

# **UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## **T E S I S**

Caracterización del crecimiento de  
levaduras durante la producción de  
cerveza artesanal

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

**JONATHAN ALEXIS ÁLVAREZ  
SEPÚLVEDA**

Directora

ALMA GABRIELA VERDUGO VALDEZ

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Octubre de 2024



**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS**  
**SECRETARÍA GENERAL**  
**DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR**  
**AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN**

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas;  
Fecha: 3 de octubre de 2024

C. Jonathan Alexis Álvarez Sepúlveda

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

**Caracterización del crecimiento de levaduras durante la producción de cerveza artesanal**

En la modalidad de: Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

**Revisores**

Dr. Javier Gutiérrez Jiménez

Mtra. María Esther Molina Ruiz

Dra. Alma Gabriela Verdugo Valdez

**Firmas:**

Cop. Expediente

## **Agradecimientos**

Gracias totales a todas las personas y entidades que me apoyaron a la realización de esta tesis: Gracias a mi asesora de tesis, la Doctora Alma Gabriela Verdugo Valdez por el tiempo, la dedicación y la paciencia que demostró a lo largo de la elaboración de este documento.

A Evelyn Alicia Molina de la Cruz, por la motivación, los ánimos y los apoyos brindados a lo largo del tiempo que me tomó hacer este documento.

A la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, por mi preparación académica y por el apoyo de las instalaciones donde se llevó a cabo el proyecto de investigación.

A mis padres, por apoyarme económicamente y anímicamente para poder realizar este proyecto.

## Índice general

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO .....	3
2.1. Generalidades de la cerveza .....	3
2.1.1. Cerveza .....	3
2.1.2. Cebada .....	3
2.1.3. Lúpulo .....	4
2.2. Levaduras .....	4
2.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	4
2.2.2. <i>Saccharomyces pastorianus</i> .....	5
2.3. Condiciones de crecimiento de las levaduras .....	6
2.3.1. Temperatura .....	6
2.3.2. Presión osmótica .....	6
2.3.3. pH .....	7
2.3.4. Oxígeno .....	7
2.3.5. Nutrientes .....	7
2.3.6. Fases de crecimiento .....	8
2.4. Determinación Azúcares reductores .....	9
2.5. °Brix y Refractómetro .....	10
2.6. Fermentación .....	11
2.6.1. Fermentación alcohólica .....	11
2.7. Sistemas de fermentación .....	11
2.7.1. Fermentación por lote .....	12
2.7.2. Fermentación alimentada .....	12
2.7.3. Fermentación continua .....	12
2.8. Efecto Pasteur y efecto Crabtree .....	13
2.8.1. El efecto Pasteur .....	13
2.8.2. Efecto Crabtree .....	13
2.9. Parámetros cinéticos de interés .....	14
2.9.1. Velocidad específica máxima de crecimiento .....	14
2.9.2. Constante de afinidad al sustrato .....	15
2.9.3. Rendimiento de biomasa y de producto con base a sustrato .....	15
III. ANTECEDENTES .....	15
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	20
V. JUSTIFICACIÓN .....	22

<b>VI. OBJETIVOS</b> .....	22
6.1. Objetivo general .....	22
6.2. Objetivos específicos .....	22
<b>VII. ZONA DE ESTUDIO</b> .....	23
<b>VIII. MÉTODOS</b> .....	23
8.1. Recetas de las cervezas .....	23
8.1.2. Estilo de cerveza IPA .....	24
8.1.3. Estilo de cerveza Cream Stout .....	25
8.1.4. Estilo de cerveza Strong Blonde .....	25
8.2. Proceso de elaboración .....	26
8.2.1. Maceración, hervor y traslado .....	26
8.2.2. Fermentación .....	27
8.2.4. Toma de muestras .....	29
8.3. Determinación de compuestos .....	29
8.3.1. Medición de azúcares reductores .....	30
8.3.2. Porcentaje de sólidos totales .....	32
8.3.3. Porcentaje de alcohol .....	33
8.3.4. Crecimiento poblacional .....	33
8.3.5. Determinación de parámetros cinéticos .....	34
8.3.6. Diseño experimental y análisis estadístico .....	35
<b>IX. RESULTADOS</b> .....	37
9.1. Estilo Stout .....	37
9.3. Estilo Strong Blonde .....	40
9.4. Parámetros cinéticos .....	41
9.5. Análisis estadístico .....	41
<b>X. DISCUSIÓN</b> .....	43
10.1. Estilo stout .....	43
10.2. Estilo IPA .....	44
10.3. Strong Blonde .....	45
10.4. Parámetros cinéticos .....	45
<b>X. CONCLUSIÓN</b> .....	46
<b>XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES</b> .....	49

## Índice de figuras

Figura 1. Fases ocurridas durante el crecimiento de un microorganismo en un cultivo por lote (Hernández, 2003). .....	9
Figura 2. Mapa y localización de la UNICACH.....	23
Figura 3. Estilo de cerveza IPA .....	24
Figura 4. Estilo de cerveza Cream Stout.....	25
Figura 5. Cerveza estilo Strong Blonde.....	26
Figura 6. Equipo de elaboración BrewZilla®. ....	27
Figura 7. Cubeta de fermentación .....	28
Figura 8. Levadura usada para fermentar los lotes de cerveza CellarSciencie®. .	29
Figura 9. Preinóculo y activación de levadura. ....	29
Figura 10 . Solución patrón de fructosa.....	32
Figura 11. Refractómetro de mano marca Anpro® (EUA).....	32
Figura 12. Cámara de Neubauer utilizada para el conteo directo. ....	33
Figura 13.- Cuadros destinados a conteo en cámara de neubauer.....	34
Figura 14. Crecimiento microbiano, % de alcohol y ART de los lotes del estilo Stout en un cultivo por lote a nivel de fermentador de 20 L.....	37
Figura 15 . Células de levadura <i>S. cerevisiae</i> del Lote de stout observado al microscopio con cámara de neubauer observadas con el objetivo 40X. ....	38
Figura 16. Crecimiento microbiano, % de alcohol y ART de los lotes del estilo IPA en un cultivo por lote a nivel de fermentador de 20 L.....	38
Figura 17. Células de levadura <i>S. cerevisiae</i> del Lote de IPA observado al microscopio con cámara de Neubauer observadas con el objetivo 40X. ....	39
Figura 18. Crecimiento microbiano, % de alcohol y ART de los lotes del estilo Strong Blonde en un cultivo por lote a nivel de fermentador de 20 L. ....	40
Figura 19. Células de levadura <i>S. cerevisiae</i> del Lote de Strong Blonde observado al microscopio con cámara de Neubauer observadas con el objetivo 40X.....	40

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Parámetros cinéticos de <i>S. cerevisiae</i> en los estilos de cerveza trabajados.....	41
--	----

## RESUMEN

En el proceso de elaboración de cerveza, la fermentación es uno de los pasos más importantes ya que es a partir de este proceso que se definirá la mayoría de las características organolépticas de esta bebida. Las características del crecimiento de las levaduras dependen en gran medida de la forma en que se desarrolle el proceso de fermentación, donde los factores de mayor importancia suelen ser el tiempo requerido, la temperatura a la que fermente, la presencia de microorganismos contaminantes y los ingredientes de cada estilo de cerveza, es por esto último que el objetivo de este estudio fue conocer las diferencias entre los parámetros cinéticos de la cepa Cali de *S. cerevisiae* que se usa para la fermentación y producción de tres estilos de cerveza (Stout, IPA y Strong Blonde), con el fin de conocer si los ingredientes característicos de cada estilo pueden afectar el comportamiento de las levaduras.

En este estudio se realizaron 9 lotes de cerveza de 19 litros, correspondidos a 3 lotes por estilo de cerveza, de cada lote de cerveza se tomó una cantidad de 10 mL cada 8 horas, los cuales se usaron para cuantificar las variables, se inició vertiendo directamente un sobre de levadura Cali agitando muy bien el fermentador por dos minutos, y en ese momento se tomó la primera muestra (Tiempo 0) y se dejó fermentar por 232 horas (Tiempo 29). Para el conteo directo se usó una cámara de Neubauer y un microscopio con objetivo 40X. Se usaron las fórmulas correspondientes para calcular los parámetros cinéticos ( $Y_{x/s}$ ,  $Y_{x/p}$ ,  $K_s$  y  $Vel_{max}$ ) las respuestas se analizaron mediante un análisis de varianza de una sola vía con el 95% de confianza con el programa Past versión 4.03.

En los lotes del estilo Stout, la fermentación alcanzó el crecimiento exponencial a las 160 horas con una densidad máxima de  $2.36E+10$  células/mL. El porcentaje final de alcohol fue de 5.33%, con un consumo de azúcares reductores de 11.4 g/L, y un cambio en el pH de 5.1 a 4.2. En el estilo IPA, el crecimiento exponencial se alcanzó a las 152 horas con una densidad máxima de  $3.07E+8$  células/mL, con un descenso en la población celular hacia la hora 192. El porcentaje de alcohol final fue de 4.93%, con un consumo de azúcares reductores de 12.99

g/L, y un cambio en el pH de 5.4 a 4.4. Para el estilo Blonde, la fermentación duró 248 horas, alcanzando el crecimiento exponencial a las 184 horas con una densidad máxima de  $2.23E+8$  células/mL. La población celular final fue de  $3.63E+8$  células/mL. El porcentaje de alcohol final fue de 4.98%, con un consumo de azúcares reductores de 14.76 g/L, y el pH cambió de 5.3 a 4.3. En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio proporcionan una visión clara de la cinética de *S. cerevisiae* en distintos estilos de cerveza artesanal. A pesar de las variaciones en los ingredientes y las condiciones de fermentación, los parámetros cinéticos fundamentales como la velocidad máxima de crecimiento, la eficiencia de conversión de sustrato en biomasa y producto, y la constante de afinidad al sustrato no mostraron diferencias estadísticamente significativa

# I. INTRODUCCIÓN

La cerveza es una bebida alcohólica no destilada, que se fabrica con granos de cebada germinados u otros cereales que sean capaces de producir azúcares fermentables en agua con levadura (principalmente *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces carlsbergensis*) y se aromatiza con lúpulo, con otras plantas o incluso especias. Es la bebida alcohólica más consumida del mundo, y una de las bebidas más consumidas, sólo por detrás del agua y el té (Jackson, 1999).

Históricamente la cerveza fue desarrollada por los antiguos pueblos elamitas, egipcios y sumerios. Las evidencias más antiguas de la producción de cerveza fueron halladas en Godin Tepe, en el antiguo Elam (actual Irán). Algunos la ubican conjuntamente con la aparición del pan entre 10 000 a. C. y 6000 a. C. ya que tiene una preparación parecida agregando en mayor cantidad agua. El consumo de cerveza y su elaboración florece en el periodo de la Edad Media en el norte de Europa. La cerveza es más barata que el vino, y se adquiere mejor en los mercados. La aparición de las grandes ciudades hace que la cerveza comience a recibir impuestos (Cornell, 2003).

Al ser una bebida con cierto porcentaje alcohólico, se entiende que debe de pasar por un proceso de fermentación, este proceso se realiza gracias a los azúcares presentes en el almidón de los granos utilizados que anteriormente tuvieron que pasar por un proceso de activación enzimática (llamado Malteado). El malteado es un proceso aplicado a los granos de cereal, que se hacen germinar sumergiéndolos en agua, para luego secarlos rápidamente mediante aire caliente. (Cornell, 2003).

La fermentación alcohólica es un proceso biológico de que se realiza en plena ausencia de oxígeno originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los azúcares para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en forma de gas y moléculas de adenosín trifosfato (ATP) que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular (Kun, 2006)

Durante el proceso de fermentación se lleva a cabo un crecimiento de los microorganismos usados y con esto se obtiene una serie de datos como las velocidades de crecimiento, el consumo de sustrato y formación de productos y los rendimientos, a estos factores se les denomina parámetros cinéticos de crecimiento microbiano y son herramientas básicas para escalar los procesos biotecnológicos evaluados en el laboratorio, puesto que permiten predecir el desarrollo de la fermentación y evaluar los rendimientos y las productividades en los procesos. Un efecto positivo sobre los parámetros cinéticos de crecimiento, permitiría disminuir los tiempos y aumentar los rendimientos y las productividades de procesos industriales o caseros de elaboración de cerveza u otras bebidas o productos obtenidos de la fermentación (Kun, 2006).

Dentro del mercado de la cerveza artesanal, podemos identificar diferencias en los ingredientes y en la forma de preparación, estas diferencias dan lugar a los llamados estilos. El estudio para la clasificación de una cerveza puede examinar su procedencia, tradición local, ingredientes o impresión sensorial, en la que convencionalmente intervienen elementos como el aroma, la apariencia, el sabor o la textura en boca. El primer paso para categorizar a las cervezas radica en el tipo de fermentación que conlleva, pudiendo ser de fermentación baja (Lager) o de fermentación alta (Ale) (Jackson, 1999).

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Generalidades de la cerveza

#### 2.1.1. Cerveza

La cerveza es una bebida alcohólica, no destilada, de sabor amargo, que se fabrica con granos de cebada germinados u otros cereales cuyo almidón se fermenta en agua con levadura (*S. cerevisiae* usualmente) y se aromatiza a menudo con lúpulo, entre otras plantas. De ella se conocen varios tipos con una amplia gama de matices, debidos a las diferentes formas de elaboración y a los ingredientes utilizados. Generalmente presenta un color ambarino con tonos que van del amarillo oro al negro pasando por los marrones rojizos. Se la considera «gaseosa» (contiene CO<sub>2</sub> disuelto en saturación que se manifiesta en forma de burbujas a la presión ambiente) y suele estar coronada de una espuma más o menos persistente. Su aspecto puede ser cristalino o turbio. Su graduación alcohólica puede alcanzar hasta cerca de los 20 % vol., aunque comúnmente se encuentra entre los 4 % y los 6 % vol (Verhoef, 2003).

#### 2.1.2. Cebada

La cebada, cuyo nombre científico es *Hordeum vulgare*, es una planta gramínea perteneciente al grupo de los cereales. Es originaria de Asia, Europa, América y el norte de África. Sus semillas, enteras o transformadas en harina, se usan tanto en la alimentación humana como en el animal y es en la actualidad el quinto cereal más cultivado del mundo. El grano molido y humedecido fue durante miles de años el cereal más utilizado en la elaboración del pan para el consumo humano, hasta que el trigo se convirtió en el protagonista (Salvador, 2015).

La cebada, rica en almidones, tiene que pasar por un proceso de malteado, los granos malteados desarrollan las enzimas que se necesitan para convertir el almidón del grano en azúcares más simples asimilables por las levaduras. El principal azúcar que encontramos en la malta de cebada es la maltosa, un disacárido formado por dos glucosas unidas mediante un enlace glucosídico.

### 2.1.3. Lúpulo

El lúpulo (*Humulus lupulus*) es la única especie del género *Humulus* de la familia de las Cannabináceas; es una planta herbácea y trepadora, propia de la Europa septentrional y del occidente de Asia, crece de manera silvestre en las orillas de los bosques, pero hoy su cultivo se ha desarrollado en gran escala en muchas co-marcas de Europa y América. Es planta monoica, tiene flores masculinas y femeninas en el mismo pie o individuo, pero es la flor femenina la que se usa en la fabricación de cerveza. La flor femenina de lúpulo es de forma ovoidea con escamas delgadas y persistentes, contiene cada una en su base dos pequeños aquenios cubiertos de un polvo amarillo, granuloso, aromático y resinoso, este polvo contiene los aceites esenciales y otros compuestos que le aportan a la cerveza su olor y amargor característicos (Nievas *et al.*, 2021)

## 2.2. Levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares pertenecientes a la clase Ascomycota, generalmente caracterizados por dividirse asexualmente por gemación o bipartición y por tener estados sexuales que no están adjuntos a un esporocarpo. Las levaduras, a diferencia de otros hongos, no forman hifas, pero no siempre es considerada una característica fundamental, ya que se han encontrado hongos que alternan ciclos de vida entre levadura e hifa (Deacon, 1999).

Las levaduras son importantes por su capacidad para realizar la descomposición de la materia orgánica de formas distintas dependiendo de los compuestos orgánicos que se encuentren y sin duda una de las especies más usadas por los humanos es *Saccharomyces cerevisiae* y su pariente *Saacharomyces carlsbergensis*.

### 2.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Comúnmente llamada “Levadura de Cerveza”, es un hongo unicelular perteneciente a la división Ascomycota utilizado mundialmente y en gran extensión para la producción de pan, cerveza e incluso vino. El genoma de *Saccharomyces cerevisiae* fue el primero de entre los eucariotas en ser secuenciado. En su ciclo de vida

alternan dos formas, una haploide y otra diploide. Ambas formas se reproducen de forma asexual por gemación. En condiciones muy determinadas la forma diploide es capaz de reproducirse sexualmente (Parapouli *et al.*, 2020). Una de las razones por la cual esta especie es ampliamente usada, es porque se conoce la secuencia completa de su genoma y se mantiene en constante revisión. Ello ha permitido la manipulación genética de la levadura, adecuándola para un gran número de estudios y actividades biotecnológicas, desde mejoramiento para una bebida fermentada hasta su uso con proteínas recombinantes (Bahrens y Rodrigo, 2013).

Las fuentes de carbono utilizadas por las *S. cerevisiae* varían desde los carbohidratos hasta los aminoácidos. Además, la capacidad de utilizar ciertos tipos de azúcares ha sido tradicionalmente empleada para la caracterización de las distintas razas que esta especie presenta. Entre los azúcares que puede utilizar están monosacáridos como la glucosa, fructosa, y manosa, entre otros. También son capaces de utilizar disacáridos como la maltosa y la sacarosa y trisacáridos como la rafinosa, la maltotriosa y las dextrinas. Uno de los azúcares que no puede metabolizar es la lactosa, utilizándose este azúcar para distinguir esta especie de *Kluyveromyces lactis*. También es capaz de utilizar otras fuentes de carbono distintas a carbohidratos y aminoácidos (Lodolo *et al.*, 2008). *S. cerevisiae* es usada en las cervecerías para la elaboración de cervezas “Ale” o de fermentación alta, llamadas así porque el proceso fermentativo sucede en la superficie del mosto.

### **2.2.2. *Saccharomyces pastorianus***

Es un híbrido de la levadura *S. cerevisiae* y *S. eubayanus*, es un producto de la elaboración de cerveza descubierta y empleado por la gran industria danesa de cerveza denominada Carlsberg, hoy en día se emplea esta levadura en la investigación de ciertos procesos de la Glucólisis. Las diferencias genómicas entre *S. pastorianus* y *S. cerevisiae* son responsables de un número de fenotipos de los que *S. pastorianus* comparte con *S. bayanus*, pero no con *S. cerevisiae*. La habilidad de *S. pastorianus* para romper melibiosa depende de los genes MEL, que son exclusivos para metabolizar la melibiosa tal y como lo hace *S. bayanus*. *S. pastorianus* nunca se cultiva con temperaturas sobre los 34°C, mientras que *S. cerevisiae* lo hace a 37 °C. *S. pastorianus* presenta una tasa de crecimiento mayor

que *S. cerevisiae* entre 6 y 12°C (Tamai *et al.*, 1998). Las cervezas Lager se caracterizan por el uso de *S. pastorianus* y son llamadas cervezas de baja fermentación porque estas levaduras tienden a depositarse en la parte baja de los depósitos durante la fermentación.

## **2.3. Condiciones de crecimiento de las levaduras**

### **2.3.1. Temperatura**

La temperatura es de los requerimientos más importantes que afectan directamente al proceso fermentativo, la sucesión y el proceso metabólico de los microorganismos involucrados. La mayoría de las levaduras se desarrollan en temperaturas que oscilan entre los 5 y 37°C, siendo el valor óptimo los 28°C (Rodríguez 2007).

Las cepas utilizadas para la elaboración de cerveza artesanal varían en su rango de temperatura óptimo de acuerdo a la especie de levadura usada, siendo *S. cerevisiae* para cervezas ale, que fermenta de forma óptima en un rango de 17-25°C y *S. pastorianus* para cervezas lager, con temperaturas óptimas de entre 5-10°C (Lanchimba *et al.*, 2021).

### **2.3.2. Presión osmótica**

Una condición de estrés hípico osmótico se define como una disminución en el potencial hídrico del ambiente en el cual se está desarrollando un organismo. La respuesta inmediata, que se da en segundos, es una salida del agua intracelular, seguida de un proceso adaptativo más largo para tratar de llevar a cabo un ajuste osmótico (López y Corona, 2016)

El ambiente natural de la levadura *S. cerevisiae* son las plantas, sus frutos y los jugos de éstos, por lo que este organismo se enfrenta durante su ciclo de vida a una condición de estrés hípico osmótico dado el alto contenido de azúcares y otros solutos presentes en su microambiente. Suele sobrevivir a un medio con un alto

contenido de azúcar de, aproximadamente, 30%. Por otro lado, en uno de los procesos más explotado por los humanos como lo es la fermentación de la uva, las levaduras se exponen a un 20% de azúcares y, al final del proceso, a un medio sin azúcares y con un 10% de etanol (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

### **2.3.3. pH**

El pH óptimo para el crecimiento de levaduras varía de 4.5 a 6.5 aunque se ha reportado que varias especies toleran grandes variaciones de 2.8-3 a 2-8.5. En una fermentación alcohólica, el pH varía normalmente entre un mínimo de 2.8 y un máximo de 3.8 (Villamil y Zapata, 1999).

### **2.3.4. Oxígeno**

Las levaduras pueden alternar entre dos metabolismos quimioorganotróficos que dependen de la presencia o ausencia de oxígeno. En presencia de oxígeno, las levaduras llevan a cabo un proceso metabólico aerobio (Respiración), donde utilizan el azúcar directamente para formar biomasa y liberar CO<sub>2</sub>. En ausencia de oxígeno, las levaduras cambian a un proceso anaerobio (fermentación), este proceso genera menor cantidad de masa celular y genera alcoholes superiores como desecho metabólico (Garzón y Hernández, 2009).

### **2.3.5. Nutrientes**

Las levaduras, al igual que todos los seres vivos, necesitan una entrada recurrente de nutrientes para satisfacer sus necesidades metabólicas. Las fuentes de carbono y nitrógeno son necesarias para generar la energía y proteínas necesarias para la duplicación celular, mientras que compuestos como vitaminas y minerales forman parte importante como catalizadores de reacciones enzimáticas necesarias para rutas metabólicas primarias o secundarias (Uribe, 2007).

a) Fuentes de carbono: en su mayoría, las células de levaduras están constituidas por carbono; igualmente los compuestos carbonados son utilizados por la levadura como fuente de carbono y energía (Uribe, 2007). La capacidad para utilizar compuestos carbonados depende de la levadura en cuestión; algunas pueden utilizar una amplia gama de compuestos, pero otras solo pueden asimilar una pequeña cantidad de ellos (Mendoza, 2013). Entre los compuestos principales como fuente de carbono, los carbohidratos son los más comunes (fundamentalmente mono y disacáridos). En la cerveza, la fuente de carbono es aportada por la malta de cebada, rica en maltosa y otros azúcares.

b) Fuentes de nitrógeno: todas las levaduras tienen la capacidad de asimilar el nitrógeno en forma de ión amonio, que es aportado al medio por el cloruro amónico, nitrato amónico, fosfato amónico y sobre todo el sulfato amónico, siendo este el mejor compuesto ya que aporta al mismo tiempo el azufre necesario para la síntesis de ciertos aminoácidos (Uribe 2007). En el caso de la cerveza, las fuentes de nitrógeno son dadas por la malta de cebada, la cual aporta una gran cantidad de aminoácidos al mosto.

### **2.3.6. Fases de crecimiento**

La medición de una curva del crecimiento exponencial de las bacterias en un cultivo ha sido tradicionalmente una parte de la formación de todos los microbiólogos. Los procesos fundamentales empleados para ello son la enumeración bacteriana (conteo bacteriano) por métodos directos e individuales, por métodos directos y masivos, por métodos indirectos e individuales, o por métodos indirectos y en bloque. El crecimiento bacteriano en un cultivo de lotes se puede modelar suponiendo cuatro fases (Zwietering, 1990)

- Fase de latencia: Las levaduras se adaptan a las nuevas condiciones del entorno donde se llevará a cabo su desarrollo. Esta fase no siempre tiene un proceso definido, ya que dependerá de múltiples factores como la afinidad al

sustrato, el número de células inoculadas y las características ambientales o del medio.

- Fase logarítmica: También llamada fase exponencial, se caracteriza por el gran número de divisiones celulares que ocurren, aumentando la tasa metabólica y duplicando de manera exponencial las levaduras. Esta fase varía en tiempo de acuerdo al tipo de medio donde se encuentre, a la especie o cepa de levadura usada y los sustratos limitantes del medio.
- Fase estacionaria: la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes y la acumulación de productos tóxicos. Esta fase se alcanza cuando las levaduras empiezan a agotar los recursos que están disponibles para ellas. Esta fase se caracteriza por un valor constante del número de levaduras a medida que la tasa de crecimiento de las levaduras se iguala con la tasa de muerte bacteriana.
- Fase de declive o muerte: el agotamiento de nutrientes, la acumulación de compuestos tóxicos entre otros factores promueven la muerte de las levaduras.

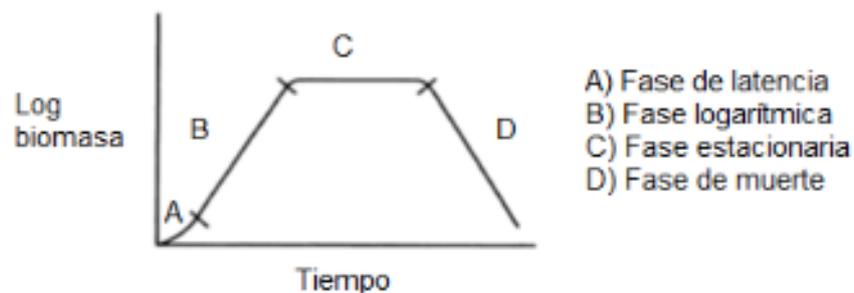


Figura 1. Fases ocurridas durante el crecimiento de un microorganismo en un cultivo por lote (Hernández, 2003).

#### 2.4. Determinación Azúcares reductores

Un azúcar reductor es un término químico usado para describir azúcares que tienen un potencial reductor, o sea, que puede donar electrones a otras moléculas. Los azúcares reductores son carbohidratos que en su estructura química tienen un grupo de aldehído o de cetona libre (grupo hidroxilo). Para la determinación de azúcares reductores se suelen utilizar una amplia variedad de reactivos, como la solución de Fehling (ión cúprico y ácido tartárico), la solución de Benedict (ión

cúprico y ácido cítrico) o el reactivo de Tollens (Nitrato de plata e hidróxido de amonio) (Cordero y Verdugo, 2006).

Los azúcares reductores más abundantes e importantes son la glucosa, la fructosa y la galactosa, todos monosacáridos. El disacárido de importancia en esta investigación es la Maltosa, un azúcar reductor obtenido de la descomposición de los almidones que es obtenido en la malta de cebada, ingrediente principal en la cerveza (Eyzaguirre, 1985).

Miller (1959) desarrolló un método para determinar azúcares reductores mediante el ácido 3,5-dinitrosalicílico, el cual reacciona con los azúcares reductores presentes en una muestra a través de calor, reduciendo el ácido a 3-amino-5 nitrosalicílico, y cambiando el color de la muestra que se oxida en apariencia amarilla-café. La cantidad de azúcares reductores en la muestra se puede determinar aplicando la ley de Beer-Lambert (Calloway, 1997), que establece que la absorbancia se relaciona con las propiedades del analito, su concentración y la longitud del haz de radiación al atravesar la muestra.

## **2.5. °Brix y Refractómetro**

Los °Brix son una medida de la cantidad de sólidos disueltos que hay en un líquido, que se obtiene a través de la gravedad específica y se usa sobre todo para medir la azúcar disuelta. Un grado Brix es un gramo de sacarosa en 100 gramos de solución. Un refractómetro es un instrumento óptico que mide la concentración de sólidos en una solución basada en el índice de refracción que produce la luz en dicha solución. El refractómetro se utiliza en una muestra para proyectar la curva que produce la luz en una retícula que contiene una escala, lo que permite determinar el ángulo que forma la luz representado en grados Brix (Gandía y López, 2018).

## **2.6. Fermentación**

La fermentación es una de las 3 modalidades del metabolismo energético (acompañada de la respiración y la fotosíntesis), es el más simple de los tres desde un punto de vista mecanístico, y puede definirse como un proceso metabólico generador de energía en el cual tanto los dadores como los aceptores de electrones son compuestos orgánicos, siendo estos más comúnmente los carbohidratos pero no excluyendo a otros macronutrientes (Steinkraus, 2018). Las fermentaciones suelen clasificarse de acuerdo a la naturaleza del producto final de las reacciones siendo las más conocidas las cuatro que comienzan a partir del piruvato: la alcohólica, la láctica, la butírica y la acética (Cavalieri et al., 2003).

### **2.6.1. Fermentación alcohólica**

La fermentación alcohólica es realizada por bacterias y levaduras que procesan los hidratos de carbono (por regla general, azúcares: por ejemplo, la glucosa, la fructosa, la sacarosa) para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono en forma de gas y moléculas de adenosín trifosfato (ATP) que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaerobio. El etanol resultante se emplea en la elaboración de algunas bebidas alcohólicas, tales como el vino, la cerveza, la sidra, etc.

En el caso de la cerveza, el azúcar fermentado es la maltosa, un disacárido conformado por dos moléculas de glucosa que se encuentra en los granos de cebada malteados, la maltosa es fermentada por las levaduras presentes en la cerveza, y de acuerdo a la cantidad de azúcares dentro del mosto, puede afectar el comportamiento cinético de las levaduras (Kun, 2006).

## **2.7. Sistemas de fermentación**

Un fermentador es un recipiente que provee condiciones adecuadas a una cepa microbiana para que pueda generar eficientemente un determinado proceso metabólico. La eficiencia de un fermentador depende de la concentración de biomasa, el mantenimiento de las condiciones asépticas, la transferencia de energía

y de condiciones óptimas de operación. Los fermentadores se distinguen por su configuración, su diseño y la utilidad que se le dará de acuerdo al bioproducto de interés (Karanthand y Raj, 2005).

### **2.7.1. Fermentación por lote**

Una fermentación discontinua (por lote) se considera como un sistema de fermentación cerrado, al cual, al inicio de la operación se le añade la solución esterilizada de nutrientes y se inocula con el microorganismo, permitiendo la incubación en condiciones óptimas de fermentación. A lo largo de toda la fermentación no se añade más sustrato fermentable. Así, la composición del medio, la concentración de metabolitos y la concentración de biomasa cambian y se pueden observar las 4 fases típicas de crecimiento microbiano (Ezeji *et al.*, 2005).

### **2.7.2. Fermentación alimentada**

En los procesos alimentados discontinuos, los sustratos se añaden escalonadamente al cultivo a medida que progresa la fermentación. La formación de muchos metabolitos secundarios está sometida a una represión catabólica, por esta razón en el método alimentado los elementos críticos de la solución de nutrientes se añaden en pequeñas concentraciones al principio de la fermentación y continúan añadiendo a pequeñas dosis durante la fase de producción (Scragg, 1997).

### **2.7.3. Fermentación continua**

En este sistema se establece un sistema abierto en el cual la solución nutritiva estéril se añade continuamente al biorreactor y una cantidad equivalente de solución utilizada de los nutrientes con los microorganismos se saca simultáneamente del sistema. Si bien los procesos de fermentación continua no se utilizan de forma general en la industria, debido fundamentalmente al mayor nivel de experiencia que

se tiene en el crecimiento de células en fermentación discontinua, el coste de producción de biomasa mediante cultivo continuo es potencialmente inferior al de cultivo discontinuo (Ezeji et al., 2005).

## **2.8. Efecto Pasteur y efecto Crabtree**

### **2.8.1. El efecto Pasteur**

Nombrado en honor al científico Louis Pasteur, se refiere a la observación de que algunos microorganismos, como ciertas levaduras, tienen la capacidad de cambiar su metabolismo en función de la disponibilidad de oxígeno. El efecto Pasteur se manifiesta de la siguiente manera:

- En presencia de oxígeno (aeróbico), los microorganismos utilizan la respiración aeróbica para obtener energía a través de la oxidación completa de los sustratos (por ejemplo, glucosa), lo que resulta en la producción de dióxido de carbono y agua.
- En ausencia de oxígeno (anaeróbico), estos microorganismos cambian a la fermentación, donde la glucosa se convierte en etanol y dióxido de carbono, incluso si esto es menos eficiente en términos de obtención de energía.

El efecto Pasteur destaca la capacidad de algunos microorganismos para adaptarse a las condiciones cambiantes y cambiar su estrategia metabólica para sobrevivir y crecer en ausencia de oxígeno (Pérez, 2016).

### **2.8.2. Efecto Crabtree**

El efecto Crabtree es un fenómeno relacionado con el efecto Pasteur y se refiere a la inhibición de la respiración en presencia de altas concentraciones de glucosa o azúcares fermentables en el medio de cultivo. Esto lleva a un aumento en la producción de etanol, incluso en presencia de oxígeno. El efecto Crabtree es especialmente común en algunas levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae*.

En condiciones de alta disponibilidad de glucosa, las levaduras muestran una preferencia por la fermentación, incluso cuando hay oxígeno presente. Esto puede ser problemático en aplicaciones de fermentación industrial, ya que la producción de etanol puede reducir el rendimiento en la producción de otros productos deseados, como biomasa o productos químicos. Lo que sucede es que las altas concentraciones de glucosa aceleran el glicólisis, lo que se refleja en una alta producción de ATP. Esto reduce la necesidad de fosforilación oxidativa producida durante el ciclo de ácidos tricarboxílicos, particularmente por la cadena de transporte de electrones, lo que finalmente reduce el consumo de oxígeno (Novillo, 2021)

## **2.9. Parámetros cinéticos de interés**

Los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano son las herramientas básicas para escalar los procesos biotecnológicos evaluados en laboratorio, puesto que permiten predecir el desarrollo de la fermentación y evaluar los rendimientos y las productividades en los procesos. Los más importantes son: la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), la constante de afinidad al sustrato ( $K_s$ ) y los coeficientes de rendimiento (Ezapata., *et al.* 2005).

### **2.9.1. Velocidad específica máxima de crecimiento**

Cada microorganismo, como unidad básica, tiene una velocidad de consumo de sustratos y formación de producto representada por su correspondiente velocidad específica. Ésta representa la velocidad a la cual cada individuo se replica para formar nuevos individuos. Debido a que la producción de biomasa es uno de los principales objetivos de un bioproceso,  $\mu$  es una velocidad de gran importancia y va a depender de las condiciones y del medio de cultivo. Jacques Monod describió el año 1940 una ecuación que relaciona  $\mu$  con la concentración de sustrato limitante ( $S$ ), la cual conocemos en la actualidad como ecuación de Monod.

En cuanto a  $\mu_{max}$ , como se dijo anteriormente, es la máxima velocidad a la que puede crecer un microorganismo en determinadas condiciones de cultivo. Estas condiciones pueden ser factores ambientales y factores endógenos, el factor ambiental que más repercusión tiene en la velocidad del crecimiento es la temperatura; la temperatura óptima de un microorganismo depende mucho del entorno y del tipo de microorganismo. Entre los factores endógenos está la organización morfológica, la regulación, el control intracelular, el pH del medio y la composición del medio, el cual le brinda a los organismos todos los nutrientes que necesitan para crecer, y más específicamente, cuando un compuesto es denominado sustrato limitante. (Castañeda, 2019).

### **2.9.2. Constante de afinidad al sustrato**

$K_s$  es un parámetro que nos brinda información acerca de la afinidad de un microorganismo por un sustrato en particular, bajo determinadas condiciones de cultivo. El microorganismo será más afín a un sustrato cuanto menor sea el  $K_s$  de ese sustrato en las condiciones de crecimiento (Castañeda, 2019).

### **2.9.3. Rendimiento de biomasa y de producto con base a sustrato**

En un proceso fermentativo, se observa que al final de cada cultivo la cantidad de nutrientes disminuye e incluso aparecen ciertos productos al mismo tiempo que se observa un incremento en la biomasa resultante de la reproducción de los microorganismos. A esto se le denomina rendimiento, a las relaciones de coeficientes estequiométricos expresados en una evolución de las concentraciones de nutrientes y productos a lo largo de un cultivo (Ezapata., *et al.* 2005).

## **III. ANTECEDENTES**

En el proceso de elaboración de cerveza, la fermentación es uno de los pasos más importantes ya que es a partir de este proceso que se definirá la mayoría de las características organolépticas de nuestra cerveza, además, es la etapa en la que el contenido alcohólico de nuestra bebida se va a establecer. A pesar de la gran importancia que tiene este paso, son pocos los estudios que se han podido reportar y la gran mayoría de la información de los cerveceros experimentados viene a partir de la práctica y error, estableciendo un aprendizaje meramente empírico y muy poco compartido.

Priest y Campbell (1996), expusieron los principales microorganismos que pueden contaminar los lotes de cerveza y los factores durante la producción que pueden suprimir el crecimiento de estos. Organismos como bacterias Enterobacteriaceae, bacterias ácido-lácticas, mohos filamentosos y levaduras salvajes comprometen el desarrollo y crecimiento adecuado de las levaduras seleccionadas y utilizadas para la elaboración de cerveza. Bajo condiciones normales, una vez que se inocula la cepa de *S. cerevisiae* a un mosto estéril, rápidamente domina todo el medio y suprime el crecimiento de Enterobacteriaceae. La competencia de nutrientes, el descenso del pH, la concentración de alcohol y CO<sub>2</sub> actúan como inhibidores del crecimiento de muchos grupos de bacterias; además, el uso de lúpulo ha reportado tener efectos antimicrobianos, especialmente de bacterias gram positivas.

Toriya *et al.* (2003) comprobaron cuál es el efecto de la temperatura en un proceso fermentación de vino usando varias cepas de *S. cerevisiae*. Se expuso que la temperatura determinó cómo se desarrollaron las cepas de *Saccharomyces* y con qué eficacia fermentaron. Algunas cepas se comportaron mejor a altas temperaturas y otras a bajas temperaturas. El tamaño máximo de la población fue similar a todas las temperaturas. A bajas temperaturas, sin embargo, se alcanza más tarde, aunque se mantiene constante durante toda la fermentación alcohólica. Por otro lado, las células viables disminuyeron a altas temperaturas, especialmente a 35 °C. También se demostró que, a bajas temperaturas, el rendimiento de alcohol fue mayor y los metabolitos secundarios de la fermentación alcohólica aumentaron a medida que aumentó la temperatura.

Dentro del proceso de fermentación de cerveza artesanal, las biomoléculas presentes en el mosto juegan un papel importante en la cinética de crecimiento de las levaduras y *S. cerevisiae* no es la excepción. En un trabajo realizado por Lodolo *et al.* (2008) se estudió la influencia que tienen algunos factores internos del mosto de cerveza en la forma en que las levaduras se desarrollan, en total se estudiaron 4 parámetros: cantidad de azúcares fermentables, composición de las fuentes de nitrógeno, el oxígeno presente y los minerales. De estos factores la afinidad y las cantidades de azúcares fermentables y de nitrógeno son las que más pueden afectar al crecimiento de las levaduras. *S. cerevisiae* es capaz de usar varias fuentes de carbohidratos (glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa, galactosa, etc.), las levaduras consumen los azúcares en orden según su complejidad, primero los monosacáridos, luego los disacáridos y finalmente los trisacáridos restantes. Una alta concentración de azúcares en el mosto puede ocasionar un estrés osmótico en las células, causando un crecimiento y rendimiento pobre de estas, lo mismo pasa con una cantidad excesiva de fuentes de nitrógeno.

Blasco *et al.* (2011), estudian cómo las proteínas y la generación de krausen pueden afectar las características fermentativas de las levaduras. El krausen es un término alemán usado para describir la capa de espuma que se genera cuando la fermentación está en su pico mayor de actividad. El krausen se genera principalmente por la interacción de las proteínas, las humulonas del lúpulo y el CO<sub>2</sub> generado. Una producción exagerada de krausen durante las primeras etapas de la fermentación puede comprometer fuertemente el proceso, puede aminorar la capacidad de las levaduras e incluso puede inhibir totalmente el crecimiento, además, una elevada cantidad de krausen puede alterar la higiene del mosto, ya que la acumulación de espuma y CO<sub>2</sub> puede provocar que el mosto se exponga al ambiente y a agentes contaminantes.

Muñoz y Catrilaf (2013) estudiaron los efectos de la temperatura, pH, medio enriquecido, concentración de azúcares, limitación de oxígeno, en los parámetros de crecimiento de la *Saccharomyces cerevisiae* en distintas condiciones de cultivo. Los datos muestran que la temperatura fue una de las variables más importantes,

sin embargo, los efectos de las concentraciones de azúcares y el pH fueron también significativos. Los principales resultados con respecto a los cambios de temperatura fueron la disminución progresiva de la biomasa a los 20 minutos bajo el cambio, y, además, la determinación de azúcares, confirmó una desaceleración en el consumo de éstos desde el comienzo del choque térmico.

Pérez et al. (2013) estudiaron el comportamiento cinético de biomasa y etanol a nivel matraz y nivel biorreactor durante la fermentación alcohólica. Se utiliza jugo de *Agave cupreata* y se establecieron como variables de estudio: tipo de levadura, concentración de azúcares y temperatura, a nivel matraz. Se encuentra que la interacción concentración de azúcares-temperatura fue la variable con mayor influencia sobre el incremento en el porcentaje de etanol. La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* presentó el segundo lugar en rendimiento de etanol (11.46%v/v), en concentraciones de azúcares de 12°Brix y una temperatura de 28°C, y a nivel biorreactor, con agitación de 150 rpm y aireación de 0.1 vvm. El destilado presenta una concentración de metanol y etanol de 1.89 % y 47.75 % respectivamente.

Durante el proceso de fermentación, los azúcares simples presentes en el mosto son convertidos en alcohol y dióxido de carbono por la levadura que se inocula en éste. Teniendo esto en cuenta y la forma en la que las levaduras se comportan conforme van consumiendo el mosto, Garduño-García *et al.* (2014) describen el comportamiento del proceso de fermentación de cerveza artesanal mediante un modelo matemático dinámico. El modelo contiene las tasas de cambio de las variables de estado en concentración de glucosa, maltosa y maltotriosa. La variable de salida es la concentración de etanol y como variable auxiliar contempla la concentración de biomasa (levaduras). Refieren el uso de un modelo matemático que sea capaz de simular el proceso de fermentación de una cerveza artesanal estilo Pale Ale. En particular, se encontró un modelo matemático que simula la dinámica del proceso de fermentación de cerveza industrial, puede ser útil para predecir el comportamiento de las variables que influyen en el proceso de fermentación de cerveza artesanal, realizando previamente la estimación de los parámetros del modelo.

Álvarez (2018) desarrolló un prototipo operativo de un sistema de control que permita controlar, monitorear y supervisar el proceso de fermentación de cerveza artesanal con el objetivo de estandarizar la misma, de modo tal de lograr una repetitividad de las características del producto en las sucesivas partidas de producción, además de reducir costos operativos, la intervención de operarios y las pérdidas de producción. Si bien el objeto de estudio de este proyecto no es meramente en el proceso de fermentación, si nos da una idea de las características específicas que se deben de considerar durante una fermentación (como pH, temperatura, etc.) para lograr una buena fermentación para un estilo de cerveza específico y a partir de esto se podrían tomar en cuenta algunos datos para la elaboración de este trabajo.

Galán *et al.* (2018) evaluaron la influencia de la temperatura, la acidez y la concentración de glucosa en el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Para estudiar el efecto de la temperatura, las levaduras se incubaron en medio líquido a 60°C, 30°C, 20°C. Se demostró que 4°C apenas existe crecimiento, probablemente porque a esa temperatura las levaduras se encuentran en estado latente. A medida que aumenta la temperatura el crecimiento también aumenta, observándose el máximo crecimiento a 30°C. A 60°C se detectó el efecto negativo de las altas temperaturas. Estas temperaturas afectan a la integridad de la membrana plasmática y la pared celular.

Se valoró también la influencia de los nutrientes aumentando la concentración de glucosa al 10% a 30°C, y es donde se reportó un menor crecimiento de las levaduras. La especie *S. cerevisiae* crece más favorablemente al encontrarse en un medio de cultivo con pH neutro, al 1% de glucosa y con una temperatura de unos 30°C, tanto en luz como en oscuridad.

Manaj *et al.* (2018) evaluaron el efecto de los cambios de temperatura de 5 lotes de cerveza artesanal (tanto a nivel industrial como a nivel semi-industrial), se determinaron las temperaturas a las que *S. cerevisiae* tiene un mejor rendimiento (comparando temperaturas de 5, 20, 25 y 35 °C) y, además, se evaluó como los

cambios de temperatura durante el proceso pueden afectar la cinética de crecimiento de las levaduras. Con este trabajo se concluyó que los procesos microbiológicos son muy dependientes de la temperatura, y como dice la literatura, aunque *S. cerevisiae* sea un organismo mesófilo, las cepas usadas en los procesos de producción de cerveza artesanal varían en cuanto a su óptima temperatura. Además, un cambio en las temperaturas mientras el proceso esté en desarrollo, estresa de manera significativa al proceso, demostrando un cambio en las características organolépticas y alterando la cinética general, mostrando errores de crecimiento.

Granada-Díaz y Salamanca-Grosso (2020) analizaron la cinética del proceso de fermentación considerando la reducción de los azúcares del mosto, producción de etanol, la generación de butanodiona y acetato de etilo, a través de ecuaciones dinámicas asociadas con el efecto de la temperatura en un proceso de producción de cerveza. Comparando lotes de cerveza fermentados a cuatro diferentes temperaturas (8°C, 13°C, 16°C y 18°C), los resultados dictan que en la fermentación asistida por levaduras; las bajas temperaturas ralentizan la duplicación celular con una marcada dependencia del tiempo y un incremento térmico acelera la fermentación de manera significativa, además, la tasa de mortalidad específica de la biomasa en el sistema de reacción se incrementa con la temperatura.

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La fermentación es un proceso metabólico en ausencia de oxígeno de las levaduras y de algunas bacterias en donde se transforman azúcares simples para obtener energía y como productos secundarios, alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono, ésteres y otros compuestos (Hutkins, 2006). Para el proceso de fermentación de las cervezas artesanales, se usan distintas cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (para cervezas Ale) y *Saccharomyces pastorianus* (para

cervezas Lager), cada cepa de levadura le proporciona características únicas a cada cerveza, tales como la producción de ésteres, producción de alcoholes superiores, la capacidad de floculación y la capacidad de sedimentación.

Las características del crecimiento de las levaduras dependen en gran medida de la forma en que se desarrolle el proceso de fermentación, donde los factores de mayor importancia suelen ser el tiempo requerido, la temperatura a la que fermenta, la presencia de microorganismos contaminantes, los ingredientes de cada estilo de cerveza, las concentraciones iniciales de los azúcares reductores y su variación respecto al tiempo (Sánchez, 2008).

A pesar de que las cepas de levadura producen características propias en cada cerveza, los ingredientes usados en cada estilo afectan la forma en que las levaduras se desarrollan, por ejemplo, en los estilos de cerveza Stout o Porter, se usan una gran cantidad de maltas tostadas las cuales incrementan el pH del mosto (Almonacid *et al.*, 2010). Otro ejemplo es el uso de granos adjuntos como trigo o avena, los cuales aumentarán las concentraciones de proteínas dentro del mosto, que tendrá un efecto directo en la fermentación como lo reportaron Blasco y colaboradores en el 2011. Otro ejemplo de factores que afectan la forma en la que las levaduras se comportan es la cantidad de lúpulo usada para aromatizar y saborizar las cervezas, especialmente las cervezas estilo IPA (Maye & Smith, 2018).

En 2020, Pinzón y David aislaron, identificaron, y caracterizaron cepas de levadura *S. cerevisiae* nativas de Colombia para su posterior implementación en una cerveza Colombian Ale que aporten características novedosas y llamativas al producto final, analizando también las propiedades fermentativas de estas levaduras para su uso en la producción de una cerveza artesanal de estilo "Colombian Ale". Este artículo nos acerca a la forma en la que se pueden estudiar las levaduras en sus procesos fermentativos, la realidad es que, detrás de cada estilo de cerveza realizado existen factores propios de los ingredientes que pueden cambiar dramáticamente la forma en la que la fermentación se realiza, por eso es necesario la caracterización del comportamiento cinético de las levaduras en cada estilo de cerveza.

## V. JUSTIFICACIÓN

Actualmente los estudios dedicados a los procesos fermentativos y especialmente de caracterización de crecimiento de levaduras son escasos en el marco de producción de cerveza artesanal en latinoamérica, siendo Estados Unidos el país que reporta más investigaciones, pero, el uso de las investigaciones para empresas privadas imposibilita la llegada de conocimientos a productores locales.

Con este trabajo, se desea conocer las diferencias cinéticas de la cepa Cali (Cellar Science®) de *S. cerevisiae* que se usa para la fermentación y producción de tres estilos de cerveza (Stout, IPA y Strong Blonde), con el fin de generar métodos y consejos que deben ser implementados en los procesos de fabricación de cerveza artesanal (específicamente de estos tres estilos) para mejorar el producto final de la fermentación.

## VI. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo general

Analizar las características de crecimiento poblacional de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada en tres distintos estilos de cerveza artesanal.

### 6.2. Objetivos específicos

- Describir la cinética de crecimiento poblacional de *Saccharomyces cerevisiae* en tres procesos artesanales de producción de cerveza.
- Comparar el comportamiento cinético de *S. cerevisiae* durante el proceso de fermentación de cerveza artesanal
- Evaluar la influencia de los ingredientes característicos de cada estilo de cerveza en la capacidad fermentativa de *S. cerevisiae*.

## VII. ZONA DE ESTUDIO

La presente investigación se realizó en la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, en el Laboratorio de Investigación de Microbiología en el Instituto de Ciencias Biológicas, ubicada en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez.

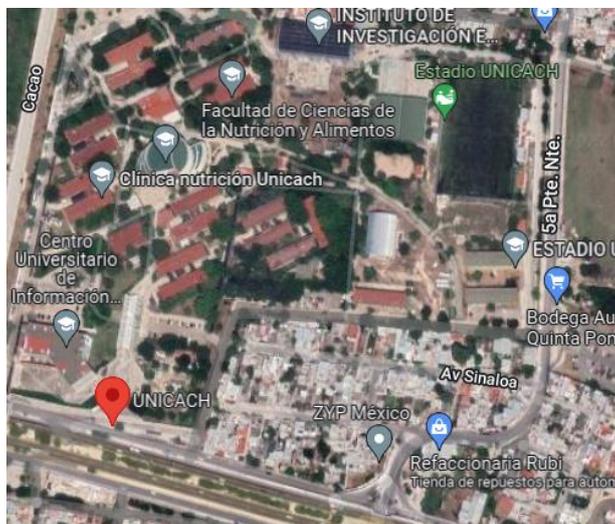


Figura 2. Mapa y localización de la UNICACH

## VIII. MÉTODOS

### 8.1. Recetas de las cervezas

#### 8.1.1. Insumos

Para la elaboración de la cerveza artesanal son necesarios ciertos insumos indispensables para su producción, entre ellos se encuentran: las maltas (Pilsner, Chocolate, Belgian, Crystal, Chocolate II, Trigo no malteado y avena), los lúpulos (de distintas variedades) la levadura y los adjuntos; la levadura a usar es una levadura neutra (la cual no produce ésteres residuales) y adjuntos como azúcar y minerales para cambiar la composición y dureza del agua. Los insumos varían de acuerdo a cada estilo de cerveza a realizar. Se llevarán a cabo un total de 9 lotes de 19 litros cada uno, divididos en tres lotes de cada estilo, elaborados en un orden aleatorio.

### 8.1.2. Estilo de cerveza IPA

**Maltas:** el mosto de esta cerveza está compuesto por un 74% de malta Pilsner, un 7% de avena y un 19% de trigo no malteado.

**Lúpulo:** los lúpulos usados para este estilo están compuestos en un 40 % de lúpulo Citra, %40 de lúpulo Azzaca y un %20 de lúpulo Amarillo.

**Levadura:** la levadura a usar en este estilo es la CellarScience® CALI Dry Yeast, conocida en el mundo cervecero por su sabor limpio y neutro, que en condiciones óptimas no genera ésteres tan marcados, lo que la hace apta para cualquier estilo donde no se quieren obtener los sabores residuales de algunas levaduras tras la fermentación.

**Adjuntos:** 65 grs. de azúcar de caña refinada, 1.5 grs. de Sulfato de Calcio y 2.5 grs. de cloruro de calcio.



Figura 3. Estilo de cerveza IPA

### 8.1.3. Estilo de cerveza Cream Stout

**Maltas:** el mosto de esta cerveza está compuesto por un 77% de malta Pilsner, un 3.8 % de malta chocolate, un 6.9 % de malta chocolate II, un %3.8 de malta Crystal, un %6.2 de trigo no malteado y un %1.5 de avena.

**Lúpulo:** el 100% de los lúpulos utilizados son de la variedad Cascade.

**Levadura:** la levadura a usar en este estilo es la CellarScience® CALI Dry Yeast.

**Adjuntos:** 65 grs de azúcar de caña refinada, 350 grs de Lactosa en polvo, 1 gr. de Sulfato de Calcio y 2.5 grs. de Cloruro de Calcio.



Figura 4. Estilo de cerveza Cream Stout

### 8.1.4. Estilo de cerveza Strong Blonde

**Maltas:** el mosto de esta cerveza está compuesto por un 92% de Malta Pilsner, 6.2% de extracto de malta seco y 1.8% de malta Belge.

**Lúpulo:** el 100% de los lúpulos utilizados son de la variedad Cascade.

**Levadura:** la levadura a usar en este estilo es la CellarScience® CALI Dry Yeast.

**Adjuntos:** 2.5 grs. de Cloruro de Calcio.



Figura 5. Cerveza estilo Strong Blonde

## 8.2. Proceso de elaboración

### 8.2.1. Maceración, hervor y traslado

El proceso de maceración y hervor de mosto se lleva a cabo en el equipo de elaboración de cerveza BrewZilla® (EUA), este es un sistema de elaboración

de cerveza eléctrico todo en uno que tiene elementos incorporados para calentar, macerar y hervir, cuenta con una bomba incorporada para recircular el mosto, un panel de control resistente al agua para ajustar y controlar las temperaturas.

Se vierten 20 litros de agua a usar al equipo de elaboración de cerveza BrewZilla®, tras esto se programa el equipo para que caliente a una temperatura de 68°C, una vez que llegue a la temperatura deseada se añaden los granos de malta y se dejan macerar exactamente por una hora. Transcurrido este tiempo, se retiran los granos de malta y se dejan escurrir, programando al mismo tiempo el equipo para que llegue a temperatura de hervor, una vez alcanzada esta temperatura se deja hervir por una hora; tras los primeros 15 minutos de hervor, se pone la carga de lúpulo deseada para cada estilo y tras los 50 minutos de hervor, se pone la carga de adjuntos según el estilo de cerveza (lactosa y azúcar).



Figura 6. Equipo de elaboración BrewZilla®.

### 8.2.2. Fermentación

El proceso de fermentación se llevó a cabo en una cubeta de fermentación con capacidad de 20 litros, cuenta con un Airlock, el cual es un dispositivo que permite la salida del CO<sub>2</sub> sin permitir la entrada de oxígeno, para evitar la

oxidación de los componentes de la cerveza y evitar la contaminación por microorganismos aerobios.

Una vez acabado el tiempo de hervor, se pasa a enfriar el mosto con el enfriador incluido del equipo, cuidando en todo momento la higiene del mosto, pues es esta etapa la más susceptible a contaminación. Una vez que el mosto haya llegado a una temperatura de 22-28°C se traslada el mosto al fermentador ya sanitizado y listo. Una vez dentro el mosto, se procede a hacer un preinóculo con un sobre de levadura CellarScience® (EUA), posterior a esto, se inocula en el mosto y se cierra el fermentador, dejándolo bien sanitizado y se deja fermentar a una temperatura que no supere los 30°C hasta que se note la falta de inactividad por la fase de muerte celular



Figura 7. Cubeta de fermentación



Figura 8. Levadura usada para fermentar los lotes de cerveza CellarScience®.



Figura 9. Preinóculo y activación de levadura.

#### **8.2.4. Toma de muestras**

De cada lote de cerveza se tomó una cantidad de 10 mL cada 8 horas, los cuales se usaron para cuantificar las variables, se inició vertiendo directamente un sobre de levadura Cali (CellarScience®), agitando muy bien el fermentador por dos minutos, y en ese momento se tomó la primer muestra (Tiempo 0) y se dejó fermentar por 232 horas (Tiempo 29). Las tomas de muestras se hicieron sin abrir el fermentador para no exponerlo a contaminación y se tomaron de la llave expendedora que viene integrada en la parte inferior de la cubeta de fermentación, esta llave se sanitiza antes y después de la toma de muestras, para evitar dejar residuos de azúcares que puedan ser atrayente de microorganismos o de moscas de la fruta que puedan infectar el interior del fermentador.

#### **8.3. Determinación de compuestos**

Para la elaboración de este proyecto se cuantificaron las siguientes variables:

medición de azúcares reductores, porcentaje de sólidos totales (° Brix), y el porcentaje de alcohol por diferencia de densidades.

### **8.3.1. Medición de azúcares reductores**

Se tomaron 1.5 mL muestra en cada conteo y se realizó la prueba de azúcares reductores por el método de DNS de Miller (Miller, 1959).

a) Preparación de la solución DNS:

1. Disolver 10 g de NaOH Meyer® (México), 0.5 g de metabisulfito de sodio Meyer®, 200 g de tartrato de sodio y potasio Meyer® y 2 g de fenol Fermont® (México), en 600 mL de agua destilada.

2. Añadir poco a poco hasta lograr la disolución completa, 10 g de ácido 3,5-Dinitrosalicílico Quimex® (México)

.

3. Aforar a 1 L con agua destilada.

b) Preparación de la solución patrón de fructosa:

1. Secar la fructosa Labessa® (México) a 60° C por 3 horas.

2. Pesar 0.2 g de fructosa

3. Disolver en 70 mL de agua destilada y aforar a 100 mL.

c) Curva de calibración:

1. De la solución patrón de fructosa, hacer diluciones desde 0 g/L hasta 1 g/L.

2. Leer la absorbancia con espectrofotómetro Milton Roy® (EUA) de las diluciones a 540 nm.

3. Construir una curva de calibración.

c) Determinación de azúcares reductores directos en las muestras.

1. En un microtubo, centrifugar la muestra tomada a 10000 RPM por 5 minutos, en centrífuga Eppendorf® (EUA).

2. Hacer dilución 1/100 del sobrenadante de la muestra.

3. Tomar 500µl de la muestra diluida y añadirle 1500µl de DNS. Colocar las muestras en baño maría a punto de ebullición por 5 minutos.

4. Enfriar a temperatura ambiente en un baño de hielo por 5 min, agregar 8 ml de agua destilada y agitar en vórtex.

5. Poner las muestras en las celdas del espectrofotómetro y leer a 540 nm.

6. Calcular la concentración de los azúcares considerando la ecuación de la curva de calibración y multiplicando por las diluciones de cada muestra (Figura 10)



Figura 10 . Solución patrón de fructosa.

### 8.3.2. Porcentaje de sólidos totales

El porcentaje de sólidos disueltos se obtuvo con la ayuda de un refractómetro de mano marca Anpro® (EUA) (PCE Instruments Chile, 2006), obteniendo directamente los grados Brix . El método de muestreo se sigue bajo las recomendaciones de Liu y Quek (2016) y se medirá cada 8 horas, para conocer el rendimiento de las levaduras y su consumo de maltosa.



Figura 11. Refractómetro de mano marca Anpro® (EUA).

### 8.3.3. Porcentaje de alcohol

El porcentaje de alcohol por volumen se obtuvo gracias al método de diferencias de densidades, por el que conociendo la densidad inicial (OG por sus siglas en inglés) y la densidad final (FG por sus siglas en inglés) del mosto, con una fórmula se puede calcular este % (Amaya y Pascagaza, 2019)

$$\%AV = (GO - GF) * 131$$

Donde:

%AV= Porcentaje de alcohol por volumen.

GO= Gravedad Original

GF= Gravedad final

### 8.3.4. Crecimiento poblacional

Para el conteo directo se usó una cámara de Neubauer MarienField® (EUA) y un microscopio Zeiss® (Alemania) con objetivo 40X; teniendo en cuenta las recomendaciones de muestreo según Vega (2007). La cámara de Neubauer consta de 9 cuadrados con lados de 1 mm (área total de recuento = 0.9 mm<sup>2</sup>), cada uno de los cuales corresponde a un volumen de 0.1 µL. Los cuatro extremos están subdivididos en 16 cuadros pequeños. El cuadro central contiene 25 cuadros, cada uno con un área de 0.04 mm<sup>2</sup> (0.2 mm x 0.2 mm), a su vez divididos en 16 cuadros más pequeños (Figura 12).

En el cuadro central, se hace conteo de células de los cuadros ubicados en las 4 esquinas y en el cuadro central, se promedia el total sumado de los 5 cuadros y se multiplica por 250,000 y por el factor de dilución usado.



Figura 12. Cámara de Neubauer utilizada para el conteo directo.

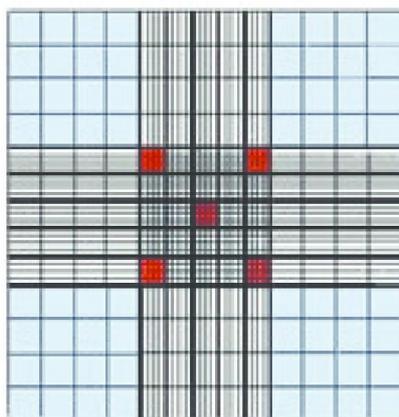


Figura 13.- Cuadros destinados a conteo en cámara de Neubauer.

### 8.3.5. Determinación de parámetros cinéticos

La evaluación de parámetros cinéticos es fundamental en la comprensión y optimización de los procesos de fermentación. En este estudio, se aborda la determinación precisa de parámetros clave, tales como el rendimiento de biomasa con base al sustrato, el rendimiento de producto con base al sustrato, la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y la constante de afinidad al sustrato ( $K_s$ ).

El rendimiento de biomasa con base al sustrato ( $Y_{x/s}$ ) es una medida fundamental de la eficiencia de conversión de sustrato en biomasa durante la fermentación. Se calculó utilizando la fórmula:

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

Donde  $\Delta X$  representa la cantidad de biomasa producida y  $\Delta S$  denota la cantidad de sustrato consumido durante el proceso.

El rendimiento de producto con base al sustrato representa la eficiencia con la que un sustrato determinado se convierte en el producto deseado, se calculó con la fórmula:

$$Y_{x/p} = \frac{\Delta X}{\Delta P}$$

Donde  $\Delta P$  es la cantidad de producto obtenido y  $\Delta S$  es la cantidad de sustrato utilizado.

La velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) es una medida de la máxima tasa de crecimiento específico de la biomasa durante la fase de crecimiento exponencial. Se determinó usando la fórmula:

$$\mu_{max} = \frac{\Delta X}{\Delta T}$$

Donde  $\Delta X$  es el cambio en la concentración de biomasa durante un intervalo de tiempo  $\Delta T$ .

$K_s$  se refiere a la constante de saturación de sustrato. Esta constante es una medida importante en la cinética de crecimiento de microorganismos. Se determinó usando la fórmula:

$$K_s = 1/2 \mu_{max}$$

### 8.3.6. Diseño experimental y análisis estadístico

El trabajo se llevó cabo a través de un diseño categórico completamente aleatorizado de un solo factor con tres réplicas; el factor fue el estilo de cerveza y las variables de respuesta fueron los parámetros cinéticos (velocidad máxima de crecimiento, afinidad del microorganismo por el sustrato,

rendimiento de biomasa con base al sustrato, y rendimiento de producto con base al sustrato) las respuestas se analizaron mediante un análisis de varianza de una sola vía con el 95% de confianza con el programa Past versión 4.03.

## IX. RESULTADOS

### 9.1. Estilo Stout

Los lotes del estilo Stout alcanzaron su crecimiento exponencial a las 160 horas de cultivo, con un total de  $2.36E+10$  cel/mL; en la hora 232 las levaduras experimentan el proceso de muerte celular, misma que se ve reflejada en la cantidad final de  $1.08E+8$  células. El porcentaje final de alcohol fue de 5.33% y en cuanto a azúcares reductores totales, el consumo fue de 11.4 g/L, como se observa en la Fig.14 y el valor de pH, antes de la fermentación era de un valor de 5.1 y después de la fermentación, 4.2. Vistos al microscopio, en los lotes Stout resaltan fragmentos de la malta de cebada tostada, como pequeñas islas de color café en las que a veces se nota en sus alrededores algunos conglomerados de levaduras, como se nota en la figura 15.

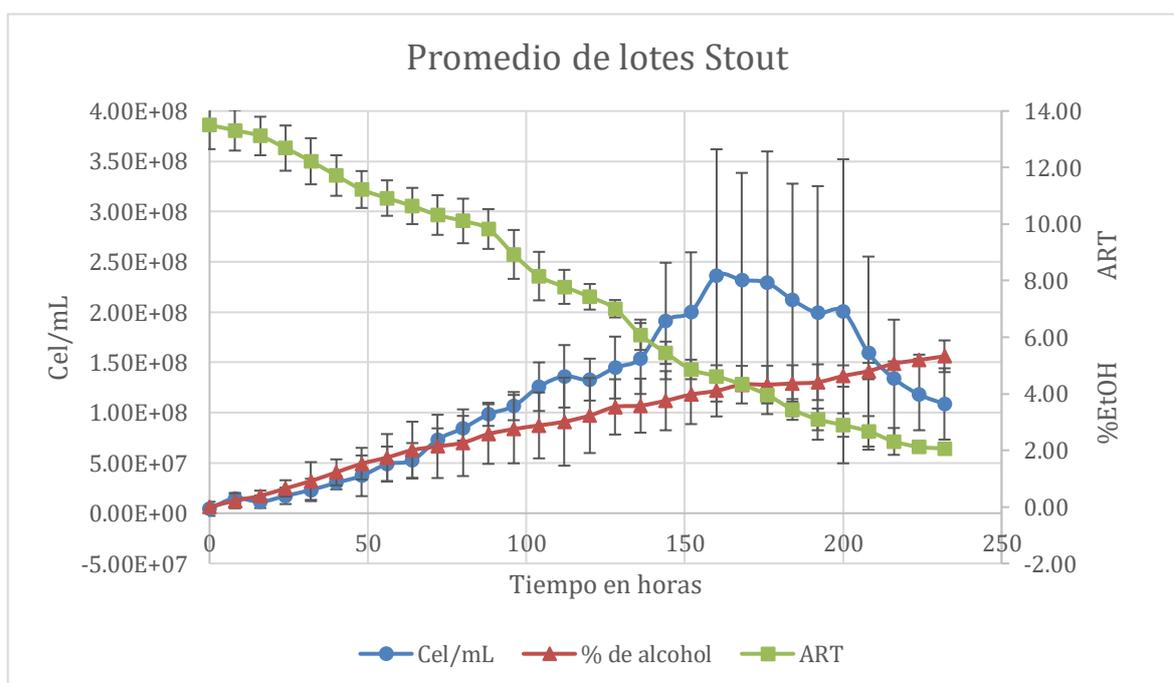


Figura 14. Crecimiento microbiano, % de alcohol y ART de los lotes del estilo Stout en un cultivo por lote a nivel de fermentador de 20 L.

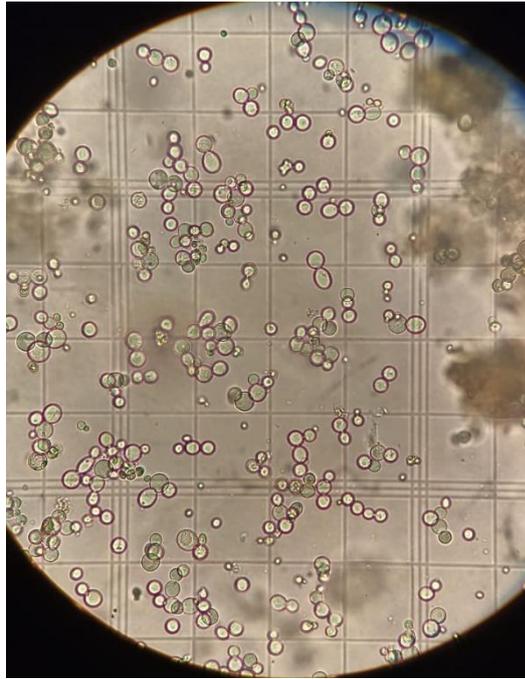


Figura 15. Células de levadura *S. cerevisiae* del Lote de stout observadas al microscopio con cámara de Neubauer con el objetivo 40X.

## 9.2. Estilo IPA

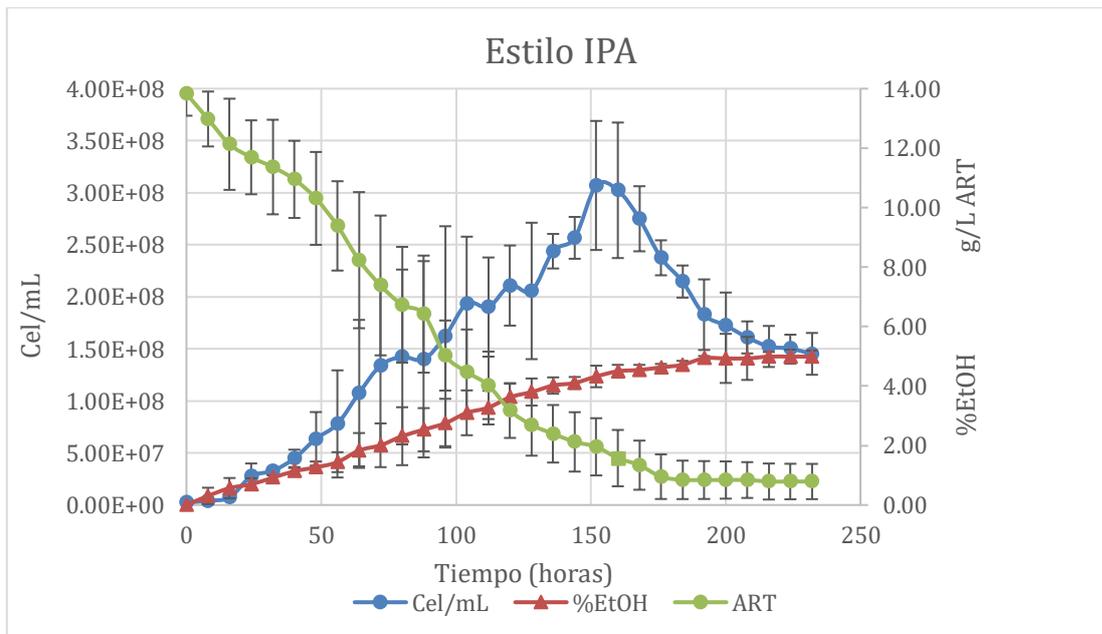


Figura 16. Crecimiento microbiano, % de alcohol y ART de los lotes del estilo IPA en un cultivo por lote a nivel de fermentador de 20 L.



Figura 17. Células de levadura *S. cerevisiae* del Lote de IPA observadas al microscopio con cámara de Neubauer con el objetivo 40X.

Los lotes del estilo IPA alcanzaron el pico de crecimiento en la hora 152, con un total de  $3.07E+8$ , seguido de un declive en el número total de levaduras, terminando con  $1.82E+8$  a la hora 192. El porcentaje final de alcohol fue de 4.93% y en cuanto a azúcares reductores totales, el consumo fue de 12.99 g/L, todo mostrado en la figura 16. Al principio de la fermentación, el valor de pH era de 5.4, y terminó con un total de 4.4. Vistos al microscopio, los estilos de IPA presentan una peculiaridad distintiva y es que, alrededor de los pedazos de lúpulo disueltos en el agua se notan grandes conglomerados de levaduras, como se aprecia en la figura 17.

### 9.3. Estilo Strong Blonde

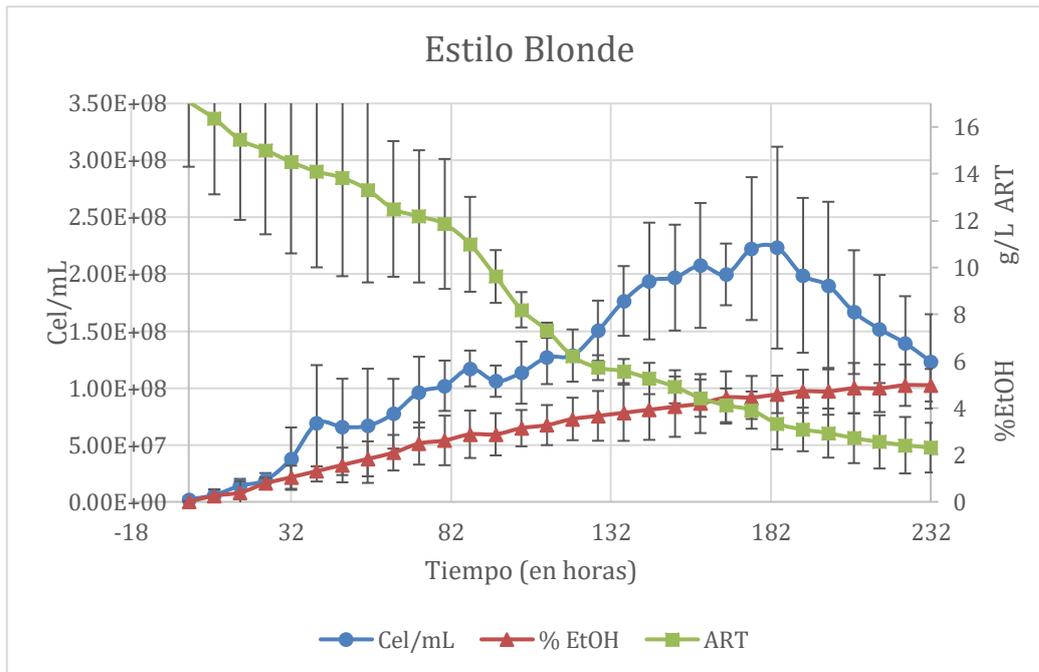


Figura 18. Crecimiento microbiano, % de alcohol y ART de los lotes del estilo Strong Blonde en un cultivo por lote a nivel de fermentador de 20 L.

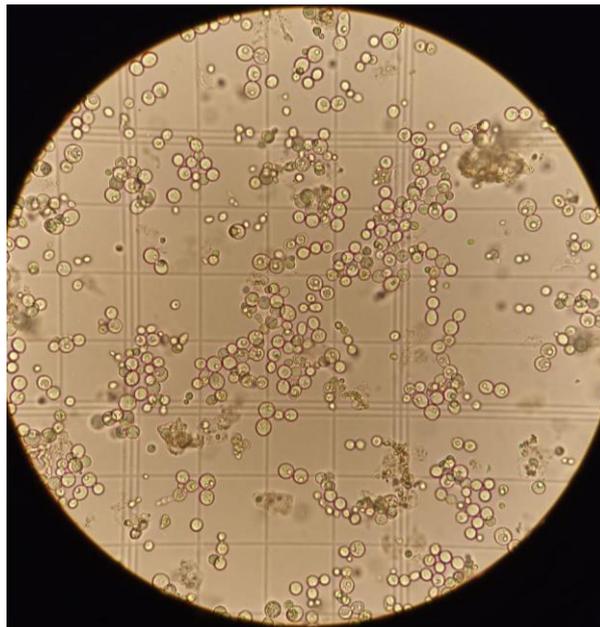


Figura 19. Células de levadura *S. cerevisiae* del Lote de Strong Blonde observadas al microscopio con cámara de Neubauer con el objetivo 40X.

Los lotes del estilo Blonde alcanzaron el pico de crecimiento en la hora 184, con un total  $2.23E+8$  seguido de un declive en el número total de levaduras, terminando con  $3.63E+8$  a la hora 248. El porcentaje final de alcohol fue de 4.98% y en cuanto a azúcares reductores totales, el consumo total fue de 14.76. El valor del pH al inicio de la fermentación fue de 5.3, terminando con un valor de 4.3. Los valores se aprecian en la figura 18.

#### 9.4. Parámetros cinéticos

Cuadro 1. Parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en los estilos de cerveza analizados.

Estilo de cerveza	$\mu_{max} \text{ h}^{-1} \pm \text{DE}$	$Y_{x/s} \text{ cel/gART} \pm \text{DE}$	$Y_{p/s} \% \text{EtOH/gART} \pm \text{DE}$	$K_s \pm \text{DE}$
Stout	$0.02 \pm 0.005$	$2.81E+07 \pm 1.07E+07$	$4.96E-01 \pm 0.2$	$9.33E-03 \pm 2.52E-03$
IPA	$0.02 \pm 0.003$	$2.91E+07 \pm 7.06E+06$	$3.80E-01 \pm 0.1$	$9.67E-03 \pm 1.53E-03$
Blonde	$0.01 \pm 0.001$	$2.23E+07 \pm 9.22E+06$	$3.45E-01 \pm 0.1$	$5.67E-03 \pm 7.64E-03$

En los parámetros cinéticos estudiados, se observaron diferencias entre los estilos de cerveza analizados. La velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) osciló en el rango de  $0.01 \text{ h}^{-1}$  a  $0.02 \text{ h}^{-1}$ , con desviaciones estándar que variaron entre 0.001 y 0.005. Los valores de  $Y_{x/s}$ , que representan la eficiencia de conversión de sustrato en biomasa, mostraron una tendencia similar, con valores que oscilaron entre  $2.23E+07 \text{ cel/gART}$  y  $2.91E+07 \text{ cel/gART}$ , y desviaciones estándar que variaron entre  $7.06E+06$  y  $1.07E+07$ . Los valores de  $Y_{p/s}$ , que indican la eficiencia de conversión de sustrato en producto, variaron entre  $3.45E-01 \% \text{EtOH/ART}$  y  $4.96E-01 \% \text{EtOH/ART}$ , con desviaciones estándar que oscilaron entre 0.1 y 0.2. Por último, los valores de  $K_s$  oscilaron entre  $5.67E-03$  y  $9.67E-03$  con una desviación estándar que varía desde  $1.53E-03$  a  $7.64E-04$  (Cuadro 1).

#### 9.5. Análisis estadístico

Para el caso de la velocidad máxima de crecimiento, no hubo diferencia estadísticamente significativa, por lo tanto, no se puede rechazar la hipótesis nula ( $p = 0.05705$ ),

Con un valor de  $p$  de 0.6355, no se encontró evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula y se encontró que no hay diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento de biomasa entre los estilos de cerveza analizados basados en el sustrato.

Dado que el valor de  $p$  es 0.301, no se encontró suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula. En consecuencia, no existen diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento de la biomasa con base a sustrato entre los estilos de cerveza analizados basados en el producto.

En cuanto a la constante de afinidad al sustrato  $K_s$ , no se encontró una diferencia significativa para rechazar la hipótesis nula ( $p=0.05705$ ), por lo tanto, se concluye que no hay una diferencia estadísticamente significativa.

## X. DISCUSIÓN

### 10.1. Estilo stout.

El uso de malta tostada y de lactosa, usada en este estilo acidifican ligeramente el pH del mosto y de la cerveza terminada. El descenso del pH en el mosto y en la cerveza puede tener implicaciones importantes en el proceso de fermentación. Investigaciones previas (Liu et al., 2015) han indicado que un pH bajo al inicio del proceso de fermentación puede prolongar la fase Lag; período inicial en el que las levaduras se adaptan a las condiciones del medio y comienzan a metabolizar los azúcares presentes. Esta prolongación en la fase Lag puede afectar negativamente la velocidad y eficiencia de la fermentación. Los resultados obtenidos en este estudio indican que la acidificación del mosto causada por los ingredientes no tuvo un impacto significativo en la calidad de la fermentación. Esta conclusión se respalda al comparar los datos presentados en las Figuras 14, 16 y 18, que muestran que no hubo alteraciones notables en la fase lag del lote Stout. Además, la velocidad máxima de crecimiento, tal como se detalla en el Cuadro 1, no presentó cambios distintivos.

Inicialmente, se esperaba que la avena, al ser una fuente adicional de proteínas, tuviera un efecto en la fermentación. Se sabe que las proteínas podrían interactuar con otros componentes de la cerveza, afectando su turbidez, aroma y sabor. Además, se consideró que un aumento en el contenido proteico podría influir en la actividad de las levaduras durante la fermentación, afectando la eficiencia del proceso y la producción de compuestos deseados como lo reportan Gordon y colaboradores en 2018. Aunque la avena es una fuente rica en proteínas, es posible que la cantidad utilizada no haya sido suficiente para inducir una variación significativa en el contenido proteico total del mosto. Esta observación se sustenta en los resultados de los parámetros cinéticos (ver Cuadro 1), que indican que no

hay una diferencia significativa en la afinidad de las levaduras a este sustrato que tiene adición de avena. Además, la velocidad máxima de crecimiento de las levaduras tampoco muestra un cambio significativo.

Otro factor interesante a analizar de este estilo es la lactosa adicionada, ya que, al ser un azúcar, tiene un efecto directo en la presión osmótica del mosto y del producto final y, a pesar de que sí se notó un aumento en la densidad en azúcares, los resultados muestran que no es significativo como para relacionarlo como un efecto negativo directo, lo contrario a lo encontrado en otros estudios como el de López y Corona en 2016, que reportan que la presión osmótica producida por los azúcares al principio de la fermentación y el resultado final de alcohol actúan como estrés químico potente hacia las células de levaduras. Los principales efectos del etanol afectan la viabilidad de la célula y su crecimiento, en la biosíntesis de macromolécula y en la estructura de la membrana y su función.

## **10.2. Estilo IPA.**

Bryant y Cohen en su estudio del 2015 reportan que el lúpulo contiene compuestos como proteínas, minerales y otros nutrientes esenciales que pueden actuar como fuentes adicionales de alimento para las levaduras. Estos nutrientes pueden promover un crecimiento más rápido y una mayor actividad fermentativa de las levaduras, lo que se traduce en una fermentación más rápida y eficiente en los lotes de cerveza IPA. Por otro lado, a pesar de los posibles beneficios nutricionales, también hay estudios que indican que el lúpulo podría afectar negativamente a las levaduras durante la fermentación. Algunos compuestos presentes en el lúpulo, como los alfa-ácidos y los aceites esenciales, poseen propiedades antimicrobianas que pueden inhibir el crecimiento y la actividad de las levaduras. Esta inhibición podría manifestarse especialmente en altas concentraciones de lúpulo o en ciertas cepas de levadura más sensibles a estos compuestos (De Keukeleire, 2000). De acuerdo con los resultados obtenidos de nuestros parámetros cinéticos, no se observa una diferencia significativa que permita concluir que la adición adicional de lúpulo tiene un efecto notable en la alteración de dichos parámetros (ver Cuadro 1).

Es importante mencionar que, hay varios factores que pueden intervenir, como la cepa de levadura usada o incluso, las cepas y la cantidad de lúpulo, pues recordemos que los lúpulos varían en concentraciones de resina, compuestos por los agentes bioquímicos que tienen efecto sobre las levaduras (Durello *et al.*, 2019).

### **10.3. Estilo Strong Blonde.**

Es el estilo con más tiempo de fermentación, y esto debido al uso de Maltosa extra para aumentar la densidad original de la cerveza, dato que concuerda con estudios previos (Timmermas *et al.*, 2022) donde al adicionar azúcares fermentables a un mosto, se observa un aumento en el tiempo de fermentación y en el porcentaje de alcohol final, y a pesar de que una mayor cantidad de azúcares podría causar estrés osmótico; como lo reportado por Marshall y colaboradores en el 2002, que reportaron que un mosto con elevada concentración de azúcares afecta a la morfología celular de la levadura y causa una reducción en el volumen celular. También se han registrado disminuciones en el crecimiento, la viabilidad y la actividad metabólica de las células. Los resultados de estos lotes sugieren que la alta concentración de azúcares reductores característica de este lote no ejerce un impacto significativo en los parámetros cinéticos observados.

### **10.4. Parámetros cinéticos**

En un contexto fermentativo, la evaluación de los parámetros cinéticos emerge como un aspecto fundamental para discernir la capacidad adaptativa y la versatilidad de las levaduras en condiciones específicas de cultivo. Los hallazgos de este estudio, en relación con los mencionados parámetros cinéticos, guardan similitudes con las investigaciones previas realizadas por Arellano y colaboradores en 2008 y por Tawas (2019). En el primer estudio, se caracterizaron los parámetros

cinéticos de tres cepas de *S. cerevisiae* y una de *Kloeckera spp.* silvestres durante la fermentación de jugo de agave para la producción de tequila, utilizando un reactor de 1.5 litros. Los resultados revelan que las cuatro cepas de levadura analizadas exhiben valores comparables en cuanto a  $\mu_{\max}$ ,  $Y_{x/s}$  (rendimiento de biomasa) y  $r_{s\max}$  (tasa máxima de consumo de azúcares), un resultado similar al obtenido en este proyecto de investigación, donde no se observan significativas entre los lotes.

Mientras que, Tawas (2019) investigó el comportamiento cinético de tres cepas de *S. cerevisiae*, las cuales fueron aisladas de la bebida tradicional denominada Chicha de chilacayote. El análisis se centró en tres parámetros cinéticos clave: el rendimiento de biomasa ( $Y_{x/s}$ ), el rendimiento de producto ( $Y_p/s$ ) y la tasa máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ). Los resultados de esta investigación no revelaron diferencias significativas entre las cepas examinadas en cuanto a estos parámetros cinéticos, lo que sugiere una homogeneidad en su respuesta metabólica bajo las condiciones estudiadas

## X. CONCLUSIÓN

El presente estudio ha proporcionado una visión detallada de la cinética de crecimiento poblacional de *Saccharomyces cerevisiae* en tres estilos distintos de cerveza artesanal: Stout, IPA y Blonde. Además, se ha llevado a cabo una comparación de los comportamientos cinéticos durante la fermentación y se ha evaluado la influencia de los ingredientes específicos de cada estilo en la capacidad fermentativa de la levadura.

El análisis de la cinética de crecimiento poblacional de *Saccharomyces cerevisiae* en los estilos de cerveza artesanal Stout, IPA y Blonde ha revelado aspectos clave sobre cómo la levadura se comporta en diferentes contextos fermentativos. A lo largo de la investigación, se observaron variaciones en los parámetros cinéticos entre los estilos de cerveza, pero también se identificaron patrones consistentes que aportan una comprensión integral de la fermentación.

### **1.- Características de Crecimiento Poblacional:**

- En los lotes del estilo Stout, la fermentación alcanzó el crecimiento exponencial a las 160 horas con una densidad máxima de  $2.36E+10$  células/mL. El porcentaje final de alcohol fue de 5.33%, con un consumo de azúcares reductores de 11.4 g/L, y un cambio en el pH de 5.1 a 4.2.
- En el estilo IPA, el crecimiento exponencial se alcanzó a las 152 horas con una densidad máxima de  $3.07E+8$  células/mL, con un descenso en la población celular hacia la hora 192. El porcentaje de alcohol final fue de 4.93%, con un consumo de azúcares reductores de 12.99 g/L, y un cambio en el pH de 5.4 a 4.4.
- Para el estilo Blonde, la fermentación duró 248 horas, alcanzando el crecimiento exponencial a las 184 horas con una densidad máxima de  $2.23E+8$  células/mL. La población celular final fue de  $3.63E+8$  células/mL. El porcentaje de alcohol final fue de 4.98%, con un consumo de azúcares reductores de 14.76 g/L, y el pH cambió de 5.3 a 4.3.

### **2.- Evaluación de Parámetros Cinéticos.**

De acuerdo a los resultados mostrados previamente, los valores de velocidad máxima de crecimiento ( $V_{el\ max}$ ), eficiencia de conversión de sustrato en biomasa ( $Y_{x/s}$ ) y eficiencia de conversión de sustrato en producto ( $Y_{p/s}$ ) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los estilos de cerveza. Las constantes de afinidad al sustrato ( $K_s$ ) también mostraron resultados sin diferencias significativas. Esto indica que, a pesar de las variaciones en los estilos de cerveza, la eficiencia general de *S. cerevisiae* en términos de conversión de sustrato a biomasa y producto no varía significativamente.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio proporcionan una visión clara de la cinética de *S. cerevisiae* en distintos estilos de cerveza artesanal. A pesar de las variaciones en los ingredientes y las condiciones de fermentación, los parámetros cinéticos fundamentales como la velocidad máxima de crecimiento, la eficiencia de conversión de sustrato en biomasa y producto, y la constante de afinidad al sustrato no mostraron diferencias

estadísticamente significativas. Esto implica que la capacidad fermentativa de *S. cerevisiae* es robusta y se mantiene constante a través de diferentes estilos de cerveza. Estos hallazgos son relevantes para la optimización de procesos en la producción artesanal de cerveza, proporcionando una base para futuros estudios que exploren cómo otros factores, como la temperatura y la aireación, pueden influir en la fermentación y en la calidad del producto final.

## XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Almonacid, S., Nájera, A., Young, M., Simpson, R. 2012. Un estudio comparativo de lotes de cerveza Stout utilizando microcápsulas de levadura. Departamento de Procesos Químicos Biotecnológicos y Ambientales. Universidad Técnica Federico Santa María, España.
- Amaya, A. y Pascagaza, M. 2019. Evaluación de perfiles fermentativos para la elaboración de cerveza artesanal por levaduras nativas (Bachelor's thesis, Fundación Universidad de América).
- Álvarez, M. 2018. Control del proceso de fermentación de cerveza artesanal. Facultad de Ingeniería de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Arellano, M., Pelayo, C., Ramírez, J., & Rodriguez, I. 2008. Characterization of kinetic parameters and the formation of volatile compounds during the tequila fermentation by wild yeasts isolated from agave juice. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(8), 835-841.
- Bahrens, C. y Rodrigo, M. 2013. Producción De Proteínas Recombinantes En Cultivos Fed-Batch De *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli*. Pontificia Universidad Católica de Chile ,(Chile) ProQuest Dissertations Publishing.
- Blasco, L., Viñas, M., Villa, T. 2011. Proteins influencing foam formation in wine and beer: the role of yeast. Spanish Society for Microbiology (SEM). *International Microbiology*. 5(16).
- Bryant, R. & Cohen, S. 2015. Characterization of hop acids in spent brewer's yeast from craft and multinational sources. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 73(2), 159-164.

- Calloway, D. 1997. Beer-lambert law. *Journal of Chemical Education*, 74(7), 744.
- Castañeda, T. 2019. Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano. Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional La Plata. Argentina. Apunte redactado.
- Cavaliere, D., McGovern, P., Hartl, D., Mortimer, R., Polsinelli, M. 2003. Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *Journal of Molecular Evolution*. 57 Suppl 1: S226-3
- Cordero, P., & Verdugo, L. 2006. Bioquímica Humana (Metabolismo Intermedio). Cuenca: Universidad De Cuenca Facultad De Ciencias Médicas
- Cornell, M. 2003. Beer: The Story of the Pint. England. Headline Book Pub Lt
- Deacon, J.W., 1997. Introduction to Modern Mycology, 3a ed. Blackwell Science, Boston.
- De Keukeleire, D. 2000. Fundamentals of beer and hop chemistry. *Química nova*, 23, 108-112.
- Durello, R., Silva, L., Y Bogusz, S. 2019. Química do lúpulo. *Química Nova*, 42, 900-919.
- Eyzaguirre, P. 1985. Química de los Hidratos de Carbono. Chile: Andres Bello.
- Ezapata, J., Hoyos, M., Quinchía, L. 2005. Parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en presencia de un campo magnético variable de baja intensidad y alta frecuencia. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 12(1).

- Ezeji, T., Blaschek, H., Qureshi, N. 2005. "Industrially Relevant Fermentations". Handbook on Clostridia: CRC Press. Chapter 36.
- Folch-Mallol, J., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., y Robles, A. 2004. La respuesta al estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Revista latinoamericana de microbiología, 46(1-2), 24-46.
- Galán, B., Merino, M., Alonso, M., Manchado, M., Luis, A., Tabuc, S. y Nogueras, P. 2018. Influencia de los factores ambientales en la cinética de crecimiento de las levaduras. Edita IeS., 17(21), 95.
- Gandía, F. y López, M. 2018. Prácticas. Técnicas Instrumentales: HPLC y Refractometría.
- Garduño-García, A., López-Cruz, I., Martínez-Romero, S., Ruíz-García, A. 2014. Simulación del proceso de fermentación de cerveza artesanal. *Revista de Ingeniería Investigación y Tecnología de la UNAM*. 15 (1).
- Garzón, S. y C. Hernández. 2009. Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. Tesis de licenciatura. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. 132 pp.
- Gordon, R., Power, A., Chapman, J., Chandra, S., & Cozzolino, D. 2018. A review on the source of lipids and their interactions during beer fermentation that affect beer quality. *Fermentation*, 4(4), 89.
- Granada-Díaz, H. y Grosso, G. 2020. Cinética del proceso de fermentación de mostos en la producción de cerveza. Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales, 7(2), 9-21.

- Hernández, A. 2003. Microbiología industrial. Editorial EUNED. México. 270 p.
- Hutkins, W. 2006. Microbiology and Technology of Fermented Foods. Ed. Blackwell publishing.
- Jackson, M. 1999. El libro de la cerveza. Barcelona: Editorial Naturart
- Karanthand, G. y Raj, E. 2005. Fermentation Technology and Bioreactor Design. 2da edición. Food Biotechnology. C. 1.03.
- Kun, Y. 2006. Microbial Biotechnology: Principles And Applications. *World Scientific*; 8(3).
- Lanchimba, R., Darwin, F., Narváez, H. 2021. Implementación de un sistema de control de temperatura para un fermentador de cerveza artesanal. Tesis de Licenciatura. Ecuador: Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi: UTC.
- Liu, X., Jia, B., Sun, X., Ai, J., Wang, L., Wang, C. y Huang, W. 2015. Effect of initial pH on growth characteristics and fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of food science*, 80(4),.
- Liu, S. y Quek, A. 2016. Evaluation of beer fermentation with a novel yeast *Williopsis saturnus*. *Food technology and biotechnology*, 54(4), 403.
- Lodolo, E., Kock, J., Axcell, B., Brooks, M. 2008. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*– the main character in beer brewing. *FEMS: Yeast research*; 8(7).

- López, V., y Corona, C. 2016. Respuestas metabólicas al estrés de levaduras de importancia industrial. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, (67), 86-91.
- Manaj, H., Pinguli, L., Malollari, I. y Dhroso, A. 2018. Impact of temperature on beer fermentation kinetics. *UBT International Conference*. 172.
- Marshall, P., Brey, S., De Costa, S., y Stewart, J. 2002. Fabricación de cerveza de alta densidad. Un inductor de estrés en la levadura. *Cerveza y Malta*, 161(1), 31-37.
- Maye, J., Smith, R. 2018 *Hidden Secrets of the New England IPA*. American Society of Brewing Chemists: St. Paul, MN.
- Mendoza, A. 2013. Caracterización de la levadura *Kluyveromyces marxianus* como microorganismo probiótico. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México. 63 pp.
- Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3). pp. 426-428.
- Muñoz, M., & Catrilaf, G. 2013. Estimación de parámetros cinéticos de *Saccharomyces cerevisiae* en sistema de fermentación batch bajo distintas condiciones de crecimiento. *International journal of food microbiology*, 131(2-3), 120–127.
- Nievas, E., Villarreal, P., Rosati, A., Rodriguez, A. y Lago, J. 2021. *El cultivo del lúpulo. Aspectos agroambientales y económicos para el Alto Valle del río Negro*. Ediciones INTA

- Novillo, J. 2021. Evaluación de la producción de etanol mediante la aplicación del efecto crabtree. *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba.*
- Okpokwasili, G. y Nweke, C. 2005. Microbial growth and substrate utilization kinetics. *African Journal of Biotechnology*. 5 (4): 305-317.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A., Hatziloukas, E. 2020. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology*, 6(1), 1.
- PCE instrumentos de chile. 2006. Refractómetro de mano. *Instrucciones de uso. [www.pceiberica.es/manuales/manual-refractometromanual.pdf](http://www.pceiberica.es/manuales/manual-refractometromanual.pdf).*
- Pérez, E., González, J., Chávez, M., & Cortés, C. 2013. Caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de jugo de *Agave cupreata* en la elaboración de mezcal. *Revista mexicana de ingeniería química*, 12(3), 451-461.
- Pérez, M. 2016. *Análisis teórico-experimental de la ruta metabólica fermentativa de Saccharomyces cerevisiae para la obtención de etanol* (Master's thesis, Tesis (MC)--Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Departamento de Biotecnología y Bioingeniería)
- Priest, F., Campbell, I.1996. *Brewing microbiology*. Chapman and Hall, London.
- Rodríguez, M. 2007. Análisis genómico y molecular de levaduras vínicas. Aplicación a la mejora del proceso de fermentación de vinos mediante selección de levaduras autóctonas. Tesis de doctorado. Universidad de Cádiz. España. 291 pp.

- Salvador, C. 2015. Cuéntame: Cebada. Fundación Empresas Polar, Ed. Arte.
- Sánchez, I. 2008 Evaluación nutrimental del sedimento de cerveza elaborada con cebada maltera. Tesis de grado de Licenciatura de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Scragg, L. 1997. Sistemas biológicos en procesos biotecnológicos. Biotecnología para ingenieros. México: Limusa. p. 50-160.
- Steinkraus, K. 2018. Handbook of Indigenous Fermented Foods (Second edición). CRC Press.
- Tamai, Y., Momma, T., Yoshimoto, H., Kaneko, Y. 1998. Co-existence of two types of chromosome in the bottom fermenting yeast: *Saccharomyces pastorianus*. *Yeast* 14(10).
- Tawas, M. 2009. Comportamiento cinético de crecimiento de *S. cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen, aisladas de la bebida tradicional "Chicha de Chilacayote" (*Cucurbita ficifolia* Bouché). Tesis de grado de Licenciatura de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
- Timmermans, E., Bautil, A., Brijs, K., Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., & Courtin, C. M. 2022. Sugar levels determine fermentation dynamics during yeast pastry making and its impact on dough and product characteristics. *Foods*, 11(10).
- Torija, M., Rozes, N., Poblet, M., Guillamón, J., y Mas, A. 2003. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International journal of food microbiology*, 80(1), 47-53.

- Uribe, L. 2007. Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 154 pp.
- Vega, B. & Voltolina, D. 2007. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*, 1, 17-25.
- Verhoef, B. 2003. La enciclopedia de la cerveza. Arganda del Rey: Editorial Edimat Libros. España.
- Villamil, Y. y Zapata, Y. 1999. Caracterización de levaduras fermentadoras aisladas de frutas en descomposición con potencial aplicación productora de etanol. Tesis de licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F., van 'T Riet, K. 1990. «Modeling of the Bacterial Growth Curve». *Applied and Environmental Microbiology* 56 (6): 1875-1881