

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE *RHODOTORULA GLUTINIS* PARA LLEVAR A CABO LA PRODUCCIÓN DE CERVEZA ARTESANAL SIN ALCOHOL

Trabajo de graduación en modalidad de trabajo profesional presentado por
Marcela Alejandra González Alvarez
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología
Industrial

Guatemala

2023

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE *RHODOTORULA GLUTINIS* PARA LLEVAR A CABO LA PRODUCCIÓN DE CERVEZA ARTESANAL SIN ALCOHOL

Trabajo de graduación en modalidad de trabajo profesional presentado por
Marcela Alejandra González Alvarez
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología
Industrial

Guatemala

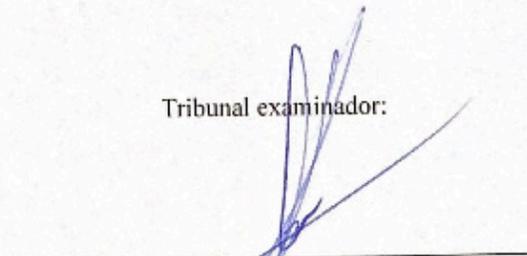
2023

Vo. Bo.



MSc. & MBA Ing. Luis Ernesto Núñez González.

Tribunal examinador:



MSc. Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano.



M.A. Ing. Carmen Alicia Ortiz Pineda.



MSc. & MBA Ing. Luis Ernesto Núñez González.

Guatemala, 5 de enero de 2023.

Prefacio

El presente trabajo proviene no solo del interés personal y profesional que se tiene sobre el proceso de elaboración de cerveza, sino que también del deseo de buscar alternativas al proceso de diversificación de la industria cervecera en Guatemala.

Dicho trabajo no hubiese sido posible sin el incansable apoyo de familia, mentores y docentes, a quienes agradezco profundamente:

A mi familia, Marco Vinicio, María Isabel, Mónica, Diego y Juan Andrés; por ser siempre apoyo y dar consejo y palabras de aliento en cada paso del camino.

A mi mentor, Axel Campos; por compartir conmigo su conocimiento, experiencia y pasión sobre la elaboración de cerveza.

A mis docentes, Ing. Luis Núñez, Ing. Gamaliel Zambrano, Lic. Carlo Martínez y Ph.D. Dalia Lau; por el tiempo, los consejos, los recursos brindados y el conocimiento y la experiencia transmitida, que más que contribuir al presente trabajo, contribuyen de forma especial a mi formación académica y profesional.

Contenido

Prefacio.....	v
Listado de cuadros.....	viii
Listado de figuras	xi
Listado de cálculos	xviii
Listado de abreviaciones	xx
Resumen	xxi
Abstract	xxii
I. Introducción.....	1
II. Justificación	3
III. Objetivos	5
A. General	5
B. Específicos	5
IV. Marco teórico	6
A. Producción de cerveza.....	6
B. Producción de cerveza sin alcohol	12
C. Métodos para producir cerveza sin alcohol.....	14
D. Proceso de fermentación parcial utilizando levaduras especiales.....	17
E. Evaluación del producto final	23
V. Antecedentes.....	25
VI. Metodología	26

A.	Prueba de consumo de etanol por <i>R. glutinis</i>	26
F.	Preparación de cultivo iniciador de <i>S. cerevisiae</i>	27
G.	Preparación de cultivo iniciador de <i>R. glutinis</i>	30
H.	Determinación de la calidad del agua	32
I.	Preparación del mosto a fermentar.....	33
J.	Fermentación parcial.....	35
K.	Determinaciones fisicoquímicas	37
L.	Análisis de datos	41
VII.	Resultados	42
VIII.	Discusión de resultados.....	51
IX.	Conclusiones	61
X.	Recomendaciones	63
XI.	Bibliografía	64
XII.	Anexos.....	67
A.	Datos originales.....	67
B.	Cálculos de muestra	84
C.	Datos calculados.....	98
D.	Análisis de error	123
E.	Balances de masa	124
XIII.	Glosario	164

Listado de cuadros

Cuadro 1. Sabores falla comunes en el proceso de elaboración de cerveza.....	10
Cuadro 2. Consumo de etanol con respecto al tiempo en caldo Dextrosa Sabouraud inoculado con <i>R. glutinis</i>	42
Cuadro 3. Inóculo inicial de <i>S. cerevisiae</i> a utilizar en el proceso de fermentación parcial.....	43
Cuadro 4. Inóculo inicial de <i>R. glutinis</i> a utilizar en el proceso de fermentación parcial.....	44
Cuadro 5. Formulación del mosto a utilizar en el proceso de fermentación parcial.....	45
Cuadro 6. Determinación de la concentración de etanol con respecto al tiempo en el proceso de fermentación parcial de <i>S. cerevisiae</i> y <i>R. glutinis</i>	48
Cuadro 7. Caracterización del producto final obtenido a partir del proceso de fermentación parcial de <i>S. cerevisiae</i> y <i>R. glutinis</i>	49
Cuadro 8. Datos para la calibración del espectrofotómetro UV-VIS para concentración de <i>S. cerevisiae</i>	67
Cuadro 9. Datos para la calibración del espectrofotómetro UV-VIS para concentración de <i>R. glutinis</i>	67
Cuadro 10. Densidad óptica a 600 nm de <i>S. cerevisiae</i> en medio de cultivo Dextrosa Sabouraud utilizando un espectrofotómetro UV-VIS	68
Cuadro 11. Densidad óptica a 600 nm de <i>R. glutinis</i> en medio de cultivo Dextrosa Sabouraud utilizando un espectrofotómetro UV-VIS	68
Cuadro 12. Dureza del agua desmineralizada.....	69
Cuadro 13. Concentración de etanol en el proceso de fermentación parcial	69
Cuadro 14. Concentración de glucosa en el proceso de fermentación parcial.....	71
Cuadro 15. Concentración de fructosa en el proceso de fermentación parcial	74
Cuadro 16. Concentración de maltosa en el proceso de fermentación parcial.....	76
Cuadro 17. Lectura de absorbancia sin celda en el espectrofotómetro UV-VIS a diferentes longitudes de onda.....	78
Cuadro 18. Absorbancia a 340 nm de estándar de acetaldehído a diferentes concentraciones para preparación de curva de calibración.....	79

Cuadro 19. Absorbancia del producto final a 340 nm para determinación de la concentración de acetaldehído.....	79
Cuadro 20. Absorbancia a 470 nm de estándar de β -caroteno a diferentes concentraciones para preparación de curva de calibración.....	80
Cuadro 21. Absorbancia del producto final a 470 nm para determinación de la concentración de β -caroteno	80
Cuadro 22. Absorbancia del producto final a 430 nm para determinación de valor SRM	81
Cuadro 23. Absorbancia del producto final a 700 nm para determinación de turbidez.....	81
Cuadro 24. Porcentaje Brix de la muestra inicial y del producto final para determinación de gravedad original y final	82
Cuadro 25. Percepción sensorial del consumidor en cuanto al sabor del producto final.....	82
Cuadro 26. Percepción sensorial del consumidor en cuanto al olor del producto final.....	83
Cuadro 27. Concentración celular de <i>S. cerevisiae</i> al finalizar su etapa en el proceso de fermentación parcial.....	83
Cuadro 28. Concentración celular de <i>R. glutinis</i> al finalizar su etapa en el proceso de fermentación parcial.....	83
Cuadro 29. Determinación de altura del agua a lo largo del proceso de preparación del mosto para determinación de grados IBU y balances de masa.....	84
Cuadro 30. Datos de <i>S. cerevisiae</i> utilizados para curva de calibración.....	98
Cuadro 31. Datos de <i>R. glutinis</i> utilizados para curva de calibración.....	99
Cuadro 32. Concentración de <i>S. cerevisiae</i> calculada con curva de calibración por corrida.....	100
Cuadro 33. Número de células de <i>S. cerevisiae</i> inoculadas por corrida	101
Cuadro 34. Concentración de <i>R. glutinis</i> calculada con curva de calibración por corrida.....	101
Cuadro 35. Número de células de <i>R. glutinis</i> inoculadas por corrida	102
Cuadro 36. Concentración de etanol (% v/v) por corrida	102
Cuadro 37. Concentración de etanol (% v/v) por prueba	105
Cuadro 38. Concentración de glucosa (% v/v) por corrida	106
Cuadro 39. Concentración de fructosa (% v/v) por corrida	108
Cuadro 40. Concentración de maltosa (% v/v) por corrida.....	110
Cuadro 41. Concentración de azúcares fermentables (% v/v) por corrida.....	112
Cuadro 42. Concentración de azúcares fermentables (% v/v) por prueba	115
Cuadro 43. Datos de lectura de absorbancia a 340 nm corregidos para curva de calibración de acetaldehído.....	116

Cuadro 44. Lecturas de absorbancia a 340 nm de acetaldehído en el producto final de cada corrida corregidas	117
Cuadro 45. Determinación de acetaldehído en el producto final de cada corrida a partir de curva de calibración	117
Cuadro 46. Datos de lectura de absorbancia a 470 nm corregidos para curva de calibración de β -caroteno	118
Cuadro 47. Lecturas de absorbancia a 470 nm de β -caroteno en el producto final de cada corrida corregidas	119
Cuadro 48. Determinación de β -caroteno en el producto final de cada corrida a partir de curva de calibración	119
Cuadro 49. Lecturas de absorbancia a 430 y 700 nm del producto final de cada corrida corregidas para determinación de valor SRM y turbidez.....	120
Cuadro 50. Determinación de valor SRM del producto final de cada corrida	120
Cuadro 51. Determinación de turbidez del producto final de cada corrida.....	121
Cuadro 52. Determinación de gravedad original del mosto de cada corrida	121
Cuadro 53. Determinación de gravedad final del producto de cada corrida	122
Cuadro 54. Determinación de grados IBU	122

Listado de figuras

Figura 1. Mercado de la cerveza, cerveza artesanal y cerveza sin alcohol	7
Figura 2. Ruta de glucólisis.....	19
Figura 3. Ruta de fermentación alcohólica bajo condiciones anaeróbicas.....	20
Figura 4. Metabolismo del etanol.....	21
Figura 5. Conversión del piruvato proveniente de la ruta de glucólisis en β -carotenos en <i>R. glutinis</i>	22
Figura 6. Balance de masa del proceso teórico	23
Figura 7. Concentración de <i>S. cerevisiae</i> con respecto al tiempo en la propagación en caldo Dextrosa Sabouraud.....	42
Figura 8. Concentración de <i>R. glutinis</i> con respecto al tiempo en la propagación en caldo Dextrosa unqueud.....	43
Figura 9. Concentraciones de las especies que intervienen en el proceso de fermentación parcial (prueba 1) de <i>S. cerevisiae</i> y <i>R. glutinis</i>	45
Figura 10. Concentraciones de las especies que intervienen en el proceso de fermentación parcial (prueba 2) de <i>S. cerevisiae</i> y <i>R. glutinis</i>	46
Figura 11. Concentraciones de las especies que intervienen en el proceso de fermentación parcial (prueba 3) de <i>S. cerevisiae</i> y <i>R. glutinis</i>	47
Figura 12. Análisis de varianza (ANOVA) de un factor para determinación de diferencia significativa en la reducción de etanol entre pruebas.....	50
Figura 13. Curva de calibración para determinación de concentración de <i>S. cerevisiae</i> a partir de lectura de absorbancia a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS.....	99
Figura 14. Curva de calibración para determinación de concentración de <i>R. glutinis</i> a partir de lectura de absorbancia a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS.....	100
Figura 15. Curva de calibración de concentración acetaldehído a partir de lecturas de absorbancia a 340 nm.....	116
Figura 16. Curva de calibración de concentración β -caroteno a partir de lecturas de absorbancia a 470 nm.....	118

Figura 17. Balance de masa del proceso de fermentación parcial (prueba 1).....	124
Figura 18. Balance de masa del proceso de fermentación parcial (prueba 2).....	124
Figura 19. Balance de masa del proceso de fermentación parcial (prueba 3).....	125
Figura 20. Medio de cultivo Dextrosa Sabouraud Merck utilizado para la propagación de levaduras	125
Figura 21. Agua desmineralizada utilizada para la preparación del mosto.....	125
Figura 22. Sulfato de magnesio pentahidratado Merck utilizado para la mineralización del agua para el mosto	126
Figura 23. Cloruro de calcio dihidratado Merck utilizado para la mineralización del agua para el mosto	126
Figura 24. Bicarbonato de sodio Ferkica utilizado para la mineralización del agua para el mosto	126
Figura 25. Acetona Quimiprova al 99% utilizada como solvente en el proceso de extracción de betacarotenos.....	127
Figura 26. Hexano Merck utilizado como solvente en el proceso de extracción de β .caroteno ...	127
Figura 27. Acetonitrilo Merck utilizado como diluyente en el proceso de extracción de β -caroteno	127
Figura 28. Espectrofotómetro UV-VIS marca SHIMADZU utilizado para lecturas de densidad óptica celular a 600 nm, color a 430 nm, turbidez a 700nm, cuantificación de betacarotenos a 470 nm y cuantificación de acetaldehído a 340 nm	128
Figura 29. Centrífuga marca SORVALL utilizada para llevar a cabo la separación de biomasa .	128
Figura 30. Incubadora con agitación marca Lab. Companion utilizada para la propagación de levaduras a 30°C y 120 rpm	128
Figura 31. Autoclave marca Tuttnauer utilizada para la esterilización de medios de cultivo.....	129
Figura 32. Vortex marca Fisher Scientific utilizado para la mezcla de biomasa con agua mineralizada	129
Figura 33. Balanza marca OHAUS utilizada para el pesaje de medio de cultivo y de sales minerales	129
Figura 34. Balanza analítica marca OHAUS utilizada para el pesaje del estándar de betacarotenos	130
Figura 35. Incubadora marca LAB-LINE utilizada para la propagación de levaduras provenientes del cepario de levaduras del departamento de Ingeniería Química de la UVG	130
Figura 36. Horno secador marca Symphony utilizado para la cuantificación de peso seco de las levaduras.....	130

Figura 37. Cuarto frío marca Johnson Controls utilizado para el almacenamiento de muestras a 6°C	131
Figura 38. Cuarto congelado marca Johnson Controls utilizado para el almacenamiento del kit de cuantificación de acetaldehído y estándar de betacarotenos a -20°C	131
Figura 39. Pipeta marca Acura 1 – 5 mL	131
Figura 40. Pipeta marca BRAND 10 – 100 µL	132
Figura 41. Pipeta marca BRAND 100 – 1000 µL	132
Figura 42. Campana de flujo laminar marca LABCONCO utilizada para proporcionar un ambiente estéril en el proceso de propagación de levaduras	132
Figura 43. Kit HACH utilizado para evaluar la dureza del agua	133
Figura 44. Reactivo EDTA, elemento del kit HACH utilizado para evaluar la dureza del agua..	133
Figura 45. Reactivo de dureza, elemento del kit HACH utilizado para evaluar la dureza del agua	133
Figura 46. Resultado obtenido a partir del kit HACH.....	134
Figura 47. Prueba de consumo de etanol.....	134
Figura 48. Caja Petri con cultivo de <i>R. glutinis</i> CBS 323 en agar nutritivo proveniente del cepario de levaduras del departamento de Ingeniería Química de la UVG	134
Figura 49. Caja Petri con cultivo de <i>S. cerevisiae</i> CBS 381 en agar nutritivo proveniente del cepario de levaduras del departamento de Ingeniería Química de la UVG	135
Figura 50. Tubos de ensayo con cultivo de <i>S. cerevisiae</i> y <i>R. glutinis</i> en caldo Dextrosa Sabouraud	135
Figura 51. Erlenmeyers con cultivo de <i>S. cerevisiae</i> y <i>R. glutinis</i> en caldo Dextrosa Sabouraud	135
Figura 52. Cámara de Neubauer utilizada para el conteo de levaduras de <i>S. cerevisiae</i> y <i>R. glutinis</i> en caldo Dextrosa Sabouraud.....	136
Figura 53. Conteo en cámara de Neubauer de <i>S. cerevisiae</i> en caldo Dextrosa Sabouraud, dilución 1:100.....	136
Figura 54. Conteo en cámara de Neubauer de <i>R. glutinis</i> en caldo Dextrosa Sabouraud, dilución 1:100.....	136
Figura 55. Ejemplo de lectura a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS para la determinación de densidad óptica de <i>S. cerevisiae</i> y <i>R. glutinis</i> en caldo Dextrosa Sabouraud...	137
Figura 56. Separación de biomasa y medio de cultivo luego de 96 horas de incubación por medio de centrifugación a 0°C y 4000 rpm por 30 minutos.....	137
Figura 57. Descarte de medio de cultivo Dextrosa Sabourad	137

Figura 58. Agua mineralizada acorde a requerimiento de una cerveza IPA para el almacenamiento de levaduras.....	138
Figura 59. Levaduras almacenadas en agua mineralizada según requerimientos de dureza de agua de una cerveza IPA.....	138
Figura 60. Determinación de peso seco de <i>S. cerevisiae</i>	138
Figura 61. Determinación de peso seco de <i>R. glutinis</i>	139
Figura 62. Adaptación de llaves y mangueras al equipo necesario para el proceso de elaboración de cerveza.....	139
Figura 63. Malta Pale Ale utilizada.....	139
Figura 64. Malta Munich utilizada.....	140
Figura 65. Malta Crystal utilizada.....	140
Figura 66. Lúpulo Columbus utilizado	140
Figura 67. Lúpulo Centennial utilizado.....	141
Figura 68. Lúpulo Cascade utilizado.....	141
Figura 69. Cubeta utilizada para la preparación de agua y sales minerales a utilizar en el mosto.....	141
Figura 70. Desinfectante grado alimenticio utilizado en el proceso	142
Figura 71. Proceso de desinfección de todos los materiales a utilizar el proceso de elaboración de cerveza.....	142
Figura 72. Medición de altura de agua inicial para determinación de reducción en volumen a lo largo del proceso	142
Figura 73. Olla de acero inoxidable utilizada para el calentamiento del agua y mosto, así como también, para el proceso de inactivación de la levadura <i>S. cerevisiae</i>	143
Figura 74. Termómetro digital marca Steren utilizado para el monitoreo de temperatura del agua y mosto, así como también, para el proceso de inactivación de la levadura <i>S. cerevisiae</i>	143
Figura 75. Balanza digital SF-400 utilizada para el pesaje de granos y lúpulos.....	143
Figura 76. Hielera utilizada para el proceso de maceración de los granos	144
Figura 77. Transferencia de agua caliente proveniente de la olla a la hielera.....	144
Figura 78. Adición de los granos a la hielera utilizando una bolsa de mesh	144
Figura 79. Hielera cerrada y cubierta con una toalla durante 1 hora para el proceso de maceración	145
Figura 80. Transferencia del mosto de hielera a olla utilizando un colador para posterior calentamiento hasta temperatura de ebullición	145
Figura 81. Bolas de té utilizadas para la adición de lúpulo al mosto hirviendo en la olla	145

Figura 82. Olla colocada en baño de hielo posterior al calentamiento, así como también, para el proceso de inactivación de la levadura <i>S. cerevisiae</i>	146
Figura 83. Transferencia de mosto enfriado e inoculación de levadura <i>S. cerevisiae</i> en fermentador utilizando un embudo	146
Figura 84. Fermentador con stopper y manguera para salida de dióxido de carbono en un recipiente con desinfectante	146
Figura 85. Fermentador 24 horas desde la inoculación de <i>S. cerevisiae</i> (Ejemplo de prueba 2)..	147
Figura 86. Fermentador 48 horas desde la inoculación de <i>S. cerevisiae</i> (Ejemplo de prueba 2)..	147
Figura 87. Fermentador 72 horas desde la inoculación de <i>S. cerevisiae</i> (Ejemplo de prueba 2)..	147
Figura 88. Fermentador 96 horas desde la inoculación de <i>S. cerevisiae</i> (Ejemplo de prueba 2)..	148
Figura 89. Fermentador luego de la inactivación de <i>S. cerevisiae</i> e inoculación de <i>R. glutinis</i> (Ejemplo de prueba 2)	148
Figura 90. Fermentador 24 horas desde la inoculación de <i>R. glutinis</i> (Ejemplo de prueba 2).....	148
Figura 91. Fermentador 48 horas desde la inoculación de <i>R. glutinis</i> (Ejemplo de prueba 2).....	149
Figura 92. Toma de muestra cada 24 horas utilizando un sifón.....	149
Figura 93. Botes utilizados para la toma de muestra cada 24 horas de cada corrida y cada prueba	149
Figura 94. Botellas utilizadas para la recolección del producto final de cada corrida y cada prueba	150
Figura 95. Curva de calibración etanol HPLC	150
Figura 96. Curva de calibración glucosa HPLC.....	150
Figura 97. Curva de calibración fructosa HPLC	150
Figura 98. Curva de calibración sacarosa HPLC	151
Figura 99. Ejemplo de cromatograma HPLC para determinación de etanol, glucosa, fructosa y sacarosa en la muestra (día 1, corrida 1, prueba 1)	151
Figura 100. Ejemplo de cromatograma HPLC para determinación de etanol, glucosa, fructosa y sacarosa en la muestra (día 1, corrida 1, prueba 2)	151
Figura 101. Ejemplo de cromatograma HPLC para determinación de etanol, glucosa, fructosa y sacarosa en la muestra (día 1, corrida 1, prueba 3)	151
Figura 102. Estándar de acetaldehído 400 mM Merck utilizado para la cuantificación de acetaldehído en el producto final	152
Figura 103. Enzima aldehído deshidrogenasa Merck utilizada para la cuantificación de acetaldehído en el producto final.....	152
Figura 104. Buffer Merck utilizado para la cuantificación de acetaldehído en el producto final	152

Figura 105. Solución de NAD Merck utilizada para la cuantificación de acetaldehído en el producto final.....	153
Figura 106. Tubos eppendorf utilizados para la colocación de muestras y estándares	153
Figura 107. Solución mastermix preparada a partir de buffer, solución NAD y enzima aldehído deshidrogenasa para la cuantificación de acetaldehído en estándares y en el producto final	153
Figura 108. Solución mastermix preparada a partir de buffer y solución NAD para la cuantificación de acetaldehído en el producto final.....	154
Figura 109. Estándar de acetaldehído 4mM.....	154
Figura 110. Estándar de acetaldehído 60µM utilizado para la preparación de estándares 0, 18, 36 y 100 µM con agua ultrapura	154
Figura 111. Muestra de producto final con solución mastermix.....	155
Figura 112. Equipo marca Merck utilizado para la obtención de agua ultrapura a utilizar en la preparación de estándares de acetaldehído.....	155
Figura 113. Celdas para espectrofotómetro UV-VIS utilizadas para la cuantificación de acetaldehído en muestras y estándares	155
Figura 114. Ejemplo de lectura a 340 nm en espectrofotómetro UV-VIS para la cuantificación de acetaldehído en muestras y estándares	156
Figura 115. Licuadora utilizada para llevar a cabo la lisis celular por acción mecánica de la levadura <i>R. glutinis</i> para la extracción de β-caroteno en el producto final.....	156
Figura 116. Estándar de betacaroteno Merck utilizado para la cuantificación de β-caroteno en el producto final	156
Figura 117. Soluciones de β-caroteno diluidas en acetonitrilo como estándares para la cuantificación de betacarotenos en el producto final	157
Figura 118. Extracción líquido líquido del β-caroteno presentes en la muestra utilizando acetona y hexano como disolventes	157
Figura 119. Equipo de destilación utilizado para llevar a cabo la separación del β-caroteno del solvente hexano:acetona.....	157
Figura 120. Extracto de β-caroteno obtenido a partir del proceso de destilación.....	158
Figura 121. Extracto de β-caroteno diluido en acetonitrilo para su cuantificación	158
Figura 122. Ejemplo de lectura a 470 nm en espectrofotómetro UV-VIS para la cuantificación de β-caroteno en el producto final	158
Figura 123. Ejemplo de lectura a 430 nm en espectrofotómetro UV-VIS para determinación de valor SRM en el producto final	159

Figura 124. Ejemplo de lectura a 700 nm en espectrofotómetro UV-VIS para determinación de turbidez en el producto final.....	159
Figura 125. Refractómetro digital modelo HI96801 utilizado para la determinación de gravedad original y final del mosto	159
Figura 126. Panel sensorial del producto final (parte I).....	160
Figura 127. Panel sensorial del producto final (parte II).....	160
Figura 128. Resultados de panel sensorial del producto final (parte I).....	160
Figura 129. Resultados de panel sensorial del producto final (parte II)	161
Figura 130. Resultados de panel sensorial del producto final (parte III)	161
Figura 131. Resultados de panel sensorial del producto final (parte IV).....	161
Figura 132. Resultados de panel sensorial del producto final (parte V)	161
Figura 133. Resultados de panel sensorial del producto final (parte VI).....	162
Figura 134. Resultados de panel sensorial del producto final (parte VII).....	162
Figura 135. Resultados de panel sensorial del producto final (parte VIII)	162
Figura 136. Resultados de panel sensorial del producto final (parte IX).....	162
Figura 137. Resultados de panel sensorial del producto final (parte X)	163

Listado de cálculos

Cálculo 1. Concentración de la levadura corregida por factor de dilución	84
Cálculo 2. Densidad óptica a 600 nm de la levadura corregida por blanco	84
Cálculo 3. Concentración de <i>S. cerevisiae</i> calculada a partir de curva de calibración	85
Cálculo 4. Concentración de <i>R. glutinis</i> calculada a partir de curva de calibración	85
Cálculo 5. Número de células en 500 mL de caldo Dextrosa Sabouraud	86
Cálculo 6. Concentración de levadura en mosto	86
Cálculo 7. Cantidad de HCO_3^- a agregar al agua desmineralizada	87
Cálculo 8. Cantidad de Na^+ a agregar al agua desmineralizada	87
Cálculo 9. Cantidad de $NaHCO_3$ a agregar al agua desmineralizada	87
Cálculo 10. Cantidad de Cl^- a agregar al agua desmineralizada	88
Cálculo 11. Cantidad de Ca^{+2} a agregar al agua desmineralizada	88
Cálculo 12. Cantidad de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ a agregar al agua desmineralizada	88
Cálculo 13. Cantidad de SO_4^{2-} a agregar al agua desmineralizada	89
Cálculo 14. Cantidad de Mg^{+2} a agregar al agua desmineralizada	89
Cálculo 15. Cantidad de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a agregar al agua desmineralizada	90
Cálculo 16. Concentración (% v/v) de etanol	90
Cálculo 17. Concentración (% v/v) de glucosa	90
Cálculo 18. Concentración (% v/v) de maltosa	91
Cálculo 19. Concentración (% v/v) de fructosa	91
Cálculo 20. Concentración (% v/v) de azúcares fermentables	92
Cálculo 21. Corrección de lecturas de absorbancia a 340 nm por blanco	92
Cálculo 22. Concentración de acetaldehído en el producto final calculado a partir de curva de calibración	93
Cálculo 23. Corrección de lecturas de absorbancia a 470 nm por blanco	93

Cálculo 24. Concentración de β -caroteno en el producto final calculado a partir de curva de calibración	94
Cálculo 25. Corrección de lecturas de absorbancia a 430 nm por blanco.....	94
Cálculo 26. Cálculo valor SRM para determinación de color en el producto final	94
Cálculo 27. Corrección de lecturas de absorbancia a 700 nm por blanco.....	95
Cálculo 28. Determinación de turbidez en el producto final.....	95
Cálculo 29. Determinación de gravedad original en el mosto	96
Cálculo 30. Determinación de gravedad final en el producto final.....	96
Cálculo 31. Volumen de mosto según altura.....	96
Cálculo 32. Cálculo de grados IBU lúpulo Cascade	97
Cálculo 33. Cálculo de grados IBU.....	97
Cálculo 34. Reducción etanol.....	98
Cálculo 35. Media aritmética	123
Cálculo 36. Desviación estándar	123
Cálculo 37. Incertidumbre porcentual.....	123

Listado de abreviaciones

ed., eds.	edición y editor; editores
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> : y otros
g	gramo, gramos
gal	galones US
kg	kilogramo, kilogramos
mg	miligramo, miligramos
mL	mililitro, mililitros
L	litro, litros
p., pp.	página, páginas
rpm	revoluciones por minuto
µg	microgramo, microgramos
µL	microlitro, microlitros
% (m/v)	porcentaje masa/volumen: g/100 mL
% (v/v)	porcentaje volumen/volumen: mL/100 mL
°C	grados Celsius

Resumen

El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar la aplicación de *Rhodotorula glutinis* para llevar a cabo la producción de cerveza artesanal sin alcohol. Para ello, se llevó a cabo un proceso de fermentación parcial con *Saccharomyces cerevisiae* utilizando concentraciones controladas de los inóculos y especies en el medio a fermentar y se evaluó el efecto del tiempo de fermentación de cada levadura en la reducción de etanol en el medio. A partir de ello fue posible determinar que, con periodos fermentativos de 3, 4 y 2 días de *S. cerevisiae* y posteriormente 3, 2 y 4 días de fermentación de *R. glutinis* se obtuvieron reducciones de etanol en el medio correspondientes a 3.33, 3.11 y 3.54% (v/v), respectivamente. Dichas reducciones en la concentración de etanol permitieron obtener cervezas cuyo porcentaje de contenido alcohólico corresponde a 2.304, 3.458 y 3.180% (v/v), respectivamente. A partir de ello es posible concluir que, a pesar de haber obtenido una cerveza tipo “light” según la American Homebrewers Association con el procedimiento de fermentación parcial propuesto, no fue posible obtener una cerveza del tipo “sin alcohol”. Por ello, se recomienda utilizar herramientas de modificación genética para llevar a cabo la inserción de los genes *ADH1B*1*, *ALDH2*1* y *ACSS2* en *R. glutinis*, los cuales corresponden a las enzimas alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogena y acetil-CoA sintetasa presentes en humanos con el fin de utilizar enzimas con alta actividad enzimática y mejorar el consumo de etanol por parte de la levadura.

Abstract

The main purpose of this work was to evaluate the application of *Rhodotorula glutinis* to carry out the production of non-alcoholic craft beer. For this, a partial fermentation process was carried out with *Saccharomyces cerevisiae* using controlled concentrations of the yeasts and species in the medium to be fermented, and the effect of the fermentation period of each yeast on the reduction of ethanol was evaluated. From this it was possible to determine that, with fermentative periods of 3, 4 and 2 days of *S. cerevisiae* and 3, 2 and 4 days of fermentation of *R. glutinis*, ethanol reductions in the medium corresponded to 3.33, 3.11 and 3.54% (v/v), respectively. These reductions in the ethanol concentration allowed to obtain beers whose alcohol percentage corresponds to 2.304, 3.458 and 3.180% (v/v), respectively. From this it is possible to conclude that, despite having obtained a "light" type beer according to the American Homebrewers Association with the proposed partial fermentation procedure, it was not possible to obtain a "non-alcoholic" type beer. Therefore, it is recommended to use genetic modification tools to carry out the insertion of the *ADH1B*1*, *ALDH2*1* and *ACSS2* genes in *R. glutinis*, which correspond to the alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and acetyl-CoA synthetase enzymes present in humans in order to use enzymes with high enzymatic activity and improve ethanol consumption by yeast.

I. Introducción

A nivel mundial, la cerveza ha sido la bebida alcohólica más consumida, y, a raíz de ello, el proceso de elaborar y beber cerveza ha sido parte de las actividades humanas desde tiempos antiguos (Fonseca, 2007). Específicamente, el proceso convencional de elaboración de cerveza requiere de agua, malta, levadura y lúpulo (Lavoie, 2020) y se compone de las etapas de malteado, molienda, maceración, filtración, cocción, aireación, fermentación y maduración (Palmer, 2001). Cabe mencionar que la etapa de fermentación es una de las más relevantes dentro del proceso puesto que permite la producción de alcohol que caracteriza una cerveza tradicional. Esto se logra por medio de la levadura, un microorganismo unicelular que metaboliza los azúcares provenientes de la malta para producir, bajo condiciones anaeróbicas, alcohol y dióxido de carbono (Lodolo *et.al.*, 2008).

En la actualidad, el interés por nuevas bebidas, como por ejemplo la cerveza sin alcohol ha adquirido creciente popularidad. Cabe mencionar que para que una cerveza sea catalogada como “sin alcohol”, el porcentaje de alcohol debe cumplir con las legislaciones de cada país o región. Por ejemplo, en el caso de Estados Unidos, la cerveza debe tener un porcentaje menor al 0.5% (v/v) para poder ser etiquetada de esta manera (Loeschen, 2019); dato que será utilizado como referencia en este trabajo de graduación.

A raíz de ello, se ha comenzado a innovar en el proceso de elaboración de cerveza e incluso se han aplicado una variedad de métodos, tanto físicos como biológicos, que permiten la creación de este tipo de productos. Siendo los de mayor relevancia para este trabajo de graduación las técnicas de fermentación limitada y la utilización de levaduras especiales; ambas consideradas dentro de los métodos biológicos para la producción de cerveza sin alcohol. Específicamente, dichas técnicas en conjunto tienen como objetivo limitar el periodo fermentativo de una levadura tradicional como lo es *S. cerevisiae* (Muller *et.al.*, 2020) y luego eliminar el alcohol ya producido mediante la introducción de levaduras especiales, como podría llegar a serlo *R. glutinis* (Kochláňová *et.al.*, 2016).

Por ello y debido a la importancia de evaluar el proceso de fermentación parcial para elaborar cerveza sin alcohol en Guatemala como parte del proceso de diversificación de la industria cervecera, en este trabajo se presenta la recopilación de datos bibliográficos que permitieron conocer las bases y los antecedentes del tema de forma que fuese posible justificar esta experimentación. Así como también, la metodología a seguir y los resultados derivados de la misma, los cuales permitieron evaluar de forma cuantitativa y cualitativa la producción de cerveza artesanal sin alcohol por medio de una ruta técnica que consiste en un proceso de fermentación parcial y el uso de levaduras especiales. Finalmente, se presentan las conclusiones y recomendaciones que giran en torno a los resultados obtenidos y que permiten determinar si es factible aplicar la ruta técnica planteada.

II. Justificación

La industria cervecera representa miles de millones de dólares al año, por lo que tiene un peso importante en el mercado de bebidas a nivel mundial. Actualmente la cerveza, la cerveza artesanal y la cerveza sin alcohol representan \$642,970 M (Statista, 2021), \$89,000 M (Fact.MR, s.f.) y \$16,650 M (TBRC, 2021) al año con crecimientos anuales pronosticados de 6.81% (Statista, 2021), 6.9% (Fact.MR, s.f.) y 10.3% (TBRC, 2021), respectivamente. Específicamente en Guatemala se pronostica que los mercados de la cerveza, cerveza artesanal y cerveza sin alcohol anuales corresponderán a \$762 M con un crecimiento esperado del 4.82%, \$152.4 M con un crecimiento esperado del 4.74% y \$60.94 M con un crecimiento esperado del 17.35% (Williams & Marshall Strategy, 2020), respectivamente. Cabe mencionar que, las tendencias en Guatemala han comenzado a cambiar y, hoy en día, los consumidores se inclinan más a comprar cervezas artesanales y cervezas sin alcohol o con bajos porcentajes de este (Williams & Marshall Strategy, 2020).

El interés por este tipo de bebidas sin alcohol o con porcentajes de alcohol muy reducidos recae principalmente en que los consumidores cada vez se percatan más de los inconvenientes que el consumo de alcohol puede causar en torno a la salud. De hecho, el mercado de bebidas saludables se encuentra en crecimiento (Bogacz y Harasym, 2018). Específicamente, para el año 2019, el mercado de bebidas saludables a nivel mundial ya representaba \$478.10 billones y se pronostica que el mismo continuará creciendo a un ritmo de aproximadamente 6.06% anual (Infinium Global Research, 2020). Además, se suma al deseo de personas que no pueden consumir alcohol, como mujeres embarazadas, deportistas profesionales e individuos con cierta condición médica de poder ingerir una bebida que contenga características similares a las de una cerveza convencional sin poner en riesgo su salud o sus respectivas responsabilidades. De igual manera, debido a que este tipo de bebidas son una novedad en la industria cervecera, los consumidores de este mercado pueden tener interés en estos productos puesto que usualmente tienden a ser consumidores que valoran la diversidad en los diferentes tipos de cerveza (Sohrabvandi *et.al.*, 2009).

Derivado de dicho interés, una de las formas de producir este tipo de bebidas es por medio de un proceso de fermentación parcial, en el cual se limita el periodo fermentativo de una levadura tradicional como lo es *S. cerevisiae* y luego se elimina el alcohol ya producido mediante la introducción de levaduras especiales, como podría llegar a serlo *R. glutinis*. Cabe mencionar que esta levadura especial sintetiza β -carotenos, compuestos que tienen beneficios significativos a nivel de salud y que podrían ser de interés en el mercado de bebidas saludables. Por ello, resulta relevante evaluar si realmente la ruta de fermentación parcial propuesta en este trabajo de graduación permite producir una cerveza sin alcohol con β -carotenos, puesto que es una ruta no evaluada hasta el momento y que podría brindar alternativas al proceso de diversificación de la industria cervecera en Guatemala.

III. Objetivos

A. General

Evaluar la aplicación de *Rhodotorula glutinis* para llevar a cabo la producción de cerveza artesanal sin alcohol utilizando un proceso de fermentación parcial con *Saccharomyces cerevisiae*.

B. Específicos

1. Propagar las levaduras *Rhodotorula glutinis* y *Saccharomyces cerevisiae* utilizando técnicas microbiológicas para la obtención de inóculos iniciales con concentración controlada a utilizar en el proceso de fermentación parcial.
2. Formular el mosto a utilizar de acuerdo con recetas reguladas en el proceso de elaboración de cerveza artesanal para estandarizar las concentraciones de las especies en el medio a fermentar.
3. Llevar a cabo una fermentación parcial con *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhodotorula glutinis* siguiendo un procedimiento semi-tradicional para la elaboración de cerveza artesanal.
4. Determinar el contenido de etanol en el mosto por medio de una cromatografía líquida de alta resolución para determinar el comportamiento del etanol durante el proceso de fermentación parcial.
5. Caracterizar la cerveza producida con el procedimiento que permita llegar a obtener una bebida del tipo “sin alcohol”.

IV. Marco teórico

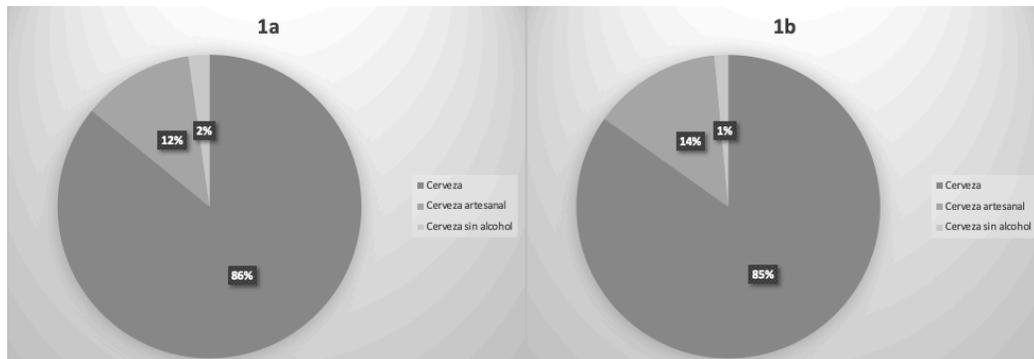
A nivel mundial, la cerveza ha sido la bebida alcohólica más consumida, y, a raíz de ello, el proceso de elaborar y beber cerveza ha sido parte de las actividades humanas desde tiempos antiguos (Fonseca, 2007). El proceso de elaboración de una cerveza convencional, desde su descubrimiento hasta la actualidad, ha constado de una serie de etapas e ingredientes que resultan fundamentales para obtener un producto que cumpla con la calidad y las características esperadas por el consumidor (Guido, 2019). Sin embargo, en años recientes, el interés por bebidas innovadoras ha cobrado una gran popularidad como, por ejemplo, el interés por las bebidas no alcohólicas o con porcentajes de alcohol muy reducidos. Por ello, el proceso de elaboración de cerveza y, específicamente la materia prima y las etapas del proceso, han tenido que innovar de forma que los nuevos productos sean aceptados por el consumidor, tomando en cuenta los requerimientos en cuanto a contenido alcohólico y en cuanto a las propiedades organolépticas (Sohrabvandi *et.al.*, 2009). Estos cambios implican retos significativos, puesto que, representan investigación y experimentación para poder crear nuevas formulaciones. En la actualidad, se presenta una variedad de nuevas alternativas, tanto químicas como biológicas, que muestran ser prometedoras para asimilar el producto final de una cerveza sin alcohol lo más que se pueda a una cerveza convencional (Brányik *et.al.*, 2012).

A. Producción de cerveza

Se considera que la cerveza fue una de las primeras bebidas fermentadas que conoció el ser humano. Se cree que su descubrimiento se dio hace más de 6,000 años, específicamente en las tierras cercanas a los ríos Tigris y Eufrates en donde habitaban los sumerios. En dicha época, los sumerios comenzaban a experimentar con la agricultura y se cree que, el pan producido a partir de un cultivo de cebada se dejó fermentar por equivocación de forma natural, de manera que, tanto las condiciones climáticas y la presencia de levaduras silvestres, causaron que se segregara un líquido que luego intentaron reproducir hasta llegar a lo que hoy conocemos como cerveza (Fonseca, 2007). Cabe mencionar que, hoy en día, el mercado de cerveza, cerveza artesanal y cerveza sin alcohol a nivel mundial como puede ser observado en la Figura 1a, así

como también, la cerveza, cerveza artesanal y cerveza sin alcohol en Guatemala como puede ser observado en la Figura 1b, tienen un peso importante y, anualmente representan ingresos de \$642,970 M (Statista, 2021), \$89,000 M (Fact.MR, s.f.), \$16,650 M (TBRC, 2021), \$762 M, \$123 M y \$13.2 M (Williams & Marshall Strategy, 2020) , respectivamente.

Figura 1. Mercado de la cerveza, cerveza artesanal y cerveza sin alcohol



Fuente: Statista (2021), Fact.MR (s.f.), TBRC (2021) y Williams & Marshall Strategy (2020).

En cuanto al proceso de elaboración de cerveza, este incluye la selección de materia prima adecuada y un proceso de elaboración que consta de varias etapas (Guido, 2019). Específicamente, dentro de la materia prima que es utilizada y requerida en el proceso de elaboración de cerveza, existen cuatro ingredientes principales; estos son la malta, la levadura, el agua y el lúpulo (Lavoie, 2020). Primero, la malta es la fuente de azúcares y proviene usualmente de la cebada y, aunque pueden utilizarse otros cereales, la cebada es uno de los más utilizados debido a su alto contenido de almidón, su alto contenido de enzimas, menor contenido de proteínas y el hecho de tener un sabor relativamente neutro. Segundo, la levadura hace referencia a un organismo unicelular de la familia de los hongos que metaboliza el azúcar proveniente del almidón de la malta para producir alcohol y algunos subproductos que le otorgan a la cerveza sus propiedades características (VanTil, s.f.). Cabe mencionar que la levadura frecuentemente utilizada es *S. cerevisiae*, ya que, es una levadura anaerobia facultativa que puede llevar a cabo la conversión de azúcar en alcohol bajo condiciones hipóxicas (Lodolo *et.al.*, 2008). Tercero, el agua constituye más del 90% de la mayoría de los tipos de cerveza y también se utiliza como parte del proceso, por lo que, la calidad del agua utilizada es realmente importante, especialmente si se habla de la dureza de la misma, es decir, la cantidad de minerales disueltos. Es importante agregar que, además del agua en sí, los oligoelementos y los elementos del agua son importantes para la salud de la levadura, de

manera que resultan fundamentales para mantener o incluso mejorar las propiedades de una cerveza. Finalmente, el lúpulo hace referencia a las flores verdes de la planta *Humulus lupulus*, cuyo amargor proporciona un contrapunto al carácter dulce proveniente de la malta. Por ello, ha sido desde siempre utilizado en la producción de cerveza para mantener el balance en cuanto a sabores. Además, esta flor es considerada como un conservante natural, lo que ha permitido que, desde tiempos antiguos, el producto no se descomponga (VanTil, s.f.).

Cabe mencionar que las concentraciones y características de las especies previamente mencionadas dependen en gran medida del tipo de cerveza que se busca elaborar. Por ejemplo, la Indian Pale Ale (IPA, por sus siglas en inglés) es uno de los estilos artesanales más populares a nivel mundial (Bartlett, 2022). Este estilo se caracteriza por ser una cerveza amarga, lo que quiere decir que su receta incluye una variedad de lúpulos como por ejemplo Cascade, Centennial y/o Columbus que le otorgan los sabores y olores deseados al producto final. En cuanto a maltas, para este tipo de cerveza se suelen utilizar Pale Ale, Munich y/o Crystal, puesto que permiten alcanzar el color oscuro característico del estilo (American Homebrewers Association, 2020). En cuanto a dureza del agua, este estilo tiende a mantener el siguiente perfil: 80 mg/L de calcio, 7 mg/L de magnesio, 17 mg/L de sodio, 150 mg/L de sulfato, 55 mg/L de cloruro y 42 mg/L de bicarbonato (Bartlett, 2022). Finalmente, en cuanto a levadura, se busca una concentración entre 7 y 12 millones de células/mL, es decir, entre 7×10^9 y 1.2×10^{10} células/L, las cuáles deben ser inoculadas a temperaturas entre 18°C y 20°C (Wyeast, 2021).

Una vez conocidos y explicados los ingredientes del proceso, es importante comprender las etapas del proceso en el que se ven involucrados. El proceso de producción de la cerveza consta de siete pasos básicos. Primero, la etapa de malteado hace referencia al proceso mediante el cual la cebada o el cereal de elección germina bajo un ambiente controlado de forma que las enzimas del grano puedan activarse. Luego, la molienda y maceración consiste en que el grano es molido para ser mezclado con agua para obtener el mosto. Específicamente, la maceración permite llevar a cabo la mezcla entre la malta y el agua a diferentes temperaturas para poder transformar el almidón en azúcares fermentables por medio de las enzimas del grano previamente activadas. Seguido de ello, el mosto líquido, es separado de la malta utilizando técnicas de filtración y, el resto sólido mejor conocido como bagazo ya no es utilizado en el proceso. Posteriormente, en el proceso de cocción, se lleva el mosto a temperatura de ebullición para aportar el amargor y el aroma provenientes del lúpulo. Además, durante esta

etapa, las elevadas temperaturas permiten que se esterilice el mosto, se coagulen las proteínas y se evaporen los aromas indeseables. Como quinto paso, el mosto se airea y se enfría para poder inocular la levadura, de forma que ya pueda comenzar el periodo fermentativo. Cabe mencionar que, el periodo fermentativo primario tiene una duración entre 2 y 3 días y es el punto en el que la levadura se encuentra más activa, mientras que, la fermentación secundaria continúa por 1 o 2 semanas adicionales. Una vez culminado, el líquido resultante atraviesa un periodo de maduración en donde la cerveza es sometida a temperaturas bajas para poder estabilizar los sabores y aromas que se produjeron durante el proceso. Finalmente, la cerveza es filtrada por segunda vez para eliminar las partículas pequeñas en suspensión y luego es envasada para su posterior comercialización (Palmer, 2001).

El uso de la materia prima y el seguimiento del proceso tienen un efecto directo en las propiedades y características del producto final, como por ejemplo en el porcentaje de etanol medido en %ABV (Alcohol By Volume por sus siglas en inglés), el color medido en escala SRM (Standar Reference Method por sus siglas en inglés), la turbidez, el amargor medido en grados IBU (International Bittering Unit por sus siglas en inglés) y las gravedades original y final, las cuales hacen referencia a la medida de azúcares fermentables presentes. De nuevo, en el caso de una cerveza estilo IPA, el ABV se encuentra alrededor de 5.9%, el valor SRM entre 6 y 7, los grados IBU entre 60 y 80, la gravedad inicial entre 1.04 y 1.06, la gravedad final alrededor de 1.01 y 1.02 y, en cuanto a la turbidez, este valor depende de si la cerveza se encuentra filtrada o no (American Homebrewers Association, 2020).

Otro punto importante a considerar es que alteraciones en la materia prima o en las etapas del proceso previamente mencionadas pueden tener como resultado que la cerveza producida presente un sabor falla. Los sabores falla son percibidos por los sentidos de gusto y olfato de la persona que consume la cerveza y estos se caracterizan por ser indeseables y poco agradables para el consumidor (Chaturvedi, 2019). Cabe mencionar que, aunque existen una amplia variedad de sabores falla, algunos de los más comunes son los que se presentan a continuación:

Cuadro 1. Sabores falla comunes en el proceso de elaboración de cerveza.

Sabor/Olor	Causa	Estrategia para evitarlo
Manzana verde	Presencia de acetaldehído debido al metabolismo del etanol.	Extender el periodo de maduración para permitir que la levadura convierta el acetaldehído en etanol, así como también, utilizar la cantidad adecuada de levadura para asegurar que pueda llevarse a cabo la conversión.
Alcohol, acetona, thinner	Presencia de alcoholes como propanol, butanol, isobutanol y alcohol isoamílico a causa de fermentar a altas temperaturas.	Evitar fermentar a temperaturas por encima de los 26°C.
Vinagre	Presencia de polifenoles o taninos por la molienda o malteado del grano.	Moler y maltar el grano el tiempo necesario, no hacerlo de forma excesiva puesto que esto libera una mayor cantidad de los taninos presentes en el grano.
Plástico, vinil	Presencia de clorofenol debido al uso de agua clorada o bien, al uso de desinfectantes a base de cloro.	No utilizar agua o desinfectantes clorados o bien, utilizar un filtro que remueva el cloro.
Mantequilla	Presencia de diacetil debido al uso de levadura altamente floculante.	Utilizar levaduras de buena calidad cuya floculación no sea elevada, de esta forma, la levadura podrá absorber el diacetil previo a caer en suspensión.

Sabor/Olor	Causa	Estrategia para evitarlo
Vegetales	Presencia de sulfuro de dimetilo (DMS) que no se evaporó durante el proceso de cocción. Este compuesto se deriva del S-metilmationina (SMM), el cual se produce en el proceso de malteado.	Asegurar que el proceso de cocción sea lo suficiente largo para que la mayor cantidad de DMS se evapore previo a la inoculación de la levadura.
Frutas	Presencia de ésteres a causa de fermentar a altas temperaturas y/o reducir la cantidad de oxígeno.	Evitar fermentar a temperaturas por encima de los 24°C.
Cartón, papel	Exceso de oxígeno durante el proceso de fermentación.	Asegurar un buen sistema anaeróbico para evitar el ingreso de oxígeno.
Moho	Presencia de moho a causa de llevar a cabo el proceso de fermentación en un área húmeda.	Procurar mantener tanto el sistema de fermentación como la materia prima almacenada en un lugar seco y oscuro.
Sal	Exceso de sal en el agua a utilizar para elaborar el mosto.	Conocer el perfil mineral del agua a utilizar y evitar agregarle sales si no es necesario.
Ácido	Presencia de bacterias o levaduras salvajes.	Asegurar una correcta sanitización del equipo a utilizar para reducir las posibilidades de contaminación.

Sabor/Olor	Causa	Estrategia para evitarlo
Rancio, olor a zorrillo	Exposición de lúpulo a rayos UV provenientes de luz solar. En este caso, los alfa ácidos del lúpulo reaccionan con el sulfuro de hidrógeno producido por la levadura produciendo mercaptano, mismo químico secretado por los zorrillos.	Procurar mantener tanto el sistema de fermentación como la materia prima almacenada en un lugar oscuro.

Fuente: Chaturvedi (2019).

Como fue indicado, el proceso de elaboración de cerveza tiene etapas básicas y específicas que deben llevarse a cabo para lograr que el producto obtenido cumpla con las características deseadas. Sin embargo, el proceso puede incluir una serie de variantes que abren paso a la oportunidad de innovación en la fabricación de cerveza, como lo es por ejemplo la cerveza sin alcohol. La innovación en esta área resulta fundamental, no solo para agradar al consumidor, sino que también, para que el proceso se vuelva lo más sofisticado y eficiente posible (Guido, 2019).

B. Producción de cerveza sin alcohol

A diferencia de la cerveza alcohólica presentada en la sección anterior, la cerveza sin alcohol no fue inventada hasta 1919, año en que comenzó a comercializarse en Estados Unidos. Los productores se vieron forzados a producir esta bebida debido a las nuevas leyes de prohibición establecidas en dicho año, ya que, en este periodo de tiempo, el alcohol fue básicamente prohibido alrededor de todo el país (Loeschen, 2019). Específicamente, el gobierno tomó la decisión de establecer que el porcentaje máximo de alcohol que podía encontrarse en cualquier bebida era del 0.5% (v/v). A pesar de que hoy en día la ley no se encuentra vigente, al menos en Estados Unidos y en la mayoría de los países alrededor del mundo, este porcentaje de alcohol aun corresponde al límite en el que una cerveza puede considerarse como una bebida “sin alcohol”. Esto a diferencia de las cervezas tipo “light” cuyo porcentaje de alcohol se encuentra

entre 2 y 4% y las cervezas tradicionales cuyo porcentaje se encuentra entre 4 y 6% (American Homebrewers Association, 2020).

En la actualidad, el interés creciente por producir cerveza de este tipo recae principalmente en que los consumidores cada vez se percatan más de los inconvenientes que el consumo de alcohol puede causar en torno a las responsabilidades civiles como, por ejemplo, en el área de trabajo o estudio o bien, al momento de manejar vehículos. Además, se suma al deseo de personas que no pueden consumir alcohol, como mujeres embarazadas, deportistas profesionales e individuos con cierta condición médica de poder ingerir una bebida que contenga características similares a las de una cerveza convencional sin poner en riesgo su salud o sus respectivas responsabilidades (Sohrabvandi *et.al.*, 2009). De hecho, como fue mencionado anteriormente; hoy en día, el mercado de cerveza sin alcohol representa \$16,650 M al año con un crecimiento anual pronosticado de 10.3%, lo que demuestra el potencial que tiene este mercado a nivel mundial (TBRC, 2021).

Aunque la mayor parte del proceso para hacer cerveza alcohólica y no alcohólica es bastante similar, existen diferencias que resultan ser esenciales para la obtención de un producto que cumpla con los requerimientos en cuanto a porcentaje de alcohol y en cuanto a las propiedades organolépticas que permitirían que la bebida tenga una aceptación en general por parte del consumidor. Dentro de estas es posible mencionar que, a diferencia del proceso de elaboración de la cerveza convencional de carácter alcohólico presentado anteriormente, la cerveza sin alcohol debe atravesar dos procesos adicionales. El primero es que la cerveza debe tratarse para reducir el contenido de alcohol, sin embargo, esta es una etapa que depende del método a utilizar, puesto que, habrá diferencias dependiendo si se utiliza una metodología de restricción de la formación de etanol o bien, una de eliminación de etanol. Como segundo punto, si el tratamiento fue restrictivo, es decir que se buscó limitar el periodo fermentativo de las levaduras en cuestión, la fermentación se da únicamente de forma parcial y, por ende, al finalizar el proceso muchas veces no se obtiene la carbonatación y/o características deseadas o esperadas; o bien si el tratamiento fue de eliminación, se tienden a perder por consecuencia compuestos aromáticos importantes que contribuyen a que la cerveza tenga los sabores y olores que tradicionalmente tiene. Esto tiene un efecto importante a nivel sensorial puesto que se produce una cerveza que, si bien tiene muchas veces el color esperado, no tiene el sabor y aroma que el consumidor espera por lo que en muchas ocasiones se ha descrito como insípida y acuosa (Hughes, 2022). Por ello, pueden llevarse a cabo etapas adicionales para agregar el o los

compuestos deseados que permitan obtener un producto con color, olor y sabor específicos a manera de no perjudicar la experiencia sensorial para el consumidor (Loeschen, 2019).

C. Métodos para producir cerveza sin alcohol

Cuando este tipo de cerveza comenzaba a producirse en 1919, la estrategia consistía en llevar a cabo una fermentación convencional, siguiendo todas las etapas de un proceso normal. Una vez producida la cerveza, esta se ponía a hervir tomando en cuenta el punto de ebullición del etanol de forma que este se evaporara por completo. Sin embargo, esto tenía una tendencia a eliminar una serie de compuestos aromáticos importantes y, por ende, a crear un sabor falla al destruir los sabores y aromas propios de la cerveza por lo que el consumidor no mostraba una aceptación total hacia las propiedades del producto (Loeschen, 2019). Por ello, a lo largo de los años se ha optado por buscar nuevas alternativas que puedan ser utilizadas en los casos en los que la evaporación no representa la mejor opción. Las nuevas alternativas pueden ser clasificadas en dos tipos según la metodología a la que corresponden. Por una parte, se encuentran los métodos físicos que consisten en eliminar el etanol que ya se encuentra en una bebida alcohólica producida de forma convencional. Por otra parte, los métodos biológicos tienden a restringir y/o eliminar el etanol durante el proceso productivo (Brányik *et.al.*, 2012).

1. Métodos físicos.

Tienen como objetivo eliminar el etanol de un producto pueden a su vez clasificarse en si el tratamiento realizado es de tipo térmico o de membrana (Brányik *et.al.*, 2012).

a. Tratamientos térmicos.

Como fue mencionado anteriormente, la técnica inicial consistía en someter el producto a temperatura elevadas, tomando en consideración el punto de ebullición del etanol de forma que este pudiera ser eliminado. Sin embargo, a pesar de poder eliminar el etanol por completo y cumplir con los requerimientos en cuanto a contenido alcohólico, la calidad de la cerveza en cuanto a sabores y aromas se ve fuertemente afectada en los tratamientos de este tipo. Sin embargo, aún cuando presenta desventajas considerables, las técnicas de destilación y evaporación todavía son utilizadas a nivel industrial (Brányik *et.al.*, 2012).

1) Destilación al vacío.

En esta técnica se calienta el producto en un intercambiador de calor de placas y se lleva a un separador de sabor donde la presión se reduce rápidamente. Como resultado, los

componentes aromáticos volátiles de la cerveza se evaporan y luego se vuelven a agregar al tanque de recombinación. A continuación, en la columna de vacío, el alcohol se libera de la cerveza y se decanta en un condensador de pulverización, logrando que el producto se desalcoholice a 0.05% en volumen (Muller *et.al.*, 2020).

2) Evaporadores.

En esta técnica se utilizan evaporadores de capa fina con películas delgadas producidas mecánicamente a temperaturas y presiones moderadas. En un flujo descendente, el alcohol se volatiliza y se separa en un condensador. La cerveza se desalcoholiza parcialmente y se vuelve a someter a este proceso en un segundo evaporador de flujo descendente con el fin de desalcoholizar el producto a 0.05% en volumen (Muller *et.al.*, 2020).

b. Tratamientos de membrana.

Este tipo de tratamientos se basan en la utilización de membranas semipermeables que tienen la capacidad de separar moléculas pequeñas como el agua y el etanol de productos como la cerveza. Dentro de estos tratamientos es posible mencionar la diálisis y la osmosis inversa (Brányik *et.al.*, 2012).

1) Diálisis.

Esta técnica se basa en la difusión selectiva de sustancias a través de una membrana semipermeable, ya que, la velocidad de separación por diálisis se basa en el gradiente de concentración y es inversamente proporcional al tamaño de las moléculas. Por ello, en el caso de la cerveza, el alcohol se difunde a través de la membrana. Este proceso emplea microtubos en donde se bombea la cerveza mientras que una solución de concentración conocida se bombea en flujo inverso en el exterior de estos tubos. Por consecuencia, la concentración de alcohol fuera del tubo es siempre menor que la del interior, lo que promueve la remoción extensa de alcohol de la cerveza y, como esta no es tratada a temperaturas altas, no hay degradación térmica del producto que tenga implicaciones en las propiedades organolépticas (Muller *et.al.*, 2020).

2) Osmosis inversa.

Esta técnica se basa en el flujo de un solvente a través de una membrana semipermeable desde una solución menos concentrada a una más concentrada, buscando el equilibrio osmótico. En este proceso, el alcohol y el agua atraviesan la membrana contra la presión

osmótica natural, mientras que, las moléculas más grandes permanecen retenidos (Catarino *et.al.*, 2006). Cabe mencionar que, aunque este método no tiene un efecto en las propiedades organolépticas de la cerveza, esta difícilmente tendrá un contenido alcohólico menor al 0.5% en volumen (Muller *et.al.*, 2020).

2. Métodos biológicos.

Tienen como objetivo restringir la producción de etanol pueden a su vez clasificarse en si el tratamiento realizado es de tipo tradicional o especial (Brányik *et.al.*, 2012).

a. Tratamientos tradicionales.

Este tipo de métodos hacen referencia a aquellos que conllevan una aplicación biológica pero que pueden llevarse a cabo en una planta convencional de fabricación de cerveza, utilizando el mismo equipo e instalaciones (Brányik *et.al.*, 2012).

1) Modificación en el proceso de maceración.

Tomando en consideración que el macerado es el proceso que permite transformar el almidón en azúcares fermentables por medio de enzimas, esta técnica consiste en modificar, ya sea de forma física, química o bioquímica la capacidad del almidón para degradarse. De esta forma, podría llegar a reducirse la cantidad de maltosa en el mosto y, por ende, durante el periodo fermentativo la levadura no produciría una cantidad elevada de etanol. Sin embargo, la dificultad del proceso recae en que no resulta sencillo encontrar un balance que funcione para mantener las características sensoriales del producto (Brányik *et.al.*, 2012).

2) Fermentación restringida.

Esta técnica hace referencia a la eliminación de las levaduras, de manera que, se detenga el proceso fermentativo. Cabe mencionar que, aunque este método evita el proceso de desalcoholización y todas las complicaciones y desventajas de dicho proceso, el tiempo reducido de la fermentación no es suficiente para obtener una cerveza sin alcohol ni para promover una adecuada conversión del mosto en cerveza, lo que da como resultado un producto final pobre en compuestos aromáticos y con fuerte presencia del mosto (Muller *et.al.*, 2020).

3) Utilización de levaduras especiales.

Esta técnica consiste en utilizar levaduras que únicamente puedan fermentar de forma parcial el mosto. Esto se debe a que, estas son levaduras que se caracterizan por ser ineficientes al momento de degradar maltosa, el azúcar con mayor presencia en el mosto, de forma que, el rendimiento en la producción de etanol es relativamente bajo. Dentro de estas levaduras es posible mencionar especies de *Saccharomyces* que son frecuentemente utilizadas en producción de cerveza sin alcohol, como *Saccharomyces rouxii* o *Saccharomyces ludwigii* (Muller *et.al.*, 2020) o bien, especies de levaduras completamente ajenas a *Saccharomyces* con las cuales no se ha experimentado mucho en este ámbito como, por ejemplo, *Torulaspora delbrueckii* y *R. glutinis* (Kochláňová *et.al.*, 2016).

b. Tratamientos especiales.

A diferencia de los métodos tradicionales, este tipo de métodos hacen referencia a aquellos que conllevan una aplicación biológica y que, además, implican el uso de equipos o instalaciones especiales (Brányik *et.al.*, 2012).

1) Fermentación continua.

Este proceso consiste en el uso de levaduras especiales que, como fue mencionado anteriormente, se caracterizan por no llevar a cabo fermentación de forma total (Navrátil *et.al.*, 2002). Esta técnica consiste en inmovilizar estas levaduras a un material portador, de manera que, tanto el material portador como la levadura se colocan en el reactor, en donde se deja fluir el mosto. La principal ventaja de esta técnica es que, la inmovilización de levaduras induce una mayor biomasa por unidad de volumen del reactor en un periodo más corto de tiempo. Este método permite formación de los compuestos aromáticos característicos de la cerveza, sin embargo, requiere de biorreactores especiales (Muller *et.al.*, 2020).

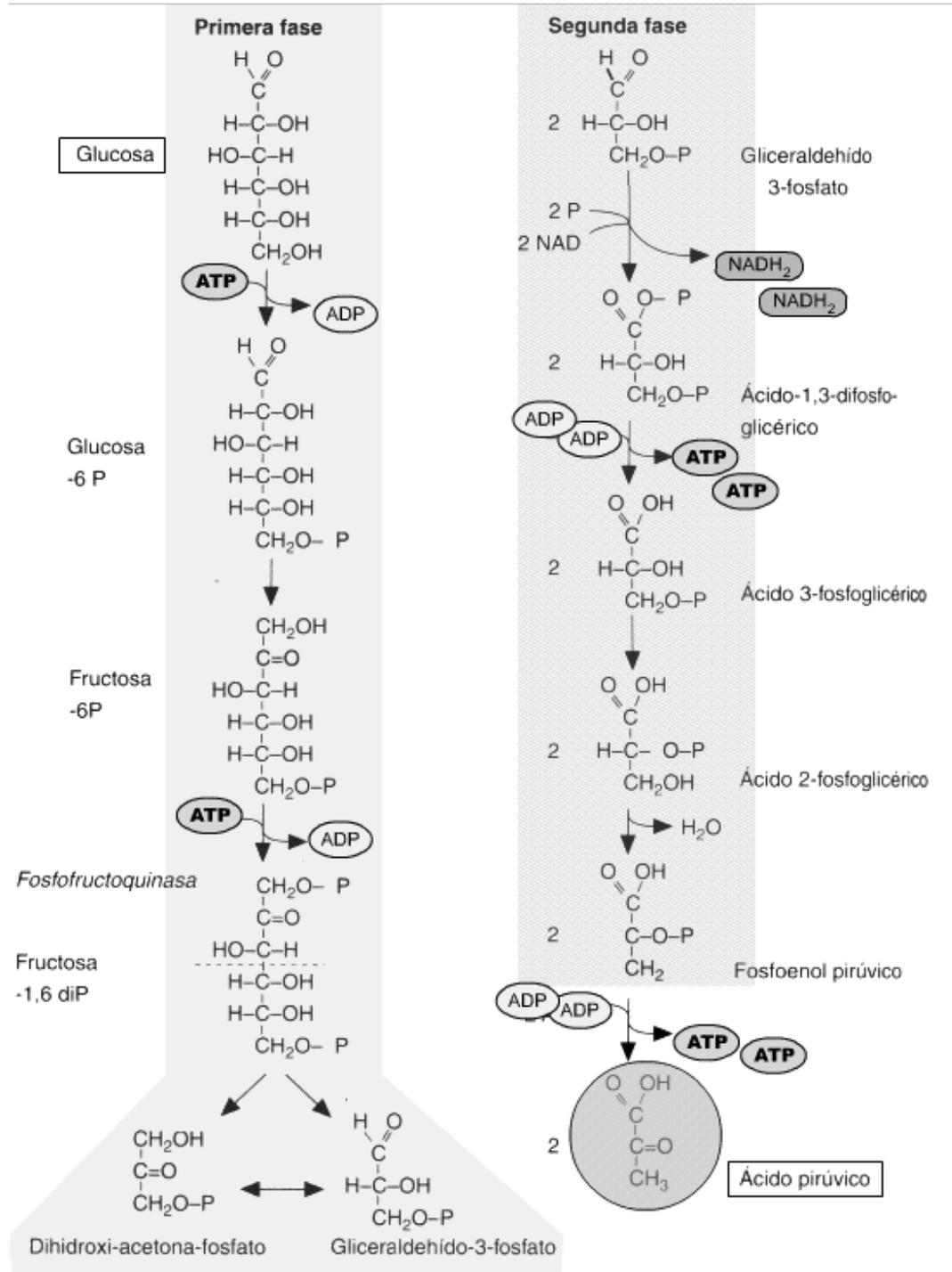
D. Proceso de fermentación parcial utilizando levaduras especiales

De los métodos previamente planteados, la combinación de un proceso de fermentación parcial con la aplicación de levaduras especiales muestra ser prometedora. Esto se debe a que, es posible elaborar cerveza de forma convencional utilizando el proceso fermentativo de *S. cerevisiae* sin llegar a comprometer la producción de compuestos aromáticos durante el proceso de fermentación y, por ende, sin perjudicar en gran medida las propiedades originales de la cerveza y, específicamente, sus características organolépticas; posteriormente es posible introducir una levadura de tipo especial como lo es *R. glutinis* para reducir el etanol presente

en el mosto a manera de alcanzar el porcentaje de etanol deseado para clasificar a la cerveza como del tipo “sin alcohol”. De esta manera es posible elaborar una bebida fermentada con un porcentaje de etanol reducido, a diferencia de producir una bebida tipo malta que, si bien, no representará un problema en cuanto a contenido alcohólico, posiblemente tampoco presente las características organolépticas que se esperan en una cerveza (Kochláňová *et.al.*, 2016).

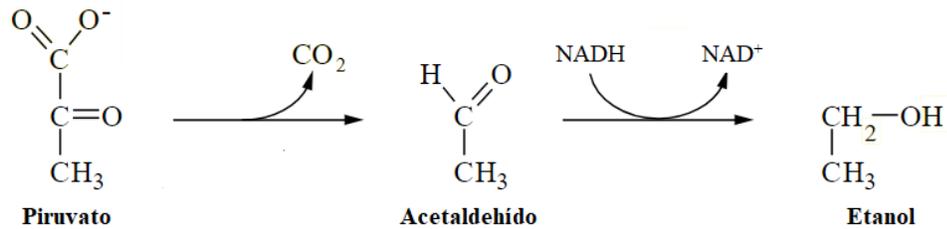
En este caso, la levadura *S. cerevisiae* utiliza las azúcares presentes en el mosto como la glucosa, la fructosa y la maltosa, para llevar a cabo el proceso de glucolisis. En esta ruta, presentada en la Figura 2, se obtienen dos moléculas de piruvato a partir de una molécula de glucosa. Luego, bajo condiciones anaeróbicas, cada molécula de piruvato es convertida a etanol, produciendo acetaldehído como intermediario y dióxido de carbono como subproducto tal como puede observarse en la Figura 3 (Nelson y Cox, 2013). Cabe mencionar que, las rutas metabólicas previamente mencionadas son procesos complejos en los que se forman una amplia variedad de compuestos como subproductos y que resultan relevantes en el producto final. Por ejemplo, en el caso de la fermentación alcohólica, más allá de producir etanol, acetaldehído y dióxido de carbono, se producen otros compuestos, como alcoholes superiores, ésteres, glicerol, ácido succínico, diacetilo, 2,3-butanodiol, entre otros (Zamora, 2009).

Figura 2. Ruta de glucólisis



Fuente: Nelson y Cox (2013).

Figura 3. Ruta de fermentación alcohólica bajo condiciones anaeróbicas



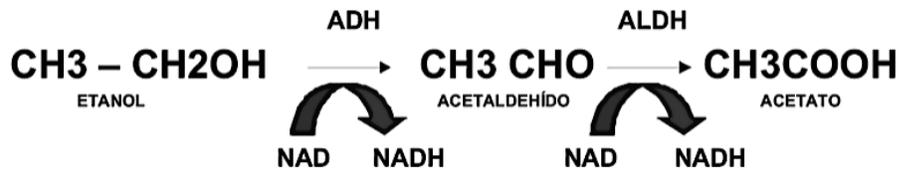
Fuente: Nelson y Cox (2013).

Una vez *S. cerevisiae* ha llevado a cabo el proceso previamente expuesto en la etapa de fermentación, ya sea primaria o secundaria, correspondiente al proceso de elaboración de cerveza, es posible llevar a cabo la inactivación térmica del microorganismo para evitar que continúe produciendo etanol. Este proceso puede llevarse a cabo tratando el mosto a 60°C durante 5 a 15 minutos. Sin embargo, es importante mencionar que algunas cepas de este microorganismo tienden a ser altamente resistentes a temperatura y, por ello, a pesar de llevar a cabo el proceso de inactivación térmica, es posible que algunas células aún se encuentren en el mosto de forma activa contribuyendo a que continúe la producción de etanol. Por ello, resulta relevante realizar pruebas confirmatorias de tipo microbiológico para determinar si, en un medio de cultivo la levadura es capaz o no de aprovechar los nutrientes, es decir, si continúa viva y con capacidades de reproducción o si se logró el objetivo de inactivarla (Reveron, Barreiro y Sandoval, 2003).

Seguidamente, es posible inocular la levadura *R. glutinis*, una levadura aeróbica, para que consuma el etanol previamente producido por *S. cerevisiae*. Para ello, es necesario proporcionar aireación periódica en el fermentador, de forma que el microorganismo pueda llevar a cabo sus funciones celulares. Por una parte, como puede ser observado en la Figura 4, el etanol puede ser convertido a acetaldehído por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa para reducir el contenido alcohólico de la cerveza. Sin embargo, este compuesto es considerado un posible carcinógeno y de carácter tóxico, por lo que es altamente reactivo y es rápidamente convertido a acetato por la acción de la enzima aldehído deshidrogenasa y, posteriormente, este compuesto es convertido a acetyl-CoA en presencia de la enzima acetyl-CoA sintetasa. Este componente ingresa al ciclo de Krebs para ser oxidado y favorecer la producción de energía. Debido a ello, el acetato no presenta riesgo de acumulación porque es convertido a acetyl-coA y esto es de gran beneficio para el organismo (Zakhari, 2006). Cabe mencionar que, debido a la toxicidad

del acetaldehído, al aplicar la ruta técnica propuesta, es necesario monitorear la cantidad de este compuesto en la cerveza producida. Específicamente, se recomienda evitar dosis mayores a 19.2 mg al día en el caso de adultos puesto que esto puede representar efectos secundarios graves como fuertes náuseas, mareos, dolor de cabeza, entre otros (FDA, 2021).

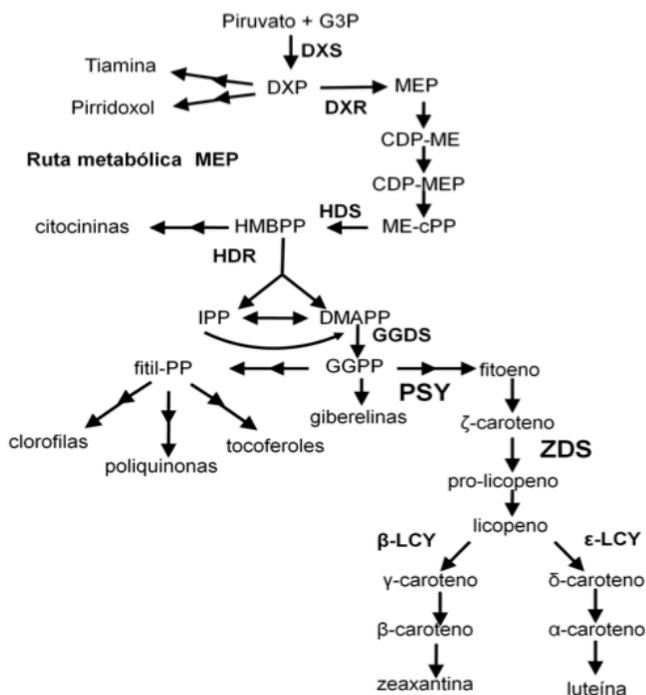
Figura 4. Metabolismo del etanol



Fuente: Zakhari (2006).

Por otra parte, es importante tomar en cuenta que, si bien esta levadura es incapaz de fermentar azúcares debido a que es una levadura aeróbica que no lleva a cabo el proceso de fermentación alcohólica, podría utilizar los azúcares como sustrato para la producción de metabolitos secundarios, como puede observarse en la Figura 5. Por ejemplo, uno de los metabolitos secundarios característicos de este microorganismo son los β -carotenos, los cuales son pigmentos producidos por el género *Rhodotorula* y que son de gran interés a nivel industrial, por lo que esta levadura es frecuentemente utilizada en la industria para este fin. Cabe mencionar que el β -caroteno es un compuesto seguro para consumo humano, incluyendo mujeres embarazadas para quienes, en cierta parte, la bebida propuesta se encuentra dirigida por lo que el consumirla no representaría ningún riesgo (HSIS, s.f.). Para el consumidor en general, siempre y cuando estos sean adultos, la dosis recomendada es de 75 a 180 mg al día puesto que, en dosis mayores, existe riesgo de hipercarotenemia, la cual es una condición no peligrosa y reversible pero que se caracteriza por presentar coloración amarilla en la piel (Mayo Clinic, s.f.). Por otra parte, es importante agregar que, aunque este microorganismo es considerado como un patógeno oportunista, únicamente presenta riesgo para personas altamente inmunocomprometidas y es parte de la razón por la cual, a pesar de su categoría, se sigue utilizando ampliamente a nivel industrial (Bogacz y Harasym, 2018).

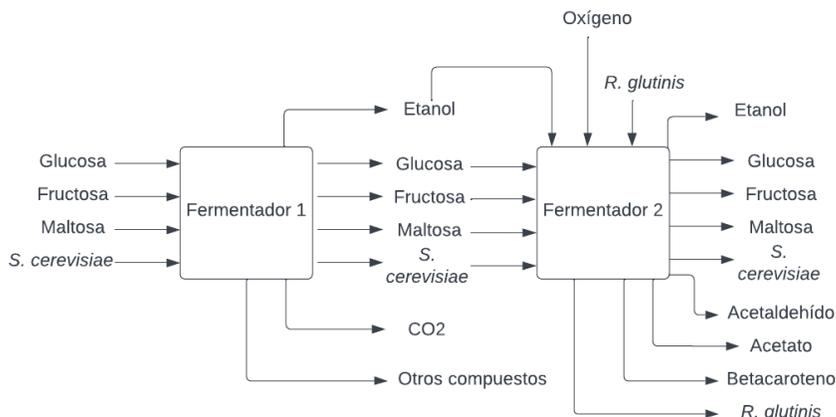
Figura 5. Conversión del piruvato proveniente de la ruta de glucólisis en β -carotenos en *R. glutinis*



Fuente: García (2011).

Tomando todos estos aspectos en cuenta, es posible plantear un balance de masa del proceso de fermentación parcial utilizando una levadura especial para la elaboración de cerveza artesanal sin alcohol con las respectivas entradas y salidas, como puede observarse a continuación:

Figura 6. Balance de masa del proceso teórico



Un aspecto importante para considerar es que si la levadura en cuestión, es decir, *R. glutinis*, no fuera capaz de llevar a cabo de forma eficiente la conversión de etanol en acetaldehído o bien, la producción de β -carotenos, sería posible utilizar herramientas de modificación genética para permitirle cumplir estas funciones en particular. Específicamente, podría utilizarse la herramienta CRISPR/Cas9 para clonar el gen o genes de interés presentes en otro microorganismo, insertarlo en un plásmido y posteriormente expresarlo en el genoma de levadura. Cabe mencionar que, sería necesario realizar pruebas de PCR que confirmen la inserción del gen de interés y, además, pruebas de actividad enzimática para evaluar si, tras la modificación genética, la levadura es suficientemente efectiva para llevar a cabo procesos de este tipo (Pi *et.al.*, 2018).

E. Evaluación del producto final

Como fue mencionado, uno de los principales retos con relación a la producción de cerveza sin alcohol es obtener un producto que sea aceptado por el consumidor, puesto que, hasta el momento, ha resultado difícil encontrar un balance entre disminuir el contenido alcohólico de una bebida sin perjudicar las propiedades organolépticas y características principales de la misma. Por ello, se hace relevante la implementación de análisis que permiten evaluar las características del producto final, tanto cuantitativamente como cualitativamente. En dicha línea, es posible realizar mediciones del contenido alcohólico y de la concentración de azúcares fermentables por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para poder determinar si la cerveza cumple los requerimientos en cuanto a porcentaje de etanol y evaluar el comportamiento de los sustratos y productos a lo largo del proceso (Sohrabvandi *et.al.*,

2009). De igual forma, es posible llevar a cabo la determinación cuantitativa o cualitativa de diferentes compuestos y/o características que aportan al producto final y son relevantes para el consumidor, como por ejemplo la concentración de acetaldehído y de β -caroteno, así como también, determinaciones de color, turbidez, grados IBU, gravedad original y final y un análisis de la percepción sensorial.

Por ejemplo, en el caso del acetaldehído es posible llevar a cabo la cuantificación del producto final utilizando un espectrofotómetro UV-VIS y lecturas de absorbancia a 340 nm puesto que esta es la longitud de onda a la cual el NADH tiene un pico significativo. Como puede ser observado en la Figura 4, en presencia de la enzima aldehído deshidrogenasa, la conversión de acetaldehído a acetato tiene como consecuencia la conversión de NAD⁺ en NADH, por lo que es posible cuantificar la concentración de NADH formado, lo cual es directamente proporcional a la concentración de acetaldehído (Nzytech, s.f.). También es posible determinar la concentración de β -caroteno y determinar la turbidez y el color medido en escala SRM utilizando un espectrofotómetro UV-VIS y lecturas de absorbancia a 470 nm (Lichtenthaler y Buschmann, 2001), 700 nm y 430 nm (Shellhammer, 2009), respectivamente. La gravedad, tanto original como final, puede ser determinada haciendo uso de un refractómetro digital. Finalmente, los grados IBU si bien pueden ser determinados de forma experimental haciendo uso de técnicas colorimétricas con un espectrofotómetro UV-VIS, también pueden ser determinados de forma teórica conociendo las propiedades del lúpulo a utilizar (Hall, 1997). Por otra parte, es posible llevar a cabo un panel para evaluar la percepción sensorial de potenciales consumidores en cuanto al sabor y olor de la cerveza producida (Sohrabvandi *et.al.*, 2009).

V. Antecedentes

Aunque en la actualidad aún no se ha experimentado con *R. glutinis* para llevar a cabo la producción de cerveza sin alcohol, si se han utilizado otras levaduras especiales, específicamente del género *Saccharomyces*, que son similares a *R. glutinis* en el sentido de que son incapaces de llevar a cabo el proceso de fermentación alcohólica a partir de maltosa y, además, cuentan con la enzima necesaria (alcohol deshidrogenasa) para llevar a cabo el consumo de etanol. Las levaduras *S. ludwigii* y *S. rouxii* han sido utilizadas en dos tipos de procesos (Kochláňová *et.al.*, 2016).

Por una parte, han sido utilizados como sustituyentes de *S. cerevisiae* y, puesto que son levaduras que no fermentan de forma adecuada la maltosa, el proceso de fermentación tiene como resultado porcentajes de etanol muy bajos. Cabe mencionar que, dado que el proceso de fermentación primaria es pobre, muchos de los compuestos secundarios que dan el sabor y olor característico de la cerveza se dan en porcentajes bajos también. A raíz de ello, el producto final no siempre cumple con los requerimientos sensoriales del consumidor y, por ello, no es la alternativa más utilizada (Kochláňová *et.al.*, 2016).

Por otra parte, se han utilizado en procesos de fermentación parcial, en los que estas levaduras son inoculadas luego de inactivar a la levadura primaria *S. cerevisiae*, lo cual ha permitido producir los compuestos importantes a nivel sensorial de la cerveza y reducir el contenido alcohólico en cierta medida. Cabe mencionar que, dado que las levaduras aún pueden fermentar otras azúcares presentes en el mosto, siempre existe la posibilidad de que la producción de etanol continúe dándose, sin llegar a reducir del todo la concentración de etanol en el producto final. Finalmente, es importante agregar que en estos procesos se utilizan concentraciones iguales de ambas levaduras, lo cual ha permitido obtener porcentajes de etanol iguales o menores al 0.5% (v/v), a partir de lo cual es posible concluir que la producción de cerveza “sin alcohol” ha sido satisfactoria (Sohrabvandi *et.al.*, 2009).

VI. Metodología

A. Prueba de consumo de etanol por *R. glutinis*

Materiales

- Cultivo de *R. glutinis* CBS 322
 - Medio de cultivo Dextrosa Sabouraud
 - Incubadora con agitación Lab Companion
 - Erlenmeyer 150 mL
 - Probeta 100 mL
 - Balanza OHAUS
 - Autoclave Tuttnauer
 - Cinta testigo
 - Asa microbiológica
 - Cloro al 10%
 - Etanol al 95%
 - Campana de flujo laminar LABCONCO
 - Agua destilada
 - Etanol absoluto
 - Micropipeta 100-1000 μ L
 - Tubos de ensayo
 - Columna Hyplex H con detector IR para HPLC
1. Solicitar caja Petri con levadura *R. glutinis* del cepario de levaduras del departamento Ingeniería Química de la Universidad del Valle de Guatemala.
 2. Incubar caja Petri a 37°C por 15 minutos.
 3. Preparar 50 mL de caldo Dextrosa Sabouraud en Erlenmeyer de 150 mL, mezclando 50 mL de agua destilada medidos con una probeta de 100 mL con 1.5 g de medio Dextrosa Sabouraud pesado en balanza.

4. Colocar identificación y cinta testigo al Erlenmeyer.
5. Esterilizar medios de cultivo en autoclave a 121°C por 15 minutos.
6. Dejar que los medios alcancen temperatura ambiente.
7. Con un asa microbiológica esterilizada con mechero, en campana de flujo laminar previamente esterilizada con cloro al 10% y etanol al 95%, inocular una colonia de la levadura proporcionada del cepario en Erlenmeyer.
8. Incubar a 30°C y 120 rpm durante 96 horas.
9. Preparar 25 mL de solución de etanol al 1.5% mezclando 375 µL de etanol absoluto con 24.63 de agua destilada.
10. Agregar solución de etanol al 1% al medio de cultivo.
11. Tomar 3 mL de muestra en tubo de ensayo y almacenar en refrigeración.
12. Incubar a 30°C y 120 rpm durante 96 horas, tomando muestras cada 48 horas.
13. Analizar muestras por HPLC.
14. Determinar si se dio una reducción de etanol en el medio.

F. Preparación de cultivo iniciador de *S. cerevisiae*

Materiales

- Cultivo de *S. cerevisiae* CBS 381
- Incubadora LAB-LINE
- Medio de cultivo Dextrosa Sabouraud
- Erlenmeyer 250 mL
- Probeta 1 L
- Balanza OHAUS
- Tubos de ensayo con rosca
- Cinta testigo
- Autoclave Tuttnauer
- Asa microbiológica
- Cloro al 10%
- Etanol al 95%
- Campana de flujo laminar LABCONCO
- Mechero
- Refrigerador
- Balanza analítica OHAUS

- Bote de vidrio
- Erlenmeyer 1 L
- Incubadora con agitación Lab Companion
- Micropipeta 10-100 μL
- Micropipeta 100-1000 μL
- Cámara de Neubauer
- Azul de metileno al 1%
- Espectrofotómetro UV-VIS SHIMADZU
- Tubos para centrifuga de 250 mL
- Centrifuga SORVALL
- Vortex Fisher Scientific
- Desinfectante DOECIL CAT al 1%
- Horno secador Symphony
- Papel aluminio
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Merck
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Merck
- NaHCO_3 Ferkica

1. Solicitar caja Petri con levadura *S. cerevisiae* del cepario de levaduras del departamento Ingeniería Química de la Universidad del Valle de Guatemala.
2. Incubar caja Petri a 37°C por 15 minutos.
3. Preparar 100 mL de caldo Dextrosa Sabouraud en Erlenmeyer de 250 mL, mezclando 100 mL de agua destilada medidos con una probeta de 1 L con 3 g de medio Dextrosa Sabouraud pesado en balanza.
4. Transferir caldo Dextrosa Sabouraud a 10 tubos de ensayo con rosca, 10 mL en cada uno.
5. Colocar identificación y cinta testigo a cada medio.
6. Esterilizar medios de cultivo en autoclave a 121°C por 15 minutos.
7. Dejar que los medios alcancen temperatura ambiente.
8. Con un asa microbiológica esterilizada con mechero, en campana de flujo laminar previamente esterilizada con cloro al 10% y etanol al 95%, inocular una colonia de la levadura proporcionada del cepario en 9 de los 10 tubos de ensayo con caldo Dextrosa Sabouraud.

9. Incubar tubos de ensayo a 37°C durante 96 horas, procurando dejar los tubos de ensayo ligeramente abiertos.
10. Almacenar tubos de ensayo en refrigeración hasta su uso.
11. En frasco de vidrio previamente esterilizado, preparar 180 mL de agua desmineralizada medidos con probeta de 1 L con 0.097 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.168 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.022 g de NaHCO_3 pesados en balanza analítica.
12. Preparar 500 mL de caldo Dextrosa Sabouraud en Erlenmeyer de 1 L, mezclando 500 mL de agua destilada medidos con probeta de 1 L con 15 g de medio Dextrosa Sabouraud pesados en balanza.
13. Colocar identificación y cinta testigo a cada medio.
14. Esterilizar medios de cultivo en autoclave a 121°C por 15 minutos.
15. Dejar que los medios alcancen temperatura ambiente.
16. Temperar 1 tubo de ensayo con cultivo.
17. Inocular 1 tubo de ensayo con cultivo en el Erlenmeyer de 1 L.
18. Incubar a 120 rpm y 30°C.
19. Preparar 1 mL de una dilución 1:100 del medio de cultivo utilizando una micropipeta, mezclando 10 μL de cultivo con 990 mL de caldo Dextrosa Sabouraud.
20. Mezclar 10 μL de la dilución 1:100 del medio de cultivo con 10 μL de solución de azul de metileno al 1%.
21. Ingresar mezcla en cámara de Neubauer.
22. Realizar conteo celular.
23. Verificar que el dato obtenido en el conteo corresponda entre 7 y 12 millones de células/mL, es decir, entre 2.65×10^{10} y 4.54×10^{10} células en 500 mL de medio.
24. Medir absorbancia a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS.
25. Realizar curva de calibración de lectura de absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro UV-VIS y conteo celular en cámara de Neubauer.
26. Repetir pasos 18 a 21 cada 24 horas.
27. Luego de 96 horas, transferir cultivo a tubos Falcón previamente esterilizados con cloro al 10% y etanol al 95% y centrifugar a 4,000 rpm y 0°C durante 30 minutos.
28. Descartar el sobrenadante.
29. Diluir cada pellet en 10 mL de agua preparada según indicaciones del paso 11 utilizando un vortex para mezclar.
30. Trasvasar a frasco de vidrio previamente desinfectado con DOECIL CAT al 1%.
31. Almacenar en refrigeración hasta su uso.

32. Repetir pasos 12 a 18 y 27 a 31 para cada corrida adicional.

Nota. Para la determinación de peso seco se realizó una corrida adicional siguiendo los pasos 12 al 18 y 27 a 28. Posteriormente se transfirió la biomasa a un pedazo de papel aluminio previamente pesado y se secó en horno a 60°C durante 2 horas. Finalmente, se pesó de nuevo para determinar por diferencia el peso seco.

G. Preparación de cultivo iniciador de *R. glutinis*

Materiales

- Cultivo de *R. glutinis* CBS 322
- Incubadora LAB-LINE
- Medio de cultivo Dextrosa Sabouraud
- Erlenmeyer 250 mL
- Probeta 1 L
- Balanza OHAUS
- Tubos de ensayo con rosca
- Cinta testigo
- Autoclave Tuttnauer
- Asa microbiológica
- Cloro al 10%
- Etanol al 95%
- Campana de flujo laminar LABCONCO
- Mechero
- Refrigerador
- Balanza analítica OHAUS
- Bote de vidrio
- Erlenmeyer 1 L
- Incubadora con agitación Lab Companion
- Micropipeta 10-100 µL
- Micropipeta 100-1000 µL
- Cámara de Neubauer
- Azul de metileno al 1%
- Espectrofotómetro UV-VIS SHIMADZU

- Tubos para centrifuga de 250 mL
- Centrifuga SORVALL
- Vortex Fisher Scientific
- Desinfectante DOECIL CAT al 1%
- Horno secador Symphony
- Papel aluminio
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Merck
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Merck
- NaHCO_3 Ferkica

1. Solicitar caja Petri con levadura *R. glutinis* del cepario de levaduras del departamento Ingeniería Química de la Universidad del Valle de Guatemala.
2. Incubar caja Petri a 37°C por 15 minutos.
3. Preparar 100 mL de caldo Dextrosa Sabouraud en Erlenmeyer de 250 mL, mezclando 100 mL de agua destilada medidos con una probeta de 1 L con 3 g de medio Dextrosa Sabouraud pesado en balanza.
4. Transferir caldo Dextrosa Sabouraud a 10 tubos de ensayo con rosca, 10 mL en cada uno.
5. Colocar identificación y cinta testigo a cada medio.
6. Esterilizar medios de cultivo en autoclave a 121°C por 15 minutos.
7. Dejar que los medios alcancen temperatura ambiente.
8. Con un asa microbiológica esterilizada con mechero, en campana de flujo laminar previamente esterilizada con cloro al 10% y etanol al 95%, inocular una colonia de la levadura proporcionada del cepario en 9 de los 10 tubos de ensayo con caldo Dextrosa Sabouraud.
9. Incubar tubos de ensayo a 37°C durante 96 horas, procurando dejar los tubos de ensayo ligeramente abiertos.
10. Almacenar tubos de ensayo en refrigeración hasta su uso.
33. En frasco de vidrio previamente esterilizado, preparar 180 mL de agua desmineralizada medidos con probeta de 1 L con 0.097 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.168 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.022 g de NaHCO_3 pesados en balanza analítica.
11. Preparar 500 mL de caldo Dextrosa Sabouraud en Erlenmeyer de 1 L, mezclando 500 mL de agua destilada medidos con probeta de 1 L con 15 g de medio Dextrosa Sabouraud pesados en balanza.

12. Colocar identificación y cinta testigo a cada medio.
13. Esterilizar medios de cultivo en autoclave a 121°C por 15 minutos.
14. Dejar que los medios alcancen temperatura ambiente.
15. Temperar 1 tubo de ensayo con cultivo.
16. Inocular 1 tubo de ensayo con cultivo en el Erlenmeyer de 1 L.
17. Incubar a 120 rpm y 30°C.
18. Preparar 1 mL de una dilución 1:100 del medio de cultivo utilizando una micropipeta, mezclando 10 µL de cultivo con 990 mL de caldo Dextrosa Sabouraud.
19. Mezclar 10 µL de la dilución 1:100 del medio de cultivo con 10 µL de solución de azul de metileno al 1%.
20. Ingresar mezcla en cámara de Neubauer.
21. Realizar conteo celular.
22. Verificar que el dato obtenido en el conteo corresponda entre 7 y 12 millones de células/mL, es decir, entre 2.65×10^{10} y 4.54×10^{10} células en 500 mL de medio.
23. Medir absorbancia a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS.
24. Realizar curva de calibración de lectura de absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro UV-VIS y conteo celular en cámara de Neubauer.
25. Repetir pasos 17 a 21 cada 24 horas.
26. Luego de 96 horas, transferir cultivo a tubos Falcón previamente esterilizados con cloro al 10% y etanol al 95% y centrifugar a 4,000 rpm y 0°C durante 30 minutos.
27. Descartar el sobrenadante.
28. Diluir cada pellet en 10 mL de agua preparada según indicaciones del paso 11 utilizando un vortex para mezclar.
29. Trasvasar a frasco de vidrio previamente desinfectado con DOECIL CAT al 1%.
30. Almacenar en refrigeración hasta su uso.
31. Repetir pasos 12 a 18 y 27 a 31 para cada corrida adicional.

Nota. Para la determinación de peso seco se realizó una corrida adicional siguiendo los pasos 12 al 18 y 27 a 28. Posteriormente se transfirió la biomasa a un pedazo de papel aluminio previamente pesado y se secó en horno a 60°C durante 2 horas. Finalmente, se pesó de nuevo para determinar por diferencia el peso seco.

H. Determinación de la calidad del agua

Materiales

- Agua desmineralizada
 - Kit HACH
1. Determinar las cantidades de calcio, magnesio, sodio, sulfato, cloruro y bicarbonato requeridas para el tipo de cerveza seleccionada.
 2. Tomar una muestra del agua desmineralizada a utilizar en la preparación del mosto.
 3. Determinar la dureza del agua haciendo uso de un Kit HACH.
 4. Si la dureza no es adecuada para el tipo de cerveza seleccionada, calcular la cantidad de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y NaHCO_3 a agregar al agua desmineralizada.

I. Preparación del mosto a fermentar

Materiales

- DOECIL CAT 1%
- Cubeta plástica
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Merck
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Merck
- NaHCO_3 Ferkica
- Agua desmineralizada
- Probeta 1 L
- Olla 15.142 L adaptada con llave y manguera ½"
- Termómetro digital Steren
- Estufa
- Regla
- Hielera 7.6 L adaptada con llave y manguera ½"
- Bolsas mesh
- Hules
- Balanza de cocina SF-400
- Malta Pale Ale
- Malta Crystal
- Malta Munich
- Cucharón
- Colador
- Lúpulo Columbus

- Lúpulo Cascade
 - Lúpulo Centennial
 - Bolas de té
 - Hielo
 - Fermentador de vidrio 3.785 L
 - Embudo plástico
 - Sifón
 - Botes de vidrio para muestreo
 - Refrigerador
 - Cronómetro
 - Guantes para calor
1. Sanitizar equipo y materiales con DOECIL CAT al 1%, mantenerlos en cubeta con sanitizante hasta su uso.
 2. Agregar 3.99 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6.91 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.87 g de NaHCO_3 a 7.4 L de agua desmineralizada medidos con probeta.
 3. En una olla de cocción de 15.142 L y utilizando un termómetro digital, calentar agua hasta alcanzar los 74°C.
 4. Determinar diferencial de altura del agua, utilizando una regla para cálculo de diferencial de volumen.
 5. Transferir agua caliente a hielera de 7.6 L.
 6. Colocar termómetro y mesh en hielera y ajustar con hules.
 7. Agregar dentro de mesh 0.9 kg de malta Pale Ale, 45.4 g de malta Crystal y 90.8 g de malta Múnich previamente pesados con balanza de cocina.
 8. Mezclar con cucharón para deshacer grumos.
 9. Cerrar hielera.
 10. Mantener la temperatura entre 67 y 69°C durante 1 hora.
 11. Exprimir mesh con granos y retirar de la hielera.
 12. Determinar diferencial de altura del mosto, utilizando una regla para cálculo de diferencial de volumen.
 13. Transferir mosto a olla de cocción, utilizando un colador.
 14. Calentar mosto hasta ebullición.
 15. Agregar 5.6 g de lúpulo Cascade en bola de té, previamente pesado con balanza de cocina.

16. Mantener hirviendo durante 10 minutos.
17. Agregar 5.6 g de lúpulo Cascade en bola de té, previamente pesado con balanza de cocina.
18. Agregar 5.6 g de lúpulo Centennial en bola de té, previamente pesado con balanza de cocina.
19. Mantener hirviendo durante 10 minutos.
20. Agregar 5.6 g de lúpulo Centennial en bola de té, previamente pesado con balanza de cocina.
21. Mantener hirviendo durante 40 minutos.
22. Agregar 5.6 g de lúpulo Columbus en bola de té, previamente pesado con balanza de cocina.
23. Mantener hirviendo durante 5 minutos.
24. Retirar mosto del fuego.
25. Determinar diferencial de altura del mosto, utilizando una regla para cálculo de diferencial de volumen.
26. Enfriar mosto en baño de hielo hasta alcanzar los 18°C.
27. Transferir el mosto a recipiente de vidrio de 3.785 L utilizando un colador y un embudo.
28. Tomar 120 mL de muestra para determinaciones fisicoquímicas utilizando un sifón.
29. Almacenar muestra en frío.
30. Repetir este procedimiento para cada una de las pruebas a realizar, 9 en total.

J. Fermentación parcial

Materiales

- DOECIL CAT 1%
- Cubeta plástica
- Levadura *S. cerevisiae*
- Levadura *R. glutinis*
- Stopper de hule para fermentador de vidrio
- Manguera 3/8"
- Recipiente de plástico
- Toalla oscura
- Olla de cocción 15.142 L adaptada con llave y manguera 1/2"
- Termómetro digital Steren

- Cronómetro
 - Hielo
 - Guantes para calor
 - Sifón
 - Botes de vidrio para muestreo
 - Refrigerador
1. Sanitizar equipo y materiales con DOCEIL CAT al 1%, mantenerlos en cubeta con sanitizante hasta su uso.
 2. Inocular el mosto con *S. cerevisiae* (entre 2.65×10^{10} y 4.54×10^{10} células).
 3. Agitar recipiente para oxigenar.
 4. Sellar el recipiente con stopper y manguera dirigida a un vaso de plástico con sanitizante.
 5. Cubrir fermentador con toalla.
 6. Fermentar a 22°C durante 72 horas, tomando muestras de 120 mL cada una cada 24 horas utilizando un sifón.
 7. Almacenar las muestras en refrigeración hasta su uso.
 8. Pasadas las 72 horas, transferir el mosto a la olla de cocción utilizando un colador.
 9. Utilizando un termómetro digital, calentar hasta que la temperatura alcance los 60°C durante 10 minutos para inactivar la levadura.
 10. Enfriar mosto en baño de hielo hasta alcanzar los 18°C.
 11. Transferir el mosto a recipiente de vidrio de 3.785 L previamente sanitizado.
 12. Inocular con *R. glutinis* (entre 2.65×10^{10} y 4.54×10^{10} células).
 13. Agitar recipiente para oxigenar.
 14. Sellar bien el recipiente con stopper y manguera dirigida a un vaso de plástico con sanitizante.
 15. Fermentar a 22°C durante 72 horas, proporcionando aireación periódica cada 12 horas y tomando muestras de 120 mL cada una cada 24 horas utilizando un sifón.
 16. Almacenar las muestras en refrigeración hasta su uso.
 17. Repetir este procedimiento en triplicado.
 18. Repetir este procedimiento de forma similar para cada una de las pruebas a realizar, las cuales se encuentran detalladas a continuación:
 - a. Prueba 2: entre 2.65×10^{10} y 4.54×10^{10} células de inóculo de *S. cerevisiae*, entre 2.65×10^{10} y 4.54×10^{10} células de inóculo de *R.*

glutinis, 96 horas de fermentación para *S. cerevisiae* y 48 horas de fermentación para *R. glutinis* (Prueba No. 2).^{oo}

- b. Prueba 3: entre 2.65×10^{10} y 4.54×10^{10} células de inóculo de *S. cerevisiae*, entre 2.65×10^{10} y 4.54×10^{10} células de inóculo de *R. glutinis*, 48 horas de fermentación para *S. cerevisiae* y 96 horas de fermentación para *R. glutinis* (Prueba No. 3).

K. Determinaciones fisicoquímicas

Materiales

- Pipeta de 1 – 5 mL
- Columna Hyplex H con detector IR para HPLC
- Estándar de β -caroteno sintético tipo II grado reactivo Merck
- Acetonitrilo Merck
- Balanza analítica OHAUS
- Probeta 10 mL
- Espectrofotómetro UV-VIS SHIMADZU
- Celdas de plástico para espectrofotómetro UV-VIS
- Licuadora
- Cronómetro
- Balanza OAHUS
- Probeta 25 mL
- Ampolla de decantación 125 mL
- Soporte para ampolla de decantación
- Hexano Merck
- Acetona Quimiprova
- Agua destilada
- Sistema de destilación
- Estándar acetaldehído 400 mM Merck
- Agua ultrapura Merck
- Buffer Merck
- Solución NAD Merck
- Enzima aldehído deshidrogenasa Merck
- Tubos eppendorf

- Micropipeta 10 – 100 μL
- Micropipeta 100 – 1000 μL
- Refractómetro digital HI96801
- Varilla de vidrio
- Vasos para panel sensorial
- Galletas soda para panel sensorial

1. Concentración de azúcares fermentables y etanol

- a. Utilizando una pipeta, tomar 5 mL de cada muestra sin que esta tenga sólidos suspendidos.
- b. Determinar la concentración de glucosa, maltosa, fructosa y etanol por medio de HPLC con detector IR utilizando una columna Hyplex H.
- c. Repetir para cada muestra de cada corrida realizada.

2. Concentración de β -caroteno:

- a. Preparar estándares 0, 50, 100, 112.5, 225 y 300 $\mu\text{g/mL}$ utilizando β -caroteno sintético tipo II grado reactivo pesado en balanza analítica y acetonitrilo como solvente medido utilizando probeta de 10 mL.
- b. Realizar lectura de absorbancia de cada estándar a 470 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS.
- c. Realizar curva de calibración de la concentración de β -caroteno utilizando espectrofotómetro UV-VIS.
- d. Introducir cada muestra de producto final en licuadora y licuar por 10 minutos.
- e. Mezclar 10 gramos de la muestra pesados en balanza con 15 mL de acetona y 15 mL de hexano medidos en probeta de 25 mL, en ampolla de decantación de 125 mL.
- f. Mezclar por inversión y esperar que las fases se separen.
- g. Decantar fase acuosa.
- h. Agregar 15 mL de acetona y 15 mL de hexano.
- i. Repetir pasos (f) y (g).
- j. Repetir pasos (h) e (i).
- k. Agregar 15 mL de agua destilada.
- l. Repetir pasos (f) y (g).
- m. Armar sistema de destilación.

- n. Introducir fase orgánica en balón de destilación.
- o. Destilar hasta alcanzar una temperatura de 69°C.
- p. Mezclar extracto con 1 mL de acetonitrilo medido con pipeta.
- q. Determinar absorbancia del extracto diluido a 470 nm.
- r. Determinar concentración utilizando la curva de calibración preparada en el paso ⑧
- s. Repetir pasos (d) a ⑧ para el producto final de cada corrida realizada, utilizando como solvente aquel recuperado en el proceso de destilación.

3. Concentración de acetaldehído

- a. Preparar 1 mL de estándar de acetaldehído 4 mM mezclando 10 μ L del estándar de acetaldehído 400 mM con 990 μ L de agua ultrapura en un tubo eppendorf utilizando micropipetas.
- b. Preparar 1 mL de estándar de acetaldehído 60 μ M mezclando 15 μ L del estándar de acetaldehído 4 mM con 985 μ L de agua ultrapura en un tubo eppendorf.
- c. Trasvasar 50 μ L de estándar a tubo eppendorf nuevo.
- d. Preparar 100 μ L de estándar de acetaldehído 36 μ M mezclando 60 μ L del estándar de acetaldehído 60 μ M con 40 μ L de agua ultrapura en un tubo eppendorf.
- e. Trasvasar 50 μ L de estándar a tubo eppendorf nuevo.
- f. Preparar 100 μ L de estándar de acetaldehído 18 μ M mezclando 30 μ L del estándar de acetaldehído 60 μ M con 70 μ L de agua ultrapura en un tubo eppendorf.
- g. Trasvasar 50 μ L de estándar a tubo eppendorf nuevo.
- h. Agregar 50 μ L de agua ultrapura a tubo eppendorf como estándar de acetaldehído 0 μ M.
- i. A cada tubo eppendorf con 50 μ L agregar 45 μ L de buffer, 8 μ L de solución NAD y 1 μ L de enzima aldehído deshidrogenasa.
- j. Incubar tubos eppendorf a temperatura ambiente por 30 minutos.
- k. Introducir muestras en celda para espectrofotómetro UV-VIS y determinar absorbancia a 340 nm.
- l. Realizar curva de calibración de la concentración de acetaldehído utilizando espectrofotómetro UV-VIS.

- m. En nuevos tubos eppendorf, mezclar 50 μL del producto final con 45 μL de buffer, 8 μL de solución NAD y 1 μL de enzima aldehído deshidrogenasa
 - n. Repetir pasos (j) y (k).
 - o. En nuevos tubos eppendorf, mezclar 50 μL del producto final con 45 μL de buffer y 8 μL de solución NAD.
 - p. Repetir pasos (j) y (k).
 - q. Restar la absorbancia de las muestras elaboradas en el paso (o) de las muestras elaboradas en el paso (m).
 - r. Calcular la concentración μM de acetaldehído utilizando la curva de calibración elaborada en paso (l).
 - s. Calcular la concentración de acetaldehído en $\mu\text{g/mL}$.
 - t. Repetir pasos (m) a (s) para el producto final de cada corrida realizada.
4. Gravedad específica
- a. Determinar el % Brix de las muestras inicial y final de cada corrida utilizando un refractómetro digital y una varilla de vidrio.
 - b. Calcular la gravedad de las muestras a partir del % Brix.
 - c. Repetir para cada una de las corridas realizadas.
5. Color y turbidez
- a. Medir la absorbancia del producto final a 700 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS para determinar la turbidez de la muestra.
 - b. Medir la absorbancia del producto final a 430 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS para determinar el color de la muestra.
 - c. Calcular el valor SRM a partir de la absorbancia del producto final libre de turbidez.
 - d. Repetir para cada producto final de cada corrida realizada.
6. Grados IBU
- a. Calcular diferencial de volumen entre las etapas de maceración y cocción.
 - b. Utilizar diferencial de volumen y el tiempo de ebullición total para calcular la tasa de ebullición del mosto.
 - c. Calcular los grados IBU teóricos del producto final a partir de las características del lúpulo utilizado y del volumen de mosto con el que se trabajó con base en la tasa de ebullición calculada.
7. Análisis de percepción sensorial

- a. Realizar un panel sensorial de todos los productos obtenidos para evaluar la percepción sensorial del consumidor en cuanto a olor y sabor en cada uno de ellos.

L. Análisis de datos

1. Calcular la desviación estándar de los resultados obtenidos en cada prueba.
2. Determinar si el porcentaje de reducción de etanol diaria es significativo en comparación con la desviación estándar de cada prueba.
3. Realizar un análisis de varianza de 1 factor con un nivel de confianza de 95% para determinar si hay una diferencia significativa en el porcentaje de reducción de etanol entre pruebas.

VII. Resultados

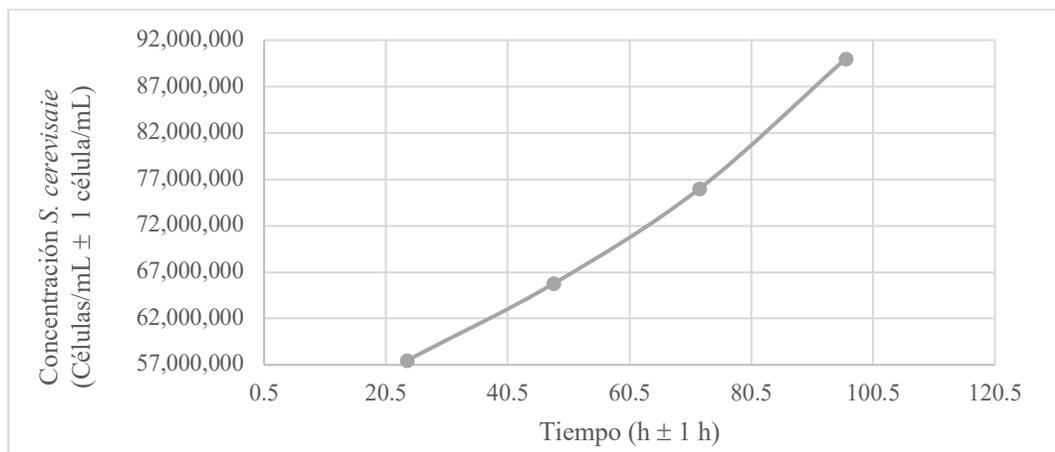
Cuadro 2. Consumo de etanol con respecto al tiempo en caldo Dextrosa Sabouraud inoculado con *R. glutinis*

Tiempo (h)	Concentración de etanol (% v/v \pm 0.001%)	Reducción diaria en la concentración de etanol (% v/v \pm 0.001%)	Reducción total en la concentración de etanol (% v/v \pm 0.001%)
0	0.523	-	
48	0.510	2.663	3.632
96	0.504	0.995	

Notas. La prueba de consumo de etanol se llevó a cabo con 75 mL de medio de cultivo inoculado con *R. glutinis* y 25 mL de solución de etanol al 1.5% durante 4 días a 30°C y 120 rpm.

El porcentaje de reducción hace referencia a la diferencia porcentual en la concentración de etanol que se obtuvo diariamente a partir de la inoculación de *R. glutinis* y fue determinado utilizando el Cálculo 34 de la sección de cálculos de muestra.

Figura 7. Concentración de *S. cerevisiae* con respecto al tiempo en la propagación en caldo Dextrosa Sabouraud

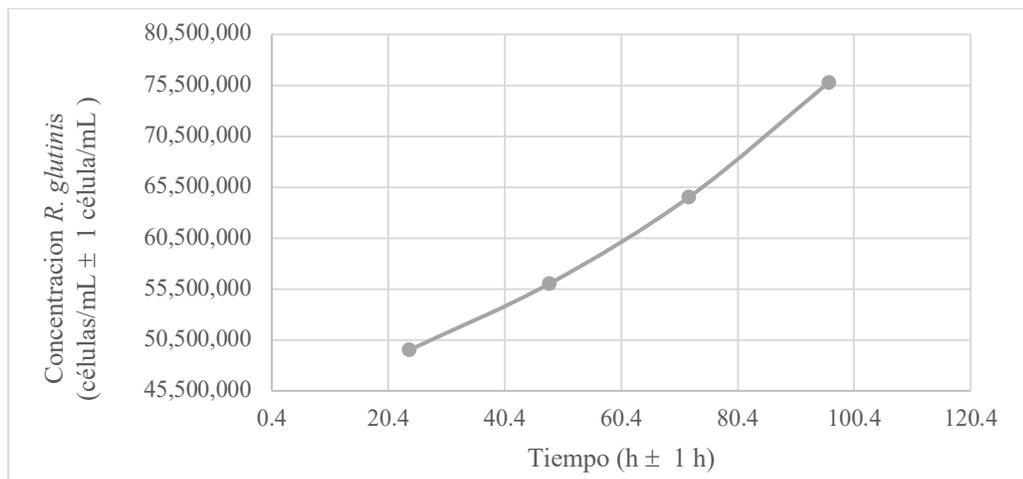


Notas. La propagación se llevó a cabo en 500 mL a 30°C y 120 rpm durante 4 días y el conteo celular se realizó utilizando una cámara de Neubauer.

La línea entre los puntos es utilizada para mejorar la percepción de tendencia con una curva suave.

La curva fue construida utilizando los datos presentados en el Cuadro 30 de la sección de datos calculados.

Figura 8. Concentración de *R. glutinis* con respecto al tiempo en la propagación en caldo Dextrosa 43unque43ud



Notas. La propagación se llevó a cabo en 500 mL a 30°C y 120 rpm durante 4 días y el conteo celular se realizó utilizando una cámara de Neubauer.

La línea entre los puntos es utilizada para mejorar la percepción de tendencia con una curva suave.

La curva fue construida utilizando los datos presentados en el Cuadro 31 de la sección de datos calculados.

Cuadro 3. Inóculo inicial de *S. cerevisiae* a utilizar en el proceso de fermentación parcial

No. Prueba	Concentración del inóculo (células/L)	Incertidumbre (%)
1	1.130×10^{10}	0.081
2	1.131×10^{10}	0.074
3	1.131×10^{10}	0.020

Notas. Las pruebas 1 a 3 se encuentran detalladas en la sección de metodología en el apartado de fermentación parcial. En donde la prueba 1 hace referencia a periodos de fermentación iguales para ambas levaduras, la prueba 2 a un periodo de fermentación mayor de *S. cerevisiae* y la prueba 3 a un periodo de fermentación mayor de *R. glutinis*.

La incertidumbre hace referencia a la relación porcentual entre la desviación estándar y la media del triplicado en cada una de las pruebas realizadas.

Los datos fueron obtenidos del Cuadro 33 presentado en la sección de datos calculados.

Cuadro 4. Inóculo inicial de *R. glutinis* a utilizar en el proceso de fermentación parcial

No. Prueba	Concentración del inóculo (células/L)	Incertidumbre (%)
1	9.751x10 ⁹	0.375
2	9.777x10 ⁹	0.055
3	9.779x10 ⁹	0.039

Nota. Las pruebas 1 a 3 se encuentran detalladas en la sección de metodología en el apartado de fermentación parcial. En donde la prueba 1 hace referencia a periodos de fermentación iguales para ambas levaduras, la prueba 2 a un periodo de fermentación mayor de *S. cerevisiae* y la prueba 3 a un periodo de fermentación mayor de *R. glutinis*.

La incertidumbre hace referencia a la relación porcentual entre la desviación estándar y la media del triplicado en cada una de las pruebas realizadas.

Los datos fueron obtenidos del Cuadro 35 presentado en la sección de datos calculados.

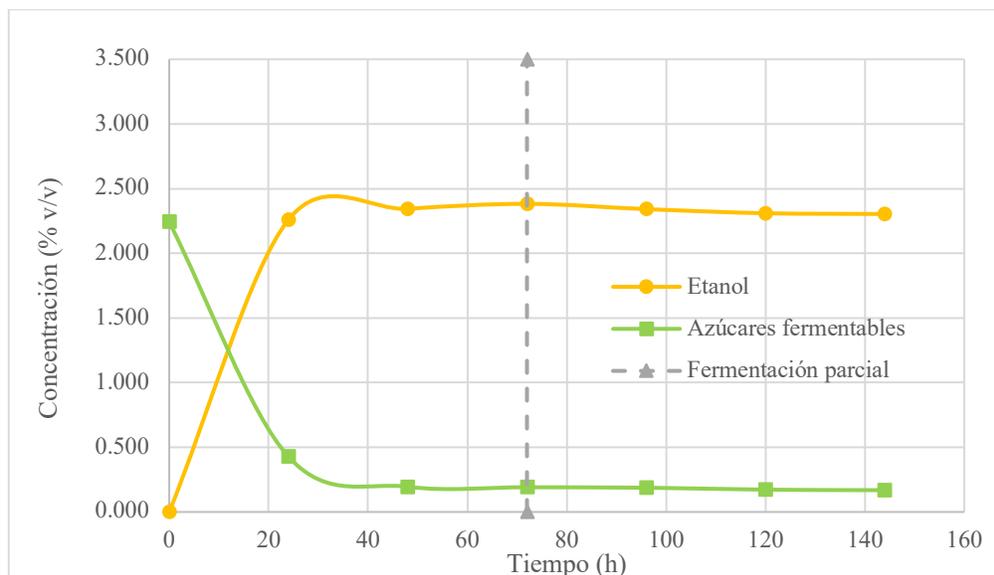
Cuadro 5. Formulación del mosto a utilizar en el proceso de fermentación parcial para estandarizar las especies en el medio

Especie	Cantidad
Agua desmineralizada	7.4 L ± 0.1 L
CaCl ₂ *2H ₂ O	3.998 g ± 0.001 g
NaHCO ₃	0.873 g ± 0.001 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	6.906 g ± 0.001 g
Malta Pale Ale	0.9 kg ± 0.1 kg
Malta Munich	90.8 g ± 0.1 g
Malta Crystal	45.4 g ± 0.1 g
Lúpulo Centennial (Alpha Ácidos 10.3%)	11.2 g ± 0.1 g
Lúpulo Columbus (Alpha Ácidos 14.8%)	5.6 g ± 0.1 g
Lúpulo Cascade (Alpha Ácidos 6.3%)	11.2 g ± 0.1 g

Nota. Esta formulación regulada por la American Homebrewers Association, permitió alcanzar un volumen final de 3.785 L de mosto, el cual fue inoculado con *S. cerevisiae* y posteriormente con *R. glutinis* según los datos de los Cuadros 3 y 4 de esta sección.

Las cantidades de CaCl₂*2H₂O, NaHCO₃ y MgSO₄*7H₂O fueron determinadas a partir de los Cálculos 7 a 15 de la sección de cálculos de muestra.

Figura 9. Concentraciones de las especies que intervienen en el proceso de fermentación parcial (prueba 1) de *S. cerevisiae* y *R. glutinis*



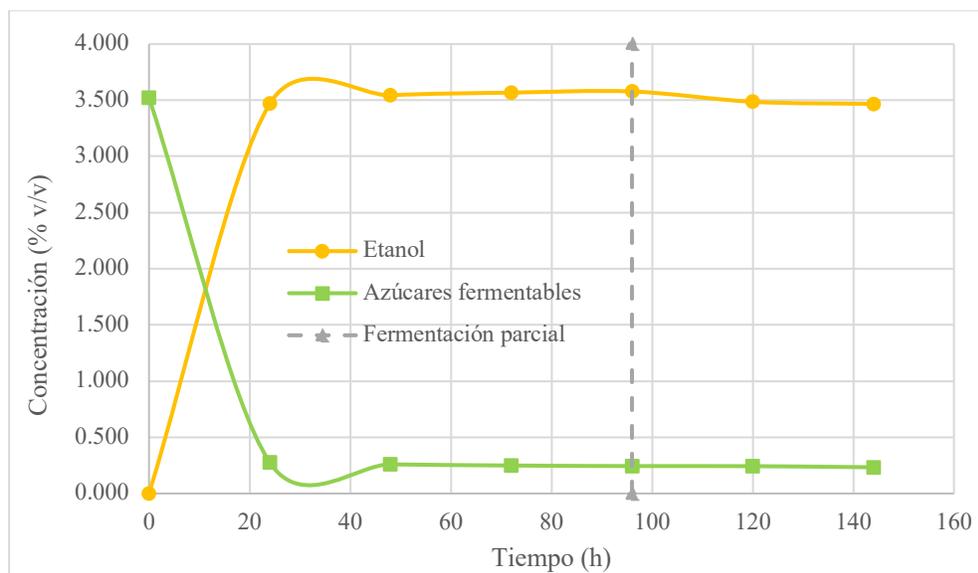
Notas. La concentración de etanol y de azúcares fermentables (glucosa, maltosa y fructosa) fue determinada por medio de HPLC utilizando una columna Hyplex H con detector IR.

La fermentación se realizó en condiciones anaeróbicas para el periodo fermentativo de *S. cerevisiae* y con periodos de aeración para el periodo de *R. glutinis*. En ambos casos, la fermentación se llevó a cabo a temperatura ambiente en un recipiente de 3.785 L.

Las líneas entre los puntos son utilizadas para mejorar la percepción de tendencia con una curva suave.

Las curvas fueron construidas utilizando los datos presentados en los Cuadros 37 y 42 de la sección de datos calculados.

Figura 10. Concentraciones de las especies que intervienen en el proceso de fermentación parcial (prueba 2) de *S. cerevisiae* y *R. glutinis*



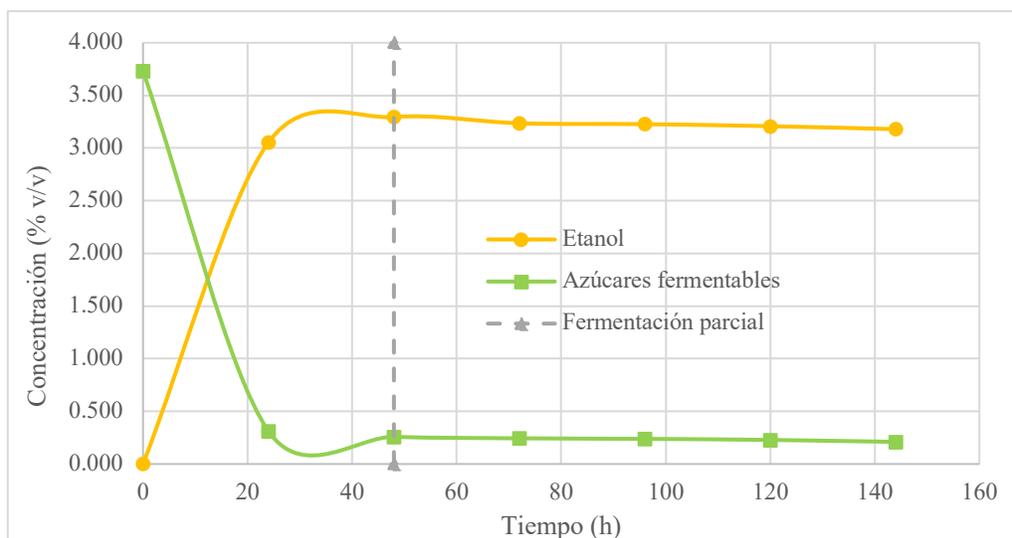
Notas. La concentración de etanol y de azúcares fermentables (glucosa, maltosa y fructosa) fue determinada por medio de HPLC utilizando una columna Hyplex H con detector IR.

La fermentación se realizó en condiciones anaeróbicas para el periodo fermentativo de *S. cerevisiae* y con periodos de aeración para el periodo de *R. glutinis*. En ambos casos, la fermentación se llevó a cabo a temperatura ambiente en un recipiente de 3.785 L.

Las líneas entre los puntos son utilizadas para mejorar la percepción de tendencia con una curva suave.

Las curvas fueron construidas utilizando los datos presentados en los Cuadros 37 y 42 de la sección de datos calculados.

Figura 11. Concentraciones de las especies que intervienen en el proceso de fermentación parcial (prueba 3) de *S. cerevisiae* y *R. glutinis*



Notas. La concentración de etanol y de azúcares fermentables (glucosa, maltosa y fructosa) fue determinada por medio de HPLC utilizando una columna Hyplex H con detector IR.

La fermentación se realizó en condiciones anaeróbicas para el periodo fermentativo de *S. cerevisiae* y con periodos de aeración para el periodo de *R. glutinis*. En ambos casos, la fermentación se llevó a cabo a temperatura ambiente en un recipiente de 3.785 L.

Las líneas entre los puntos son utilizadas para mejorar la percepción de tendencia con una curva suave.

Las curvas fueron construidas utilizando los datos presentados en los Cuadros 37 y 42 de la sección de datos calculados.

Cuadro 6. Determinación de la concentración de etanol con respecto al tiempo en el proceso de fermentación parcial de *S. cerevisiae* y *R. glutinis*

Prueba	Tiempo (h)	Concentración etanol (% v/v) (mL/100 mL)	Reducción de etanol (% v/v)	Reducción de etanol total (% v/v)	Incertidumbre (%)
1	0	0.000	-		0.00
	24	2.260	-		2.44
	48	2.344	-		3.27
	72	2.382	-	3.33%	3.08
	96	2.341	1.72		4.31
	120	2.310	1.35		2.92
	144	2.304	0.26		2.80
2	0	0.000	-		0.00
	24	3.468	-		5.18
	48	3.544	-		3.86
	72	3.567	-	3.11%	3.93
	96	3.578	-		3.95
	120	3.486	2.56		4.22
	144	3.467	0.55		4.59
3	0	0.000	-		0.00
	24	3.054	-		2.91
	48	3.295	-		2.86
	72	3.236	1.81	3.54%	4.80
	96	3.227	0.26		4.66
	120	3.208	0.60		5.65
	144	3.180	0.87		5.66

Nota. El porcentaje de reducción hace referencia a la diferencia porcentual en la concentración de etanol que se obtuvo diariamente a partir de la inoculación de *R. glutinis*.

La incertidumbre hace referencia a la relación porcentual entre la desviación estándar y la media del triplicado en cada una de las pruebas realizadas.

Los datos fueron obtenidos del Cuadro 37 presentado en la sección de datos calculados.

Cuadro 7. Caracterización del producto final obtenido a partir del proceso de fermentación parcial de *S. cerevisiae* y *R. glutinis*

Prueba	1	2	3
% ABV	2.304	3.458	3.180
Incertidumbre (%)	2.797	4.968	5.662
% AVB cerveza “sin alcohol”		≤ 0.5	
Cumple o no cumple	No	No	No
% AVB cerveza “light”		2 – 4	
Cumple o no cumple	Si	Si	Si
Concentración acetaldehído (µg/mL)	0.178	0.122	0.253
Incertidumbre (%)	0.673	0.110	0.600
Concentración β-caroteno (µg/mL)	134.068	70.358	172.986
Incertidumbre (%)	0.076	0.255	0.123
Gravedad específica original	1.048	1.054	1.056
Incertidumbre (%)	0.191	0.807	0.273
Gravedad específica original IPA		1.04 – 1.06	
Cumple o no	Si	Si	Si
Gravedad específica final	1.030	1.030	1.033
Incertidumbre (%)	0.194	0.297	0.274
Gravedad específica final IPA		1.01 – 1.02	
Cumple o no	No	No	No
SRM	7.796	7.764	7.827
Incertidumbre (%)	1.318	1.039	1.429
SRM IPA		6 – 7	
Cumple o no	No	No	No
Turbidez	Libre	Libre	Libre
Incertidumbre (%)	-	-	-
Grados IBU	96.007	96.007	96.007
Incertidumbre (%)	0.690	0.690	0.690
Grados IBU IPA		70 – 80	
Cumple o no	No	No	No
Percepción sensorial	7.167/10	7.033/10	7.267/10
Incertidumbre (%)	4.60	5.77	4.63

Nota. En los aspectos que fue posible, se compararon los valores obtenidos con los valores teóricos esperados de una cerveza “sin alcohol” o una cerveza estilo IPA, para determinar si los valores obtenidos en esta experimentación se encontraban dentro del rango.

La percepción sensorial del producto final contempla la calificación sobre un total de 10 puntos por parte del consumidor en cuanto al sabor y olor de la cerveza producida.

La incertidumbre hace referencia a la relación porcentual entre la desviación estándar y la media del triplicado en cada una de las pruebas realizadas.

Los datos fueron obtenidos de los Cuadros 37, 45, 48 y 50 a 54 presentados en la sección de datos calculados.

Figura 12. Análisis de varianza (ANOVA) de un factor para determinación de diferencia significativa en la reducción de etanol entre pruebas

Resumen				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Prueba 1	3	9.874676269	3.291558756	0.453523219
Prueba 2	3	9.314572643	3.104857548	2.138504135
Prueba 3	3	10.6472589	3.549086299	7.884470067

ANOVA						
Fuente de variación	SS	df	MS	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.29851696	2	0.14925848	0.042740949	0.958448598	5.14325285
Dentro de grupos	20.95299484	6	3.492165807			
Total	21.2515118	8				

Nota. La prueba ANOVA se realizó utilizando la reducción total de etanol en cada una de las pruebas realizadas. Para ello, se consideraron los siguientes aspectos:

Nivel de significancia: 0.05

Hipótesis nula (H_0): $H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_i = 0$

Hipótesis alternativa (H_a): $H_1: \tau_i \neq 0$

Criterio de rechazo H_0 : $F_0 \geq F_{Crítico}$

VIII. Discusión de resultados

El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar la aplicación de *R. glutinis* para llevar a cabo la producción de cerveza artesanal sin alcohol utilizando un proceso de fermentación parcial con *S. cerevisiae*. Como parte del mismo, se realizó una prueba preliminar para determinar si la levadura *R. glutinis* realmente consumía el etanol presente en un medio de cultivo. Para ello, se evaluó el consumo de etanol en caldo Dextrosa Sabouraud y se obtuvieron resultados satisfactorios puesto que, como puede ser observado en el Cuadro 2 de la sección de resultados, la concentración de etanol disminuyó con respecto al tiempo. Específicamente, la concentración se redujo en un 3.632% (v/v) en un periodo de 4 días. Esto fue un indicador de que la levadura fue capaz de llevar a cabo la reducción de etanol en dicho medio y que posiblemente, podría llevar a cabo la reducción en un medio alterno como, por ejemplo, el mosto en un proceso de elaboración de cerveza. Cabe mencionar que, dado que en este último caso se esperaba que la concentración de etanol, es decir de sustrato, fuera mayor; se esperaba que la actividad enzimática de la enzima alcohol deshidrogenasa aumentara y fuera posible reducir aún más la concentración de etanol presente en el mosto.

Por otra parte, fue necesario propagar las levaduras utilizando técnicas microbiológicas para la obtención de inóculos iniciales a utilizar en dicho proceso. Como puede observarse en las Figuras 7 y 8 de la sección de resultados, la propagación de ambas levaduras fue exitosa, puesto que la concentración celular aumentó de forma significativa con respecto al tiempo. Esto quiere decir que ambas levaduras aprovecharon de forma adecuada los nutrientes del medio, tanto para mantenimiento como para reproducción celular. Específicamente, luego de 96 horas de propagación en caldo Dextrosa Sabouraud, las levaduras *S. cerevisiae* y *R. glutinis* alcanzaron una concentración de 90,000,000 y 75,750,000 células/mL en 500 mL de medio de cultivo, respectivamente. Cabe mencionar que, como puede ser observado en los Cuadros 3 y 4 de la sección de resultados, la concentración de *S. cerevisiae* inoculada en cada prueba fue de 1.130×10^{10} , 1.131×10^{10} y 1.131×10^{10} células/L, correspondientemente. De la misma manera, la concentración de *R. glutinis* inoculada en cada prueba fue de 9.751×10^9 , 9.777×10^9 y 9.779×10^9

células/L, correspondientemente. Esto quiere decir que, el número de células inoculadas en 3.785 L de mosto fue adecuado, puesto que todos los datos se encontraron dentro del rango recomendando de 7 a 12 millones de células/mL, es decir, entre 7×10^9 y 1.2×10^{10} células/L (Wyeast, 2021). Es importante destacar que, el rango recomendado corresponde a la concentración de *S. cerevisiae* que debería de inocularse para llevar a la producción de cerveza artesanal tipo IPA. Sin embargo, dado que *R. glutinis* no había sido utilizada para la elaboración de cerveza, no existen referencias bibliográficas sobre la concentración de levadura que debería ser inoculada, por lo que se utilizó el mismo rango de referencia que el de *S. cerevisiae*, como se ha utilizado al trabajar con otras levaduras especiales.

Además de los inóculos de levadura con concentración contralada, con el fin de estandarizar las especies y sus respectivas concentraciones en el mosto a fermentar, las cantidades de agua, malta y lúpulo utilizadas corresponden a una receta regulada por la American Homebrewers Association (AHA, por sus siglas en inglés) para la elaboración de una cerveza artesanal tipo IPA, como puede observarse en el Cuadro 5 de la sección de resultados. Por una parte, para proveer a la levadura *S. cerevisiae* de los nutrientes necesarios para llevar a cabo el proceso de fermentación alcohólica, se agregaron tres tipos de malta que contienen almidón y que, al atravesar el proceso de maceración, se transformaron en azúcares fermentables como maltosa, glucosa y fructosa que pudieron ser aprovechados como sustrato. Específicamente, la diversidad en tipos de malta (0.9 kg Malta Pale Ale, 45.4 g Malta Crystal y 90.8 g Malta Munich) y lúpulo (11.2 g lúpulo Centennial, 11.2 g lúpulo Cascade y 5.6 g lúpulo Columbus) se debe a que estos otorgan diferentes sabores, colores y olores a la cerveza, por lo que se consideran necesarios para elaborar este tipo en particular. En el caso del agua (7.4 L), fuera de la receta previamente mencionada, esta se modificó para alcanzar el perfil de dureza de agua en una IPA. Esto con el objetivo de aportar a la cerveza de las sales minerales necesarias para evitar un sabor falla y alcanzar las características organolépticas esperadas. Para ello, se adicionaron cantidades controladas de cloruro de calcio (3.998 g), sulfato de magnesio (6.906 g) y bicarbonato de sodio (0.873) de manera que fuese posible satisfacer el perfil de cada componente y aportar de forma positiva a las características sensoriales del producto final.

Con ello fue posible llevar a cabo tres procesos diferentes de fermentación parcial en donde la variante fue el tiempo de fermentación de cada una de las levaduras en el proceso. Tal y como se indica en el inciso F. de la sección de metodología, en el caso de la prueba 1, la levadura *S. cerevisiae* fermentó por 3 días y *R. glutinis* por 3 días, mientras que, en las pruebas 2 y 3, la

levadura *S. cerevisiae* fermentó por 4 y 2 días y *R. glutinis* por 2 y 4 días, respectivamente. Los procesos de fermentación parcial de cada una de estas pruebas se ilustran en las Figuras 9 a 11 de la sección de resultados. Como puede observarse, todos los procesos son similares en el sentido de que, durante la primera etapa, es decir, el periodo fermentativo de *S. Cerevisiae*, se observa un consumo de sustrato y una producción de etanol con respecto al tiempo, mientras que, luego de la inactivación de esta levadura y la inoculación de *R. glutinis*, se observa una leve reducción en la concentración de etanol y un leve estancamiento en el consumo de sustrato. Específicamente, aunque únicamente se tienen los datos iniciales y finales de la concentración de ambas levaduras y no se tienen datos con respecto al tiempo, se esperaría que las concentraciones de ambas levaduras tiendan a aumentar conforme avanzan los periodos de fermentación respectivos a cada una hasta llegar a la concentración final, la cual efectivamente fue mayor que la concentración inicial, como puede observarse en las Figuras 17 a 19 de la sección de anexos correspondientes a los balances de masa de los procesos de fermentación parcial. Si este es el caso, sería posible determinar que la relación entre crecimiento celular y formación de producto es de tipo asociado en el periodo de fermentación de *S. cerevisiae* y de tipo mixto asociado durante el periodo de fermentación de *R. glutinis*. Esto se debe a que, en el periodo de fermentación de *S. cerevisiae*, el producto se forma a la misma velocidad en la que se esperaría aumente la concentración celular, mientras que, en el periodo de fermentación de *R. glutinis*, el producto derivado del consumo de etanol aumenta a una velocidad diferente, más lenta específicamente, a la que se esperaría que aumente la concentración celular.

Lo anterior tiene sentido y va acorde a lo esperado puesto que, bajo condiciones anaerobias, *S. cerevisiae* puede llevar a cabo la conversión de azúcares en etanol por medio del proceso de fermentación alcohólica y es usual que durante las primeras 24 a 48 horas de fermentación, la levadura tenga mayor actividad puesto que este es considerado el periodo de fermentación primaria, por lo que se observa un consumo considerable del sustrato y una formación considerable del producto. Por otra parte, una vez inoculada *R. glutinis*, se esperaba que el consumo de azúcares fuese mínimo, lo cual se evidencia en el leve estancamiento que este tiene y que puede observarse en las figuras previamente mencionadas. Esto se debe a que, dado que la levadura es aeróbica y no puede llevar a cabo el proceso de fermentación alcohólica, se esperaba que el consumo de azúcares se diera puramente para satisfacer los requerimientos energéticos de la levadura y que el consumo de etanol se diera por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa para reducir la concentración de etanol y alcanzar el equilibrio entre las concentraciones de etanol y acetaldehído.

Sin embargo, como se indicó con anterioridad, tanto el consumo de azúcares como de etanol fue mínimo durante esta etapa del proceso, aunque el consumo de etanol fue ligeramente mayor que el consumo de azúcares lo que significa que la ruta metabólica de glucólisis no impide la ruta de consumo de etanol. Aunque si resulta relevante mencionar que, aunque una ruta no impide la otra, siempre y cuando la levadura no necesite consumir un sustrato, en este caso etanol, y sobrevivir a partir de ello, continuará llevando a cabo otras rutas que si le permitan hacerlo, como por ejemplo la glucólisis. Por ello, *R. glutinis* lleva a cabo el consumo de ambos sustratos y, de cierta manera, la ruta de glucólisis puede llegar a limitar, más no impedir, que el consumo de etanol sea mayor. Esto es un indicador de que a pesar de la capacidad que *R. glutinis* tiene para llevar a cabo la reducción de etanol en un medio, dicha reducción no será considerable mientras otros factores estén en juego. Por ejemplo, como fue mencionado anteriormente, el hecho de que se tengan múltiples sustratos en el medio o bien, que dado que la levadura no necesita de etanol para sobrevivir, haya una transferencia de masa ineficiente entre el sustrato y la enzima o incluso una baja actividad enzimática de la misma. A raíz de ello, podría ser que la enzima alcohol deshidrogenasa presente en esta levadura tenga una actividad enzimática limitada y que, por ende, esta se saturé rápidamente al incrementar la concentración de sustrato, contrario a lo que se esperaba inicialmente.

Esto explicaría el por qué sí se llevaron a cabo ambos procesos metabólicos de forma simultánea sin reducir de forma significativa la concentración de etanol. Por una parte, el consumo de azúcares para producir β -caroteno a manera de satisfacer las necesidades energéticas de la levadura y, por otra parte, el consumo de etanol para producir acetaldehído como puede observarse en las Figuras 5 y 4 del presente trabajo, respectivamente. Cabe mencionar que, a simple vista, es posible notar en el Cuadro 7 de la sección de resultados que la concentración de β -caroteno producida es significativamente mayor que la concentración de acetaldehído con lo cual no tendría lógica que el consumo de etanol haya sido mayor al consumo de azúcares. Sin embargo, resulta relevante recordar que el acetaldehído es únicamente un intermediario en el metabolismo del etanol y que este es rápidamente convertido a acetato, puesto que este último es un compuesto más estable, lo cual explica la diferencia entre el consumo de sustratos y la formación de productos.

Específicamente, como puede observarse en los Cuadros 6 y 7 de la sección de resultados, la reducción de etanol en las pruebas 1, 2 y 3 corresponde a 3.33, 3.11 y 3.54% (v/v), respectivamente. Dichas reducciones en la concentración de etanol permitieron obtener

cervezas cuyo ABV corresponde a 2.304, 3.458 y 3.180% respectivamente. A partir de ello es posible notar que con el procedimiento de fermentación parcial con el que se realizó cada prueba y derivado de la explicación previamente expuesta, no fue posible obtener una cerveza del tipo “sin alcohol”, puesto que esta se caracteriza por tener un ABV no mayor a 0.5%.

Sin embargo, utilizando técnicas de modificación genética como por ejemplo CRISPR/Cas9, sería posible alterar la actividad enzimática de la enzima alcohol deshidrogenasa, de forma que sea posible reducir la concentración de etanol en mayor medida y poder alcanzar el objetivo planteado. Por ejemplo, sería posible considerar el gen de enzima alcohol deshidrogenasa presente en el 90% de caucásicos, específicamente la variante correspondiente al gen *ADH1B*1* la cual ha mostrado tener alta actividad enzimática debido a una baja constante de afinidad al etanol como sustrato teniendo una K_M correspondiente a 0.05 mM (Edenberg, 2007). Tomando en considerando que esta modificación permitía convertir una mayor cantidad de etanol en acetaldehído, sería necesario considerar también la inserción del gen que codifica para la enzima aldehído deshidrogenasa presente en humanos, específicamente la variante *ALDH2*1*. Esta variante tiene alta actividad enzimática y es capaz de oxidar más del 90% producido por la oxidación del etanol, de manera que la acumulación de este compuesto tóxico no sería un problema (Gaviria, Correa y Navas, 2016). Sin embargo, es necesario tomar en cuenta además que estas alteraciones implicarían una acumulación considerable de acetato en el medio, lo cual tendría un efecto negativo a nivel sensorial y que debe evitarse. Por ello, sería necesario considerar una tercera alteración genética a manera de favorecer la actividad de la enzima acetil-CoA sintetasa presente en la levadura puesto que, de esta manera, el acetato sería convertido a acetil-CoA, por lo que no representaría un problema a nivel sensorial y, además, favorecería la producción de un compuesto de interés que es importante para satisfacer los requerimientos energéticos del microorganismo. Para ello, debe considerarse el gen que codifica para esta enzima, específicamente la variante *ACSS2* (Moffett *et al.*, 2020). Para llevar esto a cabo, sería necesario clonar los genes de interés, insertarlos en un plásmido y posteriormente expresarlos en el genoma de levadura. Cabe mencionar que, sería necesario realizar pruebas de actividad enzimática para corroborar que la modificación genética se llevó a cabo y que esta es lo suficientemente efectiva para llevar a cabo un proceso de este tipo.

De igual manera, tomando en cuenta la importancia de la maquinaria enzimática presente en la levadura, sería recomendable llevar a cabo un estudio enzimático que permita evaluar el efecto de añadir el cofactor NAD^+ en el medio. Esto debido a que, como puede observarse en

la Figura 4 del presente trabajo, en presencia de este cofactor, se favorece la conversión de etanol en acetaldehído, lo que podría tener un efecto positivo en el consumo de etanol. Sin embargo, sería relevante no solo evaluar el funcionamiento de esta alternativa, sino también el costo asociado a ella puesto que, al ser un cofactor, es un compuesto que tiende a tener un costo elevado, el cual debe ser estudiado para determinar si la alternativa es o no viable.

Por otra parte, sería posible aumentar la concentración de *R. glutinis* para indirectamente aumentar la concentración de enzima y posiblemente aumentar la cantidad de etanol que es metabolizado por la levadura. De esta forma, sería posible resolver el problema de forma relativamente sencilla, aunque sería necesario realizar pruebas para determinar el rango de concentración de levadura con el que se obtiene una mayor reducción en la concentración de etanol, si esta llegase a ser considerable.

Otro punto que vale la pena abarcar es que, si bien teóricamente no debería suceder, existe la posibilidad de que el proceso de que el tratamiento térmico no haya sido suficiente para inactivar a la levadura *S. cerevisiae*. Si este fuera el caso, explicaría por qué no hubo una reducción considerable en la concentración de etanol puesto que a medida que *R. glutinis* lo consumía, *S. cerevisiae* continuaba produciéndolo. Por ello, resultaría valioso llevar a cabo esta experimentación, pero monitoreando la actividad de *S. cerevisiae* luego del proceso de inactivación utilizando pruebas confirmatorias de tipo microbiológico para determinar si, en un medio de cultivo la levadura es capaz o no de aprovechar los nutrientes, es decir, si continúa viva y con capacidades de reproducción o si se logró el objetivo de inactivarla a manera de determinar si esto pudo haber tenido un efecto negativo en este proceso.

Como fue mencionado con anterioridad, no fue posible producir una cerveza sin alcohol a partir del proceso de fermentación propuesto utilizando la levadura especial *R. glutinis*. Sin embargo, sí fue posible caracterizar el producto final obtenido a manera de clasificarlo y compararlo contra los estándares característicos de una cerveza IPA. Por una parte, tal y como se expuso previamente y como puede observarse en el Cuadro 7 de la sección de resultados, en cuanto a contenido alcohólico para cada una de las pruebas realizadas se obtuvieron valores ABV de 2.304, 3.458 y 3.180%, respectivamente. A partir de ello, es posible clasificar la cerveza como tipo “light” puesto que todos los %ABV se encuentran entre 2 y 4%, a diferencia del contenido alcohólico de una cerveza artesanal IPA, el cual es de aproximadamente 5.9% (Loeschen, 2019).

Como se explicó previamente, el %ABV alcanzado se deriva directamente del metabolismo de etanol en la levadura *R. Glutinis*, puesto que, aunque en nivel muy bajos, fue posible para esta levadura consumir el etanol y transformarlo en acetaldehído. Específicamente, en el producto final de cada prueba se obtuvieron concentraciones de acetaldehído de 0.178, 0.122 y 0.253 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Cabe resaltar que todos son valores sumamente bajos que se encuentran por debajo del límite máximo diario de consumo y que, por ende, no representan ningún tipo de consecuencia ni riesgo de toxicidad para el consumidor siempre y cuando se monitoree la cantidad de bebida consumida. En dicha línea es importante agregar que, como fue mencionado anteriormente, es posible que se haya producido una mayor cantidad de acetaldehído derivado del consumo de etanol, sin embargo, gran parte de ello posiblemente se transformó a acetato, cuya concentración no es necesariamente relevante puesto que no es un compuesto tóxico y además es convertido a acetyl-CoA.

Por otra parte, derivado del consumo de azúcares como parte de la necesidad de satisfacer las necesidades energéticas de la levadura, las concentraciones de β -caroteno en el producto final de cada prueba corresponden a 134.068, 70.358 y 172.986 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Cabe resaltar que, de nuevo, todos los valores se encuentran dentro del rango recomendado diario de consumo y que, por ende, no representan ningún tipo de consecuencia para el consumidor siempre y cuando se monitoree la cantidad de bebida consumida. Aunque dicho compuesto se encuentra presente en concentraciones muy bajas que pueden parecer insignificantes, es un aporte al producto final y que puede ser de gran interés para los consumidores de bebidas saludables. Cabe mencionar que, si el enfoque fuese producir este compuesto en mayor cantidad, la idea de utilizar una cepa de *R. glutinis* que haya atravesado un proceso de modificación genética también podría ser una opción, puesto que permitiría obtener este compuesto valioso y de interés comercial con mejores rendimientos.

Es importante mencionar que, según los resultados experimentales obtenidos, los valores de reducción de etanol y concentración de acetaldehído y β -caroteno corresponden a lo esperado en cada prueba. Esto se debe a que, resulta lógico que, a mayor tiempo de fermentación de *R. Glutinis*, se dé un mayor consumo de etanol y una mayor producción de acetaldehído y β -caroteno por muy bajos que estos valores sean. Sin embargo, la significancia de los resultados obtenidos será evaluada posteriormente.

En cuanto a gravedad original y final, valor SRM, turbidez y grados IBU, fue posible comparar los valores correspondientes al producto final con los datos teóricos de una cerveza tipo IPA. Por ejemplo, como puede observarse en el Cuadro 7, la gravedad original corresponde a 1.048, 1.054 y 1.056 para cada una de las pruebas respectivamente, siendo la gravedad original de una IPA entre 1.04 y 1.06. En el caso de la gravedad final, esta corresponde a 1.030, 1.030 y 1.033 para cada una de las pruebas respectivamente, siendo la gravedad final de una IPA entre 1.01 y 1.02. A partir de ello es posible notar que, si bien la gravedad original de la cerveza producida en este trabajo es bastante similar, la gravedad final no lo es y esto puede deberse al proceso de fermentación parcial y a la introducción de una levadura especial puesto que esto tuvo un impacto directo en el consumo y concentración de azúcares fermentables en el mosto.

Por otra parte, en cuanto al valor SRM, el cual hace referencia a una escala de color de la cerveza, es posible notar que los valores obtenidos en el producto final de cada prueba corresponden a 7.796, 7.764 y 7.827, respectivamente. Dichos valores se encuentran por encima del rango teórico de una cerveza IPA, el cual es entre 6 y 7. Cabe mencionar que esto pudo haber ocurrido debido a la presencia de β -caroteno, puesto que, al ser pigmentos, pudieron haber tenido un impacto en el color del producto. En cuanto a la turbidez, los productos obtenidos se encontraban libres de turbidez, lo cual en el caso de una IPA depende de si esta desea o no ser filtrada.

Finalmente, en cuanto a los grados IBU, los cuales hacen referencia al grado de amargor derivado de los lúpulos adicionados, el valor obtenido corresponde a 96.007 y que, para una cerveza IPA típica se encuentra entre 70 y 80. Sin embargo, en este último punto es importante mencionar que dicha diferencia puede deberse a que los grados IBU de la cerveza producida en este trabajo fue determinada de forma teórica utilizando los datos correspondientes a cada lúpulo utilizado, incluyendo la cantidad, el porcentaje de α -ácidos y su porcentaje de utilización. Es posible que, de haber realizado una cuantificación experimental adecuada de este valor, este varíe en cierta medida y se asemeje más al valor esperado, puesto que es factible que el porcentaje de utilización real sea menor que el porcentaje de utilización teórico. Cabe mencionar que este porcentaje hace referencia a la eficiencia de isomerización de los α -ácidos con respecto al tiempo de cada lúpulo en el proceso de cocción (American Homebrewers Association, 2020).

Seguidamente, en cuanto al análisis de percepción realizado, este se llevó a cabo con el fin de determinar si la cerveza producida en cada una de las pruebas era del agrado del consumidor. Esto debido a que, como se mencionó anteriormente, uno de los principales inconvenientes al llevar a cabo la producción de cerveza sin alcohol es que, en muchas ocasiones, los métodos convencionales para llevar a cabo dicha producción interfieren con características sensoriales importantes y esto tiene un efecto en la aceptación general del producto por parte del consumidor. Específicamente, se evaluó la opinión del consumidor en cuanto al sabor y olor de la cerveza producida y esta se calificó sobre un total de 10 puntos. Como puede observarse en el Cuadro 7, para los productos de cada prueba se obtuvieron calificaciones de 7.167, 7.033 y 7.267 sobre 10, respectivamente. A pesar de no representar calificaciones completas, son bastante satisfactorias considerando el impacto a nivel sensorial que puede tener la elaboración de cerveza utilizando un proceso de fermentación parcial y, aún más, si se introducen levaduras especiales con las que no se ha trabajado, pues pueden generar una serie de compuestos que aporten características diferentes a las convencionales de una cerveza. Con ello en mente, los resultados obtenidos permiten interpretar que, si bien el producto no es perfecto, es del agrado del consumidor. Cabe mencionar que, sumado a lo previamente expuesto, uno de los factores que pudo haber influido en gran medida en las propiedades sensoriales del producto final es el hecho de que, como parte del proceso de fermentación parcial, fue necesario airear el mosto para proveer de oxígeno a *R. glutinis*. Esto es uno de los característicos sabores falla al momento de elaborar cerveza puesto que esta tiende a oxidarse y presentar sabores distintivos a cartón y/o papel, los cuales no son de agrado para el consumidor (Chaturvedi, 2019).

Un punto sumamente importante para considerar es que, si bien los datos muestran una reducción en la concentración de etanol con respecto al tiempo a partir de la inoculación de *R. glutinis*, los cuales fueron explicados y discutidos previamente; estadísticamente dichos datos no son significativos. Esto se debe a que, tal y como puede observarse en el Cuadro 6, la reducción es menor a la incertidumbre del método la cual fue determinada considerando la desviación estándar de los valores de las tres corridas correspondientes a cada prueba. Esto significa que, no hay forma de demostrar con certeza que dicha reducción se dio, puesto que podría ser parte del error del método. En este aspecto resulta relevante aclarar que el error del método puede provenir de diferentes fuentes como, por ejemplo, de la concentración celular inoculada la cual se deriva directamente del conteo celular realizado con una cámara de Neubauer o bien, de las condiciones de operación en los procesos de maceración y/o fermentación.

Tomando en cuenta las incertidumbres calculadas, las cuales se presentan en la sección de resultados, es posible determinar que la concentración celular inoculada en cada prueba no presenta una incertidumbre elevada, lo cual indica que este factor no debería de haber influido de forma considerable en los resultados obtenidos. Sin embargo, al observar las incertidumbres asociadas a los resultados de formación de producto obtenidos, es posible determinar que estas sí son considerables. Esto indica que es más probable que el error del método se derive, en mayor medida, de los procesos de maceración y/o fermentación. En este caso, es posible que pequeñas variaciones en la temperatura y/o tiempo o bien, un control inadecuado de los mismos en los procesos previamente mencionados, hayan tenido un impacto fuerte en la cantidad de sustrato consumido y en la cantidad de producto formado, lo cual generó un error grande que debe ser tomado en cuenta para validar los resultados obtenidos.

Por otra parte, es importante mencionar que al realizar un análisis de varianza de un factor (prueba ANOVA) con un nivel de significancia del 0.05, se determinó que no hay diferencia significativa entre las pruebas realizadas. Esto se debe a que, como puede observarse en la Figura 12 de la sección de resultados, el valor de F de la prueba es menor al $F_{\text{crítico}}$, por lo que no es posible rechazar la hipótesis nula, lo que significa que, bajo el nivel de significancia establecido, no hay diferencia entre los resultados de cada prueba. Esto significa que el tiempo de fermentación de cada levadura no tiene un efecto directo en la reducción en la concentración de etanol y que, por ende, una reducción o aumento en el mismo no alterará de forma significativa que tanto se reduce la concentración de etanol en el mosto, ni que tanto aumenta la concentración de acetaldehído y/o β -caroteno o bien, que tanto se alteran las características del producto final. Por ello, el aumentar el tiempo de fermentación de la levadura *R. glutinis* no resulta ser una recomendación factible ni razonable para aumentar el consumo de etanol.

Finalmente, tomando en consideración la relevancia del presente trabajo, esta recae en que permitió evaluar la ruta de fermentación parcial propuesta utilizando levaduras especiales. Hasta el momento, esta había sido una ruta no evaluada y, aunque bajo las condiciones trabajadas, no mostró ser exitosa; al considerar las modificaciones propuestas, aún podría brindar alternativas al proceso de diversificación de la industria cervecera en Guatemala.

IX. Conclusiones

1. En un medio de cultivo líquido Dextrosa Sabouraud y un periodo de propagación de 4 días a 120 rpm y 30°C para cada levadura, se alcanzaron concentraciones celulares para cada prueba realizada de 1.130×10^{10} , 1.131×10^{10} y 1.131×10^{10} células/L para *S. cerevisiae* y concentraciones de 9.751×10^9 , 9.777×10^9 y 9.779×10^9 células/L para *R. glutinis*. Estas concentraciones se encuentran dentro del rango teórico recomendado a utilizar en el proceso de fermentación alcohólica para la elaboración de cerveza artesanal tipo IPA.
2. Se utilizó una receta regulada por la American Homebrewers Association para la elaboración de cerveza artesanal tipo IPA y que incluye 7.4 L de agua destilada, 3.998 g de cloruro de calcio, 6.906 g de sulfato de magnesio, 0.873 g de bicarbonato de sodio, 0.9 kg de Malta Pale Ale, 45.4 g de Malta Crystal, 90.8 g de Malta Munich, 11.2 g de lúpulo Centennial, 11.2 g de lúpulo Cascade y 5.6 g de lúpulo Columbus.
3. Se llevó a cabo un proceso de fermentación parcial con *S. cerevisiae* y *R. glutinis* para la elaboración de cerveza artesanal, en el cual se observó que durante el periodo fermentativo de *S. cerevisiae* en cada prueba realizada se alcanzó una concentración de etanol 3.282, 3.578 y 3.295% (v/v) y, luego del periodo fermentativo de *R. glutinis*, se alcanzaron concentraciones de 2.304, 3.458 y 3.180% (v/v).
4. Con el proceso de fermentación parcial y, específicamente el periodo de fermentación de *R. glutinis*, fue posible reducir la concentración de etanol alcanzada por *S. cerevisiae* durante la primera etapa del proceso. En cada una de las pruebas realizadas, se obtuvieron reducciones de etanol de 3.33, 3.11 y 3.54% (v/v), las cuales permitieron obtener cervezas cuyo porcentaje ABV corresponde a 2.304, 3.458 y 3.180%, respectivamente, con lo que fue posible clasificarlas como tipo “light”.
5. La cerveza producida fue caracterizada en cuanto a la concentración de compuestos de interés como el acetaldehído y β -caroteno se determinó que para las tres pruebas realizadas las concentraciones de acetaldehído corresponden a 0.178, 0.122 y 0.253 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; mientras que las de β -caroteno corresponden a 134.068, 70.358 y 172.986 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Además, se realizó la caracterización en cuanto a gravedad

original y final, valor SRM, grados IBU y turbidez. Se determinó que los valores corresponden a 1.048, 1.054 y 1.056 para gravedad original; 1.030, 1.030 y 1.033 para gravedad final; 7.796, 7.764 y 7.827 para valor SRM; 96.007 para grados IBU y que las cervezas producidas se encontraron libres de turbidez. La mayoría de los valores se encuentran dentro del rango esperado de una cerveza artesanal tipo IPA, sin embargo, el proceso de fermentación parcial y la adición de una levadura especial hace que estos varíen en cierta medida. Finalmente, se analizó la percepción sensorial de posibles consumidores en cuanto al sabor y el olor de la cerveza producida en cada prueba. En promedio, se obtuvieron calificaciones por parte del consumidor de 7.167, 7.033 y 7.267 sobre 10 para cada prueba; lo cual representa el nivel proyectado de satisfacción por parte del consumidor considerando el impacto a nivel sensorial que puede tener la elaboración de cerveza utilizando un proceso de fermentación parcial con levaduras especiales.

X. Recomendaciones

1. Determinar la influencia que tiene la concentración celular de *R. glutinis* inoculada y las condiciones de reacción en la reducción de etanol en el medio fermentativo para evaluar si sería posible aumentar la concentración celular para indirectamente aumentar la concentración de enzima alcohol deshidrogenasa y posiblemente aumentar la cantidad de etanol que es metabolizado por la levadura.
2. Realizar un estudio de modificación genética utilizando la herramienta CRISPR/Cas9 para insertar los genes *ADH1B*1*, *ALDH2*1* y *ACSS2* correspondientes a las enzimas alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa y acetil-CoA sintetasa presentes en humanos en la levadura *R. glutinis* para determinar si con esto es posible lograr una reducción de etanol efectiva sin crear una bebida tóxica o con características organolépticas indeseables.
3. Realizar un estudio enzimático que permita evaluar el efecto de añadir el cofactor NAD⁺ en el medio para determinar si esto permite favorecer de forma significativa el consumo de etanol, tomando en consideración el costo asociado a la adición de este componente.
4. Debido al efecto positivo que el β -caroteno puede llegar a tener en una bebida de tipo comercial, resultaría valioso utilizar, de igual forma, herramientas de modificación genética o bien, una cepa de *R. glutinis* ya modificada que permita mejorar el rendimiento de este producto de interés.
5. Llevar a cabo un análisis de diferentes cepas de *R. glutinis* o bien, de otras especies de levadura con características similares a *R. glutinis* y evaluar su capacidad para reducir de forma efectiva la concentración de etanol presente en el medio.
6. Realizar una prueba confirmatoria de tipo microbiológico para determinar si, después del proceso de inactivación, la levadura *S. cerevisiae* es capaz de aprovechar los nutrientes en un medio de cultivo Dextrosa Sabouraud a manera de confirmar la actividad del microorganismo y poder evaluar el efecto de ello sobre la reducción de etanol en el medio.

XI. Bibliografía

- American Homebrewers Association. (2020). *Quarantine American IPA*. Extraído de: <https://www.homebrewersassociation.org/homebrew-recipe/quarantine-american-ipa/>
- Bartlett, J. (2022). *The best water profile for IPA beer*. Extraído de: <https://learningtohomebrew.com/the-best-water-profile-for-ipa-beer/>
- Bogacz, L. y Harasym, J. (2018). Beta-carotene production: properties and production methods. *Food quality and safety*, 2(2). Pp. 1-6.
- Brányik, T., Silva, D., Baszczyński, M., Lehnert, R. y Almeida e Silva, J. (2012). A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. *Journal of Food Engineering*, 108(4). Pp. 493-506.
- Catarino, M., Mendes, A., Madeira, L. y Ferreira, A. (2006). Beer dealcoholization by reverse osmosis. *Desalination*, 200(1-3). Pp. 397-399.
- Chaturvedi, K. (2019). *A review on types of off-flavor, their causes, effects on sensory attributes and how to cure them*. India: National Institute of Food Technology Entrepreneurship and Management.
- Edenberg, H. (2007). The Genetics of Alcohol Metabolism: Role of Alcohol Dehydrogenase and Aldehyde Dehydrogenase Variants. *Alcohol Research and Health*, 30(1). Pp. 5-13.
- Fact.MR. (s.f.). *Craft beer market*. Extraído de: <https://www.factmr.com/report/181/craftbeer-market>
- FDA. (2021). *Applications of the principles of the ICH M7 guideline to calculation of compound-specific acceptable intakes*. Extraído de: <https://www.fda.gov/media/157451/download>
- Fonseca, V. (2007). Breve historia de la cerveza. *Virtual Pro*, 64. Pp. 1-4.
- García, C. (2011). *Expresión de los genes involucrados en la síntesis de carotenoides en el fruto de tomate por la aplicación de oligogalaturónidos y ethephon*. Tesis de maestría. Centro de Investigación en alimentación y desarrollo.
- Gaviria, M., Correa, G. y Navas, M. (2016). Alcohol, cirrosis y predisposición genética. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 31(1).
- Guido, L. (2019). Brewing and craft beer. *Beverages*, 5(51). Pp. 1.

- Hall, M. (2007). *What's your IBU?* Extraído de: <https://www.homebrewersassociation.org/attachments/0000/2501/IBUs.pdf>
- HSIS. (s.f.). *Betacarotene*. Extraído de: <https://www.hsis.org/a-z-food-supplements/betacarotene/>
- Hughes, J. (2022). *How much alcohol is in non-alcoholic beer?* Extraído de: <https://thenutritioninsider.com/wellness/how-much-alcohol-is-in-non-alcoholic-beer/>
- Infinium Global Research. (2020). *Global Health Drinks Market: Consumer Behavior Analysis by Countries, Buying Pattern Analysis, Demographics, Trends Analysis, Survey Findings and Results, Leading Companies and Their Market Strategies*. Extraído de: <https://www.researchandmarkets.com/reports/5124676/global-health-drinks-market-consumer-behavior>
- Kochláňová, T., Kij, D., Kopecká, J., Kubizniakova, P. y Matoulková, D. (2016). Non-Saccharomyces yeasts and their importance in the brewing industry. *Kvasny prumysl*, 62(7–8). Pp. 206–214.
- Lavoie, J. (2020). *The beginner's guide to small-batch brewing*. Extraído de: <https://www.beercrafr.com/learn-to-brew-beer/>
- Lichtenthaler, H. y Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 4(3). Pp. 1-8.
- Lodolo, E., Kock, J., Axcell, B. y Brooks, M. (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Research*, 8(7). Pp. 1018-1036.
- Loeschen, D. (2019). *How is non-alcoholic beer made?* Extraído de: <https://www.mixerdirect.com/blogs/mixer-direct-blog/how-non-alcoholic-beer-is-made>
- Mayo Clinic. (s.f.). *Beta-carotene (oral route)*. Extraído de: <https://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/beta-carotene-oral-route/proper-use/drg-20066795>
- Moffett, J., Puthillathu, N., Vengilote, R., Jaworski, D. y Namboodiri, A. (2020). Acetate revisited: a key biomolecule at the nexus of metabolism. *Frontiers in Physiology*, 11(580167).
- Muller, C., Neves, L., Gomes, L., Guimaraes, M y Guesthi, G. (2020). Processes for alcohol-free beer production. *Food Sci. Biotechnol.*, 40(2). Pp. 273-281.
- Navrátil, M., Domény, Z., Sturdik, E. y Smogrovicová, D. (2002). Production of non-alcoholic beer using free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in tricarboxylic acid. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 35. Pp. 133-140.

- Nelson, D. y Cox, M. (2013). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6ta ed. Estados Unidos: W. H. Freeman and Company.
- Nzytech. (s.f.). *Acetaldehyde, UV method*. Extraído de: https://www.nzytech.com/files/brochures/AK0005_Acetaldehyde,%20UV%20method.pdf
- Palmer, J. (2001). *How to brew: ingredients methods, recipes and equipment for brewing at home*. California: Defenestrative Publishing Co.
- Pi, H., Anandharaj, M., Kao, Y., Lin, Y., Chang, J. y Li, W. (2018). Engineering the oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for simultaneous β -carotene and cellulase production. *Scientific Reports*, 8(10850).
- Reveron, I., Barreiro, J., Sandoval, A. (2003). Thermal Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* in Pilsen beer. *J. Inst. Brew.*, 109(2). Pp. 120-122.
- Shellhammer, T. (2009). *Beer Color*. Extraído de: <https://beerandbrewing.com/dictionary/xizZHSE4me/>
- Sohrabvandi, S., Razavi, S. H., Mousavi, S. M., Mortazavian, A., y Rezaei, K. (2009). Application of *Saccharomyces rouxii* for the Production of Non-alcoholic Beer. *Food Sci. Biotechnol.*, 18(5). Pp. 1132–1137.
- Statista. (2021). *Beer*. Extraído de: <https://www.statista.com/outlook/cmo/alcoholic-drinks/beer/worldwide>
- The Business Research Company. (2021). *Non-Alcoholic Beer Global Market Report 2021 - By Product (Alcohol Free, Low Alcohol), By Material (Malted Grains, Hops, Yeasts, Enzymes, Others), By Category (Plain, Flavored), By Distribution Channel (Store-Based, Non-Store-Based), COVID-19 Growth And Change*. Extraído de: <https://www.thebusinessresearchcompany.com/report/non-alcoholic-beer-global-market-report>
- VanTil, A. (s.f.). *Intermediate beer ingredients*. Extraído de: http://www.imperialbeverage.com/raisingthebar/coursework/BeerIntermediate/chapters/BeerIngredients_BegInt.pdf
- Williams and Marshall Strategy. (2020). *Guatemala: beer market and the impact of COVID-19 on it in the medium term*. Extraído de: <https://www.marketresearch.com/Williams-Marshall-Strategy-v4196/Guatemala-Beer-Impact-COVID-Medium-13621840/>
- Wyeast. (2021). *Professional pitch rate*. Extraído de: <https://wyeastlab.com/resource/professional-pitch-rate/>
- Zamora, F. (2009). *Biochemistry of alcoholic fermentation*. ISBN: 978-0-387-74116-1. Pp. 3-26.

XII. Anexos

A. Datos originales

Cuadro 8. Datos para la calibración del espectrofotómetro UV-VIS para concentración de *S. cerevisiae*

Tiempo (h)	Células/mL (± 1 célula/mL)	Densidad óptica a 600 nm (± 0.0001)
24	575,000	0.4470
48	656,000	0.5041
72	760,000	0.6245
96	900,000	0.7471

Nota. El número de células viables/mL en 500 mL de medio líquido Dextrosa Sabouraud a 120rpm y 30°C fue determinado utilizando una cámara de Neubauer cada 24 horas. El medio a utilizar en la cámara de Neubauer fue diluido en 1:100 y teñido con azul de metileno para la determinación de células viables.

Cuadro 9. Datos para la calibración del espectrofotómetro UV-VIS para concentración de *R. glutinis*

Tiempo (h)	Células/mL (± 1 célula/mL)	Densidad óptica a 600 nm (± 0.0001)
24	496,000	0.3670
48	558,000	0.4273
72	645,000	0.5082
96	757,500	0.6320

Nota. El número de células viables/mL en 500 mL de medio líquido Dextrosa Sabouraud a 120rpm y 30°C fue determinado utilizando una cámara de Neubauer cada 24 horas. El medio a utilizar en la cámara de Neubauer fue diluido en 1:100 y teñido con azul de metileno para la determinación de células viables.

Cuadro 10. Densidad óptica a 600 nm de *S. cerevisiae* en medio de cultivo Dextrosa Sabouraud utilizando un espectrofotómetro UV-VIS

Prueba	Corrida	Densidad óptica a 600 nm (± 0.0001)
1	1	0.7461
	2	0.7459
	3	0.7459
2	4	0.7475
	5	0.7475
	6	0.7464
3	7	0.7464
	8	0.7467
	9	0.7467

Nota. La densidad óptica del cultivo fue medido a las 96 horas desde la incubación, la cual se realizó a 30°C y 120 rpm en caldo Dextrosa Sabouraud.

Cuadro 11. Densidad óptica a 600 nm de *R. glutinis* en medio de cultivo Dextrosa Sabouraud utilizando un espectrofotómetro UV-VIS

Prueba	Corrida	Densidad óptica a 600 nm (± 0.0001)
1	1	0.6320
	2	0.6272
	3	0.6272
2	4	0.6305
	5	0.6305
	6	0.6312
3	7	0.6312
	8	0.6307
	9	0.6307

Nota. La densidad óptica del cultivo fue medido a las 96 horas desde la incubación, la cual se realizó a 30°C y 120 rpm en caldo Dextrosa Sabouraud.

Cuadro 12. Dureza del agua desmineralizada

Corrida	Dureza total (granos CaCO ₃ /gal ± 1 grano CaCO ₃ /gal)
1	> 0
2	> 0
3	> 0

Nota. La dureza del agua fue determinada con un kit HACH.

Cuadro 13. Concentración de etanol en el proceso de fermentación parcial

Prueba	Corrida	Tiempo (h ± 1 h)	Concentración etanol (% m/v) (g/100 mL ± 0.001 g/100 mL)
		0	0
		24	1.833
		48	1.877
	1	72	1.923
		96	1.918
		120	1.855
		144	1.845
		0	0
		24	1.765
		48	1.78
1	2	72	1.814
		96	1.761
		120	1.761
		144	1.759
		0	0
		24	1.752
		48	1.891
	3	72	1.902
		96	1.863
		120	1.851
		144	1.849

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración etanol (% m/v) (g/100 mL \pm 0.001 g/100 mL)
		0	0
		24	2.725
		48	2.767
	1	72	2.778
		96	2.781
		120	2.736
		144	2.733
		0	0
		24	2.883
		48	2.916
2	2	72	2.939
		96	2.949
		120	2.873
		144	2.862
		0	0
		24	2.6
		48	2.706
	3	72	2.727
		96	2.738
		120	2.642
		144	2.611
		0	0
		24	2.468
		48	2.684
	1	72	2.672
		96	2.663
		120	2.663
		144	2.66
		0	0
		24	2.429
		48	2.543
3	2	72	2.427

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración etanol (% m/v) (g/100 mL \pm 0.001 g/100 mL)
		96	2.426
		120	2.379
		144	2.378
		0	0
		24	2.332
		48	2.573
	3	72	2.56
		96	2.55
		120	2.551
		144	2.489

Notas. La concentración de etanol fue determinada por medio de HPLC utilizando una columna Hyplex H con detector IR.

La fermentación se realizó en condiciones anaeróbicas para el periodo fermentativo de *S. cerevisiae* y con periodos de aeración para el periodo de *R. glutinis*. En ambos casos, la fermentación se llevó a cabo a temperatura ambiente en un recipiente de 3.785 L.

Cuadro 14. Concentración de glucosa en el proceso de fermentación parcial

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración glucosa (% m/v) (g/100 mL \pm 0.001 g/100 mL)
		0	0.558
		24	0
		48	0
	1	72	0
		96	0
		120	0
		144	0
		0	0.549
		24	0
		48	0
1	2	72	0

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración glucosa (% m/v) (g/100 mL \pm 0.001 g/100 mL)	
		96		0
		120		0
		144		0
		0		0.545
		24		0
		48		0
	3	72		0
		96		0
		120		0
		144		0
		0		0.998
		24		0.012
		48		0.015
	1	72		0
		96		0
		120		0.013
		144		0.01
		0		0.852
		24		0.024
		48		0
2	2	72		0.014
		96		0.013
		120		0
		144		0
		0		0.872
		24		0.025
		48		0
	3	72		0
		96		0
		120		0
		144		0

Prueba	Corrida	Tiempo (h ± 1 h)	Concentración glucosa (% m/v) (g/100 mL ±
			0.001 g/100 mL)
		0	0.86
		24	0.024
		48	0.016
	1	72	0.017
		96	0.012
		120	0.013
		144	0.015
		0	0.729
		24	0.022
		48	0.014
3	2	72	0
		96	0
		120	0.024
		144	0.013
		0	0.823
		24	0.019
		48	0.024
	3	72	0.011
		96	0
		120	0
		144	0.016

Notas. La concentración de glucosa fue determinada por medio de HPLC utilizando una columna Hyplex H con detector IR.

La fermentación se realizó en condiciones anaeróbicas para el periodo fermentativo de *S. cerevisiae* y con periodos de aeración para el periodo de *R. glutinis*. En ambos casos, la fermentación se llevó a cabo a temperatura ambiente en un recipiente de 3.785 L.

Cuadro 15. Concentración de fructosa en el proceso de fermentación parcial

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración fructosa (% m/v) (g/100 mL \pm
			0.001 g/100 mL)
		0	0.116
		24	0
		48	0.163
	1	72	0.157
		96	0.152
		120	0.111
		144	0.112
		0	0.1
		24	0
		48	0.135
1	2	72	0.135
		96	0.135
		120	0.131
		144	0.131
		0	0.101
		24	0
		48	0.136
	3	72	0.135
		96	0.142
		120	0.131
		144	0.137
		0	0.255
		24	0.124
		48	0.119
	1	72	0.121
		96	0.107
		120	0.121
		144	0.118
		0	0.234
		24	0.139

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración fructosa (% m/v) (g/100 mL \pm
			0.001 g/100 mL)
2	2	48	0.135
		72	0.136
		96	0.133
		120	0.132
		144	0.115
	3	0	0.245
		24	0.128
		48	0.143
		72	0.145
		96	0.125
3	1	120	0.127
		144	0.116
		0	0.201
		24	0.09
		48	0.108
	2	72	0.075
		96	0.087
		120	0.063
		144	0.079
		0	0.172
3	2	24	0.116
		48	0.118
		72	0.117
		96	0.116
		120	0.117
	3	144	0.118
		0	0.191
		24	0.117
		48	0.125
		72	0.122
	3	96	0.122
		120	0.123

Prueba	Corrida	Tiempo (h ± 1 h)	Concentración fructosa (% m/v) (g/100 mL ± 0.001 g/100 mL)
		144	0.134

Notas. La concentración de fructosa fue determinada por medio de HPLC utilizando una columna Hyplex H con detector IR.

La fermentación se realizó en condiciones anaeróbicas para el periodo fermentativo de *S. cerevisiae* y con periodos de aeración para el periodo de *R. glutinis*. En ambos casos, la fermentación se llevó a cabo a temperatura ambiente en un recipiente de 3.785 L.

Cuadro 16. Concentración de maltosa en el proceso de fermentación parcial

Prueba	Corrida	Tiempo (h ± 1 h)	Concentración maltosa (% m/v) (g/100 mL ± 0.001 g/100 mL)
		0	2.895
		24	0.662
		48	0.182
	1	72	0.177
		96	0.172
		120	0.166
		144	0.163
		0	2.701
		24	0.621
		48	0.161
1	2	72	0.158
		96	0.157
		120	0.133
		144	0.126
		0	2.844
		24	0.692
		48	0.163
	3	72	0.159
		96	0.147
		120	0.158

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración maltosa (% m/v) (g/100 mL \pm
			0.001 g/100 mL)
		144	0.143
		0	4.25
		24	0.259
		48	0.26
	1	72	0.269
		96	0.28
		120	0.252
		144	0.254
		0	4.233
		24	0.304
		48	0.291
2	2	72	0.253
		96	0.241
		120	0.255
		144	0.26
		0	4.431
		24	0.298
		48	0.271
	3	72	0.249
		96	0.262
		120	0.259
		144	0.237
		0	4.864
		24	0.317
		48	0.248
	1	72	0.275
		96	0.256
		120	0.268
		144	0.214
		0	4.789
		24	0.287

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración maltosa (% m/v) (g/100 mL \pm
			0.001 g/100 mL)
3	2	48	0.266
		72	0.263
		96	0.259
		120	0.2
		144	0.19
	3	0	4.691
		24	0.479
		48	0.304
		72	0.276
		96	0.281
		120	0.276
		144	0.222

Notas. La concentración de maltosa fue determinada por medio de HPLC utilizando una columna Hyplex H con detector IR.

La fermentación se realizó en condiciones anaeróbicas para el periodo fermentativo de *S. cerevisiae* y con periodos de aeración para el periodo de *R. glutinis*. En ambos casos, la fermentación se llevó a cabo a temperatura ambiente en un recipiente de 3.785 L.

Cuadro 17. Lectura de absorbancia sin celda en el espectrofotómetro UV-VIS a diferentes longitudes de onda

Longitud de onda (nm \pm 1 nm)	Absorbancia (\pm 0.0001)
340	1.9508
430	0.7524
470	0.4919
600	-0.1174
700	-0.1467

Nota. La lectura de absorbancia sin celda en el espectrofotómetro UV-VIS fue tomada para llevar a cabo la corrección de valores por blanco.

Cuadro 18. Absorbancia a 340 nm de estándar de acetaldehído a diferentes concentraciones para preparación de curva de calibración

Concentración acetaldehído ($\mu\text{M} \pm 1 \mu\text{M}$)	Absorbancia a 340 nm (± 0.0001)
0	1.9807
18	2.1726
36	2.2238
60	2.4279

Nota. El estándar de acetaldehído fue almacenado a -20°C y diluido en agua ultrapura marca Merck para la preparación de estándares a diferentes concentraciones.

La lectura de absorbancia se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro UV-VIS.

Cuadro 19. Absorbancia del producto final a 340 nm para determinación de la concentración de acetaldehído

Prueba	Corrida	Absorbancia de blanco a 340 nm (± 0.0001)	Absorbancia de muestra a 340 nm (± 0.0001)
1	1	2.22838	2.5348
	2	2.2219	2.5333
	3	2.2231	2.5311
2	1	2.2817	2.5048
	2	2.2811	2.5039
	3	2.2825	2.5052
3	1	2.1726	2.5998
	2	2.1719	2.5945
	3	2.1725	2.5982

Notas. El producto final fue almacenado a 6°C hasta su utilización.

La lectura de absorbancia se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro UV-VIS.

La medición del blanco se llevó a cabo analizando el producto final sin presencia de la enzima aldehído deshidrogenasa, mientras que la medición de muestra se llevó a cabo analizando el producto final con la enzima aldehído deshidrogenasa. En ambos casos, la enzima, la solución NAD y el buffer fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.

Cuadro 20. Absorbancia a 470 nm de estándar de β -caroteno a diferentes concentraciones para preparación de curva de calibración

Concentración β -caroteno ($\mu\text{g/mL} \pm 1 \mu\text{g/mL}$)	Absorbancia a 470 nm (± 0.0001)
0	0.6824
50	1.0289
100	1.1542
225	1.3803
300	1.4483

Nota. El estándar de β -caroteno fue almacenado a -20°C y diluido en acetonitrilo marca Merck para la preparación de estándares a diferentes concentraciones.

La lectura de absorbancia se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro UV-VIS.

Cuadro 21. Absorbancia del producto final a 470 nm para determinación de la concentración de β -caroteno

Prueba	Corrida	Absorbancia de blanco a 470 nm (± 0.0001)
1	1	1.1753
	2	1.1751
	3	1.1749
2	1	1.0505
	2	1.0508
	3	1.0501
3	1	1.2511
	2	1.2509
	3	1.2517

Notas. El producto final fue almacenado a 6°C hasta su utilización.

La lectura de absorbancia se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro UV-VIS.

Cuadro 22. Absorbancia del producto final a 430 nm para determinación de valor SRM

Prueba	Corrida	Absorbancia de blanco a 430 nm (± 0.0001)
1	1	1.3601
	2	1.3632
	3	1.3754
2	1	1.3601
	2	1.3601
	3	1.3711
3	1	1.3777
	2	1.3683
	3	1.3601

Notas. El producto final fue almacenado a 6°C hasta su utilización.

La lectura de absorbancia se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro UV-VIS.

Cuadro 23. Absorbancia del producto final a 700 nm para determinación de turbidez

Prueba	Corrida	Absorbancia de blanco a 700 nm (± 0.0001)
1	1	-0.1556
	2	-0.1436
	3	-0.1389
2	1	-0.1392
	2	-0.1321
	3	-0.1331
3	1	-0.1533
	2	-0.1507
	3	-0.1535

Notas. El producto final fue almacenado a 6°C hasta su utilización.

La lectura de absorbancia se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro UV-VIS.

Cuadro 24. Porcentaje Brix de la muestra inicial y del producto final para determinación de gravedad original y final

Prueba	Corrida	% Brix muestra inicial (± 0.1)	% Brix producto final (± 0.1)
1	1	11.6	6.9
	2	11.9	7.5
	3	12.5	7.9
2	1	11.3	7.7
	2	15.5	8.3
	3	13.4	6.8
3	1	14.5	9.1
	2	13.33	8.4
	3	14.5	7.4

Notas. La muestra inicial y el producto final fueron almacenados a 6°C hasta su utilización. La lectura de absorbancia se llevó a cabo utilizando un refractómetro digital.

Cuadro 25. Percepción sensorial del consumidor en cuanto al sabor del producto final

Prueba	Corrida	No. Consumidor / Calificación (± 1)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	8	7	8	6	8	8	7	7	5	4
	2	9	8	9	7	9	6	8	4	7	5
	3	8	8	9	6	8	5	8	5	7	5
2	1	9	8	7	6	8	7	5	6	5	3
	2	9	8	8	7	9	7	5	7	6	6
	3	10	8	8	8	8	7	7	8	7	5
3	1	8	9	7	8	10	6	0	6	9	5
	2	8	9	8	8	9	7	6	7	9	3
	3	10	9	8	7	8	8	5	5	9	4

Notas. El producto final fue almacenado a 6°C hasta su utilización.

Se solicitó a los participantes del panel que calificaran el sabor del producto de 0 a 10, siendo 10 la nota más alta.

Cuadro 26. Percepción sensorial del consumidor en cuanto al olor del producto final

Prueba	Corrida	No. Consumidor / Calificación (± 1)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	10	6	9	6	9	8	7	7	8	8
	2	9	6	9	6	8	4	8	4	5	10
	3	9	6	9	7	8	5	8	6	6	10
2	1	8	6	7	8	8	7	7	5	4	10
	2	7	6	7	7	8	5	7	8	5	8
	3	9	6	7	9	7	7	8	7	6	6
3	1	8	6	6	8	8	7	1	7	9	10
	2	8	6	6	7	8	8	7	8	8	8
	3	9	6	7	8	8	7	7	8	8	9

Notas. El producto final fue almacenado a 6°C hasta su utilización.

Se solicitó a los participantes del panel que calificaran el sabor del producto de 0 a 10, siendo 10 la nota más alta.

Cuadro 27. Concentración celular de *S. cerevisiae* al finalizar su etapa en el proceso de fermentación parcial

Prueba	Número de células viables/mL (± 1 célula/mL)
1	372,500
2	457,500
3	295,000

Nota. La concentración celular fue determinada haciendo uso de la cámara de Neubauer en dilución 1:100 y tiñendo con azul de metileno para la determinación de células viables.

Cuadro 28. Concentración celular de *R. glutinis* al finalizar su etapa en el proceso de fermentación parcial

Prueba	Número de células viables/mL (± 1 célula/mL)
1	322,500
2	262,500
3	407,500

Nota. La concentración celular fue determinada haciendo uso de la cámara de Neubauer en dilución 1:100 y tiñendo con azul de metileno para la determinación de células viables.

Cuadro 29. Determinación de altura del agua a lo largo del proceso de preparación del mosto para determinación de grados IBU y balances de masa

Descripción	Altura (cm ± 0.1 cm)
Inicial	26
Post calentamiento del agua	25.9
Post absorción del grano	24.1
Post ebullición	13.3

Nota. La altura del agua fue medida con una regla en una hielera con radio de 9.5 cm.

B. Cálculos de muestra

Cálculo 1. Concentración de la levadura corregida por factor de dilución

$$[C]_c = [C] * f$$

$$[C]_c = 575,000 * 100$$

$$[C]_c = 57,500,000$$

En donde:

$[C]_c$ es la concentración de levadura corregida por el factor de dilución, en células/mL.

$[C]$ es la concentración de levadura, en células/mL.

f es el factor de dilución.

Este cálculo se repitió para cada dato de concentración de *S. cerevisiae* y de *R. glutinis* obtenido con la cámara de Neubauer.

Cálculo 2. Densidad óptica a 600 nm de la levadura corregida por blanco

$$DO_{600_c} = DO_{600} - DO_{600_b}$$

$$DO_{600_c} = 0.4470 - (-0.1174)$$

$$DO_{600_c} = 0.5644$$

En donde:

DO_{600_c} es la densidad óptica a 600 nm de levadura corregida por blanco.

DO_{600} es la lectura de densidad óptica a 600 nm de levadura.

DO_{600_b} es la lectura de densidad óptica a 600 nm del espectrofotómetro sin celda.

Este cálculo se repitió para cada dato de densidad óptica de *S. cerevisiae* y de *R. glutinis* obtenido con el espectrofotómetro UV-VIS.

Cálculo 3. Concentración de *S. cerevisiae* calculada a partir de curva de calibración

$$[Sc]_c = mx + b$$

$$[Sc]_c = 1 \times 10^8 * 0.8645 - 802363$$

$$[Sc]_c = 8.565 \times 10^7$$

En donde:

$[Sc]_c$ es la concentración de *S. cerevisiae* calculada a partir de la curva de calibración presentada en la Figura 13 de la sección de datos calculados, en células/mL.

m es la pendiente de la línea de tendencia presentada en la Figura 13 de la sección de datos calculados.

b es el intercepto de la línea de tendencia presentada en la Figura 13 de la sección de datos calculados.

x es la densidad óptica a 600 nm de levadura corregida por blanco.

Este cálculo se repitió para cada corrida.

Cálculo 4. Concentración de *R. glutinis* calculada a partir de curva de calibración

$$[Rg]_c = mx + b$$

$$[Rg]_c = 1 \times 10^8 * 0.7494 + 2 \times 10^6$$

$$[Rg]_c = 7.414 \times 10^7$$

En donde:

$[Rg]_c$ es la concentración de *R. glutinis* calculada a partir de la curva de calibración presentada en la Figura 14 de la sección de datos calculados, en células/mL.

m es la pendiente de la línea de tendencia presentada en la Figura 14 de la sección de datos calculados.

b es el intercepto de la línea de tendencia presentada en la Figura 14 de la sección de datos calculados.

x es la densidad óptica a 600 nm de levadura corregida por blanco.

Este cálculo se repitió para cada corrida.

Cálculo 5. Número de células en 500 mL de caldo Dextrosa Sabouraud

$$N_c = [l] * 500$$

$$N_c = 8.565 \times 10^7 * 500$$

$$N_c = 4.282 \times 10^{10}$$

En donde:

N_c es el número de células de levadura, en células.

$[l]$ es la concentración de levadura correspondiente a los cálculos de $[Sc]_c$ o $[Rg]_c$, en células/mL.

Este cálculo se repitió para ambas levaduras en cada corrida.

Cálculo 6. Concentración de levadura en mosto

$$[l]_f = \frac{N_c}{3.785 L}$$

$$[l]_f = \frac{4.282 \times 10^{10}}{3.785 L}$$

$$[l]_f = 1.131 \times 10^{10}$$

En donde:

$[l]_f$ es la concentración final de levadura inoculada en el mosto, en células/L.

Este cálculo se repitió para ambas levaduras en cada corrida.

Nota. Se corroboró que este dato se encontrará entre 7×10^9 y 1.2×10^{10} células/L.

Cálculo 7. Cantidad de HCO_3^- a agregar al agua desmineralizada

$$m_{HCO_3^-} = \frac{C_{rHCO_3^-}}{C_{HCO_3^-}} * \frac{V_f}{V_c}$$
$$m_{HCO_3^-} = \frac{42}{191} * \frac{7.4}{3.785}$$
$$m_{HCO_3^-} = 0.429$$

En donde:

$m_{HCO_3^-}$ es la cantidad de HCO_3^- a agregar al agua desmineralizada, en g.

$C_{rHCO_3^-}$ es la concentración requerida de HCO_3^- en una cerveza IPA, en ppm.

$C_{HCO_3^-}$ es la concentración de HCO_3^- en 1 gramo de $NaHCO_3$, en ppm/g.

V_f es el volumen final de agua a utilizar en la preparación del mosto, en L.

V_c es la conversión de volumen en 1 galón, en L.

Cálculo 8. Cantidad de Na^+ a agregar al agua desmineralizada

$$m_{Na^+} = \frac{C_{rNa^+}}{C_{Na^+}} * \frac{V_f}{V_c}$$
$$m_{Na^+} = \frac{17}{75} * \frac{7.4}{3.785}$$
$$m_{Na^+} = 0.443$$

En donde:

m_{Na^+} es la cantidad de Na^+ a agregar al agua desmineralizada, en g.

C_{rNa^+} es la concentración requerida de Na^+ en una cerveza IPA, en ppm.

C_{Na^+} es la concentración de Na^+ en 1 gramo de $NaHCO_3$, en ppm/g.

Cálculo 9. Cantidad de $NaHCO_3$ a agregar al agua desmineralizada

$$m_{NaHCO_3} = m_{HCO_3^-} + m_{Na^+}$$
$$m_{NaHCO_3} = 0.429 + 0.443$$
$$m_{NaHCO_3} = 0.873$$

En donde:

m_{NaHCO_3} es la cantidad de $NaHCO_3$ a agregar al agua desmineralizada, en g.

Cálculo 10. Cantidad de Cl^- a agregar al agua desmineralizada

$$m_{Cl^-} = \frac{\frac{C_{rCl^-}}{C_{Cl^-}} * 100}{\frac{M_{CaCl_2}}{M_{CaCl_2 * 2H_2O}} * 100} * \frac{V_f}{V_c}$$
$$m_{Cl^-} = \frac{\frac{80}{72} * 100}{\frac{110.98}{147.02} * 100} * \frac{7.4}{3.785}$$
$$m_{Cl^-} = 2.896$$

En donde:

m_{Cl^-} es la cantidad de Cl^- a agregar al agua desmineralizada, en g.

C_{rCl^-} es la concentración requerida de Cl^- en una cerveza IPA, en ppm.

C_{Cl^-} es la concentración de Cl^- en 1 gramo de $CaCl_2$, en ppm/g.

M_{CaCl_2} es la masa molecular de $CaCl_2$, en g/mol.

$M_{CaCl_2 * 2H_2O}$ es la masa molecular de $CaCl_2 * 2H_2O$, en g/mol.

Cálculo 11. Cantidad de Ca^{+2} a agregar al agua desmineralizada

$$m_{Ca^{2+}} = \frac{\frac{C_{rCa^{2+}}}{C_{Ca^{2+}}} * 100}{\frac{M_{CaCl_2}}{M_{CaCl_2 * 2H_2O}} * 100} * \frac{V_f}{V_c}$$
$$m_{Ca^{2+}} = \frac{\frac{55}{127} * 100}{\frac{110.98}{147.02} * 100} * \frac{7.4}{3.785}$$
$$m_{Ca^{2+}} = 1.129$$

En donde:

$m_{Ca^{2+}}$ es la cantidad de Ca^{2+} a agregar al agua desmineralizada, en g.

$C_{rCa^{2+}}$ es la concentración requerida de Ca^{2+} en una cerveza IPA, en ppm.

$C_{Ca^{2+}}$ es la concentración de Ca^{2+} en 1 gramo de $CaCl_2$, en ppm/g.

Cálculo 12. Cantidad de $CaCl_2 * 2H_2O$ a agregar al agua desmineralizada

$$m_{CaCl_2 \cdot 2H_2O} = m_{Cl^-} + m_{Ca^{2+}}$$

$$m_{CaCl_2 \cdot 2H_2O} = 2.896 + 1.129$$

$$m_{CaCl_2 \cdot 2H_2O} = 3.998$$

En donde:

$m_{CaCl_2 \cdot 2H_2O}$ es la cantidad de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ a agregar al agua desmineralizada, en g.

Cálculo 13. Cantidad de SO_4^{-2} a agregar al agua desmineralizada

$$m_{SO_4^{-2}} = \frac{\frac{C_{rSO_4^{-2}}}{C_{SO_4^{-2}}} * 100}{\frac{M_{MgSO_4 \cdot 7H_2O}}{M_{MgSO_4 \cdot 7H_2O}} * 100} * \frac{V_f}{V_c}$$

$$m_{SO_4^{-2}} = \frac{\frac{7}{26} * 100}{\frac{120.37}{246.48} * 100} * \frac{7.4}{3.785}$$

$$m_{SO_4^{-2}} = 1.078$$

En donde:

$m_{SO_4^{-2}}$ es la cantidad de SO_4^{-2} a agregar al agua desmineralizada, en g.

$C_{rSO_4^{-2}}$ es la concentración requerida de SO_4^{-2} en una cerveza IPA, en ppm.

$C_{SO_4^{-2}}$ es la concentración de SO_4^{-2} en 1 gramo de $MgSO_4$, en ppm/g.

M_{MgSO_4} es la masa molecular de $MgSO_4$, en g/mol.

$M_{MgSO_4 \cdot 7H_2O}$ es la masa molecular de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, en g/mol.

Cálculo 14. Cantidad de Mg^{+2} a agregar al agua desmineralizada

$$m_{Mg^{+2}} = \frac{\frac{C_{rMg^{+2}}}{C_{Mg^{+2}}} * 100}{\frac{M_{MgSO_4 \cdot 7H_2O}}{M_{MgSO_4 \cdot 7H_2O}} * 100} * \frac{V_f}{V_c}$$

$$m_{Mg^{+2}} = \frac{\frac{150}{103} * 100}{\frac{120.37}{246.48} * 100} * \frac{7.4}{3.785}$$

$$m_{Mg^{+2}} = 5.834$$

En donde:

$m_{Mg^{+2}}$ es la cantidad de Mg^{+2} a agregar al agua desmineralizada, en g.

$C_{rMg^{+2}}$ es la concentración requerida de Mg^{+2} en una cerveza IPA, en ppm.

$C_{Mg^{+2}}$ es la concentración de Mg^{+2} en 1 gramo de $CaCl_2$, en ppm/g.

Cálculo 15. Cantidad de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a agregar al agua desmineralizada

$$m_{MgSO_4 \cdot 7H_2O} = m_{SO_4^{-2}} + m_{Mg^{+2}}$$

$$m_{MgSO_4 \cdot 7H_2O} = 1.078 + 5.834$$

$$m_{MgSO_4 \cdot 7H_2O} = 6.906$$

En donde:

$m_{MgSO_4 \cdot 7H_2O}$ es la cantidad de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a agregar al agua desmineralizada, en g.

Cálculo 16. Concentración (% v/v) de etanol

$$[E]_{(\% \frac{v}{v})} = \frac{[E]_{(\% \frac{m}{v})}}{\rho_E}$$

$$[E]_{(\% \frac{v}{v})} = \frac{1.833}{0.789}$$

$$[E]_{(\% \frac{v}{v})} = 2.323$$

En donde:

$[E]_{(\% \frac{v}{v})}$ es la concentración de etanol en el mosto, en mL/100 mL.

$[E]_{(\% \frac{m}{v})}$ es la concentración de etanol en el mosto, en g/100 mL.

ρ_E es la densidad de etanol, en g/mL.

Este cálculo se repitió para cada valor de etanol obtenido.

Cálculo 17. Concentración (% v/v) de glucosa

$$[G]_{(\% \frac{v}{v})} = \frac{[G]_{(\% \frac{m}{v})}}{\rho_G}$$

$$[G]_{(\% \frac{v}{v})} = \frac{0.558}{1.56}$$

$$[G]_{(\% \frac{v}{v})} = 0.358$$

En donde:

$[G]_{(\% \frac{v}{v})}$ es la concentración de glucosa en el mosto, en mL/100 mL.

$[G]_{(\% \frac{m}{v})}$ es la concentración de glucosa en el mosto, en g/100 mL.

ρ_G es la densidad de glucosa, en g/mL.

Este cálculo se repitió para cada valor de glucosa obtenido.

Cálculo 18. Concentración (% v/v) de maltosa

$$[M]_{(\% \frac{v}{v})} = \frac{[M]_{(\% \frac{m}{v})}}{\rho_M}$$

$$[M]_{(\% \frac{v}{v})} = \frac{2.895}{1.54}$$

$$[M]_{(\% \frac{v}{v})} = 1.879$$

En donde:

$[M]_{(\% \frac{v}{v})}$ es la concentración de maltosa en el mosto, en mL/100 mL.

$[M]_{(\% \frac{m}{v})}$ es la concentración de maltosa en el mosto, en g/100 mL.

ρ_M es la densidad de maltosa, en g/mL.

Este cálculo se repitió para cada valor de maltosa obtenido.

Cálculo 19. Concentración (% v/v) de fructosa

$$[F]_{(\% \frac{v}{v})} = \frac{[F]_{(\% \frac{m}{v})}}{\rho_F}$$

$$[F]_{(\% \frac{v}{v})} = \frac{0.116}{1.69}$$

$$[F]_{(\% \frac{v}{v})} = 0.069$$

En donde:

$[F]_{(\% \frac{v}{v})}$ es la concentración de fructosa en el mosto, en mL/100 mL.

$[F]_{(\% \frac{m}{v})}$ es la concentración de fructosa en el mosto, en g/100 mL.

ρ_F es la densidad de fructosa, en g/mL.

Este cálculo se repitió para cada valor de fructosa obtenido.

Cálculo 20. Concentración (% v/v) de azúcares fermentables

$$[AF]_{(\% \frac{v}{v})} = [G]_{(\% \frac{v}{v})} + [M]_{(\% \frac{v}{v})} + [F]_{(\% \frac{v}{v})}$$

$$[AF]_{(\% \frac{v}{v})} = 0.358 + 1.879 + 0.069$$

$$[AF]_{(\% \frac{v}{v})} = 2.306$$

En donde:

$[AF]_{(\% \frac{v}{v})}$ es la concentración de azúcares fermentables en el mosto, en mL/100 mL.

Este cálculo se repitió para cada corrida.

Cálculo 21. Corrección de lecturas de absorbancia a 340 nm por blanco

$$A_{340_c} = A_{340} - A_{340_b}$$

$$A_{340_c} = 1.9807 - 1.9508$$

$$A_{340_c} = 0.0299$$

En donde:

A_{340_c} es la absorbancia a 340 nm del producto final corregido por blanco.

A_{340} es la lectura de absorbancia a 340 nm del producto final.

A_{340_b} es la lectura de absorbancia a 340 nm del espectrofotómetro sin celda.

Este cálculo se repitió para cada corrida.

Cálculo 22. Concentración de acetaldehído en el producto final calculado a partir de curva de calibración

$$[A] = (m(A_m - A_b) + b) * \frac{M_A}{1000}$$

$$[A] = (146.84(0.5840 - 0.2730) - 4.9835) * \frac{4.4}{1000}$$

$$[A] = 0.1790$$

En donde:

$[A]$ es la concentración de acetaldehído en el producto final calculada a partir de la curva de calibración presentada en la Figura 15 de la sección de datos calculados, en $\mu\text{g/mL}$.

m es la pendiente de la línea de tendencia presentada en la Figura 15 de la sección de datos calculados.

b es el intercepto de la línea de tendencia presentada en la Figura 15 de la sección de datos calculados.

A_m es la absorbancia a 340 nm del producto final corregida.

A_b es la absorbancia a 340 nm del producto final como blanco corregida.

M_A es la masa molecular del acetaldehído en $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$.

Este cálculo se repitió para cada corrida.

Cálculo 23. Corrección de lecturas de absorbancia a 470 nm por blanco

$$A_{470_c} = A_{470} - A_{470_b}$$

$$A_{470_c} = 0.6824 - 0.4919$$

$$A_{470_c} = 0.1905$$

En donde:

A_{470_c} es la absorbancia a 470 nm del producto final corregido por blanco.

A_{470} es la lectura de absorbancia a 470 nm del producto final.

A_{470_b} es la lectura de absorbancia a 470 nm del espectrofotómetro sin celda.

Este cálculo se repitió para cada corrida.

Cálculo 24. Concentración de β -caroteno en el producto final calculado a partir de curva de calibración

$$[B] = mx + b$$

$$[B] = (511.18 * 0.4929) - 117.79$$

$$[B] = 134.17$$

En donde:

$[B]$ es la concentración de β -caroteno en el producto final calculada a partir de la curva de calibración presentada en la Figura 16 de la sección de datos calculados, en $\mu\text{g/mL}$.
 m es la pendiente de la línea de tendencia presentada en la Figura 16 de la sección de datos calculados.

b es el intercepto de la línea de tendencia presentada en la Figura 16 de la sección de datos calculados.

x es la absorbancia a 470 nm del producto final corregida.

Este cálculo se repitió para cada corrida.

Cálculo 25. Corrección de lecturas de absorbancia a 430 nm por blanco

$$A_{430_c} = A_{430} - A_{430_b}$$

$$A_{430_c} = 1.3601 - 0.7524$$

$$A_{430_c} = 0.6077$$

En donde:

A_{430_c} es la absorbancia a 430 nm del producto final corregido por blanco.

A_{430} es la lectura de absorbancia a 430 nm del producto final.

A_{430_b} es la lectura de absorbancia a 430 nm del espectrofotómetro sin celda.

Este cálculo se repitió para cada corrida.

Cálculo 26. Cálculo valor SRM para determinación de color en el producto final

$$SRM = A_{430_c} * 12.7$$

$$SRM = 0.6077 * 12.7$$

$$SRM = 7.718$$

En donde:

SRM es el valor correspondiente a la escala de color en el producto final.

Este cálculo se repitió para cada corrida.

Cálculo 27. Corrección de lecturas de absorbancia a 700 nm por blanco

$$A_{700_c} = A_{700} - A_{700_b}$$

$$A_{700_c} = -0.1556 - (-0.1467)$$

$$A_{700_c} = -0.0089$$

En donde:

A_{700_c} es la absorbancia a 700 nm del producto final corregido por blanco.

A_{700} es la lectura de absorbancia a 700 nm del producto final.

A_{700_b} es la lectura de absorbancia a 700 nm del espectrofotómetro sin celda.

Este cálculo se repitió para cada corrida.

Cálculo 28. Determinación de turbidez en el producto final

$$T = A_{430_c} * 0.039$$

$$T = 0.6077 * 0.039$$

$$T = 0.0237$$

En donde:

T es la turbidez del producto final.

Nota. Si el valor de turbidez calculado es mayor o igual que el valor de absorbancia a 700 nm (A_{700_c}), se considera que la muestra se encuentra libre de turbidez.

Este cálculo se repitió para cada corrida.

Cálculo 29. Determinación de gravedad original en el mosto

$$G_0 = 1 + \frac{\%Brix_0 * 4}{1000}$$

$$G_0 = 1 + \frac{11.6 * 4}{1000}$$

$$G_0 = 1.046$$

En donde:

G_0 es la gravedad original del mosto.

$\%Brix_0$ es el porcentaje Brix inicial del mosto.

Este cálculo se repitió para cada corrida.

Cálculo 30. Determinación de gravedad final en el producto final

$$G_f = 1 + \frac{\%Brix_f * 4}{1000}$$

$$G_f = 1 + \frac{6.9 * 4}{1000}$$

$$G_f = 1.028$$

En donde:

G_f es la gravedad final del mosto.

$\%Brix_f$ es el porcentaje Brix final del mosto.

Este cálculo se repitió para cada corrida.

Cálculo 31. Volumen de mosto según altura

$$V = \pi * r^2 * h * 1000$$

$$V = \pi * \left(\frac{9.5}{100}\right)^2 * \frac{26}{100} * 1000$$

$$V = 7.37$$

En donde:

V es el volumen del mosto, en L.

r es el radio de la hielera donde se realizó la medición, en cm.

h es la altura del mosto dentro de la hielera, en cm.

Este cálculo se repitió para cada altura medida a lo largo del proceso de preparación del mosto.

Cálculo 32. Cálculo de grados IBU lúpulo Cascade

$$IBU_{Ca} = \frac{(m_1 * \%AA * \%U)}{V_3 * 10} + \frac{(m_2 * \%AA * \%U)}{(V_3 - \left(\frac{(V_3 - V_4)}{BT_T} * (BT_1 - BT_2)\right)) * 10}$$
$$IBU_{Ca} = \frac{(5.6 * 6.3 * 30)}{6.83 * 10} + \frac{(5.6 * 6.3 * 30)}{(6.83 - \left(\frac{(6.83 - 3.77)}{65} * (65 - 55)\right)) * 10}$$
$$IBU_{Ca} = 32.13$$

En donde:

IBU_{Ca} son los grados IBU correspondientes al lúpulo Cascade.

m_1 es el peso de la primera adición de lúpulo Cascade, en g.

m_2 es el peso de la primera adición de lúpulo Cascade, en g.

$\%AA$ es el porcentaje de α -ácidos en el lúpulo.

$\%U$ es el porcentaje de utilización del lúpulo dependiendo de su tiempo en ebullición.

V_3 es el volumen del mosto previo al periodo de ebullición, en L.

V_4 es el volumen del mosto posterior al periodo de ebullición, en L.

BT_1 es el tiempo en ebullición de la primera adición de lúpulo Cascade, en min.

BT_2 es el tiempo en ebullición de la segunda adición de lúpulo Cascade, en min.

Este cálculo se repitió para cada lúpulo adicionado según sus respectivos pesos, tiempos de ebullición, volumen del mosto, $\%AA$ y $\%$ de utilización.

Cálculo 33. Cálculo de grados IBU

$$IBU = IBU_{Ca} + IBU_{Ce} + IBU_{Co}$$

$$IBU = 32.13 + 53.54 + 10.34$$

$$IBU = 96$$

En donde:

IBU son los grados IBU totales.

IBU_{Ce} son los grados IBU correspondientes al lúpulo Centennial.

IBU_{Co} son los grados IBU correspondientes al lúpulo Columbus.

Cálculo 34. Reducción etanol

$$R_E = \frac{[E]_{(\%v/v)_n} - [E]_{(\%v/v)_{n+1}}}{[E]_{(\%v/v)_n}}$$

$$R_E = \frac{2.382 - 2.341}{2.382} * 100$$

$$R_E = 1.72$$

En donde:

R_E es la reducción en etanol diaria desde el momento de inoculación de *R. glutinis*, en % (v/v).

n es el día.

Este cálculo se repitió para cada corrida.

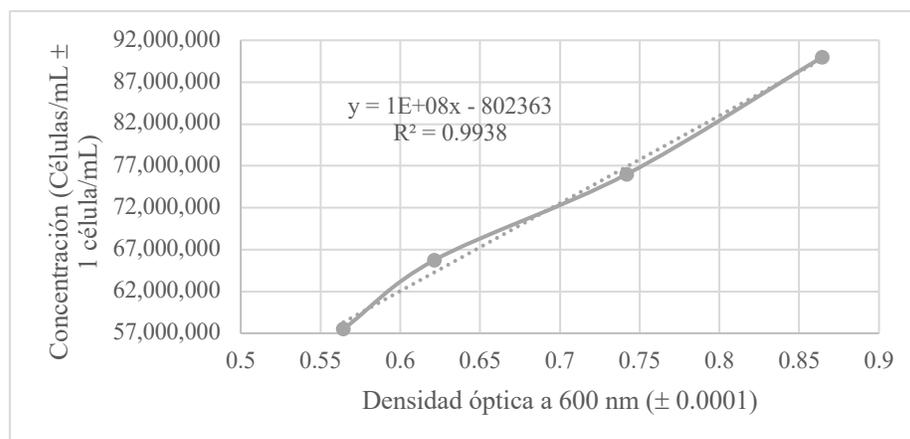
C. Datos calculados

Cuadro 30. Datos de *S. cerevisiae* utilizados para curva de calibración

Tiempo (h)	Número de células viables/mL (± 1 célula/mL)	Densidad óptica a 600 nm (± 0.0001)
24	57,500,000	0.5644
48	65,750,000	0.6215
72	76,000,000	0.7419
96	90,000,000	0.8645

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en los Cuadros 8 y 17 de la sección de datos originales y los Cálculos 1 y 2 de la sección de cálculos de muestra.

Figura 13. Curva de calibración para determinación de concentración de *S. cerevisiae* a partir de lectura de absorbancia a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS



Nota. La curva fue construida utilizando los datos presentados en el Cuadro 30 de la sección de datos calculados.

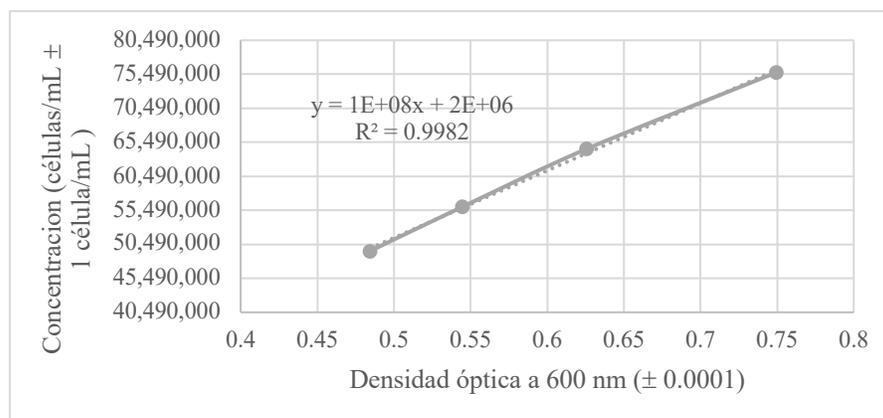
Las líneas entre los puntos son utilizadas para mejorar la percepción de tendencia con una curva suave.

Cuadro 31. Datos de *R. glutinis* utilizados para curva de calibración

Tiempo (h)	Número de células viables/mL (± 1 célula/mL)	Densidad óptica a 600 nm (± 0.0001)
24	49,500,000	0.4844
48	56,000,000	0.5447
72	64,500,000	0.6256
96	75,750,000	0.7494

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en los Cuadros 9 y 17 de la sección de datos originales y los Cálculos 1 y 2 de la sección de cálculos de muestra.

Figura 14. Curva de calibración para determinación de concentración de *R. glutinis* a partir de lectura de absorbancia a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS



Nota. La curva fue construida utilizando los datos presentados en el Cuadro 31 de la sección de datos calculados.

Las líneas entre los puntos son utilizadas para mejorar la percepción de tendencia con una curva suave.

Cuadro 32. Concentración de *S. cerevisiae* calculada con curva de calibración por corrida

Prueba	Corrida	Densidad óptica a 600 nm (± 0.0001)	Número de células viables/mL (± 1 célula/mL)
1	1	0.8645	85647637
	2	0.8633	85527637
	3	0.8633	85527637
2	1	0.8649	85687637
	2	0.8649	85687637
	3	0.8638	85577637
3	1	0.8638	85577637
	2	0.8641	85607637
	3	0.8641	85607637

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en el Cuadro 10 de la sección de datos originales, el Cálculo 2 de la sección de cálculos de muestra y la ecuación de la recta presentada en la Figura 13 de la sección de datos calculados.

Cuadro 33. Número de células de *S. cerevisiae* inoculadas por corrida

Prueba	Corrida	Concentración (células/L)	Promedio	Desviación estándar	Incertidumbre (%)
1	1	1.131x10 ¹⁰	1.130x10 ¹⁰	9.152x10 ⁶	0.081
	2	1.130x10 ¹⁰			
	3	1.130x10 ¹⁰			
2	1	1.132x10 ¹⁰	1.131x10 ¹⁰	8.390x10 ⁶	0.074
	2	1.132x10 ¹⁰			
	3	1.131x10 ¹⁰			
3	1	1.131x10 ¹⁰	1.131x10 ¹⁰	2.288x10 ⁶	0.02
	2	1.131x10 ¹⁰			
	3	1.131x10 ¹⁰			

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en el Cuadro 32 de la sección de datos calculados, los Cálculos 5 y 6 de la sección de cálculos de muestra y los Cálculos 35 a 37 de la sección de análisis de error.

Cuadro 34. Concentración de *R. glutinis* calculada con curva de calibración por corrida

Prueba	Corrida	Densidad óptica a 600 nm (± 0.0001)	Número de células viables/mL (± 1 célula/mL)
1	1	0.7494	74137637
	2	0.7446	73657637
	3	0.7446	73657637
2	1	0.7479	73987637
	2	0.7479	73987637
	3	0.7486	74057637
3	1	0.7486	74057637
	2	0.7481	74007637
	3	0.7481	74007637

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en el Cuadro 11 de la sección de datos originales, el Cálculo 2 de la sección de cálculos de muestra y la ecuación de la recta presentada en la Figura 14 de la sección de datos calculados.

Cuadro 35. Número de células de *R. glutinis* inoculadas por corrida

Prueba	Corrida	Concentración (células/L)	Promedio	Desviación estándar	Incertidumbre (%)
1	1	9.794x10 ⁹	9.751x10 ⁹	3.661x10 ⁷	0.375
	2	9.730x10 ⁹			
	3	9.730x10 ⁹			
2	1	9.774x10 ⁹	9.777x10 ⁹	5.339x10 ⁶	0.055
	2	9.774x10 ⁹			
	3	9.783x10 ⁹			
3	1	9.783x10 ⁹	9.779x10 ⁹	3.813x10 ⁶	0.039
	2	9.776x10 ⁹			
	3	9.776x10 ⁹			

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en el Cuadro 34 de la sección de datos calculados, los Cálculos 5 y 6 de la sección de cálculos de muestra y los Cálculos 35 a 37 de la sección de análisis de error.

Cuadro 36. Concentración de etanol (% v/v) por corrida

Prueba	Corrida	Tiempo (h ± 1 h)	Concentración etanol (% v/v) (mL/100 mL ± 0.001 mL/100 mL)
		0	0.000
		24	2.323
		48	2.379
	1	72	2.437
		96	2.431

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración etanol (% v/v) (mL/100 mL \pm 0.001 mL/100 mL)
		120	2.351
		144	2.338
		0	0.000
		24	2.237
		48	2.256
1	2	72	2.299
		96	2.232
		120	2.232
		144	2.229
		0	0.000
		24	2.221
		48	2.397
	3	72	2.411
		96	2.361
		120	2.346
		144	2.343
		0	0.000
		24	3.454
		48	3.507
	1	72	3.521
		96	3.525
		120	3.468
		144	3.464
		0	0.000
		24	3.654
		48	3.696
2	2	72	3.725
		96	3.738
		120	3.641
		144	3.627
		0	0.000

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración etanol (% v/v) (mL/100 mL \pm 0.001 mL/100 mL)
		24	3.295
		48	3.430
	3	72	3.456
		96	3.470
		120	3.349
		144	3.309
		0	0.000
		24	3.128
		48	3.402
	1	72	3.387
		96	3.375
		120	3.375
		144	3.371
		0	0.000
		24	3.079
		48	3.223
3	2	72	3.076
		96	3.075
		120	3.015
		144	3.014
		0	0.000
		24	2.956
		48	3.261
	3	72	3.245
		96	3.232
		120	3.233
		144	3.155

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en el Cuadro 13 de la sección de datos originales y el Cálculo 16 de la sección de cálculos de muestra.

Cuadro 37. Concentración de etanol (% v/v) por prueba

Prueba	Tiempo (h)	Concentración		Desviación estándar	Incertidumbre (%)
		etanol promedio (% v/v) (mL/100 mL)	Reducción de etanol (% v/v)		
1	0	0.000	-	0.000	0.00
	24	2.260	-	0.055	2.44
	48	2.344	-	0.077	3.27
	72	2.382	-	0.073	3.08
	96	2.341	1.72	0.101	4.31
	120	2.310	1.35	0.067	2.92
	144	2.304	0.26	0.064	2.80
2	0	0.000	-	0.000	0.00
	24	3.468	-	0.180	5.18
	48	3.544	-	0.137	3.86
	72	3.567	-	0.140	3.93
	96	3.578	-	0.141	3.95
	120	3.486	2.56	0.147	4.22
	144	3.467	0.55	0.159	4.59
3	0	0.000	-	0.000	0.00
	24	3.054	-	0.089	2.91
	48	3.295	-	0.094	2.86
	72	3.236	1.81	0.155	4.80
	96	3.227	0.26	0.150	4.66
	120	3.208	0.60	0.181	5.65
	144	3.180	0.87	0.180	5.66

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en el Cuadro 36 de la sección de datos calculados y los Cálculos 35 a 37 de la sección de análisis de error.

Cuadro 38. Concentración de glucosa (% v/v) por corrida

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración glucosa (% v/v) (mL/100 mL \pm 0.001 mL/100 mL)
		0	0.358
		24	0.000
		48	0.000
	1	72	0.000
		96	0.000
		120	0.000
		144	0.000
		0	0.352
		24	0.000
		48	0.000
1	2	72	0.000
		96	0.000
		120	0.000
		144	0.000
		0	0.349
		24	0.000
		48	0.000
	3	72	0.000
		96	0.000
		120	0.000
		144	0.000
		0	0.640
		24	0.008
		48	0.010
	1	72	0.000
		96	0.000
		120	0.008
		144	0.006
		0	0.546

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración glucosa (% v/v) (mL/100 mL \pm 0.001 mL/100 mL)
		24	0.015
		48	0.000
2	2	72	0.009
		96	0.008
		120	0.000
		144	0.000
		0	0.559
		24	0.016
		48	0.000
	3	72	0.000
		96	0.000
		120	0.000
		144	0.000
		0	0.551
		24	0.015
		48	0.010
	1	72	0.011
		96	0.008
		120	0.008
		144	0.010
		0	0.467
		24	0.014
		48	0.009
3	2	72	0.000
		96	0.000
		120	0.015
		144	0.008
		0	0.528
		24	0.012
		48	0.015
	3	72	0.007
		96	0.000

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración glucosa (% v/v) (mL/100 mL \pm 0.001 mL/100 mL)
		120	0.000
		144	0.010

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en el Cuadro 14 de la sección de datos originales y el Cálculo 17 de la sección de cálculos de muestra.

Cuadro 39. Concentración de fructosa (% v/v) por corrida

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración fructosa (% v/v) (mL/100 mL \pm 0.001 mL/100 mL)
		0	0.000
		24	0.096
		48	0.093
	1	72	0.090
		96	0.066
		120	0.066
		144	0.059
		0	0.000
		24	0.080
		48	0.080
1	2	72	0.080
		96	0.078
		120	0.078
		144	0.060
		0	0.000
		24	0.080
		48	0.080
	3	72	0.084
		96	0.078
		120	0.081
		144	0.151
		0	0.073

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración fructosa (% v/v) (mL/100	
			mL \pm 0.001 mL/100 mL)	
	1	24	0.070	
		48	0.072	
		72	0.063	
		96	0.072	
		120	0.070	
		144	0.138	
		0	0.082	
	2	2	24	0.080
			48	0.080
			72	0.079
			96	0.078
			120	0.068
			144	0.145
			0	0.076
	3	24	0.085	
		48	0.086	
		72	0.074	
		96	0.075	
		120	0.069	
		144	0.119	
		0	0.053	
	1	24	0.064	
		48	0.044	
		72	0.051	
		96	0.037	
		120	0.047	
		144	0.102	
		0	0.069	
3	2	24	0.070	
		48	0.069	
		72	0.069	
		96	0.069	
		0	0.069	

Prueba	Corrida	Tiempo (h ± 1 h)	Concentración fructosa (% v/v) (mL/100 mL ± 0.001 mL/100 mL)
		120	0.070
		144	0.113
		0	0.069
		24	0.074
		48	0.072
	3	72	0.072
		96	0.073
		120	0.079
		144	0.000

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en el Cuadro 15 de la sección de datos originales y el Cálculo 19 de la sección de cálculos de muestra.

Cuadro 40. Concentración de maltosa (% v/v) por corrida

Prueba	Corrida	Tiempo (h ± 1 h)	Concentración maltosa (% v/v) (mL/100 mL ± 0.001 mL/100 mL)
		0	1.880
		24	0.430
		48	0.118
	1	72	0.115
		96	0.112
		120	0.108
		144	0.106
		0	1.754
		24	0.403
		48	0.105
1	2	72	0.103
		96	0.102
		120	0.086
		144	0.082
		0	1.847

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración maltosa (% v/v) (mL/100 mL \pm 0.001 mL/100 mL)
		24	0.449
		48	0.106
	3	72	0.103
		96	0.095
		120	0.103
		144	0.093
		0	2.760
		24	0.168
		48	0.169
	1	72	0.175
		96	0.182
		120	0.164
		144	0.165
		0	2.749
		24	0.197
		48	0.189
2	2	72	0.164
		96	0.156
		120	0.166
		144	0.169
		0	2.877
		24	0.194
		48	0.176
	3	72	0.162
		96	0.170
		120	0.168
		144	0.154
		0	3.158
		24	0.206
		48	0.161
	1	72	0.179
		96	0.166

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración maltosa (% v/v) (mL/100 mL \pm 0.001 mL/100 mL)
		120	0.174
		144	0.139
		0	3.110
		24	0.186
		48	0.173
3	2	72	0.171
		96	0.168
		120	0.130
		144	0.123
		0	3.046
		24	0.311
		48	0.197
	3	72	0.179
		96	0.182
		120	0.179
		144	0.144

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en el Cuadro 16 de la sección de datos originales y el Cálculo 18 de la sección de cálculos de muestra.

Cuadro 41. Concentración de azúcares fermentables (% v/v) por corrida

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración azúcares fermentables (% v/v) (mL/100 mL \pm 0.001 mL/100 mL)
		0	2.306
		24	0.430
		48	0.215
	1	72	0.208
		96	0.202
		120	0.173
		144	0.172
		0	2.165

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración azúcares fermentables (% v/v) (mL/100 mL \pm 0.001 mL/100 mL)
1	2	24	0.403
		48	0.184
		72	0.182
		96	0.182
		120	0.164
		144	0.159
		0	2.256
	3	24	0.449
		48	0.186
		72	0.183
		96	0.179
		120	0.180
		144	0.174
		0	3.550
2	1	24	0.249
		48	0.249
		72	0.246
		96	0.245
		120	0.244
		144	0.241
		0	3.433
	2	24	0.295
		48	0.269
		72	0.254
		96	0.244
		120	0.244
		144	0.237
		0	3.581
3	24	0.285	
	48	0.261	
	72	0.247	
	96	0.244	
	0		

Prueba	Corrida	Tiempo (h \pm 1 h)	Concentración azúcares fermentables (% v/v) (mL/100 mL \pm 0.001 mL/100 mL)
		120	0.243
		144	0.223
		0	3.829
		24	0.274
		48	0.235
	1	72	0.234
		96	0.225
		120	0.220
		144	0.195
		0	3.679
		24	0.269
		48	0.252
3	2	72	0.240
		96	0.237
		120	0.214
		144	0.202
		0	3.687
		24	0.392
		48	0.287
	3	72	0.258
		96	0.255
		120	0.252
		144	0.234

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en los Cuadros 38 a 40 de la sección de datos calculados y el Cálculo 20 de la sección de cálculos de muestra.

Cuadro 42. Concentración de azúcares fermentables (% v/v) por prueba

Prueba	Tiempo (h)	Concentración		Incertidumbre (%)
		azúcares fermentables promedio (% v/v) (mL/100 mL)	Desviación estándar	
1	0	2.242	0.072	3.192
	24	0.427	0.023	5.414
	48	0.195	0.017	8.671
	72	0.191	0.014	7.562
	96	0.188	0.012	6.484
	120	0.172	0.008	4.732
	144	0.168	0.008	4.721
2	0	3.522	0.078	2.216
	24	0.277	0.024	8.722
	48	0.259	0.010	3.870
	72	0.249	0.004	1.607
	96	0.244	0.001	0.334
	120	0.244	0.000	0.075
	144	0.234	0.010	4.179
3	0	3.731	0.084	2.260
	24	0.312	0.070	22.343
	48	0.258	0.026	10.219
	72	0.244	0.013	5.247
	96	0.239	0.015	6.170
	120	0.229	0.020	8.892
	144	0.210	0.021	9.802

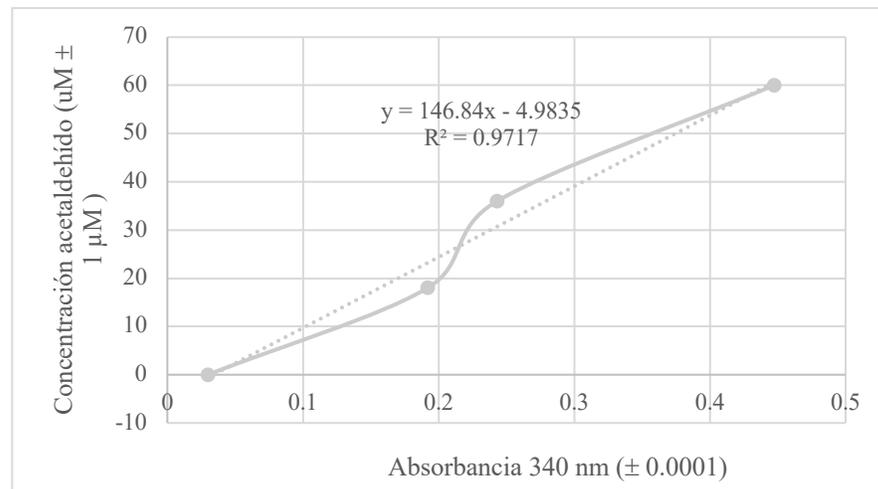
Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en el Cuadro 41 de la sección de datos calculados y los Cálculos 35 a 37 de la sección de análisis de error.

Cuadro 43. Datos de lectura de absorbancia a 340 nm corregidos para curva de calibración de acetaldehído

Concentración acetaldehído ($\mu\text{M} \pm 1 \mu\text{M}$)	Absorbancia a 340 nm (± 0.0001)
0	0.0299
18	0.1919
36	0.2431
60	0.4472

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en los Cuadros 17 y 18 de la sección de datos originales y el Cálculo 21 de la sección de cálculos de muestra.

Figura 15. Curva de calibración de concentración acetaldehído a partir de lecturas de absorbancia a 340 nm



Nota. La curva fue construida utilizando los datos presentados en el Cuadro 43 de la sección de datos calculados.

Las líneas entre los puntos son utilizadas para mejorar la percepción de tendencia con una curva suave.

Cuadro 44. Lecturas de absorbancia a 340 nm de acetaldehído en el producto final de cada corrida corregidas

Prueba	Corrida	Absorbancia a 340 nm del blanco (± 0.0001)	Absorbancia a 340 nm de la muestra (± 0.0001)
1	1	0.273	0.584
	2	0.2711	0.5825
	3	0.2723	0.5803
2	1	0.3309	0.554
	2	0.3303	0.5531
	3	0.3317	0.5544
3	1	0.2218	0.649
	2	0.2211	0.6437
	3	0.2217	0.6474

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en el Cuadro 19 de la sección de datos originales y el Cálculo 21 de la sección de cálculos de muestra.

Cuadro 45. Determinación de acetaldehído en el producto final de cada corrida a partir de curva de calibración

Prueba	Corrida	Concentración de acetaldehído ($\mu\text{g/mL}$)		Desviación estándar	Incertidumbre (%)
		Promedio			
1	1	0.179			
	2	0.179	0.178	0.001	0.673
	3	0.177			
2	1	0.122			
	2	0.122	0.122	0.000	0.110
	3	0.122			
3	1	0.254			
	2	0.251	0.253	0.002	0.600
	3	0.253			

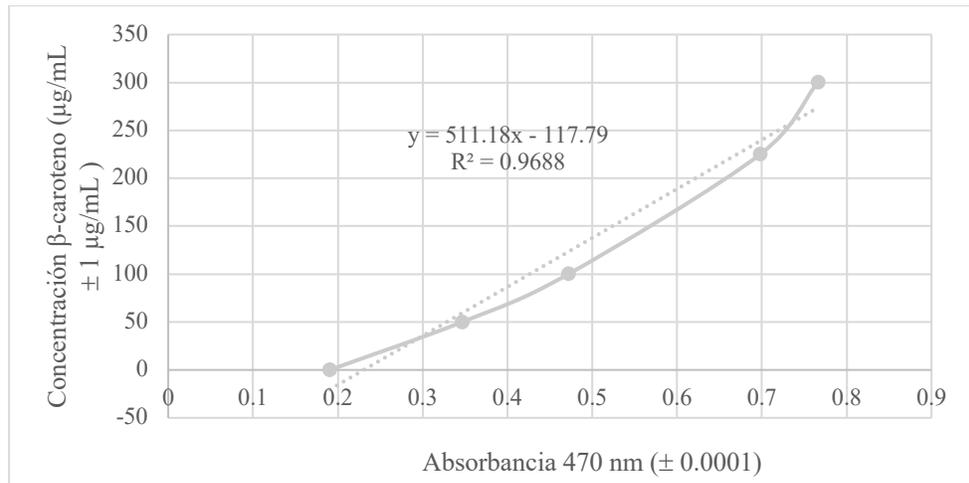
Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en el Cuadro 44 de la sección de datos calculados, el Cálculo 22 de la sección de cálculos de muestra, la ecuación de la recta presentada en la Figura 15 de la sección de datos calculados y los Cálculos 35 a 37 de la sección de análisis de error.

Cuadro 46. Datos de lectura de absorbancia a 470 nm corregidos para curva de calibración de β -caroteno

Concentración β -caroteno ($\mu\text{g/mL} \pm 1 \mu\text{g/mL}$)	Absorbancia a 470 nm (± 0.0001)
0	0.1905
50	0.3465
100	0.4718
225	0.6979
300	0.7659

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en los Cuadros 17 y 20 de la sección de datos originales y el Cálculo 23 de la sección de cálculos de muestra.

Figura 16. Curva de calibración de concentración β -caroteno a partir de lecturas de absorbancia a 470 nm



Nota. La curva fue construida utilizando los datos presentados en el Cuadro 46 de la sección de datos calculados.

Las líneas entre los puntos son utilizadas para mejorar la percepción de tendencia con una curva suave.

Cuadro 47. Lecturas de absorbancia a 470 nm de β -caroteno en el producto final de cada corrida corregidas

Prueba	Corrida	Absorbancia a 470 nm (± 0.0001)
1	1	0.4929
	2	0.4927
	3	0.4925
2	1	0.3681
	2	0.3684
	3	0.3677
3	1	0.5687
	2	0.5685
	3	0.5693

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en los Cuadros 17 y 21 de la sección de datos originales y el Cálculo 23 de la sección de cálculos de muestra.

Cuadro 48. Determinación de β -caroteno en el producto final de cada corrida a partir de curva de calibración

Prueba	Corrida	Concentración		Desviación	
		de β -caroteno ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio	estándar	Incertidumbre (%)
1	1	134.171	134.068	0.102	0.076
	2	134.068			
	3	133.966			
2	1	70.375	70.358	0.180	0.255
	2	70.529			
	3	70.171			
3	1	172.918	172.986	0.213	0.123
	2	172.816			
	3	173.225			

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en el Cuadro 47 de la sección de datos calculados, el Cálculo 24 de la sección de cálculos de muestra, la ecuación

de la recta presentada en la Figura 16 de la sección de datos calculados y los Cálculos 35 a 37 de la sección de análisis de error.

Cuadro 49. Lecturas de absorbancia a 430 y 700 nm del producto final de cada corrida corregidas para determinación de valor SRM y turbidez

Prueba	Corrida	Absorbancia a 430 nm (± 0.0001)	Absorbancia a 700 nm (\pm 0.0001)
1	1	0.6077	-0.0089
	2	0.6108	0.0031
	3	0.623	0.0078
2	1	0.6077	0.0075
	2	0.6077	0.0146
	3	0.6187	0.0136
3	1	0.6253	-0.0066
	2	0.6159	-0.004
	3	0.6077	-0.0068

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en los Cuadros 17 y 22 de la sección de datos originales y los Cálculos 25 y 27 de la sección de cálculos de muestra.

Cuadro 50. Determinación de valor SRM del producto final de cada corrida

Prueba	Corrida	Valor SRM	Promedio	Desviación estándar	Incertidumbre (%)
1	1	7.718	7.796	0.103	1.318
	2	7.757			
	3	7.912			
2	1	7.718	7.764	0.081	1.039
	2	7.718			
	3	7.857			
3	1	7.941	7.827	0.112	1.429
	2	7.822			
	3	7.718			

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en el Cuadro 49 de la sección de datos calculados, el Cálculo 26 de la sección de cálculos de muestra y los Cálculos 35 a 37 de la sección de análisis de error.

Cuadro 51. Determinación de turbidez del producto final de cada corrida

Prueba	Corrida	Turbidez	Promedio	Desviación estándar	Incertidumbre (%)
	1	Libre			
1	2	Libre	Libre	-	-
	3	Libre			
	1	Libre			
2	2	Libre	Libre	-	-
	3	Libre			
	1	Libre			
3	2	Libre	Libre	-	-
	3	Libre			

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en los Cuadros 17 y 23 de la sección de datos originales y el Cálculo 28 de la sección de cálculos de muestra.

Cuadro 52. Determinación de gravedad original del mosto de cada corrida

Prueba	Corrida	Gravedad Original	Promedio	Desviación estándar	Incertidumbre (%)
	1	1.046			
1	2	1.048	1.048	0.002	0.191
	3	1.050			
	1	1.045			
2	2	1.062	1.054	0.009	0.807
	3	1.054			
	1	1.058			
3	2	1.053	1.056	0.003	0.273
	3	1.058			

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en el Cuadro 24 de la sección de datos originales, el Cálculo 29 de la sección de cálculos de muestra y los Cálculos 35 a 37 de la sección de análisis de error.

Cuadro 53. Determinación de gravedad final del producto de cada corrida

Prueba	Corrida	Gravedad Final	Promedio	Desviación estándar	Incertidumbre (%)
	1	1.028			
1	2	1.030	1.030	0.002	0.194
	3	1.032			
	1	1.031			
2	2	1.033	1.030	0.003	0.297
	3	1.027			
	1	1.036			
3	2	1.034	1.033	0.003	0.274
	3	1.030			

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en el Cuadro 24 de la sección de datos originales, el Cálculo 30 de la sección de cálculos de muestra y los Cálculos 35 a 37 de la sección de análisis de error.

Cuadro 54. Determinación de grados IBU

Lúpulo	Grados IBU	Incertidumbre (%)
Cascade	32.126	
Centennial	53.538	
Columbus	10.343	0.690
Total	96.007	

Nota. Los datos fueron calculados a partir de los datos presentados en el Cuadro 29 de la sección de datos originales, los Cálculos 31 a 33 de la sección de cálculos de muestra y los Cálculos 35 a 37 de la sección de análisis de error.

D. Análisis de error

Cálculo 35. Media aritmética

$$\bar{x} = \frac{1}{n} * \sum_{i=1}^n a_i$$
$$\bar{x} = \frac{42823818500 + 42763818500 + 42763818500}{3}$$
$$\bar{x} = 42783818500$$

En donde:

\bar{x} es la media aritmética.

n es el número de datos.

a es el dato.

Este cálculo de muestra se realizó para el número de células de *S. cerevisiae* inoculadas en la prueba 1, sin embargo, es cálculo se repitió para cada resultado de cada corrida.

Cálculo 36. Desviación estándar

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(a_i - \bar{x})^2}{n}}$$
$$\sigma = \sqrt{\frac{(4.282 * 10^{10} - 4.278 * 10^{10})^2 + 2(4.276 * 10^{10} - 4.278 * 10^7)^2}{3}}$$
$$\sigma = 3.46 * 10^7$$

En donde:

σ es la desviación estándar.

Este cálculo de muestra se realizó para el número de células de *S. cerevisiae* inoculadas en la prueba 1, sin embargo, es cálculo se repitió para cada resultado de cada corrida.

Cálculo 37. Incertidumbre porcentual

$$I = \frac{\sigma}{\bar{x}} * 100$$

$$I = \frac{3.46 * 10^7}{4.278 * 10^{10}} * 100$$

$$I = 0.081\%$$

En donde:

I es la incertidumbre, en %.

Este cálculo de muestra se realizó para el número de células de *S. cerevisiae* inoculadas en la prueba 1, sin embargo, es cálculo se repitió para cada resultado de cada corrida.

E. Balances de masa

Figura 17. Balance de masa del proceso de fermentación parcial (prueba 1)

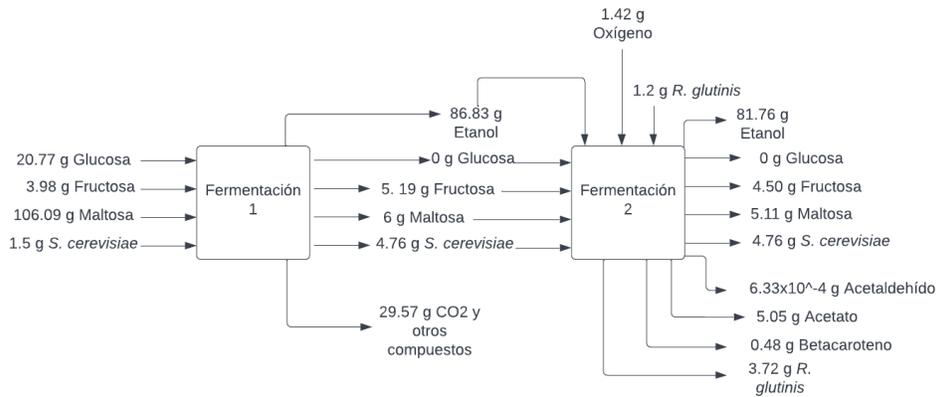


Figura 18. Balance de masa del proceso de fermentación parcial (prueba 2)

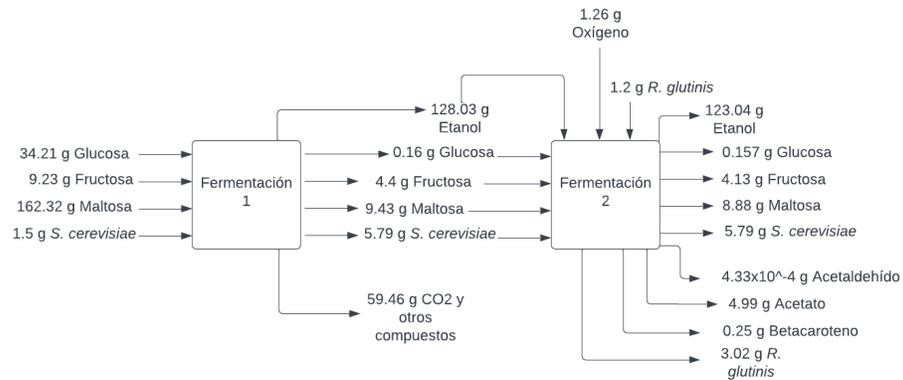
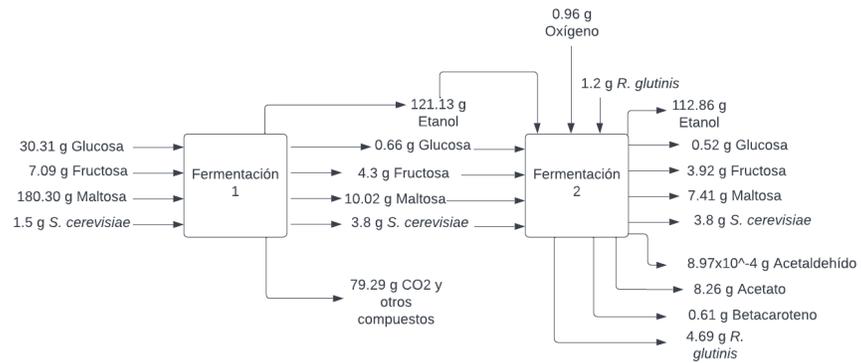


Figura 19. Balance de masa del proceso de fermentación parcial (prueba 3)



F. Evidencia fotográfica

1. Reactivos

Figura 20. Medio de cultivo Dextrosa Sabouraud Merck utilizado para la propagación de levaduras



Figura 21. Agua desmineralizada utilizada para la preparación del mosto



Figura 22. Sulfato de magnesio pentahidratado Merck utilizado para la mineralización del agua para el mosto

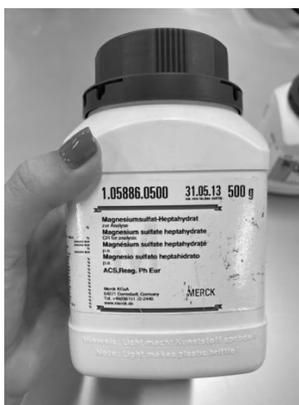


Figura 23. Cloruro de calcio dihidratado Merck utilizado para la mineralización del agua para el mosto



Figura 24. Bicarbonato de sodio Ferkica utilizado para la mineralización del agua para el mosto



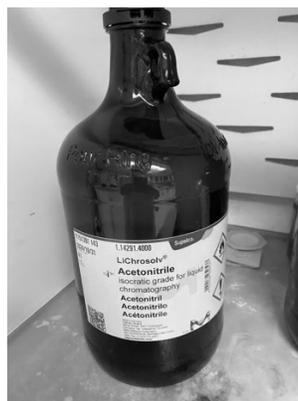
Figura 25. Acetona Quimiprova al 99% utilizada como solvente en el proceso de extracción de betacarotenos



Figura 26. Hexano Merck utilizado como solvente en el proceso de extracción de β .caroteno



Figura 27. Acetonitrilo Merck utilizado como diluyente en el proceso de extracción de β -caroteno



2. Equipos

Figura 28. Espectrofotómetro UV-VIS marca SHIMADZU utilizado para lecturas de densidad óptica celular a 600 nm, color a 430 nm, turbidez a 700nm, cuantificación de betacarotenos a 470 nm y cuantificación de acetaldehído a 340 nm



Figura 29. Centrífuga marca SORVALL utilizada para llevar a cabo la separación de biomasa



Figura 30. Incubadora con agitación marca Lab. Companion utilizada para la propagación de levaduras a 30°C y 120 rpm



Figura 31. Autoclave marca Tuttnauer utilizada para la esterilización de medios de cultivo



Figura 32. Vortex marca Fisher Scientific utilizado para la mezcla de biomasa con agua mineralizada



Figura 33. Balanza marca OHAUS utilizada para el pesaje de medio de cultivo y de sales minerales



Figura 34. Balanza analítica marca OHAUS utilizada para el pesaje del estándar de betacarotenos

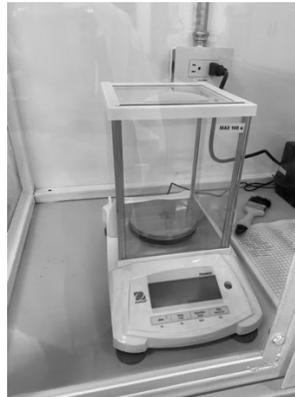


Figura 35. Incubadora marca LAB-LINE utilizada para la propagación de levaduras provenientes del cepario de levaduras del departamento de Ingeniería Química de la UVG



Figura 36. Horno secador marca Symphony utilizado para la cuantificación de peso seco de las levaduras



Figura 37. Cuarto frío marca Johnson Controls utilizado para el almacenamiento de muestras a 6°C



Figura 38. Cuarto congelado marca Johnson Controls utilizado para el almacenamiento del kit de cuantificación de acetaldehído y estándar de betacarotenos a -20°C



Figura 39. Pipeta marca Acura 1 – 5 mL



Figura 40. Pipeta marca BRAND 10 – 100 μ L



Figura 41. Pipeta marca BRAND 100 – 1000 μ L



Figura 42. Campana de flujo laminar marca LABCONCO utilizada para proporcionar un ambiente estéril en el proceso de propagación de levaduras



3. Análisis de agua

Figura 43. Kit HACH utilizado para evaluar la dureza del agua



Figura 44. Reactivo EDTA, elemento del kit HACH utilizado para evaluar la dureza del agua



Figura 45. Reactivo de dureza, elemento del kit HACH utilizado para evaluar la dureza del agua



Figura 46. Resultado obtenido a partir del kit HACH



4. Propagación de levaduras

Figura 47. Prueba de consumo de etanol



Figura 48. Caja Petri con cultivo de *R. glutinis* CBS 323 en agar nutritivo proveniente del cepario de levaduras del departamento de Ingeniería Química de la UVG

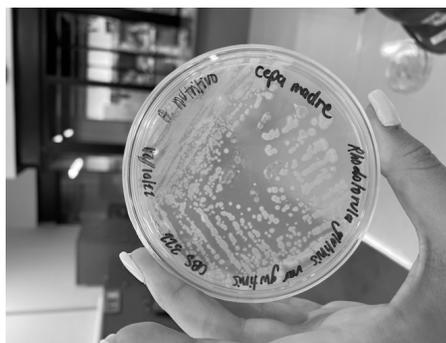


Figura 49. Caja Petri con cultivo de *S. cerevisiae* CBS 381 en agar nutritivo proveniente del cepario de levaduras del departamento de Ingeniería Química de la UVG



Figura 50. Tubos de ensayo con cultivo de *S. cerevisiae* y *R. glutinis* en caldo Dextrosa Sabouraud



Figura 51. Erlenmeyers con cultivo de *S. cerevisiae* y *R. glutinis* en caldo Dextrosa Sabouraud



Figura 52. Cámara de Neubauer utilizada para el conteo de levaduras de *S. cerevisiae* y *R. glutinis* en caldo Dextrosa Sabouraud



Figura 53. Conteo en cámara de Neubauer de *S. cerevisiae* en caldo Dextrosa Sabouraud, dilución 1:100



Figura 54. Conteo en cámara de Neubauer de *R. glutinis* en caldo Dextrosa Sabouraud, dilución 1:100

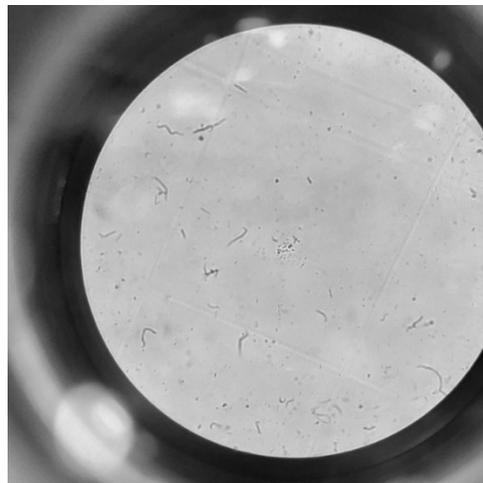


Figura 55. Ejemplo de lectura a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS para la determinación de densidad óptica de *S. cerevisiae* y *R. glutinis* en caldo Dextrosa Sabouraud



Figura 56. Separación de biomasa y medio de cultivo luego de 96 horas de incubación por medio de centrifugación a 0°C y 4000 rpm por 30 minutos



Figura 57. Descarte de medio de cultivo Dextrosa Sabourad



Figura 58. Agua mineralizada acorde a requerimiento de una cerveza IPA para el almacenamiento de levaduras



Figura 59. Levaduras almacenadas en agua mineralizada según requerimientos de dureza de agua de una cerveza IPA



Figura 60. Determinación de peso seco de *S. cerevisiae*



Figura 61. Determinación de peso seco de *R. glutinis*



5. Elaboración de cerveza artesanal

Figura 62. Adaptación de llaves y mangueras al equipo necesario para el proceso de elaboración de cerveza



Figura 63. Malta Pale Ale utilizada



Figura 64. Malta Munich utilizada



Figura 65. Malta Crystal utilizada



Figura 66. Lúpulo Columbus utilizado

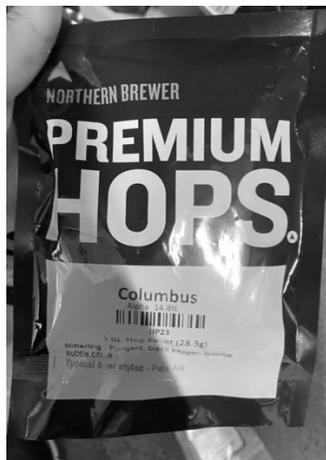


Figura 67. Lúpulo Centennial utilizado



Figura 68. Lúpulo Cascade utilizado



Figura 69. Cubeta utilizada para la preparación de agua y sales minerales a utilizar en el mosto



Figura 70. Desinfectante grado alimenticio utilizado en el proceso



Figura 71. Proceso de desinfección de todos los materiales a utilizar el proceso de elaboración de cerveza



Figura 72. Medición de altura de agua inicial para determinación de reducción en volumen a lo largo del proceso



Figura 73. Olla de acero inoxidable utilizada para el calentamiento del agua y mosto, así como también, para el proceso de inactivación de la levadura *S. cerevisiae*



Figura 74. Termómetro digital marca Steren utilizado para el monitoreo de temperatura del agua y mosto, así como también, para el proceso de inactivación de la levadura *S. cerevisiae*



Figura 75. Balanza digital SF-400 utilizada para el pesaje de granos y lúpulos



Figura 76. Hielera utilizada para el proceso de maceración de los granos



Figura 77. Transferencia de agua caliente proveniente de la olla a la hielera



Figura 78. Adición de los granos a la hielera utilizando una bolsa de mesh



Figura 79. Hielera cerrada y cubierta con una toalla durante 1 hora para el proceso de maceración



Figura 80. Transferencia del mosto de hielera a olla utilizando un colador para posterior calentamiento hasta temperatura de ebullición



Figura 81. Bolas de té utilizadas para la adición de lúpulo al mosto hirviendo en la olla



Figura 82. Olla colocada en baño de hielo posterior al calentamiento, así como también, para el proceso de inactivación de la levadura *S. cerevisiae*

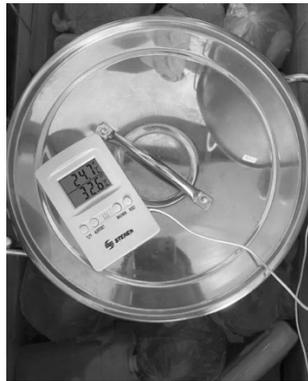


Figura 83. Transferencia de mosto enfriado e inoculación de levadura *S. cerevisiae* en fermentador utilizando un embudo



Figura 84. Fermentador con stopper y manguera para salida de dióxido de carbono en un recipiente con desinfectante



Figura 85. Fermentador 24 horas desde la inoculación de *S. cerevisiae* (Ejemplo de prueba 2)

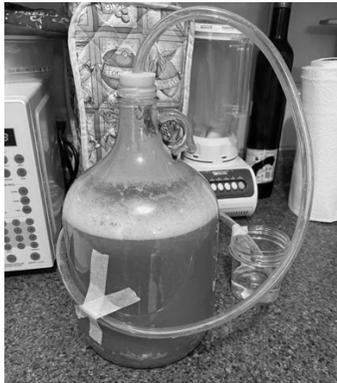


Figura 86. Fermentador 48 horas desde la inoculación de *S. cerevisiae* (Ejemplo de prueba 2)



Figura 87. Fermentador 72 horas desde la inoculación de *S. cerevisiae* (Ejemplo de prueba 2)



Figura 88. Fermentador 96 horas desde la inoculación de *S. cerevisiae* (Ejemplo de prueba 2)



Figura 89. Fermentador luego de la inactivación de *S. cerevisiae* e inoculación de *R. glutinis* (Ejemplo de prueba 2)



Figura 90. Fermentador 24 horas desde la inoculación de *R. glutinis* (Ejemplo de prueba 2)



Figura 91. Fermentador 48 horas desde la inoculación de *R. glutinis* (Ejemplo de prueba 2)



Figura 92. Toma de muestra cada 24 horas utilizando un sifón



Figura 93. Botes utilizados para la toma de muestra cada 24 horas de cada corrida y cada prueba



Figura 94. Botellas utilizadas para la recolección del producto final de cada corrida y cada prueba



6. Pruebas fisicoquímicas

Figura 95. Curva de calibración etanol HPLC

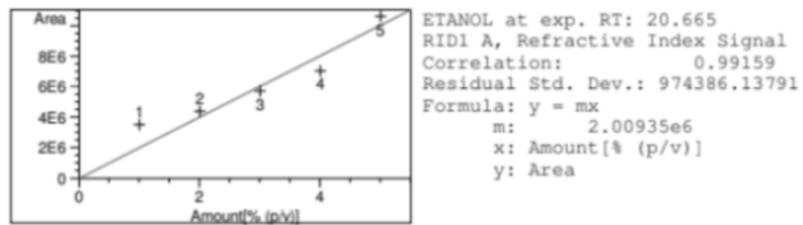


Figura 96. Curva de calibración glucosa HPLC

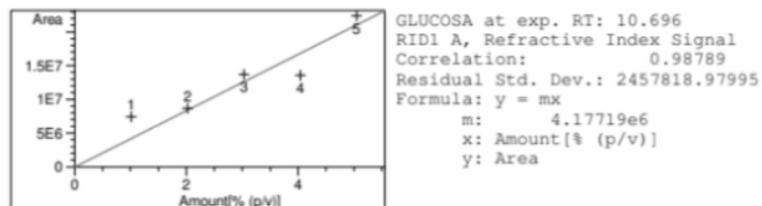


Figura 97. Curva de calibración fructosa HPLC

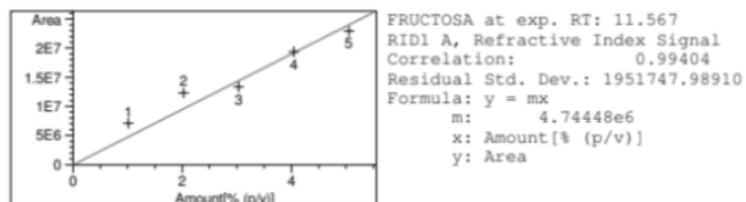


Figura 98. Curva de calibración sacarosa HPLC

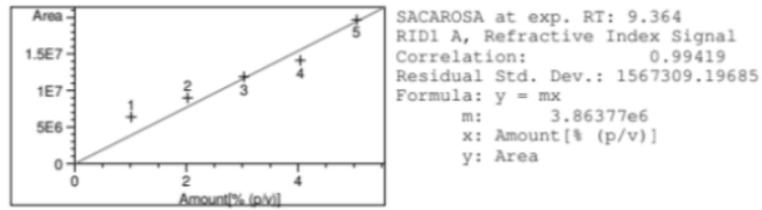


Figura 99. Ejemplo de cromatograma HPLC para determinación de etanol, glucosa, fructosa y sacarosa en la muestra (día 1, corrida 1, prueba 1)

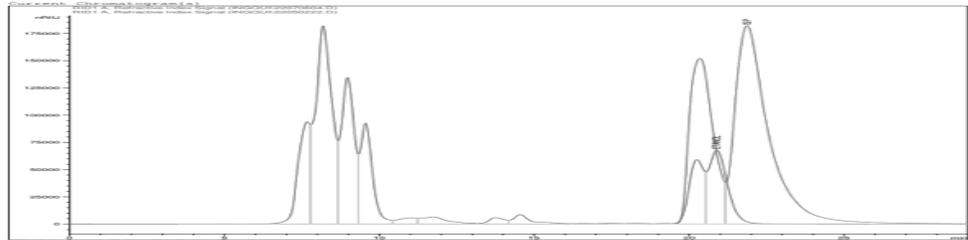


Figura 100. Ejemplo de cromatograma HPLC para determinación de etanol, glucosa, fructosa y sacarosa en la muestra (día 1, corrida 1, prueba 2)

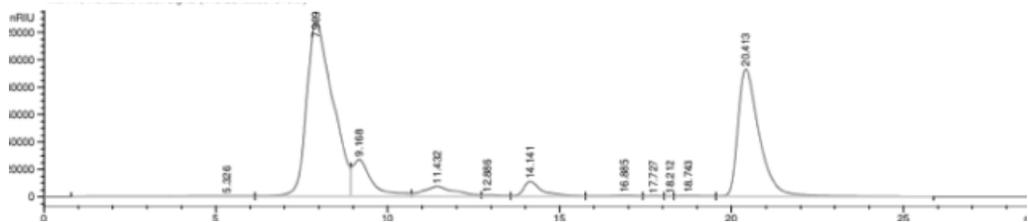


Figura 101. Ejemplo de cromatograma HPLC para determinación de etanol, glucosa, fructosa y sacarosa en la muestra (día 1, corrida 1, prueba 3)

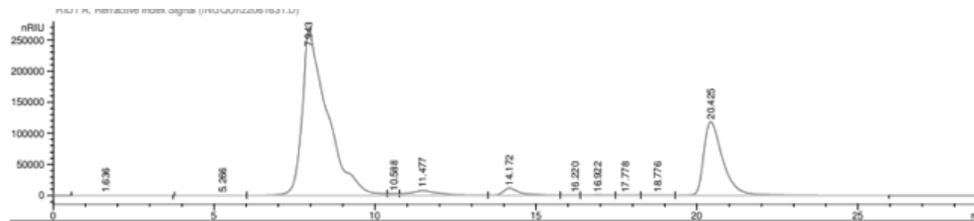


Figura 102. Estándar de acetaldehído 400 mM Merck utilizado para la cuantificación de acetaldehído en el producto final



Figura 103. Enzima aldehído deshidrogenasa Merck utilizada para la cuantificación de acetaldehído en el producto final



Figura 104. Buffer Merck utilizado para la cuantificación de acetaldehído en el producto final



Figura 105. Solución de NAD Merck utilizada para la cuantificación de acetaldehído en el producto final



Figura 106. Tubos eppendorf utilizados para la colocación de muestras y estándares



Figura 107. Solución mastermix preparada a partir de buffer, solución NAD y enzima aldehído deshidrogenasa para la cuantificación de acetaldehído en estándares y en el producto final



Figura 108. Solución mastermix preparada a partir de buffer y solución NAD para la cuantificación de acetaldehído en el producto final



Figura 109. Estándar de acetaldehído 4mM



Figura 110. Estándar de acetaldehído 60 μ M utilizado para la preparación de estándares 0, 18, 36 y 100 μ M con agua ultrapura



Figura 111. Muestra de producto final con solución mastermix



Figura 112. Equipo marca Merck utilizado para la obtención de agua ultrapura a utilizar en la preparación de estándares de acetaldehído



Figura 113. Celdas para espectrofotómetro UV-VIS utilizadas para la cuantificación de acetaldehído en muestras y estándares



Figura 114. Ejemplo de lectura a 340 nm en espectrofotómetro UV-VIS para la cuantificación de acetaldehído en muestras y estándares



Figura 115. Licuadora utilizada para llevar a cabo la lisis celular por acción mecánica de la levadura *R. glutinis* para la extracción de β -caroteno en el producto final



Figura 116. Estándar de betacaroteno Merck utilizado para la cuantificación de β -caroteno en el producto final



Figura 117. Soluciones de β -caroteno diluidas en acetonitrilo como estándares para la cuantificación de betacarotenos en el producto final



Figura 118. Extracción líquido líquido del β -caroteno presentes en la muestra utilizando acetona y hexano como disolventes



Figura 119. Equipo de destilación utilizado para llevar a cabo la separación del β -caroteno del solvente hexano:acetona



Figura 120. Extracto de β -caroteno obtenido a partir del proceso de destilación



Figura 121. Extracto de β -caroteno diluido en acetonitrilo para su cuantificación



Figura 122. Ejemplo de lectura a 470 nm en espectrofotómetro UV-VIS para la cuantificación de β -caroteno en el producto final



Figura 123. Ejemplo de lectura a 430 nm en espectrofotómetro UV-VIS para determinación de valor SRM en el producto final



Figura 124. Ejemplo de lectura a 700 nm en espectrofotómetro UV-VIS para determinación de turbidez en el producto final



Figura 125. Refractómetro digital modelo HI96801 utilizado para la determinación de gravedad original y final del mosto



Figura 126. Panel sensorial del producto final (parte I)



Figura 127. Panel sensorial del producto final (parte II)



Figura 128. Resultados de panel sensorial del producto final (parte I)

Universidad del Valle de Guatemala
Departamento de Ingeniería Química
Trabajo de Graduación
Análisis de percepción sensorial

Mónica Céspedes
13/06/2022

No. Producto	Calificación en cuanto a sabor	Calificación en cuanto a olor
1	10	10
2	9	9
3	10	10
4	10	10
5	10	10
6	10	10
7	10	10
8	10	10
9	10	10

Nota: Tener presente un punto de la escala está proporcionada entre la evaluación de sabor de cada producto y dar el tiempo de aproximadamente 5 minutos entre la evaluación de otro de. La calificación debe estar entre de 0 a 10, siendo 0 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor no sea de su agrado y 10 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor sí sea de su agrado.

[Handwritten Signature]

Figura 129. Resultados de panel sensorial del producto final (parte II)

Héctor David Álvarez
14/10/2022
CANCY

Universidad del Valle de Guatemala
Departamento de Ingeniería Química
Trabajo de Graduación
Análisis de percepción sensorial

No. Producto	Calificación en cuanto a sabor	Calificación en cuanto a olor
1	3	3
2	2	2
3	2	2
4	2	2
5	2	2
6	2	2
7	2	2
8	2	2
9	2	2

Nota: Favor consumir un pedazo de la galleta soda proporcionada entre la evaluación de sabor de cada producto y dejar un tiempo de aproximadamente 5 minutos entre la evaluación de olor de cada producto.
La calificación debe realizarse de 0 a 10, siendo 0 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor no sea de su agrado y 10 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor sí sea de su agrado.

Figura 130. Resultados de panel sensorial del producto final (parte III)

Otilio J. J. J. J.
19/06/2022

Universidad del Valle de Guatemala
Departamento de Ingeniería Química
Trabajo de Graduación
Análisis de percepción sensorial

No. Producto	Calificación en cuanto a sabor	Calificación en cuanto a olor
1	2	2
2	2	2
3	2	2
4	2	2
5	2	2
6	2	2
7	2	2
8	2	2
9	2	2

Nota: Favor consumir un pedazo de la galleta soda proporcionada entre la evaluación de sabor de cada producto y dejar un tiempo de aproximadamente 5 minutos entre la evaluación de olor de cada producto.
La calificación debe realizarse de 0 a 10, siendo 0 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor no sea de su agrado y 10 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor sí sea de su agrado.

Figura 131. Resultados de panel sensorial del producto final (parte IV)

Marcela Virginia González
13 Julio 2022

Universidad del Valle de Guatemala
Departamento de Ingeniería Química
Trabajo de Graduación
Análisis de percepción sensorial

No. Producto	Calificación en cuanto a sabor	Calificación en cuanto a olor
1	2	2
2	2	2
3	2	2
4	2	2
5	2	2
6	2	2
7	2	2
8	2	2
9	2	2

Nota: Favor consumir un pedazo de la galleta soda proporcionada entre la evaluación de sabor de cada producto y dejar un tiempo de aproximadamente 5 minutos entre la evaluación de olor de cada producto.
La calificación debe realizarse de 0 a 10, siendo 0 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor no sea de su agrado y 10 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor sí sea de su agrado.

Figura 132. Resultados de panel sensorial del producto final (parte V)

Jorge Rafael Cordero Riquelme
17/06/2022

Universidad del Valle de Guatemala
Departamento de Ingeniería Química
Trabajo de Graduación
Análisis de percepción sensorial

No. Producto	Calificación en cuanto a sabor	Calificación en cuanto a olor
1	2	2
2	2	2
3	2	2
4	2	2
5	2	2
6	2	2
7	2	2
8	2	2
9	2	2

Nota: Favor consumir un pedazo de la galleta soda proporcionada entre la evaluación de sabor de cada producto y dejar un tiempo de aproximadamente 5 minutos entre la evaluación de olor de cada producto.
La calificación debe realizarse de 0 a 10, siendo 0 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor no sea de su agrado y 10 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor sí sea de su agrado.

Figura 133. Resultados de panel sensorial del producto final (parte VI)

Universidad del Valle de Guatemala
Departamento de Ingeniería Química
Taller de Graduación
Análisis de percepción sensorial

Regina Rojas
22/06/2022
Rojas

No. Producto	Calificación en cuanto a sabor	Calificación en cuanto a olor
1	5	5
2	5	5
3	5	5
4	5	5
5	5	5
6	5	5
7	5	5
8	5	5
9	5	5

Nota: Favorecer comentar un pedazo de la galleta sola proporcionalmente entre la evaluación de sabor de cada producto y dejar un tiempo de aproximadamente 5 minutos entre la evaluación de olor de cada producto.
La calificación debe realizarse de 0 a 10, siendo 0 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor no sea de su agrado y 10 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor sí sea de su agrado.

Figura 134. Resultados de panel sensorial del producto final (parte VII)

Universidad del Valle de Guatemala
Departamento de Ingeniería Química
Taller de Graduación
Análisis de percepción sensorial

Diana Cobos
27.06.2022

No. Producto	Calificación en cuanto a sabor	Calificación en cuanto a olor
1	5	5
2	5	5
3	5	5
4	5	5
5	5	5
6	5	5
7	5	5
8	5	5
9	5	5

Nota: Favorecer comentar un pedazo de la galleta sola proporcionalmente entre la evaluación de sabor de cada producto y dejar un tiempo de aproximadamente 5 minutos entre la evaluación de olor de cada producto.
La calificación debe realizarse de 0 a 10, siendo 0 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor no sea de su agrado y 10 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor sí sea de su agrado.

No es igual al absoluto

Figura 135. Resultados de panel sensorial del producto final (parte VIII)

Universidad del Valle de Guatemala
Departamento de Ingeniería Química
Taller de Graduación
Análisis de percepción sensorial

Carla Patricia Melara Curbelo
27/06/2022
Curbelo

No. Producto	Calificación en cuanto a sabor	Calificación en cuanto a olor
1	5	5
2	5	5
3	5	5
4	5	5
5	5	5
6	5	5
7	5	5
8	5	5
9	5	5

Nota: Favorecer comentar un pedazo de la galleta sola proporcionalmente entre la evaluación de sabor de cada producto y dejar un tiempo de aproximadamente 5 minutos entre la evaluación de olor de cada producto.
La calificación debe realizarse de 0 a 10, siendo 0 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor no sea de su agrado y 10 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor sí sea de su agrado.

Figura 136. Resultados de panel sensorial del producto final (parte IX)

Universidad del Valle de Guatemala
Departamento de Ingeniería Química
Taller de Graduación
Análisis de percepción sensorial

Erika Elizabeth Giron Galvez
27/06/2022

No. Producto	Calificación en cuanto a sabor	Calificación en cuanto a olor
1	5	5
2	5	5
3	5	5
4	5	5
5	5	5
6	5	5
7	5	5
8	5	5
9	5	5

Nota: Favorecer comentar un pedazo de la galleta sola proporcionalmente entre la evaluación de sabor de cada producto y dejar un tiempo de aproximadamente 5 minutos entre la evaluación de olor de cada producto.
La calificación debe realizarse de 0 a 10, siendo 0 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor no sea de su agrado y 10 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor sí sea de su agrado.

Figura 137. Resultados de panel sensorial del producto final (parte X)

Ana Carolina Acosta
 25/04/12
 Universidad del Valle de Guatemala
 Departamento de Ingeniería Química
 Trabajo de Graduación
 Análisis de percepción sensorial

No. Producto	Calificación en cuanto a sabor	Calificación en cuanto a olor
1	7	4
2	8	5
3	8	4
4	5	5
5	5	4
6	8	3
7	8	4
8	5	4
9		

Nota: Favore consumir un pedazo de la galleta soda proporcional a la evaluación de sabor de cada producto y dejar un tiempo de aproximadamente 5 minutos entre la evaluación de olor de cada producto.
 La calificación debe realizarse de 0 a 10, siendo 0 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor no son de su agrado y 10 el valor otorgado a un producto cuyo sabor/olor sí son de su agrado.

XIII. Glosario

- Acetaldehído: componente volátil sintetizado por la enzima alcohol deshidrogenasa y detoxificado por la enzima aldehído deshidrogenasa.
- Acetato: componente volátil producido por la enzima aldehído deshidrogenasa.
- Actividad enzimática: velocidad de la reacción catalizada por la enzima.
- Aerobio: hace referencia a los microorganismos que requieren oxígeno para sobrevivir.
- Agua desmineralizada: hacer referencia a aquella que carece de sales y minerales.
- Anaerobio: hace referencia a los microorganismos que requieren de ausencia de oxígeno para sobrevivir.
- Anaerobio facultativo: hace referencia a los microorganismos que pueden o no utilizar oxígeno para sobrevivir.
- Azúcares fermentables: sustrato utilizado por las levaduras para llevar a cabo la fermentación.
- Betacaroteno: pigmento orgánico de color rojo-naranja.
- Caracterización: determinación de los atributos peculiares.
- Cerveza: bebida obtenida a partir de un proceso de fermentación alcohólica.
- Cocción: etapa del proceso de elaboración de cerveza en la que se añade el lúpulo para aportar sabor y olor.
- Color: propiedad visual que se deriva del espectro de luz que interactúa con las células fotorreceptoras en los ojos.
- Constante de afinidad al sustrato: concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima.
- Desviación estándar: medida de la distribución de datos.
- Dureza del agua: concentración total de los iones de sales presentes.
- Enzima: molécula orgánica que actúa como catalizador en las reacciones químicas.
- Especie: componente a utilizar en el proceso.
- Esterilización: proceso que elimina, mata o inactiva toda forma de vida.

- Etanol: componente volátil orgánico que se produce a partir de una fermentación alcohólica bajo condiciones anaeróbicas.
- Fermentación: reacción en la que una materia prima orgánica se convierte en producto por la acción de enzimas o microorganismos.
- Glucólisis: ruta metabólica que convierte glucosa en piruvato.
- Gravedad: hace referencia a la concentración de azúcares fermentables presentes.
- Inóculo: cantidad de microorganismos o células añadidas a un medio.
- Levadura: microorganismo unicelular.
- Lúpulo: especie de planta utilizada para aportar sabor y olor a la cerveza.
- Maceración: etapa del proceso de elaboración de cerveza en el que se transforma el almidón proveniente de la malta en azúcares fermentables por medio de enzimas.
- Malta: cereal utilizado para elaborar cerveza.
- Maltosa: disacárido compuesto de dos unidades de glucosa.
- Materia prima: materia no procesada que se utiliza para llevar a cabo un proceso y obtener un producto.
- Medio de cultivo: hace referencia a aquel que permite el crecimiento de microorganismos.
- Nivel de confianza: probabilidad máxima con la que es posible asegurar que el parámetro a estimar se encuentra de un intervalo establecido.
- Nivel de significancia: límite para determinar si un resultado es o no estadísticamente significativo.
- Nutriente: sustancia utilizada por un microorganismo para sobrevivir.
- Patógeno oportunista: hace referencia a aquellos microorganismos que pueden causar daño bajo condiciones determinadas, como por ejemplo, una disminución de los mecanismos inmunitarios en sujetos inmunocomprometidos.
- Percepción: organización, identificación e interpretación de la información.
- Producto: compuesto obtenido a partir de un proceso o ruta metabólica.
- Propagación: hace referencia al aumento en la concentración de microorganismos con respecto al tiempo.
- Ruta metabólica: sucesión de reacciones químicas donde un sustrato se transforma para formar producto/s.
- Sensorial: hace referencia a los sentidos de sabor, olor, vista y tacto.
- Sustrato: compuesto que ingresa a un proceso o ruta metabólica para su conversión a productos.

- Toxicidad: grado en el que un compuesto puede dañar a un organismo.
- Turbidez: hace referencia a la cantidad de partículas en suspensión en un líquido.