Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Química e Ingeniería Química
Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

Aislamiento de levaduras *Saccharomyces spp* a partir de bayas de uva para su aplicación en procesos de fermentación de cerveza

TESIS

Para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial

AUTOR

Rolan Eider SICCHA SÁNCHEZ

ASESOR

Dr. Waldir Desiderio ESTELA ESCALANTE

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Siccha, R. (2021). *Aislamiento de levaduras Saccharomyces spp a partir de bayas de uva para su aplicación en procesos de fermentación de cerveza*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Rolan Eider Siccha Sánchez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	70995450
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-5340-2252
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Waldir Desiderio Estela Escalante
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	09548299
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-8917-7472
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Miriam Estela Memenza Zegarra
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41564297
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Roberto Robles Calderón
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06078749
Datos de investigación	
Línea de investigación	C.O.6.1. Biotecnología
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.

Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Química e Ingeniería Química País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Latitud: -12.056445 Longitud: -77.085994
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018 - 2019
URL de disciplinas OCDE	Tecnologías de bioprocesamiento, Biocatálisis, Fermentación https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.09.00 Ingeniería de procesos https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.04.00

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central: 619 7000 anexos 1202, 1203, 1205, 1206, 1207 Telefax: 1209, 1218
Ciudad Universitaria – Av. Venezuela s/n – Lima 1

"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de independencia"

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

A C T A DE SUSTENTACIÓN DE TESIS VIRTUAL

Los suscritos Miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, bajo la Presidencia de la **Mg. MIRIAM ESTELA MEMENZA ZEGARRA,** el **Ing. ROBERTO ROBLES CALDERÓN** (Miembro) y el **Ph.D. WALDIR DESIDERIO ESTELA ESCALANTE** (Asesor), habiendo presentado para el efecto la **TESIS,** titulada "**Aislamiento de levaduras *Saccharomyces spp* a partir de bayas de uva para su aplicación en procesos de fermentación de cerveza",** después de **SUSTENTADA Y APROBADA LA TESIS** elaborada por el Bachiller en Ingeniería Agroindustrial: **SICCHA SÁNCHEZ ROLAN EIDER;** para optar el **TITULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL,** acordando calificarlo con la **NOTA** de:

DIECIOCHO 18

(LETRAS) (NÚMEROS)

Lima, 26 de julio del 2021

Mg. Miriam Estela Memenza Zegarra
Presidenta

Ing. Roberto Robles Calderón
Membro

Ph.D. Waldir Desiderio Estela Escalante
Asesor

UNMSM Firmado digitalmente por NAGLES VIDAL Edgar Orlando FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 03.09.2021 09:44:13 -05:00

Dr. EDGAR ORLANDO NAGLES VIDAL
Director de la EP de Ingeniería Agroindustrial

AGRADECIMIENTOS

La culminación de esta tesis ha sido producto de un esmerado esfuerzo, disciplina y dedicación. En primer lugar, quiero agradecer profundamente a mi asesor Dr. Ing. Waldir Desiderio Estela Escalante, MSc, PhD quien me facilitó los medios necesarios para poder llevar a cabo la parte experimental y su asesoría en cuanto a redacción.

También quiero agradecer infinitamente a mis tíos Wilfredo y Maribel quienes tuvieron la paciencia de apoyarme económicamente y moralmente mientras me enfocaba en el desarrollo de este trabajo. Agradecer también a mi prima Gabriela Ulloa por su apoyo económico que me fue de gran utilidad en la parte experimental de esta tesis.

Agradecer de manera especial a mis padres que de alguna manera me alentaron a completar esta etapa final de mi vida universitaria. Y finalmente agradecer a demás familiares y amigos que de una u otra forma me incentivaron cuando mis ánimos decaían.

Gracias por todo su apoyo.

INDICE

RESUMEN 1
INTRODUCCIÓN 3
I. MARCO TEÓRICO 5
1.1 Generalidades de las levaduras 5
1.1.1 Levaduras *Saccharomyces spp.* 5
a) Morfología 6
b) Reproducción 7
c) Requerimientos nutricionales 8
d) Metabolismo 9
e) Tolerancia a agentes exógenos 14
1.2. Nichos de aislamiento de levaduras 16
1.2.1. Distribución de las levaduras en la naturaleza 16
1.2.2. Fuentes naturales de aislamiento 17
1.2.3. Fuentes de fermentación espontánea 17
1.3. Identificación química de las levaduras 18
1.4. Tecnología cervecera 18
1.4.1. Generalidades de la cerveza 18
1.4.2. Tipos de cerveza 19
1.4.3. Materias primas utilizadas en la elaboración de cerveza 20
1.4.4. Elaboración de cerveza 21
1.4.5. Parámetros en la fermentación de cerveza 25
1.4.6. Levaduras utilizadas en la fermentación de cerveza 27
1.4.7. Tipos de fermentación 27
1.4.8. Calidad sensorial de la cerveza 28
1.5. Optimización del proceso de fermentación de cerveza 28
1.5.1. Diseño de experimentos 28
1.5.2. Diseños factoriales 29
II. MATERIALES Y MÉTODOS 30
2.1. Recolección y acondicionamiento de la muestra 30
2.2. Aislamiento de colonias 30
2.3 Evaluación de tolerancia al metabisulfito de sodio 30
2.4. Evaluación de la tolerancia al etanol 31
2.5. Aislamiento de levaduras *Saccharomyces* 31
2.6. Evaluación microscópica y selección de colonias 32

2.7. Evaluación de la capacidad fermentativa de azúcares....32
2.8. Evaluación de la capacidad de fermentación y selección de levadura....33
2.9. Evaluación bioquímica....33
2.10. Fermentación de mosto de malta en matraces....34
2.10.1. Propagación de la levadura....34
2.10.2. Fermentación de mosto de malta....34
2.11. Fermentación de cerveza en biorreactor....35
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN....36
3.1. Aislamiento de colonias, tolerancia al metabisulfito y etanol....36
3.2. Fermentación de azúcares....37
3.3. Capacidad fermentativa en presencia de etanol....39
3.4. Evaluación bioquímica....41
3.5. Fermentación de mosto de malta en matraces....42
3.5.1. Producción de etanol....44
3.5.2. Productividad de etanol....48
3.5.3. Rendimiento de etanol....51
3.6. Fermentación de cerveza en biorreactor....55
3.7. Evaluación sensorial de la cerveza....56
IV. CONCLUSIONES....61
V. BIBLIOGRAFÍA....63

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Capacidad de fermentación de azúcares por las levaduras seleccionadas. 38

Tabla 2. Formación de turbidez por las levaduras en fermentaciones con diferentes azúcares. 39

Tabla 3. Capacidad fermentativa de levaduras a diferentes concentraciones de etanol. ……..……...40

Tabla 4. Formación de turbidez por levaduras cultivadas a diferentes concentraciones de etanol. 41

Tabla 5. Identificación bioquímica de la levadura seleccionada mediante el KIT API ID 32C.…… 41

Tabla 6. Matriz experimental del diseño factorial completo 2^3 con tres repeticiones y cuatro puntos centrales. Se muestra los resultados en producción de etanol, productividad de etanol y rendimiento. 43

Tabla 7. Análisis de varianza para la producción de etanol. 44

Tabla 8. Análisis de varianza para la productividad de etanol. 48

Tabla 9. Análisis de varianza para la productividad de etanol. 52

Tabla 10. Resultados de la optimización en función de las variables de estudio. 55

Tabla 11. Resultados de la evaluación sensorial de la cerveza producida en el presente estudio. 57

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de las colonias de S. cerevisiae aisladas a partir de mosto de uva cultivadas en un medio diferencial WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient). 6

Figura 2. Ciclo de vida de levadura Saccharomyces spp. 7

Figura 3. Reproducción por gemación de Saccharomyces cerevisiae. 8

Figura 4. Catabolismo de Saccharomyces cerevisiae de las hexosas. 11

Figura 5. Metabolismo del piruvato a etanol. ……

Figura 6. La figura muestra el ingreso del piruvato a través de la membrana mitocondrial que tras una descarboxilación oxidativa por el complejo PDH (piruvato deshidrogenasa) se genera acetil-CoA para luego entrar al ciclo del TCA. ……11

Figura 7. Proceso de elaboración de cerveza. 24

Figura 8. Morfología de las colonias (a, b) y células (c, d) de levaduras Saccharomyces aisladas a partir del mosto de uva. 37

Figura 9. Planos de contorno que muestran el efecto del extracto seco y temperatura (a), extracto seco y concentración celular (b) y, temperatura y concentración celular (c) en la producción de etanol. 46

Figura 10. Gráficos de Superficie de Respuesta de fermentaciones realizadas con la levadura Saccharomyces cerevisiae C8 a diferentes condiciones. Efecto de la temperatura y extracto seco (a), extracto seco y concentración de inoculo (b) y, temperatura y concentración celular (c) en la producción de etanol. 47

Figura 11. Planos de contorno que muestran el efecto del extracto seco y temperatura (a), extracto seco y concentración celular (b) y, temperatura y concentración celular (c) en la productividad de etanol. 50

Figura 12. Gráficos de Superficie de Respuesta de fermentaciones realizadas con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* C8 a diferentes condiciones. Efecto de la temperatura y extracto seco (a), extracto seco y concentración de inoculo (b) y, temperatura y concentración celular (c) en la productividad de etanol. ……50

Figura 13. Planos de contorno que muestran el efecto del extracto seco y temperatura (a), extracto seco y concentración celular (b) y, temperatura y concentración celular (c) en el rendimiento de etanol. 53

Figura 14. Gráficos de Superficie de Respuesta de fermentaciones realizadas con la levadura Saccharomyces cerevisiae C8 a diferentes condiciones. Efecto de la temperatura y extracto seco (a), extracto seco y concentración de inoculo (b) y, temperatura y concentración celular (c) en el rendimiento de etanol. 54

Figura 15. Cinética de fermentación de cerveza utilizando la levadura aislada Saccharomyces cerevisiae C8. Viñetas estrellas: azúcares fermentables, viñetas triangulares: producción de etanol. 56

Figura 16. Puntaje por jueces de la evaluación sensorial de sabor con base a la escala hedónica utilizada. Cerveza comercial (color plomo), cerveza producida (color negro). …….. 58

Figura 17. Puntaje por jueces de la evaluación sensorial de aroma con base a la escala hedónica utilizada. Cerveza comercial (color plomo), cerveza producida (color negro). ……. 59

Figura 18. Puntaje por jueces de la evaluación sensorial de olor con base a la escala hedónica utilizada. Cerveza comercial (color plomo), cerveza producida (color negro). …… 60

RESUMEN

En el presente estudio, se aisló levaduras *Saccharomyces* a partir del mosto de uva fermentado y se evaluó su potencial aplicación en procesos de fermentación de cerveza. La investigación consta de 5 etapas, en la primera se aisló ocho cepas de levadura del género *Saccharomyces*. Para el aislamiento se tomaron muestras de mosto fermentado de uva. Las colonias aisladas se evaluaron en su capacidad de tolerar sulfito utilizando metabisulfito de sodio (600 ppm) y aquellas que toleraron se consideraron representantes del género *Saccharomyces*. Luego, se hizo una evaluación morfológica de las colonias y células mediante microscopía óptica. Seguidamente, las cepas evaluadas se identificaron bioquímicamente utilizando Kit API ID32. En la segunda etapa se evaluó la capacidad de fermentación de las levaduras aisladas utilizando un medio sintético con diferentes fuentes de carbono: glucosa, fructosa, maltosa, lactosa y sacarosa. Los resultados mostraron que las cepas no fermentan lactosa, pero si los demás azúcares: glucosa, fructosa y sacarosa. En la tercera etapa se evaluó la capacidad fermentativa de las cepas a diferentes concentraciones de etanol: 2%, 6%, 10%, 14% y 18%v/v. Todas las cepas mostraron una buena capacidad fermentativa a concentraciones de etanol igual o mayor a 10%v/v. La cepa con mayor tolerancia al etanol (14 y 18%v/v) y rápida fermentación de maltosa fue seleccionada para posteriores ensayos. De las cepas evaluadas se seleccionó la que tuvo las mejores características. La cepa seleccionada (*Saccharomyces* C8) se evaluó en su capacidad fermentativa usando mosto de malta a diferentes temperaturas, concentración celular y grados plato. Para ello se utilizó un diseño factorial completo 2^3 con tres repeticiones y cuatro puntos centrales. Se determinó tres variables respuestas: producción de etanol, productividad de etanol y rendimiento de etanol. En la optimización del proceso se obtuvo los mejores resultados para las variables respuesta. Para la producción de etanol se obtuvo un valor máximo de 51,06 g/L a 15 °C, 20°Plato y $1x10^8$ cel/ml. En la productividad de etanol el valor máximo fue de 0,159 g/L.h a 18 °C, 20°Plato y $1x10^8$ cel/mil. En cuanto a rendimiento se obtuvo un valor máximo de 41,2% a 12 °C, 20°Plato y $1x10^6$ cel/ml. La última etapa se realizó en un biorreactor donde se usó las variables de optimización incluido una tasa de aireación de 0.075 vvm y se evaluó la calidad de la cerveza mediante una escala hedónica. La cerveza tuvo una concentración de etanol de 36 g/L. En la evaluación sensorial tanto para olor, sabor y aroma fue aceptable en "me gusta ligeramente" y no hubo diferencia significativa en comparación con una cerveza artesanal.

SUMMARY

Yeasts belonging to the genera *Saccharomyces* were isolated from fermented grape must and evaluated in their potential application in beer fermentation processes. The research included five stages: isolation of eight yeast colonies presumably belonging to the genus *Saccharomyces*. Isolated colonies were tested in their capability of tolerating sodium metabisulphite. Then a morphological observation of the colonies and individual cells were carried out by optical microscopy. Subsequently, the yeasts strains were biochemically analyzed by API ID32. In the second stage, the fermentative capacity of isolated yeasts was evaluated using synthetic medium containing different carbon sources such as: glucose, fructose, maltose, lactose, or sucrose. Results showed that the strains fermented all tested sugars except lactose. In the third stage, the fermentative capacity of the isolates was evaluated at different ethanol concentrations such as: 2%, 6%, 10%, 14% y 18%v/v. All tested yeast strains showed the capability of fermenting ethanol at concentrations over 10%v/v. The yeast strains with higher capability of tolerating ethanol (14 and 18%v/v) and higher maltose fermentation rate were selected for further experiments. Finally, the yeast strain with better fermentative characteristics was chosen for future experiments. The selected strain (*Saccharomyces* C8) was evaluated in its fermentative behavior using malt wort at different temperatures, cellular density, and dry extract content (°Plato). The effect of the different parameters in the ethanol production, productivity and yield was evaluated using a 2^3 full factorial design considering three repetitions and four central points. The optimization was carried out by Surface Response Methodology according to each dependent variable. Optimization results showed the highest production of ethanol (51,06 g/L) at 15 °C, 20°Plato and $1x10^8$ cel/mL. On the other hand, the highest ethanol productivity (0,159 g/L.h) was reached working at 18 °C, 20°Plato and $1x10^8$ cel/mL. Regarding to the ethanol yield, the highest value (41,2%) was reached working at 12 °C, 20°Plato and $1x10^6$ cel/mL. The last stage of the research was performed running fermentation experiments in a fermenter using malt wort and as parameters the values found in the previous stage including an aeration rate of 0.075 vvm. The fermented wort obtained in the experiments were sensory evaluated with a hedonic scale of five points. The beer showed an ethanol content of 36 g/L. Results of the sensory evaluation regarding to the odor, taste and flavor indicated a punctuation of 4 of a hedonic scale of 5. Results of comparison with a commercial craft beer showed no statistical difference.

INTRODUCCIÓN

Actualmente la producción de nuevas variedades de cerveza se está expandiendo en diversos países del mundo, y Perú no es una excepción. Una forma de desarrollar nuevas variedades de cerveza, es trabajar con diversos tipos de levaduras que aporten nuevos aromas y sabores que incrementen la calidad sensorial.

Las cervecerías artesanales están buscando usar levaduras no convencionales para producir cervezas diferenciadas. Una especie que se está estudiando es *Saccharomyces ludwigii* con el objetivo de producir cervezas bajas en calorías y bajo en etanol (Gschaedler, 2017). La búsqueda de nuevas levaduras es el objetivo a cuál apuntan los cerveceros artesanales. Las levaduras tipo *Saccharomyces* pueden ser aisladas de diferentes medios, principalmente de plantas y frutos. Una forma más eficaz de poder aislar estas levaduras, es cuando con las frutas se elabora un mosto y se deja en fermentación. Cuando la fermentación del mosto inicia, coexisten diferentes géneros de levaduras y bacterias, pero conforme se desarrolla el proceso fermentativo, el mosto aumenta su concentración en etanol eliminando la mayoría de bacterias y levaduras que no toleran este compuesto o su tolerancia es baja. En este medio comienzan a desarrollarse unos pocos microorganismos con alta tolerancia al etanol, entre ellos destacan las levaduras del género *Saccharomyces*.

Las cervezas generalmente tienen un grado alcohólico de 5% v/v, pero dentro de lo artesanal, es común encontrar cervezas con un mayor contenido de etanol hasta de un 11% que se asemejan al vino. Para estas condiciones es necesario emplear una levadura que tenga una tolerancia de etanol alta. Luego de establecer esta característica para la levadura, se debe tener en cuenta otros parámetros muy importantes para una cerveza diferenciada. Esta levadura debe ser capaz de fermentar los azúcares presentes en el mosto, principalmente la maltosa que se encuentra en mayor proporción (Willaert, 2016). Esta levadura también debe producir aromas agradables y diferenciados. Esta última característica es muy valorada al momento de degustar una nueva cerveza.

Es necesario conocer las características de la nueva levadura en lo que se refiere a parámetros de fermentación de cerveza, como son temperatura, concentración celular, grados plato y pH. El mosto de cerveza trabaja a un rango de pH entre 5.3 y 5,6 y conforme avanza la fermentación va disminuyendo hasta 4,2 (Kunze, 2006). La temperatura de fermentación influye de forma significativa en el producto final, así, a

temperaturas bajas (cervezas lager) se obtiene cervezas ligeras y ofrecen una variedad reducida de aromas, en cambio, a temperaturas más elevadas (cervezas ale) se obtiene una gama de aromas más diverso. En las cervezas artesanales es preferible trabajar a temperaturas altas debido al ahorro de costos y obtención de sabores y aromas diferenciados. Los grados plato indican la cantidad de sólidos totales presentes en el mosto y su concentración determina el grado alcohólico que se puede obtener luego de la fermentación. Es importante conocer la capacidad de fermentación de la levadura en un medio con diferentes grados plato. La cantidad de levaduras que se emplea determina la velocidad de fermentación, pero es necesario conocer un punto de equilibrio para obtener una buena calidad de fermentación y minimizar costos.

Para conocer los parámetros de fermentación de una cepa de levadura, se debe realizar un diseño de experimentos, donde se busca optimizar las características más acertadas de la cepa y evaluar si es apta para llegar al objetivo que se desea lograr. También es importante en el proceso final, evaluar la calidad de cerveza obtenida y determinar si cumple con la aceptación del público a quien va dirigido.

I. MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades de las levaduras

Las levaduras son microorganismos eucariotas unicelulares pertenecientes al reino fungi. En la actualidad se indica que solo han sido descritas aproximadamente el 1% de las especies existentes (Pandey, et al., 2017). Se clasifican en ascosporógenas, basidiosporógenas y levaduras imperfectas. Dentro de las levaduras ascosporógenas se encuentran las del género Saccharomyces y son las que han acompañado al ser humano en procesos fermentativos desde los inicios de la civilización. (Batt 2014). En las demás clasificaciones se encuentran las levaduras no *Saccharomyces* y se caracterizan por no tener mayores aplicaciones industriales y en muchos casos se consideran como levaduras contaminantes (Ciani *et al*. 2009).

La elaboración de las primeras bebidas alcohólicas como el vino y la cerveza dieron inicio a la selección de las levaduras donde desarrollaron la capacidad de crecimiento anaerobio facultativo (Gojkovic et al., 2004), la duplicación genómica a partir de sus ancestros (Kellis et al., 2004), mutación y la adquisición de material genético nuevo (Dujon B, 2010) entre otros. Estos factores permitieron un incremento del flujo glicolítico y su adaptación a la fermentación de monosacáridos y oligosacáridos para formar etanol, que les proporcionó una importante ventaja selectiva (Conant & Wolfe, 2007).

La especie *Saccharomyces cerevisiae* fue el primer microorganismo eucariótico cuyo genoma fue secuenciado, se convirtió en un campo de pruebas para nuevas tecnologías (Hittinger et al, 2015).

1.1.1 Levaduras *Saccharomyces spp.*

El género *Saccharomyces* es fermentativo por excelencia, su estudio ha permitido diversos procesos tecnológicos en la alimentación. Podemos encontrar a *S. bayanus, S. cariocanus, S. cerevisiae, S. kudriavzevii, S. mikatae y S. paradoxus* (Kurtzman y Robnett, 2003) y son, con mucho, los más utilizados en la industria cervecera. Tienen varias propiedades que los hacen sobresalientes para uso industrial, incluido el rápido crecimiento, la buena capacidad para producir etanol y una tolerancia para varias tensiones ambientales, como la alta concentración de etanol y los bajos niveles de oxígeno (Piskur y Langkjaer, 2004). Pero no solamente por su capacidad fermentativa, sino también por las propiedades organolépticas que estas pueden aportar a los productos

fermentados, tal es el caso de S. bayanus que brinda intensos olores florales a la bebida. *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces bayanus y Saccharomyces pastorianus* están asociados con ambientes antrópicos, mientras que *Saccharomyces paradoxus, Saccharomyces kudriavzevii, Saccharomyces cariocanus, Saccharomyces mikatae* y el recientemente descrito *Saccharomyces arboricolus* están mayormente aislados de ambientes naturales. La mayoría de las cepas de levadura utilizadas para la fermentación alcohólica ahora se reconocen como *S. cerevisiae. S. pastorianus* es una especie híbrida utilizada para la producción de cerveza lager (fermentación inferior), mientras que las levaduras de cerveza que participan en la fermentación superior pertenecen principalmente a la especie *S. cerevisiae*. En la última década, se ha identificado un número creciente de híbridos naturales inter e intraespecíficos, predominantemente entre las levaduras domesticadas (Querol & Bond, 2009.)

a) Morfología

Las levaduras del género *Saccharomyces* morfológicamente se caracterizan por ser redondas, ovaladas o cilíndricas. La especie más estudiada es *Saccharomyces cerevisiae* quien posee una forma ovalada y un tamaño aproximado de 5 μm. (Hernández et al., 2015). Las levaduras en medios sólidos tienden a formar colonias, donde su apariencia estructural es variable de acuerdo al género. Esto se debe a las características morfológicas de las células individuales, etapas del ciclo de vida y por el tipo de gemación, además que también está influenciado por la disponibilidad de nutrientes del medio (Vopálenská et al.,2005). Las colonias de *Saccharomyces cereviciae* aisladas de medios naturales se caracterizan por ser esponjosas, redondas y lisas; mientras que las cultivadas en laboratorio son suaves y no esponjosas (Kuthan, 2003).

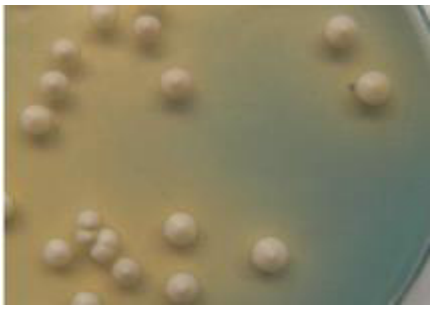


Figura 1. **Morfología de las colonias de S. cerevisiae aisladas a partir de mosto de uva cultivadas en un medio diferencial WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient). Fuente: Gody, 2013**

b) Reproducción

Se conoce muy bien el ciclo de vida de las levaduras en el laboratorio y se asume que las levaduras silvestres tienen el mismo comportamiento con una ligera diferencia que en estas predomina el estado diploide (Replansky et al., 2008)**.** Las levaduras pueden estar en su forma diploide o haploide, donde predomina la reproducción asexual (gemación o clonal); pero cuando experimentan falta de nitrógeno en su medio, se activa la reproducción sexual (meiosis) y las células diploides producen cuatro esporas, dos del tipo a y dos del tipo α encerrados en un mismo ascus. Estas esporas pueden aparearse dentro del mismo locus y producir dos esporas diploides que posteriormente pueden entrar en mitosis o meiosis de acuerdo a las condiciones del medio (Herskowistz, 1988). Las esporas también pueden liberarse del ascus y desarrollarse como haploides que solo se reproducirán asexualmente. Las esporas haploides se reproducen sexualmente cuando una del tipo a se encuentra con otra del tipo α y logran fusionarse, proceso llamado outcrossing. Si en el medio solo existen células del tipo a o α se desarrolla un proceso llamado autodiploidización, (Replansky et al., 2008).

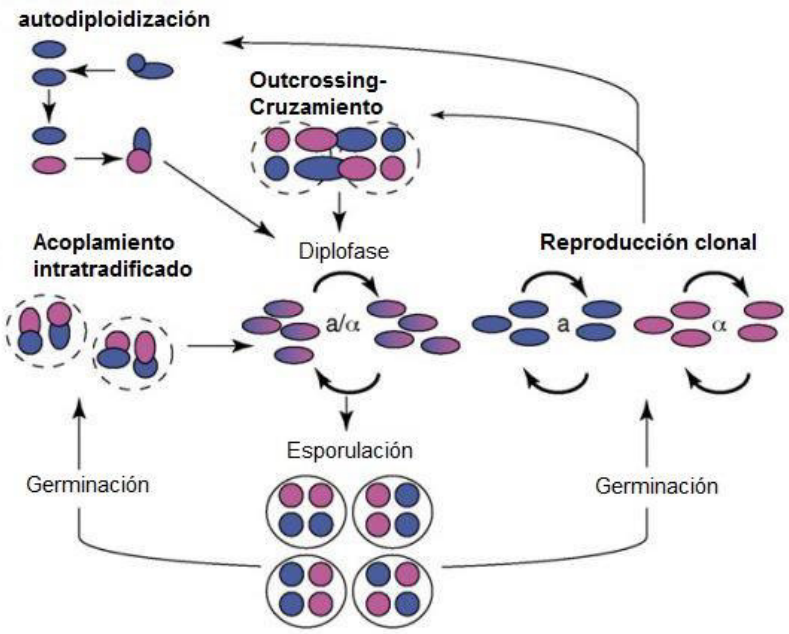


Figura 2. **Ciclo de vida de levadura Saccharomyces spp.**
Fuente: Replansky et al., 2008

La reproducción sexual en las levaduras está condiciona por el medio y se acentúa en las levaduras salvajes ya que su entorno muchas veces carece de nutrientes o es invadida por otros microorganismos. Cuando el entorno es favorable, predomina la reproducción

asexual a través de brotación o gemación. La gemación es un proceso mitótico donde la célula madre transfiere una copia de su material genético a la célula hija, ésta al separarse de la madre es de menor tamaño que luego entra en una etapa de crecimiento antes de entrar en la fase reproductiva; todo este proceso dura alrededor de 100 minutos (Herskowistz, 1988). Las levaduras haploides tienen una gemación axial, mientras que, en las diploides, su gemación es bipolar (Wang, 2017).

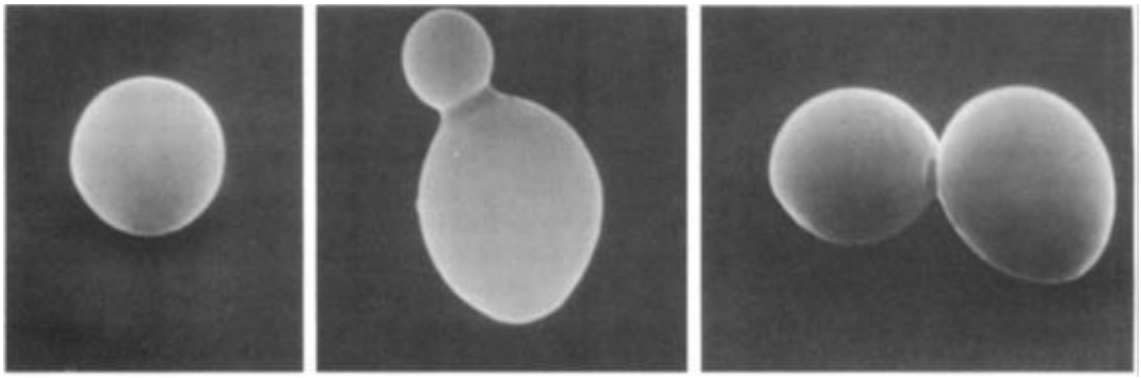


Figura 3. **Reproducción por gemación de *Saccharomyces cerevisiae*.**
Fuente: Herskowistz, 1988.

c) Requerimientos nutricionales

Las levaduras necesitan nutrientes, tanto para obtener energía, para poder crecer y reproducirse, así como para la regulación de sus funciones vitales. Para obtener energía recurren a fuentes de carbono presentes en carbohidratos como glucosa (principal fuente de azúcar), fructosa, maltosa, lactosa, sacarosa, entre otros (Saccharomyces cerevisiae no es capaz de fermentar lactosa previa a una fermentación enzimática (Zumbado, 2006)).

Para la reproducción y aumento de la biomasa celular es necesario una fuente de nitrógeno. Si esta fuente escasea, la forma de reproducción cambia de mitosis a meiosis. El nitrógeno está presente en la naturaleza en su forma orgánica como inorgánica, donde las levaduras aprovechan en su forma inorgánica como el amoniaco y nitratos (Cáceres & Reyna, 2002).

También hay otras fuentes de nutrientes que se requiere en menor proporción, pero no menos importantes, como el fósforo y azufre, para la síntesis de ácidos nucleicos y como elemento estructural respectivamente. Están también los micronutrientes como vitaminas y minerales (Cáceres & Reyna, 2002).

d) Metabolismo

El metabolismo es un conjunto de procesos, donde unos están relacionados con la degradación de moléculas complejas (catabolismo), mientras que otros procesos tienen que ver con la síntesis de macromoléculas, comúnmente denominado anabolismo (Mathews et al, 2002). Todos estos procesos se llevan a cabo simultáneamente dentro de la célula de levadura que le permiten desarrollar sus funciones vitales.

La principal fuente de las levaduras para obtener energía es la glucosa, fructosa y manosa; y en general las hexosas y algunos polisacáridos a través de la ruta metabólica Embden-Meyerhof o glucólisis donde los sustratos se metabolizan a piruvatos (Van Maris et al., 2006). Si el medio es aerobio, los piruvatos continúan a la siguiente ruta metabólica para la degradación total del sustrato a CO_2, caso contrario el piruvato se metaboliza para obtener etanol.

La membrana celular es semipermeable, por lo tanto, el primer paso es el transporte de los sustratos al interior de la levadura. Los monómeros de azúcar, en especial las hexosas como la glucosa, fructosa y manosa se lleva a cabo a través de transportadores específicos comúnmente denominados permeasas. En el caso de azúcares más complejos, antes de ser transportados, primero se hidrolizan fuera de la célula (Flores, Rodriguez, Thomas y Gancedo, 2000). Los sustratos al interior de la célula siguen la ruta metabólica común de Embden-Meyerhof.

La glucólisis es una ruta metabólica de 10 pasos que convierte una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato, con la generación de dos moléculas de ATP. La degradación de polisacáridos de almacenamiento y el metabolismo de los oligosacáridos da lugar a glucosa, hexosas relacionadas y azúcares fosfato, todos estos pasan por la ruta glucolítica. Las diez reacciones glucolíticas se producen en dos fases: Inversión de energía y generación de energía (Mathews et al, 2002).

Dentro de las 5 primeras reacciones en la inversión de energía tenemos:

- **Fosforilación.** Es una primera inversión de ATP, donde la glucosa pasa por fosforilación catalizada por una hexoquinasa, generando glucosa-6-fosfato.
- **Isomerización de la glucosa 6 fosfato.** Reacción catalizada por fosfoglucoisomerasa, donde se produce una isomerización reversible de una aldosa (glucosa-6-fosfato) a la correspondiente cetosa (fructosa-6-fosfato).

- **Fosforilación.** La enzima fosfofructoquinasa lleva a cabo una segunda fosforilación dependiente de ATP produciendo un derivado de la hexosa fosforilado, D-Fructosa-1,6-bisfosfato.
- **Ruptura o fragmentación en dos triosas fosfatos.** Esta reacción es catalizada por la fructosa-1,6-bifosfato aldolasa dando lugar a dos intermediarios de tres carbonos, el gliceraldehido-3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato.
- **Isomerización de la dihidroxiacetona fosfato.** es la conversión de la dihidroxiacetona fosfato en el gliceraldehido-3-fosfato, reacción catalizada por triosa fosfato isomerasa.

Las cinco reacciones de la fase de generación de energía son:

- **Oxidación y fosforilación.** Interviene la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa generando 1,3-Bisfosfoglicerato.
- **Fosforilación a nivel de sustrato.** El 1,3-Bisfosfoglicerato transfiere su grupo acil-fosfato al ADP, con la consiguiente formación de ATP y 3-fosfoglicerato, catalizada por la fosfoglicerato quinasa.
- **Isomerización.** Es la activación de 3-fosfoglicerato con una isomerización catalizada por la fosfoglicerato mutasa para dar 2-fosfoglicerato.
- **Deshidratación.** Catalizada por la enolasa genera otro compuesto de energía elevada el fosfoenolpiruvato y además de agua.
- **Fosforilación a nivel de sustrato.** El fosfoenolpiruvato transfiere su grupo fosforilo al ADP en otra fosforilación a nivel de sustrato generando la molécula de piruvato y ATP, esta reacción es catalizada por piruvato quinasa.

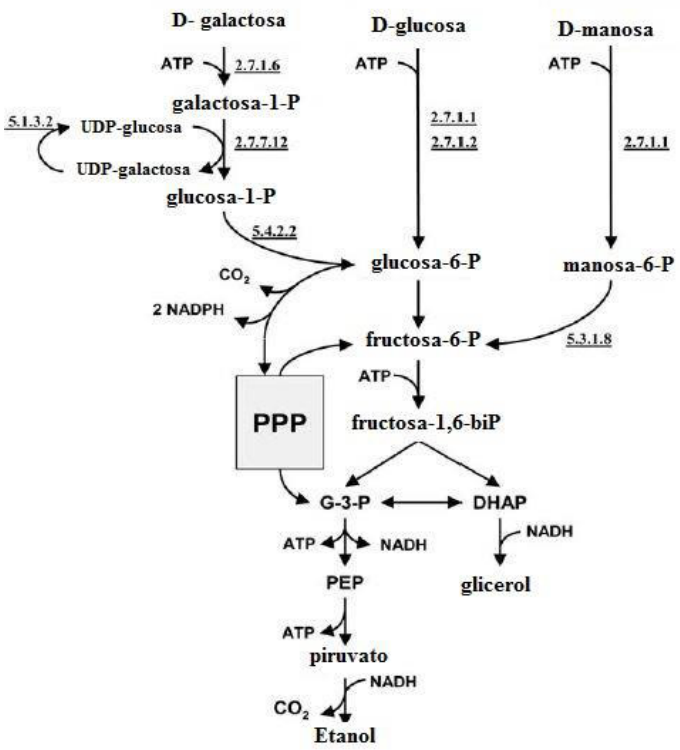


Figura 4. **Catabolismo de Saccharomyces cerevisiae de las hexosas.**
Fuente: Van Maris et al., 2006.

El piruvato tiene numerosos destinos alternativos en las levaduras. *Saccharomyces* toma principalmente dos caminos dependiendo de la presencia de oxígeno en su medio. Puede continuar con un metabolismo anaeróbico o aeróbico.

- **Metabolismo anaerobio**

  El metabolismo del piruvato para obtener etanol es una ruta que siguen las levaduras en un medio anaeróbico. Este proceso se desarrolla en dos etapas; la descarboxilación del piruvato y la deshidrogenación del acetaldehído.

  Descarboxilación del piruvato. Se lleva una descarboxilación no oxidativa del piruvato a acetaldehído, catalizada por la piruvato descarboxilasa donde se libera un mol de CO_2.

  Deshidrogenación del acetaldehído. Es la reducción del acetaldehído a etanol, dependiendo del NADH y catalizada por la alcohol deshidrogenasa.

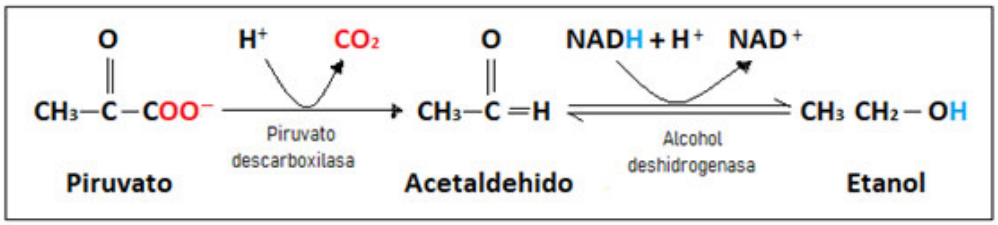


Figura 5. **Metabolismo del piruvato a etanol.**

Fuente: Mathews et al, 2002.

Como reacción final, a partir de un mol de piruvato se obtiene un mol de etanol y un mol de CO_2. Como balance general neta de la fermentación alcohólica se tiene que a partir de un mol de glucosa se genera 2 moles de etanol, 2 moles de CO_2 y 2 ATP.

- **Metabolismo aerobio.**

  Cuando el medio de las levaduras está oxigenado, el piruvato sigue la ruta metabólica del ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico. El piruvato sufre una descarboxilación oxidativa mediada por el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa que está ubicado en la mitocondria de la levadura formándose acetil-CoA. También puede producirse acetil-CoA en el citosol y luego transportarse a la mitocondria, este proceso es mediado por el bypass del piruvato donde participan una serie de enzimas (Flores, et al., 2000). El acetil-CoA entra a la ruta metabólica del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) donde este metabolito junto con el oxalacetato, tras una condensación generan citrato. Este compuesto generado inicia el ciclo, que luego da paso a una serie de reacciones tanto de oxidación como de hidrólisis dando como resultado la producción de energía que se almacena en los enlaces de ATP, CO_2 y agua (Baccolo, 2018). El ciclo del ATC inicia con la deshidratación del citrato a cis-aconitato. El cis-aconitato se hidrata y forma isocitrato. Posteriormente tras una serie de reacciones de oxidación y reducción el isocitrato se oxida a α-cetoglutarato; el α-cetoglutarato se oxida a succinil-CoA. En los siguientes pasos se da la formación del succinato, fumarato, malato y su oxidación a oxaloacetato donde finaliza el ciclo. En toda esta serie de reacciones participan cofactores reductores como el NAD y FAD.

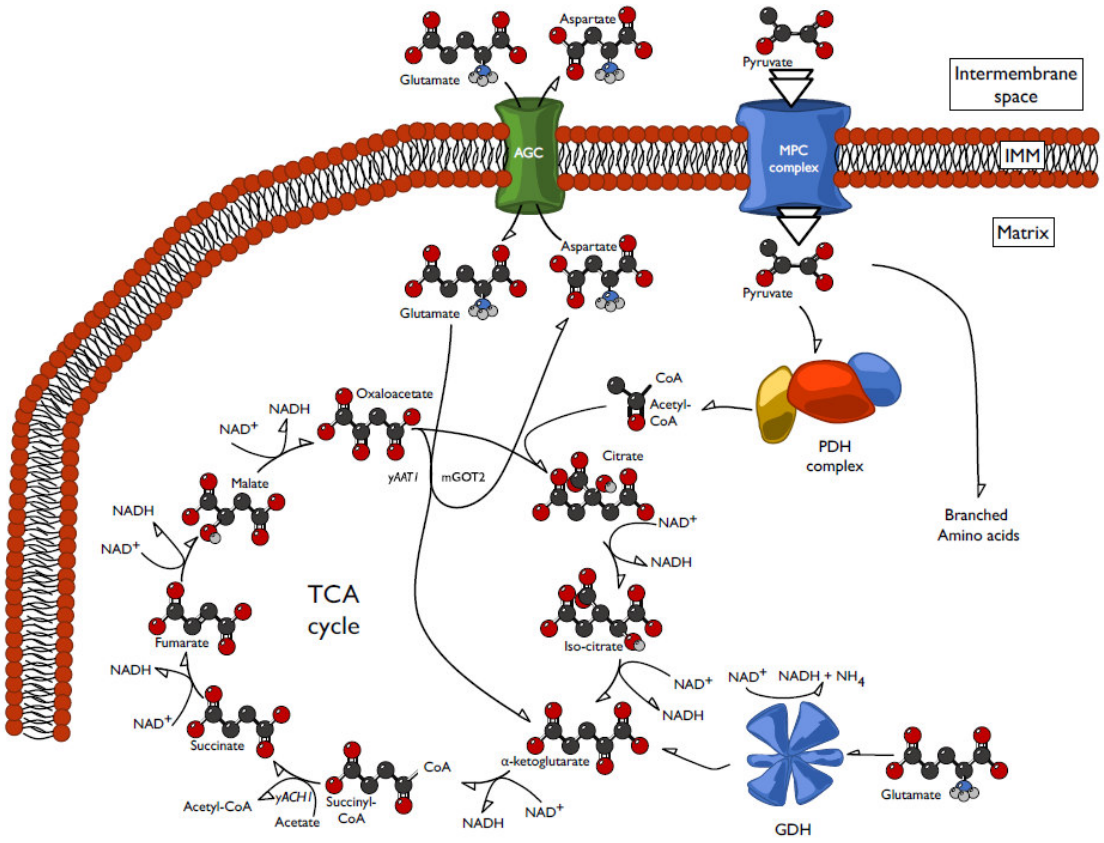


Figura 6. **La figura muestra el ingreso del piruvato a través de la membrana mitocondrial que tras una descarboxilación oxidativa por el complejo PDH (piruvato deshidrogenasa) se genera acetil-CoA para luego entrar al ciclo del TCA.**

Fuente: Baccolo, 2018.

La siguiente etapa de la respiración es la fosforilación oxidativa donde los electrones generados en el ciclo de Krebs entran a la cadena respiratoria en forma de NADH y $FADH_2$ que consta de cuatro complejos enzimáticos (I, II, III y IV) para finalmente reducir electrones de oxígeno molecular y formar moléculas de agua. En el proceso también se genera ATP.

Metabolismo fermentativo de azúcares

a) Efecto Pasteur

Este fenómeno fue notado por Luis Pasteur cuando a cultivos anaerobios de levaduras que tenían como sustrato glucosa le expuso al aire y redujeron drásticamente el consumo de este sustrato.

El efecto Pasteur inhibe la glucólisis por la presencia del oxígeno. Desde el punto de vista biológico es aceptable ya que se obtiene mayor energía a través de un proceso respiratorio que implica la oxidación completa de la glucosa (Mathews et al, 2002).

b) Efecto Crabtree

Las levaduras complejas del género *Saccharomyces* puede sobrevivir sin oxígeno mediante un proceso de fermentación. En ausencia de oxígeno estas levaduras transforman carbohidratos como la glucosa en etanol y CO_2. Sin embargo, esto también puede ocurrir en presencia de oxígeno cuando hay una alta concentración de carbohidratos debido a un circuito de "represión de glucosa" que reprime la parte respiratoria en presencia de glucosa; conocido como efecto Crabtree (Sicard y Legras, 2011).

El efecto Crabtree en la fermentación alcohólica es una vía predominante en la degradación de azúcares de hexosa en presencia de oxígeno, debido a la insuficiente capacidad o saturación o represión del metabolismo respiratorio, lo que lleva a desbordamiento de piruvato. Así mismo la represión de la glucosa implica un proceso por el cual en presencia de glucosa se interrumpe la expresión génica de una variedad de enzimas involucradas en el uso de otras fuentes de carbono, citocromos, ciclo de Krebs y respiración. (Piskur et al 2006).

Después del agotamiento de la glucosa y la acumulación de etanol, el metabolismo de la levadura cambia: en presencia de oxígeno, se produce la respiración y el etanol se convierte en un sustrato que se degrada. El cambio de metabolismo de la producción de etanol a través de la fermentación al consumo de etanol a través del proceso de respiración se conoce como el cambio diáuxico. Este cambio requiere varios elementos, incluidas las enzimas alcohol deshidrogenasa (Adh). En *S. cerevisiae*, se ha demostrado que Adh1 es predominantemente responsable de la producción de etanol, mientras que se espera que Adh2 use preferentemente etanol como sustrato (Sicard y Legras, 2011).

e) Tolerancia a agentes exógenos

- **Tolerancia al etanol**

Las levaduras *Saccharomyces* son sensibles a elevadas concentraciones de etanol. En un medio con alta acumulación de etanol ocurren diferentes eventos como por ejemplo se inhibe la viabilidad celular, se afecta los sistemas de transporte, la integridad de la membrana celular colapsa, disminuye la fluidez de la membrana plasmática, se altera el potencial electroquímico y ocurre un proceso de acidificación en el interior de las células. A elevadas concentraciones, el etanol también desnaturaliza enzimas importantes de la ruta glucolítica, como son la hexocinasa y la piruvato quinasa. En general, el etanol afecta de manera sistemática a las levaduras y el mecanismo de resistencia que se desarrolla involucra a diferentes componentes de la célula, desde la estructura de la membrana, aminoácidos como la prolina y el triptófano, proteínas y algunas enzimas (Lewis, 2010).

Dentro de la estructura de la membrana se encuentran dos componentes importantes que mejoran la tolerancia al etanol y controlan su toxicidad. El ergosterol y los lípidos insaturados forman parte de la membrana celular, y en las levaduras con alta tolerancia de etanol estos se encuentran en una mayor proporción manteniendo un espesor óptimo de la membrana y contrarrestando así el efecto del etanol (Venegas et al., 2012). Los lípidos insaturados que participan en la tolerancia al etanol son los ácidos grasos monoinsaturados, el ácido oleico y el ácido palmitoleico (Ding et al., 2009).

Otros componentes que ayudan a las levaduras a una mejor tolerancia de etanol son los aminoácidos, dentro de ellos destaca la prolina, que en una cantidad equilibrada mejora la tolerancia al etanol, aunque no se conoce aún con certeza como interacciona con los fosfolípidos. Un exceso de este aminoácido resulta tóxico y retrasa el crecimiento de las levaduras. Las proteínas de choque térmico y la trehalosa ayudan a reparar y estabilizar las proteínas funcionales de la membrana celular contribuyendo de esta manera a contrarrestar el efecto del etanol (Ding et al., 2009).

La concentración de etanol en un proceso de fermentación también afecta los transportadores de glúcidos hacia el interior de las levaduras, por lo que es necesario realizar una evaluación y determinar su eficiencia si estas van hacer reutilizadas en procesos fermentativos (Zhao y Bai, 2009).

- **Tolerancia al dióxido de azufre (SO_2)**

El sulfito se ha usado desde tiempo como un conservante de alimentos, y en el rubro de las bebidas se usa generalmente en el vino debido a que tiene propiedades antioxidantes

y antisépticas. El sulfito se disocia en varios componentes donde la proporción de cada uno de ellos depende del pH del medio. La especie antiséptica es el SO_2 molecular que se encuentra a mayor proporción a pH bajo; inhibe el crecimiento celular debido a la interferencia con los procesos metabólicos de las células. Ciertas especies de levaduras han desarrollado un mecanismo de tolerancia a este componente, las especies predominantes y más estudiadas son las del género *Saccharomyces* (Divol et al., 2012).

Las levaduras del género *Saccharomyces* son las más tolerantes al dióxido de azufre en comparación con otros géneros (Henick-Kling, et al., 1998). En el estudio que realizaron estos autores, añadieron 50 g/L de SO_2 a un mosto de uva, donde las levaduras no *Saccharomyces* se eliminaron casi en su totalidad, quedando el género *Zygosaccharomyces sp.* En cambio, las levaduras del género *Saccharomyces* crecieron en la misma proporción con SO_2 a 50 g/L que al 20 g/L. Otro estudio también evidencia la supremacía de *Saccharomyces cerevisiae* frente a *Dekkera bruxellensis* en tolerancia al SO_2, donde esta última creció en un rango de 60 a 90 mg/L, mientras que *Saccharomyces* crecía por debajo de los 200 g/L de dióxido de azufre (Barata *et al.,* 2008).

La pérdida de la viabilidad celular por acción del SO_2 se debe a la unión de este compuesto a los receptores de las proteínas que se encuentran en la superficie de la membrana celular, donde el complejo receptor-dióxido de azufre disminuye la energía libre de activación de algún proceso que pueda catalizar la proteína (Anacleto y Uden, 1982). Dentro de la catálisis está la hidrólisis descontrolada del ATP llegando a perderse casi todas las reservas internas de esta fuente de energía desencadenando la pérdida de la viabilidad celular (Schimz and Holzer, 1979).

1.2. Nichos de aislamiento de levaduras

1.2.1. Distribución de las levaduras en la naturaleza

Las levaduras están presentes en todos los hábitats naturales como el suelo, plantas, la atmósfera, frutas, ambientes marinos, etc. Esto se debe a que poseen una gran diversidad en cuanto a su fisiología, que les permite adaptarse a cualquier ambiente (Mambuscay et al., 2013). Las levaduras también han desarrollado un proceso adaptativo y muchas de ellas están asociadas a procesos productivos del ser humano como por ejemplo en alimentos y bebidas fermentadas (Kurtzman and Robnett, 1998). El campo adaptativo de las levaduras es amplio y las *Saccharomyces* forman parte de ello,

encontrándose en mayor proporción en fuentes de carbono simples como la disponibilidad de hexosas.

1.2.2. Fuentes naturales de aislamiento

Superficie de frutas

La superficie de las frutas es un importante nicho de fuente natural donde se encuentran las levaduras debido a su fuente rica en azúcares y bajo pH. En la superficie de cada tipo de fruta conviven diferentes géneros de levaduras, así, en frutas como piña, uva y mora se encontraron *Hanseniaspora, Pichia, Candida* y *Wickerhamomyces* (Mambuscay et al., 2013).

Las levaduras del género *Saccharomyces* se encuentran en una mínima proporción en las frutas, sin embargo, aumentan en cantidad cuando otros microorganismos inician el proceso de fermentación de los frutos. En un estudio realizado en la microflora de la superficie de uvas maduras, en su mayoría se encontraron levaduras de los géneros *no-Saccharomyces*. Estos géneros son desplazados por *Saccharomyces* debido a que no son buenos fermentadores de azúcares (González et al., 2006).

Además, la variedad de géneros y especies de levaduras presentes en la superficie de las uvas depende de diversos factores, como la ubicación geográfica del viñedo, el estado de maduración de la fruta, el tipo de suelo, entre otros. Estos factores permiten albergar cepas de levaduras perfectamente adaptadas a un clima en particular generando una diversidad en sus propiedades de sobrevivencia (Francesca et al. 2009).

1.2.3. Fuentes de fermentación espontánea

En la elaboración de vinos, actualmente se está retomando el uso de levaduras *Saccharomyces* autóctonas para que formen parte de un cultivo iniciador junto con levaduras comerciales ya que la que las cepas nativas aportan diversas características sensoriales (Capece et al., 2010). Las levaduras *Saccharomyces* nativas se encuentran en mayor cantidad cuando el mosto de uva o cualquier otro fruto se hace fermentar, esto se debe a que se adaptan mejor al incremento del porcentaje de alcohol en el mosto.

A partir de una fuente de fermentación espontánea rica en azúcares, se puede aislar una diversidad de levaduras y usarse como inóculo para evaluar su capacidad fermentativa. Aquellas que presenten las mejores características se pueden usar para estudios

posteriores y su posible uso a nivel industrial (Suárez-Lepe, 2007). Los principales criterios utilizados, para evaluar las características de las levaduras son:

- **Propiedades Fermentativas:** Inicio rápido de fermentación, Alta eficiencia fermentativa, Tolerancia al etanol, Rendimiento alcohólico moderado, Rango óptimo de temperatura, Producción de biomasa moderada.
- **Propiedades Tecnológicas:** Estabilidad genética, Tolerancia al SO_2, Escasa producción de acetaldehído, Capacidad de floculación, Escasa demanda de nitrógeno.
- **Propiedades Sensoriales*:*** Baja formación de H_2S, Baja producción de acidez volátil, Producción de glicerol, Producción de ésteres volátiles fermentativos.

1.3. Identificación química de las levaduras

La identificación de levaduras se basa comúnmente en el estudio de la morfología celular y reacciones bioquímicas distintivas en un conjunto estandarizado de pruebas de fermentación y asimilación. En la actualidad se comercializan diversos métodos de asimilación de nutrientes que simplifican tanto su uso como su interpretación, (Freydiere et al., 2001).

API 20C AUX® La galería API 20 C AUX (bioMérieux) se compone de 20 cúpulas con sustratos deshidratados que permiten realizar 19 pruebas de asimilación. Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semisólido y las levaduras sólo se reproducen si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente. Permite identificar un total de 34 especies diferentes. La lectura de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene, a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico o un programa informático (Linares y Solis, 2007).

1.4. Tecnología cervecera

1.4.1. Generalidades de la cerveza

La cerveza es una bebida alcohólica que ya elaboraban las primeras civilizaciones. El registro más antiguo de cerveza data alrededor de 6000 años A.C. ubicada en la antigua babilonia. En la actualidad el consumo de esta bebida es de forma masiva y contribuye de manera significativa a la economía de muchos países. La elaboración de cerveza consta de pocos ingredientes que son agua, cebada malteada, lúpulo y levadura. La variación en

cada uno de sus ingredientes da origen a una gran diversidad de cervezas, pero el punto más resaltante en su elaboración está dado en el malteado de la cebada y fermentación en donde se generan aromas específicos (Willaert, 2016).

1.4.2. Tipos de cerveza

La cerveza se clasifica teniendo en cuenta las características de sus componentes, como el tipo de malta, el tipo de lúpulo y el tipo de levadura utilizada. De acuerdo al tipo de malta utilizada se obtienen variedades de sabores y colores desde las más transparentes hasta las más oscuras; el lúpulo influye en el grado de amargor y aroma; las levaduras aportan cuerpo y sabor a la cerveza y generan una variedad de aromas de acuerdo a tipo de fermentación. La cerveza también se clasifica de acuerdo a su grado alcohólico (Estas pueden ser cerveza sin alcohol, cerveza de grado medio y cerveza de grado alto)

La cerveza sin alcohol, de acuerdo a especificaciones técnicas debe tener un grado alcohólico menor al 0,5% (Zarnkow, 2014). Este tipo de cerveza se resalta sus propiedades hipnóticas provenientes del lúpulo que controlan la ansiedad y la calidad de sueño (Franco et al., 2012). Las cervezas no alcohólicas se elaboran de dos formas diferentes, una por procesos físicos como filtración por membranas (Jackowski & Trusek 2018) y lo otro por un medio biológico usando levaduras del género *No-Saccharomyces* (Bellut & Arendt 2019). Este tipo de cerveza aún no tiene la aceptación total del público debido a que falta desarrollar estudios sobre la conservación del aroma.

La cerveza más comercializada tiene un grado alcohólico entre 4,7 y 5,0% ubicándose en el grado medio. Es aceptada por la mayoría de los consumidores (Zarnkow, 2014); Se comercializan una gran diversidad según el tipo de malta y proceso de fermentación. Según su proceso de fermentación se clasifican en dos grandes grupos: lager y ale. La lager se caracteriza por temperaturas de fermentación bajas (6-12 °C) y son ligeras mientras la cerveza ale su temperatura de fermentación es alta (15-25 °C) y tienen aromas más afrutados.

Las cervezas con grado alcohólico alto (superior al 12°) se comercializan en baja proporción y generalmente sirven para acompañamiento en comidas.

1.4.3. Materias primas utilizadas en la elaboración de cerveza

De acuerdo a la ley de pureza dictada en el año 1512 por Guillermo IV, la cerveza debía tener solo 3 ingredientes: Malta de cebada, lúpulo y agua. Posteriormente se incluyó la levadura debido al descubrimiento de Luis Pasteur. Actualmente en Alemania se sigue manteniendo esta ley para consumo interno. A nivel mundial se han desarrollado muchos estilos de cerveza variando o añadiendo ingredientes. Se usa adjuntos y en muchos casos se emplea otro tipo de maltas como la de trigo. En este apartado describiremos los 4 ingredientes básicos de la cerveza.

a) Agua

El contenido de agua en la cerveza comprende entre el 90 y 95% y sus características influyen de manera significativa en la calidad final de la cerveza (Harrison, 2009). La dureza del agua es un parámetro importante que miden los cerveceros, debido a las reacciones químicas que generan, afectan el pH del mosto. Al alterarse el pH del mosto se altera el sabor de la cerveza.

Muchos cerveceros usan diferente calidad de agua en base al interés de las características de la cerveza. Los parámetros de calidad del agua de basan en la alcalinidad, dureza y contenido de iones dónde estos deben ser minimizados para mejores resultados (Stewart, 2016). El control del cloro en el agua también es un factor muy importante debido a que este confiere sabores intensos o extraños, muchas cervecerías lo controlan usando carbón activado.

b) Cebada

La cebada (Hordeum Vulgare) está dividida en variedades que dependen del arreglo de los granos en su espiga, siendo clasificadas en cebada de dos hileras y cebadas de multihileras, para el proceso de malteado la cebada de dos hileras es la más adecuada. Esta cebada cumple con las características de tener un alto poder germinativo y proteínas suficientes para el desarrollo de las levaduras y formación de espuma. La cebada también debe poseer un alto contenido en almidón para poder generar azúcares fermentables (Harrison, 2009).

La cebada para cerveza debe cumplir con ciertas características (Stewart, 2016):

- Deben germinar como mínimo un 95% de los granos.
- Los granos no deben haber germinado previo a la cosecha.
- La cebada debe tener una humedad máxima del 13%.
- El contenido de proteínas debe estar entre el 11 y 12,5% en peso seco.
- Los granos deben estar sanos y libre de enfermedades.

c) Lúpulo

El lúpulo (*Humulus lupulus*) es una planta guiadora donde sus flores son utilizadas para aportar amargor, sabor y acción conservante a la cerveza (Martínez, 2007). Los lúpulos que se comercializan vienen en 2 presentaciones básicas: Lúpulos amargos y lúpulos aromáticos. Las humulonas sintetizadas en forma de resina por el lúpulo son la fuente de amargor que se confiere a la cerveza. Los aceites esenciales son los responsables del aroma del lúpulo, pueden ser cítricos, florales, afrutadas, entre otros, dependiendo de la variedad del lúpulo (Stewart, 2016).

d) Levaduras cerveceras

Antes del descubrimiento y cultivo de las levaduras, era probable que las cervezas se fermentaran espontáneamente como la cerveza Lambic en la actualidad. El control de calidad no era uniforme y muchas veces algunos lotes se pudieron descartar por contaminación con levaduras o bacterias ambientales. Con el descubrimiento del cultivo de levaduras por Robert Koch y Emil Hansen se pudieron seleccionar cepas adecuadas para la fermentación y conservarlas en cultivos sucesivos existiendo hoy en día en Alemania, un banco de cepas de levadura con características bien documentadas (Zarnkow, 2014). Las levaduras son los microorganismos que fermentan el mosto y producen un cambio químico, transformando los azúcares fermentables del mosto en etanol y CO_2.

1.4.4. Elaboración de cerveza

La elaboración de cerveza consta de cuatro etapas: malteado de la cebada, maceración, fermentación, maduración y filtración. A continuación, se detalla cada una de las etapas:

a) Malteado de la cebada

El objetivo de maltear la cebada es para activar las enzimas que van degradar el almidón en azúcares fermentables como dextrosa, malta y dextrinas que van hacer aprovechadas por las levaduras como su alimento y a cambio producir etanol bajo condiciones adecuadas. En el malteado se generan aminoácidos, que son útiles para el desarrollo y crecimiento de las levaduras. Se producen algunos aromas que influirán en el producto final (Harrison, 2009).

El malteado consiste en tres etapas:

- Remojo. A la cebada se le añade suficiente agua para hidratarlo hasta un 38%.
- Germinación. luego de remojar la cebada, se extiende y se remueve cada cierto tiempo para que germine a temperatura de 15 a 20 °C durante 3 a 7 días.
- Secado. La cebada germinada se coloca en un horno durante 20 horas aproximadamente a temperatura controlada entre 60 y 65 °C para no desnaturalizar las enzimas. En la etapa final de secado la temperatura se eleva hasta 80 °C para maltas claras y hasta 100 °C para maltas oscuras. La humedad final llega hasta un 5%. Luego del proceso de secado se eliminan las raicillas y el grano malteado está listo para la molienda (Zarnkow, 2014).

Extracto de malta. Es un mosto espesado que se ha desarrollado en tiempos recientes y tiene acogida en las cervecerías caseras por su ahorro en procesos de filtración y maceración. Se fabrica a partir del malteado de cebada, donde después del filtrado, el mosto se concentra entre 75 y 80 % en un evaporador al vacío a temperaturas de 50 a 60 °C para evitar reacciones de Maillard. Este tipo de malta no tiene acogida en la producción industrial de cerveza debido a sus altos costos (Kunze, 2006).

b) Maceración

El primer paso consiste en moler la malta ya sea en un molino de rodillos o martillos con el fin de generar una mayor superficie de contacto de las enzimas con el almidón. La malta molida se mezcla con agua para formar el mosto y continuar con el proceso de degradación enzimática. El mosto se somete a una escala de temperaturas con el fin de aprovechar al máximo la acción de las enzimas. Primero se eleva la temperatura entre 40 y 50 °C para aprovechar mejor la actividad de la α-amilasa que hidroliza el

almidón a dextrinas, luego se incrementa la temperatura entre 65 y 70 °C donde actúan mejor las β-amilasas que generan maltosa. Finalmente se eleva la temperatura a 75 °C para inactivar las enzimas. Este proceso dura de 2 a 3 horas (Harrison, 2009).

Una vez que se han inactivado las enzimas, restos de proteínas y granos gastados se sedimentan, el mosto se filtra del sedimento y se coloca en un hervidor. Antes que es mosto hierva se adiciona el lúpulo y luego se hace hervir por de 1 a 2 horas. Hervir el mosto mata cualquier tipo de microorganismo, permite una mejor extracción de los componentes del lúpulo, inactiva por completo las enzimas, se eliminan compuestos volátiles desagradables y mejora el color (Harrison, 2009). Luego de hervir el mosto, se filtra el sedimento y se pasa por un intercambiador de calor que lo lleva hasta la temperatura de fermentación (Zarnkow, 2014).

La maceración influye en muchas características que definirán a la cerveza, como el color, contenido de azúcares no fermentables, proteínas, cantidad de etanol y espuma (Willaert, 2016).

c) Fermentación

- **Fermentación primaria**

Esta etapa consiste en inocular la levadura al mosto para producir etanol y CO_2 a partir de los azúcares fermentables. El ambiente y recipiente de fermentación debe estar limpios y se debe mantener una temperatura estable de acuerdo al tipo de cepa que se va a utilizar (Harrison, 2009). Antes de iniciar la fermentación es necesario airear el mosto para un mejor desarrollo y actividad de las levaduras.

Los azúcares constituyen el 90% de los sólidos totales del mosto y está compuesto principalmente de glucosa, fructosa, maltosa, maltotriosa; fermentándose por las levaduras en el orden descrito. La maltosa es el azúcar más abundante. La sacarosa y fructosa están en menor cantidad (Willaert, 2016).

El tiempo de fermentación depende de la temperatura que se está empleando, así, para una temperatura de 9 °C el tiempo es de 7 días, mientras que para una temperatura de 15 °C el tiempo de fermentación se reduce a 4 días. Entre los subproductos de fermentación, aparte de etanol y CO_2 también se forman alcoholes y ésteres superiores y algunos

compuestos de aromas no refinados como los diacetilos que luego se logra corregir con la maduración (Zarnkow, 2014).

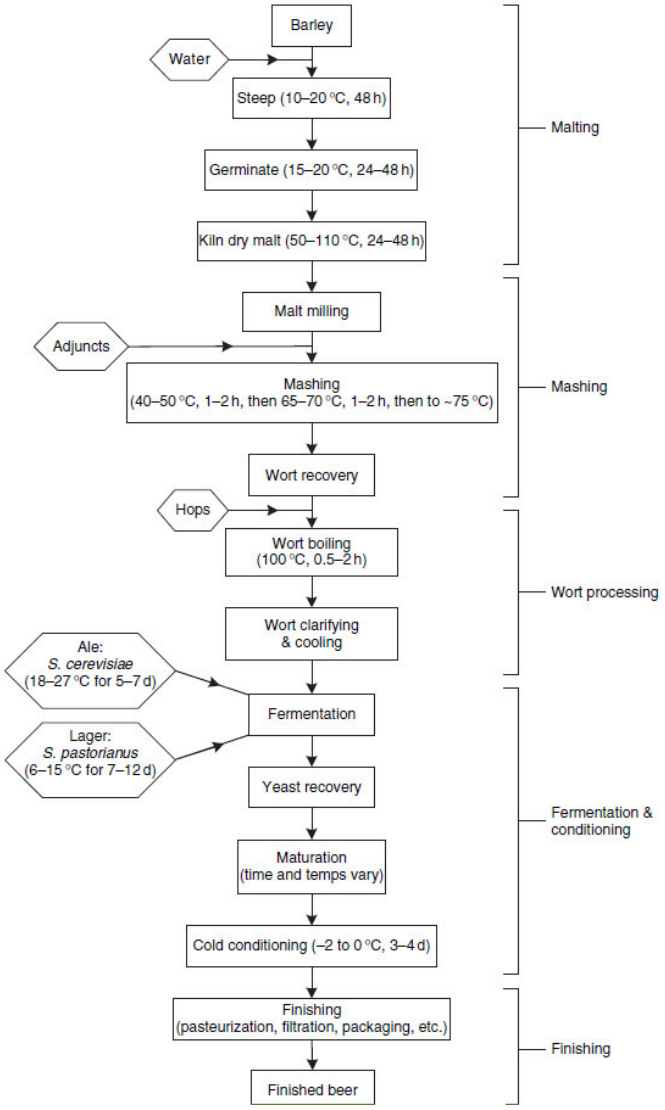


Figura 7. **Proceso de elaboración de cerveza.**

Fuente: Harrison, 2009

- **Fermentación secundaria**

También conocida como etapa de maduración. En esta etapa la cerveza verde reduce el contenido de diacetilos, acetaldehido y compuestos azufrados presentes en algunos ésteres mejorando la calidad sensorial (Zarnkow, 2014).

Las técnicas y condiciones de maduración dependen del tipo de cerveza que se está elaborando. Para la cerveza de baja fermentación (tipo lager) primero se inicia enfriando

la parte inferior cónica del tanque a 5 °C para retirar las levaduras, la parte superior del tanque se mantiene a más temperatura para favorecer la reducción de diacetilo. Este proceso dura 24 horas luego se enfría el resto de la cerveza lentamente hasta 5 °C para completar el proceso de maduración. El proceso de enfriamiento puede durar hasta nueve días. Luego que termina el enfriamiento se extrae nuevamente las levaduras. Finalmente, la cerveza se enfría de -1 a 2 °C durante 2 a 3 días para darle una estabilidad coloidal. Las técnicas de enfriamiento pueden durar más días, dependiendo de los costos y acierto en la calidad (Briggs, et al., 2004).

En el caso de la cerveza de alta fermentación (tipo ale) la temperatura en los tanques de maduración debe ser menor a 10 °C, este tratamiento en frío permite fijar los aromas de la cerveza que se han producido en la fermentación primaria e inhibir precursores de la turbidez (Briggs, et al., 2004).

d) Filtración

Esta etapa consiste en eliminar partículas que dan un aspecto opaco a la cerveza para darle un aspecto brillante, además en esta etapa también se busca una estabilidad coloidal y microbiológica. Es necesario recurrir a la filtración debido a que de forma natural no es posible decantar las partículas en suspensión. Durante la filtración se adicionan aditivos para darle estabilidad a la cerveza. Se adicionan aditivos para la estabilización coloidal, microbiológica, estabilización de aromas, de espuma, entre otros, según lo determine el maestro cervecero (Turc, 2018).

1.4.5. Parámetros en la fermentación de cerveza

a) Temperatura de fermentación

La temperatura influye significativamente en la velocidad de fermentación de la cerveza. A temperaturas mayores a 15 °C el tiempo de fermentación es alrededor de 4 días, mientras que para temperaturas menores a 9 °C la fermentación dura hasta 7 días (Zarnkow, 2014).

La fermentación alta se caracteriza porque brinda a la cerveza una mayor variedad de aromas, esto se debe a una mayor formación de alcoholes superiores y ésteres que se forman en su mayoría en la fermentación primaria. Los principales ésteres que forman parte de la cerveza son: acetato de etilo, aporta un sabor afrutado y caramelo ácido; acetato

de isobutilo e isopentilo, sabor a frutas y banana; etilbutirato, sabor a papaya y manzana; etilhexanoato, sabor a manzana y frutas; entre otros (Kunze, 2006). En la fermentación baja, la producción de ésteres y alcoholes superiores en menor por lo que de obtiene cervezas más ligeras y una menor diversidad de aromas.

b) Contenido de extracto seco del mosto

Los grados plato son los grados Brix del mosto en cervecería y constituyen los sólidos totales sobre 100 g. de mosto. El valor del °Plato se puede emplear para determinar la gravedad específica, usando la tabla denominada "Gravedad específica y °Plato de soluciones de azúcar en porcentaje del extracto por el peso"; tabla 924.33 del Manual de métodos AOAC. Esta tabla correlaciona, grados Brix, gravedad específica y grados Baumé de soluciones azucaradas (Villicaña, 2001).

En la actualidad también se está desarrollando fermentaciones de alta gravedad (16-18 °P) y muy alta gravedad (>18 °P) con la finalidad de reducir inversiones y aumentar la productividad volumétrica. Esta técnica aún no es común en producción a nivel industrial debido a que falta superar ciertas limitaciones por parte de la levadura en cuanto a estrés osmótico, concentración de etanol y limitación de nutrientes (Almeida, 2001). La falta de control de estos factores desequilibra los parámetros de la calidad final en la cerveza.

c) Densidad celular

La tasa de fermentación se ve influenciada por la cantidad de levadura que se inocula, una mayor masa en la inoculación produce fases más cortas y mayores tasas de fermentación en tiempos más cortos. Un volumen típico de inoculación, para una densidad normal de un mosto lager (alrededor de 12º Plato) es de unas 10 – 15 x 10^6 células por mililitro (Gigliarelli, 2013).

d) pH

El pH en la fermentación de cerveza disminuye de forma considerable. Los mostos tienen un pH de 5,3 a 5,6. El pH adecuado después de la fermentación debe estar entre 4,2 y 4,4 ya que favorece la precipitación de compuestos coloidales, aumenta la velocidad de maduración y refina el sabor de la cerveza. Un pH por debajo de 4,1 no es recomendable debido a que aporta un sabor ácido a la cerveza (Kunze, 2006).

1.4.6. Levaduras utilizadas en la fermentación de cerveza

Saccharomyces cerevisiae, levaduras de alta fermentación y *Saccharomyces pastorianus,* levaduras de baja fermentación son las dos especies de levadura que se utilizan principalmente en la fermentación de cerveza. De acuerdo a estudios realizados sobre la genética de *S. pastorianus,* esta levadura es un híbrido entre *S. cerevisiae* y otra especie de *Saccharomyces* relacionada (Kodama, 2005). Las levaduras de baja fermentación se encuentran de forma individual en el mosto y sedimentan durante la fermentación, mientras que las levaduras de alta fermentación se encuentran formando cadenas ramificadas en el mosto y suben a la superficie durante la fermentación apoyadas en burbujas de CO_2.

Las células de baja fermentación en su mayoría utilizan completamente la rafinosa, tienen mejor metabolismo de fermentación y son más pobres en enzimas que las de alta fermentación. *S. cervisiae* fermentan muy poco la rafinosa y tienen un metabolismo respiratorio marcado que permite una mayor cosecha de levaduras luego de la fermentación. Otra característica importante es la floculación de las levaduras; las cepas de *S. pastorianus* son floculantes y no floculantes. Las levaduras floculantes se aglomeran durante la fermentación y sedimentan obteniéndose una cerveza más clara pero no tan fermentada. Las levaduras no floculantes se mantienen de forma individual y sedimentan lentamente al final de la fermentación generando una cerveza más fermentada. Todas las cepas de *S. cerevisiae* no floculan (Kunze, 2006).

1.4.7. Tipos de fermentación

Existen dos tipos de fermentación que brindan características particulares a la cerveza: La fermentación alta o superior mediada por *Saccharomyces cerevisiae* y la fermentación baja o inferior que lo mediada *Saccharomyces pastorianus.*

a) Fermentación alta

Esta fermentación se realiza a temperaturas entre 15 y 24 °C, es de corta duración (3 y 4 días) y las levaduras no forman flóculos fermentando mejor los azúcares. En este tipo de fermentación hay una mayor producción de ésteres y alcoholes superiores dando una mayor diversidad de aromas a la cerveza (Kunze, 2006).

b) Fermentación baja

Las levaduras de fermentación baja son empleadas para producir las cervezas llamadas Lager. La palabra Lager deriva del vocablo alemán "*Lagern*" que tiene el significado guarda o permanencia en bodega. Estas levaduras fermentan a bajas temperaturas (6-14 °C) y pueden producir una cerveza transparente u opaca de acuerdo a las características floculantes de las células (Kunze, 2006). A bajas temperaturas hay una menor estimulación en la producción de ésteres y por ello se resalta mejor las características sensoriales del lúpulo. Las cervezas que se obtiene son más ligeras y ofrecen una menor variedad en aromas.

1.4.8. Calidad sensorial de la cerveza

La calidad sensorial de la cerveza va estar determinado por el consumidor, el cual naturalmente presupone la ausencia de aspectos indeseables. El sabor de la cerveza está determinado por un conjunto de factores, donde el ingrediente vital es el lúpulo, responsable del sabor amargo y aroma característico debido a sus resinas y aceites esenciales. Así mismo el aroma y sabor está influenciado por el etanol y otros compuestos derivados del metabolismo de la levadura y el tipo de malteado (Villicaña, 2001).

1.5. Optimización del proceso de fermentación de cerveza

1.5.1. Diseño de experimentos

En muchas ocasiones, en la industria es necesario realizar pruebas experimentales con el fin de solucionar determinados problemas o comprobar ciertas hipótesis. Muchas veces es común realizar estos ensayos de forma empírica y mediante pruebas ensayo error llegar a una solución. Pero cuando un problema se torna complejo, la forma intuitiva de solucionar el problema no abarca todas las variables, demanda mucho tiempo y costos encontrar una respuesta; entonces es necesario realizar un análisis sistemático y estadístico de experimentos.

El diseño de experimentos nos permite determinar cuáles son las variables y en qué forma se deben realizar y analizar estadísticamente para obtener respuestas concretas sobre un problema dado. Además, nos permite ahorrar tiempo, ajustar el desempeño de un proceso y rediseñar nuevos productos ajustando variables (Gutiérrez y Salazar, 2008).

1.5.2. Diseños factoriales

El diseño factorial es un tipo de diseño experimental que permite estudiar varios factores, sus efectos individuales y la interacción entre ellos en una o más respuestas; estos factores se consideran de igual importancia en el análisis y pueden ser cualitativos (máquinas, operarios, tipos de materiales, etc.) o cuantitativos (temperatura, presión, concentración de una sustancia, etc.) (Gutiérrez y Salazar, 2008). La aplicación de este diseño de realiza en procesos industriales, bilógicos y en áreas de investigación.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Recolección y acondicionamiento de la muestra

El aislamiento de levaduras se realizó a partir de uvas negras (Se tomó una muestra de 1 Kg de uvas negras de mesa) adquirido del mercado de Caquetá (Lima) proveniente de la región de Ica. La muestra se transportó cuidadosamente al laboratorio de la facultad de Química, Ingeniería Química e Ingeniería Agroindustrial de la UNMSM. El acondicionamiento se realizó de la siguiente manera; las bayas de uva negra se trituraron mecánicamente sin lavar utilizando guantes quirúrgicos de látex en un recipiente previamente aseptizado. El mosto conteniendo los orujos se dejó fermentar a temperatura ambiente por diez días en un recipiente hermético previamente aseptizado, el cual se tapó con un tapón de algodón para dejar liberar la presión generada por el CO_2 durante la fermentación.

2.2. Aislamiento de colonias

El aislamiento de levaduras se llevó a cabo utilizando medio de cultivo sólido de la siguiente composición: extracto de malta (15.0 g/L); peptona bacteriológica (5.0 g/L); fosfato de amonio (1.0 g/L); glucosa (20.0 g/L) y agar (18.0 g/L). Se preparó 30 ml de agar, se licuó y se vertió en tres tubos de ensayo y se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Luego de la esterilización, los tubos de ensayo conteniendo medio de cultivo se dejaron enfriar hasta una temperatura de aproximadamente 45°C. Al primer tubo conteniendo aproximadamente 10 ml de medio se añadió 100 µL del mosto fermentado, se homogenizó y luego se tomó 100 µL de medio de este y se adicionó al siguiente tubo de ensayo. De esta manera se hicieron tres diluciones sucesivas. El contenido de cada tubo se vertió en placas Petri sin dejar solidificar y se incubaron a 25 °C por 48 horas. Durante la incubación se observaron el crecimiento de colonias, las cuales sirvieron para continuar con el aislamiento de levaduras *Saccharomyces*.

2.3 Evaluación de tolerancia al metabisulfito de sodio

Las colonias aisladas fueron evaluadas en su capacidad de tolerar metabisulfito de sodio ($Na_2S_2O_5$), el cual tiene actividad microbiana frente a bacterias y levaduras no-*Saccharomyces*. Para ello se utilizó medio de cultivo líquido de la siguiente composición: extracto de malta (15.0 g/L); peptona bacteriológica (5.0 g/L); fosfato de amonio (1.0 g/L); glucosa (20 g/L) y metabisulfito de sodio (600 mg/L). Se preparó 30 ml de medio y se vertió en tres tubos de ensayo y se esterilizó a 121 °C por 15 minutos. Luego, los tubos esterilizados se dejaron reposar por 8 horas para permitir la disociación completa del metabisulfito de sodio y obtener el compuesto activo antimicrobiano (SO_2). Seguidamente, con un asa de siembra estéril y en una cámara de flujo laminar se tomaron asadas de colonias de la superficie de las placas Petri obtenidas en la Sección 2.2 y se inocularon en los tubos de ensayo y se incubaron por 2 días a 25 °C. Al término de la incubación se observó la producción de burbujas en los tubos como un indicativo de la actividad fermentativa de levaduras *Saccharomyces*.

2.4. Evaluación de la tolerancia al etanol

Las levaduras sobrevivientes al efecto del metabisulfito de sodio (Sección 2.3.) fueron sometidas a altas concentraciones de etanol. Las levaduras *Saccharomyces* típicamente toleran altas concentraciones de etanol, el cual tiene actividad antimicrobiana. Para ello se utilizó medio de cultivo de la siguiente composición: extracto de malta (15.0 g/L); peptona bacteriológica (5.0 g/L); fosfato de amonio (1.0 g/L) y glucosa (20 g/L). Se preparo 30 ml de medio y se vertió en tres tubos de ensayo y se esterilizaron a 121°C por 15 minutos. Luego, a los tubos se adicionaron etanol absoluto hasta alcanzar una concentración del 15% v/v de etanol en una cabina de flujo laminar. Seguidamente cada tubo se inoculó con 100 µL del caldo fermentado sulfitado obtenido en los ensayos de tolerancia al metabisulfito (Sección 2.3) y se incubó a 25 °C por 48 horas. Al término del cultivo se observó la producción de CO_2 y turbidez, el cual es indicativo de la actividad de levaduras *Saccharomyces*.

2.5. Aislamiento de levaduras *Saccharomyces*

Las levaduras sobrevivientes a los tratamientos con metabisulfito y etanol fueron cultivadas en medio sólido de la siguiente composición: extracto de malta (15.0 g/L);

peptona bacteriológica (5.0 g/L); fosfato de amonio (1.0 g/L), glucosa (20 g/L) y agar (18.0 g/L). El medio se esterilizó a 121 °C por 15 minutos y luego se vertió en placas Petri. Luego se tomó 100 µL de muestra del medio fermentado obtenido en la Sección 2.4, y se añadió a un tubo de ensayo conteniendo 10 ml agua estéril y se realizó 3 diluciones sucesivas en agua destilada estéril tomando muestras de 100 µL del tubo anterior. Seguidamente, de cada dilución se tomó 50 µL y se inoculó asépticamente con un asa de Drigalsky en las placas Petri conteniendo medio sólido esparciendo homogéneamente. Las placas Petri se incubaron a 25°C por 48 horas hasta observar el crecimiento de colonias separadas y definidas las cuales posteriormente fueron individualmente inoculadas en tubos de ensayo conteniendo agar inclinado de la misma composición e incubadas por 48 horas a 25°C.

2.6. Evaluación microscópica y selección de colonias

colonias de levaduras *Saccharomyces* fueron evaluadas microscópicamente con la finalidad de verificar su morfología. Para ello cada aislado se sembró en placas Petri conteniendo medio sólido de la siguiente composición: extracto de malta (15.0 g/L); peptona bacteriológica (5.0 g/L); fosfato de amonio (1.0 g/L), glucosa (20 g/L) y agar (18.0 g/L) e incubado a 25°C por 48 horas. Las colonias fueron observadas en un microscopio óptico a un aumento de 40X y de ellas se seleccionaron ocho al azar para los ensayos posteriores. Las levaduras *Saccharomyces* seleccionadas fueron mantenidos en refrigeración a 7°C y renovados cada tres meses.

2.7. Evaluación de la capacidad fermentativa de azúcares

Las levaduras seleccionadas (ocho en total) fueron evaluadas en su capacidad de fermentar diferentes azúcares: glucosa, fructosa, maltosa, lactosa y sacarosa. Los experimentos se realizaron en medio líquido de la siguiente composición: azúcar (20.0 g/L), extracto de levadura (10.0 g/L); peptona bacteriológica (5.0 g/L); sulfato de magnesio (0.5 g/L) y fosfato de amonio (1.0 g/L). La fermentabilidad de azúcares se evaluaron a través de la producción de CO_2 utilizando tubos Durham. Para ello se vertió medio de cultivo en tubos de ensayo y seguidamente se colocaron campanas Durham en el interior cuidando en no dejar burbujas de aire dentro de ellas. Luego los tubos se

autoclavaron, se dejaron enfriar y cada uno se inoculó con dos asadas de la respectiva levadura. Los tubos inoculados se incubaron a 25°C por 48 horas. La actividad fermentativa se evidenció mediante la producción de CO_2 acumulado dentro de las campanas Durham cada 12 horas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.8. Evaluación de la capacidad de fermentación y selección de levadura

La capacidad fermentativa de las levaduras aisladas se evaluó mediante ensayos de fermentación a diferentes concentraciones de etanol. En los ensayos se utilizó medio de cultivo de la siguiente composición: extracto de malta (15.0 g/L); peptona bacteriológica (5.0 g/L); fosfato de amonio (1.0 g/L) y glucosa (20.0 g/L). El medio de cultivo se vertió en tubos de ensayo y seguidamente se colocaron campanas Durham dentro de ellas teniendo cuidado en no dejar burbujas de aire. Luego, los tubos de ensayo se esterilizaron, enfriaron y asépticamente se adicionaron etanol absoluto hasta alcanzar concentraciones de 2%, 6%, 10%, 14% y 18%v/v respectivamente. Posteriormente los tubos de ensayo se inocularon con dos asadas de la respectiva levadura y se incubaron a 25°C por 4 días. La intensidad de fermentación en cada caso se evaluó cada 12 horas mediante la observación de producción de gas en las campanas Durham. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y la intensidad de fermentación se reportó como el promedio de las tres observaciones. A partir de los resultados obtenidos se seleccionó la cepa que presentó las mejores características en términos de velocidad de fermentación y poder fermentativo a altas concentraciones de etanol. La capacidad fermentativa y la velocidad de fermentación se determinó de manera cualitativa en base a la intensidad de producción de gas observado en las mediciones realizadas.

2.9. Evaluación bioquímica

Para determinar el género y especie de la cepa de levadura seleccionada se realizó una identificación bioquímica más completa mediante la utilización de un kit API. Se utilizó un el kit API ID 32C que es un test de asimilación de nutriente. Cuenta con 32 celdas distintas de fuente de carbono, cuando la levadura es capaz de asimilar la fuente de carbono de las celdas, forma una aglutinación en el medio dando una reacción positiva. El kit también presenta un pocillo adicional con esculina, para una reacción auxiliar en caso el sistema muestre una baja diferenciación entre dos especies.

Para realizar el ensayo, la muestra de levadura se diluyó en 3 ml de agua hasta alcanzar una concentración de 2 Macfarlán, luego se tomó 250 uL de la muestra y se adicionó al medio API ID 32C. Seguidamente se homogenizó y se adicionó 135 uL a cada celda del API ID 32C, luego se tapó y se colocó en incubación a 30 °C. Se realizaron evaluaciones de aglutinación luego de 24 y 48 horas. La identificación se realizó usando el API software (BioMérieux, manual API ID 32C).

2.10. Fermentación de mosto de malta en matraces

2.10.1. Propagación de la levadura

La cepa de levadura seleccionada en la Sección 2.8 fue propagada en mosto de malta de 8°Brix. El medio de propagación fue preparado a partir de un concentrado comercial de mosto de malta usado en la producción de cerveza. El mosto se ajustó a 8 °Brix con agua destilada y se pasteurizó a 105°C por 8 minutos. Luego se vertió 100 mL de mosto en matraces de 250 mL y se inoculó con dos asadas de la levadura seleccionada. La propagación se realizó en agitación (150 rpm) en un agitador orbital a temperatura ambiente por 48 horas. Luego de la propagación las células se colectaron mediante centrifugación a 3600 rpm por 10 minutos. Las células se suspendieron en 5 mL de mosto fresco y se procedió a determinar la concentración de células viables utilizando una cámara de Neubauer y la metodología de tinción con azul de metileno (EBC, 1962).

2.10.2. Fermentación de mosto de malta

En los experimentos de fermentación, se empleó mosto de malta concentrado (85 °Brix) el cual fue diluido con agua destilada hasta obtener valores determinados. Las variables que se estudiaron fueron concentración de extracto seco (ES) del mosto (14 y 20°P), temperatura (T°) de fermentación (12 y 18°C) y concentración de inoculo (CI) ($1x10^{-6}$ y $1x10^{-8}$ células/mL) para ver sus efectos en la producción, productividad y rendimiento de etanol. Para ello se utilizó un diseño factorial completo 2^3 con 3 repeticiones resultando en total 24 tratamientos. Las fermentaciones se realizaron a condiciones estáticas y se monitorearon mediante el pH y °Brix. La determinación del

etanol producido se llevó a cabo por picnometría. El azúcar residual se determinó mediante oxidación química utilizando ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959).

2.11. Fermentación de cerveza en biorreactor

Los ensayos de fermentación se realizaron en un biorreactor airlift (5L) a las condiciones definidas anteriormente que incluyen extracto seco del mosto, temperatura y densidad celular (Sección 2.9.2). El biorreactor estuvo provisto de un sistema de enfriamiento, un tubo interno concéntrico, suministro de aire controlado por un rotámetro, un difusor colocado en la parte inferior de material poroso, entradas para electrodos de pH, oxígeno disuelto y toma de muestra. El cultivo en biorreactor se realizó con un volumen de trabajo de 2.7 L, pH del mosto de 5.5 y flujo de aireación de 0.075 vvm. La cerveza producida se evaluó sensorialmente mediante pruebas afectivas utilizando una escala hedónica de cinco puntos (1: me desagrada mucho y 5: me agrada mucho). Se evaluaron atributos tales como sabor y aroma utilizando un panel compuesto por 10 jueces no entrenados entre 20 y 25 años de edad. Los jueces se seleccionaron en base considerando que no sean bebedores frecuentes o abstemios.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aislamiento de colonias, tolerancia al metabisulfito y etanol

Se aislaron microorganismos a partir de mosto de uva fermentado. El tiempo de fermentación (10 días) influyo en el proceso de selección natural de levaduras. Se ha reportado que las levaduras más tolerantes al etanol tales como *Saccharomyces* sobreviven hacia el final de la fermentación (Albergaria y Arneborg, 2016). Seguidamente, las colonias aisladas se sometieron a la actividad del metabisulfito (600 mg/L), el cual tiene actividad antimicrobiana contra bacterias lácticas, acéticas y levaduras no-*Saccharomyces*. Se ha reportado que las levaduras *Saccharomyces* son capaces de tolerar altas concentraciones de sulfito (200.0 mg/L) en comparación con las bacterias lácticas y acéticas y también levaduras no-*Saccharomyces* (Miranda et al., 2015). El uso de antimicrobianos se ha realizado desde mucho tiempo atrás por ejemplo en la producción de vinos. Por ejemplo, los tanques de fermentación y utensilios se desinfectan con azufre con la finalidad de eliminar los microorganismos indeseables que podían afectar la calidad de los vinos.

Posteriormente, las colonias tolerantes al metabisulfito fueron sometidas a la actividad de etanol (15 %v/v). Se ha demostrado que el etanol tiene actividad antimicrobiana debido a que interrumpe la actividad enzimática dentro de la célula. Las levaduras del género *Saccharomyces* se caracterizan por tolerar altas concentraciones de etanol y por ello se utiliza en la producción de vinos y bioetanol (Lewis, 2010). La presencia de metabisulfito y etanol en un medio de fermentación tiene un efecto sinérgico mayor que el efecto individual de cada uno. Se ha reportado que la utilización de metabisulfito de sodio (200 mg/L) y etanol (12 %v/v) resultó en la sobrevivencia del 56% de levaduras *Saccharomyces* en experimentos realizados con un caldo nutritivo-dextrosa para levaduras a 25 °brix, pH de 3,5 y durante un tiempo 15 horas. (Miranda et al., 2015). Al termino de los ensayos de tolerancia al etanol, se obtuvieron colonias de levaduras del género *Saccharomyces* resistentes al metabisulfito y etanol. Seguidamente se evaluó la morfología de las colonias y células por microscopia óptica. Las colonias y células que presentaron morfologías típicamente relacionadas al género *Saccharomyces* fueron seleccionadas. La morfología de las colonias seleccionadas se muestra en la Figura 8 (a y b). Las colonias fueron redondas, cremas y de superficie lisa, las cuales se relacionan con

las características de levaduras *Saccharomyces* (Kuthan, 2003). En la Figura 8 (c y d) se muestra la morfología de las células de levaduras *Saccharomyces* observadas a un aumento de 40X. Las células mostraron forma elipsoidal y ovalada y algunas en proceso de reproducción por gemación, características típicas de levaduras *Saccharomyces* (Hernández et al., 2015). A partir de las levaduras *Saccharomyces* aisladas se seleccionaron ocho cepas las cuales se codificaron como C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 y C8 y fueron utilizadas en ensayos posteriores.

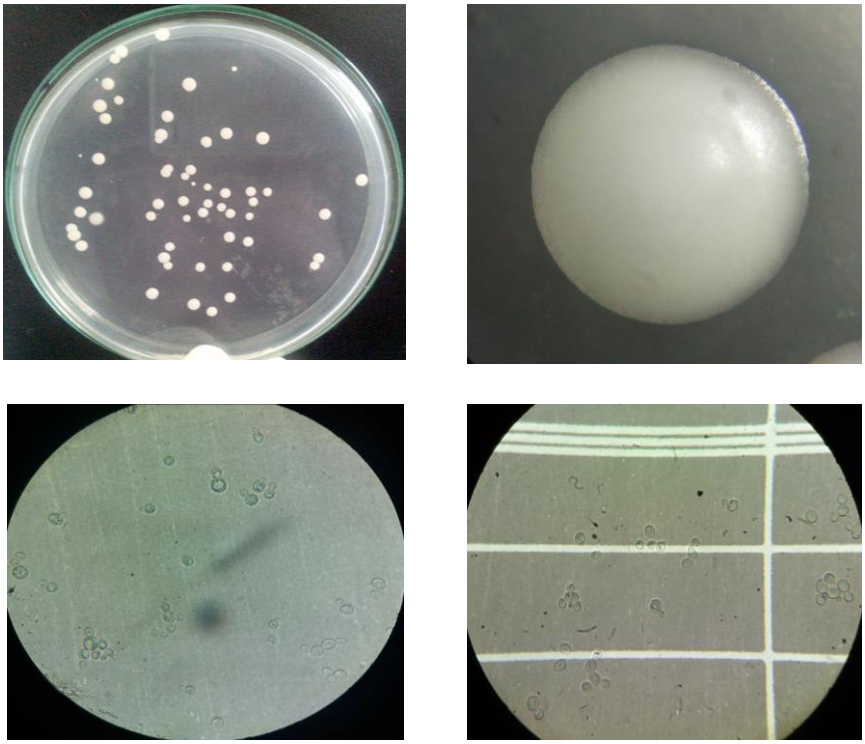


Figura 8. **Morfología de las colonias (a, b) y células (c, d) de levaduras *Saccharomyces* aisladas a partir del mosto de uva.**

3.2. Fermentación de azúcares

Las levaduras seleccionadas (ocho cepas) fueron evaluadas en su capacidad de fermentar azúcares tales como: glucosa, maltosa, sacarosa, fructosa y lactosa. Los resultados de fermentación se muestran en la tabla 1. Se ha observado que todas las levaduras aisladas fueron capaces de fermentar glucosa y fructosa monosacáridos

abundantes en jugos de frutas tales como uva, manzana, pera, etc. Sin embargo, las levaduras (C6, C7 y C8) fueron capaces de fermentar sólo sacarosa (disacárido presente en el jugo de caña de azúcar) y maltosa, disacárido que resulta de la hidrólisis del almidón de la cebada. En procesos de fermentación de vinos se desea aquellas levaduras capaces de fermentar principalmente glucosa y fructosa. Por otro lado, en procesos de fermentación de cerveza se desea levaduras capaces de fermentar principalmente maltosa. La capacidad de las levaduras para fermentar disacáridos se debe a la producción de enzimas que rompen enlaces glucosídicos y liberan monosacáridos (glucosa, fructosa o galactosa). Asimismo, no se observó fermentación de lactosa por las levaduras, lo que indica que no fueron capaces de romper el enlace glucosídico entre glucosa y galactosa. De todas las levaduras evaluadas, C6, C7 y C8 fueron capaces de fermentar la mayor cantidad de azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa). Ellas mostraron una fermentación intensa a las 24 horas para el caso de glucosa y sacarosa. En el caso de fructosa la mayor fermentación se observó a la 30 hora de fermentación. La fuerza de fermentación de maltosa fue alta para las tres levaduras *Saccharomyces* aisladas. Es sabido que las levaduras utilizan los azúcares en base a su grado de complejidad, así fermentan primero los monosacáridos, luego los disacáridos, trisacáridos y los azúcares más complejos (Hunze, 2006).

***Tabla 1*: Capacidad de fermentación de azúcares por las levaduras seleccionadas.**

	DEXTROSA				SACAROSA				FRUCTOSA				MALTOSA				LACTOSA			
Cepas	12h	18h	24h	30h	12h	18h	24h	48h	12h	18h	24h	30h	12h	24h	30h	36h	12h	1d	2d	3d
C1	-	+	++	+++	-	-	-	-	-	+	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	-	-	+	++	-	-	-	-	-	+	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	-	-	+	++	-	-	-	-	-	+	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	-	-	+	++	-	-	-	-	-	+	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
C5	-	+	++	++	-	-	-	-	-	+	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	+	++	+++	+++	+	++	+++	+++	+	+	++	+++	-	+	++	+++	-	-	-	-
C7	+	++	+++	+++	+	+	+++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	-	-	-
C8	+	++	+++	+++	+	+	+++	+++	+	+	++	+++	-	+	+++	+++	-	-	-	-
Control	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	++	+++	+++	-	-	-	-

(-): Fermentación nula; (+): Fermentación débil; (++) Fermentación moderada y (+++): Fermentación intensa. Los signos positivos indican la acumulación de CO_2 en los tubos Durham (longitud = 5 cm) y desplazamiento del medio líquido, así: (+) = <2.5 cm; (++) = ≥ 2.5 cm y (+++) = desplazamiento total del líquido. Levadura control: *Saccharomyces pastorianus* SafLager W-34/70.

Aparte de la producción de gas, la formación de película sobre la superficie del medio es una característica importante, ya que está relacionado con el requerimiento de oxígeno

por los microorganismos. De todas las levaduras ensayadas, ninguna fue capaz de formar película durante el tiempo de fermentación. Además de la producción de gas y formación de película, se ha evaluado la formación de turbidez en los tubos de ensayo, el cual está asociado a la intensidad de crecimiento de las levaduras. Los resultados de formación de turbidez se muestran en la Tabla 2. Las levaduras C1, C2, C3, C4 y C5 formaron turbidez cuando fueron cultivadas en glucosa y fructosa, lo que está relacionado con la afinidad por estos azúcares. Las levaduras C6, C7 y C8 formaron turbidez en presencia de glucosa, fructosa y sacarosa, sin embargo, en presencia de maltosa y lactosa no se observó dicha característica. La formación de turbidez, el cual es un indicativo del crecimiento celular está relacionada con el metabolismo del azúcar y otros nutrientes, entre ellos, los aminoácidos y oxígeno. El agotamiento de este último conduce al detenimiento del crecimiento.

Tabla 2. **Formación de turbidez por las levaduras en fermentaciones con diferentes azúcares.**

	DEXTROSA				SACAROSA				FRUCTOSA				MALTOSA				LACTOSA			
Cepas	12h	18h	24h	30h	12h	18h	24h	48h	12h	18h	24h	30h	12h	24h	30h	36h	12h	1d	2d	3d
C1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C5	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Dónde: (-): sin turbidez y (+): turbidez.

3.3. Capacidad fermentativa en presencia de etanol

Los resultados de la capacidad fermentativa de las levaduras a diferentes concentraciones de etanol se muestran en la Tabla 3. Se observó que las levaduras C1, C2, C3, C4 y C5 fueron capaces de fermentar en presencia de concentraciones de etanol de 2 y 6%v/v evaluados en 3 días. Sin embargo, concentraciones mayores (10, 14 y 18%v/v) inhibieron la actividad fermentativa. Se ha reportado que el etanol afecta primero la capacidad de fermentar de las levaduras y posteriormente su viabilidad. Así altas concentraciones detienen la actividad enzimática paulatinamente deteniendo toda actividad metabólica lo que conduce a su muerte. Por otro lado, las levaduras C6, C7 y C8 mostraron una capacidad de fermentar a 10, 14 y 18%v/v de etanol. Un aspecto

resaltante es que la levadura control (*Saccharomyces pastorianus* SafLager W-34/70) no fue capaz de fermentar a 18%v/v de etanol hacia el 4to día de fermentación. De las levaduras con capacidad de fermentar a 10, 14 y 18%v/v de etanol la cepa C6 mostró mejores características. Desde el punto de vista de producción de vinos y cervezas, levaduras capaces de fermentar a altas concentraciones de etanol son requeridas ya que permite obtener bebidas con diferentes grados alcohólicos. Está reportado que levaduras no-*Saccharomyces* no son capaces de tolerar altas concentraciones de etanol y se inhiben rápidamente a medida que la concentración aumenta. Miranda et al. (2015), evaluaron la capacidad fermentativa de levaduras *Saccharomyces* que aislaron a partir de mosto de uva, encontrando que fermentaron con normalidad a una concentración de 12% de etanol. Por otro lado, Guzmán (2012), evaluó el efecto de diferentes concentraciones de etanol (10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22 %v/v) sobre la viabilidad de tres cepas de levaduras *Saccharomyces* spp., nativas. Los resultados mostraron que la viabilidad celular disminuye a medida que aumenta la concentración de etanol desde 18, 20 y 22%v/v durante 24 horas. La capacidad de fermentar a altas concentraciones de etanol está relacionada con la su tolerancia a este compuesto, el cual desestabiliza la membrana celular y la presencia de algunas proteínas y aminoácidos como la prolina (Lewis, 2010; Venegas et al., 2012).

Tabla 3. **Capacidad fermentativa de levaduras a diferentes concentraciones de etanol.**

	ETANOL 2%				ETANOL 6%				ETANOL 10%				ETANOL 14%					ETANOL 18%				
	12h	1d	2d	3d	12h	1d	2d	3d	12h	1d	2d	3d	12h	24h	36h	48h	3d	12h	1d	2d	3d	4d
C1	-	-	+	+++	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	-	-	+	++	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	-	-	+	++	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	-	-	+	++	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C5	-	-	+	++	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	+	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	-	-	++	+++	+++
C7	+	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	-	++	+++	+++	-	-	+	+++	+++	-	-	+	+	++
C8	+	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	+	+++	+++	-	-	+	++	+++	-	-	+	+	++
Control	-	+	+++	+++	-	+	+++	+++	-	+	+++	+++	-	-	+	+++	+++	-	-	-	-	-

Dónde: (-): Fermentación nula; (+): Fermentación débil; (++) Fermentación moderada y (+++): Fermentación intensa. Los signos positivos indican la acumulación de CO2 en los tubos Durham (longitud = 5 cm) y desplazamiento del medio líquido, así: (+)= <2.5 cm; (++) = ≥ 2.5 cm y (+++) = desplazamiento total del líquido.

Adicionalmente se evaluó la formación de turbidez por las levaduras aisladas (Tabla 4). Los resultados mostraron la formación de turbidez tenue en todos los ensayos realizados a una concentración de etanol de 2%v/v. La turbidez está relacionada con el crecimiento

celular y la utilización de la fuente de carbono como fuente de energía. Así, una concentración de etanol del 2%v/v no mostro detener el metabolismo energético fundamental para el crecimiento celular. Por otro lado, sólo las levaduras C6, C7 y C8 produjeron turbidez tenue a una concentración de etanol del 6%v/v, lo que indica que fueron capaces de crecer lentamente. Con respecto a los ensayos a concentraciones de etanol de 10, 14 y 18% v/v, ninguna levadura, incluyendo el control fueron capaces de formar turbidez.

Tabla 4. **Formación de turbidez por levaduras cultivadas a diferentes concentraciones de etanol.**

	ETANOL 2%				ETANOL 6%				ETANOL 10%				ETANOL 14%					ETANOL 18%				
	12h	1d	2d	3d	12h	1d	2d	3d	12h	1d	2d	3d	12h	24h	36h	48h	3d	12h	1d	2d	3d	4d
C1	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C5	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C7	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C8	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Control	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Dónde: (-): sin turbidez y (+): turbidez.

3.4. Evaluación bioquímica

Para la identificación de la cepa seleccionada (C8) se usó el kit API ID 32C. El cultivo fresco de la levadura se inoculó en las celdas del kit que contiene 25 compuestos químicos diferentes. Se incubó durante 24 horas y el resultado se interpretó mediante el software API web. La levadura se identificó como *Saccharomyces cereviciae.* La tabla 5 muestra el resultado obtenido.

Tabla 5. **Identificación bioquímica de la levadura seleccionada mediante el KIT API ID 32C.**

Código	Taxón significativo	Proximidad relativa al taxón indicado (%ID)	Proximidad al perfil más típico del Taxón (T)
C8	*Saccharomyces cervisiae*	96	0,89

3.5. Fermentación de mosto de malta en matraces

A partir de los resultados de fermentabilidad de azúcares y capacidad de fermentación a diferentes concentraciones de etanol se seleccionó la levadura C8. Seguidamente se realizaron ensayos de fermentación utilizando mosto de malta comercial. Se evaluaron el efecto de la temperatura, extracto seco y concentración celular sobre la producción, rendimiento y productividad de etanol. La matriz experimental del diseño factorial 2^3 con tres repeticiones y cuatro puntos centrales que incluye las respuestas de los respectivos tratamientos se muestra en la Tabla 6. Los datos fueron procesados utilizando el programa Design Expert 10.1. Como se muestra, los valores de producción de etanol estuvieron entre 24,8 y 49,9 g etanol/L, productividad de etanol están entre 0,073 y 0,191 g etanol/L.h y de rendimiento de etanol están entre 0,24-0,43 g.etanol/g.azúcar. Si bien estos datos representan el rango de cada variable respuesta correspondiente a la zona de experimentación, es necesario determinar la mejor combinación de los valores de las variables independientes que permita obtener los valores máximos de producción, rendimiento y productividad de etanol.

Tabla 6. **Matriz experimental del diseño factorial completo 2^3 con tres repeticiones y cuatro puntos centrales. Se muestra los resultados en producción de etanol, productividad de etanol y rendimiento.**

Run	T (°C)	Materia seca (°P)	Concentración celular (cel/ml)	Producción de etanol (g.etanol/L)	Productividad (g.etanol/L.h)	Rendimiento (g. etanol/g. azúcar)
1	12	20	1,00E+06	25,807	0,086	0,416
2	18	14	1,00E+08	34,365	0,168	0,320
3	15	17	5,05E+07	40,631	0,125	0,287
4	18	20	1,00E+08	47,132	0,151	0,247
5	12	14	1,00E+06	30,94	0,086	0,369
6	12	20	1,00E+06	24,762	0,103	0,400
7	12	20	1,00E+08	47,132	0,135	0,311
8	18	14	1,00E+08	36,642	0,191	0,345
9	12	14	1,00E+06	30,06	0,078	0,351
10	12	20	1,00E+08	44,991	0,121	0,294
11	12	20	1,00E+08	46,061	0,132	0,288
12	15	17	5,05E+07	41,719	0,129	0,338
13	18	20	1,00E+06	49,274	0,128	0,292
14	15	17	5,05E+07	39,543	0,122	0,279
15	18	20	1,00E+08	52,486	0,168	0,266
16	18	14	1,00E+06	30,94	0,107	0,266
17	18	20	1,00E+06	47,132	0,123	0,274
18	18	20	1,00E+08	49,927	0,160	0,267
19	18	20	1,00E+06	48,204	0,126	0,288
20	12	14	1,00E+08	33,115	0,145	0,330
21	18	14	1,00E+08	35,35	0,184	0,327
22	12	14	1,00E+08	33,115	0,145	0,342
23	12	20	1,00E+06	27,98	0,097	0,437
24	12	14	1,00E+08	33,115	0,145	0,366
25	15	17	5,05E+07	39,543	0,122	0,301
26	12	14	1,00E+06	27,98	0,073	0,335
27	18	14	1,00E+06	34,365	0,119	0,304
28	18	14	1,00E+06	30,94	0,107	0,294

3.5.1. Producción de etanol

Se analizó la producción óptima de etanol mediante un análisis estadístico combinando las variables de temperatura, concentración celular y grados plato (°P). Los datos obtenidos mediante ANOVA muestran que el modelo es significativo (Tabla 7) debido a que el valor-p es menor a 0.05. En la tabla también se observa que los factores del modelo A, B, C, AB, AC, BC y ABC tienen un valor-p menor a 0.05 lo cual indica que son significativos para la determinación del análisis de la producción óptima de etanol.

Tabla 7. **Análisis de varianza para la producción de etanol.**

	Sum of squares	**Df**	**Mean square**	**F-value**	**P-value**
Model	1774.40	8	221.80	98.87	**< 0.0001**
A-Temperatura	350.36	1	350.36	156.18	**< 0.0001**
B-Extracto seco	599.61	1	599.61	267.29	**< 0.0001**
C-Conc.celular	301.37	1	301.37	134.35	**< 0.0001**
AB	166.14	1	166.14	74.06	**< 0.0001**
AC	125.83	1	125.83	56.09	**< 0.0001**
BC	81.01	1	81.01	36.11	**< 0.0001**
A^2	26.56	1	26.56	11.84	**0.0027**
ABC	123.52	1	123.52	55.06	**< 0.0001**
Pure Error	42.62	19	2.24		

$R^2 = 0.98$, R^2 ajustado = 0.97.

A partir del análisis de datos, se generó una ecuación empírica que relaciona la variable respuesta y las independientes, el cual para la producción de etanol se expresa en términos de la siguiente ecuación lineal: Producción de etanol = 58.79510 + 1.98867 T° - 7.20115 ES - 1.20599×10^{-6} CI + 0.549500 T°xES + 7.11504×10^{-8} T°xCI + 8.87565×10^{-8} ESxCI - 0.309264 $T°^2$ -5.09231×10^{-9} T°xES x CI. Los valores de $R^2 = 0.98$ y R^2 ajustado = 0.97, indican un buen ajuste de los datos a la ecuación encontrada.

El efecto de las variables independientes sobre la producción de etanol se observa en la Figura 9. Así, el incremento de la temperatura de fermentación y el contenido de extracto seco incrementa la producción de etanol (Figura 9a). Esto se debe a que, a mayor contenido de azúcares fermentables en el mosto hay una mayor producción de etanol

siempre y cuando la levadura sea capaz de producir una mayor cantidad de etanol. Por otro lado, a mayor temperatura una mayor actividad de la levadura lo que favorece la producción de etanol. Se observa además un efecto combinado entre ambas variables los cuales se comportan directamente proporcional a la producción de etanol. Con respecto a la concentración inicial de células, se observa un efecto positivo al incrementar dicha concentración (Figura 9b). De igual modo, se observa un efecto combinado con el contenido de extracto seco del mosto, es decir, al incrementar tanto la concentración de células y azúcares fermentables, la producción de etanol incrementa. Adicionalmente se observó un efecto combinado débil de la temperatura y la concentración de células en la producción de etanol dentro de los rangos ensayados (Figura 9c). Esto se debe a que en la producción de etanol el contenido de extracto seco tiene un mayor efecto debido a que está relacionado con el contenido de azúcares fermentables en el mosto y la temperatura es un catalizador de reacciones enzimáticas celulares.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue aislada de una fermentación espontánea a temperatura ambiente. Todas las levaduras fermentan mejor mientras se incrementa la temperatura hacia el valor óptimo, pero se debe tener en cuenta un factor importante que es la producción de compuestos volátiles tales como: diacetilo, alcoholes superiores y ésteres. Estos compuestos se producen en mayor cantidad cuando se incrementa la temperatura de fermentación, por ello se experimentó con una temperatura máxima de 18 °C que está dentro del rango de las levaduras de fermentación alta. Por otro lado, mientras más azúcares disponibles haya en el mosto, se va a producir mayor cantidad de etanol siempre y cuando también haya nutrientes para el desarrollo de las células. A una mayor concentración de células, se aprovecha todos nutrientes disponibles y se maximiza la producción de etanol. En nuestros resultados las levaduras aprovecharon las mejores condiciones de cada factor para una mayor producción de etanol.

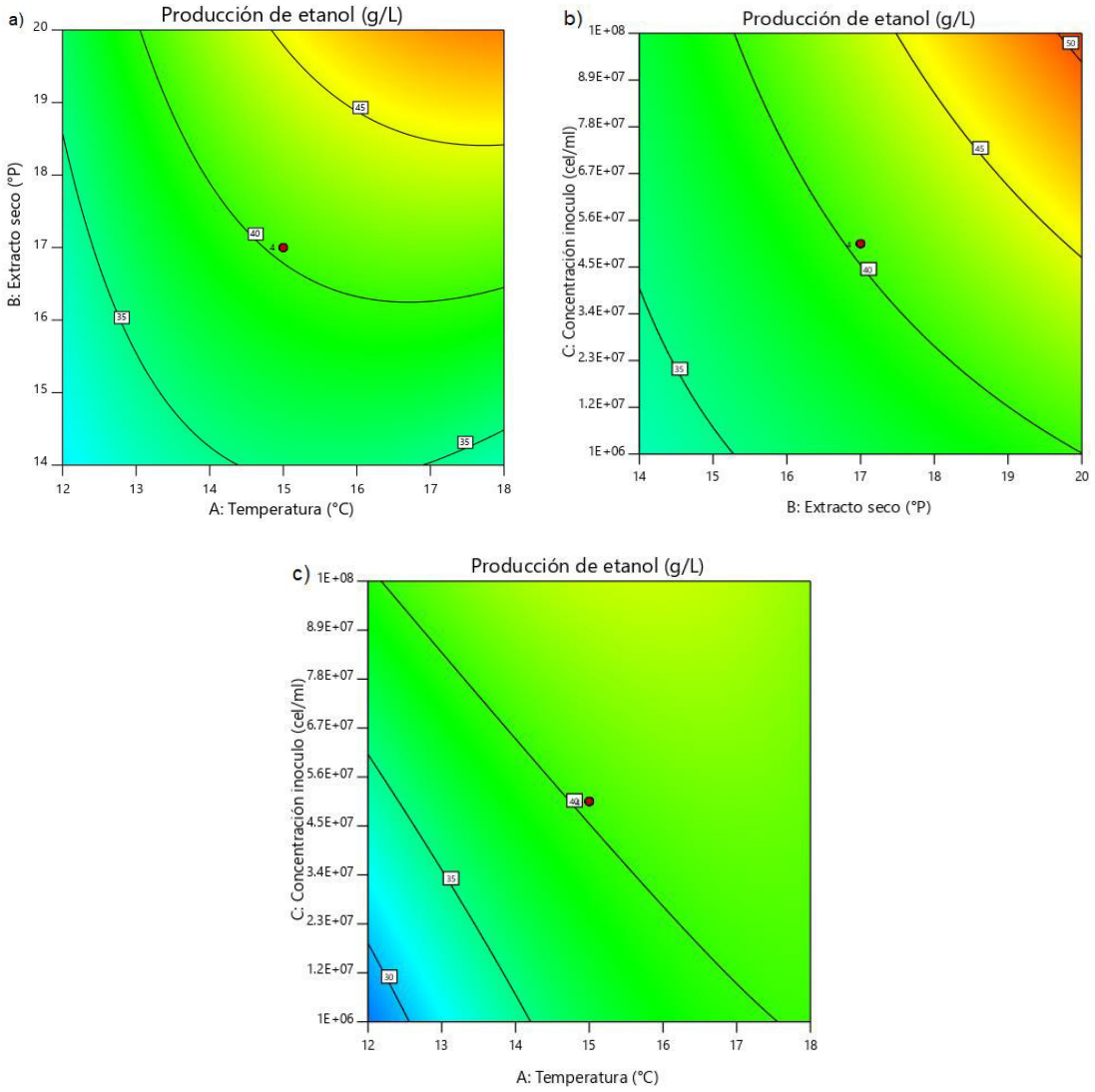


Figura 9. **Planos de contorno que muestran el efecto del extracto seco y temperatura (a), extracto seco y concentración celular (b) y, temperatura y concentración celular (c) en la producción de etanol.**

Adicionalmente, con los resultados obtenidos (Tabla 6) se ha procedido a la optimización de la producción de etanol, y se presentan como gráficos de Superficie de Respuesta (Figura 10). Los parámetros que conducirían a la producción máxima de etanol (51.060 g/L) de acuerdo con la optimización realizada con el software Design Expert serían, temperatura 18°C, extracto seco 20°Plato y 10^8 células/ml respectivamente. La producción de etanol está influenciada principalmente por la cantidad de azúcares fermentables en el mosto (maltosa). La producción de cerveza se realiza por lo general con mostos de 9°Plato para alcanzar el contenido alcohólico comercial (4.5 %v/v de etanol). Mostos con mayores contenidos de extracto seco implica una mayor cantidad de maltosa que será convertido en etanol y otros componentes. La capacidad de la levadura

para fermentar a mayores gravedades específicas y producir mayores cantidades de etanol es deseable desde el punto de vista tecnológico. Los resultados mostraron que el incremento de la producción de etanol está relacionado con una mayor concentración de extracto seco (Figura 10a,b), mayor concentración de inoculo (Figura 10b). Por el contrario, el incremento de la temperatura tendría poco efecto en una mayor producción de etanol (Figura 10c).

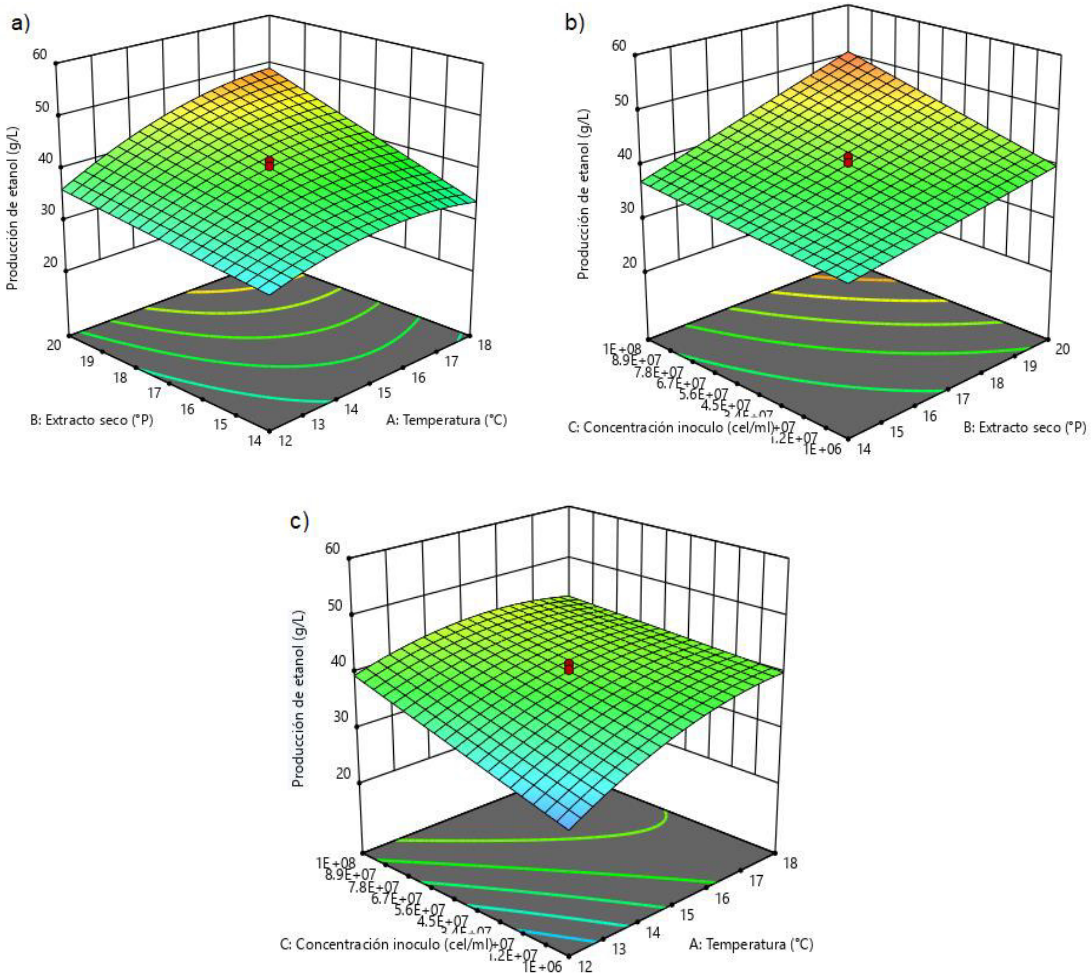


***Figura 10. G*ráficos de Superficie de Respuesta de fermentaciones realizadas con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* C8 a diferentes condiciones. Efecto de la temperatura y extracto seco (a), extracto seco y concentración de inoculo (b) y, temperatura y concentración celular (c) en la producción de etanol.**

3.5.2. Productividad de etanol

La productividad es un parámetro importante que evalúa la rapidez con que se produce etanol en un proceso fermentativo y el término de este para iniciar un subsiguiente proceso. Así, mientras más rápido termine la fermentación es económicamente conveniente. El análisis de varianza (ANOVA) mostrado en la Tabla 8 muestra que el modelo es significativo ($p<0.05$). Además, se observa que la temperatura y la concentración inicial de inoculo tienen el mayor efecto positivo. Por otro lado, se observa una falta de ajuste estadísticamente no significativo ($p>0.05$). Un aspecto importante a resaltar es el valor de R^2=0.96, el cual representa un buen ajuste de los valores experimentales al modelo matemático que se ha generado. Otro aspecto importante observado es el hecho que el contenido de extracto seco del mosto no es significativo para el modelo, sin embargo, el efecto combinado con la concentración celular resulta significativo ($p< 0.05$).

Tabla 8. **Análisis de varianza para la productividad de etanol.**

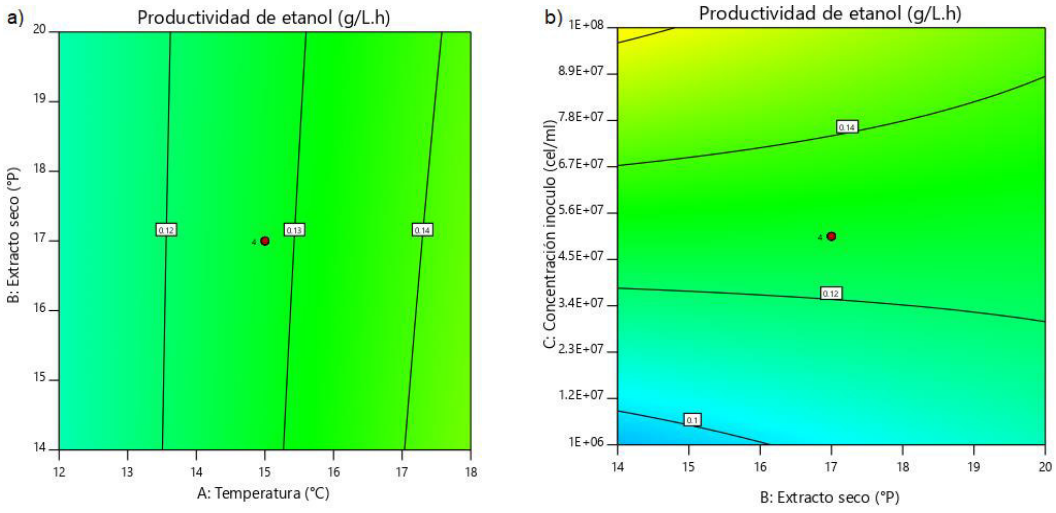
	Sum of squares	**df**	**Mean square**	**F-value**	**P-value**
Model	0.0236	7	0.0034	70.52	**< 0.0001**
A-Temperatura	0.0062	1	0.0062	129.89	**< 0.0001**
B-Extracto seco	0.0000	1	0.0000	0.2825	0.6009
C-Conc. celular	0.0156	1	0.0156	326.53	**< 0.0001**
AB	0.0000	1	0.0000	0.4219	0.5234
AC	6.000E-06	1	6.000E-06	0.1255	0.7268
BC	0.0017	1	0.0017	36.28	**< 0.0001**
ABC	6.000E-06	1	6.000E-06	0.1255	0.7268
Residual	0.0010	20	0.0000		
Lack of Fit	0.0000	1	0.0000	1.01	0.3277
Pure Error	0.0009	19	0.0000		

R^2= 0.96, R^2 ajustado= 0.95

A partir del análisis de datos, se generó una ecuación empírica que relaciona la variable respuesta y las independientes, el cual para la productividad de etanol se expresa en términos de la siguiente ecuación lineal: Productividad de etanol = - 0.032576 + 0.005959 T° + 0.003318 ES + $1.15152x10^{-9}$ CI - 0.000045 T°xES + $2.24467x10^{-11}$ T°xCI –

$4.04040x10^{-11}$ ESxCI – $1.12233x10^{-12}$ T°xES x CI. Los valores de $R^2 = 0.96$ y R^2 ajustado = 0.95, indican un buen ajuste de los datos a la ecuación encontrada.

La figura 11 muestra los graficos de contorno del efecto de las variables estudiadas con respecto a la productividad de etanol. Se observa que el incremento de la temperatura y la concentración inicial de inoculo tienen un efecto preponderante en la productividad de etanol (Figura 11b,c). Por el contrario, el contenido de extracto seco presentó un efecto menor (Figura 11a). Con base a los resultados obtenidos, la levadura aislada podría utilizarse en fermentaciones de cerveza ale debido a su capacidad de fermentar mas rápido a temperaturas mayores a 15°C. El incremento de la temperatura acelera las reacciones enzimáticas dentro de la célula de levadura, lo cual tiene impacto positivo en la velocidad de fermentación. Por otro lado, el incremento de la concentración inicial de inoculo tuvo un comportamiento esperado ya que al haber una mayor cantidad de células para metabolizar una unidad de azúcares, el proceso resulta ser más rápido. Por el contrario, con respecto a la concentración de extracto seco, se evidenció un efecto minimizado, sin embargo, a menor cantidad de extracto seco por unidad de volumen se esperaba una mayor productividad ya que los azucares contenidos se metabolizan rapidamente. Este comportamiento puede visualizarse en la Figura 11b.



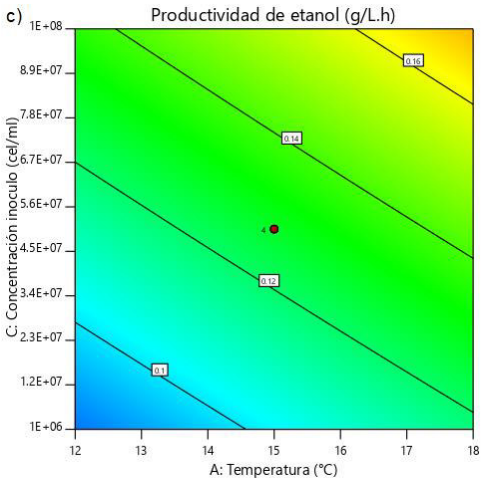
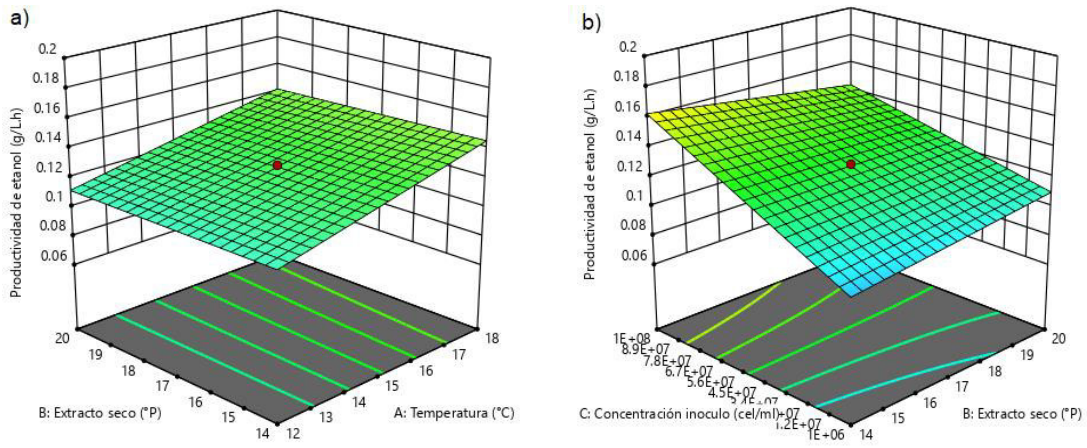


Figura 11. **Planos de contorno que muestran el efecto del extracto seco y temperatura (a), extracto seco y concentración celular (b) y, temperatura y concentración celular (c) en la productividad de etanol.**

Adicionalmente con los datos obtenidos experimentalmente se optimizó la productividad de etanol en relación con los parámetros estudiados. Los gráficos de Superficie de Respuesta se muestran en la Figura 12. Se verificó que la productividad está fuertemente influenciada por la concentración inicial del inoculo (Fig. 12b) y la temperatura (Fig. 12c). Mediante el software Design Expert se determinó la máxima productividad de etanol (0.159 g/L.h) que puede alcanzarse considerando la zona de experimentación y los parámetros estudiados, entre los valores se tiene: temperatura=18°C, extracto seco=20°Plato y concentración de inoculo=1x10^8 células/ml.



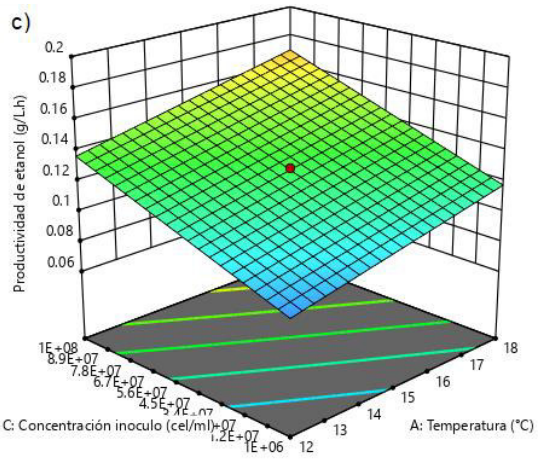


Figura 12. **Gráficos de Superficie de Respuesta de fermentaciones realizadas con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* C8 a diferentes condiciones. Efecto de la temperatura y extracto seco (a), extracto seco y concentración de inoculo (b) y, temperatura y concentración celular (c) en la productividad de etanol.**

3.5.3. Rendimiento de etanol

El rendimiento relaciona la cantidad de etanol que produce el microorganismo al utilizar el azúcar fermentable. Los datos se han tratado estadísticamente y los resultados se presentan en la Tabla 9. Se observa que el modelo matemático que se ha generado es significativo ($p<0.05$). Además, la temperatura tiene un alto impacto seguido de la concentración inicial de inoculo. El extracto seco tiene poco efecto sobre el rendimiento sin embargo el efecto combinado con la concentración inicial de inoculo es muy significativo estadísticamente. El mejor ajuste de los datos al modelo matemático resultó en un R^2=0.89. Por otro lado, la falta de ajuste no es significativo, lo cual indica que los términos seleccionados para el modelo son adecuados. El rendimiento es una variable importante en fermentaciones microbianas que valora la capacidad del microorganismo para convertir el azúcar en etanol y, por otro lado, las condiciones de fermentación que puedan desviar el metabolismo fermentativo. Desde el punto de vista tecnológico, levaduras con una mayor capacidad de convertir azúcar en etanol y una menor producción de biomasa es preferido ya que tiene un impacto económico.

Tabla 9. **Análisis de varianza para la productividad de etanol.**

	Sum of squares	**Df**	**Mean square**	**F-value**	**P-value**
Model	0.0537	7	0.0077	23.08	**< 0.0001**
A-Temperatura	0.0234	1	0.0234	70.38	**< 0.0001**
B-Extracto seco	0.0012	1	0.0012	3.58	0.0729
C-Conc. celular	0.0043	1	0.0043	13.09	**0.0017**
AB	0.0032	1	0.0032	9.49	0.0059
AC	0.0077	1	0.0077	23.30	**0.0001**
BC	0.0124	1	0.0124	37.26	**< 0.0001**
A^2	0.0015	1	0.0015	4.46	0.0474
Residual	0.0066	20	0.0003		
Lack of Fit	0.0008	1	0.0008	2.71	0.1163
Pure Error	0.0058	19	0.0003		

R^2= 0.89, R^2 ajustado = 0.85

Por otro lado, se ha evaluado el efecto de las variables en el rendimiento. Los planos de contorno se muestran en la Figura 13. Se ha observado que la temperatura y concentración inicial de inoculo tienen efecto inverso al rendimiento de etanol. Así, a menor temperatura y concentración inicial de inoculo el rendimiento de etanol incrementa (Figura 13a,c). En parte debido a que la temperatura ralentiza las reacciones bioquímicas conduciendo a que una mayor cantidad de azúcar se destine a la producción de etanol. Por otro lado, se ha observado que la concentración de extracto seco no tiene un efecto significante en el rendimiento (Figura 13a,b), esto se explicaría debido a que representa la disponibilidad de azúcares para el proceso fermentativo de las levaduras. Considerando esta variable, con la finalidad de incrementar un mayor rendimiento es conveniente realizar fermentaciones a baja temperatura, por ejemplo 12°C. Adicionalmente, es necesario considerar la naturaleza y comportamiento de la levadura en estudio para su aplicación en procesos fermentativos.

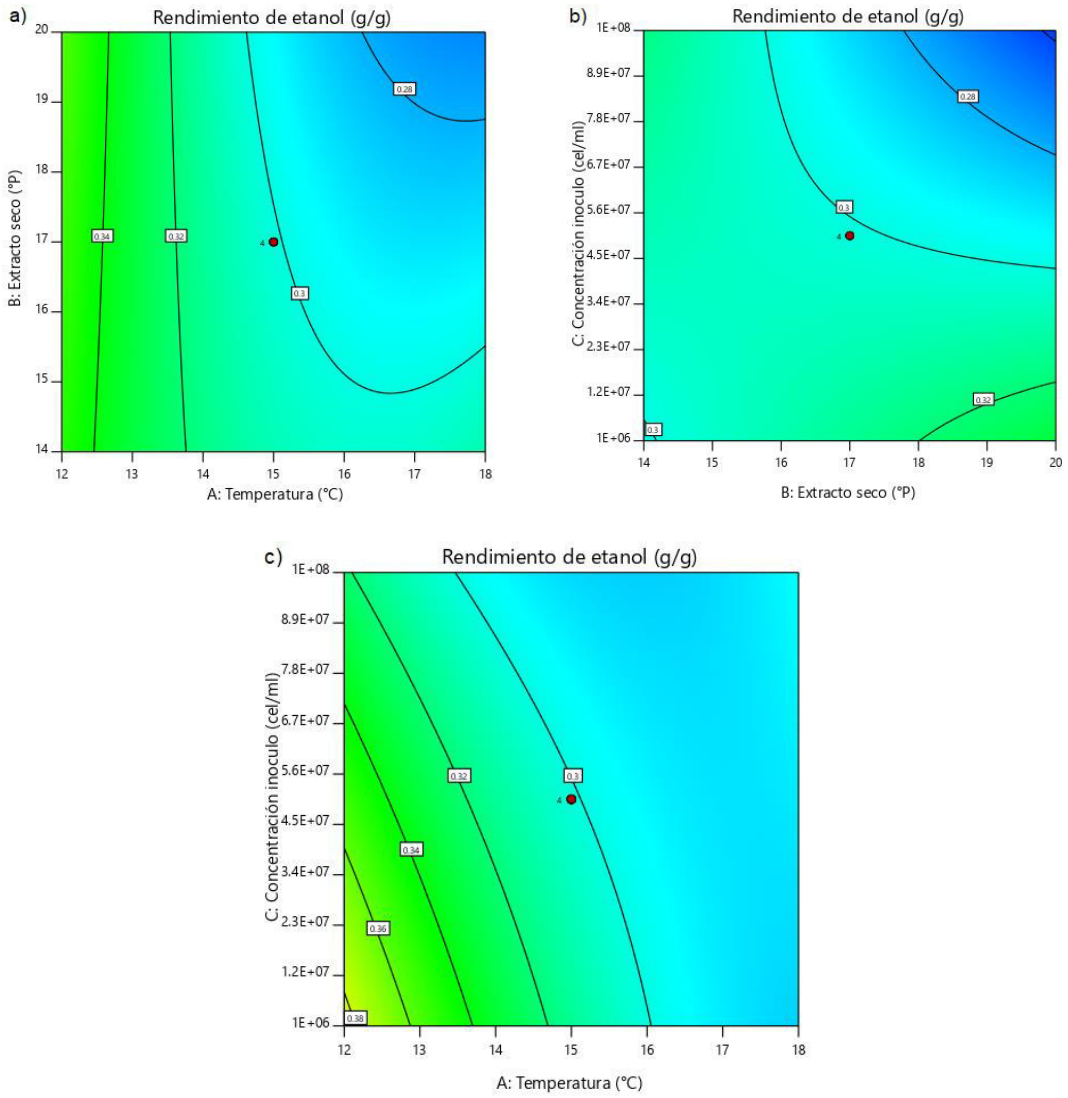


Figura 13. **Planos de contorno que muestran el efecto del extracto seco y temperatura (a), extracto seco y concentración celular (b) y, temperatura y concentración celular (c) en el rendimiento de etanol.**

Seguidamente se realizó la optimización del rendimiento de etanol a partir de los datos experimentales obtenidos y considerando la zona de experimentación establecida. Los graficos se Superficie de Respuesta se muestra en la figura 14. Se confirma el efecto inverso de la temperatura (Figura 14a,c) sobre el rendimiento de etanol y también pero con menor intensidad la concentración inicial de inoculo (Figura 14c). Asimismo se evidenció que la concentración de extracto seco tiene poco efecto sobre el rendimiento. A partir del tratamiento estadistico realizado a los datos con el software Design Expert se obtuvo el máximo valor del rendimiento de etanol (41.2%) en función de las variables estudiadas, entre ellas: temperatura (12°C), concentración inicial de levaduras ($1x10^6$células/ml), extracto seco (20°Plato). Adicionalmente, se generó el modelo

matemático que representa el efecto de las variables independientes en el rendimiento de etanol, el cual es como sigue: Rendimiento de etanol = 0.666389 - 0.064172 T° + 0.024472 ES + 5.13749x10^{-10} CI - 0.001273 T°xES +1.20932x10^{-10} T°xCI - 1.52918x10^{-10} ESxCI + 0.002310 T°^{2}. De acuerdo con el análisis, el ajuste de la ecuación a los puntos experimentales resultó en un R^2= 0.89, si bien es cierto que dicho valor es cercano al 90% se considera útil para abordar estudios complementarios con la finalidad incrementar su fidelidad.

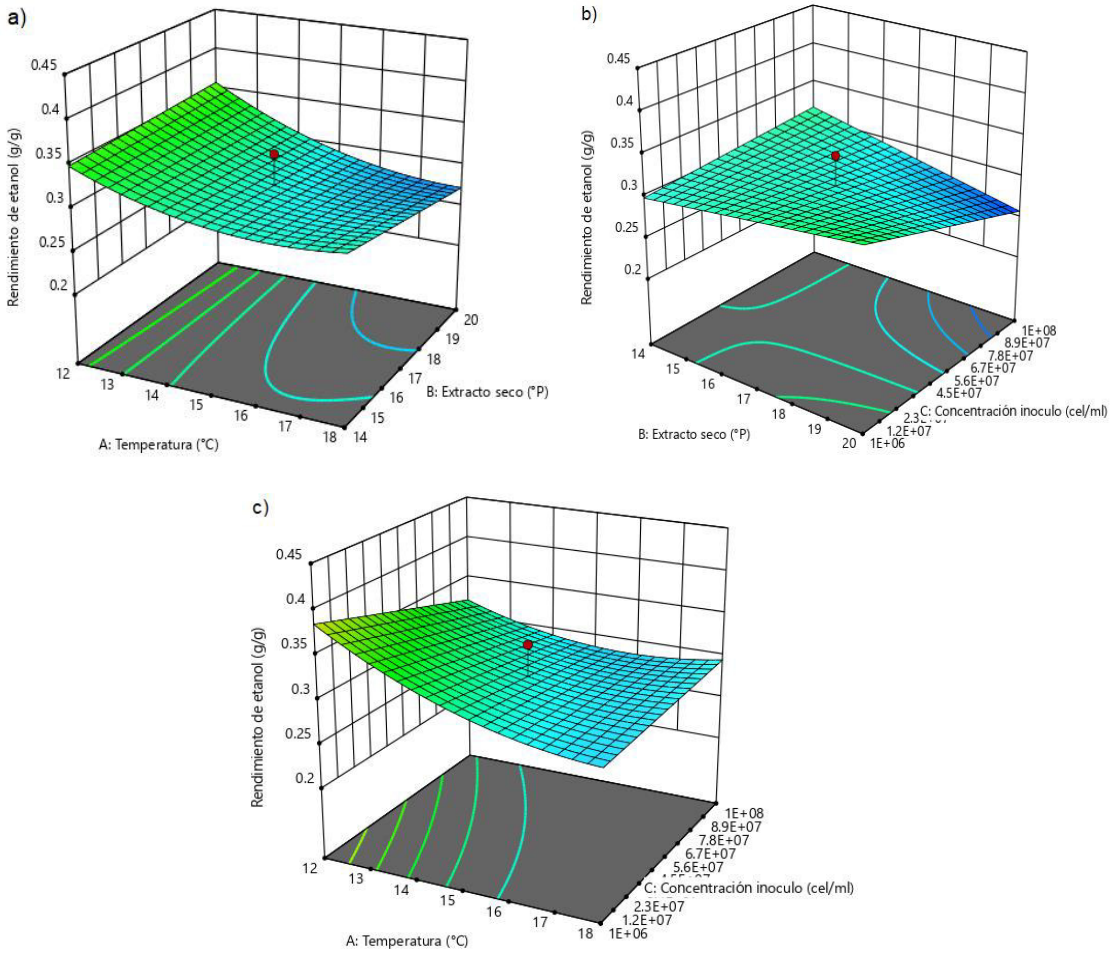


Figura 14. **Gráficos de Superficie de Respuesta de fermentaciones realizadas con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* C8 a diferentes condiciones. Efecto de la temperatura y extracto seco (a), extracto seco y concentración de inoculo (b) y, temperatura y concentración celular (c) en el rendimiento de etanol.**

Optimización en función de las variables dependientes

La optimización para cada variable respuesta en función de sus factores (temperatura, grados plato y concentración celular) se muestra en las figuras 12, 13 y 14. Como se

observa, los valores de las variables no son las mismas para cada variable dependiente. Por ejemplo, desde el punto de vista de producción de etanol, la temperatura (18°C) debe ser menor a la temperatura necesaria para alcanzar la máxima productividad (18°C), mientras que por el contrario debe ser mayor que aquella necesaria para obtener un máximo rendimiento. Por otro lado, la concentración inicial de células para alcanzar el máximo rendimiento de etanol es menor ($1x10^6$ cel/ml) que aquella necesaria ($1x10^8$ cel/ml) para alcanzar valores máximos de productividad y producción. Sin embargo, con respecto al extracto seco, el valor deseado para maximizar las tres variables dependientes fue 20°Plato.

Tabla 10. **Resultados de la optimización en función de las variables de estudio.**

Variable dependiente	Máximo valor	Temperatura (°C)	Extracto seco (°Plato)	Concentración inicial de levaduras (cel/ml)
Producción (g/L)	51.06	18*	20	$1x10^8$
Productividad (g/L.h)	0.159	18	20*	$1x10^8$
Rendimiento (%)	41.2	12	20*	$1x10^6$

* Valores que tiene poco efecto en la optimización de la variable dependiente

3.6. Fermentación de cerveza en biorreactor

A partir de los resultados obtenidos en la optimización se ha propuesto valores de las variables de estudio que estén dentro del rango de experimentación. Así, la fermentación de la cerveza se llevó a cabo en un biorreactor a temperatura de 15°C, flujo de aire de 0.075 vvm, concentración de inoculación de 5.0 $x10^7$ cel/mL y a 17 °Plato. Se suministró aire con el objetivo de evaluar el comportamiento de la levadura en presencia de oxígeno. Se usó la cepa *Saccharomyces cerevisiae* C8 y extracto de malta diluido a partir de extracto concentrada. La figura 15 nos muestra la cinética de producción de etanol y el consumo de azúcares fermentables. La fermentación duró cuatro días, se produjo 37,607 g/L (4,75% v/v) de etanol y un consumo de azúcares reductores de 76,38 g/L quedando un remanente de 28,914 g/L. El rendimiento de etanol fue del 0,49 g.et/g.azuc., mientras que la productividad fue de 0,392 g.etanol/L.h. El rendimiento obtenido se explicaría al hecho que la levadura utilizó el oxígeno para oxidar los azúcares del mosto en lugar de fermentarlos. Comparando los resultados obtenidos en los matraces, la producción de etanol fue de 40,359 g/L (5,10% v/v) que es mayor al obtenido en el biorreactor. La cantidad de aire en circulación a través de biorreactor sería un factor influyente para la menor producción de etanol, debido a que el oxígeno facilita una mayor producción de

energía y por ello parte de los azúcares se emplean en la reproducción celular. En cuanto a la productividad, a nivel de biorreactor se obtuvo una mejora significativa con respecto al valor obtenido a nivel de matraces que fue de 0,125 g.etanol/L.h. El mejor desarrollo celular facilitado por la circulación de aire favorece en la velocidad de fermentación de los azúcares, además que, el biorreactor utilizado durante la fermentación el flujo de aire forma un bucle de recirculación de mosto constantemente y así las levaduras tienen acceso en todo momento a los sustratos.

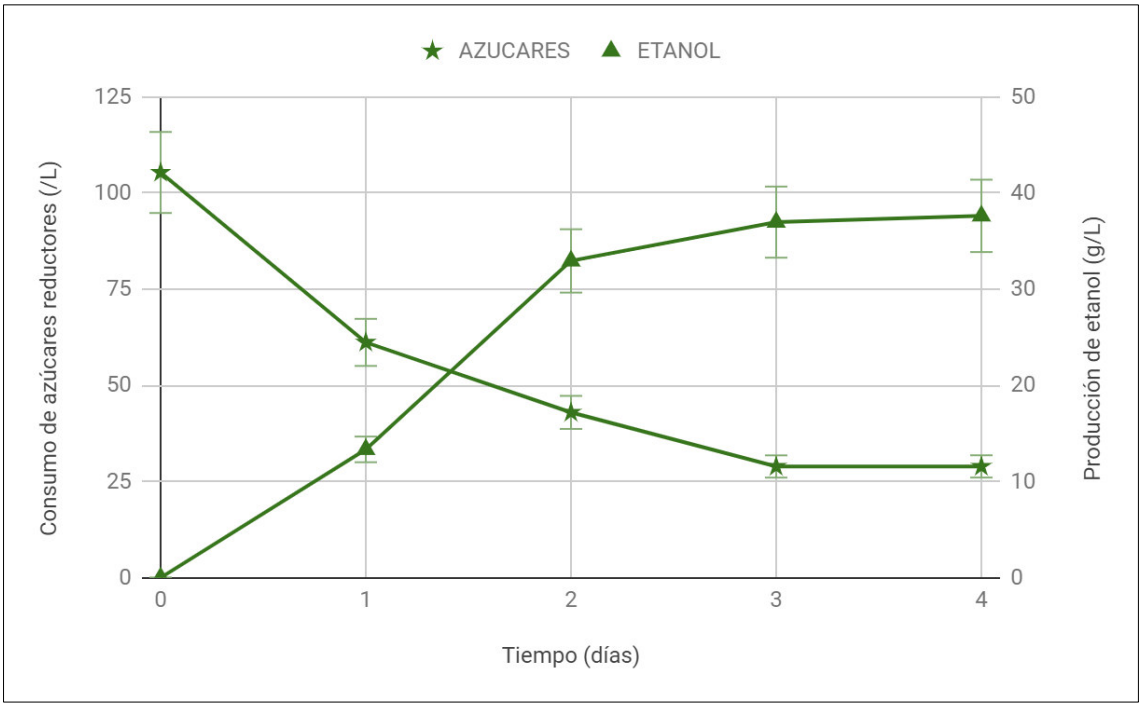


Figura 15. **Cinética de fermentación de cerveza utilizando la levadura aislada Saccharomyces cerevisiae C8. Viñetas estrellas: azúcares fermentables, viñetas triangulares: producción de etanol.**

3.7. Evaluación sensorial de la cerveza

Las cervezas producidas en biorreactor se evaluaron sensorialmente con la finalidad de comprender el impacto de la levadura y los parámetros de fermentación utilizados. La evaluación sensorial se llevó a cabo mediante pruebas afectivas (Escala hedónica) y utilizando un jurado semi entrenado compuesto por 10 personas: 5 varones y 5 mujeres entre 22 y 26 años de edad. El análisis se realizó con una escala hedónica de 5 puntos, dónde: 0=me disgusta mucho, 1=me disgusta levemente, 2=no me gusta ni me disgusta, 3=me gusta levemente y 4=me gusta mucho. Los datos obtenidos se analizaron por ANOVA (tabla N° 11), y se determinó la diferencia significativa entre una cerveza

artesanal comercial y la producida en el presente estudio. Las pruebas afectivas incluyeron el sabor, olor y aroma. Los resultados mostraron que la cerveza producida no mostro diferenciación significativa (P<0.05) con la cerveza artesanal comercial. Este resultado sugiere que la calidad sensorial de la cerveza producida es comparable con una cerveza artesanal comercial.

Con respecto a la evaluación, el puntaje promedio obtenido para cada característica fue mayor a 2 y no mayor a 3, lo que indica que existe una ligera aceptación de la cerveza. Un aspecto importante que considerar es que la cerveza artesanal adquirida no tuvo un puntaje más elevado, este resultado se vio en cierta manera influenciado por el jurado, debido que no fueron personas expertas en catación de cerveza y poder determinar cuáles son los ajustes más altos en calidad de cerveza.

Tabla 11. **Resultados de la evaluación sensorial de la cerveza producida en el presente estudio.**

Característica	Cerveza	Promedio	P<0.05
Sabor	Artesanal	2,8	0,5693
	Propia	2,5	
Olor	Artesanal	3,0	0,4872
	Propia	2,7	
Aroma	Artesanal	2,6	0,6669
	Propia	2,4	

La figura 16 muestra el gráfico de barras donde se distribuyen los grados de aceptación para el sabor de la cerveza. Se compara la cerveza propia con la cerveza artesanal. Los grados de aceptación negativos alcanzaron solo al 10% para ambas cervezas. En el grado de aceptación moderada la cerveza comercial tuvo mayor aceptación con el 50% del jurado mientras que para la cerveza propia alcanzó solo un 20%. Pero en el grado más alto de aceptación, la propia tuvo un 30% de aceptación y la comercial llegó al 20%. Con estos resultados se puede considerar que no existió una diferencia estadistica entre las dos cervezas, pero si, ambas tuvieron un mayor grado de aceptación positiva por parte del jurado.

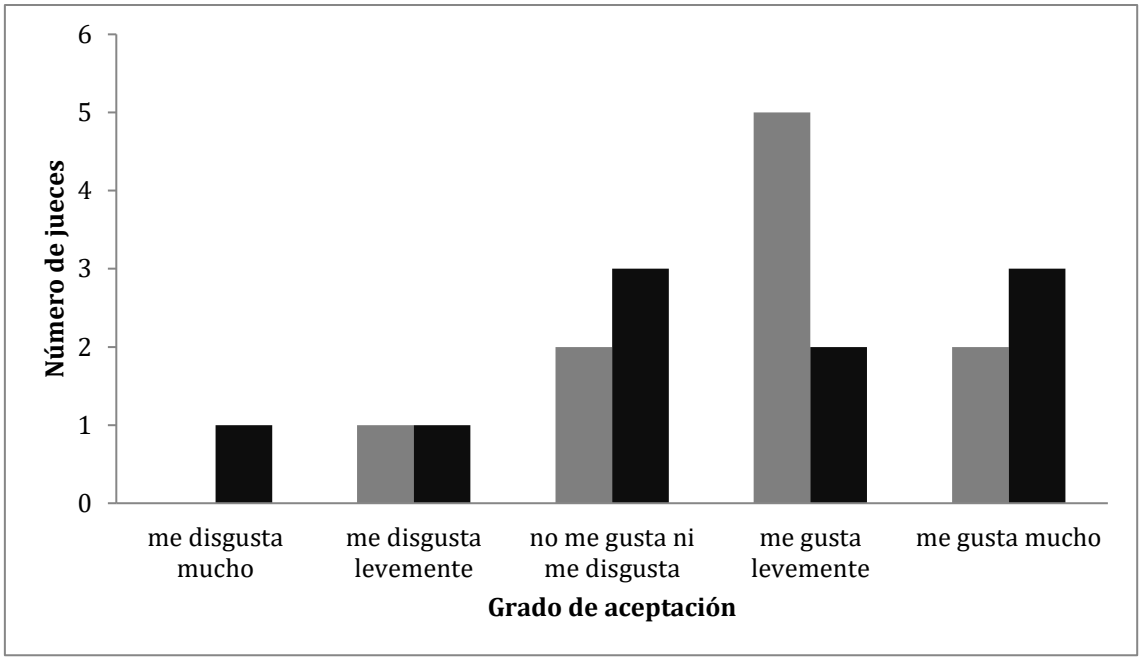


Figura 16. **Puntaje por jueces de la evaluación sensorial de sabor con base a la escala hedónica utilizada. Cerveza comercial (color plomo), cerveza producida (color negro).**

Los resultados de la evaluación del aroma (Figura 17) muestra que el mayor porcentaje del jurado tiene cierta preferencia. En la cerveza propia, al 50% no le gusta ni le disgusta y al 30% le agrada levemente. En cuanto a la cerveza artesanal, al 50% les agrada levemente, mientras que al 30% les disgusta levemente. A ninguno del jurado les disgusta mucho y hay un gusto elevado del 20% y 10% para las cervezas artesanal y propia respectivamente. El aroma de la cerveza incluye detectar a través de aparato olfativo compuestos volátiles producidos durante la fermentación. Estos compuestos se perciben mejor con la degustación ya que difunden a través de la vía retronasal. La mitad del jurado tiene ligeramente mayor preferencia por el aroma de la cerveza artesanal que por la propia, es un hecho que aún falta realizar pruebas en el tiempo de maduración de nuestra cerveza para reducir mejor la cantidad de compuestos desagradables como el diacetilo.

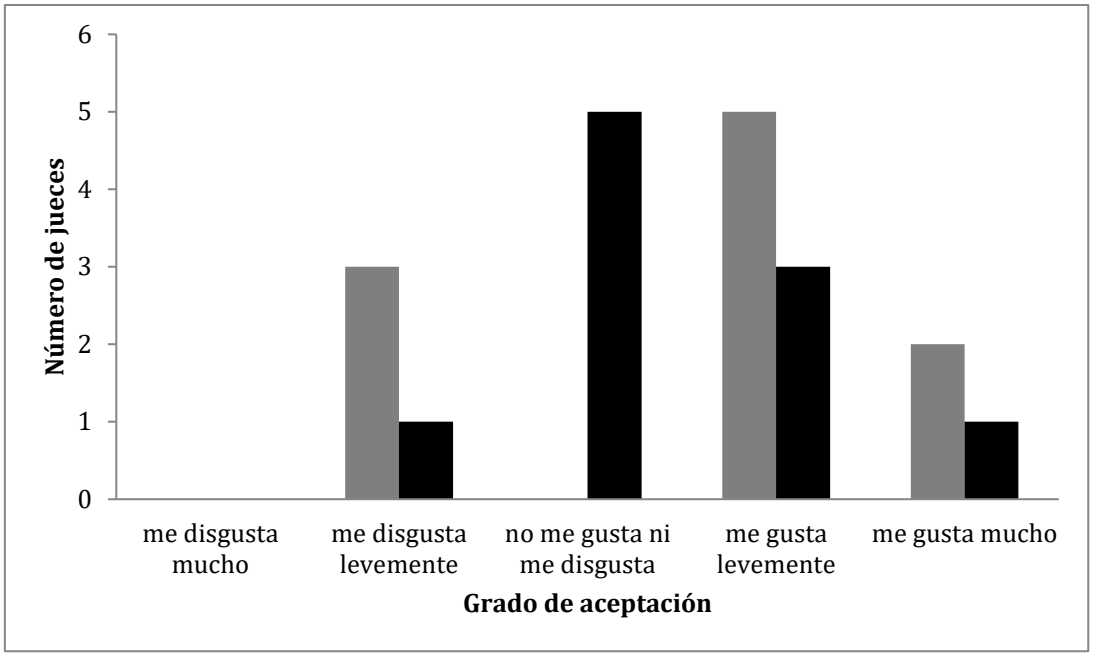


Figura 17. **Puntaje por jueces de la evaluación sensorial de aroma con base a la escala hedónica utilizada. Cerveza comercial (color plomo), cerveza producida (color negro).**

En cuanto a los resultados del olor (Figura 18) se tiene una mayor aceptación para las dos cervezas con respecto a las otras dos características evaluadas. En el grado de aceptación "me agrada levemente", la cerveza artesanal comercial tuvo el mayor porcentaje con el 50% del jurado y la cerveza propia alcanzó el 40% del jurado. Se tuvo un porcentaje apreciable en el grado de aceptación "me gusta mucho" con un 30% para la cerveza artesanal y con un 20% para la cerveza propia. La cerveza propia también tuvo un punto neutral de apreciación con un 30%. En el grado de aceptación negativo se tuvo bajos porcentajes: para "me disgusta levemente" alcanzó un 10% y en "me disgusta mucho" no tuvo ninguna apreciación. Las primeras notas que se captan al momento de oler una cerveza, es el característico de la levadura, seguida instantáneamente por el tipo de la malta y luego toda la gama de compuestos aromáticos desprendidos durante la fermentación donde cada tipo de cerveza posee sus propias características (Garrido, 2014).

Uno de los aspectos importantes en la calidad de la cerveza es la cantidad de levaduras que puedan estar presentes en el producto final. Si bien es cierto, estas se separan

mediante filtración, también puede realizarse un proceso de pasteurización para un almacenamiento prolongado. Nuestra cerveza no fue pasteuriza ni tampoco tuvo una filtración, pero si una separación por sedimentación, estas características son propias de cervezas artesanales. De acuerdo con las características de las levaduras, muchas veces no sedimentan en su totalidad e influyen en la determinación del sabor final de la cerveza.

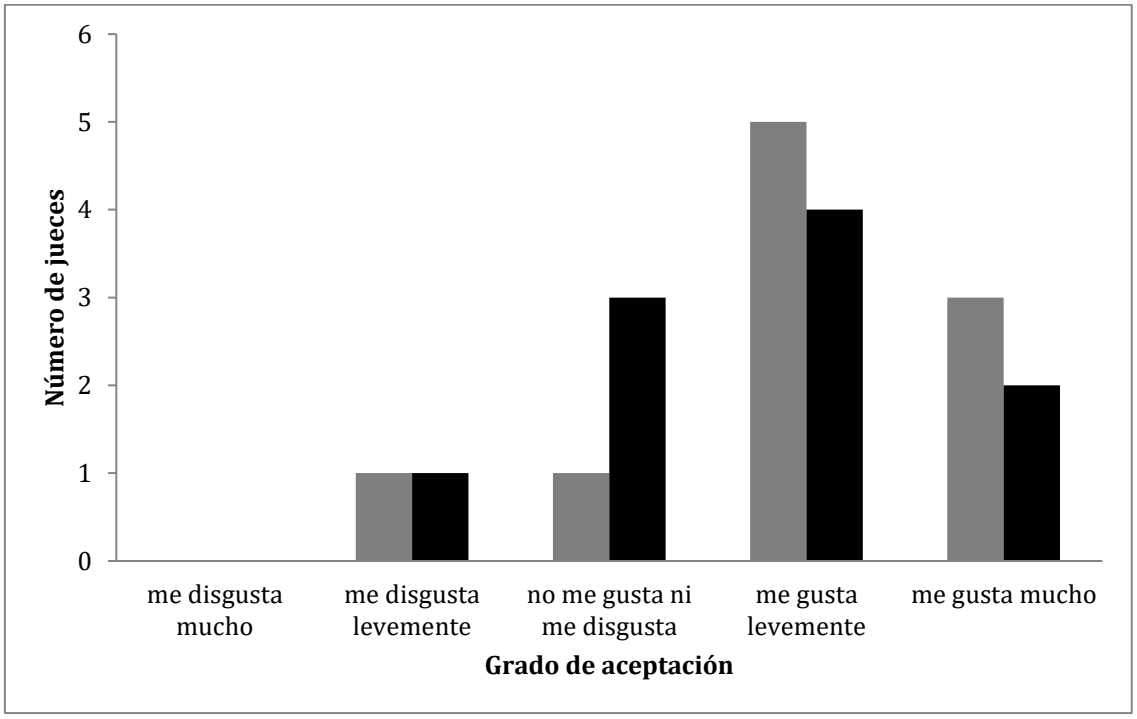


Figura 18. **Puntaje por jueces de la evaluación sensorial de olor con base a la escala hedónica utilizada. Cerveza comercial (color plomo), cerveza producida (color negro).**

Los resultados obtenidos en la presente tesis constituyen el punto de partida para un estudio más detallado de las características de la levadura aislada, además, para optimizar las condiciones de fermentación de tal forma que incrementé la valoración sensorial de la cerveza producida. Además, es necesario realizar más estudios con la finalidad de definir la mejor utilización de la levadura aislada, ya sea en la producción de cervezas "ale" o "lager".

IV. CONCLUSIONES

- Se aislaron ocho cepas de levaduras con características comúnmente observadas en *Saccharomyces* tales como tolerancia al etanol (12%v/v) y al metabisultifo de sodio (200 mg/L). Asimismo, se evaluaron morfológicamente mostrando formas redondas y elipsoidales típicamente del género *Saccharomyces*.
- Todas las cepas aisladas (08) fueron capaces de fermentar glucosa mientras que sólo tres (C6, C7 y C8) fueron capaces de fermentar además sacarosa y maltosa. Levaduras capaces de fermentar un mayor espectro de azúcares son deseadas. Adicionalmente, las cepas aisladas no fueron capaces de fermentar lactosa.
- Las cepas C6, C7 y C8 fueron capaces de fermentar en medios conteniendo hasta 18%v/v, característica adecuada para procesos de producción de etanol. De las tres cepas, se eligió la cepa 8 para los ensayos de fermentación de cerveza.
- La producción de etanol durante la fermentación de cerveza estuvo influenciada por la temperatura, el extracto seco del mosto y la concentración inicial de inoculo. Así, al incrementar la temperatura de fermentación, la cantidad de azúcares fermentables y la densidad celular inicial se incrementa la producción de etanol.
- Con respecto a la productividad de etanol, el incremento de la temperatura y la concentración inicial de inoculo tiene efecto positivo. Sin embargo, el extracto seco del mosto tuvo poco efecto. Esto se debería a que a mayor cantidad de células la conversión de azúcares a etanol es más rápido y, por otro lado, el incremento de la temperatura acelera los procesos bioquímicos de las levaduras.
- El rendimiento de etanol en la fermentación del mosto con la cepa C8 estuvo influenciado positivamente con la disminución de la temperatura y la concentración inicial de inoculo. Estos resultados son diferentes a los observados en las evaluaciones de la producción y productividad de etanol. Sin embargo, el contenido de extracto seco del mosto no tuvo un efecto significante.
- Los ensayos de fermentación realizados en biorreactor resultaron en valores de producción de etanol menores a lo observado en fermentaciones realizadas en matraces. Esto se debería al suministro de oxígeno, el cual debió desviar la conversión de etanol hacia la formación de biomasa.

- La evaluación sensorial de la cerveza producida en el biorreactor presentó resultados comparables a lo observado en una cerveza artesanal en términos de sabor, aroma y color. Su aceptación afectiva evaluada por el jurado fue positiva, por lo que la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* C8 y los parámetros utilizados se presentan como un potencial interesante para continuar con los estudios de escalamiento.

V. BIBLIOGRAFÍA

Anacleto J. and Uden N. (1982). Kinetics and activation energetics of death in *Saccharornyces cerevisiae* induced by sulfur dioxide. Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXIV, Pp. 2477-2486.

Almeida, R., Silva J., Lima, U., Silva, D. & Assis, A. (2001). Evaluation of fermentation parameters during high-gravity beer production. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *18*(4), 459-465.

Querol, A. Bond U. (2009). The complex and dynamic genomes of industrial yeasts, FEMS Microbiol. Lett. 293 1–10.

Albergaria, H. Arneborg, N. 2016. Dominance of Saccharomyces cerevisiae in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. Appl Microbiol Biotechnol 100:2035–2046.

Baccolo, G., Stamerra, G., Coppola, D., Orlandi, I. and Vai, M. (2018). Mitochondrial Metabolism and Aging in Yeast. International Review of Cell and Molecular Biology, Volume 340. ISSN 1937-6448.

Barata,A. Caldeira, J. Botelheiro, R. Pagliara, D. Malfeito-Ferreira, M. Loureiro, V. (2008). Survival patterns of Dekkera bruxellensis in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. International Journal of Food Microbiology 121: 201–207.

Batt, Carl A., and Mary Lou Tortorello. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier/Academic Press, 2014.

Bellut, K., & Arendt, E.K. (2019). Chance and Challenge: Non-Saccharomyces Yeasts in Nonalcoholic and Low Alcohol Beer Brewing – A Review. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 77(2), 77-91.

BioMerieux. Manual API ID 32 C, (2011). Identification system for yeasts REF 32 200 USA, 07990H - xl – 2011.

Briggs D., Boulton C., Brookes P. and Stevens R. (2004). Brewing: Science and practice. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.

Capece, A.; Romaniello, R.; Siesto, G.; Pietrafesa, R.; Massari, C.; Poeta, C. y Romano, P. 2010. Selection of indigenous Saccharomyces cerevisiae strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. International Journal of Food Microbiology, 144: 187-192.

Cáceres, J. y Reyna A. (2002). Modelamiento microbiológico para la levadura *Saccharomyces cerevisiae.* (Tesis de pre grado). Universidad De La Sabana. Bogotá, Colombia.

Ciani, M. Comitini, F. (2015). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. Current Opinion in Food Science, 1:1–6.

Conant, G. y Wolfe, K. (2007). Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. Molecular Systems Biology 3:129.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION: yeast group estimation of yeast viability. Inst. Brew. Vol. 68, 1962.

Ding, J. Huang, X. Zhang, L. Zhao, N. Yang, D. Zhang, K. (2009). Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol. 85:253–263.

Divol, B. du Toit, M. Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. Appl Microbiol Biotechnol. 95:601–613.

Dujon, B. Yeast evolutionary genomics. (2010). Nat Rev Genet, 11:512-524.

Flores, C., Rodríguez, C., Petit, T. y Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. FEMS Microbiology Reviews 24: 507-529.

Francesca N., Chiurazzi M.; Romano R.; Aponte M., Settanni L., Moschetti G., 2009. Indigenous yeast communities in the environment of 'Revollobianco' grape variety and their use in commercial While wine fermentation. World J Microbiol Biotechnol 26:337-351.

Freydière AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. Med Mycol 2001; 39: 9-33.

Garrido F. (2014). Análisis sensorial de la cerveza. Asociación Madrileña de Sumilleres (AMS).

Gigliarelli, P. (2013). Fermentación. *Mash, Volumen 379*. Obtenido de http://www.revistamash.com/detalle.php?id=379.

Gody, A. (2013). Aislamiento e identificación molecular de especies de levaduras No-*Saccharomyces* presentes en uvas (Tesis de pre grado). Universidad De La República Uruguay, Montevideo, Uruguay.

Gojkovic, Z., Knecht W., Zameitat, E., Warneboldt, B., Coutelis J-B., Pynyaha, Y., Neuveglise, C., Møller K., Lüffler, M. y Piskur, J. (2004). Horizontal gene transfer promoted evolution of the ability to propagate under anaerobic conditions in yeasts. Mol Gen Genomics 271: 387–393.

González S., Barrios E., Querol A. (2006), Molecular identification and characterization of wine yeast isolated from Tenerife (Canary Island, Spain) J Appl Microbiol 102: 1018-1025.

Gutiérrez H. y Salazar R. (2008). Análisis y diseño de experimentos. México, México D.F. McGRAW-HILL/INTERAMERICANA.

Guzmán Y. (2015). Efecto del etanol sobre la viabilidad de 3 cultivos de Saccharomyces spp nativos productores de etanol (tesis de pregrado). Universidad Nacional De Trujillo. Perú.

Harrison M. (2009). Beer/brewing. Applied Microbiology: Agro/Food.

Henick-Kling T., Edinger W., Daniel P. and Monk P. (1998). Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. Journal of Applied Microbiology 84, 865–876.

Hernández, S.J., Domínguez, E.L. y Gonzaga, L. (2015). Magnetic Field Influence in *E. coli* and *S. cerevisiae* Growth and the Ability of *Pseudomoanas sp* and *Bacillus sp* to be Phosphorus Solubilizers for Industrial Usage. Revistas de ciencias. 19 (1):109-121.

Herskowitz, I. (1988). Life Cycle of the Budding Yeast Saccharomyces cerevisiae. Microbiological reviews, Dec., p. 536-553.

Hittinger, T., Rokas, A., Bai, F-Y., Boekhout, T., Goncalves, P., Jeffries T. W., Kominek, J., Lachance, M-A., Libkind, D., Rosa, C. A., Sampaio, J. P. and Kurtzman, C. P. (2015). Genomics and the making of yeast biodiversity. Current Opinion in Genetics & Development, 35:100–109.

Jackowski, M. and Trusek, A. (2018). Non-alcoholic beer production – an overview. Polish Journal of Chemical Technology, 20, 4, 32—38, 10.2478.

Kellis, M., Birren, B., y Lander, E. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Nature Publishing Group vol. 428.

Yukiko Kodama, Y., Kielland-Brandt M. y Hansen J. (2005). Lager brewing yeast. Topics in Current Genetics, 145-164.

Kunze W. (2006). Tecnología para cerveceros y malteros. Alemania, Berlín: Westkreuz-Druckerei Ahrens KG.

Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. (2003). Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses.FEMS Yeast Research 3. 417-432

Kuthan, M., Devaux, F., Janderová, B., Slaninová, I., Claude Jacq, C. y Palková, Z. (2003). Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. Molecular Microbiology 47 (3), 745–754.

Lewis, M.M.Z. (2010). Mechanisms of ethanol tolerance in Saccharomyces cerevisiae. Appl Microbiol Biotechnol. 87:829–845

Linares M., Solis F. (2007). Revista Iberoamericana de Micología ISBN: 978-84-611-8776-8. http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf.

Mathews, C.K. Van Holde, K.E. Ahern, K.G. Bioquímica. Pearson Educación S.A. Madrid, 2002.

Martínez, J., Valls, V. y Villarino, A. (2007). El lúpulo contenido en la cerveza, su efecto antioxidante en un grupo controlado de población. Madrid, España: Centro de Información Cerveza y Salud (CICS).

Miranda, D., Ortiz, E., Arbizu, S., Ramiro, J., Aldrete, J. y Martínez, R. (2015). Aislamiento, selección e identificación de levaduras S*accharomyces spp*. nativas de viñedos en Querétaro, México. Agrociencia 49: 759-773.

Pandey, A., Sanromán, M. A., Du, G., Soccol, C.R. y Dussap, C. (Eds). (2017). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering.* Doi: 10.1016/B978-0-444-63664-5.00001-0.

Piskur, J. Rozpedowska¸ E. Polakova1, S. Merico, A. Compagno, C. (2006). How did Saccharomyces evolve to become a good brewer? TRENDS in Genetics.22 (4): 183-186.

Piskur , J. and Langkjaer , R.B. (2004). Mol. Microbiol. 53, 381 – 389.

Replansky, T., Koufopanou, V., Greig, D. and Bell, G. (2008). Saccharomyces sensu stricto as a model system for evolution and ecology. doi: 10.1016/j.tree.2008.05.005.

Schimz K-L and Holzer H. (1979). Rapid Decrease of ATP Content in Intact Cells of Saccharomyces cerevisiae After Incubation with Low Concentrations of Sulfite. Arch. Microbiol. 121,225-229

Sicard, D. Legras, J.L. (2011). Bread, beer and wine: Yeast domestication in the Saccharomyces sensu stricto complex. C. R. Biologies 334 229–236.

Suárez, R. Suárez-Lepe, J.A. Morata, A. Calderón, F. 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. Food Chemistry 102: 10–21.

Stewart G. (2016). Beer: Raw Materials and Wort Production. Doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00058-1.

Turc, X. (2018). diseño de una planta de fabricación de cerveza artesanal (tesis de pregrado). Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial de Barcelona, España.

Van Maris, A. J. Abbott, D. A. Bellissimi, E. van den Brink, J. Kuyper, M. Luttik, M. A.H.Wisselink, H.W. Scheffers, W.A. van Dijken, J.P. Pronk, J. T. (2006). Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *90*(4), 391-418.

Vanegas, J.M. Contreras, M. F. Faller, R. Longo, M. L. (2012). Role of Unsaturated Lipid and Ergosterol in Ethanol Tolerance of Model Yeast Biomembranes. Biophysical Journal. 102:507–516.

Villicaña, M. T. O. 2001. Elaboración de Cerveza Tipo Lager a Partir de Malta y Adjuntos Cerveceros de Sorgo-Edición Única.

Vopálenská, I., Hulková, M., Janderová, B. y Palková, Z. (2005). The morphology of *Saccharomyces cerevisiae* colonies is affected by cell adhesion and the budding pattern. Research in Microbiology 156: 921–931.

Wang, Y. Wing-Cheong Lo, & Ching-Shan Chou. (2017). A modeling study of budding yeast colony formation and its relationship to budding pattern and aging. PLoS Computational Biology, 13(11).

Willaert, R. (2016). Section V. Beverages: The Beer Brewing Process: Wort Production and Beer Fermentation. Department of Ultrastructure – Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, B-1050 Brussel, Belgium.

Zarnkow M. (2014). Beer. Doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00393-1.

Zumbado, W., Esquivel, P. y Wong, E. (2006). Selección de una levadura para la producción de biomasa: crecimiento en suero de queso. Agronomía Mesoamericana 17(2): 151-160.