFE. (5 de Octubre de 2012). Chile es el segundo consumidor de pan en el mundo tras Alemania. *La Segunda Online*, págs. http://www.lasegunda.com/Noticias/Nacional/2012/10/786123/Chile-es-el-segundo-consumidor-de-pan-en-el-mundo-tras-Alemania.

Espeleta, I. (12 de Enero de 2015). Uso de levadura fresca en panificación en Costa Rica. (L. Rojas, Entrevistador).

Ferrer, X. (8 de octubre de 2009). *Las levaduras.* Recuperado el 5 de julio de 2014, de CUINANT: http://www.cuinant.com/elllevat1.htm.

Gómez, M. (2012). *Elementos de estadística descriptiva.* San José, C.R: EUNED.

Gutiérrez. (19 de Noviembre de 2014). Reproducción de levadura en cervezas. (L. Rojas, Entrevistador).

Hernández, A. (2003). *Microbiología Industrial .* San Jose: Editorial Universal Estatal a Distancia.

Hernández, G. (2010). *Libro blanco del Pan.* ESpaña: Editorial Médica Panamericana.

Hernández, M. J. (2005). *Aplicaciones Tecnológicas y Aislamiento de Genes en respuesta al estrés (Tesis Doctoral).* (U. d. Valencia, Ed.) Valencia, España: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC.

Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2010). *Metodología de la Investigación* (5 ed.). México D.F.: McGrow Hill.

INEC. (03 de 2013). *Evaluación demográfica del X Censo Nacional de Población de Costa Rica 2011 y de otras fuentes* . Recuperado el 03 de 06 de 2014, http://www.inec.go.cr/A/MT/Poblaci%C3%B3n%20y%20Demograf%C3%ADa/Poblaci%C3%B3n/Evaluaci%C3%B3n%20Censo%202011/Metodolog%C3%ADa/Evaluaci%C3%B3n%20censal%202011.pdf.

Lallemand. (1996). Bioquímica de la producción de Levadura. *Lallemand Baking Update, 1*(9), 2.

Lallemand. (1998). Guía de Ingredientes Acondicionadores de Masa. *Lallemand Baking Update, 1*(13), 2.

Lezcano, E. (03 de 2012). *Alimentos Argentinos*. Recuperado el 02 de 06 de 2014, de http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/farinaceos/Productos/Levadura_2012_03Mar.pdf.

Maglione, A. (6 de noviembre de 2009). El pan y su historia. *La Nación*, págs. http://www.lanacion.com.ar/1194032-el-pan-y-su-historia-parte-ii.

Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Higiene. (s.f.). *Norma Venezolana, Levadura Industrial para Panificación.* Venezuela: FONDONORMA.

Norma Venezolana. (2000). *Norma Venezolana, Levadura Industrial para Panificación.* Venezuela: FONDONORMA.

OAS. (2014). *Organization of American States*. Recuperado el 02 de 06 de 2014, de Science and Technology : http://www.science.oas.org/Simbio/mbio_ind/cap8_mi.pdf.

Ortiz Avram, M. G. (2010). *Diagnóstico del proceso de fermentación con la levadura Sacharomyces cerevisae, desde la etapa de propagación hasta la última generación cosechada, en la planta de producción de cerveza de prductora La Florida, S.A.* San José: Tesis para optar el Título Profesional de Licenciatura en Tecnología de Alimentos, UCR.

Otero, M., Martínez, J., & Saura, G. (2010). Propagación de levadura Candida utilis. *ICIDCA*, 27-31.

Rodríguez, B. (1987). *Producción de levaduras usando una columna de burbujeo.* San José, C.R.

Rodríguez, B. (1987). *Producción de levaduras usando una columna de burbujeo.* San José, C.R.

Rodríguez, J. (18 de jun de 2016). Métodos estadpísticos para el desarrollo de proyectos. (L. Rojas, Entrevistador) Universidad Técnica Nacional. Atenas.

sevenoticias. (18 de 08 de 2013). *oms recomienda consumo diario de 250 g de pan*. Recuperado el 02 de 06 de 2014, de http://www.sevenoticias.com/sn/jo1515/index.php?option=com_content&view=article&id=2551:oms-recomienda-consumo-diario-de-250-gramos-de-pan&catid=41:noticias.

Sigifredo, B. (2012). *Análisis comparativo de la influencia de factores de estrés en levaduras industriales y levaduras de panificación.* Córdoba, Argentina: Departamento de Química. Universidad Tecnológica Nacional-Facultad Regional Villa María.

Silvestrini, M. (2008). *Poncer inter edu*. Recuperado el 26 de 07 de 2014, de Fuentes de información primaria, secundaria y terciaria: http://ponce.inter.edu/cai/manuales/FUENTES-PRIMARIA.pdf.

UNAM. (2010). (U. N. México, Ed.) Recuperado el nov de 2015, de Hoja de seguridad del etanol: www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/12etanol.pdf.

Universidad de Barcelona. (2016). *Universitat de Barcelona.* Recuperado el 14 de Agosto de 2016, de http://www.ub.edu/aplica_infor/spss/cap4-7.htm.

USDA. (2016). *USDA food composition database.* Recuperado el jun de 2016, de https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/5690?fgcd=&manu=&lfacet=&format=&count=&max=35&offset=&sort=&qlookup=molasses.

Víquez, E. (24 de Octubre de 2014). Proceso de la levadura en la industria. (L. Rojas, Entrevistador).

VII. APÉNDICES

Para lograr establecer una fórmula adecuada en el desarrollo de la biomasa de la levadura a partir de los sustratos mencionados en la teoría de las fuentes consultadas, hubo que realizar muchas pruebas preliminares y definir mejor las proporciones adecuadas para el alcance del objetivo 2 del proyecto, lo cual se resume en este capítulo:

Apéndice 1. Resumen de prueba preliminar para determinar mejor fórmula para la propagación de levadura

Se realizaron pruebas y mediciones de la cantidad de CO_2 generado por levaduras en función del tiempo, partiendo de fórmulas distintas, y con esto determinar la condición en donde la levadura se desarrollara mejor. Para estas pruebas a escala, se usó como fermentador un matraz o Erlenmeyer, ya que adapta adecuadamente para desenvolver el estudio inicial de las condiciones idóneas para el desarrollo de la levadura, esto antes de aumentar el tamaño del proceso.

En este erlenmeyer se colocó levadura, melaza, harina, alimento para levadura y agua. Esta mezcla se mantuvo en agitación y temperatura (entre los 34 y 35 °C). Se realizaron tres pruebas, donde las cantidades de los sustratos y levadura empleados fueron iguales, pero variando únicamente el tiempo de fermentación (tiempo 1: 5 horas, tiempo 2: 8 horas, y tiempo 3: 12 horas).

A partir de la muestra con el mejor resultado de propagación para la levadura se replicó a mayor escala en la marmita de propagación, donde se agregan los mismos materiales de manera proporcional, siguiendo los pasos antes mencionados pero con agitación aireación constante, respetando la misma temperatura mencionada. Una vez alcanzado el tiempo de replicación, se procedió a realizar pruebas al mosto, en donde se pretendía determinar la viabilidad de uso de la levadura propagada, para esto se hicieron pruebas de funcionalidad, cuyo principio se basó en colocar la levadura con harina, agua a 30°C con azúcar y sal. Esto se detalla en el apéndice 2.

Apéndice 2. Resumen de procedimiento para pruebas de actividad (funcionalidad) de la levadura

La mezcla de ingredientes que se describió anteriormente se colocó en una bolsa, a esta se le extrajo todo el aire, luego se dobló en tres partes y se cerró de manera que no entrara ni salera sustancia alguna a la misma. Esta bolsa con la mezcla adentro se ubicó en un erlenmeyer lleno con agua a 30 °C cerrando con un tapón provisto de un hueco en el centro, al cual se le colocó una manguera, cuya salida daba a un beaker, todo este sistema se colocó dentro de un fermentador a una temperatura constante entre 34 y 35°C.

El principio de este sistema se basa en la activación de la levadura ante ciertas condiciones ideales y la eventual producción de CO_2 que la misma pueda desarrollar. El CO_2 que se generara en cierto tiempo (idealmente 1 hora) es atrapado por la bolsa que contiene la mezcla, por lo que el volumen de la misma aumenta, lo cual provoca el desplazamiento del agua que se encuentra en le erlenmeyer y por ende la misma su salida por la manguera posicionada en la parte superior del tapón. El agua que se desplaza es recuperada por medio del beaker y se midió para determinar cuánta se desplazó y con esto tener una idea de cuál es la actividad de la levadura.

Para la prueba de actividad de levadura en masas saladas, se preparó una crema con la levadura de la siguiente manera: 50 g de harina fuerte, 1,8 g de sal, 200 ml de agua a 34-35 °C y 7,5 g de levadura en pasta. Posteriormente se vertieron 50 g de la mezcla dentro de la bolsa plástica, se le extrajo todo el aire sin que se derramara la mezcla y se cerraba con un nudo en la parte superior, de manera que permita que se infle al fermentar la mezcla.

Luego se introduce la bolsa en el erlenmeyer y se llena con agua (a 35 °C) hasta el tope del envase. Se colocó el tapón con manguera en el Erlenmeyer y se introdujo el otro extremo en el beaker, para ser llevado al fermentador durante 1 hora. Finalmente se midió la cantidad de agua obtenida en el beaker. Lo anterior se ilustra mejor en el apéndice 3:

Apéndice 3. Procedimiento de prueba funcional de desplazamiento de agua por el CO_2 de la levadura

Fuente: propia, 2016.

Tras realizar pruebas con distintos sustratos tras lo mencionado en los apéndices anteriores, se obtuvo mejor resultado en el aspecto de constancia en el comportamiento y de producción de CO_2 en el tiempo, con la mezcla con menor cantidad de minerales, lo cual se resume en el próximo apéndice:

Apéndice 4. Resultados de pruebas de desplazamiento de CO_2 con distintos sustratos

Fórmula primer prueba

Agua a 32°C	1.432	Kg
Melaza	0.163	Kg
Urea	0.075	Kg
Fosfato	0.038	Kg
Mg	0.038	Kg
Levadura	0.254	Kg
Total	2	Kg

Tiempo (horas)	Temperatura en el sistema (°C)	pH	Temperatura (°C)	Sólidos (°Brix)	Actividad (Desplazamiento de H_2O en una hora)
0	33	3.9	33.3	10.8	22
1	33.4	4.17	31	8.2	43
2	31.1	4.1	30	8.4	40
3	28	4.07	28	8.2	45
4	28.5	4.07	28.6	8.1	35

Fórmula segunda prueba

Agua a 32°C	2.148	Kg
Melaza	0.245	Kg
Urea	0.113	Kg
Fosfato	0.056	Kg
Mg	0.056	Kg
Levadura	0.381	Kg
Total	2.999	Kg

Tiempo (horas)	Temperatura en el sistema (°C)	pH	Temperatura (°C)	Sólidos (°Brix)	Actividad (Desplazamiento de H_2O en una hora)
0	35	4.15	35	9.9	25
1	30.1	4.56	28	7.9	38
2	33.5	4.12	32.5	7.6	62
3	34.5	4.03	33.2	7.3	25
4	36	4.03	35	No hubo lectura	

Fórmula tercer prueba

Agua	1150	
Fosfato	1.94	
Sulfato de am	2.87	
Magnesio	0.86	Disolución de la melaza
Urea	1.44	255
Melaza diluida	332.1	85
	1489	

Tiempo (horas)	Temperatura en el sistema (°C)	pH	Temperatura (°C)	Sólidos (°Brix)	Actividad (Desplazamiento de H_2O en una hora)
0	32	4.17	29	12.3	20
1	39	4.35	32	6.9	20
2	36	4.4	31	6.9	26
3	33	4.47	31	7.1	28
4	38.6	4.42	31.5	7.2	30

Fórmula cuarta prueba

Melaza	100
Harina	400
Agua	400
Levadura	200
	1100

Tiempo (horas)	Temperatura en el sistema (°C)	pH	Temperatura (°C)	Sólidos (°Brix)	Actividad (Desplazamiento de H_2O en una hora)
0	32	4.2	30	8.2	22
1	34	4.3	33	6.7	44
2	35	4.41	32	7.8	43
3	33	4.46	33	7.1	49
4	32	4.44	34	7.1	46

Fuente: propia, 2016.

En dichas pruebas se midieron los sólidos y pH, la primera presentó mayor variación por diferenciación de los sustratos, sin embargo el nivel de acidez se comportó similar, siempre dentro de los niveles aceptables para el desarrollo de la levadura en cuestión.

Una vez conocidos y analizados los resultados anteriores, donde la fórmula de la cuarta prueba presentó mayor constancia en el volumen de desplazamiento de CO_2 bajo las mismas condiciones mencionadas en el trascurso del tiempo. Seguidamente se optó por volver a realizar esta prueba pero esta vez usando la levadura en pasta original con únicamente agua, donde tras una hora se obtuvo mayor cantidad de CO_2 respecto a las pruebas indicadas en el apéndice anterior, en las cuales se emplearon más sustratos, como se muestra en el siguiente apéndice:

Apéndice 5. Desplazamiento de CO_2 con levadura en pasta (madre)

13/02/2016	
Fórmula	
Ingrediente	Cantidad
Agua	42%
Levadura	58%
Dezplazamiento CO_2 (mL)	82
Temperatura (°C)	35

19/03/2016	
Fórmula	
Ingrediente	Cantidad
Agua	42%
Levadura	58%
Dezplazamiento CO_2 (mL) en 1h	119
Temperatura (°C)	36

01/04/2016	
Fórmula	
Ingrediente	Cantidad
Agua	42%
Levadura	58%
Dezplazamiento CO_2 (mL) en 1h	91
Temperatura (°C)	33

01/04/2016	
Fórmula	
Ingrediente	Cantidad
Agua	42%
Levadura	58%
Dezplazamiento CO_2 (mL) en 1h	109
Temperatura (°C)	34

Fuente: propia, 2016.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Ficha técnica de la levadura en pasta utilizada

1. INFORMACION SISTEMA EXACTUS:

1.1. Levadura en pasta a granel utilizada en panificación para productos crudo congelado, precocido-congelado y terminado-congelado.

2. DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO:

Es el producto obtenido a partir de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, estas cepas son propagadas en condiciones controladas de laboratorio donde luego son mezcladas con melaza clarificada y esterilizada, agua y aire para pasar por un proceso de fermentación a 32°C, separación, enfriamiento por un intercambiador de calor donde pasa de 30°C hasta 3°C para obtener una crema consistente, el cual sufre un proceso de prensado por un filtro-prensa para obtener la levadura fresca. Esta es empacada a 9°C y se coloca en cuartos de enfriamiento hasta llegar y mantener una temperatura interna entre 0°C a 5°C.

3. INGREDIENTES:

Levadura tipo *Saccharomyces cerevisiae*, melaza clarificada y esterilizada, agua.

4. CARACTERÍSTICAS:

4.1 FISICO-QUIMICAS Y ORGANOLÉPTICAS

Apariencia física	Blando, fácilmente desboronable.
Color	Blanco hueso.
Olor	Típico a levadura.
pH	4.0-6.0
Actividad Salada	155ml Mín.
Actividad Dulce	245ml Mín.
Sólidos solubles	15.5°Brix crema Mín.
Humedad	70 % Máx.
Nitrógeno	7.15 % Máx.
Fosfato (P_2O_5)	2.0-2.4 %

4.2 ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS:

Recuento Total	$<4.0 \times 10^7$ UFC/g
Levaduras Salvajes	$<3.0 \times 10^6$ UFC/g
Coliformes Totales	<200 UFC/g
Salmonella	Negativo
E- Coli	Negativo
Proteolíticos	<3+

5. EMPAQUE Y ETIQUETADO

Cajas de cartón corrugado con plástico en su interior con un contenido de 25 kg de producto. El empaque tiene la siguiente información: descripción del producto, número de lote, fecha de producción, fecha de expiración, nombre de fabricante, dirección y teléfono, número de registro.

6. ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

Mantener en cámara de refrigeración entre 0°C a 5°C, limpio, seco, lejos del calor y la luz solar. No congelar y evitar cambios bruscos de temperatura. El producto se debe transportar en camiones refrigerados que aseguren la cadena de frío en todo momento (0°C a 5°C), debe venir en tarimas limpias y secas, libres de infestación alguna, y el empaque debe estar cerrado, limpio e íntegro.

7. VIDA ÚTIL:

El producto debe ser estable en condiciones de almacenamiento en cámaras de refrigeración adecuadas (0°C a 5°C). Tiene una vida útil de 30 días a partir de la fecha de fabricación, siempre y cuando no se rompa la cadena de frío. Debe ingresar a al cliente, con al menos con el 50 % de su vida útil activa y se acepta un máximo de 2 lotes por entrega.

8. REQUISITOS Y DOCUMENTACION:

La planta de proceso y bodegas debe tener el permiso de funcionamiento al día. Además, debe tener implementado un programa de inocuidad (BPM, HACCP). Con cada despacho debe enviarse un Certificado de Calidad que incluya los números de lotes y cantidad por lote que componen el despacho, además de los resultados de las pruebas de calidad realizadas. El lote no puede ser mayor que la capacidad de la planta de producir en una sola línea en producción continua y preferiblemente en un mismo día de manera que todas las unidades dentro del lote puedan ser consideradas de tener una calidad homogénea.

El proveedor no puede hacer cambios en el producto en ninguno de los parámetros establecidos en este documento sin previa aprobación de la empresa. El proveedor debe comunicar previamente cualquier cambio que sea necesario en el origen y calidad de los ingredientes utilizados en la formulación.

9. LEGISLACION

Apego a las Regulaciones y Legislaciones Nacionales e Internacionales al igual que el Codex Alimentarius.

Anexo 2. Ficha técnica de la Melaza líquida

1. INFORMACION SISTEMA EXACTUS:

1.1. Melaza Líquida. Marca Aprobada: Alúsp
1.2. Código SAP: 118431
1.3. Proveedor: Industria Alimenticia Alúsp S.A.
1.4. Origen: Costa Rica

2. DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO:

Es el producto obtenido a partir de uno de los subproductos del proceso de fabricación de azúcar de caña que luego es pasteurizado, se le agrega en dosificación correcta acido acético como conservante y luego pasa por un tamiz, por último es envasado en estañones limpios y desinfectados.

3. INGREDIENTES:

Melaza pasteurizada y preservada con ácido acético.

4. CARACTERÍSTICAS:

4.1 FISICO –QUIMICAS Y ORGANOLÉPTICAS

Apariencia	Líquido, viscoso color negro-café.
Olor	Característico a dulce de caña.
Sabor	Dulce característico.
pH	4.0-4.5
Grados Brix	60-65

4.2 ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS:

Recuento Total Aerobio	≤1000 UFC/g
Recuento Coliformes	<10 UFC/g
Recuento Bacteria Lácticas	50 UFC/g
E. coli	<10 UFC/g
Levaduras y mohos	$1*10^2$ UFC/g

5. EMPAQUE Y ETIQUETADO

Pichingas de plástico grado alimentario, lavados y desinfectados con un contenido de 40kg. Cada pichinga debe venir etiquetado al menos con la siguiente información: descripción del producto, número de lote, fecha de producción, fecha de expiración, nombre de fabricante, dirección y teléfono, número de registro sanitario.

6. ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

Mantener en un lugar fresco (<35 °C), limpio y seco, lejos del calor y la luz solar. No congelar y evitar cambios bruscos de temperatura. El producto se debe transportar en tarimas limpias, y el empaque debe estar cerrado y limpio e íntegro. El camión debe estar limpio, libre de material y olores extraños, sin grietas.

7. VIDA ÚTIL:

El producto debe ser estable en condiciones de almacenamiento adecuadas al menos hasta 3 meses a partir de la fecha de fabricación, sin abrir el envase. Debe ingresar a la empresa al menos con el 80 % de su vida útil activa (2.4 meses).

8. REQUISITOS Y DOCUMENTACION:

La planta de proceso y bodegas debe tener el permiso de funcionamiento al día. Además, debe tener implementado un programa de inocuidad (BPM, HACCP). Con cada despacho debe enviarse un Certificado de Calidad que incluya los números de lotes y cantidad por lote que componen el despacho, además de los resultados de las pruebas de calidad realizadas. El lote no puede ser mayor que la capacidad de la planta de producir en una sola línea en producción continua y preferiblemente en un mismo día, de manera que todas las unidades dentro del lote puedan ser consideradas de tener una calidad homogénea.

El proveedor no puede hacer cambios en el producto, ni en ninguno de los parámetros establecidos en este documento sin previa aprobación de Pinova. El proveedor debe comunicar a Pinova previamente cualquier cambio que sea necesario en el origen y calidad de los ingredientes utilizados en la formulación.

9. LEGISLACION

Apego a las Regulaciones y Legislaciones Nacionales e Internacionales al igual que el Codex Alimentarius.

Anexo 3. Ficha técnica de la harina fuerte

1. INFORMACION SISTEMA EXACTUS:

1.1. Harina fuerte a granel para panes crudos congelados.
1.2. Proveedor: Molinos de Costa Rica S.A.
1.3. Origen: Previo acuerdo con el proveedor

2. DESCRIPCIÒN DEL PRODUCTO:

Producto obtenido de la molienda del trigo del grano maduro, sano, entero, quebrado, seco y limpio en el que se elimina gran parte del salvado y del germen, el resto se muele (tritura) hasta darle un grado adecuado de finura.

3. INGREDIENTES:

Harina de trigo limpio, libre de impurezas o materia extraña.

4. CARACTERÍSTICAS:

4.1 FISICO –QUIMICAS Y ORGANOLÈPTICAS

Aspecto	Polvo fino, libre de insectos
Color	Blanco a cremoso
Olor y sabor	Característico. Sin olores ni sabores extraños
Absorción	58% Mín.
Humedad	14.4% Máx.
Estabilidad (min)	7% Mín.
Proteina	12.3% Mín.
Ceniza	0.68% Máx.
Gluten Húmedo	33% Mín.
Falling Number (Indice de caida)	300 - 400s
Fungal Falling Number	80-120s
Fuerza (W)	290 x 10^{-4} J Mín.
Relación (P/L)	1.0- 1.9

4.2 ESPECIFICACIONES MICROBIOLÒGICAS:

Recuento Total	*<50000 UFC/g*
Recuento Hongos	*< 300 UFC/g*
Aflatoxinas	*<20 ppb*
Salmonella	*Negativo*
E- Coli	*Negativo*

5. EMPAQUE Y ETIQUETADO

Debe incluir descripción del producto, número de lote, fecha de producción, certificado o reporte de calidad, nombre de fabricante, dirección y teléfono, número de registro sanitario.

6. ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

Las condiciones de almacenamiento y transporte de la harina de trigo a granel, deben ser tales que, al ser manipulada en condiciones apropiadas, ésta conserve las características del producto. No se debe transportar harina de trigo en vehículos que transporten o hayan transportado productos tóxicos, contaminantes, animales vivos o muertos o cualquier producto que altere sus características sensoriales, fisicoquímicas y microbiológicas. Idealmente, la harina a granel debe venir de 5 a 8 días de maduración, cualquier desviación en este punto debe ser notificada antes de la entrega y aprobada por la Gerencia de la empresa.

7. REQUISITOS Y DOCUMENTACION:

La planta de proceso y bodegas debe tener el permiso de funcionamiento al día. Además, tener implementado un programa de inocuidad (BPM, HACCP). Con cada despacho debe enviarse un Certificado de Calidad que incluya los números de lotes y cantidad por lote que componen el despacho, además de los resultados de las pruebas de calidad realizadas. El lote no puede ser mayor que la capacidad de la planta de producir en una sola línea en producción continua y preferiblemente en un mismo día, de manera que todas las unidades dentro del lote puedan ser consideradas de tener una calidad homogénea.

El proveedor no puede hacer cambios en el producto, ni en ninguno de los parámetros establecidos en este documento sin previa aprobación del cliente. El proveedor debe comunicar previamente cualquier cambio que sea necesario en el origen y calidad de los ingredientes utilizados en la formulación.

11. LEGISLACION

Apego a las Regulaciones y Legislaciones Nacionales e Internacionales al igual que el Codex Alimentarius. El enriquecimiento de la harina con Tiamina, Riboflavina, Niacina, Acido fólico y Hierro debe estar en conformidad con el decreto Nº 26371-S de La Gaceta Nº 208 del Miércoles 29 de Octubre de 1997. La legislación nacional **NO** permite presencia de Bromato de potasio en la harina de trigo.

Anexo 4. Balanza de precisión Veritas

Anexo 5. Fermentador portátil marca Salva

Anexo 6. Horno eléctrico marca Salva

Anexo 7. pH-metro Hanna 2213

Anexo 8. Termómetro digital de espiga Delta trak 11050

Anexo 9. Centrífuga Gallenkamp Junior

Anexo 10. Tubo cónico plástico para centrífuga

Anexo 11. Sólidos presentes en las muestras de levadura hidratada (patrón)

Muestra	Peso del tubo (g)	Peso del tubo + masa (g)	Peso del tubo + sólidos (g)	% de sólidos
Tubo 1	14,15	45,91	36,10	69,11%
Tubo 2	14,02	45,48	35,24	67,45%
Tubo 3	14,18	46,21	36,90	70,93%
Tubo 4	14,21	46,11	36,28	69,18%
			Promedio	69,17%

Fuente: propia, 2016.

Anexo 12. Datos de pH de muestras de levadura patrón

Muestra	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
Muestra 1	5,24	5,53	5,3
Muestra 2	4,65	5,35	4,54
Muestra 3	5,15	4,46	4,95
Muestra 4	5,08	5,56	5,42
Muestra 5	5,18	5,35	5,31
Promedio	5,06	5,31	5,10

Fuente: propia, 2016.

Anexo 13. Mediciones del pan elaborado con la levadura patrón

Muestras	Largo (cm)	Altura (cm)	Circunferencia (cm)
Muestra 1	60,50	6,50	25,50
Muestra 2	61,00	7,30	25,50
Muestra 3	65,00	6,80	23,50
Muestra 4	60,00	7,30	25,00
Muestra 5	59,50	6,00	25,00
Promedio	61,20	6,78	24,90

Fuente: propia, 2016.

FORMULARIO DE AUTORIZACIÓN

DE USO PÚBLICO DE LA INFORMACIÓN

Los suscritos, Natalia Gómez Alfaro, Leonardo Rojas Zamora y Oscar Víquez Chaves, estudiantes de la carrera de Ingeniería en Tecnología de Alimentos, con cédula de identidad 206840054, 206010122 y 206200237 respectivamente, autorizamos para que nuestro Trabajo Final de Graduación titulado: "DISEÑO DE UN MÉTODO VIABLE PARA LA PROPAGACIÓN DE LEVADURA (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*), EN LA PRODUCCIÓN DE PAN" para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería de Tecnología de Alimentos, sea donado a la Biblioteca de la Universidad Técnica Nacional, Sede de Atenas.

Asimismo, hacemos entrega de una copia en formato impreso y en digital el cual funcionará como respaldo de la información.

Finalmente, autorizamos a la Biblioteca de la UTN, Sede de Atenas, para que realice la publicación de esta investigación, a través de la página Web de dicha unidad para fines académicos y no lucrativos, sin perjuicio de la observancia del régimen de derechos de autor.

Agradeciendo la oportunidad de brindar un aporte al desarrollo académico y profesional de la comunidad universitaria, firmamos en Atenas al día 1, del mes de setiembre, del 2016.

Atentamente,

_____
Natalia Gómez Alfaro

_____
Directora Unidad Académica
Ana María Barcenas Parra

SELLO U.A

_____
Leonardo Rojas Zamora

_____
Oscar Víquez Chaves