



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

"Evaluación de la Cinética de Fermentación de una Levadura
Antártica y su Aplicabilidad en el Proceso de Fermentación de
Cervezas"

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

(TESIS DE GRADO)

Previa a la obtención del Título de:

INGENIEROS DE ALIMENTOS

Presentada por:

Christian Daniel Guarco Rodríguez

Andrea Verónica Morales Haro

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2015

AGRADECIMIENTO

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) por permitirnos desarrollar la investigación en sus instalaciones y en especial a la Blga. Monserrate, al Ing. Vargas y al Ing. Chóez por su constante colaboración.

Al Ph.D. Juan Manuel Cevallos por confiar en nosotros y ser nuestro guía.

A nuestros seres queridos.

DEDICATORIA

A mis padres, todo se lo
debo a ellos.

Christian Guarco

DEDICATORIA

A Dios

A mi familia

A mis amigos

Andrea Morales

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

Ing. Jorge Duque R.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

Dr. Juan Cevallos C., Ph.D
DIRECTOR DEL TFG

M.Sc. María Morales R.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este Trabajo Final de Graduación, nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

Christian Daniel Guarco Rodríguez

Andrea Verónica Morales Haro

RESUMEN

Investigadores ecuatorianos han llevado a cabo expediciones hacia la Antártida logrando aislar e identificar diferentes especies de levaduras psicrófilas con un alto potencial en bioprocesos de alimentos como lo es la fabricación de cerveza. Tradicionalmente en su producción se han utilizado especies del género *Saccharomyces*, pero cada vez más se están experimentando con nuevas especies en busca de distintas características de sabor y aroma en el producto final. Sin embargo, hasta la fecha no se han publicado reportes sobre la utilización de levaduras extremófilas ni provenientes de la Antártida.

En la presente investigación se evaluó la cinética de fermentación de una levadura antártica a diferentes temperaturas y pHs, además de su comportamiento en la producción de cerveza bajo la hipótesis de que esta levadura fermenta a bajas temperaturas los azúcares presentes en el mosto y que se puede efectivamente obtener cerveza.

Para identificar la especie de la levadura se realizó la extracción del ADN genómico seguido por una amplificación por PCR y secuenciación. Con respecto a la determinación de la temperatura óptima de fermentación, se realizaron pruebas en tubos de ensayo con campanas de Durham donde se midió el CO₂ producido durante 30 días cada 24 horas. Se usó un medio

mineral con D-glucosa inoculado con el microorganismo en estudio a una densidad óptica de 0,5 de Mcfarland. Estos tubos se incubaron a 4°C, 10°C, 16°C, 20°C ó 26°C. Los datos obtenidos se ajustaron al modelo de Rosso y se analizaron estadísticamente para evaluar la cinética de fermentación de la levadura ante distintas temperaturas y así hallar su valor óptimo con un R^2 mayor a 0,90. En la obtención del pH óptimo de fermentación, se usó una metodología y análisis similar a la empleada anteriormente. En este caso se ajustó el medio mineral a doce distintos pHs entre 1,6 y 12,6, y se incubaron a la temperatura óptima. Se utilizó como control positivo a *Saccharomyces cerevisiae* en ambos ensayos.

El siguiente paso consistió en elaborar la cerveza utilizando una receta basada en una cerveza tipo Pilsen a la que ulteriormente se le realizaron mediciones fisicoquímicas, pruebas de aroma y toxicidad, y finalmente una evaluación sensorial.

Los resultados mostraron una temperatura óptima de 13.74°C y un pH óptimo de 7.89, con un perfil de aroma predominantemente compuesto de alcoholes y ésteres sin la presencia de compuestos tóxicos y un contenido de alcohol de 2.62%, con un grado de satisfacción positivo de los atributos olor y sabor. Los datos indican que la levadura antártica puede ser utilizada en la elaboración de cervezas tipo light a partir de cebada.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	ii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ABREVIATURAS.....	vi
SIMBOLOGÍA.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1	
1. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. La Cerveza	3
1.2. Proceso Tecnológico	25
1.3. Fermentación.....	33
1.4. Microorganismos de la Antártida	55
CAPÍTULO 2	
2. GENERALIDADES.....	59
2.1. Planteamiento del Problema.....	59
2.2. Justificación	60
2.3. Objetivos.....	62
2.4. Hipótesis.....	63

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA.....	64
3.1. Identificación Molecular de la Levadura Antártica.....	64
3.2. Diseño Experimental de las Condiciones Óptimas de Fermentación	73
3.3. Elaboración de Cerveza.....	77
3.4. Identificación de Compuestos Químicos Mediante CG-EM	83
3.5. Prueba Sensorial	86

CAPÍTULO 4

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	92
4.1. Análisis de Secuenciación de Nucleótidos.....	92
4.2. Análisis Estadístico de las Condiciones Óptimas de Fermentación.	94
4.3. Propiedades Fisicoquímicas de la Cerveza	109
4.4. Evaluación Sensorial	114

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	122
---	-----

APÉNDICES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
INAE	Instituto Antártico Ecuatoriano
pH	Potencial de hidrógeno
ATP	Adenosina trifosfato
etc.	Etcétera
OG	Gravedad específica original
FG	Gravedad específica final
FAN	Free Amino Nitrogen
GAP	General amino acid permease
VDK	Dicetonas vecinales
E	Extracto real
RDF	Real Degree of Fermentation
ABV	Alcohol por volumen
SG	Gravedad específica
SENESCYT	Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación
SECA	Sociedad Ecuatoriana de Cerveceros Artesanales
INEC	Instituto Nacional de Estadística y Censos
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
SDS	Dodecilsulfato sódico
PCR	Polymerase Chain Reaction
ITS	Internal Transcribed Spacer

TAE	Tris-acetato-EDTA
BLAST	Basic Local Alignment Tool
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PETG	Policiclohexilenodimetileno Etileno Tereftalato
CG-EM	Cromatografía de Gases por Espectrometría de Masas
MEFS	Microextracción en Fase Sólida
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano/Carboxen/divinilbenceno
R.E.P.	Recuento de aerobios mesófilos
Mín.	Mínimo
Máx.	Máximo
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UP	Unidades Propagadoras
N _E	Número estimado
NTE	Norma Técnica Ecuatoriana
INEN	Instituto Ecuatoriano en Normalización
ANOVA	Análisis de varianza
Desv. Est.	Desviación Estándar
SSE	Suma Cuadrática del Error
MSE	Media Cuadrática del Error
RSME	Raíz Cuadrática de la Media Cuadrática del Error
GDL	Grados de Libertad
w/w	Peso en peso
IBU	International Bittering Units
w/v	Peso en volumen

SIMBOLOGÍA

°C	Grados Celsius
%	Tanto por ciento
ppm	Partes por millón
µg	Microgramos
NADH ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
CO ₂	Dióxido de carbono
g	Gramos
mg	Miligramos
K ⁺	Ion potasio
CoA	Coenzima A
°P	Grados Plato
°Sacch	Grados de sacarificación
L	Litros
mL	Mililitros
M	Molar
mM	Milimolar
Tris-HCl	Clorhidrato de trisaminometano
NaCl	Cloruro de sodio
rpm	Revoluciones por minuto
µL	Microlitros
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
min	Minutos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
H ₂ O	Agua

pb	Pares de base
mm ³	Milímetros cúbicos
μ	Velocidad de la reacción
T	Temperatura
kg	Kilogramos
A.A.	Alfa Ácidos
cm ³	Centímetro cúbico
μm	Micrómetros
m	Metros
mm	Milímetros
n	Tamaño de muestra
≥	Mayor igual
R ²	Coefficiente de determinación
H ₀	Hipótesis nula
H ₁	Hipótesis alterna

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.1	Estructuras de Humulonas y Lupulonas.....	8
Figura 1.2	Visión General de La Clasificación de La Levadura Cervecera.....	13
Figura 1.3	Composición Promedio de Elementos Traza en Levaduras (µg Peso Seco).....	14
Figura 1.4	Representación Diagramática de Una Sección A Través de una Típica Célula de Levadura Gemando.....	15
Figura 1.5	Azúcares, Oxígeno, Nitrógeno, Minerales Entran a la Célula. Etanol, Dióxido de Carbono y Compuestos de Flavor Salen de Ella.....	17
Figura 1.6	Crecimiento de Levadura de un Cultivo Batch en Mosto, cuya Fuente Principal de Carbono es el Azúcar. Las Fases Indicadas son: 1, Fase Lag; 2, Período de Crecimiento Acelerado; 3, Fase de Crecimiento Exponencial; 4, Fase de Crecimiento Desacelerado; 5, Fase Estacionaria; 6, Fase de Cambio Diaúxico; 7, Segunda Fase de Crecimiento en Etanol si hay Oxígeno Presente (Línea Sólida), O Fase de Muerte Celular si no hay Oxígeno Presente (Línea Punteada).....	18
Figura 1.7	Levaduras de Baja (izquierda) y Alta Fermentación (derecha) Bajo el Microscopio (Magnificada X640).....	24
Figura 1.8	Diagrama de Flujo General del Proceso de Elaboración de Cerveza.....	25
Figura 1.9	Fosforilación a Nivel de Sustrato.....	33
Figura 1.10	Fermentación que Ocasiona Excreción de Etanol y CO ₂	34
Figura 1.11	Algunas Reacciones de Equilibrio Redox Utilizando a NAD ⁺ como Coenzima.....	34
Figura 1.12	Utilización de Azúcares durante una Fermentación Ale de un Mosto con Gravedad Específica Original de 1.040.....	38
Figura 1.13	Rutas para la Disimilación de la Glucosa a Etanol en Levaduras Vía Glucólisis y la Derivación de Hexosa Monofosfato.....	45
Figura 1.14	Roles Centrales del Piruvato y Acetil-CoA en Diversas Rutas de la Utilización de Nutrientes del Mosto y Formación de Metabolitos Activos del Sabor.....	49

Figura 1.15	Curso del Tiempo de Fermentación para una Cerveza Lager. Fa, Nivel de Alcoholes de Fusel ($\mu\text{g/L}$); es, Nivel de Ésteres ($\mu\text{g/L}$); T, Temperatura ($^{\circ}\text{C}$).....	55
Figura 1.16	XVII Expedición Ecuatoriana.....	56
Figura 1.17	Localización de Las Islas de Greenwich.....	57
Figura 3.1	Utilización del Dispensor En Medios Petrifilm.....	88
Figura 3.2	Ficha de Evaluación Sensorial por Atributos.....	91
Figura 4.1	Secuencia de Nucleótidos para CIBE-12126.....	93
Figura 4.2	Secuencia de Nucleótido para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	94
Figura 4.3	Producción Promedio Diaria de CO_2 a las Temperaturas: 4, 10, 16, 20 Y 26°C	96
Figura 4.4	Datos Ajustados al Modelo de Regresión no lineal de la Variable Velocidad De Fermentación [$\text{Mm}^3 \text{CO}_2/\text{Día}$] (Temperatura).....	99
Figura 4.5	Producción Promedio diaria de CO_2 a pHs: 1.6, 2.6, 3.6, 4.6, 5.6 Y 6.6.....	102
Figura 4.6	Producción Promedio diaria de CO_2 a pHs: 7.6, 8.6, 9.6, 10.6, 11.6 Y 12.6.....	103
Figura 4.7	Datos Ajustados Al Modelo de Regresión No Lineal de la Variable Velocidad de Fermentación [$\text{Mm}^3 \text{CO}_2/\text{Día}$] (pH).....	108
Figura 4.8	Comparación de Picos de los Cromatogramas en los Primeros 5 Minutos.....	111
Figura 4.9	Porcentajes de Respuestas más Frecuentes del Atributo Olor en la Cerveza Pasteurizada.....	116
Figura 4.10	Porcentajes de Respuestas más Frecuentes del Atributo Olor en la Cerveza sin Pasteurizar.....	117
Figura 4.11	Porcentajes de Respuestas más Frecuentes del Atributo Sabor en la Cerveza Pasteurizada.....	119
Figura 4.12	Porcentajes de Respuestas más Frecuentes del Atributo Sabor en la Cerveza sin Pasteurizar.....	120

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Composición Química del Lúpulo.....	7
Tabla 2	Efectos de la Composición Iónica del Agua en el Proceso de Elaboración Cerveza.....	10
Tabla 3	Orden de Consumo de Azúcares del Mosto.....	37
Tabla 4	Clases de Aminoácidos según el Orden de Asimilación durante la Fermentación.....	41
Tabla 5	Clases de Aminoácidos Presentes en el Mosto Basados en el Efecto del Desempeño de la Fermentación y Análisis de Cerveza.....	42
Tabla 6	Mecanismos para la Regulación del Metabolismo de Azúcares en Levaduras.....	46
Tabla 7	Aplicaciones de Microorganismos de la Antártida.....	58
Tabla 8	Composición del Buffer de Extracción.....	67
Tabla 9	Composición de Master Mix.....	70
Tabla 10	Secuencia de Primers.....	70
Tabla 11	Requisitos Microbiológicos.....	87
Tabla 12	Escala Hedónica Verbal de Cinco Puntos.....	89
Tabla 13	Velocidad de Fermentación Promedio de Temperatura [Mm ³ CO ₂ /Día].....	97
Tabla 14	Estadística Descriptiva.....	97
Tabla 15	Coeficientes de Ajuste.....	98
Tabla 16	Parámetros del Modelo de Ajuste.....	100
Tabla 17	Velocidad de Fermentación Promedio [Mm ³ CO ₂ /Día] para los Doce Valores de pH entre 1.6 y 12.6.....	104
Tabla 18	Estadística Descriptiva.....	105
Tabla 19	Coeficientes de Ajustes.....	106
Tabla 20	Parámetros del Modelo de Ajuste.....	107
Tabla 21	Propiedades Fisicoquímicas de La Cerveza Elaborada 100% a Base de Malta de Cebada.....	109
Tabla 22	Compuestos de la Cerveza “Antártida” no Encontrados en la Cerveza Comercial.....	112
Tabla 23	Compuestos de Aroma y Sabor Predominantes de La Cerveza	113
Tabla 24	Análisis de Varianza de un Factor.....	118
Tabla 25	Análisis de Varianza de un Factor.....	121

INTRODUCCIÓN

El desarrollo del siguiente Trabajo Final de Graduación abarca principalmente lo siguiente:

En el capítulo 1 se comenzará con una descripción de los fundamentos teóricos que competen a la cerveza, detallando los tipos y la materia prima e ingredientes que son empleados en el proceso de elaboración de la misma, realizando un enfoque especial en la etapa de fermentación. Asimismo, se dará una visión general sobre el proyecto realizado por el CIBE acerca de los microorganismos de la Antártida, en especial las levaduras identificadas y su potencial aplicación en la industria de alimentos.

En el capítulo 2 se planteará el problema y justificación del presente estudio. Además, se establecerá la hipótesis de que la levadura antártica puede fermentar a bajas temperaturas los azúcares presentes en el mosto y puede ser empleada en la elaboración de cervezas a partir de cebada. Esto se conseguirá estableciendo objetivos general y específicos.

Una vez expuestos los conocimientos teóricos necesarios y el objetivo de este estudio, en el capítulo 3 se definirán claramente los materiales y la metodología aplicada de manera detallada. Se llevará a cabo la experimentación comenzando por la identificación de la levadura antártica y

la obtención de su temperatura y pH óptimos de fermentación, para luego continuar con la elaboración de la cerveza. Para comprobar la idoneidad del producto para el consumo humano, se realizará una cromatografía de gases, pruebas microbiológicas y una prueba sensorial.

Una vez descrito lo anterior, en el capítulo 4 se analizarán los resultados obtenidos de cada uno de los experimentos efectuados. Se realizará un análisis estadístico de las condiciones óptimas de fermentación de la levadura antártica identificada, logrando así los consiguientes resultados de las propiedades fisicoquímicas de la cerveza elaborada y su posterior análisis en conjunto con la evaluación sensorial. Se buscarán razones científicas a los resultados conseguidos basándose en los conceptos previamente estudiados.

Finalmente en el capítulo 5 se darán las respectivas conclusiones y recomendaciones de este proyecto.

CAPÍTULO 1

1. MARCO TEÓRICO

1.1. La Cerveza

La cerveza es una bebida que contiene alcohol, extracto de azúcares y dióxido de carbono (1) producida por fermentación de un medio acuoso con azúcares derivados generalmente de cereales usando levaduras (2).

Materia Prima e Ingredientes

Para llevar a cabo la producción de cerveza se necesita materia prima seleccionada con características adecuadas de acuerdo al tipo y calidad de cerveza que se desea producir. Los ingredientes necesarios son: un recurso que proporcione la cantidad de azúcares necesario, agua, lúpulo, levadura y en algunos casos adjuntos y auxiliares del proceso (2).

Malta de Cebada

Antes de entrar de lleno con lo que respecta a la cebada, es relevante indicar que la malta (granos malteados) simplemente es el grano sometido a germinación, desecado y finalmente un leve tostado. El propósito es activar las enzimas necesarias propias del grano para así romper la estructura proteica que cubre el almidón que posteriormente será convertido en azúcares simples (3).

La cebada (*Hordeum vulgare*) que es una planta perteneciente a la familia de las gramíneas (*Gramineae*) es el grano más comúnmente malteado. Es el principal recurso de azúcares fermentables en cervecería (3), crece mejor en climas húmedos y en suelos con una cantidad moderada de nutrientes. Existe una diferencia entre la cebada de invierno y la cebada de primavera como entre la planta de cebada con dos hileras y múltiples hileras. La descripción de las hileras se refiere a la morfología de la espiga, en cada hilera se encuentran los granos maduros de cebada. Las distintas variedades difieren en su idoneidad para el malteado. La cebada de múltiples hileras produce maltas más ricas en cáscaras, proteínas y enzimas, la cual puede ser beneficiosa cuando se usan adjuntos de granos sin maltear. Por otro lado, la de dos hileras tiene las mejores propiedades para malteado y producción de cerveza (1).

Las ventajas de la cebada sobre otros granos que pueden ser usados para el malteado son: la regulación y control más fácil del proceso de germinación, el sabor sobresaliente de la cerveza y la tecnología disponible para su proceso. Las cáscaras actúan como lecho filtrante cuando se realiza la filtración del mosto y el complemento de enzima es ventajoso para obtener la modificación deseada. Las mezclas de cebada de invierno y de verano traen como consecuencia dificultades tecnológicas en la etapa de malteado debido a los distintos ritmos de desarrollo y por consiguiente un proceso de germinación disparejo. Aunque se puede combatir estos problemas usando procesos de malteado por separado, se presentarían dificultades en la etapa del "lautering", fermentación y filtrabilidad de la cerveza, así como la estabilidad de la cerveza se vería deteriorada (1).

La humedad de la cebada tiene gran relevancia para su almacenamiento, y debe estar en un rango óptimo del 10 al 12% preferentemente entre 8 y 16°C de temperatura (1). El almidón, carbohidrato principal de la cebada, cuenta con el 55-65% del peso total del grano. Del 75 al 80% del almidón está presente en forma de amilopectina, mientras la amilosa se encuentra entre 20 y 25% (2) Por tanto, los carbohidratos presentes en mayor cantidad en la

cebada son los α -glucanos (amilosa y amilopectina del almidón), seguidos de los β -glucanos (celulosa, hemilcelulosa, gomas), pentosanos, así como pequeñas porciones de azúcares de baja masa molecular (1). Las proteínas son indispensables para la maltabilidad, nutrición de la levadura, sabor y la estabilidad de la cerveza. Por otro lado, solo una parte de los lípidos son usados durante el malteado y lo demás permanece en los granos utilizados. Se encuentran también en cantidades muy pequeñas pero de vital importancia algunos componentes como fosfatos (cerca del 0.3%), minerales (2.5- 3.5%), vitaminas (cerca del 0.005%) y sustancias fenólicas (cerca del 0.2%) (1).

Lúpulo

La planta de lúpulo (*Humulus lupulus L.*) es parte de la familia *Cannabaceae* que crece en regiones templadas del mundo (2). Se usa en cervecería principalmente para impartir amargor y sabor, aunque también se considera que actúa como antiséptico, mejora las cualidades de la espuma y promueve la clarificación en la cerveza (1,4). Los componentes de flavor de los lúpulos son resinas y aceites esenciales, producidos en las glándulas que poseen lupulina, las cuales están situadas en la base de las bracteólas de los conos de la planta femenina. Los conos son cosechados y luego

secados hasta alcanzar una humedad que no sobrepase el 12%, obteniendo así el lúpulo que se conoce en la producción de cerveza (2).

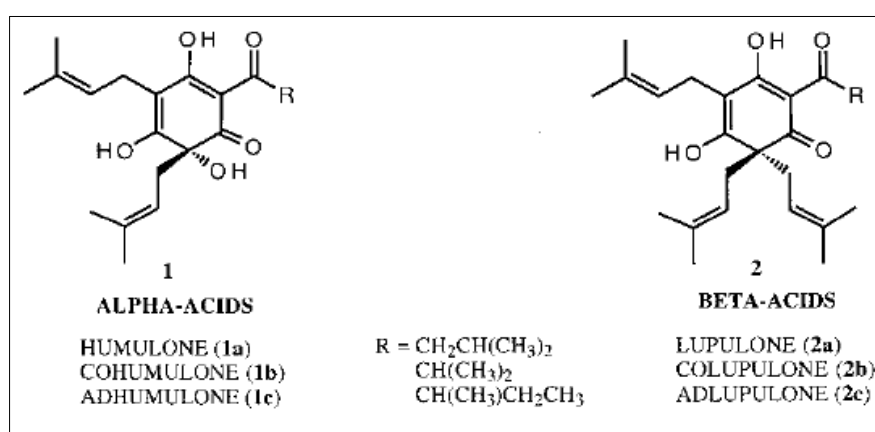
Es importante conocer que los compuestos responsables del amargor que ofrece el lúpulo son principalmente resinas como los α -ácidos y β -ácidos, mientras que los aceites presentes se encargan del aroma y sabor característico (1). El contenido de alfa ácidos es una característica que depende mucho de la variedad del lúpulo seleccionado al igual que sus otros componentes (2).

TABLA 1
COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL LÚPULO

Compuestos	Contenido en %
Agua	9 -12
α -ácidos	2 -17
β -ácidos	2 -10
Aceites esenciales	0.5 - 2.5
Compuestos de extracto no nitrogenados	4 – 9
Proteína	15 – 21
Fibra	10 – 17
Polifenoles	3 – 8
Minerales	7 – 11
Lípidos y ceras	> 3
Ácidos grasos	0.05 – 0.2

Fuente: Adaptado de Eblinger, et al., 2009 (1)

Los α -ácidos, también llamados humulonas, son los de mayor interés por su alto potencial de amargor, incluyendo tres compuestos primordiales: humulona, cohumulona y adhumulona (4). La solubilidad de los alfa ácidos es muy dependiente del valor de pH, por ende se someten a un proceso de ebullición para provocar un cambio estructural conocido como isomerización. Los productos de amargor de la isomerización son los iso- α -ácidos, cis y trans-isohumulona, los cuales son significativamente más solubles que los α -ácidos en el valor de pH de la cerveza (1,4). Los β -ácidos o lupulonas, en realidad contribuyen mínimamente en el amargor de la cerveza debido a su baja solubilidad en el mosto. Aunque durante el almacenamiento, las lupulonas se oxidan siendo así más solubles e imparten mayor amargor (1).



Fuente: De Keukeleirc, Denis, 2000 (5)

FIGURA 1.1 ESTRUCTURAS DE HUMULONAS Y LUPULONAS

Con respecto a los aceites del lúpulo, estos comprenden una mezcla compleja de más de 250 componentes, los cuales brindan aromas y sabores florales, picantes, cítricos, entre otros. Son compuestos volátiles que en gran parte se pierden durante el hervor. Los aceites aromáticos más livianos (Mirceno, linalol, geraniol, limoneno, terpineol, etc.) se añaden en la etapa de fermentación y los aceites aromáticos más pesados (humuleno, cariofileno, farneseno) y sus óxidos/epóxidos se agregan en la etapa final del hervor (2,3).

Agua Cervecera

El agua juega un papel crucial en el proceso cervecero, después de todo la cerveza es mayormente agua. Su composición iónica cumple roles importantes en la preparación del mosto y le ofrece ciertas cualidades únicas a cada estilo de cerveza. Por ejemplo, algunos lugares como Pilsen, Dublin, Burton-upon-Trent, Dortmund y Munich, son mundialmente famosos debido a su suministro de agua con características particulares (2,3).

Los iones del agua, en la etapa de formación de mosto contribuyen en la nutrición de la levadura, influyen en las propiedades tecnológicas de la levadura y tienen impacto sobre el flavor de la

cerveza. Los iones de mayor relevancia deben estar presentes en cantidades adecuadas y balanceadas, ya que en concentraciones muy altas pueden provocar efectos negativos como causar inhibición o generar flavors no deseados (2). Químicos cerveceros reconocen que tres componentes presentes en el agua influyen en el pH del mosto: bicarbonato, calcio y magnesio. El pH del mosto recomendado está en el rango de 5.8 a 5.2 (4). En la tabla 2 se muestran los iones más importantes presentes en el agua y sus respectivos efectos en el proceso de cerveza.

TABLA 2
EFFECTOS DE LA COMPOSICIÓN IÓNICA DEL AGUA EN
EL PROCESO DE ELABORACIÓN CERVEZA

Ion (Rango objetivo)	Efectos
Calcio (50-150ppm)	<ul style="list-style-type: none"> - Interactúa con fosfatos y proteínas para reducir el pH de la mezcla de agua con malta y promueve un mosto más brillante. - Precipita oxalato del mosto, que puede causar turbiedad en la cerveza. - Activa las proteasas y α-amilasas - Promueve floculación de levadura al final de la fermentación. - A concentraciones altas, inhibe la extracción de resinas de lúpulos.
Magnesio (10-30ppm)	<ul style="list-style-type: none"> - Reduce el pH del mosto con interacción con fosfatos pero menos importante que el calcio. - Co-factor importante de múltiples

	enzimas
Bicarbonato (0-250ppm)	- A concentraciones altas incrementa el pH del mosto y reduce la generación de extracto.
Sodio (0-150ppm)	- Combinado con cloruro contribuye al dulzor de la cerveza. - A niveles moderados acentúa el flavor de la malta
Cloruro (0-250ppm)	- A concentraciones elevadas inhibe la fermentación e imparte un sabor salino.
Sulfato (50-150ppm)	- Acentúa el amargor del lúpulo - A concentraciones elevadas genera sabores indeseables

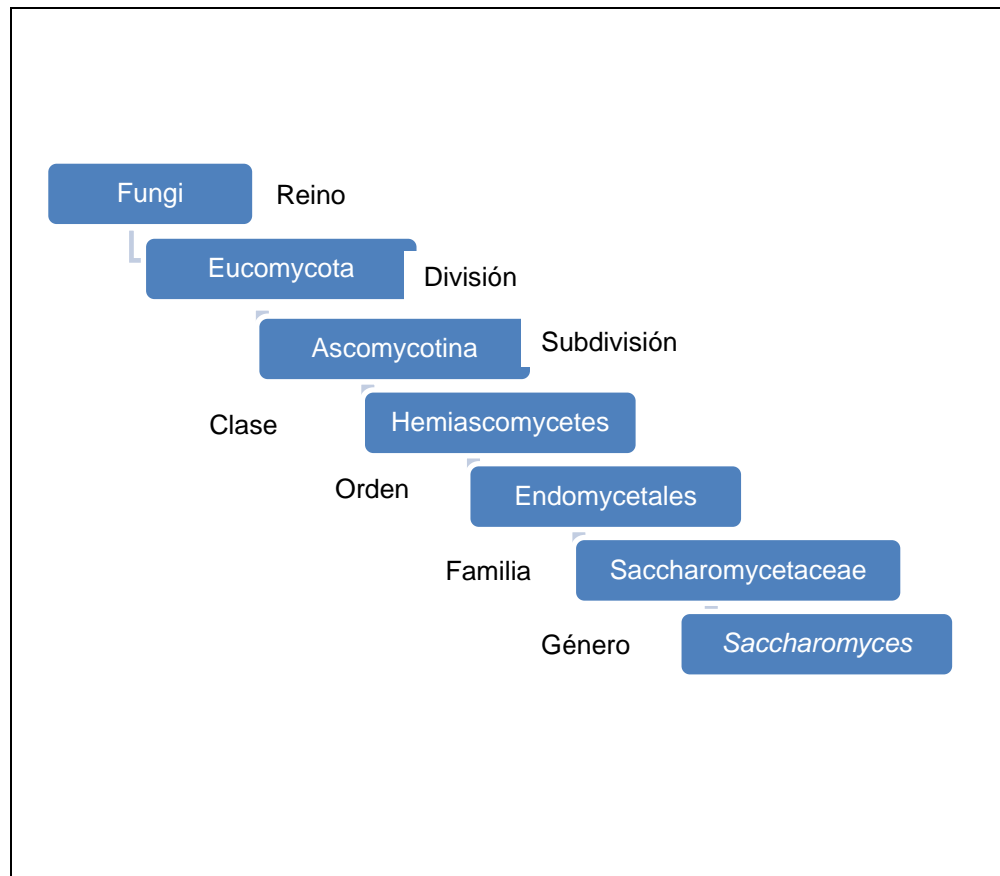
Fuente: Adaptado de Boulton & Quain, 2013 (2) y Palmer, John, 2006 (3)

Levadura en la Industria de la Cerveza

El componente más importante en la fermentación del mosto de cerveza es la levadura, prácticamente se encarga de hacer la cerveza y definir su sabor, tanto como cualquier otro ingrediente que se añade (4). De manera universal, es un microorganismo eucariótico unicelular perteneciente al reino fungi (hongos) que tiene cuatro divisiones: ascomicetos, basidiomicetos, zigomicetos, oomicetos y deuteromicetos (6). Dependiendo de la especie muestra una forma ovoidea, redonda o alargada, cuyo tamaño varía entre 5 y 30 micrones y puede reproducirse sexual o asexualmente (7,8). Hasta la actualidad se han detectado alrededor de 1500 especies y con cada especie un sin número de cepas distintas (9). Se puede encontrar levaduras viviendo en suelo, insectos,

crustáceos, animales y en plantas, ya que pueden viajar en el polvo o corrientes de aire hacia nuevas áreas (7).

Cuando se trata de la industria cervecera, las levaduras empleadas generalmente son del tipo ascomiceto clasificadas con el género *Saccharomyces* (ver figura 1.2) y poseen la característica de reproducirse por gemación (10). En ocasiones interviene la llamada “levadura salvaje” pero no es deseada por los cerveceros, ya que puede ser transportada por partículas de polvo en el ambiente hacia la cerveza de forma no deliberada (7).



Fuente: Adaptado de Eblinger, HM., 2009 (11)

FIGURA 1.2 VISIÓN GENERAL DE LA CLASIFICACIÓN DE LA LEVADURA CERVECERA

Se conocen hasta la actualidad 10 especies del género *Saccharomyces*, entre las más importantes se encuentran: *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* y *S. pastorianus* (11). La diferenciación taxonómica ha sido muy complicada, tema que se revisará más adelante en la sección “Tipos de cerveza”.

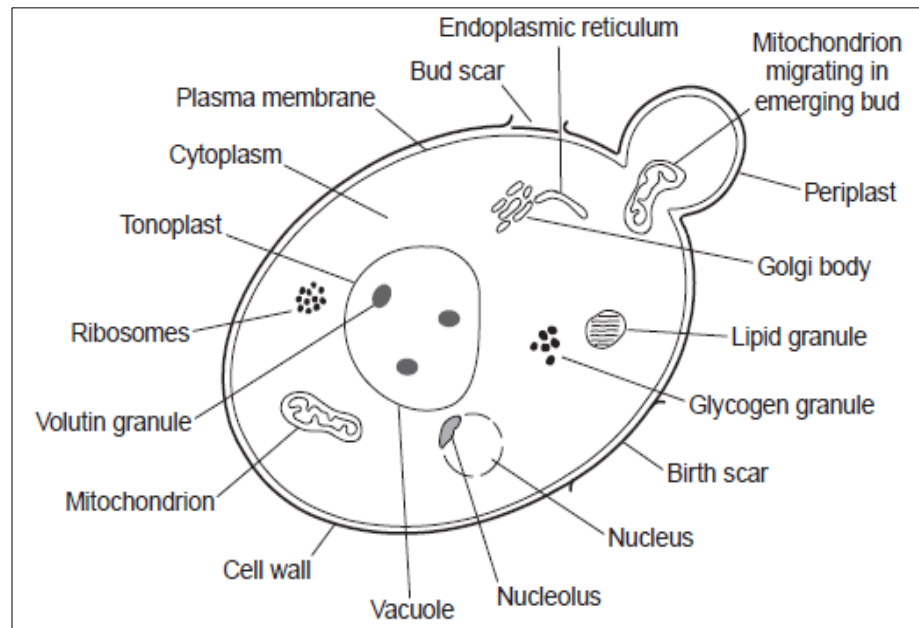
La levadura, como la mayoría de los organismos vivos, está compuesta principalmente de agua, seguido por proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos. El total de contenido de minerales ronda entre el 5 y 10% (10) y se aprecia a continuación en la figura 1.3.

	Bakers (Reed and Nagodarithana, 1991)	Brewers (Eddy, 1958)	Brewers (Eddy, 1958)	Brewers (Eddy, 1958)
Aluminium	–	3.0	2.0	1.0
Calcium	0.75	–	–	–
Chromium	2.2	37.0	104.0	34.0
Copper	8.0	–	–	–
Iron	20.0	17.0	104.0	25.0
Lead	–	2.0	14.0	100.0
Lithium	0.17	–	–	–
Magnesium	1.65	–	–	–
Manganese	8.0	4.0	5.0	11.0
Molybdenum	0.04	0.1	0.04	2.7
Nickel	3.0	3.0	4.0	3.0
Phosphorus	13.0	–	–	–
Potassium	21.0	–	–	–
Selenium	5.0	–	–	–
Silicon	30.0	–	–	–
Sodium	0.12	–	–	–
Sulphur	3.9	–	–	–
Tin	3.0	3.0	> 100	3.0
Vanadium	0.04	–	–	–
Zinc	170.0	–	–	–

Fuente: Briggs, et al., 2004 (10)

**FIGURA 1.3 COMPOSICIÓN PROMEDIO DE ELEMENTOS
TRAZA EN LEVADURAS (μG PESO SECO)**

En la figura 1.4, se puede observar la estructura idealizada de una célula de levadura y sus principales organelos (10).



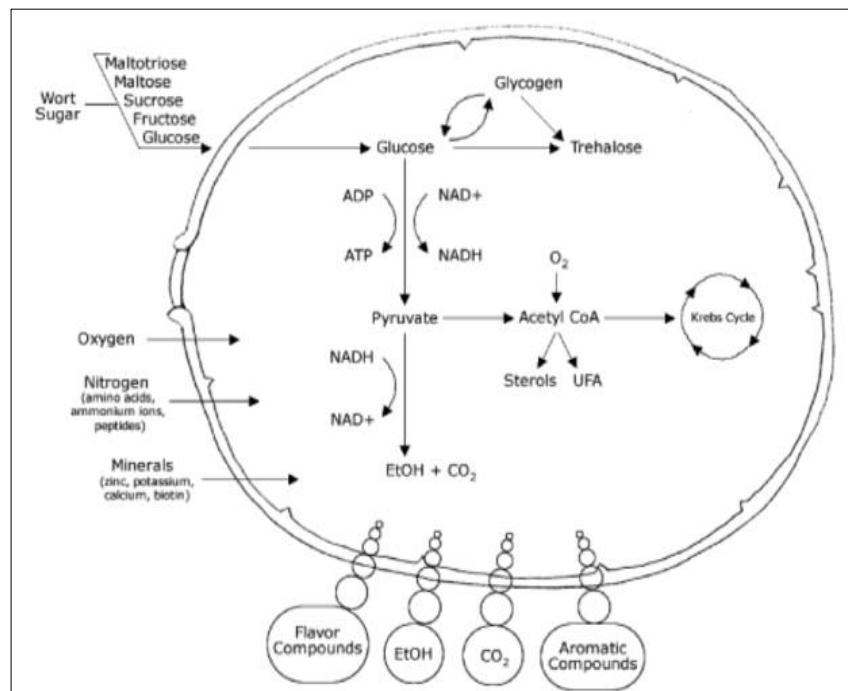
Fuente: Briggs, et al., 2004 (10)

FIGURA 1.4 REPRESENTACIÓN DIAGRAMÁTICA DE UNA SECCIÓN A TRAVÉS DE UNA TÍPICA CÉLULA DE LEVADURA GEMANDO.

Los organelos o partes más importantes para la fermentación son: la pared celular, encargada de la protección contra las influencias externas (12) y relacionada con el fenómeno de floculación (11); la membrana citoplasmática, cuya estructura conserva diversos complejos enzimáticos encargados de catalizar reacciones

específicas, además de ser una barrera para la difusión indiscriminada de solutos (2); el periplasma, ubicado entre la superficie externa de la membrana plasmática y la interna de la pared celular, que contiene enzimas como invertasa (2) útil para la asimilación de la sacarosa; la mitocondria, el sitio donde se realiza la mayor producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa, parte de la cadena respiratoria (2); y por último las vacuolas, lugares en donde se almacenan nutrientes regulando la concentración intracelular (2).

Las levaduras cerveceras en su mayoría son anaerobias facultativas, es decir, pueden vivir tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (10). En presencia, piruvato se convierte en dióxido de carbono y agua; en ausencia, piruvato se convierte en acetaldehído y luego en etanol más dióxido de carbono (7). En la figura 1.5 se ilustra lo mencionado y además se puede apreciar las entradas y salidas de la célula.

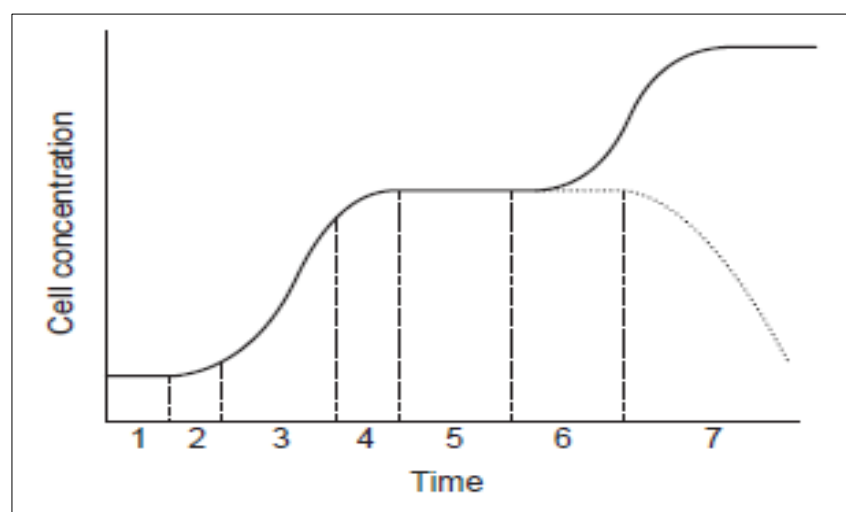


Fuente: White, et al., 2010 (7)

**FIGURA 1.5 AZÚCARES, OXÍGENO, NITRÓGENO, MINERALES
ENTRAN A LA CÉLULA. ETANOL, DIÓXIDO DE CARBONO Y
COMPUESTOS DE FLAVOR SALEN DE ELLA.**

El medio en el que se reproduce una levadura contiene una cantidad finita de nutrientes. Existen otros factores intrínsecos y extrínsecos como el estado fisiológico en el que se encuentre la levadura o la temperatura del medio de cultivo que regulan el tiempo de las distintas fases de crecimiento como se detalla en la figura 1.6. La levadura degrada los nutrientes para obtener energía y así crear los componentes de sus próximas generaciones. Pero al

inicio puede que tenga que sintetizar enzimas útiles para el propio consumo y utilización del sustrato presente en el medio (10). Esto último se evidencia en la primera etapa de crecimiento denominada fase lag, de latencia o adaptación.



Fuente: Briggs et al., 2004 (10)

FIGURA 1.6 CRECIMIENTO DE LEVADURA DE UN CULTIVO BATCH EN MOSTO, CUYA FUENTE PRINCIPAL DE CARBONO ES EL AZÚCAR. LAS FASES INDICADAS SON: 1, FASE LAG; 2, PERÍODO DE CRECIMIENTO ACELERADO; 3, FASE DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL; 4, FASE DE CRECIMIENTO DESACELERADO; 5, FASE ESTACIONARIA; 6, FASE DE CAMBIO DIAÚXICO; 7, SEGUNDA FASE DE CRECIMIENTO EN ETANOL SI HAY OXÍGENO PRESENTE (LÍNEA SÓLIDA), O FASE DE MUERTE CELULAR SI NO HAY OXÍGENO PRESENTE (LÍNEA PUNTEADA)

El estadio en el que se encuentra la célula madre con respecto a las siguientes generaciones hace que el cultivo no sea sincrónico. Es por eso que en la gráfica de biomasa sobre tiempo se muestra la concentración promedio para toda la población celular (10).

Siguiendo con la figura 1.6 como referencia, el cambio de fase 1 a 2 es paulatino y la velocidad de crecimiento va aumentando hasta alcanzar una constante máxima (pendiente) que establece la siguiente fase: crecimiento exponencial o logarítmico. Esta fase puede cesar al acabarse los compuestos orgánicos esenciales del medio o al concentrarse metabolitos a niveles inhibitorios y así entrar a la fase 5, la fase estacionaria, donde la concentración de biomasa permanece constante (10). Normalmente lo que ocurre es que los niveles de los compuestos esenciales disminuyen y limitan la velocidad de crecimiento entrando a la fase 4 de crecimiento desacelerado.

En la fase 5 el metabolismo de la levadura toma otro rumbo. Comienza a desarrollarse el famoso metabolismo secundario, en donde se excreta al medio, sustancias influyentes sobre el perfil

de aroma y sabor de la cerveza. La fase 6, llamada la fase de cambio diaúxico, se presenta en ciertas cepas de levaduras.

El cambio diaúxico es un tipo de crecimiento bifásico que se genera a partir de la presencia de dos sustratos en el medio, uno que se va acabando y el otro con mayor concentración. Visto desde el presente caso de fermentación alcohólica, consiste en el cambio de glicólisis del metabolismo anaeróbico a la utilización aeróbica del etanol (13), y es considerada una adaptación fenotípica (10) debido al estrés por la carencia de glucosa en el medio. Si se adapta bien la levadura a este cambio ocurre la fase 7 con líneas sólidas, sino entra a una fase en donde las posibilidades de sobrevivir son mínimas y poco a poco se van apagando rutas metabólicas innecesarias (10).

En la fase 7 con líneas punteadas, ocurren cambios morfológicos de la célula y se inicia el consumo de las reservas de glucógeno y trehalosa para mantenerse lo más estables posible durante un largo período. Se acaban las reservas, y comienza la “autodegradación” en donde la levadura comienza a consumir sus propios componentes estructurales. Una vez acabado todo posible nutriente, entra a la fase de muerte celular (10).

La autólisis genera un decremento en la concentración de biomasa. En este punto obviamente ya no hay más consumo de sustrato ni formación de producto (etanol) (10).

Ingredientes Auxiliares y Adjuntos

En ocasiones en la industria cervecera se utilizan ciertos ingredientes que no son esenciales, para corregir ciertas deficiencias de la materia prima o del proceso y así mejorar la calidad de la cerveza.

Por ejemplo, se emplean clarificadores, químicos para reducir el riesgo de formación de mohos en la fase de germinación, nutrientes adicionales para levadura, estabilizadores de espuma, antioxidantes para alargar la vida útil de la cerveza, enzimas para mayor generación de azúcares en el mosto y para acortar el tiempo de germinación, entre otros (1).

Además, hay casos en los que se usan adjuntos, sean sólidos o líquidos, para aumentar el recurso de azúcares fermentables. Entre los adjuntos sólidos se tiene el maíz, trigo o arroz. Los adjuntos líquidos son jarabes (2).

Tipos de Cerveza

Hoy en día existe una amplia gama de cervezas, las cuales pueden categorizarse por múltiples factores como el aroma, apariencia, sabor, concentración de alcohol, método de producción, ingredientes usados, historia u origen (2). Pero una forma de establecer una clasificación sencilla es dividir las en tres grandes grupos de acuerdo al tipo de levadura que utilizan para su fermentación: ale, lager y lambic. Cabe recalcar que el metabolismo propio de cada levadura le va a otorgar diferentes características al producto final. En la figura 1.7 se refleja una diferencia entre las levaduras lager y ale en la forma de gemación, las tipo lager forman pequeños clusters y las tipo ale no (11).

Ale

Este tipo de levaduras usadas en la fermentación, normalmente *S. cerevisiae* (2), trabajan a temperaturas más calientes que las lager y tienden a agruparse en grandes cantidades en la parte alta del fermentador donde se acumula la espuma, motivo por el cual son también conocidas como levaduras de fermentación alta. Durante este proceso, la superficie hidrofóbica de la levadura causa floculación para adherirse al dióxido de carbono e ir a la parte superior de la cerveza. En realidad existe gran cantidad de cepas

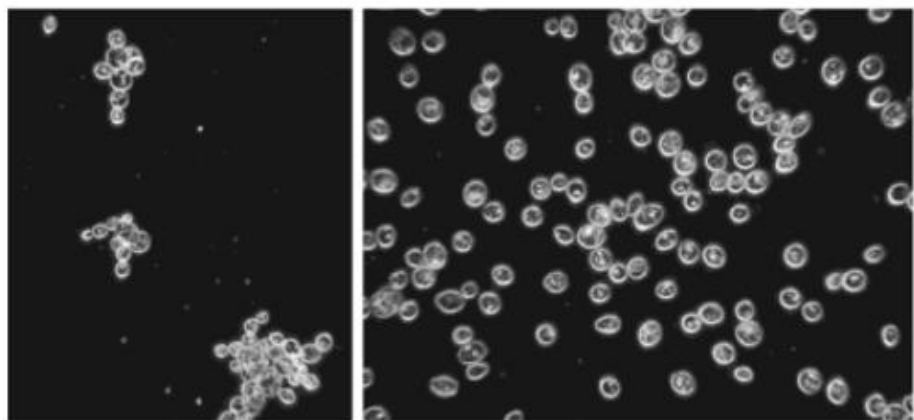
diferentes pero con sus respectivas similitudes. Comúnmente tienen una temperatura óptima de fermentación alrededor de los 20°C, fermentan rápidamente, consumen el perfil correcto de azúcares y toleran cantidades moderadas de alcohol. Los cerveceros distinguen este estilo de cervezas por su comportamiento y producción de un flavor fuerte y frutal característico (7).

Lager

La fermentación se lleva a cabo de manera óptima generalmente a temperaturas más frías, entre los 4 y 13°C (3,7). Es denominada levadura de fermentación baja debido a que la mayoría de sus cepas, entre ellas *S. carlsbergensis* o *S. pastorianus* (2,11), presentan la cualidad de permanecer en el fondo del tanque fermentador en lugar de dirigirse hacia la superficie. Al no elevarse y permanecer en suspensión por más tiempo, les permite reducir en mayor cantidad los sub productos presentes. Además de no ser levaduras tan floculantes, poseen la habilidad de fermentar melibiosa y el tiempo que tardan para realizar el proceso de fermentación es mayor. Las cervezas tipo lager son las más producidas industrialmente y las caracteriza su sabor suave, limpio y ligero (7).

Lambic

Las cervezas lambic son originarias de Bruselas (Bélgica) y se destacan por ser producidas a través de una fermentación espontánea. Es decir, el mosto se expone a las levaduras salvajes y bacterias presentes en el ambiente que puedan caer “accidentalmente” y así realizar el proceso de fermentación. Es un tipo de cerveza bastante especial con sabores muy variados, principalmente agrios y a vino. Su fermentación puede tomar entre seis meses e inclusive tres años (4,7).

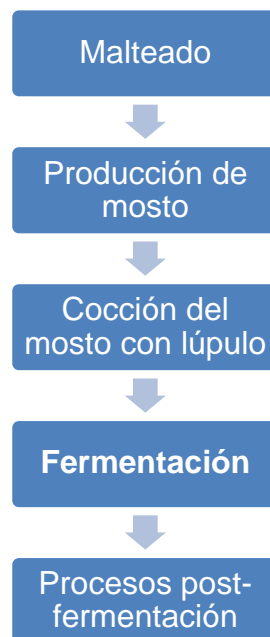


Fuente: Eblinger, HM., 2009 (11)

**FIGURA 1.7 LEVADURAS DE BAJA (IZQUIERDA) Y ALTA
FERMENTACIÓN (DERECHA) BAJO EL MICROSCOPIO
(MAGNIFICADA X640)**

1.2. Proceso Tecnológico

Cuando se habla de los pasos a seguir para la producción de cerveza, como lo muestra la figura 1.8, se puede encontrar ciertos cambios y variaciones en algunas de las etapas, ya que va de la mano con el tipo de cerveza que se quiera obtener y la tecnología disponible. A continuación se detallarán las etapas de elaboración de cerveza de una manera global para obtener un producto final de calidad utilizando la materia prima antes mencionada.



Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

FIGURA 1.8 DIAGRAMA DE FLUJO GENERAL DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE CERVEZA

Malteado

El proceso de malteado consiste en germinar el grano de cebada u otro cereal bajo condiciones controladas. Primordialmente se realiza en la cebada aunque puede aplicarse en varios cereales. Entre los propósitos principales se encuentran: el desarrollo de las enzimas del grano con degradación simultánea de compuestos de alto peso molecular de sus paredes, lograr características distintivas de color y aroma y remoción de compuestos aromáticos no deseados (1).

Básicamente, se inicia remojando los granos con ciertos periodos de exposición al aire hasta llegar a un contenido de humedad entre el 42 y 45%. Esto posibilita la activación de los sistemas enzimáticos y el grano comienza a movilizar las reservas de almidón que proveen carbono y energía para el desarrollo del embrión. En esta fase la cebada en crecimiento debe permanecer dispersa a una temperatura entre 13 y 16°C para remover el dióxido de carbono y permitir la respiración. La germinación produce endoglucanasas, pentosanasas, endoproteasas y amilasas, las cuales degradan la estructura del endospermo del grano (2).

En un punto apropiado el proceso de germinación se detiene aplicando calor por medio del horneado, incrementando la

temperatura gradualmente de 25 a 70°C y así reducir la humedad del grano a un 4% (2). De esta manera se logra estabilizar el grano y mantener las enzimas relevantes para las siguientes etapas del proceso. El control del secado junto con la calidad de la malta, determina el tipo y color del producto (1).

Producción del Mosto

El mosto prácticamente es el agua que contiene los azúcares fermentables necesarios y se obtiene mediante tres pasos esenciales: molienda, maceración y fase de separación.

Molienda

Se empieza por moler los granos malteados con el objetivo de liberar el contenido del endospermo y reducir el tamaño de las partículas para suministrar una operación óptima en la subsiguiente etapa de maceración. El grado de la molienda debe ser equilibrado. Si el tamaño de la partícula es muy grande, la degradación enzimática es deficiente, mientras que al ser partículas demasiado pequeñas la separación del mosto se vuelve muy dificultosa. Este proceso puede ser en seco o húmedo, acorde a la composición de los granos o preferencias del cervecero (2).

Maceración

El propósito principal de la maceración es convertir el almidón de la malta en azúcares fermentables e hidrolizar sus proteínas, hemicelulosas y gomas (1,3). La molienda es sumergida en agua y esta mezcla es calentada normalmente de sesenta a noventa minutos. Por medio del calor, son activadas una serie de enzimas que ayudan a degradar los compuestos presentes en la molienda, cada una de estas enzimas tiene un rango de temperatura en el cual actúan (3). Para generalizar, temperaturas más altas (64-68°C) favorecen la rápida conversión del almidón y formación de extracto, mientras temperaturas más bajas (50- 55°C) favorece la concentración de nitrógeno soluble (2). Lo importante es no exceder los 70°C, ya que inhibe las amilasas que mayormente convierten el almidón en maltosa y dextrinas no degradadas; como consecuencia la fermentabilidad del mosto reduciría notoriamente (3). Existen varios métodos de maceración como la infusión o decocción. Además, se puede usar una temperatura fija usualmente de 65°C o se aumenta gradualmente la temperatura para permitir una degradación enzimática progresiva, dependiendo de las necesidades del cervecero (2).

Separación

Después de la maceración se procede a elevar la temperatura a 77°C, suspendiendo toda acción enzimática para mantener el perfil de azúcares requerido y hacer la cama de granos y mosto más fluidos. Finalmente el mosto dulce es drenado y los granos triturados son enjuagados para extraer la mayor cantidad de restos de azúcares posible (3).

Cocción del Mosto

Una vez obtenido el mosto clarificado, este es sometido a un tratamiento térmico en el cual se añade el lúpulo. Este proceso tiene diversas funciones como (1,2):

- Evaporación del agua excesiva para alcanzar la concentración de mosto deseado (extracto original).
- Destrucción de enzimas.
- Esterilización del mosto.
- Coagulación de proteínas.
- Disolución e isomerización de las sustancias de amargor en el mosto.
- Aromas indeseables son removidos, sustancias reductoras son formadas, el color aumenta y el valor de pH cae ligeramente.

El tiempo de hervor recomendado es de sesenta a noventa minutos, y dependiendo del tipo de lúpulo a usarse, estos se añaden ya sea al final o al comienzo del proceso. Si se trata de lúpulos de aroma, se agregan en los últimos 15 o 20 minutos, pero si se trata de lúpulos de amargor, estos se incorporan desde el primer minuto. El amargor que concede el lúpulo es proporcional al tiempo que se encuentra sometido a altas temperaturas y a la concentración de alfa ácidos (3). Al finalizar el hervor, los sólidos en forma de sedimento o cualquier residuo de lúpulo tiene que ser separado del mosto caliente por medio de algún tipo de filtración, para luego ser enfriado y enviado al fermentador (2). Como resultado, el mosto presentará una gravedad inicial u original (OG), la cual es de suma relevancia, porque denota la cantidad de azúcares en el mosto antes de ser fermentado, usualmente medido con un densímetro (14).

Proceso Fermentativo

Esta etapa es de gran trascendencia, ya que en pocas palabras es aquí donde el mosto se convertirá en cerveza. Por lo general, antes de realizar el proceso anaerobio de fermentación, se necesita airear el mosto para que la levadura cuente con el oxígeno necesario para su reproducción. El tipo de levadura empleada va a determinar los

diferentes flavors y propiedades de la cerveza, además de los parámetros de fermentación. La fermentación del mosto es iniciada con la inoculación de la levadura seleccionada y el número de células dependerá de la cantidad y concentración del mosto. Como ya se ha mencionado anteriormente, las lager son inoculadas a temperaturas más bajas que las ale (4 – 13°C), por consiguiente el tiempo de fermentación será mayor. Como el mosto se convierte en cerveza, y los azúcares son transformados en alcohol y dióxido de carbono principalmente, esto contribuye al declive de la gravedad original del mosto (10). Con el dato de gravedad final (FG), que es la densidad del mosto al terminar la fase fermentativa, se puede corroborar que efectivamente hubo una fermentación alcohólica y por ende un contenido de alcohol final (14).

Más adelante, se explicará de forma minuciosa el proceso y reacciones de fermentación.

Procesos Post-fermentación

El producto de la fermentación es la llamada “cerveza verde” o inmadura (no es de color verde, pero tiene flavors inmaduros inaceptables) (14). Existen varias opciones posibles para acondicionar la cerveza a una forma adecuada para el consumo (2).

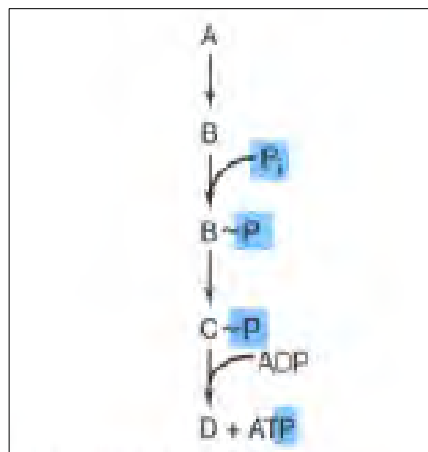
Algunos cerveceros, para refinar el flavor de la cerveza, mantienen un periodo de maduración donde la misma es almacenada a -2°C por grandes lapsos, en ocasiones meses, mientras una fermentación secundaria ocurre lentamente. También se logra realizar una segunda fermentación adicionando azúcar, lo que aumenta el metabolismo de la levadura y genera una cerveza con mayor carbonatación (10).

Una vez realizada la fase de acondicionamiento, generalmente se procede a realizar una filtración para eliminar los rastros de levadura presentes en la cerveza. Ulteriormente, una pasteurización o filtración estéril para eliminar los microorganismos que causan deterioro (2).

En realidad, la cuidadosa selección de materia prima y buenas condiciones del proceso ayudan a los productores de cerveza a obtener un producto de calidad: un color claro y brillante, con una estable espuma blanca al ser servida, con flavors y contenido de gases estables, y por supuesto libre de microorganismos que provoquen un rápido deterioro.

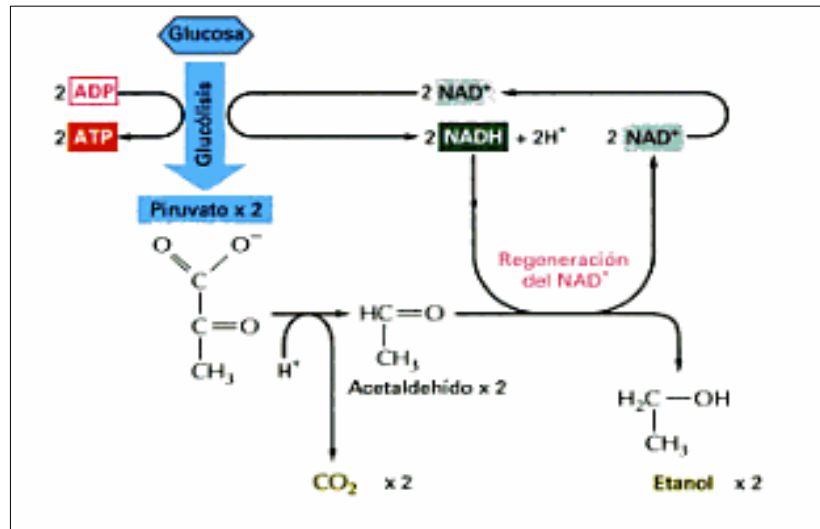
1.3. Fermentación

La fermentación, según la biología, es un tipo de obtención de energía que, al igual que la respiración aeróbica, se inicia en la glucólisis y produce ATP como producto de fosforilación a nivel de sustrato (figura 1.9). Difiere en que sus reacciones se dan en ausencia de oxígeno: no existe un aceptor final de electrones. Se produce la oxidación del NADH (cofactor enzimático) para formar, en este caso, etanol y CO₂ y éste se regenera para volver a la etapa de glucólisis. Es por eso que la fermentación es denominada una reacción de óxido-reducción (6,15), esto se ilustra de mejor manera en la figura 1.10 y en la figura 1.11.



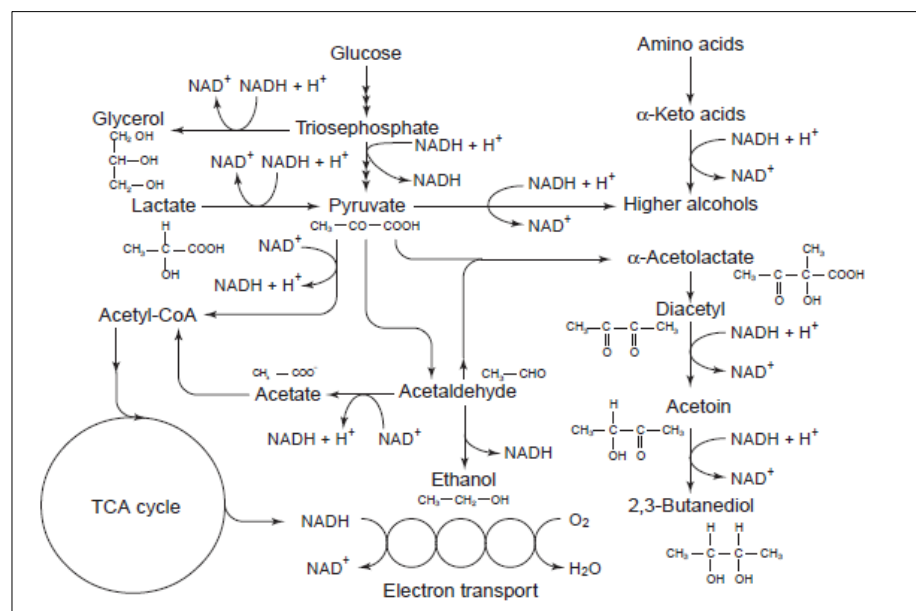
Fuente: Madigan, et al., 2009 (6)

FIGURA 1.9 FOSFORILACIÓN A NIVEL DE SUSTRATO



Fuente: Bray, Dennis, 2006 (15)

FIGURA 1.10 FERMENTACIÓN QUE OCASIONA EXCRECIÓN DE ETANOL Y CO₂



Fuente: Briggs, et al., 2004 (10)

FIGURA 1.11 ALGUNAS REACCIONES DE EQUILIBRIO REDOX UTILIZANDO A NAD⁺ COMO COENZIMA

Desde el punto de vista técnico de la cerveza, la fermentación es la descomposición del mosto, ejecutado por una cepa específica de levadura con la finalidad de obtener etanol, CO₂ y otros sub-productos como: alcoholes superiores alifáticos y aromáticos, ésteres, ácidos orgánicos, compuestos carbonílicos, compuestos que contienen azufre y alcoholes polihídricos, que en conjunto determinan las propiedades y calidad de la cerveza (1).

Bioquímica de Fermentación

Analizar la bioquímica de fermentación resulta complejo por la cantidad de reacciones aún bajo estudio. Sin embargo, se puede afirmar con certeza que el crecimiento celular de la levadura y la conversión del mosto en cerveza son los dos principales eventos que ocurren de manera simultánea durante la fermentación.

La composición del mosto es uno de los tres puntos clave que influyen en la bioquímica de fermentación, dado que brinda los nutrientes necesarios para que se lleve a cabo el metabolismo de la levadura. También se encuentra dentro de este grupo el genotipo y el fenotipo de la levadura. Por ejemplo, la tolerancia que tiene una levadura hacia un máximo contenido de azúcar en el mosto o

hacia una cierta concentración de etanol depende del genotipo de la levadura (2), es algo inherente en su cepa, está en sus genes.

Por otro lado, la levadura tiene diferentes respuestas bioquímicas hacia cambios en el ambiente como una disminución drástica en el pH, o en la actividad de agua, fluctuaciones de temperatura o elevada presión hidrostática producto de la geometría del fermentador, etc. Es allí en donde se manifiesta la expresión fenotípica, cómo la levadura puede manejar el estrés.

Balance de Masa

Para comprender un poco más sobre la fermentación, se tiene el siguiente balance de masa de la reacción en general (2):

Azúcares (150 g/L) + FAN (150 mg/L) + Levadura (1 g/L) + Oxígeno (25 mg/L) → Etanol (45 g/L) + CO ₂ (42 g/L) + Levadura (5 g/L)
--

Dependiendo de la gravedad específica o densidad relativa del mosto, se considera común el uso de entre 5 y 20 millones de células/mL de mosto y esto puede resultar en un aumento de hasta 5 veces la masa inicial (10). Normalmente por cada molécula de

glucosa se producen 2 de etanol y 2 de dióxido de carbono, siendo repartidas en cantidades equimolares; pero en esta representación la cantidad de CO₂ es ligeramente menor a la de etanol debido a que posteriormente pequeñas proporciones son utilizadas en reacciones anabólicas de carboxilación (2).

Asimilación de Nutrientes del Mosto

Carbohidratos. En la tabla 3 se muestra el orden que las levaduras consumen los azúcares presentes en el mosto:

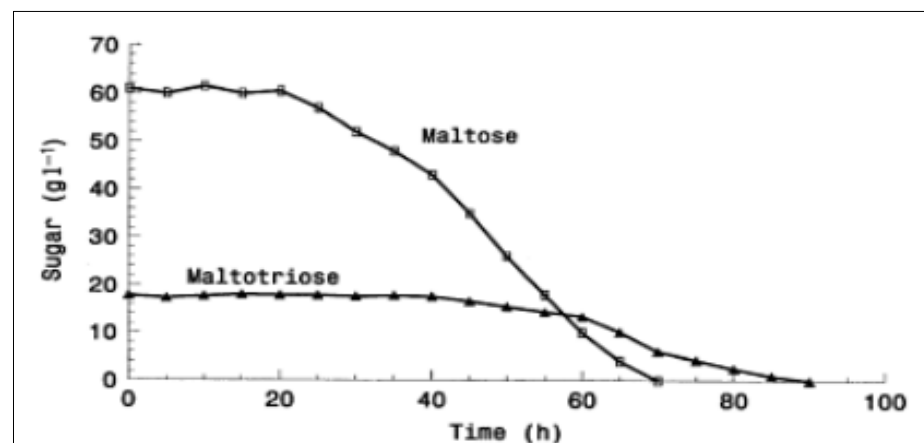
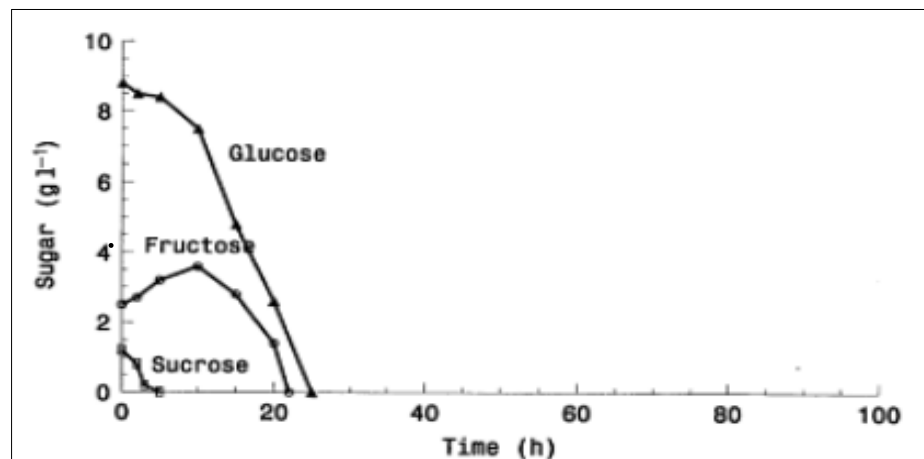
TABLA 3
ORDEN DE CONSUMO DE AZÚCARES DEL MOSTO

Orden	Azúcar
1	Sacarosa
2	Glucosa
3	Fructosa
4	Maltosa
5	Maltotriosa

Fuente: Adaptado de Palmer, John, 2006 (3)

El patrón de consumo de azúcares de un mosto de 1.040 en una fermentación tipo ale se muestra en la figura 1.12. Se puede apreciar la rápida desaparición de la sacarosa, y además un

aumento en la concentración inicial habitual de las hexosas en el mosto debido a la hidrólisis de la sacarosa (glucosa > 8%; fructosa > 2% (3)).



Fuente: Boulton & Quain, 2013, (2)

FIGURA 1.12 UTILIZACIÓN DE AZÚCARES DURANTE UNA FERMENTACIÓN ALE DE UN MOSTO CON GRAVEDAD ESPECÍFICA ORIGINAL DE 1.040

En cambio la maltosa se va consumiendo lentamente y desaparece del medio poco después de las 70 horas. La maltotriosa es la última en asimilarse por completo. El orden va desde las moléculas más simples como los monosacáridos hasta las más complejas como los oligosacáridos.

Para el transporte hacia el interior de la célula, la glucosa tiene dos vías: difusión simple o difusión facilitada por proteínas transportadoras llamadas "Carrier". Los carrier están involucrados en dos tipos de sistemas de consumo: alta afinidad y baja afinidad. El sistema de alta afinidad depende de las concentraciones de glucosa extracelular; si ésta es alta, el sistema entra en represión. Por el contrario, el sistema de baja afinidad no depende de las condiciones fisiológicas en las que se encuentre la célula; es decir, es un sistema constitutivo (2).

Para que la levadura asimile el disacárido sacarosa, necesita la ayuda de la enzima invertasa ubicada en el periplasma celular, liberando glucosa y fructosa que reingresan a la célula por los mecanismos ya mencionados. La maltosa, por su parte requiere de una enzima denominada maltosa permeasa en un transporte activo ligado a simporte de protones de potasio (K^+) (2). Cantidades

mayores a 15% de glucosa y fructosa pueden inhibir la fermentación de la maltosa (3).

Compuestos Nitrogenados. Los compuestos nitrogenados de mayor relevancia son los aminoácidos y los polipéptidos de cadena corta. El transporte hacia la célula lo realizan mediante permeasas: algunas específicas para determinados aminoácidos y otras generales denominadas GAP con amplia especificidad de sustrato. Se conoce de 16 sistemas de transporte de aminoácidos, 12 constitutivos y el resto sujetos a inhibición por altos niveles de compuestos nitrogenados en el medio (2).

Varios estudios revelan el efecto del fenómeno de represión catabólica por nitrógeno, y se ha hallado que las permeasas específicas tienden a estar involucrados en rutas anabólicas y las GAP en catabólicas (2).

En la tabla 4 se encuentran cuatro clases de aminoácidos presentes en el mosto. En la clase A se encuentran los más asimilables, en la clase B los que asimilan lentamente. En la clase C están los aminoácidos que no se comienzan a consumir hasta que los de la clase A no hayan desaparecido del mosto y la clase D

necesita la actividad de una oxidasa mitocondrial activa sólo en condiciones aeróbicas. Más adelante, el mismo autor los reclasificó según la importancia de su asimilación para el desarrollo del perfil de sabor de la cerveza (formación de metabolitos) o si podían ser sintetizados a partir de los azúcares del mosto. Esto se aprecia en la tabla 5 (2).

TABLA 4
CLASES DE AMINOÁCIDOS SEGÚN EL ORDEN DE ASIMILACIÓN DURANTE LA FERMENTACIÓN

Clase A	Clase B	Clase C	Clase D
Arginina	Histidina	Alanina	Prolina
Asparagina	Isoleucina	Amoníaco	
Aspartato	Leucina	Glicina	
Glutamato	Metionina	Fenilalanina	
Glutamina	Valina	Tirosina	
Lisina		Triptófano	
Serina			
Treonina			

Fuente: Adaptado de Boulton & Quain, 2013 (2)

TABLA 5
CLASES DE AMINOÁCIDOS PRESENTES EN EL MOSTO
BASADOS EN EL EFECTO DEL DESEMPEÑO DE LA
FERMENTACIÓN Y ANÁLISIS DE CERVEZA

Clase 1	Clase 2	Clase 3
Aspartato	Isoleucina	Lisina
Asparagina	Valina	Histidina
Glutamato	Fenilalanina	Arginina
Treonina	Glicina	Leucina
Serina	Tirosina	
Metionina		
Prolina		

Fuente: Adaptado de Boulton & Quain, 2013 (2)

Se ha demostrado la inhibición del consumo de dipéptidos por la presencia de amoníaco, urea y otros aminoácidos. En contraste, la leucina induce su asimilación. En general las levaduras prefieren los péptidos L-estereoisómeros con residuos básicos (2).

Lípidos. Si no se encuentran en el mosto, estos deben ser sintetizados por la levadura con requerimiento de oxígeno. Los esteroides y ácidos grasos insaturados son esenciales para el crecimiento y óptimo desarrollo de la levadura, forman parte constitutiva de la membrana plasmática y le confieren estabilidad a la misma. En la fase estacionaria celular, en ausencia de oxígeno,

los esteroides presentes en el mosto no son consumidos. Los mostos que no se les retira las proteínas coaguladas llamadas "trub" tienen un mayor contenido de ácidos grasos insaturados (2).

El transporte hacia el interior celular se da por un sistema de difusión facilitada. Esto es debido a la naturaleza lipofílica de la membrana.

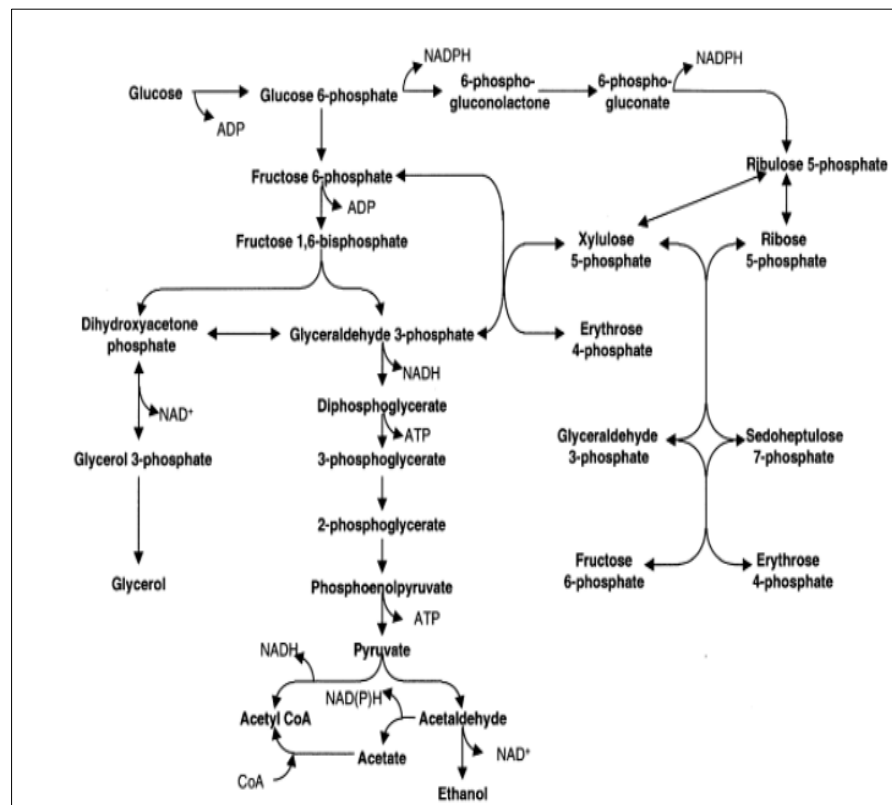
Metales Iónicos. Calcio, magnesio y zinc son nutrientes esenciales para diversas reacciones. Actúan como cofactores enzimáticos y en la regulación de transporte celular, entre otros. Pero la levadura tiende a concentrar en su interior toda clase de metales que se presenten en el medio, siendo muy poco selectiva. Esto puede acarrear en la competición de consumo de metales esenciales y no esenciales (2).

Existen dos mecanismos de entrada: bioabsorción y bioacumulación. El primero es un proceso pasivo, sin gasto energético, que se da de manera rápida sin ninguna clase de inhibición metabólica. El segundo, por su parte, es un proceso lento, dependiente de la temperatura y regulado por metabolitos inhibidores de su mecanismo. Además existen otros mecanismos

como: permeación, peroxidación lipídica, utilización de carriers, canales iónicos o incluso endocitosis (2).

Disimilación de Carbohidratos

La disimilación o catabolismo de carbohidratos en el proceso fermentativo toma diferentes caminos como se observa en la figura 1.13. La glucólisis, llamada indistintamente como la vía Embden-Meyerhoff es la preferida por la mayoría de las levaduras. La obtención de energía en forma de ATP se da, como se ha mencionado anteriormente, gracias a la fosforilación a nivel de sustrato (glucosa). Al menos 2% de la glucosa presente en el medio es metabolizada para la obtención de pentosas y hexosas (2) que posteriormente servirán para la síntesis de ácidos grasos y ácidos nucleicos. Esta ruta metabólica se inicia a partir de la glucosa-6-fosfato y se denomina ruta de la hexosa monofosfato o también pentosa fosfato (6).



Fuente: Boulton & Quain, 2013 (2)

FIGURA 1.13 RUTAS PARA LA DISIMILACIÓN DE LA GLUCOSA A ETANOL EN LEVADURAS VÍA GLUCÓLISIS Y LA DERIVACIÓN DE HEXOSA MONOFOSFATO

En el género *Saccharomyces* se ha estimado que las proporciones de glucosa y maltosa utilizadas para la producción de ATP por la ruta fermentativa fueron de 73% y 69%, respectivamente, y de esto sólo el 3% y 4% fueron metabolizados aeróbicamente (16).

Como las levaduras cerveceras son generalmente anaerobias facultativas, bajo las condiciones apropiadas pueden realizar todo el proceso aerobio obteniendo mayor cantidad de ATP gracias a la fosforilación oxidativa. Se asume que quien regula el intercambio entre proceso anaerobio y aerobio es justamente la disponibilidad de oxígeno (2) pero además existen otros efectos reguladores del metabolismo de azúcares como se ilustra en la tabla 6. Estos efectos no solo abarcan al género *Saccharomyces* sino también otros como *Brettanomyces* (conocida como una levadura salvaje).

TABLA 6
MECANISMOS PARA LA REGULACIÓN DEL
METABOLISMO DE AZÚCARES EN LEVADURAS.

MECANISMO	DESCRIPCIÓN
Efecto Pasteur	Inhibición de la fermentación alcohólica en presencia de oxígeno, o activación de glicólisis por anaerobiosis.
Efecto Crabtree – a corto plazo	Instantánea formación aeróbica de etanol siguiendo una transición de limitación de carbono a un exceso de carbono.
Efecto Crabtree – a largo plazo	Formación aeróbica de etanol a elevadas tasas de crecimiento bajo condiciones de exceso de o limitación de azúcar.
Efecto Custers	Estimulación por oxígeno de la fermentación de glucosa a etanol (<i>Brettanomyces</i>).

Efecto Kluver	Ausencia de fermentación alcohólica de ciertos azúcares, particularmente disacáridos aunque glucosa sea fermentada.
Inactivación y represión catabólica por carbono	Supresión del metabolismo respiratorio por altas concentraciones de azúcar.

Fuente: Adaptado de Boulton & Quain, 2013 (2)

Tolerancia al Etanol

La tolerancia de la levadura hacia etanol es un punto crítico en el proceso ya que todo cervecero, o al menos la mayoría, desea obtener una cerveza de alto grado alcohólico. Esta tolerancia se debe a diversos factores mencionados a continuación (2):

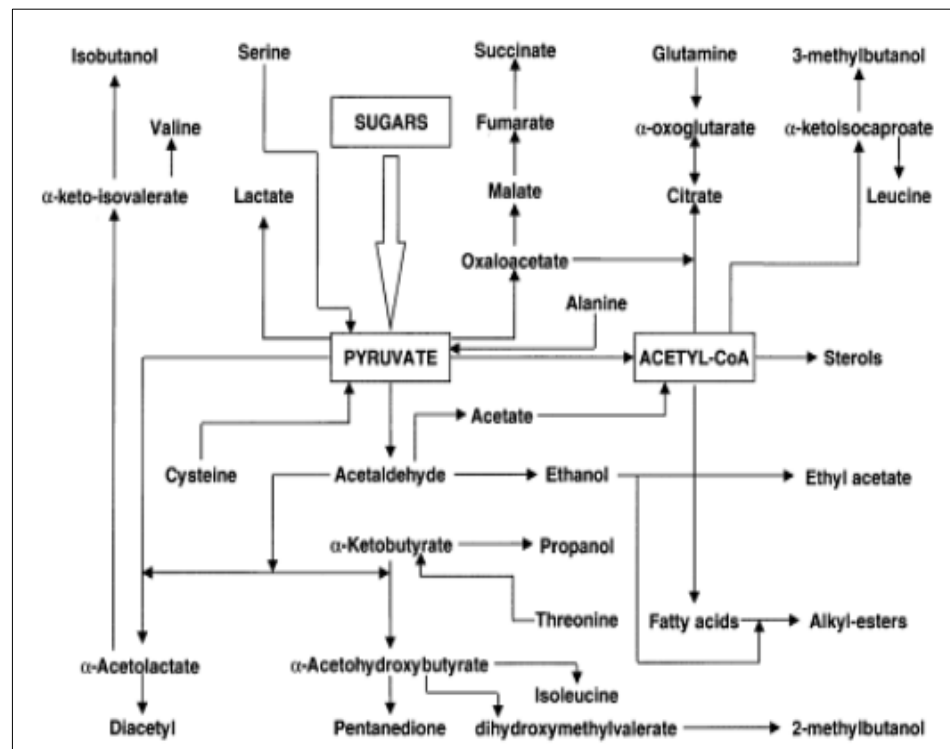
- Genética de la levadura
- Condiciones fisiológicas de la levadura
- Ambiente físico
- Composición del mosto
- Toxicidad del etanol e intermediarios

Las levaduras cerveceras tienen una moderada capacidad para tolerar etanol, y se ha encontrado levaduras en donde la tolerancia del etanol aumenta conforme disminuye la temperatura (17). En el

apéndice A se encuentra una lista parcial de levaduras y su tolerancia al etanol.

Formación de Compuestos de Sabor y Aroma

La formación de compuestos de sabor y aroma son producto de un metabolismo secundario, finalizando la fase logarítmica de crecimiento y entrando a la fase estacionaria (2,10). En la figura 1.14 se logra observar la desviación de piruvato a diversas rutas metabólicas secundarias para la formación de distintos compuestos que caracterizan la calidad sensorial de la cerveza resultante y dependiendo de su cantidad pueden tener o no un impacto positivo.



Fuente: Boulton & Quain, 2013 (2)

FIGURA 1.14 ROLES CENTRALES DEL PIRUVATO Y ACETIL-COA EN DIVERSAS RUTAS DE LA UTILIZACIÓN DE NUTRIENTES DEL MOSTO Y FORMACIÓN DE METABOLITOS ACTIVOS DEL SABOR.

Compuestos Carbonílicos. Son sustancias altamente volátiles formadas durante la maceración y cocción del mosto, siendo metabolizados por la levadura en la etapa de fermentación (2,18). Este grupo es liderado por los aldehídos, principalmente el acetaldehído (que puede encontrarse en concentraciones tan altas como 37.2 mg/L), y aldehídos de cadenas carbonadas largas como

nonadal, decanal, dodecanal (18). Dejan un sabor y aroma a frutas o incluso a plantas que no suele ser muy agradable a concentraciones elevadas (2). Formaldehído, una sustancia precursora del formato (causa ceguera), puede ser encontrado en cantidades muy poca significativas como 0.17 mg/L (18).

Por otra parte se encuentran las cetonas, en especial las dicetonas vecinales, conocidas por sus siglas en inglés como VDK, cuyo grupo lo lideran el diacetilo (2,3-butanodiona) y la 2,3-pentanodiona, ambos brindando un sabor y aroma a caramelo de mantequilla con un umbral de concentración de 0.15 y 0.9, respectivamente (2) cuya presencia no deseada en cervezas tipo lager es el resultado de un proceso defectuoso (10). Su formación proviene, como se observa en la figura 1.14 del metabolismo del acetaldehído en donde es convertido en α -acetolactato dentro de la célula, la cual al encontrarse en concentraciones elevadas es excretada al exterior y ésta a su vez es descarboxilada en presencia de oxígeno originándose el diacetilo y la 2,3-pentanodiona (2). Ésta reacción es ayudada por temperaturas altas y bajo pH pero puede ser reabsorbida por la levadura en condiciones óptimas (19).

Ésteres. Son compuestos que posiblemente participan en la mayoría del perfil aromático y de sabor en la cerveza, con sus toques florales y frutales, entre otros (2). Los más importantes son: etil-acetato, con un perfil frutal/solvente, en concentraciones desde 10 mg/L hasta 69 mg/L (18); isoamil acetato e isobutil acetato, con perfiles frutales con un mayor despliegue del sabor y olor a banana; y por último un sabor anisado/frutal del etil caproato y un perfil floral, de miel o manzana del 2-feniletacetato (2). Otros ésteres generalmente se encuentran en concentraciones menores a 1 ppm (10). La producción de ésteres puede ser producto de reacciones entre alcoholes primarios o superiores y ésteres de acil-CoA (2) como se puede apreciar en la figura 1.14 a partir del propio etanol.

Principios Básicos de la Tecnología de Fermentación

Fermentabilidad del Mosto

El principal objetivo es fermentar hasta obtener el porcentaje de atenuación o etanol deseado. Esto se puede lograr usando mostos con mayor cantidad de azúcares fermentables, que estimulen a una mayor conversión a etanol, disminuyendo la gravedad específica inicial (OG) o extracto original a una gravedad específica final (FG) determinada.

La proporción de sólidos disueltos o extracto que puede ser fermentado se denomina porcentaje de fermentabilidad del mosto o porcentaje de atenuación aparente y se calcula de la siguiente manera (10):

$$\text{Fermentabilidad (\%)} = \frac{\text{OG}(\text{°P}) - \text{FG}(\text{°P})}{\text{OG}(\text{°P})} \times 100$$

La gravedad específica es expresada en grados Plato (°P), que mide la concentración en términos de peso/peso como gramos de sólidos por 100 gramos de mosto. También puede ser expresada en °Sacch que relaciona la densidad del mosto con la del agua (densidad relativa) (10).

El densímetro es el instrumento de medición preferido para obtener los valores de gravedad específica. Pero al medir el FG o extracto aparente, éste ya no trabaja sobre una solución netamente acuosa sino hidroalcohólica, y el alcohol con menor densidad que el agua induce error pero se corrige con la siguiente fórmula propuesta (20):

Extracto real (°P)

$$= 0.8192 \times \text{Ext. Aparente}(\text{°P}) + 0.1808 \times \text{Ext. Original}(\text{°P})$$

Con este resultado de extracto real (E) se puede cuantificar el porcentaje de carbohidrato fermentado, que es el grado de fermentación real o porcentaje de extracto fermentado, conocido por sus siglas en inglés como RDF (Real Degree of Fermentation) (21):

$$\text{RDF (\%)} = \frac{\text{OG}(\text{°P}) - \text{E}(\text{°P})}{\text{OG}(\text{°P})} \times \frac{1}{1 - (0.005161 \times \text{E}(\text{°P}))} \times 100$$

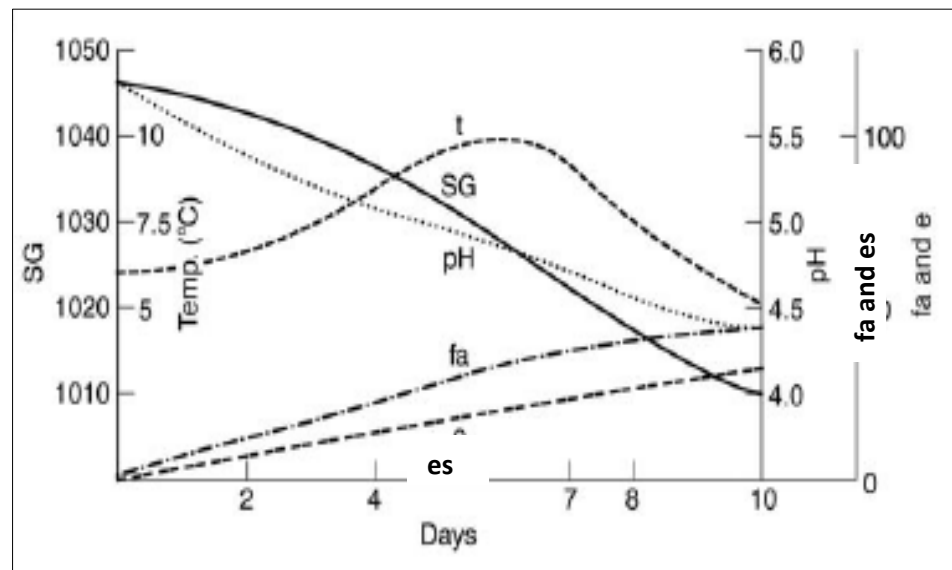
Además, con los datos de gravedad inicial y final, por medio de una fórmula aproximada se puede hallar el alcohol por volumen:

$$\% \text{ABV} = (\text{OG} - \text{FG}) \times 131 \quad (10)$$

Los valores de OG y FG esta última fórmula deben ser expresados en términos de densidad relativa, tomando la densidad del agua como 1 g/L.

Tiempo de Duración de la Fermentación

En la figura 1.15 se ilustra una fermentación tipo lager finalizada en 10 días, donde además se puede notar que la biomasa es inversamente proporcional a la gravedad específica. A medida que ésta aumenta, el consumo de sustrato aumenta y los azúcares se van convirtiendo en alcohol. Además, el pH del medio disminuye alrededor de una unidad debido a la formación de ácidos orgánicos que se excretan hacia afuera de la célula. Se debe tener presente la incidencia en las características organolépticas de los alcoholes de fusel o alcoholes superiores, ya que una gran cantidad de ellos podrían arruinar la calidad de la cerveza o incluso llegar a ser nocivos para la salud humana si se formarían dentro de ella (ejemplo: metanol).



Fuente: Adaptado de Briggs, et al., 2004 (10)

FIGURA 1.15 CURSO DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN PARA UNA CERVEZA LAGER. FA, NIVEL DE ALCOHOLES DE FUSEL ($\mu\text{G/L}$); ES, NIVEL DE ÉSTERES ($\mu\text{G/L}$); T, TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)

1.4. Microorganismos de la Antártida

Proyecto Antártida – CIBE

El Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) arrancó en el año 2009 con el establecimiento de un banco de microorganismos antárticos con la finalidad de evaluar su potencial en la biotecnología. Este proyecto surgió gracias al convenio con el Instituto Ecuatoriano Antártico (INAE) (22).



Fuente: Monserrate, Lorena, 2013

FIGURA 1.16 XVII EXPEDICIÓN ECUATORIANA

En el año 2013 los investigadores del centro realizaron su primera excursión (figura 1.16). Se recolectaron muestras de diferentes zonas del sur de la Antártida cuando ésta se encontraba en su estación de verano, a una temperatura ambiental promedio de 8°C. Continuando con el proyecto: “Microorganismos antárticos: aislamiento, identificación, preservación y evaluación de su potencial biotecnológico”, gracias al financiamiento del SENESCYT a través del INAE y con el aval de la ESPOL, el equipo de trabajadores del centro lograron aislar e identificar alrededor de 400 muestras de microorganismos extremófilos (23).

Se determinaron, además, enzimas y otros compuestos útiles en áreas como la agricultura, medio ambiente, medicina y alimentos. Estos microorganismos y compuestos son preservados a una temperatura de -80°C y varios están siendo estudiados en la actualidad. De estos organismos vivos los que interesan en el presente proyecto son las levaduras.

Levaduras Antárticas

Al sur de la Antártida, en el archipiélago de Shetland, en sus islas Greenwich y Torres (figura 1.17) se tomaron muestras en zonas de interés debido a sus características de alta diversidad vegetativa.



Fuente: Monserrate Lorena, 2013

FIGURA 1.17 LOCALIZACIÓN DE LAS ISLAS DE GREENWICH

Se obtuvieron un total de 28 aislados y se descubrieron 4 géneros de levaduras, con una especie totalmente desconocida. Se analizó el perfil bioquímico y todas resultaron catalasa-positivo. Un solo género resultó positivo en la prueba de ureasa. Algunas especies del mismo género resultaron además positivas en las pruebas de peptidasa y amilasa. Y solo una especie, la que es objeto de estudio en este proyecto, pudo fermentar azúcares, los mismos que normalmente se encuentran en el mosto para hacer cerveza.

Aplicación en la Industria de Alimentos

De los microorganismos analizados en el CIBE hasta el día de hoy, se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en la tabla 7:

TABLA 7

APLICACIONES DE MICROORGANISMOS DE LA ANTÁRTIDA

Microorganismos	Panificación	Bebidas alcohólicas	Clarificación de jugos	Degradación de plásticos	Antimicrobiano
Bacterias	1	0	0	0	1
Levaduras	4	2	0	0	0
Hongos	0	0	1	1	0

Fuente: Monserrate, Lorena, 2013

CAPÍTULO 2

2. GENERALIDADES

2.1. Planteamiento del Problema

La Biotecnología se define como el uso controlado de microorganismos en procesos químicos específicos con el fin de poder aplicarlos a nivel industrial. Estos microorganismos deben ser previamente estudiados y caracterizados a nivel molecular y bioquímico (6,24).

En el campo de la Biotecnología Alimentaria se busca principalmente aplicar en la industria microorganismos que brinden facilidades tecnológicas e innovación en los productos finales. Con el afán de cumplir este objetivo, desde el 2013 el CIBE, con el auspicio del INAE, ha realizado expediciones a la Antártida, un enorme reservorio de microorganismos extremófilos, en donde se

han aislado alrededor de 400 especies, lográndose identificar 28 levaduras psicrófilas sujetas en la actualidad a estudios de bioprospección para descubrir su potencial uso en la industria de alimentos (23).

Una de las industrias de alimentos en la cual la biotecnología es pieza clave para sus procesos es la cervecera. El género *Saccharomyces* ha sido el más utilizado en la fermentación de azúcares presentes en el mosto para la producción de alcohol y dióxido de carbono. Pero hasta el día de hoy no se ha realizado ningún estudio sobre la utilización de levaduras extremófilas, mucho menos procedentes de la Antártida; es por eso que surge la necesidad de esta investigación de evaluar la levadura que tiene actividad a bajas temperaturas y que puede ser aplicable en el proceso de fermentación de cervezas.

2.2. Justificación

El negocio de la cerveza en Ecuador, específicamente, ha sido de suma importancia para su desarrollo socio-económico, con más de 170 millones de dólares en ganancias netas (25), siendo consumida por el 79.2% de los ecuatorianos que generalmente consumen bebidas alcohólicas (26) en una tasa promedio de 27

litros anuales per cápita (27). Artesanalmente entre las 42 microcervecerías registradas por la Sociedad Ecuatoriana de Cerveceros Artesanales (SECA) se producen entre 500 y 8000 litros mensuales con precios que van desde los \$2.70 (28). Ambos sectores, el industrial y el artesanal son las fuentes de empleo de alrededor de 1667 ecuatorianos según el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) (28).

En la producción de cerveza, elaborada de forma industrial o artesanal, *Saccharomyces* es el género más empleado debido a sus diversos estudios y adaptaciones, lo que ha brindado un mejor control del proceso de fermentación y características sensoriales específicas en el producto final.

Se trate de la especie *S. cerevisiae* en cervezas tipo ale, o *S. pastorianus*, *S. bayanus*, *S. uvarum* en las cervezas tipo lager, este género manifiesta una gran ventaja tecnológica debido a su tolerancia a cantidades mayores al 8% de etanol y a metabolitos tóxicos secundarios (29,30). Actualmente existe otro género aplicado en cervezas de origen belga: *Brettanomyces* (31) pero este no es tan popular en comparación con el primero.

Hablar de calidad en el mundo de la cerveza es algo muy subjetivo. La enorme variedad de cervezas existentes en el mercado global es una prueba de ello, con sus distintos perfiles de aroma, sabor, color y textura; pero en la mayoría las fuentes de variación, tomando de pivote el género de levadura, son el tipo de materia prima utilizada, tiempos, temperaturas y otros parámetros de procesos o una mezcla de todos ellos. Casi nadie se atreve a emplear otro género debido a que, como ya se mencionó, la levadura predilecta y más estudiada para cervecería es la *Saccharomyces* y sus distintas cepas.

Considerando la poca y limitada variedad de géneros estudiados en cervecería, y aprovechando la diversidad microbiana que el continente Antártico brinda, este proyecto tendría un impacto positivo en la ampliación de los conocimientos acerca de un nuevo género, extremófilo, aplicado en la elaboración de cerveza.

2.3. Objetivos

Objetivo General

Evaluar la cinética de fermentación de una levadura procedente de la Antártida y su posible aplicación en la elaboración de cervezas.

Objetivos Específicos

- Identificar mediante técnicas moleculares la levadura antártica.
- Determinar la temperatura y pH óptimos de fermentación de D-glucosa para la levadura antártica.
- Evaluar la aplicación de la levadura antártica en la fermentación de cervezas.

2.4. Hipótesis

La levadura antártica puede fermentar a bajas temperaturas los azúcares presentes en el mosto y puede ser empleada en la elaboración de cervezas a partir de cebada.

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

3.1. Identificación Molecular de la Levadura Antártica

Antes de iniciar con las pruebas de fermentación, se revisó la información provista por los ensayos previos realizados en el CIBE sobre la levadura antártica. Se obtuvo que la levadura fuera aislada e identificada como CIBE-12126 la cual fue sometida a varias pruebas bioquímicas. La levadura fue preservada a -80°C .

Con el objetivo de corroborar la información propuesta, se realizaron una serie de procedimientos moleculares para identificar género y especie de la levadura proveniente de la Antártida y que son descritos a continuación.

Aislamiento

Se realizaron resiembras de la levadura en cajas Petri extraídas de un medio de cultivo sólido enriquecido con caseína y de un medio enriquecido con marva hacia medios PDA (Potato Dextrose Agar) con 0.3% sulfato de estreptomina, antibiótico que evita cualquier posible contaminación bacteriana. Se hicieron dos réplicas por cada medio.

Luego de cinco días de incubación a 20°C se monitoreó el aspecto morfológico de las células mediante tinción GRAM y se observó en el microscopio óptico vertical marca Carl Zeiss (modelo: Axiostar plus).

A lo largo del tiempo se fueron realizando varias resiembras para mantener fresco el cultivo, debido a que luego de 10 días se notaba la presencia de pseudohifas en los alrededores de las colonias, producto del estrés por el agotamiento de los nutrientes esenciales del medio en las células periféricas (10). Además, se cogieron dos réplicas de cultivo puro para preservarlas mediante la técnica de criopreservación: mezclar 80% de medio líquido PDB (Potato Dextrose Broth) con 20% de glicerol, inocular una cantidad

suficiente de colonias en tubos eppendorf de 1.5 mL y almacenar a -80°C.

Extracción de ADN

Se colocaron dos réplicas de la levadura antártica y dos del control positivo *Saccharomyces cerevisiae* en cuatro tubos eppendorf de 1.5 mL llenandolós aproximadamente a 1/3 de su volumen, y se procedió a realizar la extracción aplicando el protocolo de “Rápida extracción de ADN genómico para hongos” (32).

El protocolo inició con la adición de 350 µL de buffer de extracción en los tubos, cuya composición se muestra en la tabla 8, los cuales fueron triturados con una maja de plástico estéril. Luego se agregaron 150 µL de acetato de sodio a 3M y pH 5.2, se mezcló el contenido de cada tubo realizando vortex y se almacenaron a -20°C por 10 minutos.

TABLA 8
COMPOSICIÓN DEL BUFFER DE EXTRACCIÓN

Reactivo	Concentración
Tris-HCl, pH 8.5	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0.5%

Fuente: Adaptado de Cenis, J., 1992 (32)

Se retiraron los tubos del congelador, se centrifugaron a 14000 rpm por 5 minutos en una microcentrífuga Eppendorf (modelo 5810R) y se extrajeron los respectivos sobrenadantes, transfiriéndolos a nuevos tubos. Este proceso se repitió una vez más.

Se agregó 500 μ L de isopropanol, se mezcló mediante vortex y se dejaron los tubos en reposo por 5 minutos a temperatura ambiente ($\sim 20^{\circ}\text{C}$). Después se centrifugaron los tubos a 14000 rpm por 2 minutos.

Se removieron los sobrenadantes por completo y se lavaron los pellet con 50 μ L de etanol al 70%. Se centrifugaron los tubos una vez más a 14000 rpm por 1 minuto y se sometieron a secado los pellet en un secador al vacío Eppendorf (modelo Vacufuge

Concentrator plus) por 5 minutos. Al final se agregaron distintos volúmenes de agua estéril en cada tubo para llevar las concentraciones de ADN a 50 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ aproximadamente. Se almacenaron a -20°C .

Se cuantificaron en el equipo espectrofotómetro NanoDrop 2000 (marca Thermo Scientific) las concentraciones de ADN [$\eta\text{g}/\mu\text{L}$] de las muestras, tomando alícuotas de 2 μL previamente tratadas con vortex para su total homogenización. El equipo calculó también la pureza de los ADN con los ratio 260/280 y 260/230. Dichos valores muestran la absorbancia de la muestra a esos valores de longitud de onda [ηm] y son aceptables valores inferiores a 2 que denotan un bajo contenido de otras sustancias distintas a ADN.

Amplificación por PCR y detección por Electroforesis

Se empezó con la preparación de un Master Mix como se muestra en la tabla 9, siguiendo el protocolo de Chaturvedi, et al., 2010, adaptado por el CIBE. La mezcla de reactivos debió manejarse con mucho cuidado, sobre todo aquellas más sensibles al choque de temperatura como los dNTPs (deoxinucleótidos), primers (cebadores, iniciadores o partidores) y la Taq polimerasa, los cuales fueron agregados al final en ese orden, esperando a que se

descongelen lentamente en una gradilla refrigerada. Al final se dispensó 24 μL del Master Mix en cada tubo de 200 μL , se le agregó 1 μL del ADN extraído de cada muestra y se homogenizaron durante 3 segundos en la microcentrífuga a 5000 rpm.

El siguiente paso realizado fue la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa, conocido por sus siglas en inglés como PCR (Polymerase Chain Reaction). Se utilizaron los primers ITS1 e ITS4 (ver secuencia en tabla 10) para poder amplificar las regiones ITS1, ITS2 y 5.8 S del ADN ribosomal. El proceso fue realizado en el equipo de termociclación Eppendorf Mastercycle Gradient, en el cual, siguiendo el mismo protocolo de Chaturvedi, et al., 2010, se colocaron los microtubos de manera ordenada y se corrió el programa que iniciaba con una desnaturalización a 94°C por 1 min seguido de 30 ciclos: desnaturalización a 94°C por 1 min; temperado a 55°C por 1 min; extensión a 68°C por 1 min; y una final extensión a 68°C por 3 min (33).

TABLA 9
COMPOSICIÓN DE MASTER MIX

	Concentración inicial	Concentración final para 25µL	Volumen para 25 µL
Buffer para PCR	10 X	1 X	2.5
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
Primer Forward ITS1	10 mM	0.4 mM	1
Primer Reverse ITS4	10 mM	0.4 mM	1
Taq polimerasa	5 U/µL	0.5 U	0.1
ADN	50 ng/µL	5 ng/µL	1
H ₂ O estéril	-	-	[25-6.85] = 18.15

Fuente: Adaptado De Chaturvedi, Et Al., 2010 (33)

TABLA 10
SECUENCIA DE PRIMERS

Primers	Secuencias nucleótidas
Forward ITS1	5' TCCGTAGGTGAACCTGCG 3'
Reverse ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

Fuente: Chaturvedi, et al., 2010 (33)

Terminada la termociclación, los microtubos fueron almacenados a -4°C para su uso a corto plazo.

Para la electroforesis, una técnica de separación de moléculas mediado por un campo eléctrico (34), primero se elaboró un gel de agarosa al 2% mezclando 1.6 gr de agarosa en 100 mL de solución buffer TAE [1X] (Tris-Acetato-EDTA). Se calentó en un microondas hasta ver una disolución clara, sin grumos. Se dejó enfriar hasta llegar a una temperatura de aproximadamente 40°C. y se adicionó, en ausencia de luz directa, 10 µL de SBYR Safe [10000X], un colorante fotosensible de cianina para ácidos nucleicos (35). Se vertió la solución en un molde retirando todas las burbujas de aire que podrían haber afectado la porosidad del gel.

Antes de solidificarse la solución, se colocó una plantilla en forma de peineta encima de la parte superior del mismo con el fin de formar mini moldes rectangulares y allí cargar las muestras.

Una vez solidificado y formado el gel, se colocó el mismo en el equipo de electroforesis (apagado) cubriéndolo con una solución de TAE [1X] y se colocaron en los moldes una mezcla homogenizada de 5 µL del producto de PCR con 2 µL de Blue loading dye [6X] para teñir la muestra y facilitar su detección. Se utilizó en el primer espacio un marcador molecular de 100 pb (Ladder Invitrogen) para comparar el tamaño de las regiones amplificadas del ADN llamadas

amplicones. Además, se utilizó un blanco que contenía sólo el master mix y un control positivo del laboratorio que siempre amplificaba. Se configuró el equipo a 100 voltios y 400 amperios por 30 minutos.

Se reveló el gel obteniéndose las imágenes de las bandas con los tamaños de los amplicones gracias al equipo transiluminador UV Bio-Rad Gel Doc™ XR. Los productos de PCR fueron almacenados a -20°C.

Secuenciación de Nucleótidos

Los productos de PCR que amplificaron correctamente fueron nivelados a una concentración entre 30 y 35 ng/μL y se llenaron en una placa que fue enviada al Instituto de Genómica de la Universidad de Florida para su secuenciación.

Los resultados fueron alineados utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Tool) con la base de datos GenBank recolectada por el NCBI (National Center for Biotechnology Information). Comprobado el origen de las dos levaduras, se pudo iniciar las siguientes pruebas de fermentación.

3.2. Diseño Experimental de las Condiciones Óptimas de Fermentación

Para llevar a cabo el experimento que determina los parámetros óptimos de fermentación de la levadura CIBE- 12126, básicamente se midió el dióxido de carbono producido por la fermentación de D-Glucosa a diferentes temperaturas y pHs, donde se siguió el siguiente procedimiento (en el apéndice B se muestran imágenes sobre la metodología empleada):

Temperatura Óptima

Cabe mencionar que los siguientes procedimientos fueron desarrollados bajo condiciones asépticas; en una cámara de flujo laminar y con todos los materiales completamente estériles.

Preparación de Medio Mineral

Se preparó un medio mineral con D-Glucosa con la composición propuesta por Hahn-Hägerdal et al., 2005 (36), realizando ligeros cambios: 0.5 g/L de sulfato de magnesio, 5 g/L de sulfato de amonio, 1 g/L de fosfato monopotásico y 20 g/L de D-Glucosa. Este medio fue ajustado a un pH de 3.6 y esterilizado por 15 minutos a 121°C.

Preparación de Inóculos:

Por medio de un asa se tomaron colonias de la caja Petri con medio PDA conteniendo la levadura antártica y se disolvieron en un tubo de ensayo con agua ultra pura, hasta llegar a una turbidez estándar de 0.5 Mc Farland. Esta medida fue tomada con el equipo DENSIMAT y para lograr una mezcla uniforme se agitó usando un vortex. Para preparar el inóculo de levadura con *Saccharomyces cerevisiae* se siguieron los mismos pasos efectuados anteriormente.

Inoculación en los Tubos

Luego, se procedió a dispensar 35 mL del medio previamente preparado en 20 tubos de ensayo con tapa rosca, de 40 mL de capacidad. Inmediatamente, dentro de cada tubo se colocó una campana Durham graduada para medir la producción de CO₂ (37), llenada con el mismo medio de cultivo empleando pipetas Pasteur.

Estos 20 tubos fueron divididos en 5 grupos, ya que tenían que ser evaluadas 5 temperaturas distintas: 4, 10, 16, 20 y 26°C. Cada grupo constó de dos réplicas usando la levadura en estudio (CIBE-12126), un control positivo utilizando una levadura comercial (*S. cerevisiae*) y un blanco negativo (sin inóculo). En cada tubo se

colocó 1 mL del inóculo correspondiente antes preparado, se taparon y se llevaron a incubadoras bajo las temperaturas ya mencionadas. Cada 24 horas, por 30 días seguidos se midió la cantidad de dióxido de carbono que mostraba la campana Durham.

Procesamiento de los Datos

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa Excel. Para cada temperatura, se graficó el CO₂ producido diariamente de las dos replicas y se trazó una línea de tendencia para cada una de ellas. Los valores de las pendientes se promediaron, ya que representan la velocidad de fermentación promedio en (mm³ CO₂/día) a la temperatura dada. Finalmente, las velocidades de fermentación promedio para las 5 diferentes temperaturas fueron ajustadas al modelo de Rosso empleando el complemento estadístico de Excel: XLSTAT. El modelo de Rosso explica el efecto de la temperatura en el comportamiento cinético de la levadura (38):

$$\mu(T) = \frac{\mu_{opt}(T - T_{max})(T - T_{min})^2}{(T_{opt} - T_{min})[(T_{opt} - T_{min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} + T_{min} - 2T)]}$$

Donde,

μ_{opt} : velocidad óptima

$T_{\text{máx}}$: temperatura máxima

T_{min} : temperatura mínima

T_{opt} : temperatura óptima

pH Óptimo

El experimento del pH óptimo se realizó con una metodología similar mostrada en el experimento para temperatura óptima, con ligeras modificaciones detalladas a continuación:

Se prepararon medios minerales con D-Glucosa, pero esta vez ajustados a doce distintos valores de pH: 1.6, 2.6, 3.6, 4.6, 5.6, 6.6, 7.6, 8.6, 9.6, 10.6, 11.6 y 12.6. Se usaron en total 48 tubos de ensayo, cada uno con su respectiva campana Durham graduada. Igualmente, se armó un juego de tubos para cada pH: con dos replicas, un control positivo y un blanco negativo, los cuales fueron colocados en una incubadora a la temperatura óptima hallada en el experimento anterior.

De la misma manera, se tomaron las mediciones dióxido de carbono diariamente por 30 días y para este caso se usó el modelo de Rosso que describe el efecto del pH sobre la cinética de la levadura (38):

$$\mu(pH) = \frac{\mu_{opt}(pH - pH_{min})(pH - pH_{max})}{(pH - pH_{min})(pH - pH_{max}) - (pH - pH_{opt})^2}$$

Donde,

μ_{opt} : velocidad óptima

$pH_{m\acute{a}x}$: pH máximo

pH_{min} : pH mínimo

pH_{opt} : pH óptimo

3.3. Elaboración de Cerveza

Una vez encontrados la temperatura y el pH óptimos de fermentación se procedió a la elaboración de cerveza con métodos artesanales, tomando como base una receta de cerveza Pilsen (3), con ciertas alteraciones en el proceso para obtener alrededor de 5.5 litros, como se especifica a continuación. El apéndice C muestra algunas figuras sobre esta sección.

Limpieza Preliminar

Antes de comenzar de lleno con la elaboración de cerveza, es importante limpiar todos los materiales de la manera correcta para evitar contaminación. Se lavaron los utensilios con detergente neutro y luego fueron enjuagados con agua caliente.

Preparación del Mosto

Molienda

Se inició la preparación del mosto utilizando 2 kg de malta de cebada tipo Pilsen marca Patagonia, la cual fue triturada en un molino manual Corona. Hay que tener en cuenta que en la molienda se debe partir el grano, no transformarlo netamente en harina.

Maceración

La maceración fue realizada por infusión, los 2 kg de malta molida se repartieron en tres pequeñas bolsas de malla fina. Se calentaron 11 litros de agua embotellada marca "Mi comisariato" en una olla de acero inoxidable hasta alcanzar una temperatura de 68°C y se introdujeron las bolsas llenas del grano molido. Se mantuvo dicha temperatura constante por 1 hora, verificando el proceso con un termómetro.

Cocción del mosto

Transcurrida la hora de maceración, se llevó el mosto a hervor (punto de ebullición) y se retiró el precipitado de turbios, que es la espuma marrón formada arriba del mosto. Se conservó la ebullición por una hora exacta, donde desde el comienzo de la misma se

añadieron 11.2 g del lúpulo Northern Brewer (6.4% A.A.) y posteriormente se agregaron 8.2 g del lúpulo Saaz (4 %A.A.) a los 30 y en los últimos 15 minutos.

Enfriamiento

Una vez que el mosto estuvo sometido a hervor con los lúpulos, se procedió a enfriar rápidamente hasta llegar a los 20°C. Se lo realizó colocando la olla en una tina con hielo y agua, verificando la temperatura con un termómetro. Luego, por decantación se separaron los residuos sólidos del mosto, es decir, se esperó que las partículas en suspensión se sedimenten en el fondo de la olla para retirar netamente el líquido sobrenadante.

Además, en esta etapa se midió la gravedad original (OG), el pH y el oxígeno disuelto del mosto a 20°C. Se tomó una muestra de 200 mL en una probeta lo suficientemente grande para colocar el densímetro y luego medir el pH con el equipo ORION3STAR marca Thermo Scientific.

Fermentación

Finalizadas las mediciones en el mosto, este fue transferido a un pequeño tanque plástico de Policiclohexilenodimetileno Etileno

Tereftalato (PETG) de 5 litros de capacidad con una trampa de aire, conocido como “airlock”, en la parte superior (con alcohol al 40% en su interior). Días atrás se realizaron algunos pasos antes de inocular el mosto con la levadura antártica:

Primero, se creó un “Starter” o medio de cultivo líquido específico para propagar la levadura y obtener la biomasa necesaria. Se utilizó 25 mL de agua destilada más la siguiente composición: 20 g/L de D-Glucosa, 20 g/L de extracto de malta y 1 g/L de peptona (39) en un matraz de Erlenmeyer, el cual fue previamente esterilizado y donde se introdujeron 10 colonias de la levadura antártica extraídas con un asa de la caja Petri con medio PDA donde se encontraba. Se homogenizó la mezcla agitando suavemente, se tapó el recipiente con aluminio no muy ajustado y se lo llevó a una incubadora con shaker New Brunswick marca Eppendorf a 20°C con 120 rpm. Se esperó crecimiento por 24 horas.

Pasadas las 24 horas, para la siguiente propagación se transfirieron 10 mL del medio con levadura a otro medio de extracto de malta con mayor volumen (250 mL). De igual forma se tapó el

medio y se sometió a agitación en la incubadora con shaker a 20°C por 24 horas más.

Una vez listo el “Starter” con suficiente biomasa, se contó el número de células presente en el mismo, usando una cámara de Neubauer y observando en el microscopio, como sugiere la metodología de Oscar Bastidas de la compañía Celeromics (40). Se determinó una concentración de 200 millones de levaduras por mL. Gracias a este conteo, se pudo determinar la cantidad aproximada necesaria de Starter a inocular en el mosto. Primero se usó la siguiente fórmula (7):

$$\text{Células a inocular} = (1,000,000) \times (\text{mL de mosto}) \times (\text{°P del mosto})$$

Dando un total de células de levadura a inocular en el mosto de 45 billones. Para llegar a esta proporción de células se suministró 225 mL de Starter en el tanque fermentador. Ulteriormente se colocó el tanque fermentador en una incubadora a la temperatura óptima hallada con anterioridad. No se usó el pH óptimo encontrado para esta fase, ya que es inapropiado modificar el pH característico del mosto a través de sustancias químicas.

Se tomaron mediciones de gravedad final (FG) de la cerveza cada semana y la fermentación terminó cuando este valor fue constante. Estas mediciones fueron realizadas recogiendo una muestra del tanque con una probeta para introducir el densímetro. Al obtener la gravedad final, se calculó el porcentaje de fermentabilidad del mosto mediante la siguiente ecuación (10):

$$\text{Fermentabilidad (\%)} = \frac{\text{OG}(\text{°P}) - \text{FG}(\text{°P})}{\text{OG}(\text{°P})} \times 100$$

Se calculó también el extracto real (20) y con dicho valor se obtuvo el grado de fermentación real (RDF) (10):

$$\text{Extracto real (°P)} = 0.8192 \times \text{FG}(\text{°P}) + 0.1808 \times \text{OG}(\text{°P})$$

$$\text{RDF (\%)} = \frac{\text{OG}(\text{°P}) - \text{E}(\text{°P})}{\text{OG}(\text{°P})} \times \frac{1}{1 - (0.005161 \times \text{E}(\text{°P}))} \times 100$$

Además, se halló el porcentaje de alcohol por volumen (%ABV) con la fórmula mostrada a continuación (10):

$$\% \text{ABV} = (\text{OG} - \text{FG}) \times 131$$

Donde OG y FG están expresados en términos de densidad relativa, tomando como referencia la densidad del agua como 1 g/cm³

Post-fermentación

Transcurrido el tiempo de fermentación necesario, se procedió a quitar el tanque fermentador de la incubadora. Por decantación se retiró el sedimento de levadura de la cerveza y se transfirió su contenido a un botellón de plástico. Finalmente, se cogió una muestra representativa para medir el pH y hacer los análisis consiguientes.

3.4. Identificación de Compuestos Químicos Mediante CG-EM

El fin de identificar compuestos químicos en la cerveza es determinar si ésta contiene o no compuestos nocivos o tóxicos para el consumo humano.

La Cromatografía de gases es una técnica de separación de los componentes volátiles de una mezcla determinada. Ésta fluye por una columna gracias a la fase móvil gaseosa pura. La otra fase que complementa la técnica es la estacionaria. Esta fase retiene, en distintos tiempos, los componentes de la mezcla según la afinidad

química que tengan con ella, si no existe afinidad, ésta pasa de largo con la fase móvil (41,42). Al final se obtiene los componentes separados de manera individual que pasan a un detector: el espectrómetro de masas. Este detector/analizador viene acoplado al equipo y es el encargado de romper los enlaces moleculares de cada uno de los componentes aislados de la mezcla mediante una fuente de ionización (43). Finalmente, el analizador cuantifica los iones según sus valores masa/carga y se comparan los espectros de masa con la base de datos del software del equipo para determinar la naturaleza de los compuestos (41). También se puede obtener la concentración determinando el área de cobertura y la altura de los picos cromatográficos.

Una vez introducida la base teórica fundamental se explica a continuación los pasos seguidos en esta etapa del proyecto:

Previo a la Cromatografía de Gases por Espectrometría de Masas (CG-EM), se tuvo que acondicionar la muestra y extraerla mediante Microextracción en Fase Sólida (MEFS). Del contenedor de cerveza filtrada se tomó una muestra de 35 mL en un tubo falcon de 50 mL y se centrifugó para aislar restos de levaduras suspendidas o de componentes de carácter lipídico y proteico que

ensuciasen la metodología de extracción de los compuestos volátiles y semi-volátiles. Se retiró el sobrenadante y se lo colocó en un vial.

Se llevó la muestra a baño maría a una temperatura de 55°C durante media hora. Después se insertó en el vial una jeringa portadora de la microfibrá de sílice fundida de 65 µm recubierta con polidimetilsiloxano/Carboxen/divinilbenceno (PDMS/DVB), utilizando el método del espacio de cabeza en el cual la fibra no debía tocar la muestra líquida sino permanecer suspendida (44,45), y se esperó media hora más a las mismas condiciones (45).

La microfibrá, entonces, fue retirada e insertada en el cromatógrafo acoplado a espectrómetro de masas marca Agilent Technologies, para la desorción de los componentes de la fibra al equipo durante 5 minutos bajo la siguiente configuración: temperatura de inyección, 240°C; temperatura del detector, 280°C; columna capilar HP-5MS (30m x 0.25 mm) con fenil dimetilpolisiloxano como fase estacionaria; y helio, como fase móvil (1 mL/min). El equipo analizó la muestra por otros 32 minutos, aproximadamente, manteniéndose el siguiente sistema en el horno: 0.5 minutos a

70°C; tasa de incremento de temperatura de 5°C por minuto hasta alcanzar 180°C y de 10°C por minuto hasta llegar a 310°C.

Se repitió todo el proceso desde el inicio con la muestra de una cerveza del mercado. Finalmente con el cromatograma obtenido se extrajeron los picos más representativos, eliminando curvas superpuestas que interferían en el análisis de los resultados. Se logró comparar si en el perfil de volátiles (compuestos aromáticos y de sabor) de la cerveza con la levadura antártica se encontraba algún compuesto tóxico que no haya sido identificado en la cerveza comercial.

En el apéndice D se muestran gráficamente los detalles de esta etapa.

3.5. Prueba Sensorial

Previo a la prueba sensorial se realizaron dos pruebas microbiológicas propuestas por la norma INEN para cerveza. Las especificaciones se muestran en la tabla 11.

TABLA 11
REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS

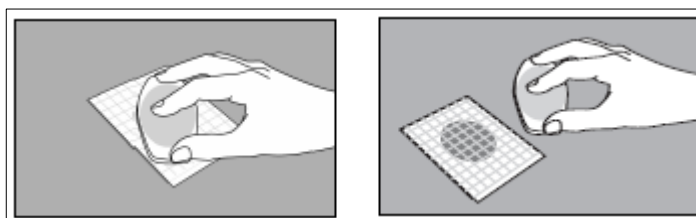
Requisitos	Unidad	Cerveza no pasteurizada	
		Mín.	Máy.
R.E.P	UFC/cm ³	-	80
Mohos y levaduras	UP/cm ³	-	50

Fuente: Adaptado de la NTE INEN 2 262:2003 (46)

Aerobios mesófilos (R.E.P.): La prueba se realizó en placas de r-biopharm RIDA®Count Total (Aerobic Count) que consistió en la inoculación directa de 1 mL de muestra no diluida en el centro del medio, se esparció a lo largo del área cuadrada del medio y se incubó a 35°C. Los resultados se evaluaron al término de 48 horas según lo especificado por el proveedor (47). Se usaron dos réplicas y un blanco.

Mohos y levaduras: La prueba se realizó en placas de 3M™ Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plate que consistió en la inoculación de 1 mL de muestra no diluida en el centro del film y la formación de un círculo con un dispersor como se aprecia en la figura 3.1 y se incubó a 25°C. Los resultados se interpretaron a los

2 y 5 días según lo especificado por el proveedor (48). Se utilizaron dos réplicas y un blanco.



Fuente: <http://multimedia.3m.com/>, (48)

FIGURA 3.1 UTILIZACIÓN DEL DISPERSOR EN MEDIOS PETRIFILM

Una vez verificado el cumplimiento de estos requisitos microbiológicos, se procedió a realizar la valoración sensorial.

Se utilizó una prueba afectiva denominada “Prueba de Grado de Satisfacción” que consistió en medir, basado en una escala hedónica verbal de 5 puntos (tabla 12) (49), cuán agradable o no eran los atributos sabor y olor de las dos muestras de cerveza para los jueces, que para estas pruebas, no fueron más que consumidores habituales o compradores en potencia (49,50).

TABLA 12
ESCALA HEDÓNICA VERBAL DE CINCO PUNTOS

Descripción	Valor
Me gusta mucho	+2
Me gusta	+1
Ni me gusta ni me disgusta	0
Me disgusta	-1
Me disgusta mucho	-2

Fuente: Anzaldúa-Morales, Antonio, 1994 (49)

Las dos muestras de cerveza, una filtrada y posteriormente pasteurizada a 60°C por 20 min, y otra solamente filtrada, llevaron códigos aleatorios 7463 y 8396, respectivamente, tal como lo sugiere Anzaldúa-Morales, 1994 (49).

Se escogieron 40 jueces inexpertos con características de consumidores habituales en un rango de edad entre 20 y 50 años a quienes se les entregaron una ficha de evaluación (gráfico 3.1) y se les dieron las debidas instrucciones para la degustación.

Cabe recalcar que en la literatura se recomienda un número mínimo de jueces de 30 personas no entrenadas (49), un número

validado estadísticamente basado en la teoría del Límite de Tendencia Central que establece que a medida que el tamaño de muestra (n) aumenta, su media muestral tiende o se aproxima a una distribución normal estándar y es mejor para $n \geq 30$ (51). Bajo esta premisa se pudieron hacer los respectivos análisis de varianza (ANOVA), que trabajan bajo supuestos de normalidad (51), ajustados a un nivel de significancia de 0.05.

Producto: _____	Fecha: _____	
Edad: _____	Sexo: _____	
<p>Marque con una X qué tanto le gustan o disgustan los atributos: olor y sabor de las muestras 7463 y 8396, según la escala mostrada a continuación:</p>		
Muestra: 7463		
ESCALA	Olor	Sabor
Me gusta mucho	_____	_____
Me gusta	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____
No me gusta	_____	_____
Me disgusta mucho	_____	_____
Muestra: 8396		
ESCALA	Olor	Sabor
Me gusta mucho	_____	_____

Me gusta	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____
No me gusta	_____	_____
Me disgusta mucho	_____	_____
Comentarios: _____		

Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

**FIGURA 3.2 FICHA DE EVALUACIÓN SENSORIAL POR
ATRIBUTOS**

CAPÍTULO 4

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. Análisis de Secuenciación de Nucleótidos

En la figura 4.1 se comprueba el porcentaje de identidad de la levadura antártica con la de la base de datos, GenBank, recolectado por el NCBI, de un 99% de confiabilidad en un 100% de cobertura de las regiones secuenciadas. Se decidió darle un código a esta levadura, por cuestiones de confidencialidad y propiedad intelectual del CIBE y se la denominó CIBE-12126.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
731 bits(380)	0.0	386/389(99%)	0/389(0%)	Plus/Minus
Query 1	GTCAAACCTTGTAGATTAGTATAACGAGTTGGTAAAACCTAATAGTTATGCTTTTCATGTT	60		
Sbjct 427	GTCAAACCTTGTAGATTAGTATAACGAGTTGGTAAAACCTAATAGTTATGCTTTTCATGTT	368		
Query 61	TTTCAAGTAAACCGAGTATCACTCAACGCCAAACCGAGGTTTGAGGGAGAAATGACGCT	120		
Sbjct 367	TTTCAAGTAAACCGAGTATCACTCAACGCCAAACCGAGGTTTGAGGGAGAAATGACGCT	308		
Query 121	CAAACAGGCATGCCCTGTGGAATACCACAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGAT	180		
Sbjct 307	CAAACAGGCATGCCCTGTGGAATACCACAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGAT	248		
Query 181	TCACGAAAATCTGCAATTCATATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCA	240		
Sbjct 247	TCACGAAAATCTGCAATTCATATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCA	188		
Query 241	GAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATATTTTTATCTGTTGACTAAGTAAATTAT	300		
Sbjct 187	GAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATATTTTTATTTGTTGACTAAGTAAATTAT	128		
Query 301	TAGTGTCTTGCAAGCAAGTTCTCTaaaaaaCATGTGTGATGCAATTAAGCAAACCTTTA	360		
Sbjct 127	TAGTGTCTTGCAAGCAAGTTCTCTAAAAAACATGTGTAATGCAATTAAGCAAACCTTTA	68		
Query 361	ATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAA	389		
Sbjct 67	ATGATCCTTCCGCAGGGTCACCTACGGAA	39		

Fuente: Guarco & Morales, 2014

FIGURA 4.1 SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS PARA CIBE-12126

Los resultados confirmaron que la levadura antártica pertenecía a una especie que se ha utilizado para la fabricación de alimentos en países asiáticos desde hace muchas décadas atrás.

Además se pudo comprobar que el control positivo era del género *Sacharomyces* especie *cerevisiae* con un 99% de cobertura y 94% de identidad con la secuencia de nucleótidos de la base de datos GenBank como se expone en la figura 4.2.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
581 bits(302)	3e-162	344/365(94%)	0/365(0%)	Plus/Plus
Query 4	CATTGATGAAGAACGCAGGGAAATTCGATACGTAATGTGAATTGCCGAATCCGGGAATC			63
Sbjct 39	CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATC			98
Query 64	ATTGAATTTTGAACGCCCTTGCTCCCTTGGTATCCCGGGGCAAGCCTGTTTGGAGG			123
Sbjct 99	ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATCCAGGGGGCATGCCCTGTTTGGAGC			158
Query 124	GTCATTTCCCTTTCAAAACATTTGTTTGGGAGTGAGTGATACTTTTGGAGTTAACTTGA			183
Sbjct 159	GTCATTTCCCTTCTAAACATTTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGA			218
Query 184	AATTGGTGGCCTTTTCCCTTGGATGtttttttttttCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTT			243
Sbjct 219	AATTGCTGGCCTTTTCAATTGGATGTTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTT			278
Query 244	GAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATA			303
Sbjct 279	GAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATA			338
Query 304	CTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACCAATGGTGTAA			363
Sbjct 339	CTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACCAATGTTCTTAA			398
Query 364	GTTTG 368			
Sbjct 399	GTTTG 403			

Fuente: Guarco & Morales, 2014

FIGURA 4.2 SECUENCIA DE NUCLEÓTIDO PARA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

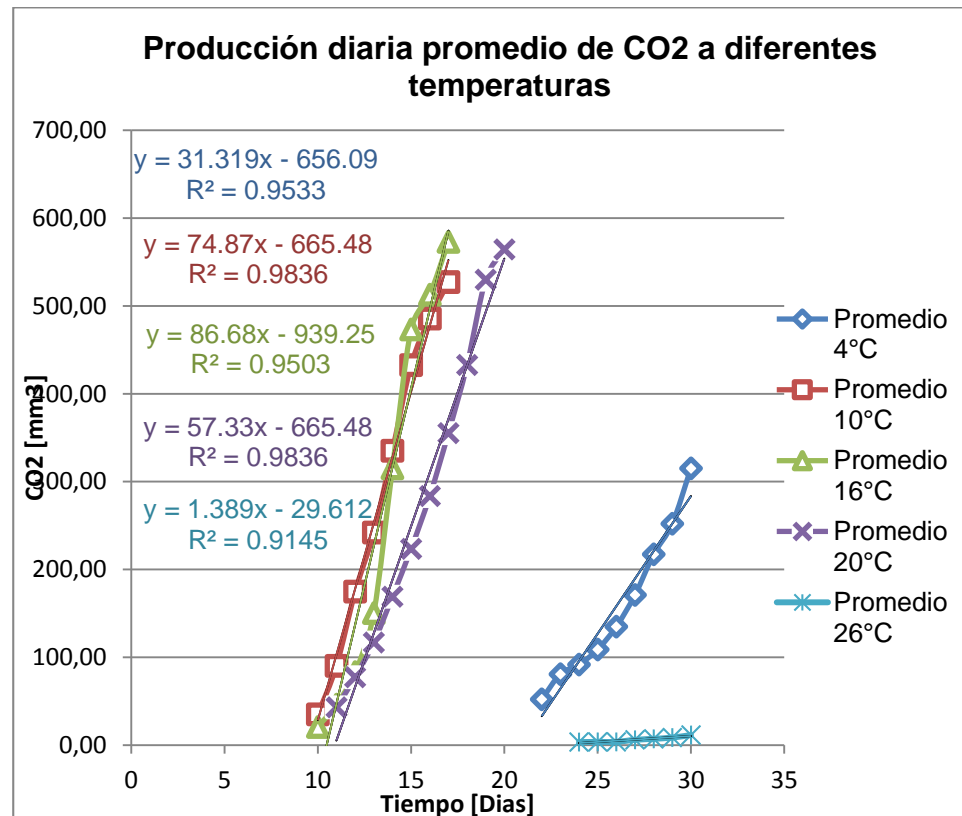
4.2. Análisis Estadístico de las Condiciones Óptimas de Fermentación

Mediante los datos obtenidos, una vez finalizada la parte experimental, se pudieron encontrar los valores de temperatura y pH óptimos de fermentación de D-Glucosa de manera precisa mediante los análisis estadísticos respectivos. Es importante indicar que en ambos experimentos, todos los controles positivos fermentaron y los blancos no produjeron CO₂, es decir, no

fermentaron. Esto confirma que la experimentación fue realizada de forma exitosa, sin ningún tipo de contaminación o anomalía.

Temperatura Óptima

En la figura 4.3 se muestran las gráficas de producción diaria promedio de CO₂ de cinco diferentes temperaturas: 4, 10, 16, 20 y 26°C. Se consideró únicamente la etapa exponencial de la fermentación y se trazó una línea de tendencia con sus respectivas pendientes para obtener la velocidad de fermentación a cada una de las temperaturas mencionadas. Además, los coeficientes altos de R² denotan una excelente calidad del modelo.



Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

FIGURA 4.3 PRODUCCIÓN PROMEDIO DIARIA DE CO₂ A LAS TEMPERATURAS: 4, 10, 16, 20 Y 26°C

En la tabla 13 se encuentran las pendientes que son los valores de velocidad de fermentación correspondiente a cada temperatura en mm³ CO₂/día.

TABLA 13
VELOCIDAD DE FERMENTACIÓN PROMEDIO DE
TEMPERATURA [MM³ CO₂/DÍA]

D-Glucosa	
Temperatura (°C)	Velocidad de Fermentación promedio [mm³ CO₂/día]
4	31.32
10	74.87
16	86.68
20	57.33
26	1.39

Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

Además, en la tabla 14 se puede observar la estadística descriptiva y así contemplar una descripción general de las características de los datos obtenidos en la experimentación.

TABLA 14
ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Variable	Observaciones	Mín.	Máx.	Media	Desv. Est.
Velocidad de fermentación	5	1.39	86.68	50.32	34.39
Temperatura	5	4.00	26.00	15.20	8.56

Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

Para explicar cómo la velocidad de fermentación (variable dependiente) se ve afectada por el cambio de temperatura (variable independiente) se aplicó el modelo de Rosso, que es una regresión cuadrática, ya que una lineal no explicaría apropiadamente el efecto de la temperatura sobre la velocidad.

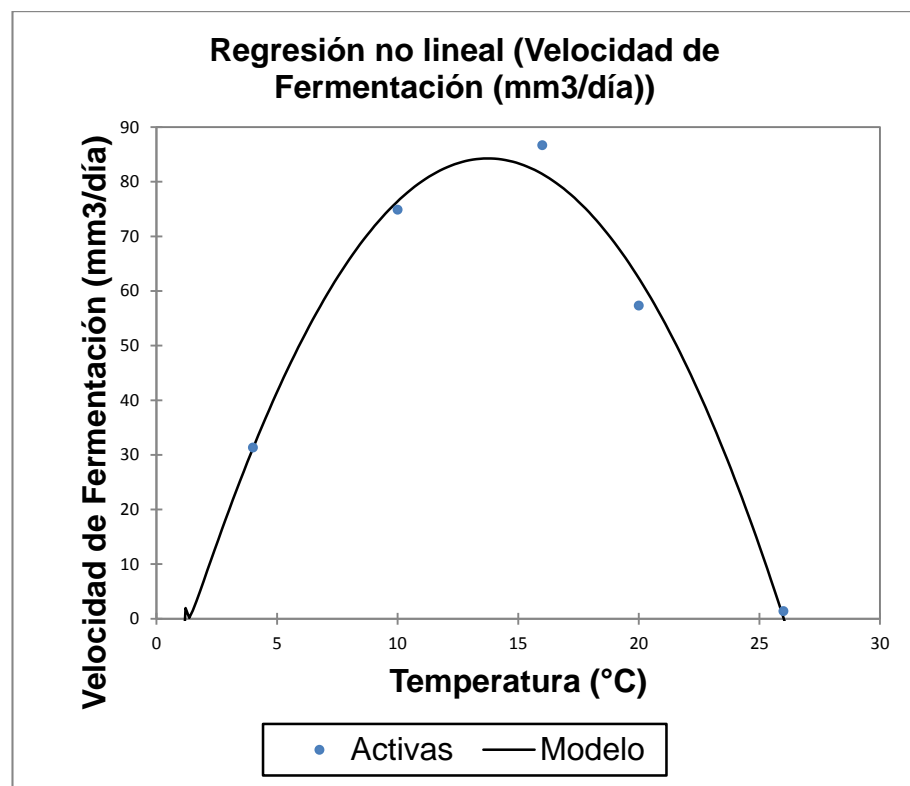
Para tener una idea más clara sobre la variación no explicada por el modelo o variación del error se obtuvieron la suma cuadrática del error (SSE), la media cuadrática del error (MSE) y su raíz cuadrática (RMSE), esto dos últimos valores representan la varianza y desviación estándar del error. Estas medidas predicen las observaciones en una manera muy favorable, puesto que la diferencia entre los valores reales observados de velocidad con respecto a las predicciones del modelo fue bastante aceptable tal como se ilustra en la tabla 15.

TABLA 15
COEFICIENTES DE AJUSTE

Observaciones	5.00
GDL	1.00
R²	0.99
SSE	56.82
MSE	56.82
RMSE	7.54
Iteraciones	3.00

Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

Con los resultados de la tabla 13 se pudo realizar la curva de velocidad de fermentación versus temperatura. Los datos se ajustaron a una regresión no lineal aplicando el modelo de Rosso, como se mencionó anteriormente, con ayuda del complemento estadístico de Excel: XLSTAT (ver figura 4.4).



Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

FIGURA 4.4 DATOS AJUSTADOS AL MODELO DE REGRESIÓN NO LINEAL DE LA VARIABLE VELOCIDAD DE FERMENTACIÓN [MM³ CO₂/DÍA] (TEMPERATURA)

Se puede notar claramente que los datos se ajustan muy bien al modelo y forman una campana, la cual en su punto de inflexión presenta la mayor velocidad de fermentación de D-Glucosa y por ende denota la temperatura óptima. Además, el valor de R^2 fue de 0.988, lo cual indica una alta capacidad explicativa de la curva. En la tabla 16, se encuentran especificados los resultados de las estimaciones de cada parámetro.

TABLA 16
PARÁMETROS DEL MODELO DE AJUSTE

Parámetro	Valor
Velocidad óptima (μ_{opt})	84.23 mm ³ CO ₂ /día
Temperatura mínima (T_{min})	1.31 °C
Temperatura máxima (T_{max})	26.01 °C
Temperatura óptima (T_{opt})	13.74 °C

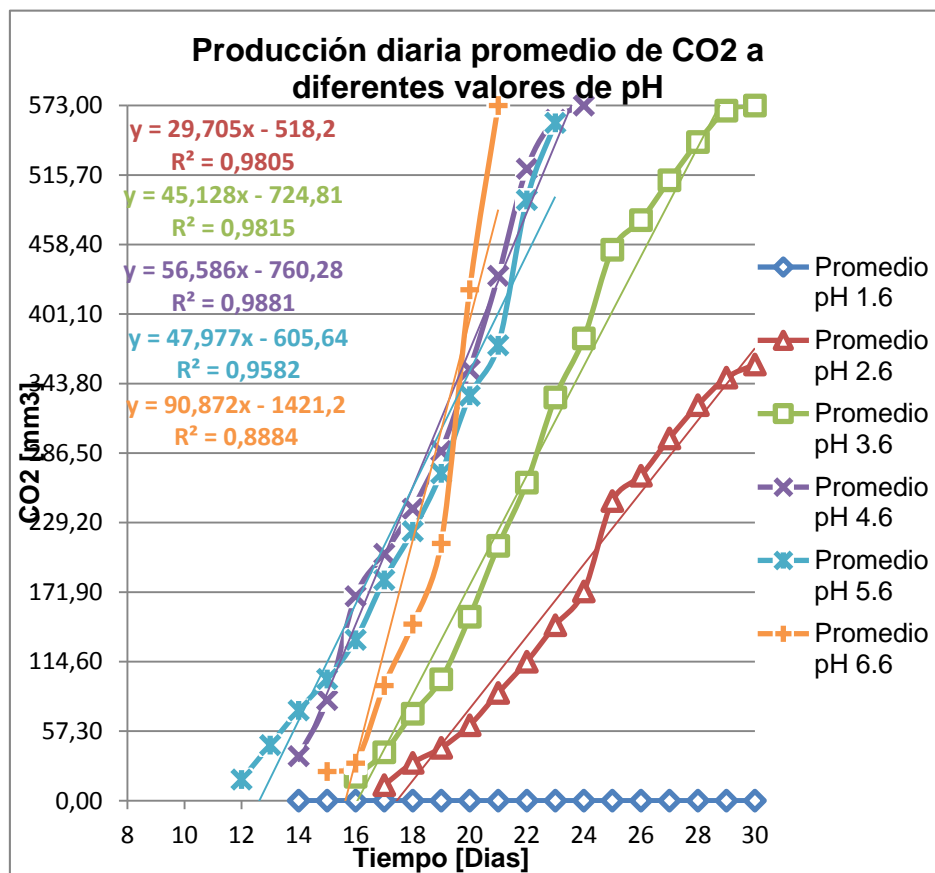
Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

Prácticamente los resultados evidencian que la levadura antártica puede fermentar en un rango de temperatura aproximado entre 1.31°C y 26°C, siendo 13.74°C la temperatura ideal para llevar a cabo la fermentación. Se esperaba que la levadura presentará actividad fermentativa a bajas temperaturas, lo cual si se cumplió,

aunque en realidad también se especulaba que la levadura CIBE-12126 podría fermentar a temperaturas por debajo de 0°C debido al ambiente extremo en el cual está habituada, el continente antártico, pero según el modelo estadístico hay muy poca probabilidad de que ocurra.

pH Óptimo

En las figuras 4.5 y 4.6 se muestran los resultados para los doce valores de pH trabajando a la temperatura óptima de 13.74°C. En la figura 4.5 se encuentran las producciones promedio diarias de CO₂ a pHs entre 1.6 y 6.6, escogidas en la fase exponencial, con su respectivo modelo lineal con coeficientes de determinación (R²) mayores a 0.88, una calidad de ajuste muy buena. Las pendientes de los valores de pH hasta 6.6 fueron ascendiendo (a excepción de pH 5.6) como se verifica en la tabla 17, teniendo al pH 6.6 con la mayor tasa promedio de fermentación (90.87 mm³ CO₂/día) entre todos.



**FIGURA 4.5 PRODUCCIÓN PROMEDIO DIARIA DE CO₂ A
PHS: 1.6, 2.6, 3.6, 4.6, 5.6 Y 6.6**

En la figura 4.6 se encuentran las producciones de CO₂ promedio para los valores de pH restantes desde 7.6 hasta 12.6, donde los R² de sus modelos lineales fueron mayores a 0.93, un excelente ajuste.

Tanto a pH 1.6 como a 12.6 no existió formación de dióxido de carbono, por eso sus gráficas se encuentran en el eje de las abscisas. El hecho de no tener producción de CO₂ a pHs tan extremos como 1.6 y 12.6, pero si al inmediato superior e inferior, respectivamente, caracteriza de mejor manera la actividad fermentativa que posee la levadura CIBE-12126, estableciendo sus límites.

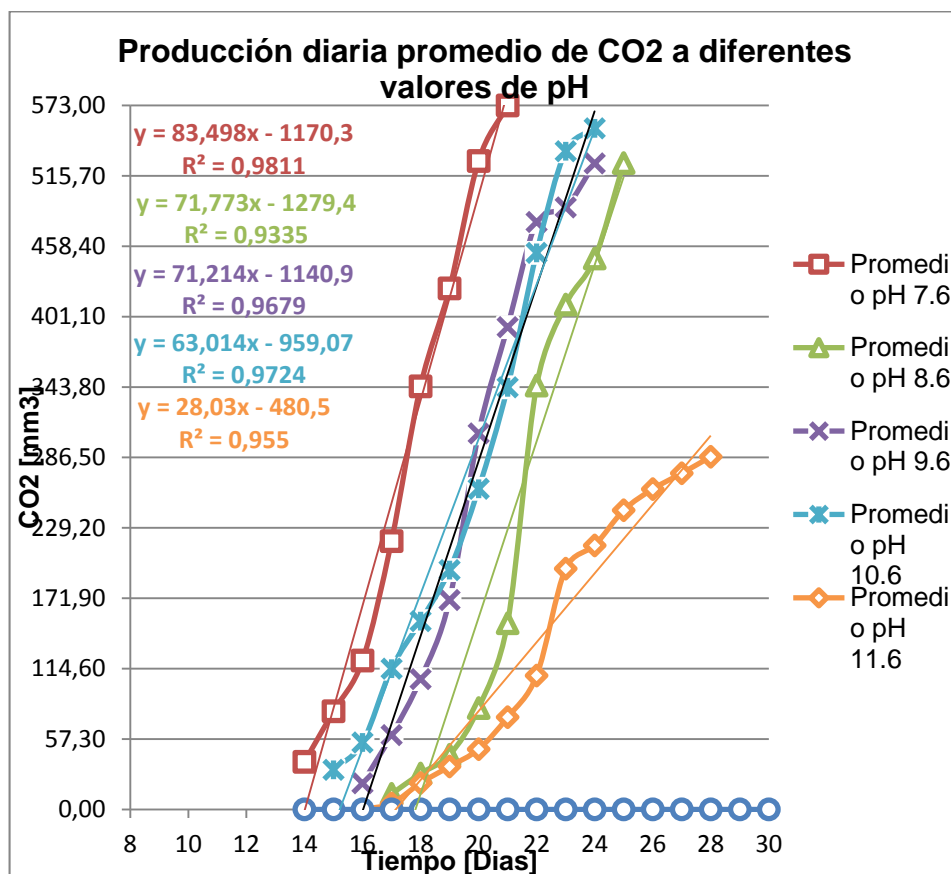


FIGURA 4.6 PRODUCCIÓN PROMEDIO DIARIA DE CO₂ A

PHS: 7.6, 8.6, 9.6, 10.6, 11.6 Y 12.6

TABLA 17
VELOCIDAD DE FERMENTACIÓN PROMEDIO [MM³
CO₂/DÍA] PARA LOS DOCE VALORES DE PH ENTRE 1.6 Y
12.6

D-Glucosa, T= 13.74°C	
pH	Velocidad de Fermentación promedio [mm ³ /día]
1.6	0.00
2.6	29.71
3.6	45.13
4.6	56.59
5.6	47.98
6.6	90.87
7.6	83.50
8.6	71.77
9.6	71.21
10.6	63.01
11.6	28.03
12.6	0.00

Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

Además, como en el ensayo de temperatura óptima, se obtuvieron los estadísticos descriptivos de las observaciones que brindaron una visión rápida y resumida del comportamiento de los datos obtenidos experimentalmente como se ve a continuación en la tabla 18:

TABLA 18
ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Variable	Observaciones	Mín.	Máx.	Media	Desv. Est.
Velocidad de fermentación	12	0.00	90.87	48.98	29.91
pH	12	1.60	12.60	7.10	3.61

Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

La media de la variable de resultado fue de 48.98 mm³ CO₂/día. Y aunque se pueda pensar que la desviación estándar estuvo un poco elevada (29.91 mm³ CO₂/día), esa conclusión no tendría mucha trascendencia puesto que hay que recordar que el pH es una escala logarítmica y que cada vez que se eleva 1 unidad, su efecto en las reacciones no son de tipo lineal.

Regresión No Lineal de la Velocidad de Fermentación

Como se suponía, la relación entre la variable dependiente (velocidad de fermentación) y la variable independiente (pH) no fue de carácter lineal, por lo que se ajustaron los datos al modelo de Rosso mediante una regresión no lineal cuadrática.

En la tabla 19 se encuentran los coeficientes de ajustes del modelo no lineal. Se obtuvo una excelente calidad de ajuste con un R^2 de 0.92: el modelo de Rosso explicó alrededor del 92% de la variabilidad en la velocidad de fermentación. Las diferencias o residuos entre los verdaderos valores observados de velocidad con respecto a las predicciones del modelo fueron relativamente altos debido tal vez a la aleatoriedad o a la falta de consideración de otros factores incidentes en la velocidad, pero aun así se lo considera un excelente modelo tratándose del trabajo con entes y fenómenos biológicos.

TABLA 19
COEFICIENTES DE AJUSTES

Observaciones	12.00
GDL	8.00
R²	0.92
SSE	811.35
MSE	101.42
RMSE	10.071
Iteraciones	5.00

Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

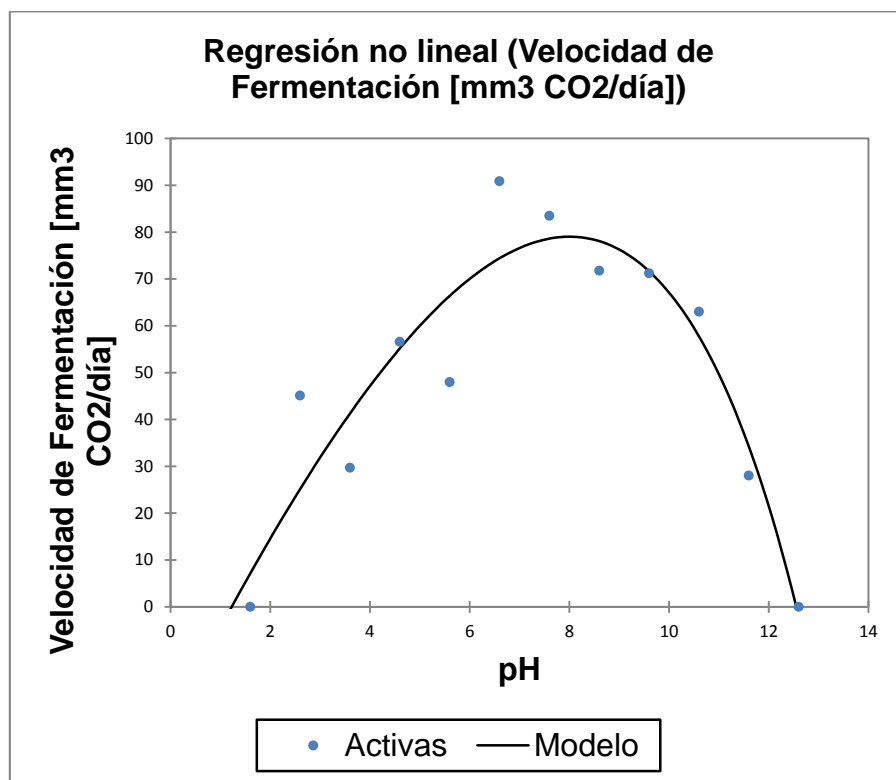
Una vez analizada la robustez del modelo se continúa con los resultados obtenidos en la tabla 20, los parámetros del modelo que en síntesis representan las condiciones de fermentación de la levadura CIBE-12126.

TABLA 20
PARÁMETROS DEL MODELO DE AJUSTE

Parámetro	Valor
Velocidad óptima (μ_{opt})	80.03
pH mínimo (pH_{min})	1.41
pH máximo (pH_{max})	12.57
pH óptimo (pH_{opt})	7.89

Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

La velocidad óptima según el modelo fue de 80.03 mm³ CO₂ por día a un pH de 7.89, considerado ligeramente básico. En la figura 4.7 se ilustra la curva modelada, donde se evidencia un pequeño sesgo de la campana hacia la izquierda.



Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

FIGURA 4.7 DATOS AJUSTADOS AL MODELO DE REGRESIÓN NO LINEAL DE LA VARIABLE VELOCIDAD DE FERMENTACIÓN [MM³ CO₂/DÍA] (PH)

Por último, para concluir, se muestra la ecuación del modelo para estimar la velocidad de fermentación de D-glucosa por la levadura CIBE-12126 ante distintos pH con una fiabilidad del 92%:

$$\text{Velocidad de Fermentación [mm}^3 \text{ CO}_2\text{/día]} = \frac{80,03 \cdot (\text{pH} - 1,41) \cdot (\text{pH} - 12,56)}{((\text{pH} - 1,41) \cdot (\text{pH} - 12,56)) - ((\text{pH} - 7,89)^2)}$$

4.3. Propiedades Fisicoquímicas de la Cerveza

Al sexto día se observó la fermentación más vigorosa con mayor producción de CO₂. Después de 3 semanas de fermentación se obtuvieron los datos descriptivos de la cerveza (en este caso una cerveza verde), propiedades tanto físicas como químicas resumidas en la tabla 21. Con esto se pudo comprobar si efectivamente la levadura CIBE-12126 era apta para llevar a cabo una fermentación de azúcares y así producir cerveza.

TABLA 21
PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA CERVEZA
ELABORADA 100% A BASE DE MALTA DE CEBADA

Propiedades	Cantidad
Gravedad específica	1.016
Extracto aparente (°P)	4.1
Alcohol (% w/w)	2.62
Fermentabilidad (%)	62.5
Extracto real (% w/w)	3.99
Gravedad original (°P)	9.00
Grado Real de Fermentación	51.18
pH	4.5
% Amargor (IBU)	35

Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

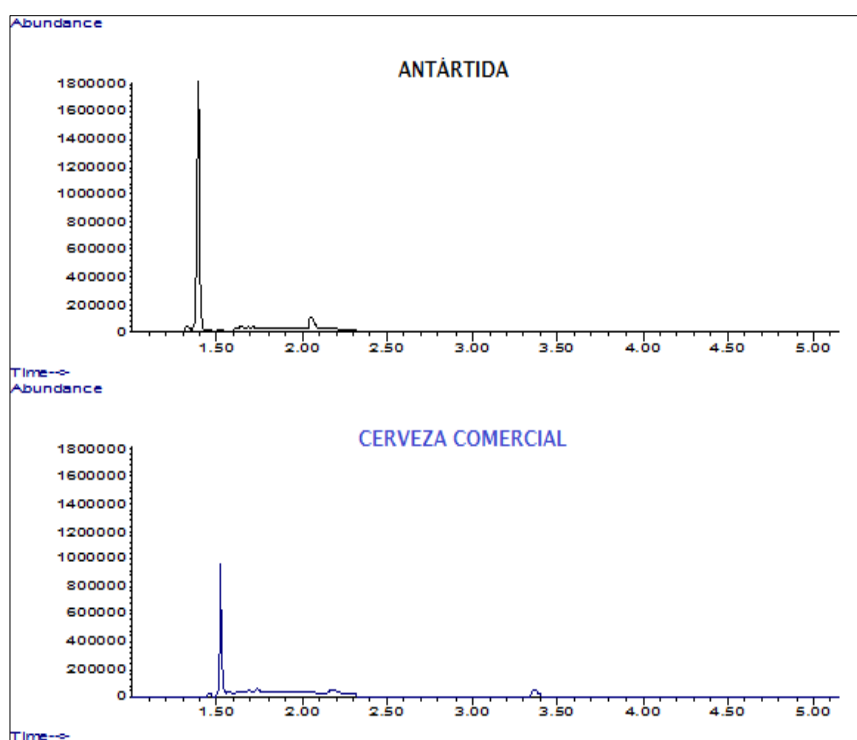
Los porcentajes de fermentabilidad y de alcohol muestran que gracias a una reducción en la gravedad original del mosto (de 1036 a 1016), se pudo verificar que la levadura ciertamente fermentó los azúcares presentes en dióxido de carbono y alcohol principalmente. Al producir etanol, disminuyó la cantidad de glucosa y por lo tanto la gravedad (o densidad) del mosto, ya que la densidad del alcohol es menor que el agua azucarada (mosto).

En síntesis, la variación de densidad fue directamente proporcional al grado alcohólico vigente en la cerveza. Además, el metabolismo de la levadura CIBE – 12126 dio como resultado una cerveza de bajo porcentaje de alcohol o “light”, con 2.6%.

Perfil de compuestos volátiles

El perfil cromatográfico de los compuestos volátiles presentes en la cerveza contenía más de 351 compuestos. Es por eso que el análisis de resultados se realizó mediante la comparación entre los picos de los cromatogramas de las dos cervezas como se aprecia en la figura 4.8. En muchas instancias (tiempos de retención), los compuestos encontrados en la cerveza “Antártida” eran iguales a los de la cerveza comercial, donde los picos seguían los mismos patrones como se muestra en la figura 4.8. Los compuestos

identificados y analizados fueron únicamente los que representaban picos presentes en la cerveza antártica pero ausentes en la cerveza comercial, teniendo la certeza de que todos los compuestos encontrados en la cerveza comercial son aptos para el consumo humano.



Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

FIGURA 4.8 COMPARACIÓN DE PICOS DE LOS CROMATOGRAMAS EN LOS PRIMEROS 5 MINUTOS

En la tabla 22 se muestran los compuestos pertenecientes a la cerveza Antártida que no fueron registrados en la cerveza

comercial. Se evidencia que el contenido no es tóxico y se concluye que la cerveza producida por CIBE-12126 puede ser ingerida sin ningún riesgo para la salud, excepto cuando es consumida excesivamente, como todas las bebidas alcohólicas cuyo consumo debe ser moderado. Este resultado era el esperado debido a que ésta levadura ya ha sido utilizada en otros productos alimenticios.

TABLA 22
COMPUESTOS DE LA CERVEZA “ANTÁRTIDA” NO
ENCONTRADOS EN LA CERVEZA COMERCIAL

Tiempo de retención	Compuesto químico
7.468	Linalol
8.209	Heptano-1, 2, 4, 6 -tetraeno
8.288	(E)-1-(etoxi-d5)propeno
8.296	3,3-dimetoxi-2-butanona
8.344	2,4,5-Trimetil-1,3-dioxolano
8.36	Benzil 2,2-dimetilpropanoato
8.655	Tert-butil 4-hidroxi-2,5-dimethylhexanoato
10.804	Amil butirato
12.906	Isopiperitenona
12.914	2-acetil-4-isopropenilciclopenteno
12.922	4-vinyl-guaiacol
16.418	Beta-elemeno
16.792	1-heptanol
17.246	N-glioxilol-((S)-prolina-benzil ester)
21.824	(1S,3R,4R)-3,4-epoxi-4-etinil-3,5,5-trimetilciclohexanol
25.47	Propanal
28.185	2-pentil furano

Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

Los compuestos de aroma y sabor más predominantes fueron los que se muestran en la tabla 23 quienes pertenecen al grupo de los alcoholes y ésteres, cuyas principales características son los olores florales, frutales y anisados:

TABLA 23
COMPUESTOS DE AROMA Y SABOR PREDOMINANTES
DE LA CERVEZA

Tiempo de retención	Compuesto químico	Grupo químico	Característica del flavor
1.391	Etanol	Alcohol	-
2.06	Isopentil alcohol	Alcohol	Aroma a malta
5.363	Etil caproato	Éster	Anisado/ Manzana
7.903	Feniletil alcohol	Alcohol	Floral/Miel
11.174	Isoamil caproato	Éster	Frutal

Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

Vale recalcar que los metabolitos de aroma y sabor producidos pertenecen a una cerveza que no ha sido madurada, solo fermentada y filtrada. Los compuestos como ésteres e isopentil alcohol tienden a disminuir durante la maduración, algunos por

hidrólisis espontánea como el primer grupo mencionado (52). Otro detalle a resaltar es la ausencia de compuestos como aldehídos y cetonas, compuestos que en grandes cantidades no son deseados e indican una cerveza de mala calidad.

Debido a que esta identificación es netamente cualitativa, es decir no se cuantifican las concentraciones de los compuestos de la cerveza, los resultados son simplemente una referencia o una base de los metabolitos producidos por la levadura antártica y los productos no metabolizados o desarrollados espontáneamente fuera de la levadura, como las reacciones con el oxígeno en presencia de calor y luz.

4.4. Evaluación Sensorial

Previo al análisis sensorial se obtuvieron los resultados de las pruebas microbiológicas:

- Aerobios mesófilos (R.E.P.): N_E de UFC/cm³ =< 1.0 x 10⁰
- Mohos y levaduras: N_E de UP de mohos y levaduras/cm³ =< 1.0 x 10⁰

Donde N_E significa Número Estimado y UP Unidades Propagadoras. Estos resultados cumplen con los requisitos de la norma INEN para cerveza y además reflejan una excelente asepsia y cuidado en los procesos. La cerveza no sufrió contaminación alguna y pudo ser analizada sensorialmente.

Análisis Sensorial

El panel estuvo conformado por 40 consumidores habituales, los cuales 26 eran hombres y 14 mujeres, con una edad promedio total de 29 años. Los resultados de las respuestas de los jueces no entrenados hacia los atributos olor y sabor de las muestras de cerveza no madurada o “verde” con los códigos 7463 (filtrada y pasteurizada) y 8396 (solamente filtrada) se muestran a continuación:

Grado de satisfacción del Atributo Olor:

En la figura 4.9 se puede observar los resultados del olor en la cerveza pasteurizada: 55% les gustó, al 27% ni les gustó ni les disgustó, al 10% les gustó mucho, al 8% no les gustó, y a ninguno les disgustó mucho. Se concluye entonces que a más del 50% les podría gustar el olor del producto, un resultado considerado positivo para el estudio.



Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

FIGURA 4.9 PORCENTAJES DE RESPUESTAS MÁS FRECUENTES DEL ATRIBUTO OLOR EN LA CERVEZA PASTEURIZADA

En la figura 4.10 se observa los resultados del olor en la cerveza que no fue pasteurizada sino solamente filtrada: 45% les gustó, 40% ni les gustó ni les disgustó, 10% les gustó mucho, 5% no les gustó y a ninguno les disgustó mucho. Se resalta que aquí el porcentaje de indecisos es mayor que con la muestra pasteurizada, aunque sigue siendo más del 50% de los consumidores habituales que les podría gustar el olor del producto.



Elaborado por: Guarco & Morales. 2014

**FIGURA 4.10 PORCENTAJES DE RESPUESTAS MÁS
FRECUENTES DEL ATRIBUTO OLOR EN LA CERVEZA SIN
PASTEURIZAR**

Análisis de Varianza (ANOVA) de Atributo Olor:

Para determinar si hubo diferencia significativa entre los olores de las muestras se aplicó ANOVA, con un nivel de significancia del 5%, al siguiente contraste de hipótesis:

Hipótesis nula (H_0): las medias de las respuestas sobre el olor de la cerveza pasteurizada y de la no pasteurizada son iguales.

Hipótesis alterna (H_1): las medias de las respuestas sobre el olor de las cervezas no son iguales.

En la tabla 24 se encuentra la tabla ANOVA con el estadístico F, cuya interpretación se realiza comparándolo con el valor crítico para F. Al ser éste menor que el F crítico, no se rechaza la H_0 y se concluye que no hay suficiente evidencia estadística para decir que las medias no son iguales, es decir, no hubo diferencia significativa entre el grado de satisfacción producido por el olor de la cerveza pasteurizada y el producido por la cerveza solamente filtrada (sin pasteurizar).

TABLA 24
ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GD L	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.1125	1	0.1125	0.1977	0.6578	3.9635
Dentro de los grupos	44.3750	78	0.5689			
Total	44.4875	79				

Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

Grado de Satisfacción del Atributo Sabor

En la figura 4.11 se muestran los porcentajes de los diferentes grados de satisfacción sobre el sabor de la cerveza pasteurizada. En contraste con su olor, ésta presentó bajas calificaciones (30%

no le gustó el sabor y 5% les disgustó mucho el sabor, con un total negativo de 35%), y menos de la mitad, exactamente el 32% fueron valoraciones positivas, siendo incluso menor que las valoraciones negativas. Tres de cada diez jueces se mostraron indecisos con respecto al sabor. Se concluye entonces que a pesar de tener un olor agradable su sabor deja mucho qué desear. En los comentarios se encontraron que la cerveza pasteurizada tenía un sabor muy amargo y con poca intensidad, además de la ausencia de espuma.



Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

**FIGURA 4.11 PORCENTAJES DE RESPUESTAS MÁS
FRECUENTES DEL ATRIBUTO SABOR EN LA CERVEZA
PASTEURIZADA**

Por otro lado, la cerveza sin pasteurizar tuvo mayor éxito con respecto al sabor. En la figura 4.12 se muestran los porcentajes del grado de satisfacción producida por esta cerveza. El 62% fueron valoraciones positivas donde al 25% le gustó mucho el sabor y sólo el 8% lo valoró negativamente. Se puede concluir que a más del 50% de los consumidores habituales les podría gustar el sabor del producto, recordando además que su olor también obtuvo una calificación similar por lo que esta cerveza obtuvo un mayor grado de satisfacción en términos generales. Se acota que dentro de los comentarios positivos sobre la cerveza no pasteurizada estaba la confusión con una cerveza comercial.



Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

FIGURA 4.12 PORCENTAJES DE RESPUESTAS MÁS FRECUENTES DEL ATRIBUTO SABOR EN LA CERVEZA SIN PASTEURIZAR

Análisis de Varianza (ANOVA) de Atributo Sabor:

Se aplicó ANOVA, con un nivel de significancia del 5%, al siguiente contraste de hipótesis:

Hipótesis nula (H_0): las medias de las respuestas sobre el sabor de la cerveza pasteurizada y de la no pasteurizada son iguales.

Hipótesis alterna (H_1): las medias de las respuestas sobre el sabor de las cervezas no son iguales.

En la tabla 25 se encuentra la tabla ANOVA con el estadístico F mayor al F crítico, por lo tanto se rechaza la H_0 y se concluye que sí hay suficiente evidencia estadística para decir que las medias no son iguales, es decir, sí hubo diferencia significativa entre el grado de satisfacción producido por el sabor de la cerveza pasteurizada y el producido por la cerveza sin pasteurizar.

TABLA 25
ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GDL</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	13.6125	1	13.6125	14.5698	0.0003	3.9635
Dentro de los grupos	72.8750	78	0.9343			
Total	86.4875	79				

Elaborado por: Guarco & Morales, 2014

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Los objetivos planteados al iniciar esta investigación fueron cumplidos satisfactoriamente a lo largo del desarrollo de la misma.
2. De acuerdo a la experimentación realizada, la levadura CIBE-12126 tiene una velocidad óptima de fermentación a una temperatura de 13.74°C y a pH 7.89, aunque el pH es hallado únicamente por cuestión de diseño ya que en la práctica no está permitido alterar el pH del mosto. Se obtuvo un rango de temperatura de fermentación amplio desde 1.31°C hasta 26.01°C y un rango de pH aún más amplio, con valores desde 1.41 hasta 12.57, dato valioso ya que se podría concluir que la levadura tiene una buena tolerancia al estrés debido a variaciones de pH.

3. Después de haber realizado todas las pruebas de este estudio, se confirma la hipótesis planteada inicialmente. Es decir, ciertamente es posible aplicar la levadura antártica CIBE-12126 a temperaturas bajas para la elaboración de cerveza, utilizando mosto con azúcares procedentes de la cebada.
4. El descenso en la densidad del mosto y como resultado una fermentabilidad de 62.5%, indica que evidentemente la levadura en estudio consiguió realizar la fermentación de los azúcares presentes, obteniendo de manera esencial alcohol y dióxido de carbono.
5. El porcentaje de alcohol de la cerveza obtenido (2.62%) sugiere que la levadura no posee una alta capacidad fermentativa, produciendo así una cerveza tipo “light” o de bajo grado alcohólico. En todo caso, presenta la ventaja de elaborar este tipo de cerveza sin la necesidad de truncar la fermentación o adicionarle agua, que normalmente baja la calidad del producto. Es decir, la levadura produce una cerveza “light” debido a su propio metabolismo, sin ningún tipo de alteración en el proceso.
6. Aproximadamente en el doceavo día después de haber inoculado el mosto con la levadura en cuestión, la densidad del mismo se

mantuvo constante. Razón por la cual se puede concluir que el tiempo de fermentación de CIBE-12126, de un mosto obtenido a partir de cebada para producir cerveza, ronda las dos semanas.

7. Dentro de los metabolitos producidos por la levadura antártica durante la fermentación se encuentran principalmente los compuestos alcohólicos con notas florales y ésteres con notas frutales. No hubo presencia de otros compuestos aromáticos como aldehídos o cetonas. Además no se encontraron compuestos tóxicos como metanol o formato lo que permite asegurar su consumo.
8. La prueba de grado de satisfacción de atributos olor y sabor en la cerveza filtrada sin pasteurizar tuvo resultados positivos, con valoraciones positivas por más del 50% de los jueces siendo significativamente diferente a la valoración negativa que recibió el sabor de la que fue pasteurizada.
9. Es importante tener en cuenta que cada una de las materias primas seleccionadas en la elaboración de cerveza deben contar la calidad necesaria para dicho propósito y su almacenamiento debe ser el adecuado, previniendo así cualquier alteración indeseada en la materia prima ya que puede perjudicar el proceso y por ende el

producto final. Igualmente todas las etapas del proceso deben realizarse de la manera adecuada con los parámetros especificados, tomando en consideración medidas asépticas al trabajar con la levadura.

10. Sería conveniente realizar estudios futuros para clasificar a la levadura CIBE-12126 entre lager o ale mediante análisis específicos principalmente pruebas de floculación, cuantificación de compuestos volátiles producidos y capacidad de fermentación de melibiosa. Además, se debería profundizar sobre el metabolismo que presenta la levadura antártica.
11. Se recomienda utilizar otras pruebas sensoriales, como las de aceptación o preferencia en un producto totalmente terminado, es decir, un producto madurado, para así analizar no sólo si posee una buena formulación, sino también si posee fuerza o alguna ventaja competitiva en comparación con otras cervezas del mercado. Se puede realizar pruebas con paneles de expertos para poder obtener resultados más precisos sobre el umbral de detección de los compuestos aromáticos.

APÉNDICES

APÉNDICE A

TOLERANCIA AL ETANOL DE ALGUNAS ESPECIES DE LEVADURAS

Poder de fermentación (%w/v) de algunas especies de levaduras

<2%	2-5%	5-8%	>8%
<i>Candida emobii</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Candida stellata</i>	<i>Saccharomyces bayanus/uvarum</i>
<i>C. guilliermondii</i>	<i>Pichia fermentans</i>	<i>Lachancea thermotolerans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>C. parapilopsis</i>	<i>Lachancea kluyveri</i>	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	<i>S. pastorianus</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Schwannyomyces occidentalis</i>	<i>S. mikatae</i>	<i>S. paradoxus</i>
<i>C. valida</i>	<i>Torulaspota pretoriensis</i>	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	
<i>Debaryomyces castelli</i>	<i>Zygotorulaspota mtakii</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	
<i>Lidnera saturnus</i>		<i>Zygosaccharomyces bailli</i>	
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>		<i>Zygotorulaspota florentinus</i>	
<i>M. reukafii</i>			
<i>Pichia membranifaciens</i>			
<i>Schwanniomyces polymorphus</i>			

Fuente: Adaptado de Kurtzman, et al., 2011 (30)

APÉNDICE B
ENSAYOS DE FERMENTACIÓN

TEMPERATURA Y PH ÓPTIMOS

Preparación de Medio Mineral

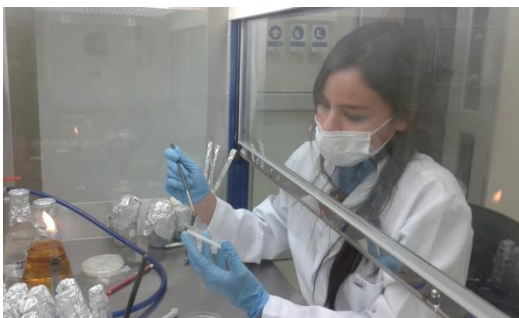


Medio mineral con D-glucosa
a pH 3.6

Medios minerales con D-glucosa a
12 distintos pH entre 1.6 y 12.6



Preparación de Inóculos



Selección de colonias para
elaboración de inóculo

Ajuste de turbidez del inóculo a 0.5
Mc Farland



Inoculación en los Tubos



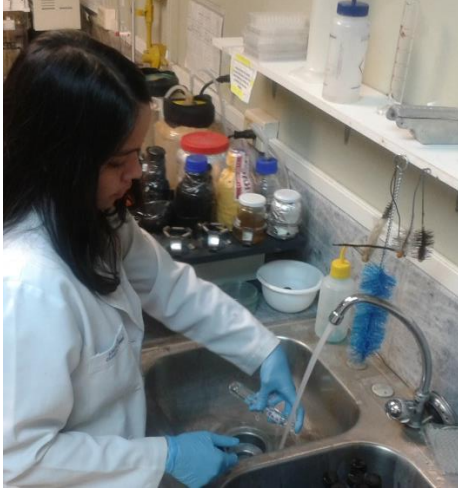
Tubos almacenados a
diferentes temperaturas

Tubos a diferentes pH
almacenados a la temperatura
óptima



APÉNDICE C
ELABORACIÓN DE CERVEZA

LIMPIEZA PRELIMINAR



Limpieza de materiales con
detergente neutro

Materiales esterilizados y
secados en estufa



Fermentador listo para usar

PREPARACIÓN DEL MOSTO

Molienda



Selección de malta

Molino manual



Maceración



Maceración a 68°C durante 1 hora

Retiro de granos gastados



Cocción del Mosto



Mosto a hervor: presencia de proteínas coaguladas y precipitadas (hot break)

Adición de 2 clases de lúpulo: Northern Brewer y Saaz



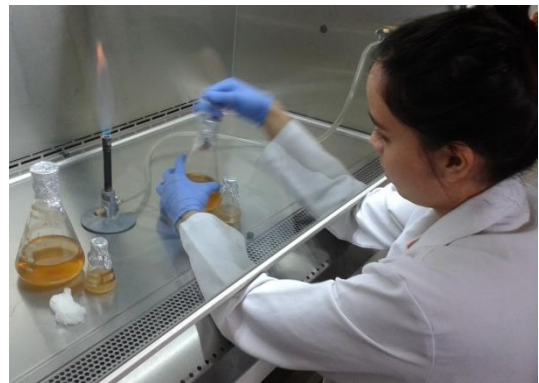
Enfriamiento



Enfriamiento a 20°C en una tina con hielo

FERMENTACIÓN

Preparación del “starter” de levadura



Aireación del mosto en condiciones asépticas

Medición de gravedad original
(OG) de 1.036



Medición de pH inicial de 5.83

Inoculación del starter y
protección del fermentador
hacia la luz



POST-FERMENTACIÓN



Filtración de la cerveza

Pasteurización y enfriamiento



Medición de gravedad final (FG) de 1.016 y pH de 4.5

APÉNDICE D

**CROMATOGRAFÍA DE GASES POR ESPECTROMETRÍA DE
MASAS**

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE LA CERVEZA

Acondicionamiento de la Muestra



Centrifugación a 5000 rpm
por 5 min

Colocación de muestras en
viales



Microextracción en Fase Sólida (MEFS)



Baño María a 55°C por 30
min

Baño María con la aguja de sílice inyectada a 55°C por 30 min



Cromatografía de Gases con Espectrometría de Masas



Inyección de la aguja en el cromatógrafo por 5 min

Análisis de compuestos en el cromatógrafo



BIBLIOGRAFÍA

1. Eblinger HM, Narzib L. Beer. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 2009.
2. Boulton C, Quain D. Brewing Yeast and Fermentation. John Wiley & Sons; 2013.
3. Palmer JJ. How to Brew: Ingredients, Methods, Recipes and Equipment for Brewing Beer at Home. Brewers Publications; 2006.
4. Daniels R. Designing Great Beers. 2000.
5. De Keukeleirc D. Fundamentals of Beer and Hop Chemistry. 2000 p. 108–12.
6. Madigan MT, Martinko J, Parker J. Brock, Biología de los microorganismos 12/e. Pearson Educación; 2009.
7. White C, Zainasheff J. Yeast: The practical Guide to Beer Fermentation. 2010.
8. Pelczar MJ, Reid RD, Chan ECS. Microbiología. 1982.
9. Kurtzman C, Fell J. Yeast Systematics and Phylogeny - Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology. 2005.
10. Briggs D, Boulton C, Brookes P, Stevens R. Brewing: Science and Practice. 2004.
11. Eblinger HM. Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets. John Wiley & Sons; 2009.
12. Fogler HS. Elementos de ingeniería de las reacciones químicas. Pearson Educación; 2001.
13. Galdieri L, Mehrotra S, Yu S, Vancura A. Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. OMICS. 2010 Dec;14(6):629–38.
14. Boulton C. Encyclopaedia of Brewing. John Wiley & Sons; 2013.

15. Bray D. Introducción a la biología celular. Ed. Médica Panamericana; 2006.
16. Lagunas R. Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1986 Dec;2(4):221–8.
17. Batt C, Tortorello M-L. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press; 1999.
18. Chemical composition of alcoholic beverages, additives and contaminants. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 1988 Jan;44:71–99.
19. Malting and Brewing » Diacetyl or Vicinal Diketone (VDK) [Internet]. Available from: <http://www.maltingandbrewing.com/diacetyl-or-vicinal-diketone-vdk.html>
20. Koroluk C. Cerveza de Argentina [Internet]. Available from: <http://www.cervezadeargentina.com.ar/articulos/carbonatandocervezamos-to.html>
21. Hardwick W. *Handbook of Brewing*. CRC Press; 1994.
22. Ratti M, Catagua D, Vargas J, Monserrate L, Ordoñez N, Chong P, et al. Establecimiento de un banco de microorganismos antárticos para evaluar su potencial biotecnológico. *Instituto Antártico Ecuatoriano*. 2011;43–9.
23. El hielo de la Antártida tiene utilidad científica | El Comercio [Internet]. Available from: <http://www.elcomercio.com.ec/tendencias/ciencia/hielo-de-antartida-utilidad-cientifica.html>
24. García M, Quintero R, López-Munguía A. *Biotecnología alimentaria*. Editorial Limusa; 1993.
25. Alvarado J, Justamond C, Rangel E. Plan de Marketing para la Elaboración de la nueva marca de cerveza pilsener gold.
26. INEC. Más de 900 mil ecuatorianos consumen alcohol [Internet]. Available from: http://www.inec.gob.ec/inec/index.php?option=com_content&view=article&id=615%3Amas-de-900-mil-ecuatorianos-consumen-alcohol&catid=56%3Adestacados&Itemid=3&lang=es
27. *Diario Expreso*. Consumo promedio anual de cerveza de un ecuatoriano es de 27 litros. 2014;

28. Comercio D El. Las cervezas artesanales se multiplican | El Comercio [Internet]. Available from: <http://www.elcomercio.com/actualidad/cervezas-artesanales-multiplican-quito.html>
29. Jones HL, Margaritis A, Stewart RJ. The Combined Effects of Oxygen Supply Strategy, Inoculum Size and Temperature Profile on Very-High-Gravity Beer Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Inst Brew*. 2007 May 16;113(2):168–84.
30. Kurtzman C, Fell J, Boekhout T. *The Yeasts: A Taxonomic Study*, Volume 1. Elsevier; 2011.
31. Yakobson C. *Brettanomyces in Brewing the horse the goat and the barnyard*. 2011;
32. Cenis JL. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res*. 1992 May 11;20(9):2380–2380.
33. Chaturvedi V, Springer D, Behr M, Ramani R, Li X, Peck M, et al. Morphological and Molecular Characterizations of Psychrophilic Fungus *Geomyces destructans* from New York Bats with White Nose Syndrome (WNS). *PLoS One*. 2010;5(5):1–12.
34. Somma M, Querci M. Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. JRC European Commission.
35. SYBR® Safe DNA Gel Stain - Life Technologies [Internet]. Available from: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/S33102>
36. Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Larsson CU, Gorwa-Grauslund M, Görgens J, van Zyl WH. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. *Microb Cell Fact*. 2005 Nov;4(1):31.
37. Garbutt J., Bartlett A. *Experimental Biology with Micro-Organisms*. 2014.
38. Rosso L, Lobry JR, Bajard S. Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. 1995;61(2).
39. Atlas RM. *Handbook of Microbiological Media*, Third Edition, Volume 1. CRC Press; 2004.

40. Bastidas O. Conteo Celular con Hematocitómetro [Internet]. Available from: <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>
41. Mattisek R, Schnepel F-M, Steiner G. Análisis de los Alimentos: Fundamentos, métodos, aplicaciones. 1992.
42. Bamforth C. Standards of Brewing: A Practical Approach to Consistency and Excellence. 2002.
43. De Hoffmann E, Stroobant V. Mass Spectrometry. Principles and Applications. 2007.
44. Peñalver A. Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental. 2002. p. 11–4.
45. Holten H-C, Waul C, Rasmus H, Seredynska-Sobecka B, Mosbaek H, Christensen N, et al. HS-SPME-GC-MS analysis of antioxidant degradation products migrating to drinking water from PE materials and PEX pipes. *Int J Environmental Anal Chem.* 2013;93(6):593–612.
46. Bebidas Alcohólicas. Cerveza. Requisitos [Internet]. INEN. 2003. p. 1–8. Available from: http://www.inmetro.gov.br/ExigenciasTecnicas/documentos/ECU/Bebidas_alco%C3%B3licas.pdf
47. r-biopharm. RIDA COUNT TOTAL specification sheet [Internet]. Available from: http://www.shp.hu/hpc/userfiles/r-biopharm/cultura_medium.pdf
48. 3M. 3M Petrifilm Levaduras y Mohos. Guía de Interpretación [Internet]. Available from: <http://multimedia.3m.com/mws/media/374978O/ym-interp-guide-spa.pdf>
49. Anzaldúa-Morales A. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. 1994.
50. Ibañez F, Barcina Y. Análisis sensorial de alimentos: métodos y aplicaciones. Taylor & Francis; 2001.
51. Walpole R, Myers R, Myers S, Keying Y. Probabilidad y Estadística para ingeniería y ciencias. 2007.
52. Yeast Metabolome Database: Ethyl hexanoate (YMDB01381) [Internet]. Available from: <http://www.ymdb.ca/compounds/YMDB01381>