



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

“Aprovechamiento de levaduras enológicas nativas *no-Saccharomyces* para su uso como agentes fermentativos en elaboración de cerveza artesanal”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

MYRIAM YOLANDA RIOS RESENDIZ

DRA. MA. ANDREA TREJO MÁRQUEZ

M. EN C. SELENE PASCUAL BUSTAMANTE



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Aprovechamiento de levaduras enológicas nativas *no-Saccharomyces* para su uso como agentes fermentativos en elaboración de cerveza artesanal.

Que presenta la pasante: **Myriam Yolanda Ríos Resendiz**

Con número de cuenta: 412062722 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Diciembre de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Carolina Moreno Ramos	
VOCAL	I.A. María Guadalupe López Franco	
SECRETARIO	Dra. María Andrea Trejo Márquez	
1er. SUPLENTE	I.A. Miriam Alvarez Velasco	
2do. SUPLENTE	M. en C. María Guadalupe Amaya León	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

El presente trabajo fue financiado por el proyecto Desarrollo tecnológico para el aprovechamiento integral de frutas y hortalizas (PAPIIT IT201216), de la dirección General de Asuntos de personal Académico de la UNAM.

DEDICATORIAS

A mis padres

A mi Madre una mujer guerrera que ha afrontado con sabiduría las adversidades que dios nos ha dispuesto, que sin duda me ha dado la lección más importante, "El amor a la vida", gracias por el gran apoyo, amor y motivación que me has brindado para salir adelante, te amo Mamá.

A mi Padre le agradezco infinitamente el apoyo que ha brindado, a esté gran hombre que es mi ejemplo de disciplina, compromiso, dedicación y tenacidad. Gracias por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida, gracias por cada consejo y cada una de tus palabras que me han guiado a lo largo de mi vida, te amo Papá.

A mis abuelos

A mis abuelitos paternos que desde el cielo siguen mis pasos y cuidan de mí. Me hubiera encantado compartir este momento tan especial de mi vida a su lado. Y así sentirse orgullosos del excelente trabajo que mi papá he hecho de mí para convertirme en una mujer exitosa.

A mis abuelitos maternos, por siempre darme ánimos y guiarme por el camino del bien. A mi Papi Mauro por sus sabias palabras y por estimularme siempre a superarme.

A mis hermanas;

Les agradezco no solo por estar presentes aportando buenas cosas a mi vida, sino por los grandes momentos de felicidad y de diversas emociones que siempre me han causado. Muchas gracias.

A mi novio:

Por ser el mejor compañero de carrera, amigo incondicional, confidente y consejero, el que me ha enseñado que cuando anhelas algo y luchas por ello lo consigues.

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quiero agradecerle a dios, a la virgen de Guadalupe y a la vida por todas las dichas que me han brindado.

Me faltarían palabras para poder expresar mi profundo agradecimiento a mis padres, a los cuales les debo la vida, mi educación y todo lo que soy, gracias por su apoyo incondicional. A mis hermanas, novio y amigos, por su comprensión y entendimientos continuos en la lucha de mis sueños.

Quiero expresar mi agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater y a la Fes Cuautitlán por haberme abierto las puertas y apoyarme en su extraordinaria tarea para formarme como profesionista.

A la Dra. Andrea Trejo por su confianza, apoyo y disposición que me brindo durante la realización de esta tesis.

A los profesores del taller y los miembros de mi jurado por sus aportaciones y sugerencias que permitieron enriquecer este trabajo.

Agradecer a mis amigos que a lo largo de esta estancia en la facultad me acompañaron en esta gran aventura y por compartir grandes experiencias que sin duda han sido y siguen siendo una gran alegría en mi vida.

**A TODOS USTEDES ESTÁ DEDICADO ESTÉ TRABAJO YA QUE SIN SU APOYO ESTO NO HUBIERA SIDO
POSIBLE.**

POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU

3.5. Técnicas Analíticas.....	47
3.5.1. Técnicas para evaluar parámetros fisicoquímicos.....	47
3.5.2. Técnicas para evaluar parámetros químicos.....	48
3.5.3. Técnicas para evaluar parámetros microbiológicos.....	53
3.5.4. Técnicas para evaluar parámetros bioquímicos.....	56
3.5.5. Prueba de Evaluación Sensorial	56
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
4.1. Evaluación de los parámetros químicos y fisicoquímicos de cervezas Artesanales.....	58
4.1.1. Parámetros químicos.....	58
4.1.2. Parámetros Fisicoquímicos.....	62
4.2. Aislamiento, purificación e identificación de levaduras enológicas nativas <i>no-Saccharomyces</i>	65
4.2.1. Aislamiento de levaduras <i>no-Saccharomyces</i>	65
4.2.1. Hoja de Uva.....	65
4.2.2. Orujo de uva deshidratado.....	66
4.2.3. Orujo Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Sauvignon/Melbec y Tempranillo.....	67
4.2.3. Diferenciación e Identificación de levaduras.....	72
4.4. Evaluación de los parámetros Químicos y Fisicoquímicos de levaduras <i>no-Saccharomyces</i> seleccionadas.....	75
4.4.1. Parámetros químicos.....	75
4.4.2. Parámetros fisicoquímicos.....	78
4.5. Cinética de fermentación de levaduras <i>no-Saccharomyces</i> ; NS008, NS010, NS011 y NS014.....	80
CONCLUSIONES.....	87
RECOMENDACIONES.....	89
REFERENCIAS.....	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Componentes volátiles y no volátiles de la cerveza.....	5
Tabla 2.	Composición típica de la cerveza; principales componente.....	6
Tabla 3.	Clasificación de estilos de cerveza.....	11
Tabla 4.	Análisis de agua para cinco estilos de cerveza diferentes.....	12
Tabla 5.	Compuestos minerales presentes en cerveza.....	14
Tabla 6.	Ésteres con significativa actividad flavolizante presente en cerveza.....	20
Tabla 7.	Dicetonas vecinales y sus componentes reducidos hallados en cerveza.....	22
Tabla 8.	Alcoholes comúnmente hallados en cerveza.....	23
Tabla 9.	Ácidos orgánicos presentes en cerveza.....	25
Tabla 10.	Algunos compuestos derivados del aceite esencial de lúpulo hallados en cerveza.....	27
Tabla 11.	Composición química del orejo de uva.....	37
Tabla 12.	Investigaciones realizadas sobre levaduras no- <i>Saccharomyces</i>	38
Tabla 13.	Muestras de desecho de industrias vitivinícolas.....	42
Tabla 14.	Cervezas artesanales analizadas.....	43
Tabla 15.	Nutrientes de Agares para el aislamiento de levaduras <i>no-Saccharomyces</i> ...	44
Tabla 16.	Agar Extracto de Levadura Peptona Dextrosa.....	45
Tabla 17.	Agar Lisina.....	45
Tabla 18.	Agar Amonio.....	45
Tabla 19.	Agar Mosto Malta.....	45
Tabla 20.	Criterios de selección de levaduras enológicas según Rainier y Pretorius (2000).....	46
Tabla 21.	Descripción de crecimiento de colonias de microorganismos presentes en los medios de selectivos.....	71
Tabla 22.	Descriptor de Flavor detectables en las muestras de levadura.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Precusores biosintéticos derivados de la fermentación alcohólica...	8
Figura 2	A) Planta de cebada, b) Distribución de granos de cebada de dos hileras, c) distribución de granos de cebada de 6 hileras.....	15
Figura 3.	Esquema de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (gemación multilateral) A) Ascas y ascosporos de <i>Saccharomyces spp</i> B).....	16
Figura 4.	Estructura celular de <i>Saccharomyces spp</i>	17
Figura 5.	Esquema de la captación y metabolismo de los compuestos Nitrogenados.....	19
Figura 6.	Rutas para la formación y subsiguiente degradación de dicetonas vecinales en cerveza.....	22
Figura 7.	Formación de 2-metilpropan-1-ol y 3-metilbutan-1-ol a partir del metabolismo de los carbohidratos y la biosíntesis de valina y leucina.....	24
Figura 8.	Diagrama de proceso de elaboración de cerveza tipo Ale.....	28
Figura 9.	Estructura de la amilosa y amilopectina.....	30
Figura 10.	Partes del grano y pulpa de una uva vitivinícola.....	35
Figura 11.	Cuadro metodológico.....	41
Figura 12.	Material y equipo para la determinación de contenido alcohólico en donde a) Equipo de destilación y b) Lectura de la muestra con el alcoholímetro.....	49
Figura 13.	Determinación de alcoholes superiores (curva patrón).....	50
Figura 14.	Equipo para la determinación de estrés.....	51
Figura 15.	Determinación de aldehídos.....	52
Figura 16.	Proceso para tinción de Gram	53
Figura 17.	Proceso para tinción de cápsula.....	54
Figura 18.	Técnica de sembrado en placa.....	54
Figura 19.	Técnica de agotamiento por estría.....	55
Figura 20.	Prueba de evaluación sensorial para la selección de cepas de <i>Saccharomyces</i>	57
Figura 21.	Contenido de Aldehídos en cervezas artesanales.....	59
Figura 22.	Contenido de Ésteres A) y de Alcoholes Superiores B), en cervezas artesanales.....	60

Figura 23. Determinación % Alc. Vol en cervezas artesanales.....	62
Figura 24. Determinación de Acidez Total expresado en Ác, Acético A) y pH B), en cervezas artesanales.....	63
Figura 25. Determinación de Sólidos Solubles Totales (°Brix) A) y Gravedad Específica (GE) B) en cervezas artesanales.....	65
Figura 26. Muestra el crecimiento de microorganismos en los medios Agar YEPD A), Lisina B), Agar Amonio C) y Agar Mosto Malta D) inoculadas con las muestras hoja de uva y orujo deshidratado.....	67
Figura 27. Muestra el crecimiento de microorganismos en los medios Agar YEPD A), Agar Lisina B), Agar Amonio C) y Agar Mosto Malta D) inoculadas con las muestras Cabernet Sauvignon.....	68
Figura 28. Muestra el crecimiento de microorganismos en los medios Agar YEPD A), Agar Lisina B), Agar Amonio C) y Agar Mosto Malta D inoculadas con las muestras Cabernet Franc.....	69
Figura 29. Muestra el crecimiento de microorganismos en los medios Agar YEPD A), Agar Lisina B), Agar Amonio C) y Agar Mosto Malta D) inoculadas con las muestras Sauvignon y Melbec	69
Figura 30. Muestra el crecimiento de microorganismos en los medios Agar YEPD A), Agar Lisina B), Agar Amonio C) y Agar Mosto Malta D) inoculadas con las muestras Tempranillo.....	70
Figura 31. Diferenciación macroscópica.....	73
Figura 32. Morfología de tinción de cápsula A) y tinción de Gram y tamaño celular B) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73
Figura 33. Morfología de tinción de cápsula de levaduras <i>no-Saccharomyces</i> ..	73
Figura 34. Morfología en tinción de Gram y tamaño celular de levaduras <i>no Saccharomyces</i>	74
Figura 35. Determinación de Aldehídos en levaduras <i>no-Saccharomyces</i> seleccionadas y el control (SC: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	75
Figura 36. Determinación de Alcoholes Superiores A) Y Ésteres B) de las levaduras <i>no-Saccharomyces</i> seleccionadas y el control (SC: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	76
Figura 37. Determinación del % Alc. Vol. de las levaduras <i>no-Saccharomyces</i> seleccionadas.....	77
Figura 38. Determinación de Acidez Total A) y pH, de las levaduras <i>no - Saccharomyces</i> y y el control (SC: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	78
Figura 39. Determinación SST (°Brix) A) y Gavedad Específica (GE) B), de las	

	levaduras <i>no-Saccharomyces</i> seleccionadas y el control (SC: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	79
Figura 40.	Cinética de crecimiento de levaduras <i>no-Saccharomyces</i> y el control (SC: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	81
Figura 41.	Cinética de consumo de azúcares de levaduras <i>no-Saccharomyces</i> y el control (SC: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	82
Figura 42.	Cinética de atenuación como gravedad específica de levaduras <i>no-Saccharomyces</i> y el control (SC: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	83
Figura 43.	Cinética de % Alcohol Volumen de levaduras <i>no-Saccharomyces</i> y el control (SC: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	84
Figura 44.	Cinética de producción de acidez total de levaduras <i>no-Saccharomyces</i> y el control (SC: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	85
Figura 45.	Cinética de cambio de pH de levaduras <i>no-Saccharomyces</i> y el control (SC: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	85

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo la caracterización de cervezas artesanales de alta fermentación procedente de Bélgica empleando *Saccharomyces cerevisiae* durante su elaboración, mediante la determinación de parámetros químicos (Aldehídos, % Alcohol Volumen, Alcoholes Superiores y Ésteres) y fisicoquímicos (pH, °Brix, Acidez, Gravedad Especifica (GE)), a fin de establecer parámetros de calidad en la cerveza, así como el aislamiento, purificación, diferenciación e identificación de levaduras *no-Saccharomyces* (NS) a partir de desechos de industrias vitivinícolas (Hojas de uva y orujo) provenientes de los estados de Querétaro y Baja California Sur, para su uso alternativo como agentes fermentativos en cerveza artesanal. El aislamiento de levaduras se llevó a cabo en medios de cultivos selectivos (Agar-EYPD, Agar-Lisina, Agar-Amonio y Agar-Mosto Malta), obteniendo 30 cepas de levaduras, las cuales fueron purificadas en medios Agar Lisina, diferenciando como NS aquellas levaduras capaces de desarrollarse después de dos siembras consecutivas sobre este medio, obteniendo 14 cepas de levaduras NS. La identificación de levaduras NS se llevó a cabo evaluando la pureza del cultivo macroscópicamente, observando el crecimiento de colonia, forma, color y homogeneidad, microscópicamente; mediante una tinción de Gram y tinción de cápsula, logrando observar con claridad la capsula típica que envuelve a la levadura, con morfologías muy variadas donde el tamaño de cada una de ellas oscilaba entre 0.4-1 µm. La identificación de levaduras NS se evaluó mediante la presencia de actividad enzimática al mostrar una diferenciación notable de compuestos aromáticos al finalizar la fermentación con respecto al control (*Saccharomyces cerevisiae*). Seleccionando mediante evaluación sensorial aquellas levaduras que presentaron atributos positivos favorables para la obtención de cervezas con notas florales y/o frutales a las cuales se les evaluaron parámetros químicos y fisicoquímicos. Finalmente se realizó la cinética de fermentaciones, evaluando tres cepas individuales ;control, NS008 y NS014 y una fermentación mixta; con las cepas NS010/NS011, mostrando un comportamiento de consumo de azúcar decreciente durante la fermentación donde los parámetros de GE y °Brix fueron disminuyendo a la par del consumo sustrato fermentable y producción de alcohol ascendente, siendo la levadura NS014 la que se adaptó con mayor facilidad al medio, presentando una cinética rápida de crecimiento y alcanzando una población máxima de 8.7×10^6 , dicha cepa fue la que se comportó en la %Alc. Vol y atenuación del mosto igual al control.

INTRODUCCIÓN

La cerveza es considerada desde hace miles de años como una bebida popular y su producción se considera a menudo como el proceso biotecnológico más antiguo (Baxter y Hughes, 2004). Se define como una bebida alcohólica no destilada elaborada por medio de fermentación de mosto procedente de malta de cebada, solo o mezclado con otros productos amiláceos (trigo, maíz, arroz o sustituto de malta) en donde el almidón ha sido parcialmente hidrolizado por digestión enzimática y se le ha conferido por infusión el sabor del lúpulo (García, 2009). Aquellas cervezas con sabores más complejos, aromas intensos y cargados de matices por la adición de adjuntos como; frutos, hierbas, especias y/o condimentos son denominadas cerveza gourmet, cerveza de especialidad o cerveza artesanal (Sweet, 2014; Coriat, 2014).

En la actualidad el panorama de la cerveza artesanal en México es prometedor logrando distinguirse de las marcas industriales en cuanto a variedad y calidad, ganando aceptabilidad entre los consumidores. En el año 2012 el gremio artesanal representaba el 0.05% de la producción nacional, para el 2016 alcanzó el 0.1% del total de la cerveza comercializada en México, equivalente a una producción de 166,069 hectolitros de cerveza artesanal, reportando gradualmente un aumento en el crecimiento de la industria cervecera en un 56% al año (Arteaga, 2013; ACERMEX; 2016).

Lo que ha generado el aumentando de la demanda de estos productos en el mercado, haciéndolo cada vez más competitivo, lo que conlleva a buscar maneras novedosas de conectarse emocionalmente con los nuevos consumidores a través de nuevas variedades y diversificación de sabores.

En México existe una limitada cantidad de cepas de levaduras para su aplicación en la elaboración de cerveza, siendo *Saccharomyces cerevisiae* la levadura de excelencia. Paradójicamente existe una gran biodiversidad de cepas de levaduras nativas en frutos como, lo es en las uvas vitivinícolas. Existen investigaciones dedicadas a estudiar el aporte de las levaduras nativas, en su gran mayoría *no-Saccharomyces* sobre las características organolépticas de los vinos, ya que estas producen una serie de metabolitos secundarios volátiles (ésteres apolares que se asocian al aroma frutal, floral y fresco) y ácidos grasos que aportan atributos sensoriales beneficiosos al vino. Por otra

parte, las fermentaciones espontaneas se asocian con la producción de mayor cuerpo, aroma y sabores inusuales, textura cremosa una mayor complejidad.

Es por ello que se propone una estrategia de búsqueda de nuevos fenotipos del sabor en la flora nativa proveniente de uvas para vinificación, así como la integración de conocimientos sobre análisis sensorial y biodiversidad natural de cepas *no-Saccharomyces* abriendo así la oportunidad de lograr nuevas cepas de aplicación industrial en la industria cervecera, ofreciendo con ello oportunidades innovadoras para mejora en el aroma y sabor de la cerveza, incrementando así la diferenciación de estas cervezas artesanales en un mercado cada vez más competitivo y a su vez satisfacer la demanda de nuevas alternativas del uso de agentes fermentativos en la elaboración de éstas.

Antecedentes



1. ANTECEDENTES

1.1 Cerveza

1.1.1. Historia

La cerveza es una bebida popular desde hace miles de años y su producción se considera a menudo como el proceso biotecnológico más antiguo (Baxter y Hughes, 2004). El arte de fabricar cerveza y vino se ha ido desarrollando a lo largo de 5,000-8,000 años. Debieron producirse varios descubrimientos independientes, como el exponer al aire los jugos de frutas, o los extractos de cereales, y se obtenían bebidas fermentadas (López, 2016).

Suficientes pruebas científicas y arqueológicas han sido recopiladas hasta el punto de convencernos firmemente, de que lo que ahora conocemos como “cerveza” fue producida por vez primera, al final del cuarto milenio a.C., por los sumerios en el sur de Babilonia (Suárez, 2013).

La cerveza y el pan fueron los ingredientes de mayor importancia en la dieta de los antiguos egipcios. En aquella época la cerveza se usaba para pagar y todos la bebían, desde el Faraón hasta sus súbditos. Se ha sugerido que las pirámides fueron construidas con una dieta de pan y cerveza. En esta época la elaboración de la cerveza era un misterio, porque se desconocían las razones que justificaban las distintas etapas del proceso de elaboración, la mayor parte de los cuales, como la fermentación, fueron descubiertos por casualidad (Carbajal e Insuasti, 2010).

Antes del siglo VIII, las cervezas eran elaboradas sin lúpulo, es en este siglo cuando en Bavaria se da su introducción, pero es hasta el siglo XVII cuando su uso se generaliza. Algunos hechos importantes que se dan en la historia de la cerveza son: Robert Boyle en 1661 y posteriormente Luis Pasteur, hacen estudios sobre fermentaciones; en 1677, Antonj Van Leewenhoek fue la primera persona que observó y describió a las levaduras al tomar muestras de cerveza; en el laboratorio Carlsberg, Emil Hansen desarrolla métodos para aislar células de levadura simple y posterior subcultivo, lo que condujo a que su sistema de cultivo puro, se usara en producción a gran escala en 1883 (este sistema ha resultado ser la base de todos los modernos protocolos de cultivo de levadura) (Carbajal e Insuasti, 2010).

En Europa, América o Australia, se elaboraban tradicionalmente con cebada, en África

con mijo, en Japón con arroz, en la América pre-colombiana se hacía de maíz. En las recetas del pasado, se le añadían amapolas, champiñones, plantas aromáticas, miel, azúcar, laurel, mantequilla, migas de pan, etc. Por regla general, en la actualidad cerveza es el nombre genérico que se da a toda bebida fermentada con malta, azúcar, lúpulo, agua y levadura (Suárez, 2013).

La palabra “beer” se considera por algunas autoridades, derivada de la antigua palabra inglesa “beor”, que significaba hidromiel baja.

Los documentos de principios de la edad media son escasos, pero sabemos que durante la época medieval, la actividad cervecera quedó más o menos confinada en los monasterios; dentro de tales comunidades religiosas se prestaba atención considerable a la mejora de la calidad del producto final. Muchos de nuestros estilos de cervezas actuales datan de aquellos tiempos (Hornsey, 2003).

1.1.2. Definición

La cerveza es una bebida alcohólica no destilada elaborada por medio de fermentación de mosto procedente de malta de cebada, solo o mezclado con otros productos amiláceos (trigo, maíz, arroz o sustituto de malta) en donde el almidón ha sido parcialmente hidrolizado por digestión enzimática y se le ha conferido por infusión el sabor del lúpulo (García, 2009; Ibáñez, 2013; Reyes, 2010; Sánchez, 2011).

La cerveza proviene de cuatro principales materias primas; malta, lúpulo, agua y levadura (González *et al.*, 2001). La cerveza contiene un 90% de agua y una amplia variedad de especies químicas con distintas propiedades que darán un determinado amargor, color, aspecto y formación de espuma y su elaboración es un proceso complejo en el que intervienen diferentes disciplinas científicas y diferentes tecnologías (Suárez, 2013).

Existen cerca de cientos de estilos de cervezas diferentes alrededor del mundo, muchas de ellas se pueden introducir en un estilo clasificado que se han desarrollado a lo largo del tiempo en varios países y regiones distintas. Dependiendo esto en el tipo de proceso empleado, si es de fermentación alta o baja, y por las materias primas utilizadas (diversos granos, jarabes, etc.) (Góngora, 2014).

1.1.3. Composición

La cerveza, por su proceso natural de elaboración y por las materias primas a partir de

las cuales se produce (agua pura, cereales, lúpulo y levaduras), posee características nutricionales que la hacen una bebida sana y nutritiva. Sus componentes finales son agua (90%), hidratos de carbono no fermentados (dextrinas), minerales, vitaminas, ácidos, fenoles, alcoholes, dióxido de carbono y aditivos (Robles, 2012).

Robles (2012), clasifican los componentes de la cerveza en dos grupos: componentes volátiles y no volátiles. Los primeros tienen una alta presión de vapor y son responsables del aroma y “bouquet” de la cerveza y se forman fundamentalmente en la etapa de fermentación. Los componentes volátiles se encuentran concentrados en el espacio de la cabeza de los envases. Mientras que los componentes no volátiles forman un conjunto más heterogéneo como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Componentes volátiles y no volátiles de la cerveza.

COMPONENTES VOLÁTILES	COMPONENTES NO VOLÁTILES
Alcoholes superiores	Inorgánicos: minerales (cloruros, sulfatos, carbonatos, sodio, calcio, magnesio) y metales (pomo, hierro, cobre y zinc).
Alcohol etílico	
Ésteres	Hidratos de carbono (mono-, di-, trisacáridos; dextrinas y β -glucanos).
Aldehídos	Compuestos nitrogenados (aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos).
Cetonas	
Ácidos orgánicos	Compuestos fenólicos
Compuestos azufrados	Vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, ácido fólico).
Aminas	Lípidos
Compuestos fenólicos volátiles	
Hidrocarburos y lactonas	

Fuente: Robles (2012).

Algunos elementos que forman parte de la composición de la cerveza y que constituyen la base de su valor nutricional son las vitaminas y minerales, proteínas, carbohidratos, etc. No obstante si se incluyera todos los elementos que la componen, se tendría alrededor de cincuenta, entre los que se cuentan derivados del lúpulo, inositol, taninos, polifenoles, entre otros.

1.1.4. Características nutricionales

Desde hace muchos años se sabe que la cerveza puede ser un importante contribuyente a la dieta. Para los hombres primitivos, la elaboración de cerveza

artesanal estaba estrechamente relacionada con el pan, pues ambos se elaboraban con cereales, agua y levadura y ambos tenían un valor nutritivo muy similar. En la antigüedad, como Mesopotamia la cerveza probablemente era más espesa, rica en proteínas, pobre en alcohol y más dulce. Durante la época medieval, la cerveza se bebió en grandes cantidades por la mayor parte de la población ya que ésta era microbiológicamente más segura que el agua en parte porque se sometía a ebullición y sus propiedades antimicrobianas del alcohol; más tarde incorporando el lúpulo en el siglo XV. En África subsahariana la cerveza de sorgo proporciona una cantidad significativa de las proteínas y vitaminas de la dieta de muchas regiones pobres (Baxter y Hughes, 2004).

En la tabla 2 se muestra los principales componentes de la cerveza moderna, comparada con la leche, el vino y bebidas refrescantes carbonatadas. Es evidente que la cerveza contiene cantidades significativamente mayores de los principales nutrientes (proteínas, carbohidratos, fibra y vitaminas) que otras bebidas alcohólicas como el vino y no alcohólicas como la limonada o las sodas. Su contenido en vitaminas es tan adecuado como el de la leche, en cuanto al contenido de grasa es muy inferior. Sin embargo, la leche tiene un contenido en proteínas superior a la cerveza (Baxter y Hughes, 2004).

Tabla 2. Composición típica de la cerveza; principales componente.

INGREDIENTE	NIVELES TÍPICOS (g/100 mL)			BEBIDAS REFRESCANTES CARBONATADAS
	CERVEZA	VINO	LECHE	
Agua	92-95	85-91	88-90	89
Alcohol	2.5-3.5	9-14	0	0
Carbohidratos totales	1.5-3	0.1-6.0	5	10
a los cuales pertenece los azúcares libres	<0.2	0.1-6.0	---	10
Proteínas totales	0.2-0.6	0.02	3.0	Despreciable
Lípidos	Despreciable	Despreciable	3.0-4.0	0
Minerales	0.2-0.3	0.1-0.3	0.2-0.5	0.025
Vitaminas y otros micronutrientes	0.002	0.003	0.002	0
Fibra	0.3-1.0	Despreciable	Despreciable	despreciable
Polifenoles y compuestos de lúpulo	0.002-0.06	0.03-0.074	0	0

Fuente: Baxter y Hughes, (2004).

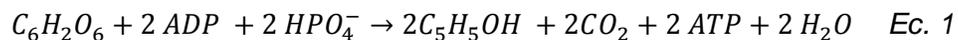
1.1.5. Clasificación

En el mundo existen muchas clases de cerveza y cada cual posee un particular aroma, sabor, color y cuerpo; muchas veces llevan el nombre de los pueblos de los cuales son originarias. Si bien todas se fabrican con los mismos ingredientes, cebada malteada, lúpulo, levadura y agua, lo que establece la diferencia entre una y otra son las variaciones de esas materias primas y el tipo de fermentación (Rodríguez, 2003). Miles de marcas de cerveza son producidas en todo el mundo y la mayoría de ellas se pueden clasificar de acuerdo al proceso utilizado, una primera clasificación puede hacerse en base al proceso de fermentación; cervezas de alta fermentación (cervezas Ale) y cervezas de baja fermentación (cervezas Lager) (Pavslar y Buiatti, 2009). Como segunda clasificación se obtiene de acuerdo al modo de acción de la levadura; *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae* y levaduras silvestres o Lambic (Olvera, 2013).

1.1.5.1. Fermentación Alcohólica

La fermentación alcohólica es un proceso anaerobio que además de generar etanol desprende grandes cantidades de dióxido de carbono (CO₂) además de energía para el metabolismo de las levaduras.

La degradación de azúcares por la levadura, vía glicolítica, comprende todo un conjunto de reacciones que permiten a las células transformar la glucosa en ácido pirúvico, gracias a un contenido enzimático (Suarez e Iñigo, 2004). Las fuentes de carbono, fundamentalmente las hexosas glucosa y fructosa, permiten a las células de levadura obtener energía mediante la fermentación alcohólica. Esta ruta metabólica (figura 1) tiene lugar en el citoplasma y puede expresarse mediante la siguiente ecuación global simplificada:



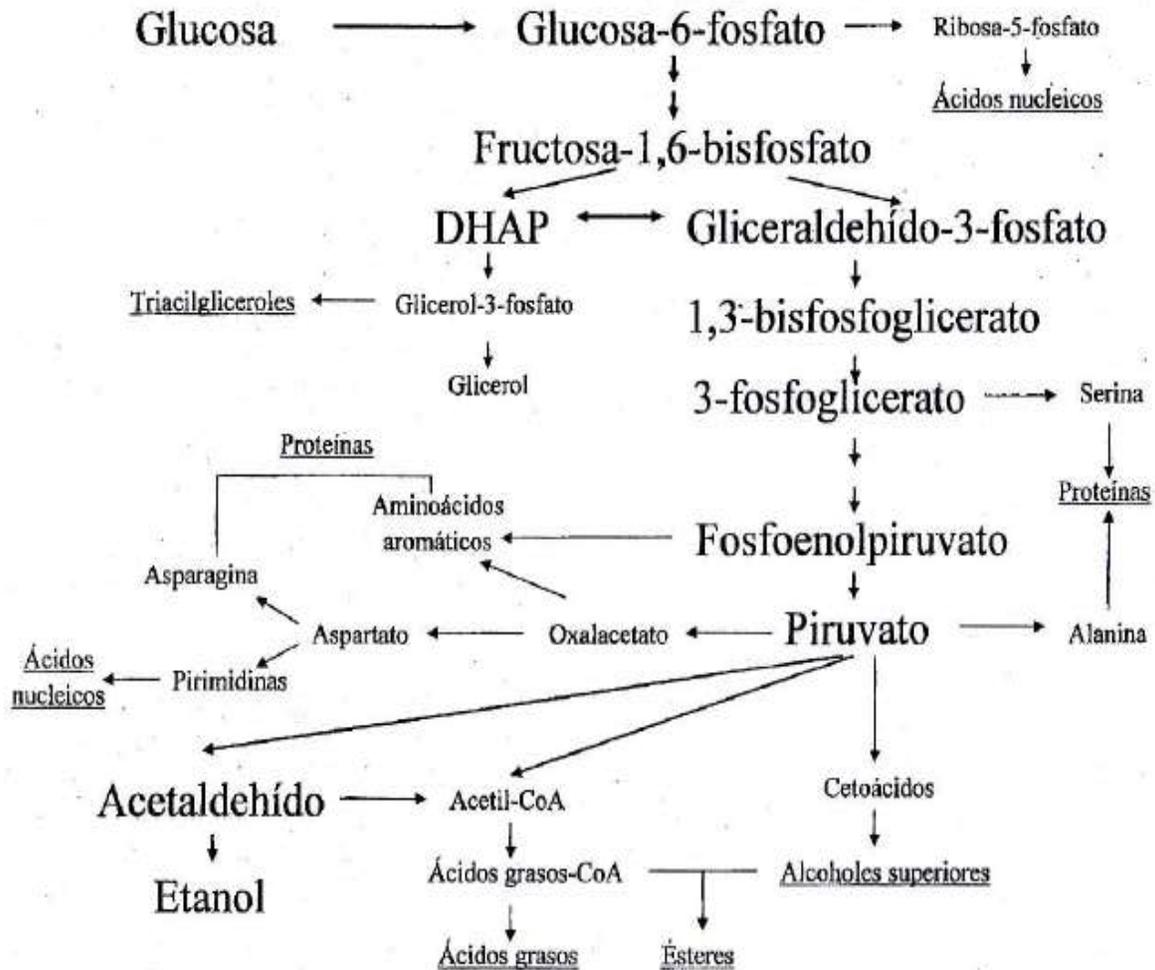


Figura 1. Precursores biosintéticos derivados de la fermentación alcohólica

Fuente: Carrascosa *et al.* (2005).

La fermentación alcohólica sigue la ruta Embden-Meyerhof-Parnas, descrita hacia 1940 por estos investigadores y conocida como glicolisis. Esta ruta consiste en 10 reacciones. Las cinco primeras constituyen la fase de inversión de energía, en la que los azúcares se activan metabólicamente por fosforilación dependiente de ATP para dar lugar a un azúcar de seis carbono, la fructosa-1,6-bisfosfato, que sufre una escisión para proporcionar dos moles de triosa fosfato. Durante la fase de generación de energía (reacciones 6 a 10), la triosa fosfato sufre una nueva activación que conduce a dos compuestos con un alto potencial de transferencia de fosfato, primero el 1,3-bisfosfoglicerato y luego el fosfoenolpiruvato. Cada uno de estos compuestos transfiere su fosfato de alta energía al ADP, proporcionando así ATP, en un proceso conocido como fosforilación a nivel de sustrato. La energía química del ATP puede transformarse posteriormente en la célula en otras formas de energía necesarias para el crecimiento

de la misma (biosíntesis y transporte a través de membrana, por ejemplo), mediante los denominados procesos de transducción de energía.

Tras la ruta glicolítica la fermentación alcohólica concluye con dos reacciones adicionales. En la primera el piruvato resultante es descarboxilado a acetaldehído y CO_2 , mediante el enzima piruvato descarboxilasa, que requiere la presencia como coenzima de pirofosfato de tiamina. Finalmente, el acetaldehído es reducido a etanol por el enzima alcohol deshidrogenasa, en una reacción que implica la oxidación del NADH a NAD^+ , lo que permite poder recuperar el potencial de oxidación consumido en la etapa anterior. Debe tenerse en cuenta que los procesos de catabolismo y anabolismo están mediados por deshidrogenasas que utilizan predominantemente NADP^+ y NAD^+ como cofactores redox. La formación de NADH y su oxidación a NAD^+ son siempre mantenidas en equilibrio por la célula para el mantenimiento de la glicolisis (Carrascosa *et al.*, 2005).

1.1.5.2. Fermentación baja (Lager)

Las cervezas tipo Lager son elaboradas con levadura *Saccharomyces carlsbergensis* conocida también como *Saccharomyces uvarum* o *pastorianus* que durante y al finalizar la fermentación ésta se sedimentan, depositándose en el fondo del fermentador. Son levaduras más estables, obteniendo cervezas más claras, ligeramente más espumosas, su estabilidad mejora si se almacenan a bajas temperaturas en bodegas o cuevas (Sánchez, 2011; Olvera, 2013).

Este tipo de cerveza generalmente se somete a una fermentación primaria de entre 8 a 15°C , seguida de una segunda fermentación prolongada entre -1 a 4°C (la fase lagering). Ahora, con un moderno control de fermentación, la mayoría de las fábricas de cerveza utilizan periodos cortos de almacenamiento en frío, típicamente de 1 a 3 semanas. Estas cervezas son llamadas "lagers", palabra alemana que significa guarda o permanecía en bodega (López, 2016).

1.1.5.3. Fermentación alta (Ale)

La cerveza tipo Ale es por tradición, el producto de la fermentación de las cepas “de superficie”, de *Saccharomyces cerevisiae*, denominada así debido a que una parte de la levadura ascendían hacia la superficie hasta formar una densa “cabeza de levaduras” en la superficie del fermentador. Este tipo de levadura es más rápida para la degradación del extracto de azúcar en la etapa de fermentación, ya que permanece en suspensión, y por las temperaturas más altas utilizadas (20 - 23°C). las levaduras “altas” se pueden diferenciar de las “bajas” por fermentar el trisacárido, la rafinosa hasta un tercio, al formar sólo fructosa y melibiosa, pues les falta la enzima melibiasa que sigue descomponiendo la melibiosa, en glucosa y galactosa, ambas fermentables (Rodríguez, 2003).

La fermentación de la cerveza Ale ocurre de manera más rápida y a temperaturas de 20°C aproximadamente, actuando la levadura en la superficie del mosto. Además, tienen un elevado porcentaje de alcohol y son muy aromáticas (López, 2016).

Estos estilos básicamente dependen de la levadura seleccionada para la fermentación. Dentro de estos dos grupos existe una gran variedad de estilos de cerveza con características bien definidas como color, amargor, aroma, carbonatación, grado alcohólico, etc. Algunos estilos de cerveza se pueden observar en la tabla 3.

1.1.5.4. Modo de acción de la levadura

Las levaduras de cervecería son *Saccharomyces carlsbergensis* y *Saccharomyces cerevisiae*. Donde *S. carlsbergensis* es una levadura de fondo que no suele formar esporas, se adapta bien a la fermentación lenta a bajas temperaturas y es la preferida para elaborar cerveza tipo Lager. La levadura de *S. cerevisiae* produce una fuerte fermentación a temperatura elevada y tiende a flotar en la superficie. Es preferida para la elaboración de cerveza tipo pilsner. También existen cervezas de fermentación espontánea mediante levaduras silvestres denominadas Lambic, producidas y consumidas en menor escala principalmente en Bélgica (Rodríguez, 2003).

En la tabla 3 se muestran los tipos de cerveza según su fermentación y las características que debe tener cada una de ellas.

Tabla 3. Clasificación de estilos de cerveza.

ALE FERMENTACIÓN ALTA		LAGER FERMENTACIÓN BAJA	
Estilo	Características	Estilo	Características
Pale Ale	Clara (cobriza), fabricada a partir de maltas pálidas, fuertemente lúpulada (muy amarga), muy aromatizada, poco dulce, mucho cuerpo.	Pale (Hell o Pilsner)	Fabricada con maltas pálidas (cervezas claras), secas y aromatizadas con mucho lúpulo, amarga.
Britter	Cervezas claras, mucho lúpulo (amargas), mucho cuerpo (pale ale del barril), secas y afrutadas.	Munich, Durkel o Dark	Fabricada con muchas maltas oscuras, sabor intenso, aromática, más fuertes que las pálidas, mucho cuerpo, algunas veces ligeramente dulces
Brown Ale	Fabricadas con maltas que proporcionan un olor intenso (oscura), generalmente más dulce menos cargada de lúpulo que las pálidas, menos alcohol.	Bock, Marzen	Pueden ser claras, semi oscuras-oscuras u oscuras, mucho cuerpo, alto contenido alcohólico, alto nivel de lúpulo, consideradas cervezas de gran fuerza.
Mild Ale	Suave (poco densa), semi oscura, dulce, de moderado amargor, afrutada, con bajo contenido alcohólica.	Dortmunder	Similar a la pilsner pero con menos lúpulo y menos cuerpo, cerveza secas.
Indian Pale Ale	Fuertemente lúpulada y alto contenido alcohólico.	Viena	Semi oscura, consistencia suave (poca densidad), sabor a malta y ligeramente suave, algunos sabores tostados. Carbonatación moderada.
Stout y Porter	Muy oscuras (negras), mucho cuerpo, intensamente amargas, sabores tostados, dulces o secas.		

Fuente: Olvera (2013) y López (2016).

1.1.6. Ingredientes

Las principales materias primas para la elaboración de la cerveza son; la cebada malteada, el lúpulo (o productos obtenidos a partir de lúpulos pellets o extractos), levadura y agua (Baxter y Hughes, 2004).

1.1.6.1. Agua

El agua representa un papel de suma importancia para la elaboración de la cerveza, ya que representa más del 90% de su peso. Por ello resulta sorprendente que la calidad del agua sea de vital importancia para la cálida el producto final. El agua utilizada para la elaboración de la cerveza debe ser agua para consumo humano libre de cualquier contaminante químico o microbiológico. Esto significa que debe cumplir con las legislaciones vigentes (Reyes, 2010; Suárez, 2013).

En la actualidad el agua de cada cerveza puede ser modificada químicamente (acondicionada), ya que el contenido de minerales de esta tienen grandes efectos en las propiedades de la cerveza, dando una importante contribución en el sabor del producto terminado (López, 2016).

La composición iónica ideal del agua de cervecería, varía de acuerdo con el tipo de cerveza deseada. En la tabla 4 se muestra las características ideales del agua para cinco tipos de cerveza (Hornsey, 2003).

Tabla 4. Análisis de agua para cinco estilos de cerveza diferentes.

	Pilsen (mg/L)	Burtonupon- Tremt (mg/L)	Munich (mg/L)	Durtmund (mg/L)	Viena (mg/L)
Na ⁺	32	54	10	69	-
Ca ₂ ⁺	7.1	268	75.8	262.3	162.8
Mg ²⁺	2.4	62.1	18.1	22.9	67.6
HCO ₃ ⁻	14	280.1	151.5	282.4	242.9
SO ₄ ²⁻	4.8	638.3	9.6	289.2	216.3
NO ₃ ⁻	Trazas	31	Trazas	Trazas	Trazas
Cl ⁻	5	36	2	107	39
Dureza total	0.9	29	8.2	23.5	21.6
Dureza temporal	0.7	7.4	8	9.4	17.3
Dureza permanente	0.2	21.6	0.3	14.1	4.3
Alcalinidad residual	0.5	0.2	5.9	3.1	4.4

Fuente: Hornsey (2003)

Para el acondicionamiento del agua hay que tener presente que existen dos clases de dureza; permanente y temporal. La primera es causada por CaSO₄, Oca, Ca (NO₃)₂, MgO y Mg (NO₃)₂, mientras que los bicarbonatos de calcio y magnesio son responsable de la última. La dureza temporal es uno de los principales problemas del agua cervecera, debido a que la disociación de los bicarbonatos determina un aumento de pH

en la cuba de maceración. Una forma moderna más común de tratamientos de agua, se basa en la adición de ácido (frecuentemente sulfúrico) para eliminar la dureza temporal, acompañando de yeso, para aumentar la dureza permanente (Hornsey, 2003).

La dureza temporal puede eliminarse parcialmente por ebullición, especialmente si el agua es aireada. Esto ayuda a eliminar al dióxido de carbono y precipitar carbonato de calcio insoluble al depositarse como sedimentos. Es menos eficiente en presencia de iones magnesio porque el carbonato de magnesio precipita peor y es más soluble. Otro método tradicional consiste en dosis cuidadosas de cal, de manera que precipite al carbonato, aunque para este método se necesita más tiempo para que se forme el precipitado.

Por lo tanto la dureza del agua es de suma importancia para la cerveza, primordialmente durante la maceración, ya que el pH juega un papel muy crítico durante este proceso.

Durante el proceso de maceración el bicarbonato libera dióxido de carbono tomando hidrogenaciones. Este consumo de iones hidrógeno reduce la acidez y por lo tanto eleva el pH, por lo que se recomienda que el agua de maceración debe ser tal que el pH neto sea de 5.4. Este pH es el óptimo para la actividad amilolítica y el que produce por consiguiente los niveles máximos de degradación del almidón (sacarificación), de igual manera los iones de calcio son importantes durante este proceso ya que su efecto estabiliza la activada ya mencionada. Por ello, muchas veces el agua es tratada para lograr bajar el pH mediante la adición de CaSO_4 (Hornsey, 2003).

En presencia de pH bajos ocurre la extracción polifenoles (taninos), por lo que las cervezas fabricadas con aguas ricas en calcio resultan menos astringentes y menos coloreadas. Tanto las levaduras como los coágulos flocculan mejor en presencia de iones calcio; por consiguiente, los iones calcio facilitan la clarificación del mosto de la cerveza. Finalmente en presencia de iones calcio precipitan cristales de oxalato cálcico, lo que evita la liberación incontrolada de dióxido de carbono disuelto. Aunque los iones magnesios suelen tener efectos similares a los iones calcio, su eficiencia en la reducción de pH es menor, porque los fosfatos magnésicos son más solubles que el fosfato cálcico. Los iones magnesio son, sin embargo, esenciales para el funcionamiento de ciertas enzimas de las levaduras; por ejemplo el magnesio es un cofactor de la piruvatodescarboxilasa el enzima que cataliza la producción de acetaldehído.

En la Tabla 5 se muestran algunos compuestos minerales presentes en cerveza entre los que se pueden observar como mayoritarios al fosfato, potasio y sodio.

Tabla 5. Compuestos minerales presentes en cerveza.

Ion	Niveles típicos en la cerveza (mg/L)	Fuentes	Efectos
Potasio	200-245	Malta, coadyuvantes	Sabor salado
Sodio	20-350	Materiales para la elaboración, agua	Empalagoso
Calcio	25-120	Materiales para la elaboración, agua	Efectos favorables sobre el sabor
Magnesio	50-90	Materiales para la elaboración, agua	Desagradable con sulfato
Cloruro	120-500	Agua, hidrolizados de almidón	Pleno, dulzor, flavor suave
Sulfato	100-430	Agua	Seco
Oxalato	may-30	Principalmente de la malta	Velo, inductor de borboteo
Fosfato*	170-600	Malta, coadyuvantes	
Nitrato	0.5-2	Agua, lúpulo.	Sabor extraño, color intenso

*La mayor parte es captado por las levaduras durante la fermentación limpios

Fuente: Baxter y Hughes (2004)

1.1.6.2. Cebada malteada

Después del agua este es el segundo ingrediente más importante en la cerveza. Existen dos tipos de cebada de 2 hileras (2H) y de 6 hileras (6H), lo que refiere a la morfología de la espiga, véase figura 2.

Cebada de 2 hileras (*Hordeum distichum*); esta espiga tiene dos hileras paralelas de granos maduros. Este tipo de cebada da granos más grandes y más uniformes y contiene más almidón, su contenido enzimático y proteico es menor

Cebada de 6 hileras (*Hordeum vulgare*); esta espiga tienen seis hileras de granos maduros, con este tipo de cebada se obtiene rendimientos altos por su alto contenido en proteínas que va de 11.5-12.5%, tiene menor contenido en almidón y tienen la ventaja de que suelen ir acompañadas de complementos enzimáticos altos y presenta mayor cantidad de cascarilla (Galindo, 2004; Reyes, 2010).

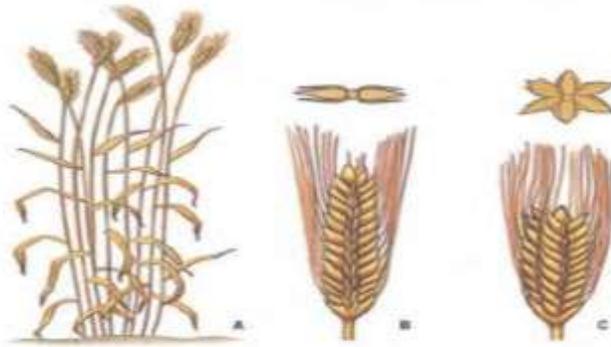


Figura 2. A) Planta de cebada, b) Distribución de granos de cebada de dos hileras, c) Distribución de granos de cebada de 6 hileras.

Fuente: Archundia (2014).

La cebada es sometida a un proceso de malteado, por lo cual los granos de cereal son sometidos a un remojo, germinación, secado y tostados en condiciones tecnológicamente adecuados. Su fabricación comienza con unos ciclos de remojo o maceración de la cebada la cual se reblandece y se hincha por absorción del agua y de oxígeno del aire. De vez en cuando conviene dejar que tome contacto con el aire para permitir la respiración al germen del grano. Durante el primer remojo, se suele añadir algo de cal para desinfectar y limpiar la cebada. Cuando el grano se encuentra debidamente ablandado se puede doblar entre los dedos y la piel se suelta.

Durante este proceso de malteado o germinación se desarrollan la plúmula y la radícula, con tanta más fuerza cuanto mayor haya sido el período de remojo (8 a 10 días) y el tipo de cebada. La cebada que no ha hinchado pasa a germinar a la maltería (Parker, 2012)

La materia prima fundamental para la fermentación de la cerveza es la malta, proporciona sustratos y enzimas apropiados para obtener un extracto soluble o mosto. La malta debe proporcionar este extracto fácilmente y de forma barata; también debe proporcionar cascarilla, que forma un eficaz lecho filtrante para la clarificación del mosto.

1.1.6.3. Levadura

Las levaduras desempeñan un papel central en la obtención de bebidas fermentadas, como el vino y cerveza. Se trata de hongos superiores unicelulares que se multiplican formados yemas. De acuerdo con su desarrollo sexual, es decir con el modo de formación de esporas, pueden clasificarse en *Ascomycetos* y *Basidiomicetos*. En los

organismos *Ascomycetos* el cigoto, se desarrolla dentro de una estructura en forma de saco, el asca, mientras el núcleo sufre dos divisiones meióticas, con frecuencia seguidas de una o más divisiones mitóticas. En torno a cada núcleo hijo y citoplasma circundante se forma una pared originando cuatro ascosporas dentro del asca. Después ésta se rompe y se libera las ascosporas allí encerradas, que pueden germinar y producir nuevas células vegetativas. Dentro de este grupo se encuentran muchas levaduras, como *Saccharomyces* y hongos como, *Aspergillus* y *Penicillium* (véase figura 3). Los *Basidiomicetos* poseen micelios divididos por paredes transversales, pero sus basidiosporas se forman en cuatro ecrescencias de una célula característica, denominada basilio. A este grupo pertenecen las levaduras del género *Sporobolomyces* que poseen esporas externas, poco corrientes denominadas balistosporas (Carrascosa *et al.*, 2005; Carvajal e Insuasti, 2010).

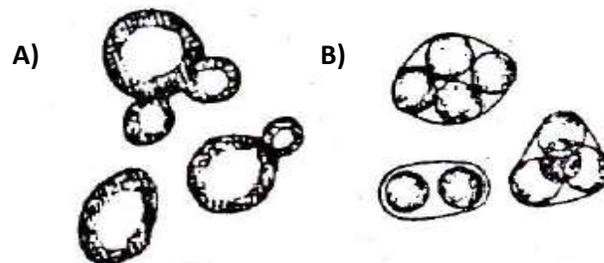


Figura 3. Esquema de *Saccharomyces cerevisiae* (gemación multilateral) A). Ascas y ascosporas de *Saccharomyces sp B*).

Fuente: Suárez e Iñigo (2004)

La levadura más utilizada a nivel industria en cerveza es la *Saccharomyces cerevisiae*, se encuentra dentro de la familia *Saccharomycetaceae* y se distingue de las restantes por su características morfológicas y fisiológicas. Se produce vegetativamente por gemación, bajo determinadas condiciones (Ojeda, 2012). Cada célula plenamente desarrollada tiene entre 8-14 μm de diámetro, está rodeada por una pared constituida de β -glucanos y manoproteínas (α -mananos), es metabólicamente activa, conteniendo enzimas que son capaces de permitir la transferencia macromolecular al interior de la célula. En cuanto su estructura esta se compone de tres paredes bien definidas: pared externa, se compone de manoproteínas; pared interna, compuesta por glucano fibrosos asociados a la quitina y es de carácter rígido; y por último, el espacio periplásmico situado entre la pared y la membrana plasmática donde se localizan las enzimas necesarias para la célula, destacando entre las más importantes para el crecimiento y también algunas β -glucanasas (Ibañez, 2013).

La constitución de la pared celular es importante debido a que se conoce que las

levaduras llamadas de fermentación alta esta cubiertas por pequeñas protuberancias morfológicas (manoproteínas) que les confiere una aspereza permitiendo que las células asciendan a la superficie durante la fermentación; además, la pared celular posee una carga negativa y tiene hidrofobicidad. La carga negativa se atribuye a las cadenas de fosfatos localizadas en la pared externa de manoproteínas (Ibañez, 2013). En la figura 4 se puede visualizar la estructura celular de la levadura.

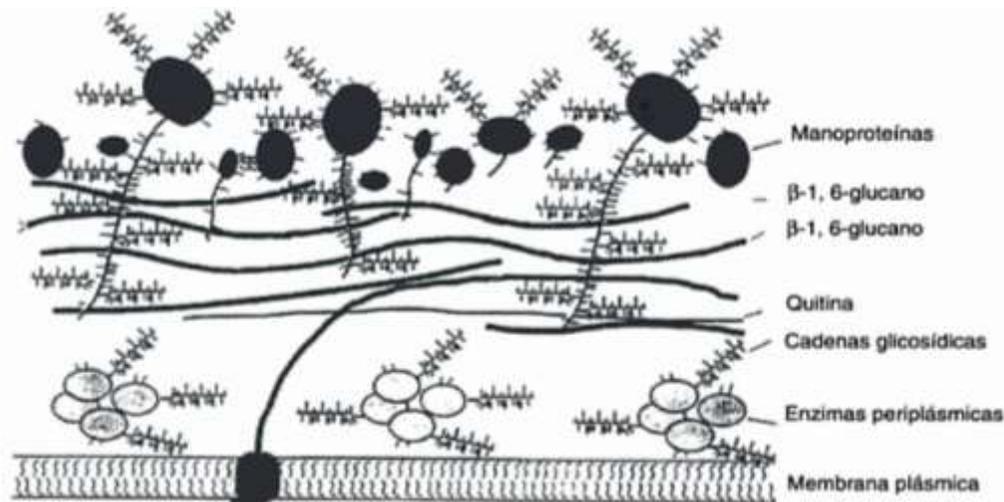


Figura 4. Estructura celular de *Saccharomyces spp.*

Fuente: Ibañez (2013).

La levadura metaboliza durante la fermentación casi todos los carbohidratos (hexosas, disacáridos y trisacáridos) para convertirlos así en etanol y dióxido de carbono. Es por ello que lo que se busca de una levadura para los cerveceros, está relacionado con el bouquet y aroma de la cerveza, de un modo adecuado para poder establecer una especificación por elemental que sea (Bamforth, 2006; López. 2016).

De acuerdo con Heredia (2015), durante el proceso de fermentación las levaduras producen en pequeñas concentraciones sustancias que contribuyen al sabor de las bebidas alcohólicas. Por lo que el sabor de la cerveza es consecuencia de una mezcla muy compleja de gran cantidad de compuestos, de los cuales se encuentran en diferentes proporciones agrupados en: alcoholes, ésteres etílicos, terpenos, carbonilo y compuestos azufrados. En general a éstos compuestos se le denominan compuestos congenéricos (Ojeda, 2012).

El origen de los congenéricos se encuentra principalmente en la cepa de levadura y otros microorganismos presentes durante la fermentación. También la materia prima

contribuye en la aportación de congenéricos algunos de los cuales permanecen inalterados durante la fermentación. En general los factores que afectan la formación de congenéricos son: la cepa de levadura, la temperatura de fermentación, el tipo y concentración de azúcares fermentables (García, 2004).

Los compuestos congenéricos son esenciales en el aroma y sabor de la cerveza dependiendo de su concentración pueden otorgarle características organolépticas desde muy agradables hasta desagradables (Heredia, 2015).

1.1.6.3.1. Metabolismo de las levaduras y precursores de los compuestos congenéricos.

Los principales compuestos congenéricos se forman durante la fermentación, ya que son compuestos producto de transformaciones bioquímicas de los compuestos de la materia prima, mediados por el metabolismo de la levadura a ciertas condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la fermentación. Existen evidencias que demuestran que los carbohidratos influyen en la formación de ciertos congenéricos como son los alcoholes superiores y ésteres (Estela *et al.*, 2014).

Tanto el aroma como el sabor son dos de las características organolépticas más importantes que definen la calidad de una cerveza. El aroma viene determinado por compuestos de naturaleza volátil, como son; alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas e hidrocarburos. Por el contrario, en el sabor influyen compuestos no volátiles tales como: azúcares, ácidos orgánicos, sustancias minerales, entre otros (Casas *et al.*, 2015). En general los compuestos volátiles pueden ser percibidos a concentraciones mucho más bajas ya que sus umbrales de percepción varían entre 0.07-14000 g/L

Al igual que en otras bebidas alcohólicas, el aroma de una cerveza está determinado por varios cientos compuestos volátiles de diversa naturaleza química. Hasta la fecha, se ha identificado más de 1000 compuestos volátiles, que manifiesta su gran complejidad, lo que contribuye a las características de otras bebidas alcohólicas.

La concentración de estos compuestos en el producto final depende de los factores asociados al tipo lúpulo, malta, así como de las numerosas variables del proceso de fermentación (pH, temperatura y nutrientes) y de las operaciones que involucran la elaboración de la cerveza, como la filtración y clarificación entre otros. El aroma final deriva del balance y la interacción de todos estos compuestos, ya que pequeñas variaciones en su concentración pueden marcar la diferencia entre una cerveza de otra.

El aroma fermentativo de la cerveza es el que se atribuye a los compuestos generados,

durante la fermentación alcohólica, los cuales son liberados y/o transformados bioquímicamente de los compuestos de la materia prima, mediados por el metabolismo de las levadura *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces uvarum* a ciertas condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la fermentación (García, 2009), aportándole a la cerveza un perfil aromático más complejo que el mosto amargo (mosto lúpulado) del que procede. Durante la fermentación alcohólica las levaduras no solo convierten los azúcares en etanol y dióxido de carbono, sino que también producen una serie de metabolitos volátiles detallados en la figura 4 y 5, que determinan el carácter aromático propio de una cerveza. El perfil aromático de este tipo de producto tan complejo no es atribuible a un solo compuesto de impacto, sino que es el resultado de la combinación e interacciones entre los distintos compuestos aromáticos (véase tablas 6 a 9). A pesar de ello, su aroma genérico de fondo se atribuye mayoritariamente a alcoholes y ésteres, que le otorgan su calidad e intensidad aromática (Viana, 2011).

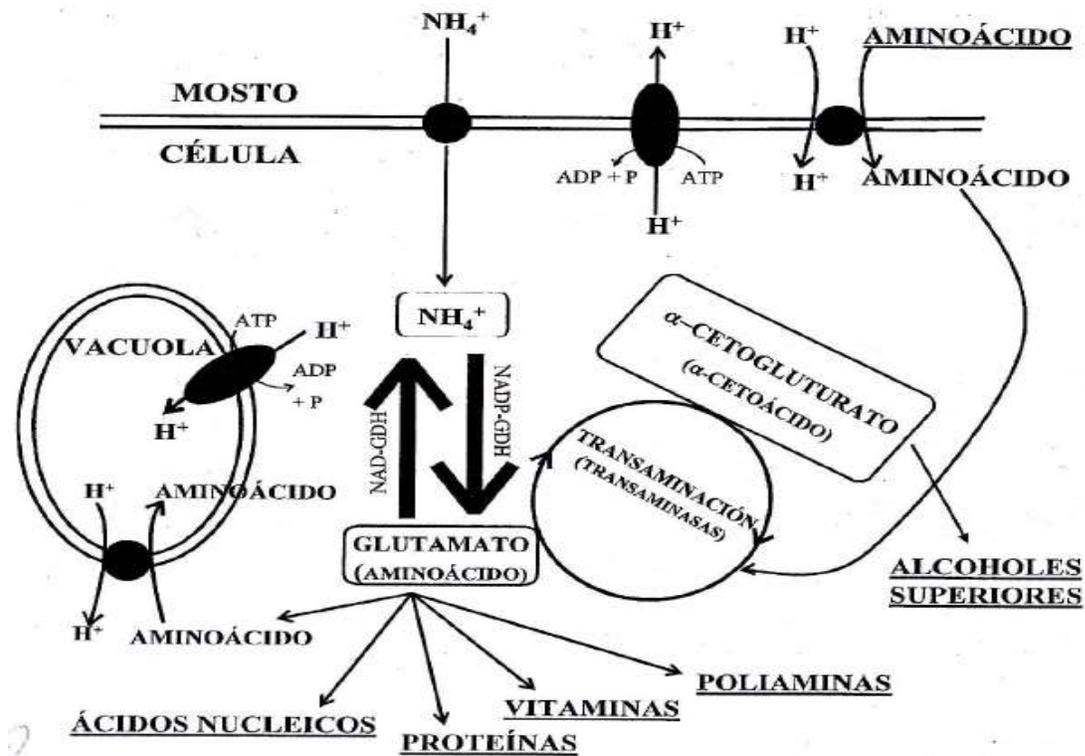


Figura 5. Esquema de la captación y metabolismo de los compuestos nitrogenados.

Fuente: Carrascosa et al. (2005).

➤ **Ésteres**

Los ésteres forman parte de los componentes más numerosos de la cerveza. De estos componentes, lo más importantes para los cerveceros son al acetato de etilo y el llamado acetato de isoamilo que es de hecho una mezcla de los acetatos de 2 y 3-metilbutilo. Estos compuestos son producidos intercelularmente como resultado de la condensación de la Coenzima A (Co A) de ácidos grasos con un alcohol, posteriormente estos difunden de la célula al caldo de fermentación. La reacción es catalizada por la enzima alcohol aciltransferasa (AAT) (Ibañez, 2013).

La acetil CoA es el centro de muchos aspectos metabólicos de la levadura y junto con otros ésteres de CoA de ácidos grasos, es un intermediario clave en la biosíntesis de lípidos. Así algunos factores que gobiernan la producción y consumo de lípidos tienen un efecto en la síntesis de ésteres (Ojeda, 2012).

Cierto número de factores influyen sobre los niveles de estos compuestos, composición del mosto, gravedad específica del mosto, la cantidad de oxígeno a la que se expone la levadura y niveles de ácidos grasos insaturados (Baxter y Hughes, 2004).

Diferentes temperaturas de fermentación genera diferencias importantes en el perfil de sabor, influenciado por la formación de acetato de etilo y 2- fenil-etil acetato a temperaturas altas. El aumento de alcoholes superiores contribuye a la formación de acetato de isoamilo debida a la alta concentración de alcohol isoamílico (Ibañez, 2013). No obstante el principal factor que afecta la cantidad de ésteres producidos, es la propia cepa de levadura, pues algunas cepas generan estrés más fácilmente que otras (Baxter y Hughes, 2004).

En la tabla 6 se muestran algunos ésteres presentes en cerveza.

Tabla 6. Ésteres con significativa actividad flavolizante presente en cerveza.

Compuesto	Niveles típicos (mg/L)	Umbral de flavor (mg/L)	Descriptor del flavor
Acetato de etilo	10.0-60.0	30	A disolvente, dulce
Acetato de isoamilo	0.5-5.0	1	Banana, ester. Disolvente
Hexanoato de etilo	0.1-05	0.2	Manzana, frutal, dulce
Octanoato de etilo	0.1-1.5	0.5	Manzana, frutal tropical , dulce
Acetato 2-feniletilo	0.05-2	3	Rosas, miel, manzana
Nicotinamato de etilo	1-1.5	2	Cereal, perfume

Fuente: Baxter y Hughes (2004).

➤ **Carbonilos (Aldehídos y cetonas)**

Entre los compuestos carbonilos más importantes se encuentran los aldehídos y cetonas. Ambos grupos se encuentran en la cerveza a bajas concentraciones, pero solamente los aldehídos son producidos en cierta cantidad durante la fermentación (Ibañez, 2013).

Aldehídos: El aldehído más importante en la cerveza es el acetaldehído ya que se encuentra en más alta concentración, lo que es de esperar puesto que el etanol se forma durante la fermentación por la reducción de este compuesto. La formación de todos los aldehídos sigue el mismo principio, siendo sintetizado cada uno de ellos por descarboxilación enzimática del α -cetoácido correspondiente. Por consiguiente, el acetaldehído se origina por descarboxilación del ácido pirúvico (piruvato) por la piruvato descarboxilasa (Kobayashi *et al.*, 2008).

Cada una de las conversiones de los α -cetoácidos a aldehídos requiere una enzima descarboxilasa específica, aunque la reducción de los aldehídos a sus respectivos alcoholes (un proceso que oxida al NADH a NAD⁺) emplea una única alcohol deshidrogenasa no específica. Una pequeña cantidad de aldehídos surgen a partir de la subsiguiente oxidación del alcohol durante la fermentación secundaria y maduración (Viana, 2011).

Dicetonas vecinales; Son sustancias fuertemente aromáticas, las principales dicetonas vecinales (DCV) es la 2,3-butandiona (diacetilo), pero existen cantidades significativas de 2,3-pentanodiona producida durante la fermentación (tabla 8). Estos compuestos se forman por descarboxilación oxidativa de acetohidroxiácidos que son excretadas por la levadura. Son producto del metabolismo de los aminoácidos (Ojeda, 2012; Ibañez, 2013).

Estas sustancias se derivan del piruvato y su homólogo α -oxobutirato (figura 6). Se cree que el precursor de α -acetolactato, intermediario de la biosíntesis de valina y leucina, se fuga, de la levadura y se degrada espontáneamente por DCVs. Sin embargo, las levaduras captan DCVs del medio que las rodea si la levadura permanece en contacto con la cerveza y está sana. El diacetilo se reduce secuencialmente primero acetoína y después a btano-2,3-diol; la pentano-2,3-diona sufre una reacción de reducción análoga. Tanto la acetoína como el btano-2,3-diona tienen una actividad flavorizante mucho menor que sus precursores DCVs (Baxter y Hughes, 2004).

Tabla 7. Dicetonas vecinales y sus componentes reducidos hallados en cerveza.

Compuesto	Niveles típicos (mg/L)	Umbral de flavor (mg/L)	Descriptor del flavor
2,3-butanodiona	0.01-0.4	0.07-0.15	Galleta de mantequilla
3-Hidroxy-2-butanona	1.0-10	17	Frutal, mohoso, a madera
2,3-butanodiol	50-150	4500	Goma, dulce, cálido
2,3-Pentanodiona	0.01-0.15	0.9	Galleta de mantequilla, frutal
3-Hidroxy-2-pentanona	0.05-0.07	-----	-----

Fuente: Baxter y Hughes (2004).

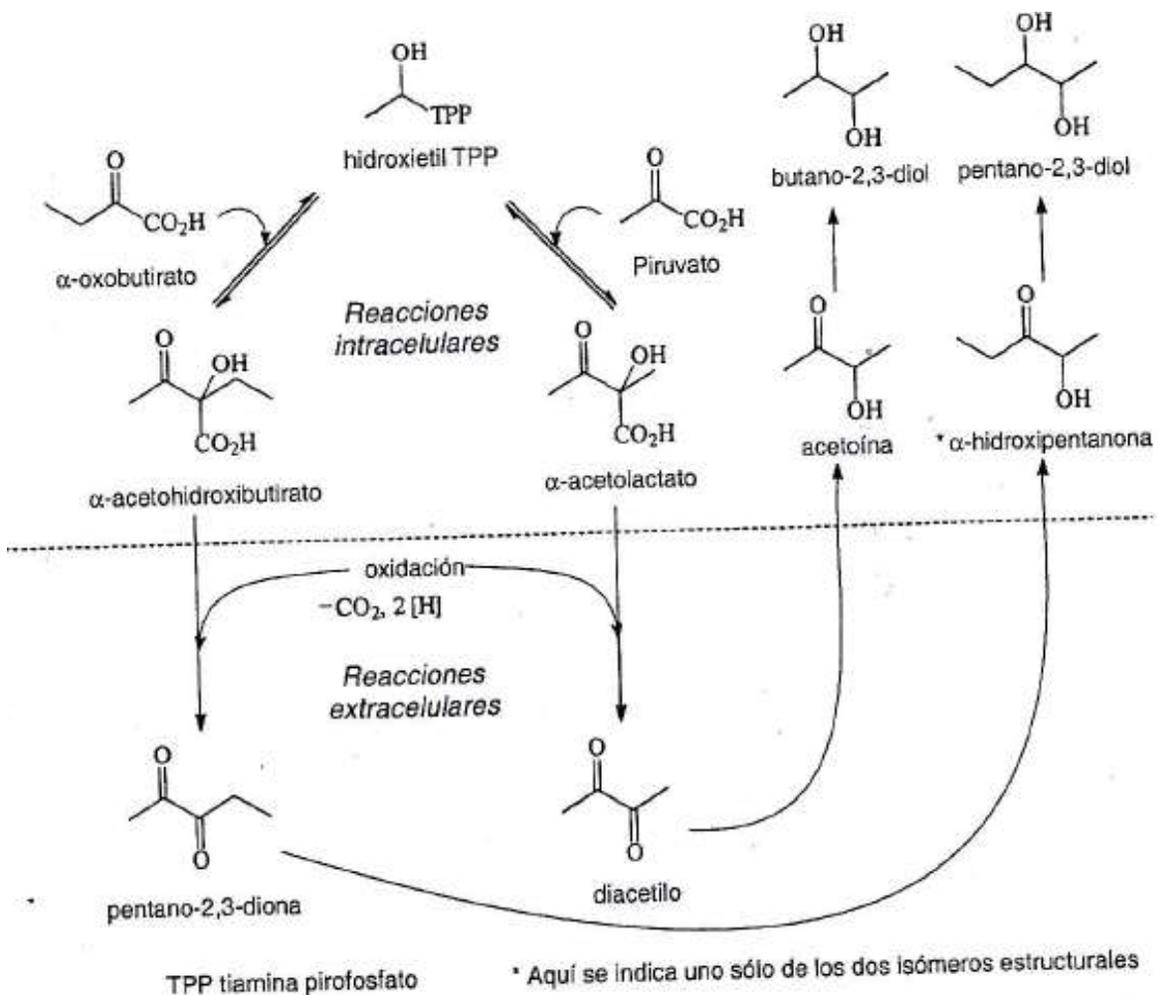


Figura 6. Rutas para la formación y subsiguiente degradación de dicetonas vecinales en cerveza.

Fuente: Baxter y Hughes (2004)

➤ **Alcoholes superiores**

También conocidos como aceite de fusel. Estos hacen referencia a todos aquellos alcoholes que poseen más de dos átomos de carbono, un peso molecular y punto de ebullición superior al etanol (Viana, 2011). Los precursores de los alcoholes son los aminoácidos (ver figura 5), que para su formación, ocurre primero la desaminación que da origen a un α -cetoácido que posteriormente es descarboxilado y convertido en n n-aldehído que a través de una reducción produce al alcohol. La desaminación corresponde para la formación de alcoholes, se lleva a cabo mediante una enzima específica (lecindesaminasa, isoleucindesaminasa, valindesaminasa) (Ojeda, 2012).

Los alcoholes superiores son muy importantes como precursores inmediatos de ésteres más activos, de tal manera que el control de la formación de alcoholes superiores debe ser reglado para que a su vez controle la producción de ésteres. Basta decir que la producción de alcoholes superiores aumenta tanto a niveles excesivamente altos como a suficientemente bajos de nitrógeno asimilable de que dispone la levadura del mosto. El tipo de cepa de levadura es el factor más importante, siendo cepas *A/e* las que producen más alcoholes superiores que las Lager (Baxter y Hughes, 2004).

En la figura 7 y tabla 8 se muestra un esquema generalizado de la producción de alcoholes superiores y los alcoholes comúnmente hallados en cerveza.

Tabla 8. Alcoholes comúnmente hallados en cerveza.

Compuesto	Niveles típicos (mg/L)	Umbral de flavor (mg/L)	Descriptor del flavor
Metanol	0.5-3	10000	alcohólico, disolvente
Etanol	20000-80000	14000	Alcohólico, fuerte
1-Propanol	3.0-16.0	700	Alcohólico
2-Propanol	3.0-6.0	1500	Alcohólico
2-Metilbutanol	8.0-30.0	65	alcohólico, vinoso, banana
3-Metilbutanol	30-70	70	alcohólico, vinoso, banana
2-Feniletanol	8.0-35.0	125	Rosas, amargo, perfumado
1-Octen-3-ol	0.03	0.2	Hierba recién cortada, perfume
2-Decenol	0.005	0.015	Coco, anisado
Glicerol	1200-2000		Dulzón, viscoso
Tirosol	3-40.0	200	Amargo, sustancia química

Fuente: Baxter y Hughes (2004)

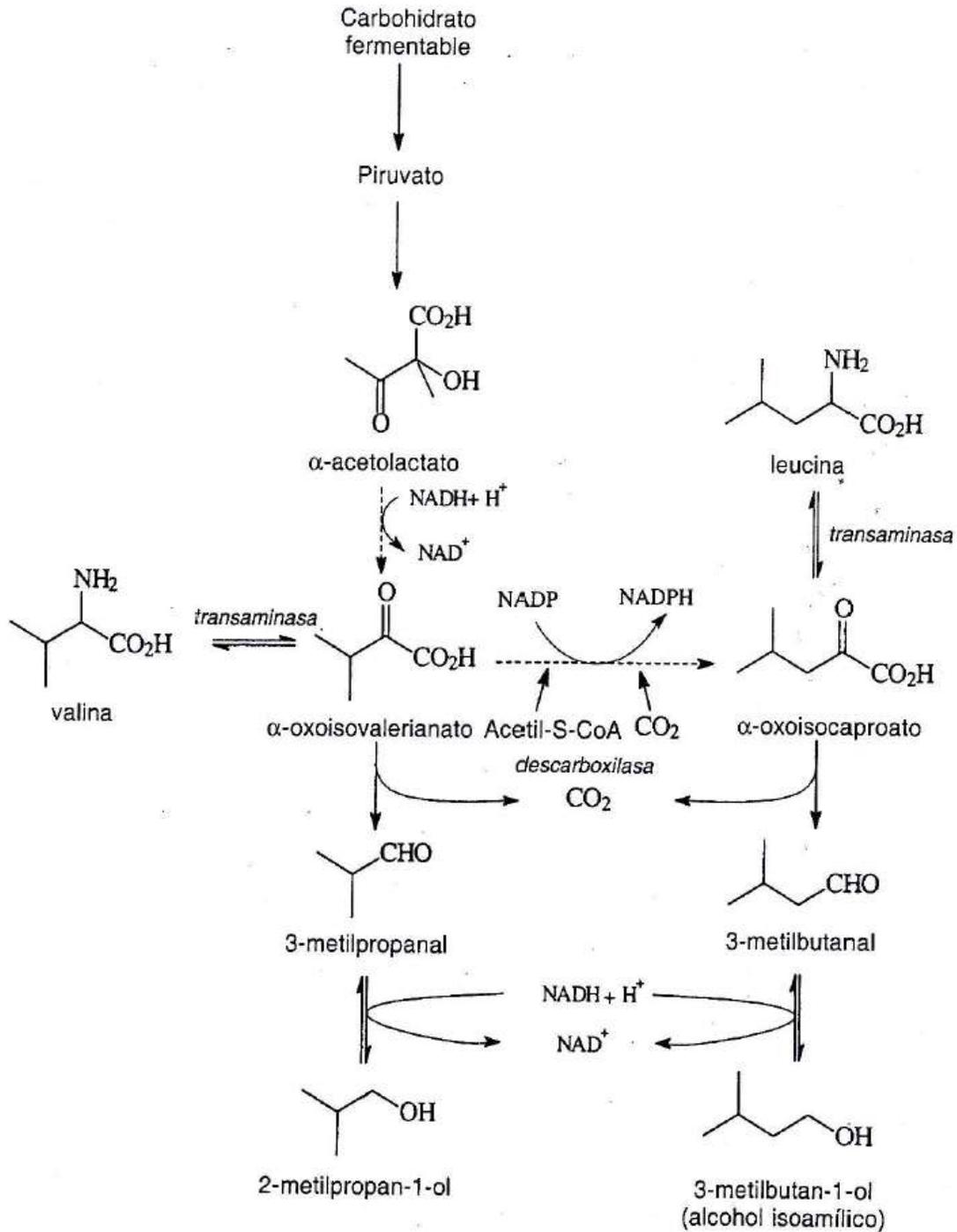


Figura 7. Formación de 2-metilpropan-1-ol y 3-metilbutan-1-ol a partir del metabolismo de los carbohidratos y la biosíntesis de valina y leucina.

Fuente: Baxter y Hughes (2004).

➤ **Ácidos Orgánicos**

Durante la fermentación se producen una amplia variedad de ácidos orgánicos, existiendo dos grupos principales: a) ácidos orgánicos volátiles, donde se encuentra principalmente el ácido acético, propiónico y butírico. El primero se produce por la hidrólisis de la Acetil Ca A. b) Ácidos orgánicos no volátiles, que incluye oxoácidos como ácido pirúvico y productos del ciclo de Krebs, tales como ácidos succínico y que están estrechamente relacionados con la composición de los aminoácidos del mosto (Hornsey,2003).

Tabla 9. Ácidos orgánicos presentes en cerveza.

Ácido	Umbral del flavor (mg/L)-	Descriptorios de flavor-
Acético	175	ácido, vinagre
Propanoico	150	Acido, vinagre, leche
Butanoico	2.2	Mantequilla, Queso, sudor
2-Metilpropanoico	30	Sudor, amargo, agrio
Pentanoico	8	Sudor, olor corporal
2-Metilbutanoico	2	Queso, lúpulo viejo, sudor
3-Metilbutanoico	1.5	-----
Octanoico	15	Caprónico, caprino
Láctico	400	Ácido
Pirúvico	300	Acido, sal, forraje
Succínico	-----	-----

Fuente: Baxter y Hughes (2004) y Hughes (2003)

1.1.6.4. Lúpulo

El lúpulo empleado en cervecería, *Humulus lupulus* se sitúa botánicamente en la familia de las Cannabinaceas, pero a pesar con su parentesco con el *Cannabis*, el lúpulo no tiene sustancias alucinógenas. Está relacionada con las ortigas irritantes, olmos, arrayán de ciénaga y cáñaga, siendo el último el parentesco más próximo (Ibañez, 2013).

El lúpulo es una planta perenne trepadora capaz de alcanzar una altura de 6 m. Los tallos ascienden trepando, enrollándose en sentido contrario al de las agujas del reloj. La especie es dioica (las flores femeninas se desarrollan en plantas distintas de las que se producen las flores masculinas) siendo el tamaño de la inflorescencia, la diferencia

morfológica más evidente entre la planta macho y hembra (López, 2016). La cabeza de flor macho está muy ramificada y tiene unos 5 mm de diámetro, mientras que las flores hembras están arracimadas (frecuentemente llamados “conos”) y tienen el orden de 15-10 mm de diámetro. Como fruto el cono hembra alcanza 5 cm de diámetro. El periodo de florecimiento es durante julio y agosto, siendo la planta un seto nativo y matorral, extendido atreves de Europa y Asia occidental.

Sin embargo para satisfacer las necesidades de la industria cervecera, ahora el lúpulo se cultiva en todas las regiones templadas del mundo y a ello se debe, que las especies dentro del conjunto, muestren considerables variaciones (Hornsey, 2003).

Los lúpulos tienen una serie de propiedades: proporcionan el amargor que compensa el dulzor de la malta, propiedades antibacterianas conservando la cerveza, contribuyen a la formación y retención de la espuma, los polifenoles que contienen reaccionan con las proteínas indeseadas de la malta y las hacen insolubles lo que permite su filtrado o sedimentación. Según las clases de lúpulo y el momento del proceso en que se añaden, pueden contribuir en el sabor y aroma de forma muy variada y tienen propiedades benéficas para la salud (Suárez, 2013).

De los componentes del lúpulo, los más interesantes para la cerveza son las resinas, aceites esenciales y los taninos o polifenoles, que están contenidos en la lupulina, un polvo aceitoso y resinoso que hay dentro del cono. Proporciona los taninos pirogalol y catecol, resinas y aceites esenciales y otros constituyentes con el objeto de precipitar las proteínas inestables durante la ebullición del mosto y originar el agradable y característico sabor amargo (α -ácidos) de la cerveza y contribuye, entre otras propiedades, a la estabilidad del sabor y a la retención de la espuma (Baxter y Hughes, 2004).

Los aceites esenciales de los conos del lúpulo son una mezcla compleja de varios cientos de componentes, entre los cuales se encuentran hidrocarburos terpenoides, aldehídos, cetonas, ácidos y alcoholes. Estos influyen tanto en el sabor como aroma de la cerveza. Algunos de los componentes del lúpulo más importantes, son los alfa ácidos, debido a que durante la ebullición del mosto se isomerizan y de esta forma imparten el peculiar amargor en la cerveza (Ibáñez, 2013). De igual manera estos influyen tanto en el sabor como en el aroma de la cerveza, aunque la mayor parte del aceite añadido a la cerveza durante la cocción se pierde por destilación. Si el aceite mejora o empeora la calidad de la cerveza, depende de la proporción entre sus numerosos componentes. Los aceites esenciales se oxidan y se hacen menos atractivos durante su almacenamiento, además aceleran la oxidación de resinas.

En la tabla 10 se muestran alguno de los compuestos derivados del aceite esencial del lúpulo.

Tabla 10. Algunos compuestos derivados del aceite esencial de lúpulo hallados en cerveza.

COMPUESTO	INTERVALO DE LOS NIVELES HALLADOS (µg/L)*	UMBRAL DE FLAVOR EN LA CERVEZA (µg/L)
Linalool	1-470	27.8
Oxidos de linalool	nd-49	-
Citronelol	1.0-90	-
Geraniol	1.0-90	36
acetato de geranilo	35	-
α-Terpineol	1.0-75	200
Humeleno epóxido I	nd-125	10 [#]
Humeleno epóxido li	1.9-270	450
α-Eudesmol	1-100	-
T-Cadinol	nd-200	-
Hmulenol	1.0-1.5	500-2500
Humuladienona	nd-43	-
Humulol	nd-220	-
Clovanodiol	51-677	-

*nd= no detectable. #= umbral determinado en agua.

Fuente: Baxter y Hughes (2004)

1.1.7. Proceso de elaboración

El proceso de elaboración de la cerveza convierte el almidón de la malta primero en azúcares solubles y luego utiliza levadura para fermentar estos, dando lugar a alcohol. Al mismo tiempo las proteínas se rompen dando lugar a aminoácidos que pueden ser utilizados por las levaduras como nutrientes, produciendo a su vez compuestos característicos del flavor (Baxter y Hughes, 2004).

1.1.7.1. Proceso de elaboración de cerveza tipo Ale

En la figura 8 se muestra el diagrama de elaboración de cerveza artesanal.

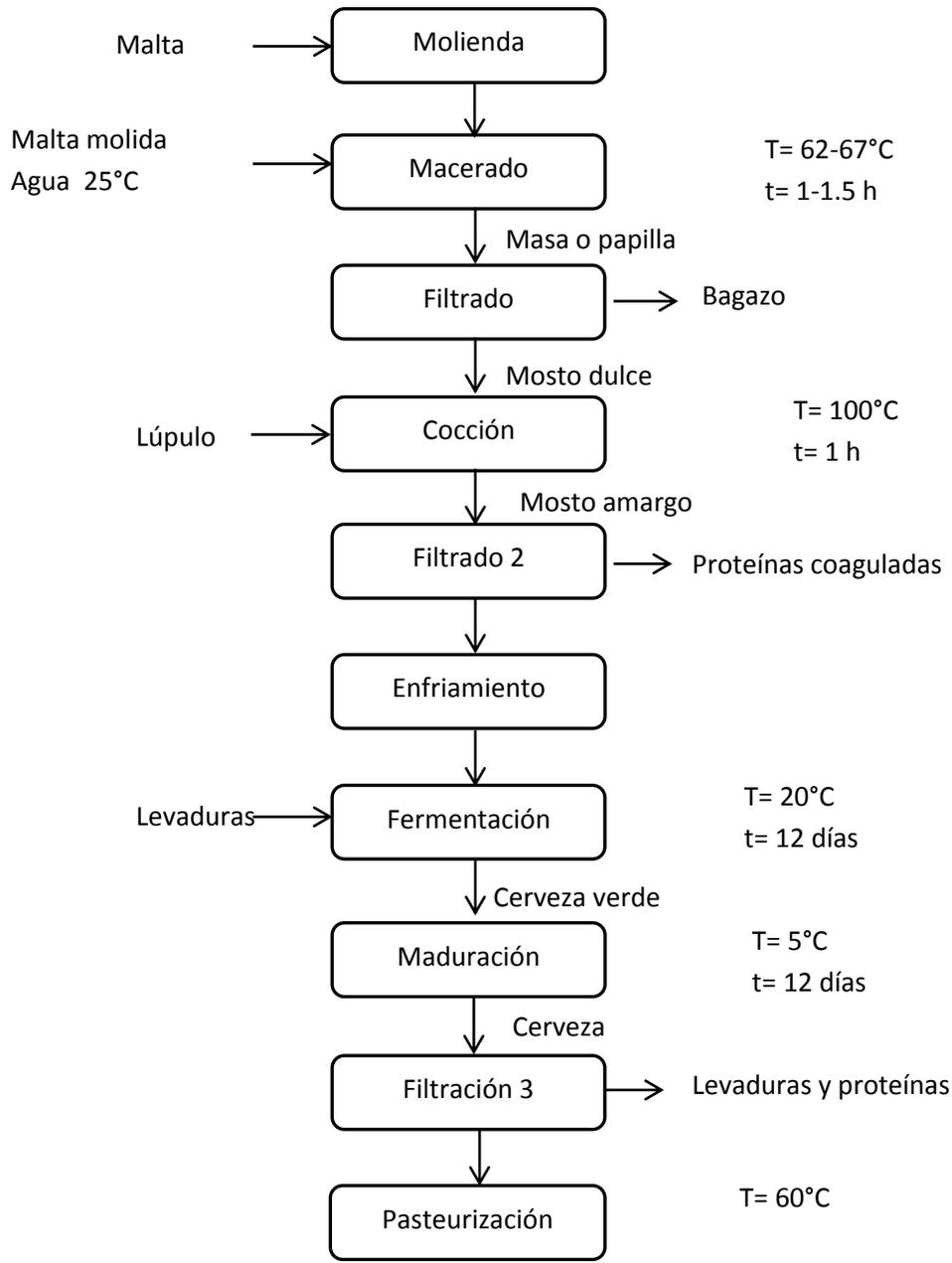


Figura 8. Diagrama de proceso de elaboración de cerveza tipo Ale.

Molienda

La molienda tiene por objetivo triturar la malta. Es necesario que la cascarilla permanezca tan entera como sea posible y que, en cambio, el endospermo se muele

hasta un tamaño de partícula que permita la fácil liberación del extracto. Si se desintegra mucho, la cascarilla no puede formar un filtro lo suficientemente eficaz y permeable durante la maceración del mosto. En cuanto a la trituración del endospermo, es preciso que las partículas del mismo se hidraten bien y liberan fácilmente sus enzimas y otros constituyentes celulares para que puedan degradarse rápidamente (Góngora, 2014).

Maceración

Es el proceso en el que la malta molida, o sémola se mezcla con agua agitando lentamente, para producir un extracto fermentable, que permita el crecimiento de la levadura, con la consiguiente producción de cerveza (Ibañez, 2013).

La malta molida es mezclada con el agua caliente, la temperatura de esta mezcla en esta etapa es crítica siendo muy difícil modificar sin diluirla con mucha agua. La temperatura más adecuada para esta atapa es de 62-67°C y se opera de ordinario a 65°C; para lograrlo se debe utilizar agua de 4-5°C más caliente. A medida que las partículas de endospermo se van hidratando las diferentes enzimas presentes en la malta se activan degradando el almidón a azúcares fermentables y dextrinas no fermentables (Baxter y Hughes, 2004).

El almidón de los cereales consta aproximadamente de un 75% de amilopectina y un 25% de amilosa. La amilopectina es una molécula muy grande y ramificada compuesta por unidades de glucosa unidas por enlaces α 1-4 (que dan lugar a cadenas lineales) y enlaces α 1-6 (que constituyen los puntos de ramificación. Como media cada rama contiene alrededor de 25 unidades de glucosa. La amilosa por otro lado, es una molécula lineal formada por hasta 2000 unidades de glucosa unidas por enlaces α 1-4) (figura 9) (López, 2016).

Tanto la α -amilasa como la β -amilasa pueden hidrolizar los enlaces α 1-4. La β -amilasa ataca desde los extremos reductores exteriores de las moléculas de amilosa y amilopectina, liberando maltosa (compuesta por dos unidades de glucosa), pero se detiene cuando alcanza los enlaces α 1-6. Esta enzima no menos termoresistente que α -amilasa y suele ser más eficiente a pH de 4.7. Por el contrario la α -amilasa ataca la cadena lineal de enlaces α 1-4 entre los puntos de ramificación, liberando dextrinas más pequeñas y ramificadas con largas cadenas lineales laterales. Esta enzima es más termoresistente, por lo que a temperaturas altas, por ejemplo a 67°C favorece su acción, del mismo modo a un pH de 5.7 (Baxter y Hughes, 2004; Escobedo, 2010).

Las amilasa α y β actúan juntas reduciendo la amilosa a maltosa, maltotriosa y glucosa,

pero la amilopectina da lugar a un aumento de numerosas dextrinas pequeñas ramificadas que no pueden degradarse más durante la extracción. De este modo, tras la etapa de conversión (extracción) se obtiene un líquido dulce similar a un jarabe y conocido como mosto cervecero, este líquido contiene principalmente maltosa y glucosa, que son fermentables, junto con cantidades importantes de pequeñas dextrinas ramificadas que no son fermentables (Reyes, 2010).

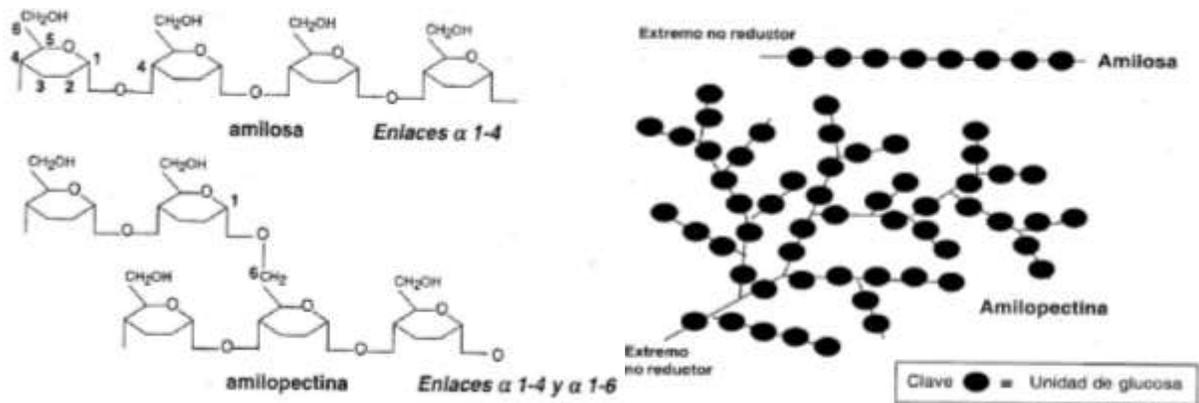


Figura 9. Estructura de la amilosa y amilopectina.

Fuente: Baxter y Hughes (2004)

Filtración o Lautering

Durante este proceso el mosto es separado del bagazo de la caldera de empastado mediante un proceso que facilita que el mosto se filtre a través del lecho del bagazo hacia un recipiente inferior. Se pulveriza agua caliente (normalmente a 70°C) sobre la superficie del lecho de los granos con el fin de extraer y lavar los componentes solubles. A este proceso se le conoce como rociado o *sparging* (Baxter y Hughes, 2004; Reyes, 2010).

1. La separación de la mezcla obtenida tras la maceración es importante por tres razones (Hornsey, 2003):
2. Conseguir la máxima extracción de azúcares fermentables posibles.
3. Obtener mostos brillantes con mínima cantidad de sólidos suspendidos.
4. Reducir el mínimo la concentración de oxígeno disuelto (O^2) en el mosto.

Cocción

Una vez filtrado, el mosto se lleva a una caldera, donde se hierve junto con el lúpulo, que le dará el amargor y aroma típico de la cerveza. Es ésta la caldera tradicional de cobre que puede verse todavía en muchas instalaciones de cerveza. Dependiendo de la cantidad y de la variedad de lúpulo que se utilice, la cerveza tendrá un mayor o menor amargor y aroma. Normalmente no se adiciona todo el lúpulo al principio, sino que se añaden distintas variedades de lúpulo en diferentes momentos de la ebullición (Reyes, 2010; Góngora, 2014).

1. Los tiempos de ebullición en la planta cervecera varían entre 45 a 120 minutos, dependiendo del equipo que se use, el método de utilización del lúpulo y el tipo de cerveza a producir. Independientemente del tiempo, la ebullición del mosto tiene los siguientes propósitos.
2. Esterilización del mosto,
3. Cese de toda actividad enzimática derivada de la malta,
4. Concentración del mosto,
5. Fin de las reacciones químicas que comienzan en la maceración, con la reducción resultante del pH,
6. Coagulación de proteínas y taninos
7. Descomposición y eliminación de compuestos volátiles indeseables,
8. Aportar el sabor amargo al mosto, debido a la isomerización de las resinas del lúpulo
9. Intensificación del color del mosto.
10. Extracción de aceites esenciales y polifenoles del lúpulo

Filtración 2 (Clarificación) y Enfriamiento

Tras la cocción de las proteínas coaguladas o turbias, junto con el lúpulo agotado, deben ser eliminados. En las cervecías modernas la mayor parte del lúpulo se utiliza en formas de gránulos o extractos, los cuales forman una menor cantidad de materia de desechos que pueda construir un filtro, por ello en su lugar se utiliza un recipiente cónico conocido como Whirlpool o tanque remolino. El mosto amargo caliente es bombeado de moda tangencial al tanque remolino. Este movimiento en remolino tiene como consecuencia que los “turbios” recojan en el centro del recipiente en forma de un montón cónico. El mosto clarificado puede retirarse a través de una tubería de salida

que se encuentra situada en un lado del recipiente. Posteriormente el mosto amargo es enfriado antes hasta la temperatura de fermentación para así depositarlos en los tanques de fermentación, haciéndolos pasar a través de un intercambiador de calor de flujo paralelo (Escobedo, 2010).

La temperatura final del mosto varía de acuerdo con el tipo de cerveza a producir. Para las cervezas *Lager*, el mosto pasan los enfriados a 10-15°C, mientras que para las cervezas *Ales* se necesitan temperaturas de 16-20°C (Hornsey, 2003).

Fermentación

La fermentación del mosto lúpulado a cerveza es afectada mediante la fermentación; la operación se realiza en tanques de fermentación provistos con equipos de refrigeración adecuados (ej. Camisa de enfriamiento). El equipo tradicionalmente es de acero inoxidable de 3.5 m de altura con base circular o cuadrada que tiene una capacidad de sellarse herméticamente. El mosto se inocula con 1.5-2.5 g de levadura comprimida/L. Durante el proceso de fermentación primaria el proceso de fermentación primaria, la levadura se multiplica por gemación por un factor de 4-5 veces. Las propiedades organolépticas y el carácter de la cerveza dependen en gran parte del tipo de levadura y de la manera en que se conduce la fermentación. Esta es considerada una de las operaciones más críticas de la cerveza (Góngora, 2014).

Maderación o Guarda

Tras la fermentación se obtiene “la cerveza verde” que aun contienen componentes del favor que no son deseables y que deben eliminarse mediante un acondicionamiento para su atenuación.

La maduración es denominada una fermentación secundaria se lleva a cabo en tanques cerrados que pueden durar de 2-6 semanas adicionales a la fermentación. Donde la concentración de oxígeno es menor de 0.2 ppm.

- El objetivo principal de este proceso es (Reyes, 2010; Archundia, 2014):
Permitir la precipitación lenta de proteínas y complejos de proteínas, taninos, así como levaduras residuales confiriéndole a la cerveza claridad. Permitir reacciones de maduración del sabor, siendo aquí donde la cerveza obtiene su bouquet y aroma, principalmente debido a una serie de procesos bioquímicos que dan origen a la obtención moderada de compuestos congenéricos.

Filtración 3

Mediante una centrífuga la levadura, proteínas y complejos de proteínas son recuperados por centrifugación continua. La cerveza muestra turbidez debido a factores biológicos y no biológicos. El primer paso de esta filtración es la remoción de levadura por centrifugación y filtración a través de lechos de celulosa, carbón activado y/o tierras diatomeas (Góngora, 2014).

Envasado

La cerveza es enfriada, filtrada y pasteurizada en flujo continuo, puede transferirse a grandes tanques estériles. Los barriles pueden ser de acero inoxidable. Las botellas usadas pueden ser de dos tipos; retornables o de un solo uso. La retornables exigen, para posteriores usos, el lavado, el aclarado y el escurrimiento antes de su relleno, se someten a un proceso de limpieza con una disolución caliente de NaOH al 1 o 2 %, para el caso de las latas, solo se requieren ser sometidas a un chorro, primero de aire estéril a presión y luego de agua esterilizada (Escobedo, 2010; Góngora, 2014).

Pasteurización

La cerveza que se envasa no es totalmente estéril, posee una pequeña cantidad de microorganismos que puede producir el deterioro del producto envasado. Para evitarlo y así alargar su vida útil, la cerveza envasada se pasteuriza. Existen grandes túneles de pasteurización que lanzan chorros de agua a diferentes temperaturas. Al pasar por el túnel la cerveza embotellada se va calentando hasta llegar a los 60°C y se enfría hasta la temperatura ambiente. La cerveza de barril no es pasteurizada y es por eso que el sabor es más fresco pero la estabilidad es menor. La cerveza de barril tiene una vida útil de un mes y la pasteurizada de hasta 6 meses (Baxter y Hughes, 2004).

1.2. Cerveza artesanal

Aquellas cervezas con sabores más complejos, aromas intensos y cargados de matices por la adición de adjuntos como; frutos, hierbas, especias y/o condimentos son

denominadas cerveza gourmet, cerveza de especialidad o cerveza artesanal (Sweet, 2014; Coriat, 2014).

1.2.1. Cerveza artesanal fermentada con Levaduras *no-Saccharomyces*

En México existe una limitada cantidad de cepas de levaduras para su aplicación en la elaboración de cerveza, siendo *Saccharomyces cerevisiae* la levadura de excelencia. Paradójicamente existe una gran biodiversidad de cepas de levaduras nativas en frutos como, lo es en las uvas vitivinícolas. Existen investigaciones dedicadas a estudiar el aporte de las levaduras nativas, en su gran mayoría *no-Saccharomyces* sobre las características organolépticas de los vinos, ya que estas producen una serie de metabolitos secundarios volátiles (ésteres apolares que se asocian al aroma frutal, floral y fresco) y ácidos grasos que aportan atributos sensoriales beneficiosos al vino. Por otra parte, las fermentaciones espontaneas se asocian con la producción de mayor cuerpo, aroma y sabores inusuales, textura cremosa una mayor complejidad.

La selección de una cepa de levaduras nativas asegura el mantenimiento de las propiedades sensoriales típicas de los vinos producidos en una región dada.

1.3. Origen de las levaduras *no-Saccharomyces*

1.3.1. Uva vinícola

El grano de uva o baya consta de hollejo, pulpa y pepitas, en proporciones muy variables según la cepa y las condiciones de clima y cultivo. Un grano de uva tiene por terminado medio el 89% de pulpa, el 7% de hollejo y el 4% de pepitas.

La *piel u hollejos* de los granos de uva maduros contienen entre un 40 y un 80% de agua, pero también muchas sustancias importantes para la vinificación, como la pruina que reviste su exterior, en la que, por su consistencia cerosa, se adhieren muchos microorganismos entre ellos las levaduras que han de producir la fermentación espontanea de los mostos (*levaduras no-Saccharomyces*). Contienen importante cantidades de celulosa, de ácido tartárico y málico y sus sales (sobre todo bitartrato de potasio), de compuestos nitrogenados y de sales minerales como fosfatos, sulfatos, carbonatos, etc. Siendo especialmente rica en potasio. Los compuestos más importantes en hollejos son los responsables del color; los flavonoides del color amarillo y las antocianos del color rojo. Los primeros son propios de las uvas blancas y ambos están en

las uvas tintas. También se encuentran el hollejo cierta cantidad de taninos (0.2-1% en la piel de uvas blancas y 1-3% de las uvas tintas) y la mayoría de los terpenoles y de los precursores aromáticos de las uvas.

El componente mayoritario del grano de uva es la *pulpa*. La pulpa está casi por completo formada por el mosto, y entre sus componentes se encuentran la práctica total de los azúcares, polisacáridos, ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados, vitaminas y un importante porcentaje de terpenoles libres, como el linalol y de ácidos grasos precursores de aromas. La pulpa contiene compuestos fenólicos no flavonoides, pero no contienen compuestos flavonoides como taninos o antocianos, que existen en los mostos y vinos procedentes de raspón, hollejos y pepitas.

Las *pepitas* están formadas por 2 capas envolventes, a modo de corteza, la testa y el tegumen, que son muy duras y leñosas y ricas en taninos. En el interior de esta cepas está el albumen, que contienen hacia el pico de la semilla el germen o embrión de la nueva planta. El albumen, del que se alimentara el embrión el empezara germinar, contienen un aceite especial que se enrancia rápidamente al contacto con el aire y que si pasa al vivo elaborado, le comunica malos olores y sabores desagradables. En la vinificación solo se extraen de las pepitas los taninos de las capas externas, que suponen el 10-12% del peso total de la pepita (Aleixandre y Álvarez, 2003).

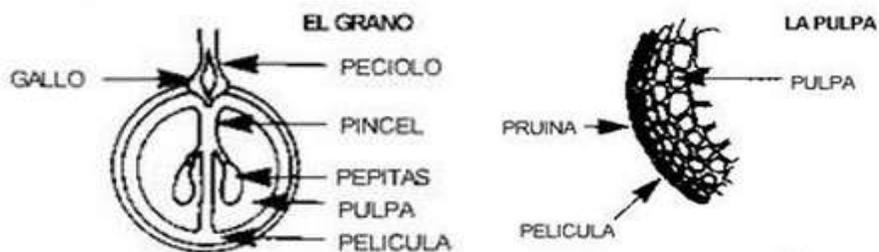


Figura 10. Partes del grano y pulpa de una uva vitivinícola.

Fuente: Aleixandre y Álvarez (2003).

1.3.2. Levaduras en las uvas.

Numerosos estudios enológicos se han realizados a lo largo de los años para conocer la dinámica, cuantificación y composición de la microflora responsable de las fermentaciones espontáneas del mosto (Carrau, 2005).

La fermentación del mosto de uva es un proceso microbiológico y bioquímico muy complejo, en el que intervienen e interaccionan levaduras, bacterias y otros microorganismos. Entre todos ellos, las levaduras son los microorganismos clave en la

vinificación, ya que son los responsables de la fermentación alcohólica, la principal reacción en la conversión del mosto en vino (Torija, 2002).

La transformación del mosto en vino se lleva a cabo de la manera tradicional, es decir sin emplear cultivos iniciadores, utilizando las cepas de levaduras procedentes de la superficie de las uvas y del ambiente de las bodegas (prensas, tanques, fermentadores, bombas, etc), dando como resultado de la acción combinada de varias especies de levaduras la fermentación de este (Carrascosa *et al*, 2005).

Las levaduras alcanzan las uvas por el efecto de desimanación del viento y de los insectos y están presentes en las viñas desde el inicio de la maduración del fruto (Carrascosa *et al.*, 2005). Las levaduras se localizan sobre todo en los estomas y lugares donde existen microfisuras, que pueden exudar hacia el exterior sustancias azucaradas, y en mucha menor cantidad sobre la queratina que cubre el resto del hollejo (Bernardi, 2013). Las especies predominantes (en un 50-75%) en la superficie de la uva corresponden al género *Kloeckera* y *Hanseniaspora*. En menor proporción es posible encontrar otras especies oxidativas o débilmente fermentativas y poco tolerantes a etanol, pertenecientes a *Metschnikowia*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Hansenula*, a este tipo de levaduras se les conoce como levaduras *no-Saccharomyces*. Existe una presencia reducida de las especies fermentativas de *Saccharomyces cerevisiae* y *S.bayanus*.

Las levaduras *no-Saccharomyces* aparecen durante los primeros días de fermentación del vino originando una fermentación espontánea, a pesar de crecer durante los primeros días de la fermentación, estas producen gran cantidad de compuestos que pueden tener influencia sobre la calidad organoléptica del vino (Carrascosa *et al.*, 2005).

Su contribución a la calidad del vino ocurre de diversas formas, como en la producción de glicerol por *Candida stellata*, o de ésteres por *C. pulcherrima*. Otras también son ampliamente reconocidas por producir enzimas glicosídicas; las cuales al hidrolizar este tipo de enlace, son capaces de liberar compuestos volátiles ligados a azúcares, dando mayor complejidad al perfil aromático del vino. Por el contrario, otras como *Kloeckera apiculada* está asociada a la producción de ácido acético, que disminuye la calidad del vino. Debido a que las levaduras *no-Saccharomyces* no son eficientes en la conversión de azúcares ya que estas solo llegan a producir de 4 a 5° Alcohol Volumen, la aplicación de estas con fines enológicos suele llevarse a cabo en cultivos mixtos con *Saccharomyces*, para que esta última realice el proceso fermentativo y las *no-Saccharomyces* contribuyan positivamente al perfil sensorial (Ortiz *et al.*, 2015). Por otra parte, las fermentaciones espontáneas se

asocian con la producción de mayor cuerpo del vino, aroma y sabores inusuales, textura cremosa y una mayor complejidad (Ortiz, 2013).

1.4. Orujo o bagazo de uva.

El orujo de uva se define como un residuo sólido que es generado de la extracción del zumo de la uva y constituye el principal subproducto de la industria vitivinícola (Díaz, 2009).

Está constituido por una mezcla de tallos, semillas y hollejos en proporciones variables y constituye de un 10 a 20% en peso del total de la uva. En general el orujo es llevado a las destilerías donde se realiza la extracción del alcohol remanente, ácido tartárico y aceite, a partir de las semillas, originando un segundo subproducto denominado “orujo agotado” que es utilizado como enmienda orgánica en cultivos ya que actúa como mejorador de suelos (Venenzi, 2014).

En los últimos, los residuos sólidos de vinificación han atraído una atención considerable ya que este orujo o bagazo mantiene algunas de las características propias de la uva, ya que tienen un riqueza cualitativa y cuantitativa en constituyentes fenólicos y contenido de fibra dietaria, los que no fueron extraídos en su totalidad durante la vinificación quedando todavía presentes en altas concentraciones (Salinas, 2013; Zúñiga, 2005). En la tabla 11 se muestra la composición química típica del orujo de uva.

Tabla 11. Composición química del orujo de uva.

Compuesto	Hollejo %	Semillas %
Agua	78-80	25-45
Ác. Orgánicos	0.8-1.6	---
Compuestos glucídicos	---	34-36
Taninos	0.4-3	4-10.0
Antocianos	0-0.5	
Compuestos nitrogenados	1.5-2	4-6.5
Minerales	1.5-2	2-4.0
Ceras	1-2.0	----
Lípidos	----	13-20

Fuente: Zúñiga (2005).

Este bagazo, actualmente posee algunos usos alternativos como, por ejemplo, sustrato para la obtención de proteína unicelular, alimentación animal, para la extracción de

pigmentos rojos, para la extracción de taninos, ácidos o proteínas y también uso como compostaje o como biomasa para producción de biogas (Salinas, 2013).

En la tabla 12, se muestran algunos de los trabajos donde se ha llevado a cabo el estudio de las levaduras *no-Saccharomyces*.

Tabla 12. Investigaciones realizadas sobre levaduras *no Saccharomyces*.

NOMBRE DEL PROYECTO	AUTOR	RESUMEN
Aislamiento e identificación de levaduras vínicas de viñedos ecológicos	Lucio <i>et al.</i> , (2009)	Obtención de cultivos puros mediante una selección, caracterización taxonómica e identificación por PCR, para una posterior aplicación a nivel industrial.
Aislamiento, selección e identificación de levaduras enológicas nativas <i>no-Saccharomyces</i> en viñedos establecidos en Querétaro	Ortiz (2013)	Aislamiento, selección e identificación por PCR de levaduras <i>no-Saccharomyces</i> nativas.
Ecología de levaduras: selección y adaptación a fermentaciones vínicas	Torija (2002)	Selección de levaduras para uso como cultivos iniciadores durante la fermentación vínica.
Identificación de una cepa de levadura con potencial de reiniciar fermentaciones vínicas estancadas: una caracterización cinética.	Rodríguez, <i>et al.</i> (2014)	Selección de levaduras reiniciadoras en fermentación estancada, mediante caracterización cinética.
Levaduras nativas para enología de mínima intervención, selección y caracterización.	Carrau (2005)	Potencial que existe en la flora nativa presente en viñedos y métodos de selección para la obtención de cepas que aportan mayor complejidad aromática a los vinos.
Levaduras <i>no-Saccharomyces</i> para modular el aroma secundario de los vinos; incremento del acetato de 2-feniletilo mediante cultivos iniciadores mixtos.	Viana (2011)	Capacidad de las levaduras <i>no Saccharomyces</i> para producir esteroides de acetato y su inclusión en cultivos iniciadores mixtos a fin de introducir características aromáticas de diferenciación en los vinos.
Micro vinificaciones con levaduras nativas y uvas Isabella cultivadas en misiones	Miño <i>et al.</i> (2011)	Evaluación del desempeño de las levaduras indígenas para conocer los parámetros indicadores de proceso de vinificación.
Potencial enológico de levaduras <i>no Saccharomyces</i> nativas de viñedos establecidos en Querétaro.	Ortiz <i>et al.</i> (2015).	Aislamiento de levaduras de fermentaciones espontáneas de mosto de uva para obtención de cepas con potencial enológico a nivel industrial.

<p>¿<i>Saccharomyces</i> o <i>no-Saccharomyces</i>? Biodiversidad para incrementar complejidad sensorial.</p>	<p>Giorello <i>et al.</i>, (2014)</p>	<p>Búsqueda de nuevos fenotipos del sabor en la flora, mediante la integración de conocimientos sobre análisis sensorial y biodiversidad natural de cepas <i>no-Saccharomyces</i> para su aplicación enológica a nivel industrial.</p>
<p>Selección de levaduras vínicas en la denominación de origen calificada rioja</p>	<p>Gutiérrez <i>et al.</i> (1995)</p>	<p>Selección de levadura de vinificación de autóctona capaz de mantener la típica de los vinos de esta región, capaz de mantener la tipicidad de los vinos de esta región.</p>
<p>Importancia de las levaduras <i>no-Saccharomyces</i> durante la fermentación de bebidas alcohólicas</p>	<p>Casas <i>et al.</i> (2015)</p>	<p><i>No-Saccharomyces</i>, durante la fermentación producen producción de congénicos, enzimas y proteínas pueden enriquecer organoléptica y nutricionalmente las bebidas a satisfacer el paladar de los consumidores más alcohólicas, lo que ayudaría a satisfacer el paladar de los consumidores más exigentes.</p>
<p>Diversidad de levaduras <i>no-Saccharomyces</i> en diferentes ecosistemas vitivinícolas.</p>	<p>Ocón (2015)</p>	<p>Brindar los conocimientos para llevar a cabo una selección de levaduras <i>no-Saccharomyces</i> de interés para vinificación controlada.</p>

Fuente: Elaboración propia.

Objetivos



2. OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener cepas de levaduras enológicas nativas no-*Saccharomyces* mediante técnicas microbiológicas para su uso como agentes fermentativos en la elaboración de cerveza artesanal: así como su efecto en la calidad organoléptica cuantificando sus compuestos congénicos y evaluación sensorial.

Objetivo Particular 1

Caracterizar cervezas artesanales usando como agente fermentativo *Saccharomyces cerevisiae* durante su elaboración, mediante la determinación de parámetros químicos y fisicoquímicos, a fin de establecer parámetros de calidad.

Objetivo Particular 2

Realizar el aislamiento, purificación, diferenciación e identificación de levaduras enológicas nativas no-*Saccharomyces* obtenidas de orujos y hoja de uva vitivinícola, mediante criterios de selección (características de diferenciación) para su uso como agentes fermentativos en la elaboración de cerveza artesanal.

Objetivo Particular 3

Seleccionar levaduras enológicas nativas no-*Saccharomyces* obtenidas del orujos y hoja de uva vitivinícola mediante criterios de selección de levaduras enológicas (características cualitativas) y evaluación sensorial, para su uso como agentes fermentativos en la elaboración de cerveza artesanal.

Objetivo Particular 4

Determinar las características tecnológicas, los parámetros químicos y fisicoquímicos de las levaduras no-*Saccharomyces*, para su uso como agentes fermentativos en la elaboración de cerveza artesanal.

Materiales y Métodos



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Secuencia metodológica

Para poder realizar los objetivos planteados se llevó a cabo la secuencia metodológica que se muestra en la figura 11.

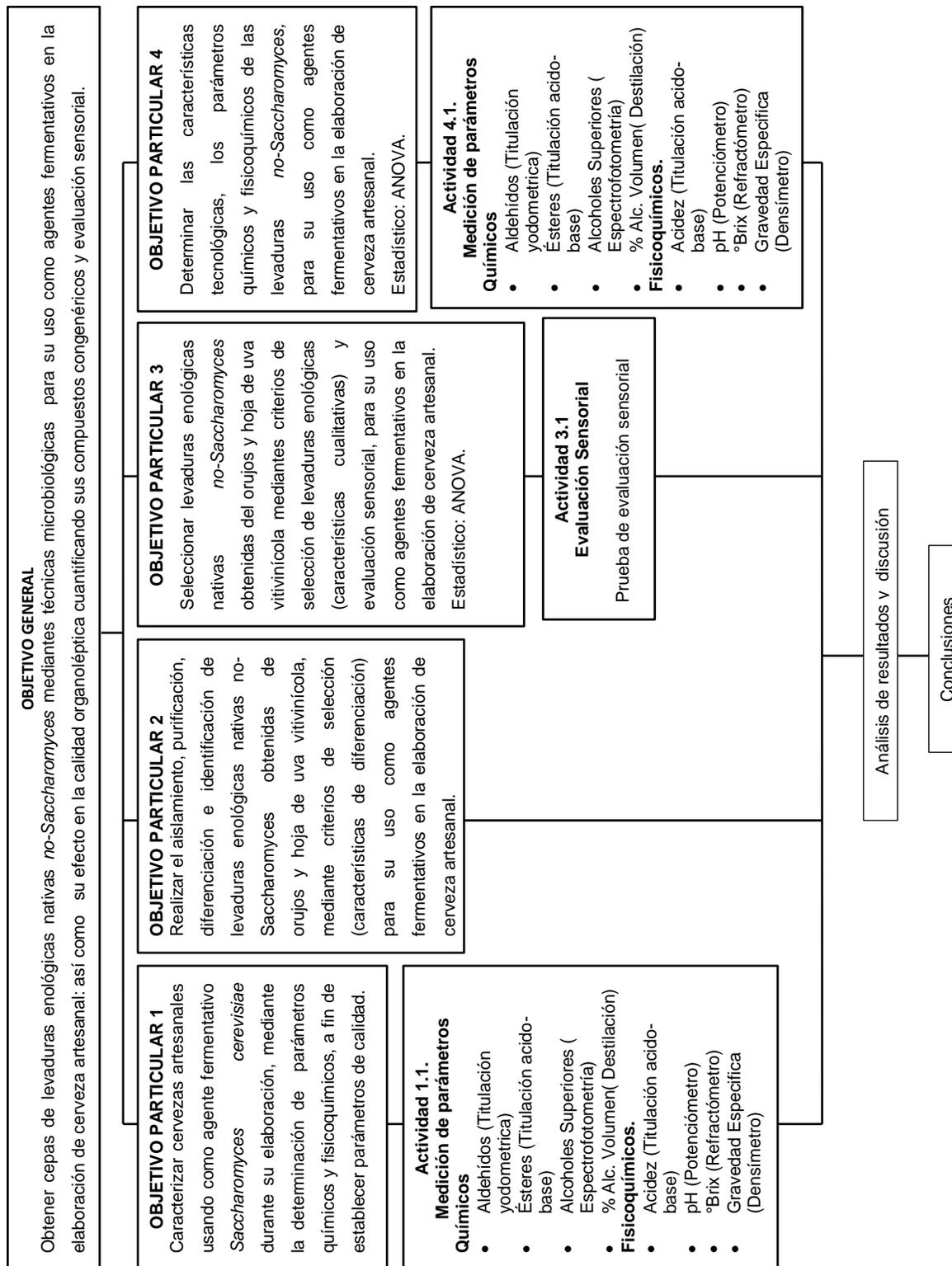


Figura 11. Cuadro metodológico.

3.2. Material de estudio

3.2.1. Material Biológico

Las levaduras *no-Saccharomyces* se obtuvieron de los residuos generados por las industrias vitivinícolas; orujo de una mezcla de uvas Sauvignon / Malbec y hoja de uva provenientes de los municipios de Tequisquiapan y Ezequiel Montes ubicados en el estado de Querétaro, México. Orujos de Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc y Tempranillo provenientes del estado de Baja California Norte.

Una vez obtenidas las muestras, fueron almacenadas en bolsas de polietileno a -20°C, posteriormente una parte se almacenó en congelación (-20°C) y a otra se le aplicó un proceso de secado a 40°C por 24 horas almacenándolo en bolsas metálicas a temperatura de 20-25°C, en un ambiente seco. Para las hojas de la vid se realizó un muestreo aleatorio de los racimos y se descartó aquellas que no contaran con las condiciones sanitarias adecuadas, almacenadas en bolsa metálicas a 20-25°C, ver tabla 13.

Como referencia se utilizó la cepa *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 13. Muestras de desecho de industrias vitivinícolas.

Muestra	Imagen	Muestra	Imagen
Hoja de Uva		Cabernet Sauvignon	
Orejo deshidratado		Cabernet Franc	
Sauvignon y Melbec		Tempranillo	

3.2.2. Caracterización de cervezas artesanales

Para la caracterización de cervezas, se analizaron 3 cervezas artesanales de alta fermentación procedente de Bélgica. Las muestras seleccionadas se escogieron con base al tipo de fermentación (*Fermentación Alta*). En la tabla 14 se muestran las cervezas utilizadas en el presente proyecto.

Tabla 14. Cervezas artesanales analizadas.

Tipo de Cerveza	Nombre	Imagen
Golden Ale	Duvel	
Lambic	Leffe	
Tripell	Delirium Nucturnum	

Fuente: Elaboración propia.

Las cervezas analizadas fueron adquiridas en distintos centros de comercialización de la zona metropolitana, y fueron conservadas a temperatura ambiente antes de ser abiertas, una vez abiertas se guardaron en frascos de vidrio ámbar y almacenaron en refrigeración a 6°C para evitar la volatilización del alcohol.

3.3. Evaluación de los parámetros químicos y Fisicoquímicos de la cerveza.

La determinación de los parámetros Químicos (Aldehídos) y Fisicoquímicos (pH, °Brix, Acidez, % Alc. Volumen, Alcoholes Superiores y Ésteres) se hizo por triplicado, cuyas técnicas analíticas se describen en el apartado 3.5.

3.4. Aislamiento, purificación, diferenciación e identificación de levaduras no-*Saccharomyces*.

Según Carrascosa *et al.* (2005), indica que para poder hacer uso del potencial de las levaduras no-*Saccharomyces* y entender su contribución sobre la calidad del vino, es necesario disponer tanto de técnicas de aislamiento y su correcta identificación, en general se emplean medios complejos nutricionalmente ricos en: fuente de energía, hidrolizado proteico y suplemento vitamínico, así como antibióticos que inhiben el crecimiento bacteriano y fúngico (Tabla 15).

Tabla 15. Nutrientes de Agares para el aislamiento de levaduras no *Saccharomyces*.

	Glucosa
Fuente de energía	Fructosa
	Sacarosa
	Peptona
Hidrolizado Proteico	Triptona
	Casitona
Suplente vitamínico	Extracto de levaduras
	Extracto de malta
Antibióticos	Oxitetraciclina
(Inhibir crecimiento bacteriano)	Crortretetraciclina
	Cloranfenicol
Inhibir crecimiento fúngico	Rosa de bengala
	Diclorano

Fuente: Carrascosa *et al.* (2005).

Para discriminar entre cepas *Saccharomyces spp.* y no-*Saccharomyces spp.* la bibliografía recomienda el uso de un medio selectivo con L-lisina como única fuente de

nitrógeno. Por este método sólo dos especies del género *Saccharomyces* (*S. kluyveri* y *S. unisporus*) son capaces de crecer pero ellas no se encuentran en entornos enológicos, el resto de las cepas del género no logran desarrollarse en un medio que contiene dicho aminoácido como única fuente de nitrógeno, las cepas no -*Saccharomyces*, en cambio colonizan en este medio sin mayores dificultades (Bernardi, 2013).

Con base en ello se realizó una adaptación de Bernardi (2013) y Ortiz (2013), formulando tres medios de cultivo con diferente fuente de nitrógeno; peptona, lisina ($C_6H_{14}N_2O_2HCl$) y amonio ($(NH_4)_3PO_4$), siendo este último medio donde se realizó un reajuste de trazas minerales en cuento a la fuente de Fósforo, para el uso de medios de cultivos selectivos, en el aislamiento de levaduras vínicas, a continuación se muestra la formulación de cada uno de ellos (Tablas 16, 17, 18 y 19).

Tabla 16. Agar Extracto de Levadura Peptona Dextrosa.

Agar-YEPD	
Compuesto	g/L
Dextrosa	20
Peptona	20
Agar bacteriológico	20
Extracto de Levadura	10
MgSO ₄	0.5
KH ₂ PO ₄	1
Ampicilina	0.1
Rosa de bengala	0.06
Total	71.66

Tabla 17. Agar Lisina.

Agar-Lisina	
Compuesto	g/L
Dextrosa	20
Lisina	0.6129
Agar bacteriológico	20
Extracto de Levadura	10
MgSO ₄	0.5
KH ₂ PO ₄	1
Ampicilina	0.1
Rosa de bengala	0.06
Total	52.2729

Tabla 18. Agar Amonio.

Agar-Amonio	
Compuesto	g/L
Dextrosa	20
(NH ₄) ₃ PO ₄	1.38
Agar bacteriológico	20
Extracto de Levadura	10
MgSO ₄	0.5
KH ₂ PO ₄	0.3
Ampicilina	0.1
Rosa de bengala	0.06
Total	51.66

Tabla 19. Agar Mosto Malta.

Agar-Mosto Malta	
Compuesto	g/L
Dextrosa	20
Agar bacteriológico	20
Extracto de Levadura	10
MgSO ₄	0.5
KH ₂ PO ₄	1
Ampicilina	0.1
Rosa de bengala	0.06
Total	51.66

*Se usó 1000 mL de mosto de cebada 2H de 10°BRIX

Para la selección de las levaduras *no-Saccharomyces* se llevó a cabo la identificación de los aislados con equipamiento básico y mediante técnicas simples. Los criterios de selección aplicados fueron descritos por Rainier y Pretorius (2000) quienes los dividen en: características de *diferenciación*; evaluando pureza del cultivo sobre un medio específico, *tecnológicos*; los que establecen la eficiencia del proceso de fermentación y *cualitativos* que ayudan a determinar la composición química y la participación en las cualidades sensoriales de los vinos, ver tabla 20 (Bernardi ,2013).

Tabla 20. Criterios de selección de levaduras enológicas según Rainier y Pretorius (2000).

Características de diferenciación	Características macro y microscópicas
Características tecnológicas	Poder de Fermentación Cinética de Fermentación Fermentación de Azúcares (Glucosa y Fructosa)
Características Cualitativas	Formación de ácidos a partir de glucosa Actividad β -glucosidasa

Fuente: Bernardi (2013) y Rainier y Pretorius (2000)

3.4.1. Aislamiento de levaduras *no-Saccharomyces*

El aislamiento se llevó a cabo mediante un sembrado en placa en medios de cultivos selectivos Agar-Extracto de Levadura Peptona Dextrosa (YEPD), Agar-Lisina, Agar-Amonio y Agar-Mosto Malta (Bernardi, 2013; Ortiz, 2013), aislando solo aquellas colonias que crecieron sobre estos medios de cultivo que presentaron características morfológicas macroscópicas típicas de levaduras (redondas, colores claros y textura cremosa) y homogeneidad, se purificaron, diferenciaron e identificaron.

3.4.2. Purificación, diferenciación e identificación de levaduras *no-Saccharomyces*

La purificación se realizó por medio de sembrado en placa mediante transferencia de placa en medio Agar Lisina, realizando resiembras consecutivas incubadas a 25 ° C por 4 días. Considerando NS (*no-Saccharomyces*) aquellas levaduras capaces de desarrollarse después de dos siembras consecutivas sobre este medio.

La diferenciación e identificación se realizó mediante la adaptación de los métodos descritos por Rainier y Pretorius (2000) puntualizado en el apartado 4.4, donde se evaluaron las características de diferenciación mediante el análisis de pureza del cultivo,

macroscópicamente; corroborando morfología típica de levadura, microscópicamente; mediante una tinción de Gram y tinción de cápsula.

Para la identificación de levaduras se evaluaron las características cualitativas; evaluando la actividad enzimática de las levaduras NS mediante microfermentaciones, considerando presencia de actividad β -glucosidasa al mostrar una diferenciación notable de liberación de compuestos aromáticos al finalizar la fermentación con respecto a *Saccharomyces cerevisiae* y cuantificación de parámetros Químicos (aldehídos, alcoholes superiores, ésteres y contenido alcohólico) y fisicoquímicos (acidez , pH , SST , gravedad específica (GE)), en mosto de cebada malteada lúpulado de 12°Brix, gravedad específica inicial de 1.054 y pH inicial de 5.4 fermentados por 6 días.

3.4.3. Selección de Levaduras *no-Saccharomyces*

Tras finalizar las microfermentaciones se seleccionó mediante evaluación sensorial aquellas levaduras que presentaron atributos positivos favorables para la obtención de cervezas con notas florales y/o frutales y posteriormente se evaluaron sus parámetros químicos y fisicoquímicos.

Finalmente se realizó la caracterización tecnológica de las levaduras mediante cinética, realizando fermentaciones aireadas a temperatura de 30°C y agitación constante en matraces Erlenmeyer de 2L y una capacidad de mosto lúpulado de 1.8 L. En cada uno de los matraces se inocularon las levaduras NS a analizar con 6×10^6 ufc/mL, realizando 12 muestreos por un periodo de 5 días. Durante ese lapso se determinó el crecimiento de colonias de levaduras NS mediante conteo en placa PDA, determinación de ácido acético, pH, consumo de azúcares (Glucosa y Fructosa) a través de la determinación de sólidos solubles totales (°Brix), gravedad específica y producción de alcohol y contenido alcohólico. Cuyas técnicas analíticas se describen en el apartado 3.5.

3.5. Técnicas Analíticas

3.5.1. Técnicas para evaluar parámetros fisicoquímicos.

pH. La técnica se basa en la medición electrométrica de la actividad de los iones hidrógeno presentes en una muestra del producto mediante un aparato medidor de pH (potenciómetro) (NMX-F-317-S-1978).

Para la determinación se usó un potenciómetro marca HANNA y los resultados se obtuvieron por lectura directa de pH, sumergiendo el electrodo directamente en la cerveza utilizando 50 mL de muestra.

Sólidos Solubles. La técnica se basa en la propiedad de los líquidos de refractar la luz en proporción a su contenido de sólidos solubles totales (NMX-F-103-1982).

La determinación se realizó por medio de un refractómetro digital de bolsillo (Marca Atagon) cubriendo el lente con unas gotas de cerveza. Los resultados se expresaron en °Brix.

Gravedad Específica. Esta técnica se basa en la determinación del porcentaje de alcohol en bebidas alcohólicas a través de su densidad. El hidrómetro flota verticalmente en el líquido en donde se sumerge por medio del principio de Arquímedes, la densidad del líquido es la lectura de la marca en la escala justo en la superficie del líquido (López *et al.*, 2013).

La determinación se realizó sumergiendo el hidrómetro en 100 mL de cerveza a 15°C, de acorde a la escala se obteniendo la lectura directa.

Acidez Total: Esta técnica consiste en determinar la acidez por medio de una titulación ácido-base con una solución de álcali estandarizada (NMX-V-015-NORMEX-2014). La determinación se realizó mediante una valoración ácido-base en presencia de fenolftaleína como indicador de la valoración ácido-base. Los resultados se expresaron en g/L de ácido láctico y Acético.

3.5.2. Técnicas para evaluar parámetros químicos.

Contenido alcohólico (%Alc. Vol.) Esta técnica se basa en la determinación de la cantidad de alcohol etílico en 100 volúmenes de una mezcla alcohólica. En el cual se determina en la medición del contenido alcohólico a una temperatura estable en una mezcla hidroalcohólica, a través de un alcoholímetro y un termómetro (NMX-V-013-NORMEX-2005).

Para realizar la determinación se desgasificó la muestra con agitación constante y se tapó con el fin de evitar vaporización de alcohol que se mezcle con la humedad del aire, una vez desgasificada se procedió a realizar una destilación de 250 mL de cerveza adicionada con 125 mL de agua, se homogenizo, es importante evitar una ebullición violenta. El destilado obtenido se le realizó la lectura directa con el contenido alcohólico. Expresando los resultados en % Alc. Vol a 15°C (Véase figura 12).



Figura 12. Material y equipo para la determinación de contenido alcohólico en donde a) Equipo de destilación y b) Lectura de la muestra con el alcoholímetro.

Alcoholes superiores. Se basa en la coloración producida cuando se somete los alcoholes superiores al calor y a la presencia de ácido sulfúrico concentrado, la reacción se sensibiliza con la adición del p-dimetilamino benzaldehído. El color producido se lee en el espectrofotómetro a 453 nm (NMX-V-015-NORMEX-2014).

La determinación se realizó por vía húmeda, realizando una curva patrón a diferentes concentraciones, para lo cual se prepararon soluciones estándar a partir de una solución madre de aceite de fusel (0.1 %m/v), se tomó 500 mL de cerveza destilada y se pusieron en una serie de tubos de ensaye, se preparó un blanco con 500 μ L de agua destilada y un testigo para la comprobación de la curva patrón. Los tubos se colocaron en baño con hielo y se le adicionó a la curva patrón, al blanco, muestra y testigo 250 μ L de p-dimetilamino benzaldehído dejando enfriar por 3 minutos, seguido de la adición de 2.5 mL de H_2SO_4 concentrado, se agitaron los tubos individualmente, colocándolos de nuevo en el baño con hielo por 3 minutos, se pasaron a un baño con agua en ebullición durante 20 minutos, para posteriormente colocarlos nuevamente en un baño con hielo por 5 minutos y atemperarlos por 15 minutos. Una vez atemperados se midió la absorbancias a 453 nm en un espectrofotómetro (marca Genesys 10). Expresándose los resultados en mg de aceite de fusel /100 mL de alcohol anhidro (véase figura 13).



Figura 13. Determinación de alcoholes superiores (curva patrón).

Ecuación 2:

$$AS = \frac{P \times FD \times 100}{\%Al. vol}$$

Dónde;

AS = Alcoholes superiores

P = mg ac. $\frac{\text{fusel}}{100}$ ml de muestra

FD = $\frac{\text{Vol. total de dilucion}}{\text{Vol. de la muestra empleaa en disolución}}$

%Al. Vol = contenido de alcohol

Ésteres. La técnica se basa en una titulación de neutralización con solución de ácido clorhídrico al hidróxido de sodio adicionado a un volumen de muestra después de una saponificación (NMX-V-015-NORMEX-2014).

La determinación de ésteres se llevó a cabo mediante una titulación, tomando como alícuota 50 mL de destilado, usando fenolftaleína como indicador, se neutralizó con NaOH (0.1N), posteriormente se agregó un exceso de 5 mL de NaOH (0.1N). Las muestras se conectaron a un condensador de reflujo y se calentaron a ebullición durante 2 horas, transcurrido el tiempo se dejó enfriar y se atempero por 15 minutos. Posteriormente se tituló con HCl (0.1N). Se hizo el mismo tratamiento para el blanco con 50 mL de agua destilada. Expresándose los resultados en mg de acetato de etilo /100 mL de alcohol anhidro (Véase figura 14).



Figura 14. Equipo para la determinación de ésteres.

Ecuación 3:

$$E = \frac{(V_1 N_1 - V_2 N_2) - (V_3 N_3 - V_4 N_4) \times 88 \times 100}{V} \times \frac{100}{\% Alc. Vol}$$

Dónde:

E= ésteres mg acetato de etilo/ 100 ml de alcohol anhidro.

V_1 =Vol. De NaOH utilizados para saponificar la muestra

V_2 = Vol. De solución de Ácido Clorhídrico utilizados para titular la muestra.

N_1 =Normalidad de NaOH valorada

N_2 = Normalidad de Ácido Clorhídrico valorada.

V_3 =Vol en ml de solución de NaOH usada para saponificar el blanco.

V_4 = Vol. De solución de Ácido Clorhídrico utilizados para titular el blanco

N_3 = Normalidad de la solución valorada de NaOH utilizada en el blanco

N_4 = Normalidad valorada del Ácido Clorhídrico utilizada en el blanco.

88= Mili equivalentes del acetato de etilo expresados en mg

V=n Volumen en ml de la muestra analizada

%Alc. Vol; Contenido Alcohólico expresado en porcentaje de alcohol volumen de la muestra a 20°C.

100= Factor de ajuste de unidades

Aldehídos. La técnica se basa en el aprovechamiento de la reactividad química del grupo carbonilo del acetaldehído para combinarse fácilmente con un exceso de agentes sulfatados y formar el ácido etanol sulfúrico, el contenido de aldehídos se determina por el procedimiento indirecto de bisulfito de sodio, el cual se valora mediante una titulación del exceso de yodo con bisulfito de sodio (NMX-V-015-NORMEX-2014).

Para realizar la determinación de aldehídos, primero se procedió a realizar la destilación de las muestras, posteriormente se llevó a cabo una titulación colocando 10 mL de muestra en un matraz mezclando con 10 mL de agua y 2 mL de bisulfito de sodio 0.05 N. Esperar 30 minutos y agregarle 2.5 mL de yodo y titular con tiosulfato de sodio, usando como indicador 5 gotas de almidón. Los resultados se expresaron en mg de acetaldehído/100 mL de alcohol anhidro (a.a.) (ver imagen 15).

Ecuación 4:

$$A = \frac{(V_1 - V_2)N \times 22 \times 100}{M} \times \frac{100}{\%Alc. Vol}$$

Dónde:

V_1 = gasto de solución de tiosulfato 0.05 N por la muestra

V_2 = gasto de solución de tiosulfato 0.05 N por el blanco

N = Normalidad de la solución de tiosulfato.

M =Volumen de la muestra utilizada en la prueba

$\% Alc. Vol$ = Contenido Alcohólico expresado en por ciento en alcohol volumen a 20°C

A = mg de acetaldehído por 100 mL de alcohol anhidro

22=mili equivalentes del acetaldehído expresados en mg

100= factor de ajuste de unidades



Figura 15. Determinación de aldehídos.

3.5.3. Técnicas para evaluar parámetros microbiológicos

Tinción de Gram. Esta técnica se basan en las diferencias entre las paredes celulares de las bacterias Gram positivas y Gram negativas, a través de la fijación de colorantes (Santambrosio *et al.*, 2009).

Para evaluar la pureza del cultivo, A) primero se colocó en el porta objetos una gota de agua, se tomó una muestra de cultivo con la asa bacteriológica previamente flameada al rojo vivo y se realizó un frotis, B) se fijó la muestra al fuego, C) posteriormente se cubrió con cristal violeta y dejó reposar 1 minuto, enjuago con agua destilada, D) se cubrió con lugol y se dejó reposar 1 minuto, se enjuagado con agua destilada, E) se decoloro la muestra con alcohol etílico 96% G.L., se enjuago nuevamente con agua destilada, se colocó safranina dejando reposar 1 minuto y se enjuago con agua destilada , F) se dejó escurrir el porta objetos sobre una toalla absorbente y se observó la muestra en un microscopio a 100X (ver figura 16).

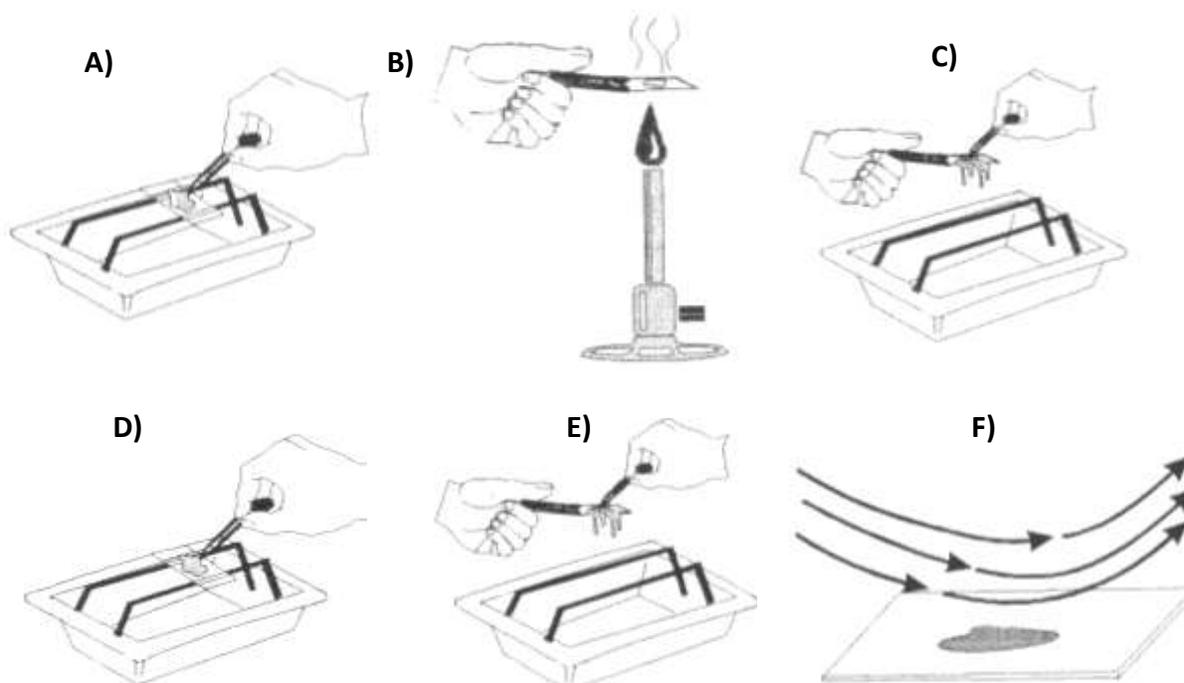


Figura 16. Proceso para Tinción de Gram.

Fuente: Blogger (2014).

Tinción de cápsula. Esta técnica se basa en la coloración del medio que rodea la muestra, permitiendo que la cápsula desplace a las partículas de carbono coloidal de la

tinta china, apareciendo un halo claro alrededor del microorganismo (Reynoso *et al.*, 2015).

Para llevar a cabo esta prueba, A) primero se colocó una gota de agua en un porta objetos, segundo de la adición de una gota de tinta china marca Pelikan India, se tomó una muestra del cultivo y se mezcló sobre las gotas, B) se colocó sobre las gotas u extremo de otro porta objetos inclinado a 45°, C) deslizo en un solo movimiento, D) Fijar la muestra al fuego y observar la muestra en un microscopio a 40X(ver figura 17).

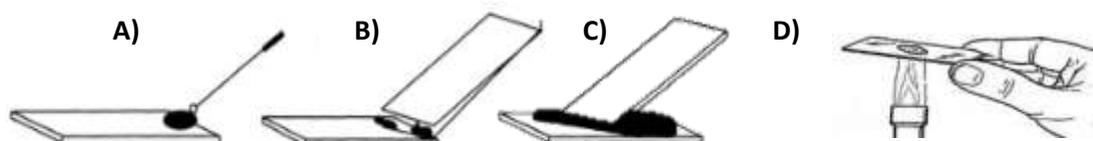


Imagen 17. Proceso para Tinción de cápsula.

Fuente: Blogger (2014).

Sembrado en Placa. Poner en contacto la muestra en los medios de cultivo, extendiendo el inóculo uniformemente por la superficie del medio de cultivo. Las células diseminadas sobre la superficie formarán colonias aisladas.

Todo se realizó en una campana de flujo laminar para garantizar la esterilidad del medio. La muestra se mezcló en agua estéril destilada, se homogenizo la muestra y se tomó 100 μ L de esta solución para en el medio de cultivo, dispersando la muestra con una asa bacteriológica previamente flameada, donde el extendido del inóculo se realizó en forma de zig-zag sobre toda la caja Petri (ver figura 18).

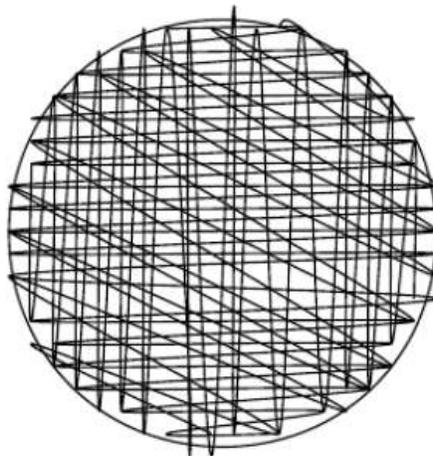


Figura 18. Técnica de Sembrado en Placa

Fuente: Blogger (2014).

Agotamiento por estría. Se basa en una sola inoculación de una sección de la placa Petri y a continuación disminuir la colonia arrastrando microorganismos de la sección inicial de dos a tres secciones adicionales, diluyendo eficazmente la población de microorganismos (García, 2014).

Para purificar la muestra mediante este método todo se realizó en una campana de flujo laminar para garantizar la esterilidad del medio. Se flameo la asa bacteriológica al rojo vivo y enfrió sobre el medio de cultivo, se tomó cuidadosamente con el asa un poco de muestra de la levadura a aislar, se inoculo en la nueva caja de PDA disminuyendo la colonia arrastrando microorganismos de la sección inicial a tres secciones adicionales, achicando eficazmente la población de microorganismos (ver figura 19).

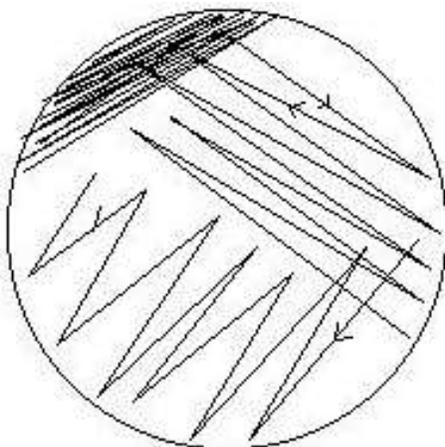


Figura 19. Técnica de agotamiento por estría.

Fuente: Blogger (2014).

Conteo en placa. Se basa en la preparación de diluciones primarias, para obtener una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos presentes en la porción de muestra (NOM-110-SSA1-1994).

Esta prueba se realizó en cajas Petri de PDA estériles, se preparó una dilución primaria donde se le agregó 10 mL de muestra a 90 mL de agua destilada estéril, se homogenizó y se procedió a realizar las diluciones decimales adicionales (10^{-1} a 10^{-10}), se tomó 100 μ L de cada dilución y se inoculo sobre el medio con la pipeta, se utilizó una pipeta estéril por cada dilución y se sembró por duplicado cada una de ellas. Posteriormente se distribuye lo más uniformemente posible utilizando un asa microbiológica previamente flameada y entre una muestra y otra. Se permite que el medio absorba la muestra y se voltean las cajas, rotulan e ingresan a incubación.

3.5.4. Técnicas para evaluar parámetros bioquímicos

Actividad enzimática. Hidrólisis de polisacáridos a través de vía enzimática, enzimas que pertenecen a la familia de las β -glucosidasa, responsables del catabolismo de una amplia gama de hidratos de carbono y liberación de compuestos aromáticos (Belda *et al.*, 2016; Arévalo, 2005).

La actividad enzimática de las 14 cepas de levaduras NS se evaluó mediante microfermentaciones aireadas incubadas a 30°C con agitación constante en matraces Erlenmeyer de 500 mL, inoculando cada matraz 6×10^6 ufc/mL, en mosto de cebada malteada lúpulado de 12°Brix, gravedad específica inicial de 1.054 y pH inicial de 5.4 y un control con *Saccharomyces cerevisiae* en ausencia de oxígeno, dejándolos fermentar 6 días. Tras la fermentación se realizó una evaluación sensorial considerando presencia de actividad β -glucosidasa al mostrar una diferenciación notable de liberación y sabor de compuestos aromáticos con respecto a *Saccharomyces cerevisiae*. Seleccionado aquellas levaduras con atributos positivos favorables para la obtención de cervezas con notas frutales y florales perceptibles y agradables al consumir.

Cinética de fermentaciones. La cinética de fermentación alcohólica se basa en la cuantificación del crecimiento de biomasa (curva de crecimiento), formación de producto o metabolitos asociados a su metabolismo (CO_2 , alcohol, ésteres, aldehídos, ácidos orgánicos entre otros componentes) y consumo de sustrato (Shirai *et al.*, 2013).

La cinética se realizó, mediante fermentaciones aireadas incubadas a 30°C con agitación constante en matraces Erlenmeyer de 2L adaptados con una llave para muestreo y una capacidad de mosto lúpulado de 12°Brix, gravedad específica inicial de 1.054 y pH inicial de 5.4 con una capacidad de 1.8 L. En cada uno de los matraces se inocularon las levaduras NS y control con 6×10^6 ufc/mL y realizaron 12 muestreos durante 5 días.

Para el control *Saccharomyces cerevisiae* se realizó la fermentación en ausencia de oxígeno.

3.5.5. Prueba de Evaluación Sensorial

Evaluación Sensorial. Para la selección de las cepas de levaduras NS con perfiles frutales y florales, se requiere de jueces analíticos quienes posean una sensibilidad sensorial específica y deseada para este estudio. Por lo que se emplearon 10 jueces Beer Sommelier certificados, la cerveza se presentó en vasos de vidrio tipo caña (pinta).

Las distintas cerveza fermentadas con las levaduras NS se presentaron en la siguiente orden: 1) *Saccharomyces cerevisiae*, 2) NS008, 3) NS010, 4) NS011 y 5) NS014.

Se evaluaron las cervezas en los aspectos de aroma, sabor y sensación en boca.

Evaluando los descriptores que se muestran en la Figura 20.

Fecha _____ Edad _____ Sexo _____

A CONTINUACIÓN SE TE PROPORCIONARA CINCO MUESTRAS DE CERVEZAS, POR FAVOR MARQUE CON UNA X SOBRE EL DESCRIPTOR MENCIONADO SI MANIFIESTAN LAS CARACTERÍSTICAS DE SABOR Y/O AROMA EN LA MUESTRA.

Descriptor	Muestra				
	1	2	3	4	5
Warming					
Sweet					
Frutal					
Picante/Clavo					
Floral					
Astringente					
Esmalte					
Amargo					
Manzana Verde					
Maltoso					
Cuerpo					
OFF-Flavors	1	2	3	4	5
Vegetal					
Butterscotch					
Láctico					
Acético					
Málico					
Terroso					
Plástico					

Comentarios _____

Figura 20. Prueba de evaluación sensorial para la selección de levaduras NS para uso como agentes fermentativos en cerveza artesanal.

Resultados y Discusión



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de los parámetros químicos y fisicoquímicos de cervezas artesanales.

El aroma y el sabor de las bebidas alcohólicas (cerveza, vino, tequila y mezcal) son el resultado de numerosos compuestos volátiles y no volátiles, cuya mezcla compleja define los atributos sensoriales y la aceptación por el consumidor (Vera *et al.*, 2009).

Durante la fermentación de bebidas alcohólicas intervienen principales levaduras del género *Saccharomyces*. Sin embargo, existen otros géneros de levaduras que también participan en el proceso de fermentación y rara vez son tomadas en cuenta, estas levaduras son llamadas *no-Saccharomyces*, las cuales se caracterizan por producir una variedad de compuestos volátiles y no volátiles que tienen influencia decisiva sobre la calidad organoléptica de las bebidas alcohólicas (Suárez *et al.*, 2016).

Los aromas y sabores son el resultado de los diferentes metabolitos de desecho que produce cada cepa; dentro de estos metabolitos se encuentran compuestos azufrados, ésteres, ácidos orgánicos, carbonilos, alcoholes entre otros.

A los compuestos químicos relacionados con el aroma y sabor de las bebidas se les denominada congénicos y tienen la peculiaridad de encontrarse en pequeñas concentraciones (Casas *et al.*, 2015).

4.1.1. Parámetros químicos.

➤ Aldehídos

Los aldehídos son uno de los compuestos que se generan durante la fermentación de las cervezas y aproximadamente se han encontrado 30 compuestos, siendo el Acetaldehído el compuesto que se encuentra en mayor concentración 4-15 mg/L, el cual imparte un sabor a manzana verde o hierbas recién cortadas a la cerveza (Galindo, 2004; Hornsey, 2003). Un exceso de este compuesto contribuye a un sabor desagradable en la cerveza, impartiendo un sabor graso y con notas intensas a manzana (Ibáñez, 2013).

En la figura 21 se observa que la cerveza Leffe fue la que presentó mayor contenido de Acetaldehído, seguida de Delirium y Duvel con 48.89, 20.62 y 19.41 mg/ 100 mL Alc.

Anhidro, respectivamente. Los resultados estadísticos obtenidos mostraron que las cervezas Delirium y Duvel no presentaron diferencia significativa ($p \geq 0.05$).

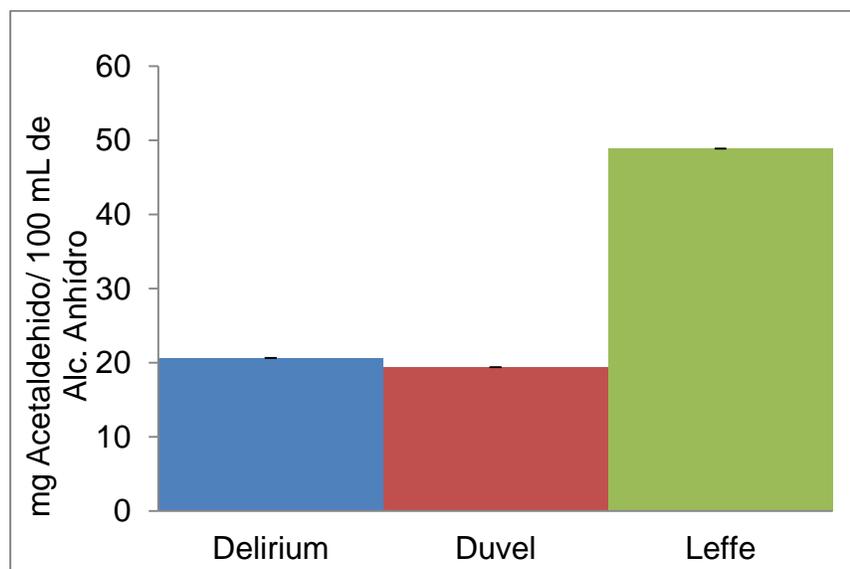


Figura 21. Contenido de Aldehídos en cervezas artesanales.

Leffe presentó una concentración excesiva de este compuesto, sobrepasando los valores permitidos para bebidas alcohólicas 40 mg/100 mL Alc. Anhidro (NOM-142-SSA1/SCFI-2014). Ibáñez (2013) menciona que las condiciones de proceso es una de los factores que influye en la producción de este compuesto, como temperatura, la aeración, así como la cepa usada; en este caso se sabe que la levadura que se utilizada para su elaboración es *S. cerevisiae* de origen Belga.

➤ Ésteres

Dentro de los parámetros químicos, los volátiles determinan la calidad organoléptica de la cerveza y se encuentran los ésteres, alcoholes superiores y ácidos orgánicos.

Los ésteres son de primera importancia en la influencia del flavor de la cerveza, el perfil de ésteres y sus concentraciones dependen de la cepa de levadura empleada para la elaboración de cerveza (Ibáñez, 2013), así como una excesiva cantidad de estos conduce a aromas desagradables (Hornsey, 2003).

Cierto número de ésteres contribuye al flavor de la cerveza. Los componentes más importantes para el cervecero son el acetato de etilo y el llamado acetato de isoamilo que es de hecho una mezcla de los acetatos 2 y 3-metilbutilo (Baxter y Hughes, 2004).

El Acetato de etilo se encuentra en cerveza en niveles típicos de 10-60 mg/L, con un umbral de percepción de flavor de 30 mg/L; el cual imparte un sabor a disolvente y/o dulce (figura 22A). En cuanto al Acetato de isoamilo se encuentran en niveles típicos de 0.5-5.0 mg/L, umbral de percepción de sabor es de 1 mg/L presentando un descriptor de flavor asociado a Banana, éster y/o disolvente (Baxter y Hughes, 2004).

➤ **Alcoholes Superiores**

Un amplio grupo de alcoholes afectan al flavor de la cerveza. Siendo los alcoholes superiores los de mayor importancia en cerveza, como el alcohol isoamílico que se encuentra en niveles típicos de 30-70 mg/L, con un umbral de percepción de 70 mg/L dando como descriptor de sabor alcohólico, vinoso y/o banana y el alcohol iso butano con un umbral de percepción de 100 mg/L (Figura 22B). Es importante mencionar que los alcoholes superiores son precursor es inmediatos de los ésteres, por lo tanto el control de alcoholes superiores debe ser controlado para que a su vez controle la producción de ésteres (Baxter y Hughes, 2004).

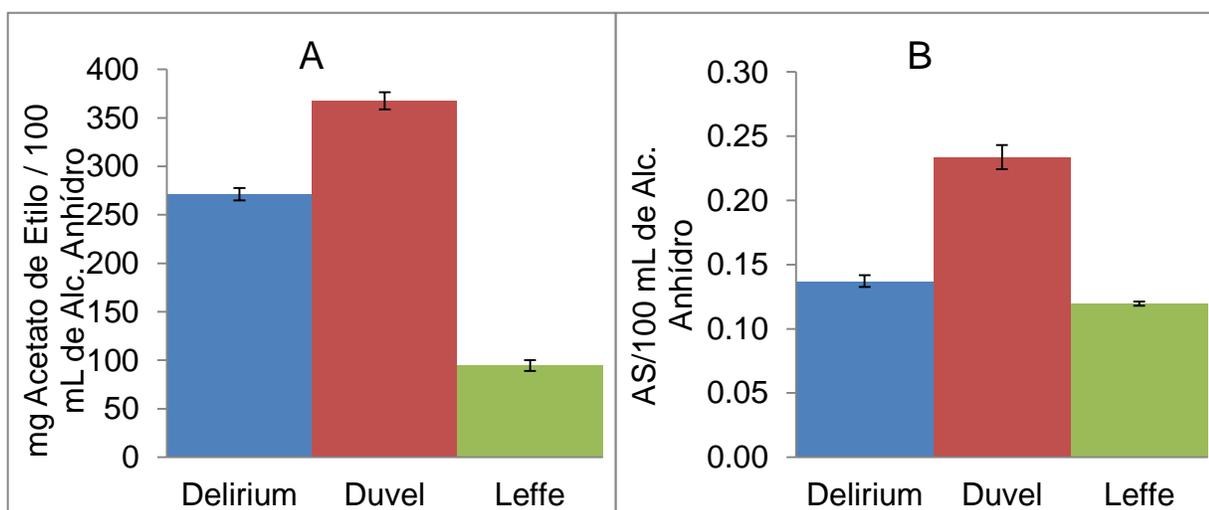


Figura 22 Contenido de Ésteres A) y de Alcoholes Superiores B) en cervezas artesanales.

La determinación de Acetato de etilo y Alcoholes Superiores (A.S.) presentaron un comportamiento directamente proporcional en las cervezas analizadas, observando mayor contenido de Acetato de etilo y A.S. en la cerveza Duvel con 271.33 mg/ 100 mL Alc. Anhidro y 0.2337 mg/ 100 mL Alc. Anhidro A.S. respectivamente y con una menor cantidad Leffe con 94.519 mg/ 100 mL Alc. Anhidro y 0.1196 mg/ 100 mL Alc. Anhidro. Por lo tanto

los resultados obtenidos para las muestras sobre los parámetros de Alcoholes Superiores y Ésteres mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

De igual manera las cervezas analizadas resultaron dentro de los límites de AS permitidos para bebidas alcohólicas 500 mg/100 mL Alc. Anhidro (NOM-142-SSA1/SCFI-2014). Baxter y Hughes (2004) mencionan que los alcoholes superiores son precursores inmediatos de estrés, por lo que al presentar concentración muy baja de AS, generó una producción mínima de Acetato de etilo.

➤ %Alcohol Volumen

En la figura 23 se muestran los resultados obtenidos de la determinación del grado alcohólico de las cervezas artesanales analizadas, siendo Leffe la cerveza que presentó una diferencia de 0.5 %Alc. Vol. en cuanto a la reportado en la etiqueta equivalente al 5% Alc. Vol. Esta variación se puede atribuir a factores como la cepa usada, las condiciones de proceso como; correcta extracción de los azúcares fermentables durante la maceración; ya que durante esta etapa se recomienda una temperatura de maceración dentro de un margen de 64 a 65°C denominada temperatura de “choque, es la temperatura a la cual el almidón de la malta es transformado por las enzimas amilasas en azúcares fermentables, la α -amilasa actúa eficazmente en un margen de temperatura de 64 a 68°C y β -amilasa entre 60 a 65 °C. Cuando se supera la temperatura de “choque” esta puede ser nociva para las enzimas de las maltas inactivándolas y en consecuencia se produce una baja degradación del almidón, por lo tanto se obtienen una extracción de azúcares deficiente que se ve reflejado en la gravedad específica del mosto dulce obtenido y en consecuencia se genera una producción más baja de alcohol, para el caso cuando es inferior la temperatura de “choque” solo se obtienen los azúcares degradados por la β -amilasa siendo deficiente la extracción. Otro de los factores es la oxigenación del mosto, si no se realiza una dosificación controlada de oxígeno antes de fermentarlo, si esta es baja retarda el desarrollo de la levadura y en consecuencia la producción de alcohol (Hornsey, 2003; Rodríguez, 2003).

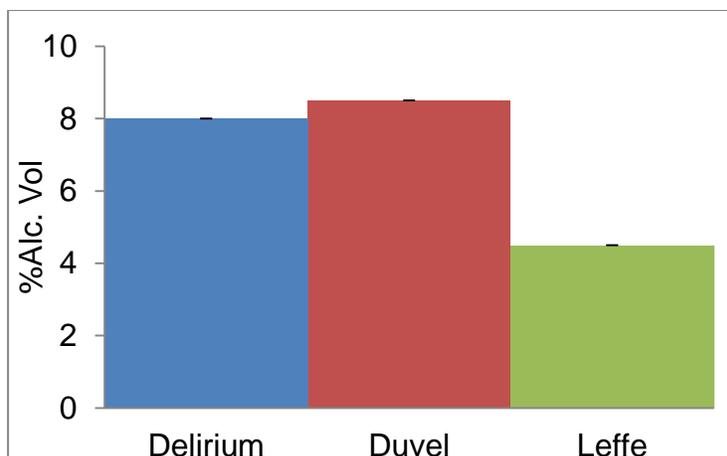


Figura 23. Determinación % Alc. Vol en cervezas artesanales.

En cuanto a las cervezas Duvel y Delirium se confirmó lo estipulado en la etiqueta 8.5 % y 8% Alc. Vol, respectivamente.

Las cervezas Delirium y Duvel no presentaron diferencia significativa ($p \geq 0.05$) en cuanto a la cerveza Leffe

4.1.2. Parámetros Fisicoquímicos

➤ Acidez Total y pH.

La influencia de los ácidos orgánicos presentes en cerveza, son parte de los metabolitos que se generan durante la fermentación alcohólica, los cuales contribuyen de forma importante en el sabor de ésta. El ácido orgánico volátil de interés es el ácido acético con niveles típicos en cerveza de 0.03 a 0.200 g /L y un umbral de percepción de sabor de 0.175 g/L dando notas de sabor ácido y/o vinagre (Baxter y Hughes, 2004).

En la figura 24 la cerveza marca Leffe 0.3203 g/L Ác. Acético y 3.65 pH, mientras que Delirium 0.2302 g/L Ác. Acético y 4.39 pH por último la cerveza Duvel presentó una acidez de 0.1872g/L Ác. Acético y pH 3.65, que la cerveza. El análisis estadístico demostró que la acidez de las marcas de cervezas Delirium y Duvel no presentaron diferencia significativa ($p \geq 0.05$) en comparación con la cerveza Leffe, esta variación se le atribuye al tipo de cepa usada para la elaboración de la cerveza, ya que el ácido acético es un metabolito que se genera en la levadura. A partir del acetil- CoA procedente de la descarboxilación oxidativa del piruvato (Carrascosa *et al.*, 2005).

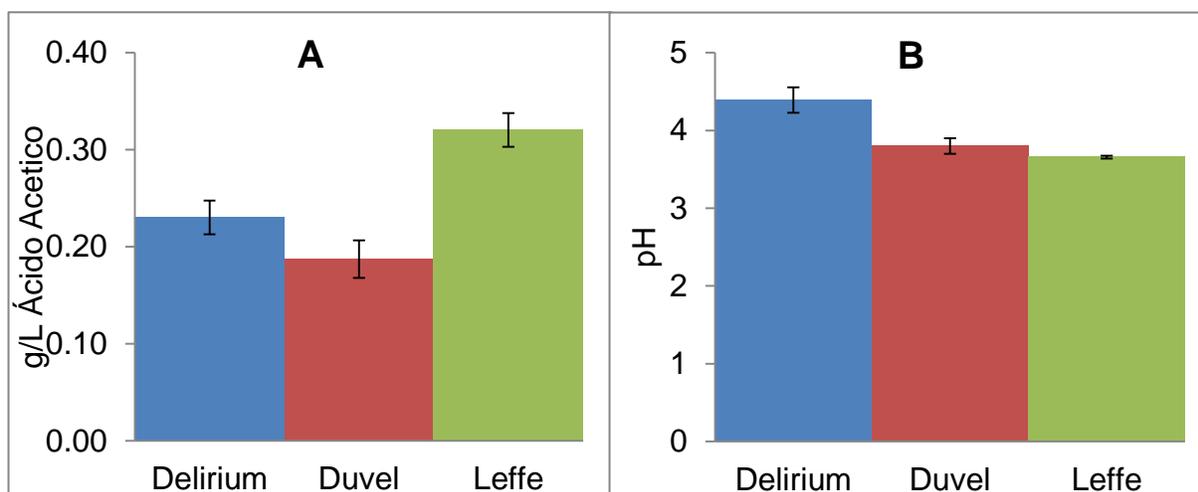


Figura 24. Determinación de Acidez Total expresada en Ác. Acético A) y pH B) en cervezas artesanales.

Teóricamente la acidez presente en las cervezas Leffe y Delirium sobre pasaron los niveles típicos encontrados de ácido acético en este tipo de producto, siendo Duvel la cerveza dentro de los niveles típicos, en cuanto a normatividad las cervezas mostraron valores dentro del intervalo de acidez total permitida en bebidas alcohólicas que es de 10g/L (PROY NOM-199-SCFI-2015) .

Es importante mencionar que el pH de una cerveza depende de muchos factores entre ellos; la dureza del agua, ya que juega un papel muy crítico durante el proceso de maceración (Hornsey, 2003), el tipo de maltas usadas (Baxter y Hughes, 2004), adjuntos y cepa de levadura (Ibáñez, 2013).

Baxter y Hughes (2004), indican que en las cervezas típicas el pH varía entre 3.9- 4.4 y la normatividad señala que el pH para bebidas alcohólicas debe estar en un intervalo de 2.5 a 5 (PROY NOM-199-SCFI-2015).

Los resultados estadístico mostraron que la cerveza Delirum si presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en comparación con las otras cervezas analizada, esto indica que uno de los factores que influyó sobre este valor para el caso de la cerveza Leffe fueron los ingrediente con los que está hecha, dicha cerveza presentó un valor teórico inferior a 3.9, debido a que esta cerveza tiene como adjunto frutos rojos; fresa, frambuesa y/o cereza, modificando con ello el pH y acidificando la cerveza. Suarez y Iñigo (1992) menciona que la concentración de iones H^+ en la cerveza provienen de la disociación de los ácidos que entran en su composición, por lo tanto al tener como adjuntos frutos rojos, la concentración de hidrogeniones se debe en gran parte a los ácidos que provienen de las frutos como el cítrico

y ascórbico. Para el caso de la cerveza Duvel el pH que presentó se puede atribuir en gran parte al tipo de cepa usada durante la fermentación de la cerveza. En general por norma los valores obtenidos para todas las cervezas analizadas son permitidos en cerveza.

➤ SST (°Brix) y Gravedad Específica

El contenido de azúcares fermentables obtenidos durante la maceración es el extracto total que determina el límite de atenuación, que establece el alcohol que contendrá la cerveza final (Rodríguez, 2003).

Los mostos contienen azúcares disueltos, entre otros compuestos que durante la fermentación la levadura va degradando el sustrato fermentables (azúcares reportados en °Brix) y disminuyendo la concentración de estos paulatinamente hasta estabilizarse, la densidad (Gravedad específica) es un parámetro que está en función de la concentración de azúcares y a medida que transcurre la fermentación estos disminuirán, haciendo el medio menos denso que el agua, ya que los azúcares han sido total o parcialmente consumidos y transformados en alcohol. Cuando una bebida contiene alcohol genera que la densidad de la cerveza esté por debajo del agua (Aleixandre y Álvarez, 2003; Rodríguez, 2003).

En la figura 25A se observa que la determinación de °Brix en las cervezas analizadas fue diferente significativamente ($p \leq 0.05$), esto indica que tanto la cepa usada, materias primas y condiciones de proceso influyen significativamente sobre este valor.

En el caso de la Gravedad Específica (figura 25B) la cerveza Leffe presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en comparación con las otras cervezas, esta variación puede deberse a la densidad inicial que poseía el mosto de cerveza antes de ser fermentada, como se menciona anteriormente existe una relación entre el consumo de azúcares, densidad y producción de alcohol, que al finalizar dicha fermentación atenuó hasta una densidad de 1.023, siendo un valor más elevado en comparación con otras dos cervezas estudiadas debido a que esta contienen un grado de alcohol menor equivalente a 4.5% (véase figura 18).

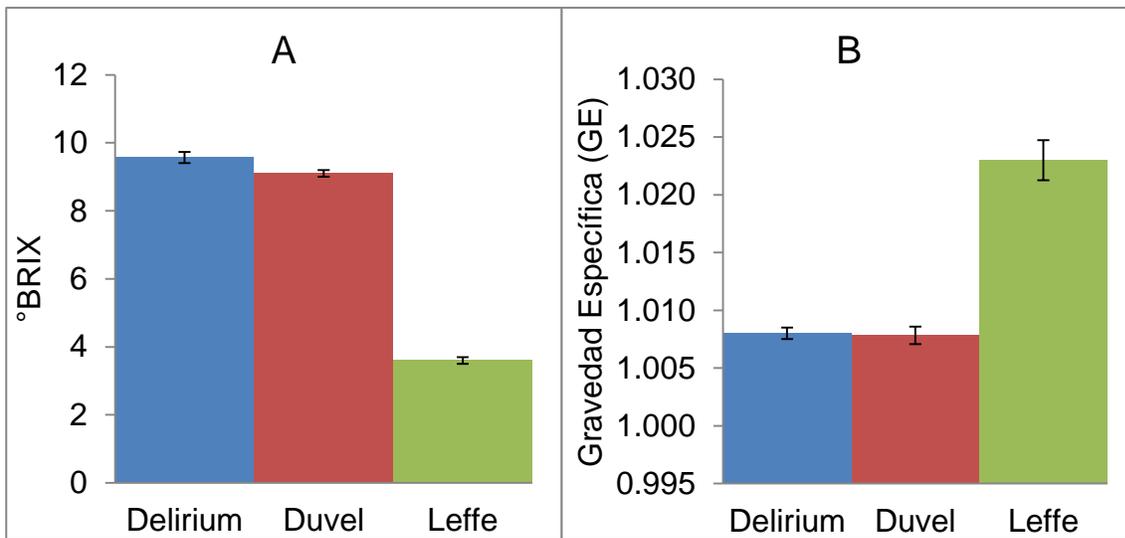


Figura 25. Determinación de Sólidos Solubles Totales (°Brix) A) y Gravedad Específica (GE) B) en cervezas artesanales.

4.2. Aislamiento, purificación e identificación de levaduras enológicas nativas *no-Saccharomyces*.

4.2.1. Aislamiento de levaduras *no-Saccharomyces*

El aislamiento se llevó a cabo en los cuatro medios de cultivos selectivos; Agar-EYPD, Agar-Lisina, Agar-Amonio y Agar-Mosto Malta, presentando resultados favorables.

Los medios de cultivo usados estaban compuestos de nutrientes de cadenas simples e hidrolizadas contenían como fuente energía; dextrosa, fuente proteica; peptona, lisina y amonio y como suplemento vitamínico; extracto de levadura, así como minerales, según el caso del medio usado, para el caso del medio Agar Mosto Malta éste estaba compuesto de vitaminas, minerales, glucosa, fructosa, proteínas y aminoácidos provenientes de la malta (Carrascosa *et al.*, 2005).

4.2.1. Hoja de Uva

Los cultivos inoculados con la muestra hoja de uva, mostraron la presencia de crecimiento diverso de colonias de levaduras y mohos. Presentando colonias de levaduras con texturas lisas, cremosas de color rosa y blanco, así como la presencia de crecimiento fúngico de color naranjas, verde, amarillo, blanco y negro. Las levaduras son capaces de alcanzar las uvas

por el efecto de diseminación del vino y de los insectos ya que están presentes en las viñas desde el inicio de la maduración del fruto (Santos, 2016).

Con base en la disponibilidad de nutrientes de los medios de cada medio de cultivo, se permitió la reproducción favorable de gran variedad de microorganismos especialmente Mohos en el medio Mosto Malta

En el caso de los medios Agar Lisina y Amonio estos medios contenían una fuente de nitrógeno más compleja, pero esto no impidió el desarrollo de microorganismos en particular crecimiento fúngico. De forma general para esta muestra se obtuvo un crecimiento excesivo de colonias fúngicas, debido a que este tipo de muestra se encontró en contacto directo con la desimanación del viento, tierra e insectos de la región (ver figura 26 y tabla 21) (Carrascosa *et al.*, 2005; Suárez, 2004).

4.2.2. Orujo de uva deshidratado

Las muestras de orujo deshidratado mostraron un crecimiento moderado de colonias de levaduras en los medios EYPD, Amonio y Mosto Malta y un crecimiento favorable de levaduras en el medio con Lisina.

En este caso las pocas colonias de microorganismos que crecieron sobre los medios de cultivo se pudieron ver afectado debido a que el orujo fresco al momento de ser recolectado fue almacenado a una temperatura de -20°C y posteriormente la muestra fue sometida a un proceso de secado por un lapso de 24 hrs a 40°C . Es importante mencionar que aun cuando un organismo posee mecanismos para adaptarse a los cambios en el medio que afectan su crecimiento y reproducción, si estos son demasiado severos pueden ser letales. Pero, si un organismo se expone de manera abrupta a un choque térmico de 20 a 25°C por encima de su temperatura de óptima de crecimiento, éste morirá (Folch *et al.*, 2004). Sin embargo no todos los microorganismos logran morir durante el tratamiento térmico, ya que unos adquieren la capacidad de sobrevivir a la temperatura letal, debido a que unos logran sobrevivir por diversos factores intrínsecos como; esporulación o estado vegetativo y factores ambientales que actúan durante el tratamiento térmico tales como a_w , pH, minerales, etc. Este fenómeno se conoce como inducción de la tolerancia (Folch *et al.*, 2004).

Dicho esto es por ello que se presenta un crecimiento microbiológico moderado, en especial levaduras sobre los medios de cultivo (ver figura 26 y tabla 21).

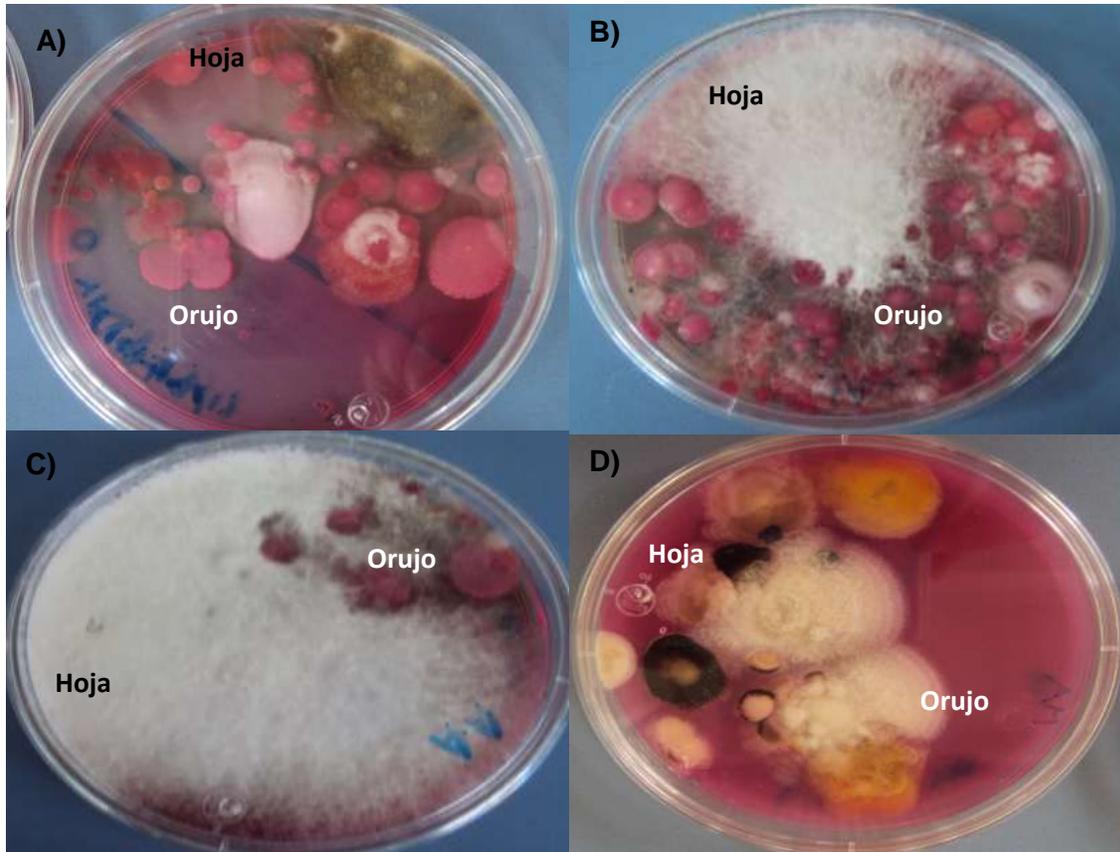


Figura 26. Muestra el crecimiento de microorganismos en los medios Agar YEPD A), Agar Lisina B), Agar Amonio C) y Agar Mosto Malta D) inoculadas con las muestras hoja de uva y orujo deshidratado

Cabe mencionar que se presentó un crecimiento positivo fúngico en los medios Agar Lisina y Amonio, a este comportamiento se le atribuyó que el crecimiento de microorganismos es más selectivo por la fuente proteica de la cual estos medios están hechos, al no presentar indicios de crecimiento de microorganismos sobre los medios, estos quedaron con nutrientes disponibles para su uso. Es importante mencionar que en el mismo medio de cultivo se inocularon 2 muestras diferentes (hoja de uva y Orujo deshidratado), lo que favoreció la expansión del crecimiento de las colonias de Mohos que crecieron en la muestra de hoja de uva, ocasionando una contaminación en los medios de cultivo.

4.2.3. Orujo Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Sauvignon/Melbec y Tempranillo

Las muestras de orujo Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Sauvignon/Melbec y Tempranillo, lo que solo origino la inactivación de los microorganismos, que posteriormente fueron activados al colocarlos en las condiciones de crecimiento adecuadas (Medios de

cultivos selectivos) con los nutrientes disponibles. Estas muestras presentaron crecimiento diverso de colonias en el medio Mosto Malta, desde colonias de levaduras con texturas lisas y rugosas, de colores rosas fuerte, blancas y naranjas, así como crecimiento de mohos verdes y amarillos.

Bien, en los medios Agar lisina y Agar Amonio se observó poco crecimiento de microorganismos, ya que estos medios contienen una fuente de nitrógeno más compleja y selectiva. Siendo los medios de Lisina los que presentaron crecimiento positivo de levaduras, ya que solo las levaduras *no-Saccharomyces* pueden metabolizarlas y coloniza en estos medios sin dificultades, ya que reconoce como única fuente de nitrógeno la Lisina, ver imágenes de la 27 a la 30 y tabla 21 (Bernardi, 2013).

Todas aquellas colonias que crecieron sobre estos medios de cultivo que presentaron características morfológicas macroscópicas semejantes a colonias de levaduras (redondas, colores claros y textura cremosa) y homogeneidad, fueron purificadas por el método agotamiento por estría en placa en medios Agar lisina, logrando aislar 30 cepas de levadura.

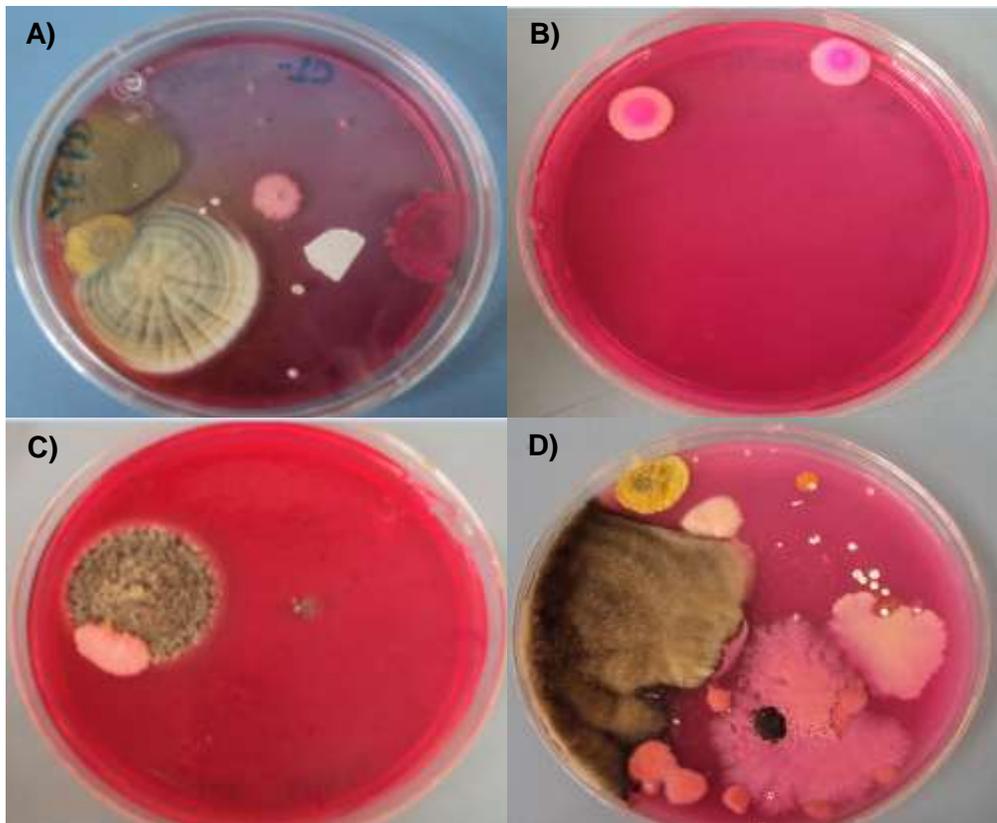


Figura 27. Muestra el crecimiento de microorganismos en los medios Agar YEPD A), Agar Lisina B), Agar Amonio C) y Agar Mosto Malta D) inoculadas con las muestras Cabernet Sauvignon.

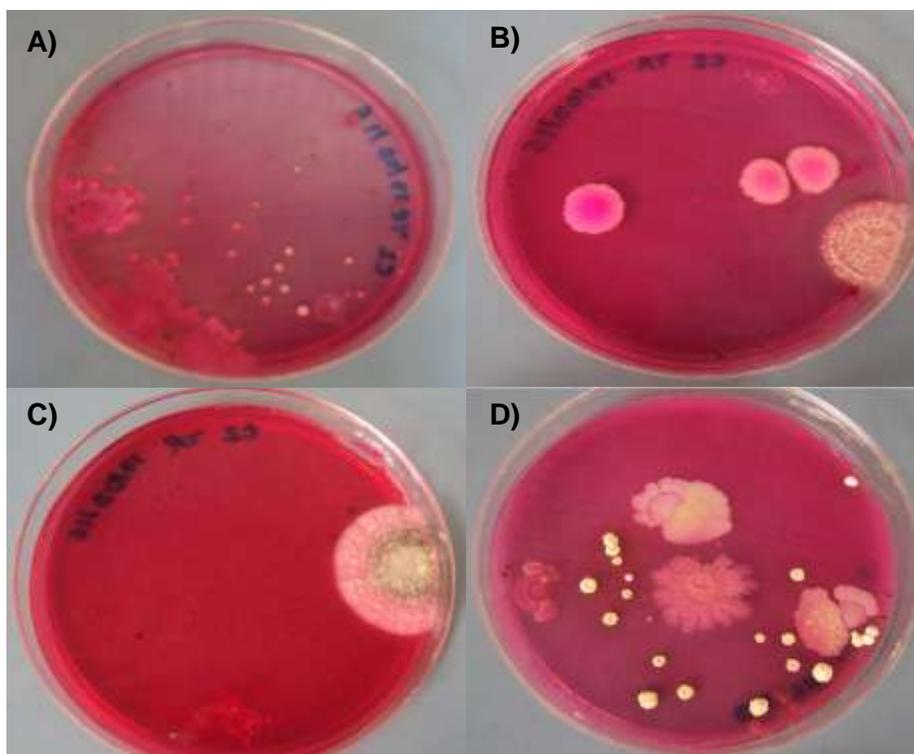


Figura 28. Muestra el crecimiento de microorganismos en los medios Agar YEPD A), Agar Lisina B), Agar Amonio C) y Agar Mosto Malta D) inoculadas con las muestras Cabernet Franc.

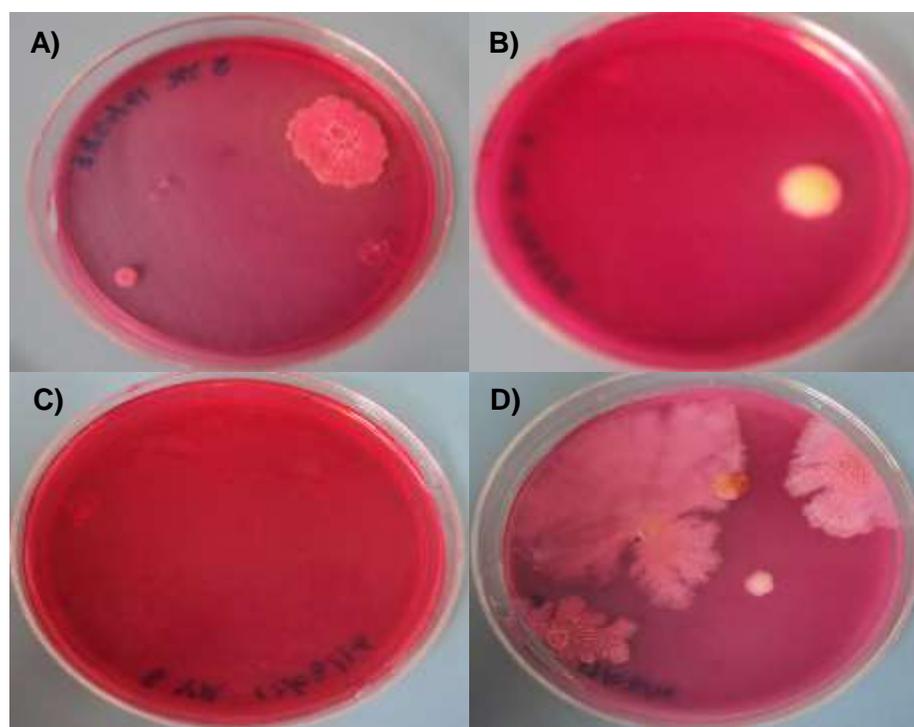


Figura 29. Muestra el crecimiento de microorganismos en los medios Agar YEPD A), Agar Lisina B), Agar Amonio C) y Agar Mosto Malta D) inoculadas con las muestras Sauvignon/Melbec.

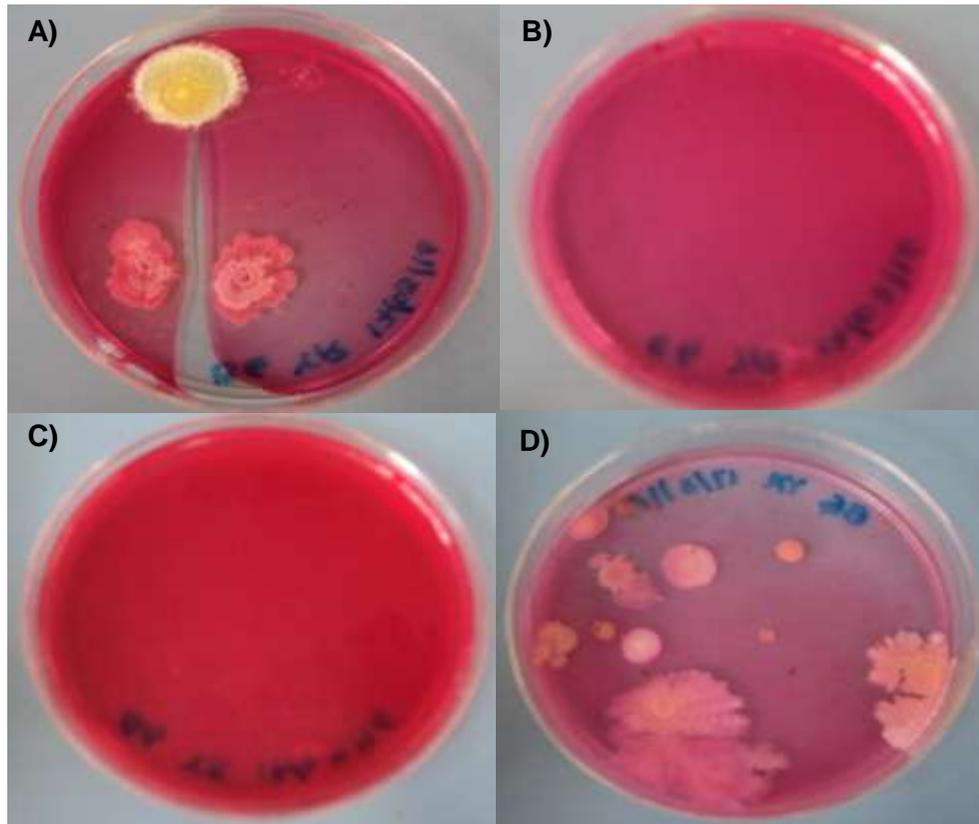


Figura 30. Muestra el crecimiento de microorganismos en los medios Agar YEPD A), Agar Lisina B), Agar Amonio C) y Agar Mosto Malta D) inoculadas con las muestras Tempranillo.

Tabla 21. Descripción de crecimiento de colonias de microorganismos presentes en los medios de cultivos selectivos.

Muestra/Medio	YEPD	A-Lisina	A-Amonio	A-Mosto Malta
Orujo deshidratado	Colonias lisas, naranja y rosas fuerte, redondas, cremosas Colonias rugosas, rosa claro, cremosas	Crecimiento excesivo fúngico con presencia de colonias de levaduras lisas, rosas y cremosas.	Crecimiento excesivo fúngico	Crecimiento fúngico de colonias amarillo intenso, blanco, verde y negras. Colonias lisas, blanca, redonda y cremosa
Hoja de Uva	Colonias lisa, rosas crema, redondas, cremosas. Colonias lisas, blancas, ovoides, cremosas. Colonias fúngica color verde con amarillo	Crecimiento excesivo fúngico con presencia de colonias de levaduras lisas, rosas y cremosas	Crecimiento excesivo fúngico	Colonias fúngica naranja, blanco y negó. Colonias fúngicas amarillas y verde olivo.
Cabernet Sauvignon	Colonias fúngicas color verde, amarillas y blanco con verde.	Colonias lisas, rosa fuerte con blanco, redonda, cremosa.	Colonias lisas, rosa fuerte con blanco, redondas y cremosas	Colonias lisas, rosa claro, naranjas, blancas, redondas, cremosas. Colonias rugosas, rosas y beige, extendidas y cremosas
Cabernet Franc	Colonias rugosas, rosa claro, extendidas, cremosas. Colonias rugosas, blancas, pequeñas, secas.	Colonia fúngica color crema. Colonias lisas, amarillas, redondas y cremosas.	Colonias lisas, rosas con blanco, redondas y cremosas. Colonia fúngica color crema	Colonias rugosas, rosas con blanco, redondas y cremosas. Colonias rugosas, blancas y secas.
Sauvignon/ Malbec	Colonia rugosa, rosa con blanco, extendida, cremosa.	Colonias, lisas, amarillas, redondas y cremosas.	Colonia lisa, amarilla, redonda y cremosa.	Colonias rugosas, rosas, extendidas y cremosas. Colonias lisas, naranja, amarillas y blancas, redondas y cremosas
Tempranillo	Colonias fúngicas amarillas. Colonias rugosas, rosa con blanco, extendida, cremosa	Sin crecimiento de MO	Sin crecimiento de MO	Colonias rugosas, blancas y cremosas. Colonias lisas, blancas, beige y rosa claro, redondas y cremosas.

4.3. Diferenciación e Identificación de levaduras

La diferenciación de levaduras se realizó en un medio específico Agar –Lisina, lo que permitió la identificación de las cepas de levaduras *no-Saccharomyces*, resultaron positivas aquellas que crecieron en dos resiembras consecutivas sobre este medio, a partir de ese momento se le asignaron las letras NS por pertenecer al género *no-Saccharomyces*, seguido de un número para poder identificarlas entre ellas, identificando 14 cepas *no-Saccharomyces* representando el 46.7% del total de aislamiento.

Posteriormente se evaluó la pureza del cultivo, macroscópicamente; observando el color, textura y crecimiento de colonias, presentando homogeneidad en todos los cultivos (ver figura 31). Se confirmó la pureza, microscópicamente mediante tinción de Gram y tinción de cápsula, en donde todas las cepas se comportaron como Gram positivas, debido a la composición de la pared celular de la levadura, ya que sus principales componentes son polisacáridos (80-90%), esencialmente manano-proteínas y β - glucanos, que no son afectados por la decoloración con alcohol y/o acetona, reteniendo el colorante inicial (Suárez *et al.*, 2016; Rodríguez *et al.*, 2008).

Se logró observar con claridad la cápsula que envuelve a la levadura, todas las muestras presentaban la forma característica de levaduras donde algunas presentaron morfología ovoide (NS002, NS004, NS005, NS008, NS009 y NS0014), esférica (NS001, NS003, NS006, NS007, NS010), apiculada (NS011 y NS012) y elíptico alargada (NS013), incluso se observó algunas células en fase reproductiva (gemación), el tamaño de cada una de ellas oscilaba entre 0.4-1 μm (ver figuras 32 a la 34).

La prueba de actividad enzimática mediante microfermentaciones permitió identificar con actividad positiva a 11 levaduras de las 14 cepas seleccionadas como NS, tras finalizar la fermentación se procedió a realizar una evaluación sensorial para diferenciar la presencia de compuestos aromáticos producidos, obteniendo actividad positiva de producción de ácido sulfúrico, ácidos orgánicos, alcoholes superiores, ésteres y aldehídos, ver tabla 22.

Se obtuvieron 7 levaduras con los atributos buscados: notas frutales y florales (NS002, NS004, NS006, NS008, NS010, NS011 y NS014), de las cuales se seleccionaron solo aquella levadura que sensorialmente gustaron más en cuanto a sabor y olor, eligiendo las cepas NS008, NS010, NS011 y NS014, a las cuales se les realizó análisis químico y físico químico.



Figura 31. Diferenciación macroscópica.

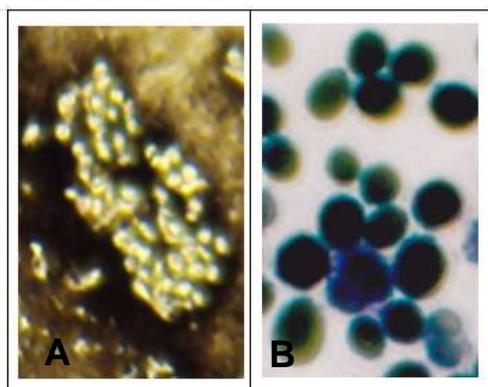


Figura 32. Morfología de tinción de cápsula A) y tinción de Gram y tamaño celular B) de *Saccharomyces cerevisiae*.

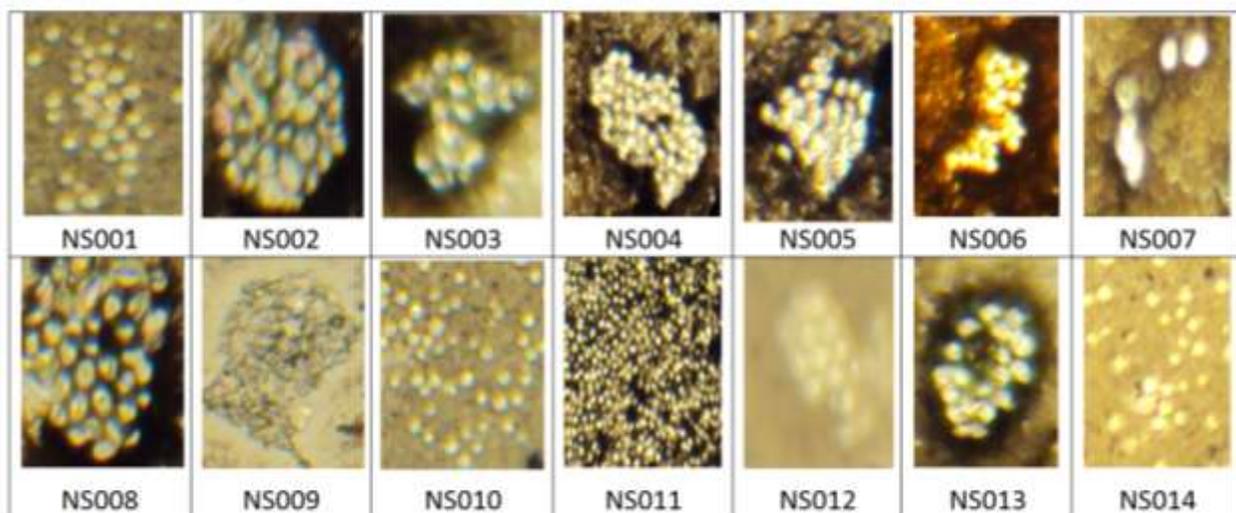


Figura 33. Morfología de tinción de cápsula de levaduras *no-Saccharomyces*.

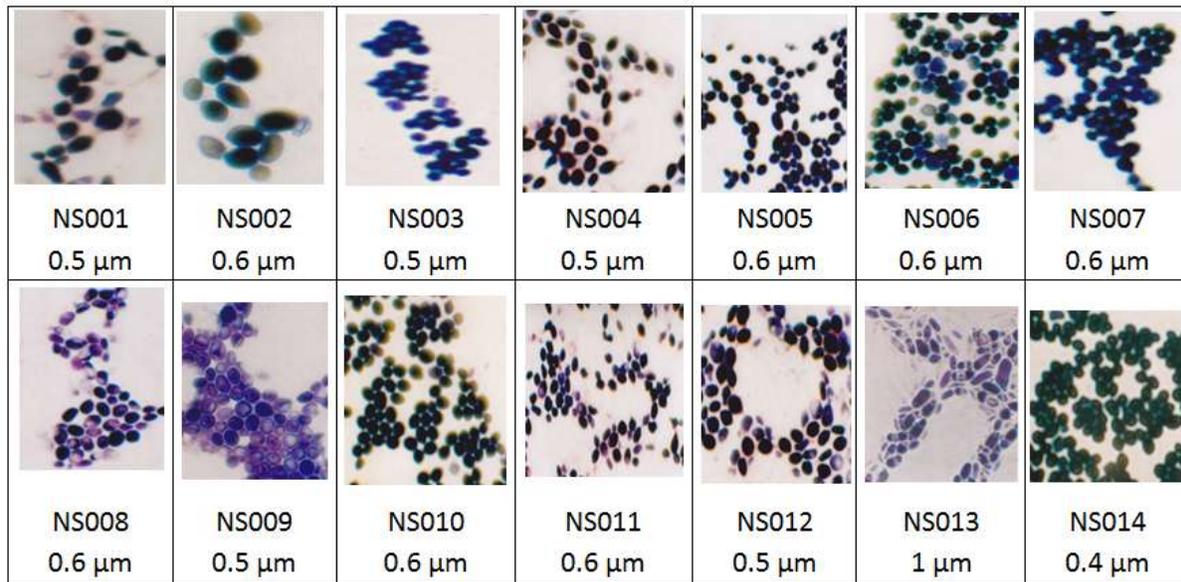


Figura 34. Morfología en tinción de Gram y tamaño celular de levaduras no-*Saccharomyces*.

Tabla 22. Descriptores de Flavor detectables en las muestras de levadura.

Levadura	Descriptor de Flavor.
SC	Floral y frutal
NS001	Ácido láctico, Sulfhídrico, a h huevo podridos.
NS002	Frutal, plátano, dulce, viscoso.
NS003	Ácida, Amarga, sudor.
NS004	Manzana verde, ligeramente ácida.
NS005	Sulfhídrico, a huevo podridos
NS006	Manzana verde, ligeramente ácida.
NS007	Floral, ligeramente acida.
NS008	Clavo, dulce, frutal.
NS009	Sulfhídrico, a h huevo podridos
NS010	Ácido, frutal.
NS011	Floral y frutal.
NS012	Sulfhídrico, a huevo podridos
NS013	Sulfhídrico, a huevo podridos
NS014	Manzana verde, ligeramente ácida.

*SC: *Saccharomyces cerevisiae*

4.4. Evaluación de los parámetros Químicos y Fisicoquímicos de levaduras no-*Saccharomyces* seleccionadas.

4.4.1. Parámetros químicos

➤ Aldehídos

En la figura 35 se muestra los resultados obtenidos de la determinación de aldehídos en las levaduras seleccionadas, así como el control "*Saccharomyces cerevisiae*" tras las micro fermentaciones, manifestando que el control fue la que presentó un menor contenido de Acetaldehído en comparación con las levaduras *no-Saccharomyces*, mostrando un valor de 18.3 mg/100 mL de Alc. Anhidro una cantidad sumamente menor a las obtenidas por NS, siendo la NS008 fue la que produjo mayor concentración de Acetaldehído con 183.3 mg/100 mL de Alc. Anhidro.

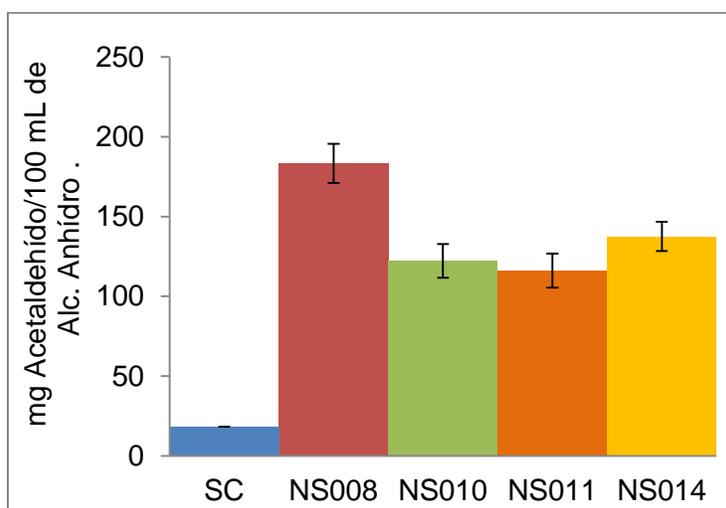


Figura 35. Determinación de Aldehídos en levaduras *no-Saccharomyces* y el control (SC: *Saccharomyces cerevisiae*).

Las cepas de levaduras SC y NS008 registrando diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en comparación con el resto de las cepas, uno de los factores más importante en la producción de este compuesto es la oxigenación del mosto. Carroscosa *et al.* (2005) indica que aeración excesiva puede llevar a la producción indeseable de acetaldehído y una menor producción de ésteres, como se puede ver en las figuras 35 y 36B, esta produjo la concentración mayor de Acetaldehído pero la una concentración mucho menor de Acetato de etilo.

➤ **Ésteres y Alcoholes Superiores**

En la figura 36 se exponen los resultados de Acetato de Etilo y AS, en este caso los resultados no presentaron un comportamiento proporcional en cuanto la producción de estos compuestos, siendo muy variado los resultados en consecuencia de diversos factores que intervinieron para su producción.

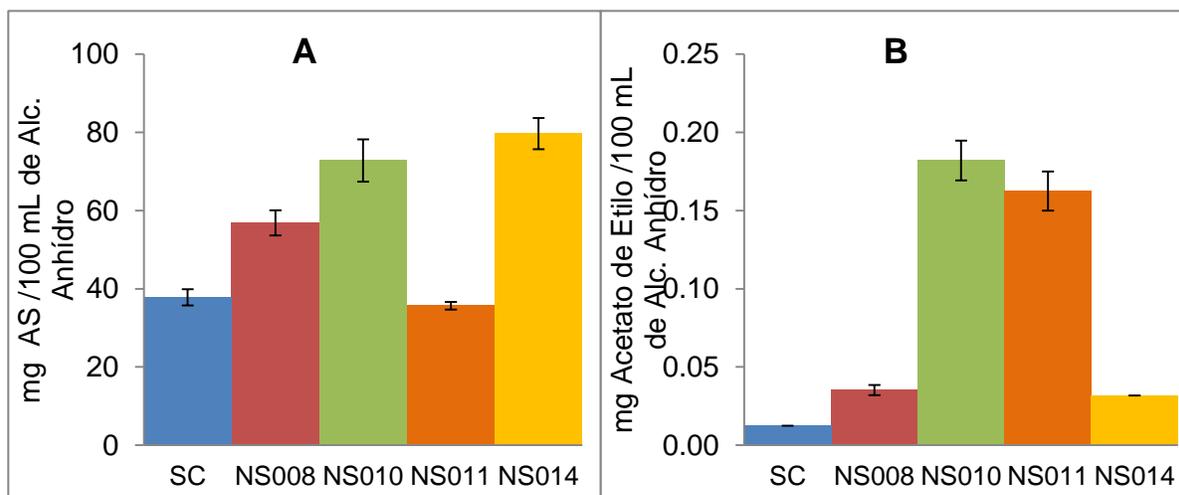


Figura 36. Determinación de Alcoholes Superiores A) y Ésteres B) de las levaduras *no-Saccharomyces* y el control (SC: *Saccharomyces cerevisiae*).

Saccharomyces cerevisiae mostró menor concentración de Acetato de Etilo con 0.013 mg/100 mL de Alc. Anhidro en comparación con las levaduras NS y un valor mayor de Alcoholes Superiores equivalente a 39.62 mg AS /100 mL de Alc. Anhidro y la levadura NS010 fue la que presentó mayor producción de Acetato de Etilo con 0.182 mg/100 mL de Alc. Anhidro y 72.78 mg AS /100 mL de Alc. Anhidro,

Las pruebas estadísticas realizadas mostraron que los Alcoholes Superiores producidos por las cepas *Saccharomyces cerevisiae* (SC) y NS011 no presentaron diferencia significativa ($p \geq 0.05$) y para el caso del Acetato de Etilo las cepas SC, NS010 y NS011 si presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en su producción, lo que nos indica que en este caso los alcoholes superiores producidos durante la fermentación no fueron precursores inmediatos de estrés, Baxter y Hughes (2004) menciona que el control de la formación de alcoholes superiores debe ser regulado para que a su vez controle la producción de estrés y que cierto número de factores influyen sobre los niveles de estos compuestos como; la aireación del mosto así como la cepa de levaduras, que en este

caso se estudiaron 15 cepas de levaduras. De igual manera si existe un crecimiento intenso de levaduras está relacionado con una excesiva producción de alcoholes superiores y la oxigenación del medio promueve su producción (Folch *et al.*, 2004).

➤ **%Alcohol Volumen**

En la figura 37 se observa que las cepas SC y NS008 no presentaron diferencia significativa ($p \geq 0.05$), registrándose una producción de alcohol de 4.5%, comportándose muy similares al degradar el azúcar, mostrando una relación directamente proporcional con el parámetro de GE, debido a que existe una relación entre el consumo de azúcares sobre la densidad y a su vez con la producción de alcohol.

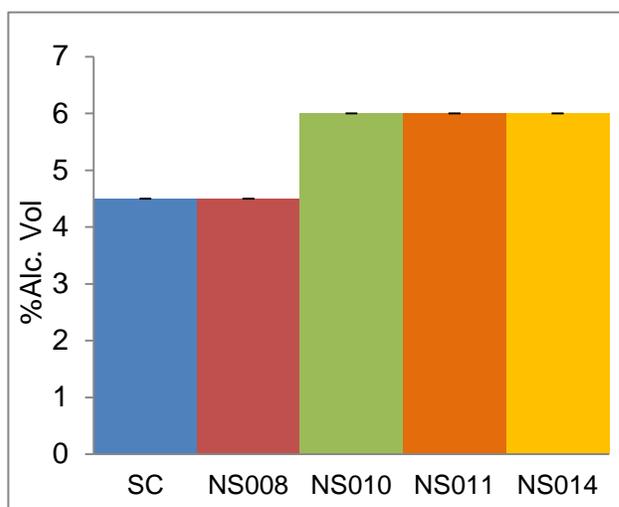


Figura 37. Determinación del % Alc. Vol. de las levaduras *no-Saccharomyces* y el control (SC: *Saccharomyces cerevisiae*).

En general las cepas produjeron de 4.5 a 6 % Alc. Vol. atenuando tras la fermentación hasta una gravedad específica de 1.032.

4.4.2. Parámetros fisicoquímicos

➤ Ácidos Orgánicos y pH

A la vista de la figura 38A se muestran que *Saccharomyces Cerevisiae* alcanzó un valor acidez total de 0.18 g/L y para las no-*Saccharomyces* los valores oscilan entre 0.15 a 0.25 g/L Ac. Acético.

Ortiz (2015) notifica valores de acidez total en cepas *Saccharomyces Cerevisiae* de 0.155-0.16 g/L Ácido Acético, por el contrario Comitini *et al.* (2011) consigna valores superiores de acidez total para *Saccharomyces Cerevisiae* de 0.33 a 0.52 g/L Ácido Acético. Con base a lo anterior se deduce que el valor obtenido para el control SC se encuentra dentro de estos intervalos de Acidez.

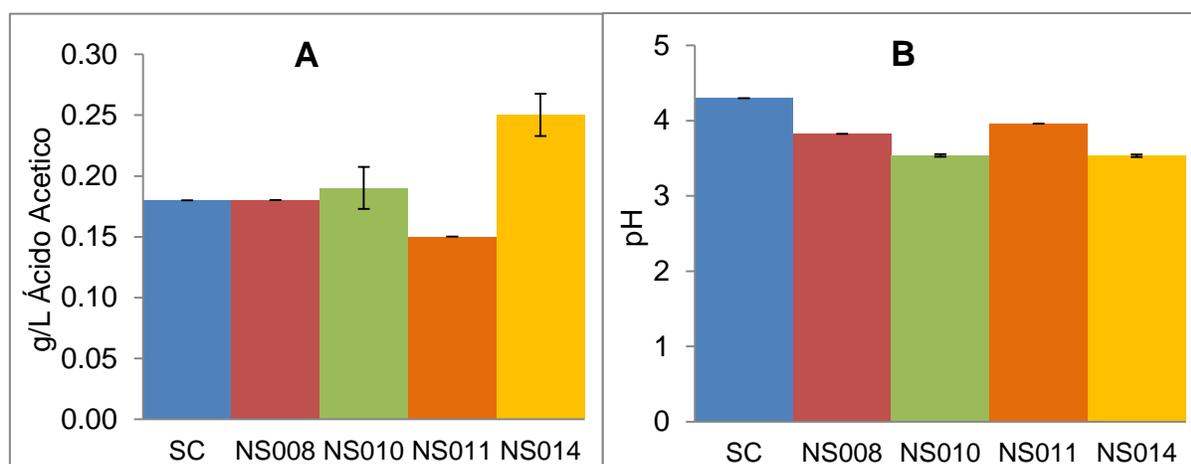


Figura 38. Determinación de Acidez Total A) y pH B) de las levaduras *no-Saccharomyces* y el control (SC: *Saccharomyces cerevisiae*).

Las cepas SC, NS008 y NS010 no presentaron diferencia significativa ($p \geq 0.05$) en la producción de Acidez Total con respecto a las otras cepas analizadas, esto se debe a la capacidad que tienen la cepa de levadura usada durante la fermentación, ya que el ácido acético es un metabolito que se produce dentro de la levadura por la hidrólisis de Acetil CoA (Hornsey, 2003).

En la figura 38B se percató que la levadura SC obtuvo un valor de pH de 4.3, valor que se encuentra dentro del intervalo de pH típico de la cerveza que varía entre 3.9- 4.4 (Baxter y Hughes, 2004). Las levaduras *no-Saccharomyces* mostraron valores de pH más bajos que fluctuaron entre 3.53 a 3.83, esto se debe a que las levaduras *no-*

Saccharomyces tienen la ventaja de soportar medios más ácidos ya que las fermentaciones alcohólicas vínicas se efectúan en condiciones con bajo valores de pH con niveles típico de 2.75 a 4.2 (Suaréz *et al.*, 2016; Miño *et al.*, 2011; Carrascosa *et al.*, 2005).

Las cepas que mostraron diferencia significativa de pH fueron SC, NS008 y NS011 esta variación de pH no suponen ningún problema, simplemente las levaduras *no-Saccharomyces* se desarrollan bajo condiciones de pH más severas. Por lo que se deduce que el uso de estas levaduras no incrementara los niveles de producción de ácido acético en la cerveza.

A la vista de la figura 39A se observa que la determinación de °Brix en las cepas analizadas fue diferente significativamente ($p \leq 0.05$), indicando con ello que la cepa usada, influyen significativamente sobre este valor. En general se obtuvo valores que fluctuaron en un intervalo de 8 a 10°.

En el caso del parámetro de GE (figura 39B) para las cepas de levaduras SC y NS008 no presentaron diferencia significativa ($p \geq 0.05$), lo que indica que durante la fermentación estas cepas se comportaron de manera similar sobre el consumo del sustrato. Debido a que existe una relación entre el consumo de azúcares, densidad y producción de alcohol, ambas cepas mostraron dicha relación apreciándolo en la figura 36 y 38B.

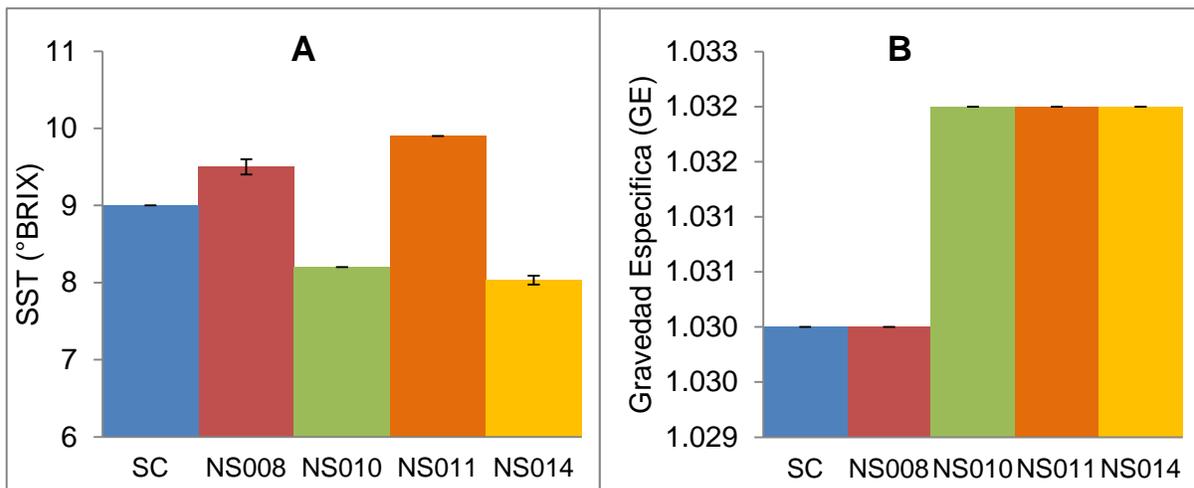


Figura 39. Determinación SST (°Brix) A) y Gravedad Específica (GE) B) de las levaduras *no-Saccharomyces* y el control (SC: *Saccharomyces cerevisiae*).

4.5. Cinética de fermentación de levaduras no-*Saccharomyces*; NS008, NS010, NS011 y NS014.

Una vez seleccionadas las cepas se procedió a realizar una cinética de fermentación, con el objetivo de determinar su poder fermentativo, consumo de sustrato y producción de biomasa.

Se realizaron 3 fermentaciones evaluando la cepas individualmente y una fermentación mixta; *Saccharomyces cerevisiae* (control), NS008 y NS014 individuales y fermentación mixta con las cepas NS010/NS011 a fin de evaluar si en conjunto potencializan el sabor.

La levadura SC presentó una cinética fermentativa correcta, mostrando las 7 fases de Bacha-nan de un cultivo microbiano, curva de; 1) *Latencia*, es el periodo de adaptación de los microorganismos al medio ambiente, durante el cual el número de células sembradas no sufre modificaciones o incluso disminuye. 2) *Fase de aceleración del desarrollo*, durante una o dos horas la multiplicación de los microorganismos se va haciendo cada vez más rápida, así como más intensa su actividad metabólica. 3) *Fase logarítmica de desarrollo*, en el cual el número de divisiones crecen durante unas horas con progresión geométrica. 4) *Fase de desarrollo ralentizado*, también llamada de aceleración negativa. Suele ser corta y en el microorganismo empieza a alargar el tiempo de generación. 5) *Fase de población máxima estacionaria*, aquí se establece un cierto equilibrio entre división y muerte celular, de forma que el número de individuos vivos permanece constante. 6) *Fase de mortalidad acelerada*, en el que le número de microorganismos que mueren aumenta a velocidad acelerada, siguiendo un curso muy diferente según la especie, hasta la completa degeneración de las células vivas (Suárez e Iñigo, 2004). Alcanzó una población máxima de 8×10^6 UFC/mL a las 24 horas.

Por otra parte la levadura NS008 mostró una cinética con problemas de arranque presentando una fase de latencia más prolongada, a los 2 días la levadura alcanzó la fase logarítmica de desarrollo y el crecimiento fue muy rápido logrando una población máxima de 9×10^6 UFC/MI. En cuanto NS010/NS011 al entrar en contacto con el mosto la población disminuyó, pese a ello se recuperó a las 6 horas respondiendo favorablemente al medio, alcanzando una población máxima de 8.7×10^6 UFC/ml, NS014 fue la cepa que se adaptó con mayor facilidad al medio, la cual alcanzo una población máxima de 8.7×10^6 (Figura 40), siendo esta la cepa con mayor arranque de fermentación, pero con problemas de finalización (Bernardi; 2013).

El estadístico realizado mostró que el control SC y la cepa NS008 no registraron diferencia significativa durante las primeras 12 horas de adaptación ($p \geq 0.05$), sin embargo a las 48 horas en la fase estacionaria estas cepas son las que mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) mostrando una diferencia gradual en la población máxima de crecimiento, finalmente en la etapa de mortalidad a las 120 horas la cepas SC, NS008 y NS014 no presentaron diferencia significativa ($p \geq 0.05$).

Como era de esperar el comportamiento de consumo de azúcares y producción de alcohol en las levaduras estudiadas fue satisfactoria, donde los valores de Gravedad Especifica (GE) y °Brix del mosto están directamente relacionados con la cantidad de azúcar, estos parámetros fueron disminuyendo a la par del consumo sustrato fermentable. Ver figuras de la 40 a la 42.

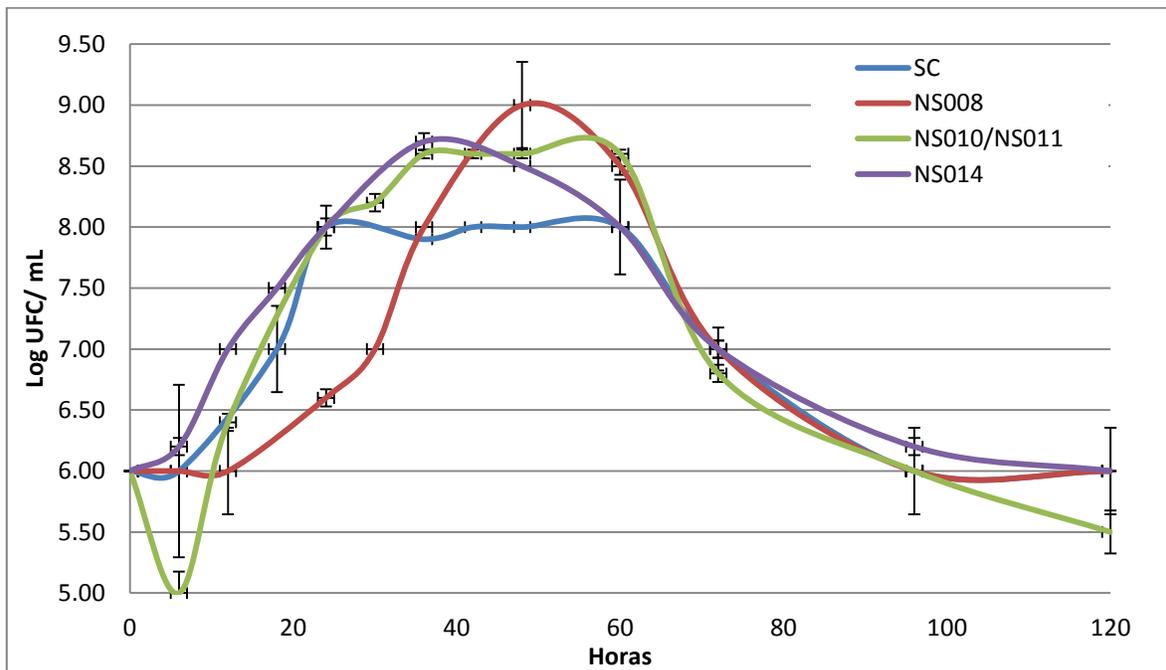


Figura 40. Cinética de crecimiento de levaduras *no-Saccharomyces* y el control (SC: *Saccharomyces cerevisiae*)

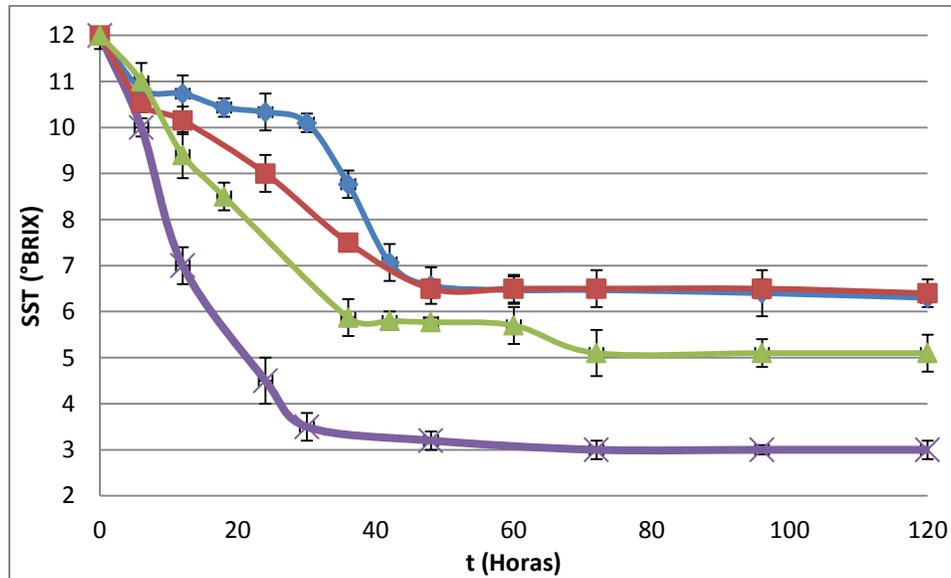


Figura 41. Cinética de consumo de azúcares de levaduras *no-Saccharomyces* y el control (SC: *Saccharomyces cerevisiae*).

En la figura 41 se muestra el comportamiento de las cepas sobre el consumo de los azúcares fermentables presentes en el mosto de cebada. En general la conducta de cada cepa durante toda la fermentación fue muy variable, siendo la cepa de levaduras y las condiciones de proceso los factores principales sobre las tendencias del consumo de sustrato fermentable.

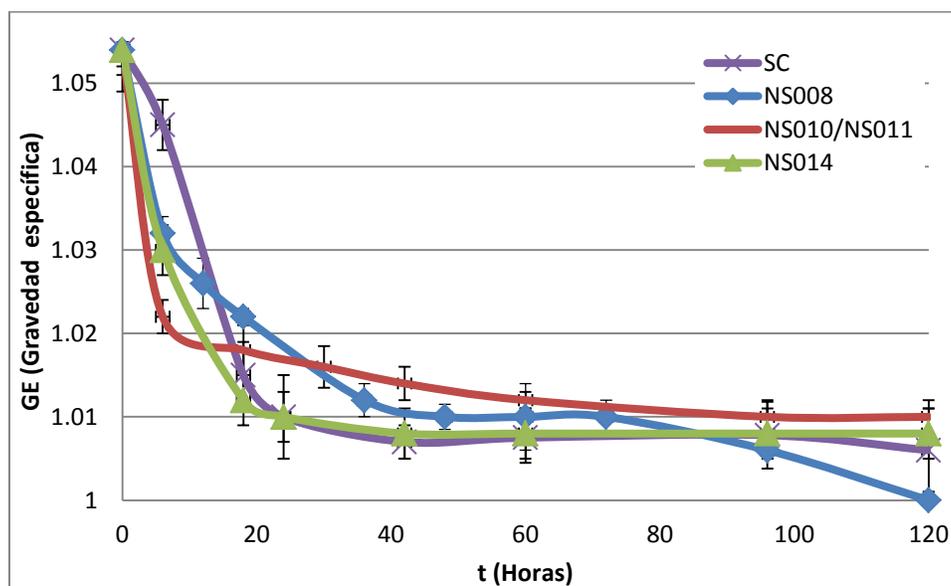
En condiciones anaerobias la levadura SC presentó un metabolismo más rápido de consumo de azúcar, con un consumo mayor de sustrato durante las primeras 30 horas obteniendo un valor final de 3 °Brix., en comparación con las cepas NS que presentaron un menor consumo de azúcar en condiciones aerobias, en especial le cepa NS008 mostrando un consumo lento hasta las primera 30 horas.

Miño *et al.* (2011) reporta comportamientos de consumó de sustrato fermentable similares a los obtenidos experimentalmente.

El estadístico realizado mostró que la cepa de SC a las 12 horas de la fermentación presentó diferencia significativa ($p \leq 0.05$), las levaduras NS008 y NS010/NS011 mostraron a las 48 y a las 120 horas un comportamiento de consumo de sustrato constante por lo tanto no presentaron diferencia significativa ($p \geq 0.05$).

La densidad y los °Brix del mosto están directamente relacionados con la cantidad de azúcar e indican el grado de avance de la fermentación. Como era de esperar la densidad fueron disminuyendo durante el proceso de fermentación; los cuales fueron disminuyendo por el consumo de azúcar fermentable (Miño *et al.*, 2011).

A la vista de la figura 42 las tendencias de la atenuación de las cepas tras la fermentación no fueron tan variables, observando que SC y NS014 muestran un comportamiento similar después de las 24 horas de fermentación. La cepa NS008 de las 12 a las 30 horas la atenuación presentada fue lenta, comportamiento que se relaciona con consumo de sustrato (°Brix) y %Alc. Vol.



*SC: *Saccharomyces cerevisiae*

Figura 42. Cinética de atenuación como gravedad específica de levaduras *no-Saccharomyces* y el control (SC: *Saccharomyces cerevisiae*).

Durante las primeras 12 horas de a ver transcurrido la fermentación todas las cepas analizadas presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) sobre los valores de gravedad específica obtenidos, mientras que a las 48 y 120 horas las cepas SC y NS008 mostraron la misma tendencia de atenuación por lo tanto no presentaron diferencia significativa ($p \geq 0.05$).

El porcentaje de alcohol volumen generados durante la fermentación fluctuaron de 5.5 a 6 % Alc. Vol. Las cepas de SC y NS014 se comportaron de manera similar hasta las 48 horas de haber transcurrido la fermentación, las cepas mixtas NS010/NS011 mostraron un metabolismo de producción del alcohol muy rápido durante las 18 a las 42 horas. La cepa NS008 mostró un comportamiento de producción de alcohol lento, este comportamiento está relacionado con el consumo lento de azúcar y gravedad específica que presentó antes de las 36 horas de fermentación (ver figura 41 y 42).

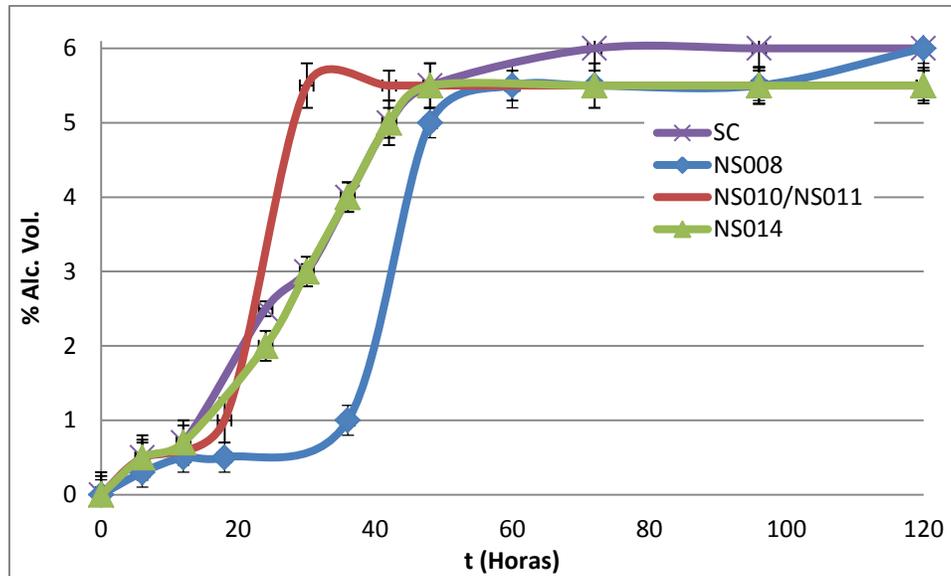


Figura 43. Cinética de % Alcohol Volumen de levaduras no-*Saccharomyces* y control (SC: *Saccharomyces cerevisiae*).

Para el caso de las levaduras *no-Saccharomyces* este comportamiento se encontró asociado a la etapa de crecimiento de la levadura (*Fase logarítmica de desarrollo*), generando el aumento de la producción de alcohol, determinado con ello que un metabolito asociado al crecimiento (Hornsey, 2003; Miño *et al.*; 2011).

Durante las primeras 12 horas de a ver transcurrido la fermentación todas las cepas analizadas no presentaron diferencia significativa ($p \geq 0.05$) en la producción de alcohol, tras las 48 horas la cepa NS008 mostro diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a las demás y al finalizar la fermentación (120 horas) la NS014 mostro diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

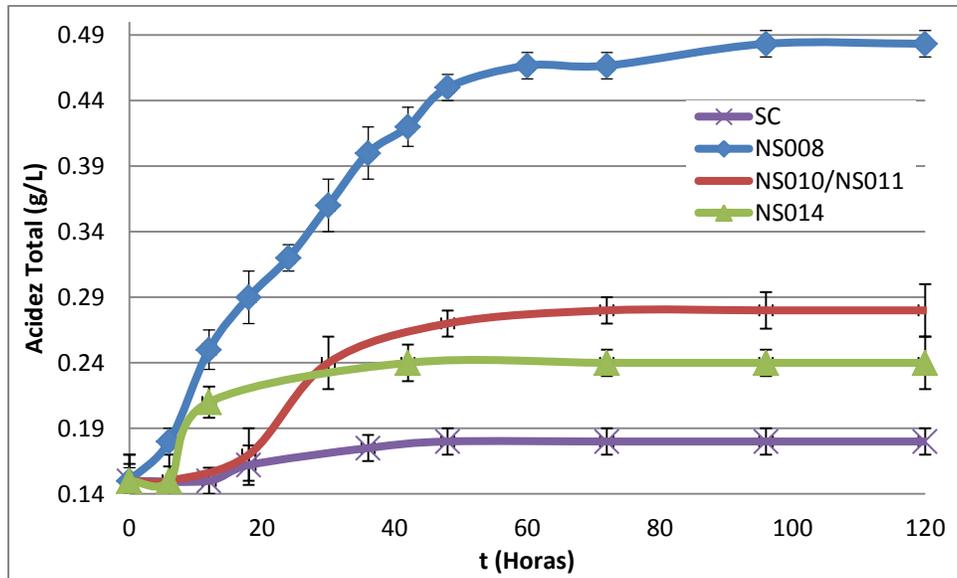


Figura 44. Cinética de producción de acidez total de levaduras no-*Saccharomyces* y el control (SC: *Saccharomyces cerevisiae*).

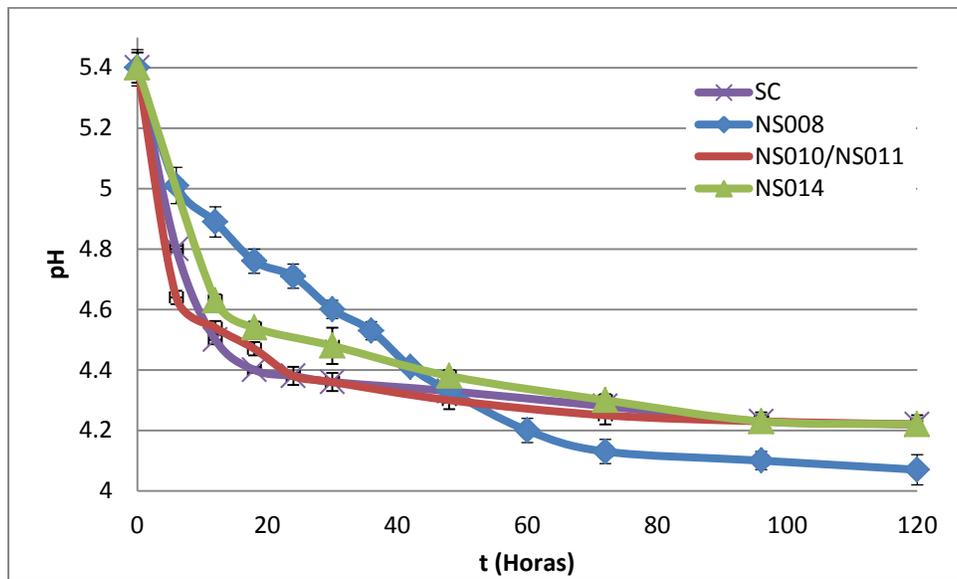


Figura 45. Cinética de cambio de pH de levaduras no-*Saccharomyces* y el control (SC: *Saccharomyces cerevisiae*).

Retomando el hecho que existe una relación inversamente proporcional entre la producción de acidez total y pH, las tendencias de la producción de ácido acético y pH fueron muy variables. La cepa SC presento en general una concentración baja de acidez total durante la fermentación, lo cual era de esperarse ya que las cepas del género *Saccharomyces cerevisiae* producen una concentración mínima de ácido acético durante la fermentación (Baxter y Hughes, 2004), obteniendo una acidez final de 0.18 g/L Ac. Acético y un pH 4.22, en cuanto a la cepa NS008 está presente una la mayor

concentración de Acidez Total durante toda la fermentación y un acidez 0.48 g/L Ac. Acético, con un pH de 4.07.

En general el desempeño de las levaduras cubrió las expectativas, los valores de acidez obtenidos por las levaduras son similares a los reportados por Comitini (2011) en cultivos mixtos de cepas de *Candida zemplinina*, *Tolraspora delbrueckii*, *Metshnicowia pulquérrima*. Por lo contrario a Ortiz *et al.* (2015), el cual notifica valores de acidez total menores (0.1 a 0.210 g/L g/L Ácido Acético) en cultivos mixtos de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces cerevisiae*, al igual que Jolly *et al.* (2003) declara valores semejantes de acidez total en cultivos mixtos con: *Candida colliculosa/Saccharomyces cerevisiae*, *Cándida stellata/Saccharomyces cerevisiae*, *Klockera apiculada/Saccharomyces cerevisiae*.

Los análisis estadísticos arrojaron que la producción de Acidez y pH mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre las cepas durante todo el proceso.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados anteriores se concluye lo siguiente:

- Los parámetros químicos como; ésteres, aldehídos, Alcoholes Superiores, % Alc. Vol. y los parámetros fisicoquímicos como: pH, Acidez, °Brix y GE, cuyos valores hasta el día de hoy no han sido reportados para cervezas artesanales mexicanas cumplen con las Normas de calidad establecidas (NOM-142-SSA1/SCFI-2015 y PROY NOM-199-SCFI-2015), sin embargo el contenido de aldehídos y % Alc. Vol. en la cerveza Leffe presentaron ligeras variaciones con respecto a las otras cervezas analizadas, por lo que es sumamente importante conocer y controlar las condiciones de proceso, adjuntos y cepa a usar para su elaboración.
- La calidad de las cervezas está en función del control de determinados parámetros durante su elaboración como; temperatura, aeración y la cepa usada.
- La adición de adjuntos durante la elaboración de la cerveza como frutos rojos, presentó un efecto significativo en la determinación de pH incrementado la concentración de iones H^+ que provienen de los ácidos que aportaron dichos frutos (ácido cítrico y ascórbico), generando de igual forma la acidificación de la cerveza. Mostrando la cerveza Leffe valores de pH y Acidez dentro de la normatividad (PROY NOM-199-SCFI-2015).
- El tipo de muestra usada para el aislamiento de las cepas de levaduras mostró un crecimiento variable de colonias desde fúngicas, bacterias y levaduras, logrando aislar 30 cepas de las cuales 14 pertenecen al género no-*Saccharomyces*.
- Las cepas identificadas como NS mostraron la cápsula envolvente característica de las levaduras y comportamiento como Gram positivas, debido a la composición de la pared celular de la levadura, dichas levaduras presentaron morfologías variables; ovoide, esférica, apiculada y elíptico alargada que oscilaban de tamaño de 0.4-1 μm .
- La selección de las levaduras no-*Saccharomyces* para uso como agentes fermentativos en la elaboración de cerveza se eligieron en base a los atributos buscados: notas frutales y florales obtenidos tras microfermentaciones seleccionaron solo aquella levadura que sensorialmente gustaron más en cuanto a sabor y olor; NS008, NS010, NS011 y NS014.

- En general la cepas estudiadas SC y NS manifestaron una tasa de crecimiento logístico, a medida que transcurrió la cinética de fermentación, la tasa de crecimiento se redujo conforme al tamaño poblacional alcanza su máximo tamaño.
- La determinación de % Alcohol Volumen y °Brix de levaduras *no-Saccharomyces* seleccionadas, presentaron una variación significativa respecto al control, manifestando un comportamiento cinético de fermentación que podría indicar un comportamiento similar al modelo de Monod, siendo la cepa SC que presentó una mayor velocidad de consumo de sustrato y producción de alcohol y la cepas NS014 la que presentó valores similares a ésta.
- Levaduras *no-Saccharomyces* tienen la ventaja de soportar medios ácidos con bajo valores de pH con niveles típico de 2.75 a 4.2, es adecuado para la producción de cerveza artesanal.

Como era de esperar el comportamiento de cinético de consumo de sustrato y producción de alcohol en las levaduras estudiadas fue satisfactorio. En general el desempeño de las levaduras cubrió las expectativas en cinética de consumo de sustrato, producción de alcohol y productos volátiles (estrés y aldehídos), siendo la cepa NS014 la que se comportó durante la cinética similar a la cepa control y la cepa NS008 en producción de compuestos volátiles. De acuerdo a la clasificación de Gaden podría indicarnos un comportamiento tipo 2 para la *Saccharomyces cerevisiae* y un comportamiento tipo 1 para levaduras *no Saccharomyces*.

RECOMENDACIONES

Para poder complementar el presente trabajo se recomienda:

- Realizar una evaluación sensorial (prueba de preferencia) con la aplicación de las levaduras *no Saccharomyces* en cerveza artesanal, con el objetivo es determinar si las cervezas fermentadas con estas cepas son del agrada del consumidor.
- Realizar una caracterización molecular mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de las levaduras *no Saccharomyces* seleccionas.
- Realizar pruebas más específicas fermentativas a las levaduras *no Saccharomyces* seccionadas que ayuden a las caracterizaciones genéticas.

REFERENCIAS

- ACERMEX (Asociación Cervecera de la República Mexicana) (2016). Estado de la Industria Cervecera 2016-2017.
- Aleixandre, J. y Álvarez, M. (2003). Tecnología enológica. Síntesis. España.
- Archundia, B. (2014). Cerveza Artesanal Elaborada con Miel de Abeja Mexicana. Tesis para obtener el grado de Químico de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- Arévalo, M. (2005). Estudio de la actividad β -Glucosidásica en levaduras vínicas y su aplicación en enología. Tesis doctoral. Universidad de Castilla, Facultad de Ciencias Químicas. España.
- Arteaga, R. (2013). México Puede Convertirse en el Próximo Rey de la Cerveza Artesanal. Fecha de consulta: 16/nov/2017. Disponible en: <http://cerveceriaretono.com/?p=102>.
- Baxter, D. y Hughes, P. (2004). Cerveza: Calidad e higiene y características nutricionales. Zaragoza, España. Acribia.
- Belda, I., Ruiz J., Alonso, A., Marquina, D., Navascués, E. y Santos, A. (2016). Actividades enzimáticas de levaduras *no Saccharomyces* para su aplicación enológica. Fecha de Consulta: 20/Jul/2017. Disponible en: <http://www.agrovin.com/blog/wp-content/uploads/2015/07/ACE1.pdf>
- Bernardi, A. (2013). Selección de levaduras vínicas provenientes de la providencia de Mendoza, Tesina para obtener el grado de licenciada en Bromatología. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza. Argentina.
- Blogger (2014). Métodos y técnicas de tinción bacteriana, Microbiología. Disponible en: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.mx/2014/10/metodos-y-tecnicas-de-tincion.html>. Consultado; 10/01/2018.
- Carrascosa, A., Muños, R. y González, R. (2005). Microbiología del vino. A. Madrid Vicente. España.
- Carrau, F. (2005). Levaduras nativas para enología de mínima intervención, selección y caracterización. Agrociencia. Vol. 9 N° 1 y No. 2 pp. 387- 399.
- Carvajal, M.L.& Insuasti, A. M. (2010). Elaboración de cerveza artesanal utilizando cebada (*hordeum vulgare*) y yuca (*manihot esculenta crantz*). Tesis para obtener el grado de Ingenieros Agroindustrial. Universidad técnica del norte. Facultad de ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Ecuador.

- Casas, A., Aguilar, C., De la Garza, H. Morlett, J; Montet, D.,y Rodríguez, R. (2015). Importancia de las levaduras *no-Saccharomyces* durante la fermentación de las bebidas alcohólicas. *Investigación y Ciencia*, Vol. 23, Núm. 65, pp. 73-79.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I. y Ciani, M. (2011). Selected *non-Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food microbiology*, Vol. 28. No. 5. pp. 873-882.
- Coriat, S. (2014), La cerveza se rejuvenece y conquista los locales más 'trendy'. Conoce sus tipos, secretos y templos. Fecha de consulta: 13/01/2017 Disponible en: <http://cervezagoose.com/elle-gourmet-reportaje-de-cerveza-artesana>.
- Díaz, A. (2009). Reciclado de Orujo de Uva como medio sólido de fermentación para la producción de enzimas hidrológicas de interés Industrial. Tesis para obtener el grado de Doctora para universidad de Cádiz. Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias. España.
- Escobedo, R. (2010). Directrices para la aplicación de HACCP en la elaboración de cerveza. Tesis para obtener el grado de Químico de Alimentos. Universidad nacional autónoma de México. Facultad de Química. México.
- Estela, W., Rychtera, M., Melzoch, K., Torres, F., Calixto, R., Bravo, N., Memenza, M. & Chávez, Y. (2014). Efecto de la aireación en la producción de compuestos volátiles por cultivo mixto de *Brettanomyces intermedius* *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación de sidra. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. Vol. 17. No. 1, pp. 5-14.
- Folch, J., Garay, A, Lledías, F. y Covarrubias, A. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*
- Galindo, P. R. (2004) .Desarrollo de condiciones metodológicas para elaborar cerveza Ale a nivel laboratorio. Tesis para obtener el grado de Químico de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de química. México.
- Galindo, R. (2004). Desarrollo de condiciones metodológicas para elaborar cerveza Ale a nivel Laboratorio. Tesis para obtener el grado de Químico de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- García, H. (2014). Técnicas y Métodos de estriado en caja y tubo (medios de cultivo). Fecha de consulta: 20/Jul/2017 Disponible en:

<http://microbiologia3bequipo5.blogspot.mx/2014/10/tecnicas-y-metodos-de-estriado-en-caja.html>. Consultado: 15/03/16.

- García, M. (2009). Biotecnología de alimentos. Limusa. México.
- Giorello, F., Martín, V., Fariña, L., Boido, E., Medina, K., Dellacassa, E., Berna, L., Aguilar, P., Gaggero, C. y Carrau, F. (2014). ¿*Saccharomyces* o *no-Saccharomyces*? Biodiversidad para incrementar complejidad sensorial. Jornada de difusión de resultados y propuestas de líneas de investigación vitivinícola. Universidad de la República Uruguay. Facultad de Química. Uruguay.
- Góngora, T. (2014). Desarrollo de una cerveza artesanal sabor Jamaica determinando los atributos sensoriales mediante el uso del análisis descriptivo cuantitativo. Tesis para obtener el grado de Ingeniera en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México.
- González S., Muñiz, P. y Valls, V. (2001). Actividad antioxidante de la cerveza: estudios In vitro e In vivo. Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Burgos Departamento de Pediatría, Ginecología y Obstetricia. Universidad de Valencia. Disponible: http://www.cervezaysalud.es/wp-content/uploads/2015/05/Estudio_8.pdf.
- Gutiérrez, A., Santamaría, M., López R. y Sevilla M. (1995). Selección de levaduras vínicas en la denominación de origen calificada rioja. Zulia monográfico. No. 7. pp. 103-111.
- Heredia, A. (2015). Cuantificación de compuestos que contribuyen en el aroma de la cerveza por micro extracción en fase sólida seguida por cromatografía de gas-espectrometría de masa. Tesis para obtener al grado de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de química. México.
- Hornsey, I. (2003). Elaboración de cerveza, microbiología, bioquímica y Tecnología. Acribia. España.
- Ibañez, A. (2013). Determinación de compuestos congenéricos en cerveza elaborada a partir de mosto de alta gravedad. Tesis para obtener el grado de Químico en alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- Jolly, N., Augustyn, O., y Pretorius, I. S. (2003). The effect of *non-Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. South Africa Journal of Enology and Viticulture. Vol. 21. No. 2. Pp. 55-62.

- Kobayashi M., Shimizu H., Shioya S. (2008). Beer Volatile Compounds and Their Application to Low-Malt Beer Fermentation Journal of Bioscience and Bioengineering. 106:317-323.
- López , F. (2016). Estudio de la viabilidad del método de granos gastados para la elaboración de cerveza artesanal. Tesis para obtener al grado de Ingeniero en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México.
- López, J. ,Camarillo, K. , Becerra, L. y Peña, L. (2013). Medición de densidad de líquidos mediante hidrómetros y procesamiento de imágenes digitales. Memorias del XIX congreso internacional anual de la somim 25 al 27 de septiembre, 2013. Pachuca, Hidalgo. México.
- Lucio, O., Polo, L., Pardo, I. y Ferrer, S. (2009). Universidad de Valencia. Facultad de Biología. GENIOL. pp.253-256.
- Miño, J., Herrera, J. y González.. (2011). Microvinificaciones con levaduras nativas y uvas isabella cultivadas en Misiones. Universidad Nacional de Misiones. Centro Azúcar. Vol.38.No. 4. pp.47-52.
- NMX-F-103-1982. Alimentos. Frutas y derivados. Determinación de grados Brix. Disponible en: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-103-1982.PDF>
- NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Disponible en: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-317-S-1978.PDF>.
- NMX-V-013-NORMEX-2005. Bebidas Alcohólicas-Determinación del Contenido Alcohólico (Por ciento de Alcohol en Volumen a 293 K) (20°C) (% Alc. Vol.) Disponible en: dof.gob.mx/nota_to_doc.php?codnota=4917328.
- NMX-V-015-NORMEX-2014. Bebidas alcohólicas-determinación de acidez total, acidez fija y acidez volátil-métodos de prueba. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5387317&fecha=31/03/2015.
- NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>.
- NOM-142-SSA1/SCFI-2014. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial. Disponible: <https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0OahUKEwjKseWwpdnXAhXhQ98KHQu3CHQQFggmMAA&url=http%2F%2Fwww.colpos.mx%2Fbancodenormas%2Fnmexicanas%2FNMX-F-103-1982.PDF>

[3A%2F%2Fwww.dof.gob.mx%2Fnota_detalle.php%3Fcodigo%3D5386313%26fecha%3D23%2F03%2F2015&usq=AOvVaw0G4QN8xkufdYDAQf7cD7nP](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=3D5386313%26fecha%3D23%2F03%2F2015&usq=AOvVaw0G4QN8xkufdYDAQf7cD7nP).

- Ocón M. (2015). Diversidad de levaduras *no-Saccharomyces* en diferentes ecosistemas vitivinícolas. Tesis para obtener el grado de doctora. Universidad de la Rioja.
- Ojeda, B.P. (2012). Efecto de la temperatura sobre la producción de congénicos de importancia en la fermentación alcohólica en la elaboración de cerveza lager. Tesis para obtener el grado de Químico de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- Olvera, C. A. (2013). Determinación de compuestos volátiles y semivolátiles en cerveza por microextracción en fase sólida- cromatografía de gases- espectrometría de masas y su relación con el perfil sensorial. Tesis para obtener el título de Químico de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- Ortiz, E., Miranda, D., Arvizu, S., Pacheco, J., Aldrete, J., Hernández, M. y Martínez, R. (2015). Potencial enológico de levaduras *no Saccharomyces* nativas de viñedos establecidos en Querétaro. Revista Chapingo. Vol.XXI, No. 2, pp.159-170.
- Ortiz, E. (2013). Identificación de una cepa de levadura con potencial de reiniciar fermentaciones vínicas estancadas: una caracterización cinética. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y tecnología de alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias. México.
- Parker, D. (2012). Beer: production, sensory characteristics and sensory analysis. Ciudad de edición: Woodhead Publishing.
- Pavsler, & Buiatt, S. (2009). Non-lager beer. Beer in health and disease prevention. USA. Preedy V.
- PROY-NOM-199-SCFI-2015. Bebidas alcohólicas-Denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial métodos de prueba. Disponible: http://dof.gob.mx/nota_to_doc.php?codnota=5502882.
- Rainier, S. & Pretorius I.S. (2000) Selection and improvement of wine yeasts. Annals of Microbiology, No. 50. pp.; 15-31.
- Reyes, A. (2010). Proceso para elaboración de cerveza artesanal a partir de cebada *Esperanza Hordeum vulgare*. Tesis para obtener el grado de Químico de Alimentos. Universidad nacional autónoma de México. Facultad de Química.

México.

- Reynoso, Ma., Magnoli, C., Barros, G. y Mirta, D. (2015). Manual de microbiología General. Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina
- Robles, E. (2012). Desarrollo de una formulación para obtener cerveza saborizada adicionando concentrado de frutas. Tesis para obtener el grado de Ingeniera en Alimentos. Universidad nacional autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México.
- Rodríguez, L., Páez, J.B., Rutiaga, O.M., Rojas, J.A., Ruiz Baca e., Gutiérrez, G., Barrio, E. y Soto, N. (2014). Identificación de una cepa de levadura con potencial de reiniciar fermentaciones vínicas estancadas: una caracterización cinética. Cyta. Vol. 12, No. 1, pp. 1–8.
- Rodríguez, H. (2003). Determinación de Parámetros Físicoquímicos para la caracterización de Cervezas Tipo Lager por la Compañía Cervecería Kunstmann S.A. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Ingeniería en Alimentos. Chile.
- Rodríguez, M., Pérez, M. y Bocourt, R. (2008). Componentes de la pared de las levaduras: actividad prebiótica. Universidad de Matanzas. Cuba.
- Salinas, N. (2013). Estudio de los parámetros de elaboración de harina de Bagazo de Uva para la obtención de un producto con propiedades funcionales. Tesis para obtener el grado de Ingeniero en Alimentos. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Chile.
- Sánchez, A. (2011). Fermentación de malta empleando un sistema semicontinuo en el proceso de elaboración de cerveza. Tesis para obtener el grado de Ingeniero en Alimentos. Universidad Tecnológica de la Mixteca. México.
- Santambrosio, E., Ortega, M. y Garibaldi, P. (2009). Tinción y observación de microorganismos. Cátedra De Biotecnología. Universidad Tecnológica Nacional . Facultad Regional Rosario. Argentina.
- Santos, M. (2016). Evaluación enológica de co-inoculación de levaduras *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces* en vinos chilenos. Para obtener el grado Ingeniero Químico. Universidad Politécnica de Madrid. Facultad de Química. España.
- Shirai, Keiko., Mullica, Frida. (2013). Manual de prácticas de laboratorio Tecnología de Fermentaciones Alimentarias. Universidad Autónoma Metropolitana. Ciencias Biológicas y de la Salud, México.

- Suárez, C., Garrido, N. & Guevara, C. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar. Vol. 50, No. 1. pp. 20-28..
- Suárez, J. e Iñigo, B. (2004). Microbiología enológica. 3ª Edición. Grafo. España
- Suárez, M. (2013). Componentes y propiedades de la cerveza. Trabajo fin de Master Universitario en Biotecnología Alimentaria. Universidad de Oviedo. España.
- Sweet, C. (2014). Y tú ¿ya probaste una cerveza artesanal mexicana?. Fecha de consulta: 13/01/2017, Disponible en: <https://www.directopaladar.com.mx/bebidas/y-tu-ya-probaste-una-cerveza-artesanal>.
- Torija, Ma. (2002), Ecología de levaduras: selección y adaptación a fermentaciones vínicas. Memoria para obtener el grado en Doctora en Bioquímica. Universidad Rovira I Virgili. Facultad de Enología.
- Venenzi, L. (2014). Estudio de Métodos de extracción de compuestos fenólicos de orujo provenientes de vinificación de uvas cv Melbec. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Bromatología. Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias.
- Vera, A., Santiago, P. y López, M. (2009). Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de *Agave angustifolia* AND *Agave potatorum*. *Fototeca*. Vol. 32 No. 4. Disponible: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802009000400005.
- Viana, F. (2011). Levaduras *no-Saccharomyces* para modular el aroma secundario de los vinos; incremento del acetato de 2-feniletilo mediante cultivos iniciadores mixtos. Memoria para obtener el grado como Doctor por la Universidad. Universidad Politécnica de valencia. Departamento de Tecnología de Alimentos. España.
- Zúñiga, M. (2005). Caracterización de fibra dietaria en orujo y capacidad antioxidante en vino, hollejo y semillas de uva. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Chile.