

**EVALUACIÓN DE PERFILES FERMENTATIVOS PARA LA ELABORACIÓN DE
CERVEZA ARTESANAL POR LEVADURAS NATIVAS**

**NICHOLE ANDREA AMAYA JIMENEZ
LINA MARCELA DIAZ PASCAGAZA**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2019**

**EVALUACIÓN DE PERFILES FERMENTATIVOS PARA LA ELABORACIÓN DE
CERVEZA ARTESANAL POR LEVADURAS NATIVAS**

**NICHOLE ANDREA AMAYA JIMENEZ
LINA MARCELA DIAZ PASCAGAZA**

**Proyecto integral de grado para optar al título de:
INGENIERO QUÍMICO**

**Director
DIANA MILENA MORALES FONSECA
Microbióloga MSc Ing. Química**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2019**

Nota de aceptación:

Ing. Alexander Jiménez Rodríguez

Ing. Diana Milena Morales Fonseca

Bogotá D.C., noviembre de 2019

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del claustro

Dr. Mario Posada García-Peña

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. Luis Jaime Posada García-Peña

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dra. Ana Josefa Herrera Vargas

Decano Facultad de Ingenierías

Ing. Julio César Fuentes Arismendi

Director Programa de Ingeniería Química

Ing. Leonardo De Jesús Herrera Gutiérrez

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

DEDICATORIA

Agradecerle a Dios por darme la oportunidad de culminar este camino, por darme la fortaleza para superar cada obstáculo y acompañarme en cada paso que daba. A mi madre Sandra Jiménez y mi padre Jairo Amaya, por todo el esfuerzo que realizaron para que yo pudiera culminar mi formación profesional, por apoyarme y amarme, todo esto se lo debo a ustedes. A Cesítar por sus palabras de aliento en los momentos adecuados y su paciencia en este recorrido. A mi tío William porque con su ayuda pude llevar a cabalidad mi carrera. A Cony por haber confiado en mí e interceder para dar inicio a este proyecto. A la cervecería Manigua por haber contribuido en el desarrollo de este proceso. Finalmente, a los maestros especialmente Diana Morales por su acompañamiento y orientación, y a mis amigos aquellos que marcaron cada etapa de este camino universitario.

Nichole Andrea Amaya Jiménez

DEDICATORIA

Quiero agradecer principalmente a Dios por permitirme prepararme como profesional, porque de su mano y su voluntad logré culminar esta etapa de mi vida.

También a mis padres porque con su esfuerzo día a día en su trabajo me demostraron todo el amor que me tienen, dándome la oportunidad de hacer lo que más me gusta, servir a una sociedad por medio de mi labor como ingeniera química.

A mi mejor amiga Catalina Castiblanco, porque con su creatividad sin límites nos apoyó en este proyecto cuando lo necesitamos y con su amor incondicional me sostuvo hasta el final.

A la vida por poner en mi camino a Nichole Andrea Amaya Jiménez para ser mi compañera de proyecto de grado, porque con su trabajo, esfuerzo y dedicación se logró culminar con gran éxito y con sus actos y palabras logro enseñarme lecciones de gran valor para mi vida tanto profesional como personal.

A la docente Diana Milena Morales Fonseca, directora del proyecto, por su apoyo incondicional desde el inicio, por transmitirnos su conocimiento día a día y por su paciencia corrigiendo cada falla.

Al comité de proyecto de grado, el cual bajo sus comentarios constructivos nos guiaron por el camino correcto para realizar este proyecto y culminarlo de manera exitosa.

Al personal de la Cervecería Artesanal de los Andes, quienes con su apoyo, conocimiento y colaboración nos dieron la posibilidad de enriquecer nuestro conocimiento en el proceso.

A mis compañeros de carrera que nos apoyaron en su momento y compartieron con nosotras experiencias inolvidables.

A todo el personal que labora en la fundación Universidad de América por su atención y colaboración constante para la elaboración de este proyecto.

Por último, quiero agradecer a mi ángel Natalia Ramírez quien con su amor incondicional me ha apoyado en todo momento y siempre ha querido lo mejor para mí, me llevó a vivir una locura y conocer personas a quienes ahora considero mi familia Qhantati, en ellos encontré apoyo, amor e impulso para lograr cosas que jamás imaginé.

Lina Marcela Diaz Pascagaza

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	24
OBJETIVOS	25
1. MARCO TEÓRICO	26
1.1 FERMENTACIÓN	26
1.1.1 Fermentación alcohólica	26
1.1.2 Fermentaciones espontáneas	29
1.1.3 Microorganismos fermentadores en industria de alimentos	31
1.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS LEVADURAS	32
1.2.1. Levadura de género <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
1.2.2 Levaduras No <i>Saccharomyces</i>	34
1.2.3 Requerimientos ambientales y nutricionales para el crecimiento y desarrollo óptimo de la levadura	35
1.2.4 Nichos ecológicos de las levaduras	40
1.3 INDUSTRIA CERVECERA	41
1.3.1 Proceso de elaboración de la cerveza	41
1.3.2 Microorganismos alteradores de la cerveza	45
1.3.2.1 Sabores indeseados en la producción de la cerveza	46
1.4 MARCO LEGAL	48
2. AISLAMIENTO DE LAS LEVADURAS CON PERFILES FERMENTATIVOS A PARTIR DE TRES FRUTOS (MARACUYÁ, CIRUELA Y GUAYABA) A TRAVÉS DE MEDIOS DE CULTIVOS SELECTIVOS	49
2.1 INTRODUCCIÓN	49
2.2 MATERIALES Y EQUIPOS	49
2.2.1 Equipos y materiales utilizados en la experimentación	49
2.3 METODOLOGÍA	53
2.3.1 Selección y preparación de frutos para el proceso de aislamiento	53
2.4 PRE- ENRIQUECIMIENTO DE MICROBIOTA PRESENTE EN FRUTOS	56
2.4.1 Aislamiento en medio sólido Sabouraud, a partir de los caldos de pre enriquecimiento	57
2.4.1.1 Caracterización de los aislamientos en medio sólido Agar Sabouraud con cloranfenicol	59
2.5 DIFERENCIACIÓN DE LEVADURAS EN AGAR LISINA Y AGAR SABOURAUD CON CICLOHEXIMIDA	60
2.5.1 Diferenciación en medio sólido lisina	61
2.5.1.1 Caracterización morfológica de los pases en agar lisina	64
2.5.1.2 Comparación morfológica entre las 12 cepas obtenidas en agar lisina y la cepa control	64

2.5.1.3 Selección de cepas diferenciadas en agar lisina	65
2.5.1.4 Diferenciación en agar Sabouraud con cicloheximida	66
2.6 PRUEBAS API	67
2.7 AISLAMIENTO DE LEVADURAS A PARTIR DE CALDOS SABOREAUD CON FRUTOS MADUROS	70
2.7.1 Caracterización morfológica de las colonias en dilución de 1:100.000	71
2.8 PASES EN MEDIO DE CULTIVO DISTINTIVO AGAR LISINA	76
2.9 CEPAS SELECCIONADAS POR MORFOLOGÍA SIMILAR AL GÉNERO SACCHAROMYCES	79
2.10 AISLAMIENTO EN AGAR SABOURAUD CON CICLOHEXIMIDA	80
2.11 PRUEBAS API 20C AUX	84
3. ANALIZAR LOS PERFILES DE FERMENTACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS BAJO PRUEBAS PRELIMINARES DE FERMENTACIÓN	91
3.1 INTRODUCCIÓN	91
3.2 MATERIALES Y EQUIPOS	91
3.2.1 Equipos y materiales utilizados en la experimentación	91
3.3 METODOLOGÍA	96
3.3.1 Diseño de experimentos	96
3.3.2 Identificación de la pregunta de investigación	96
3.3.3 Elección de los factores, los niveles y los rangos	96
3.3.3.1 Identificación de las variables dependientes	96
3.3.3.2 Identificación de las variables independientes	97
3.3.4 Selección de la variable respuesta	99
3.3.5 Elección del diseño experimental	99
3.4 PROCESOS DE FERMENTACIÓN CON LAS CEPAS P, N (MARACUYÁ) y D (CIRUELA)	101
3.4.1 Preparación del inóculo	103
3.4.2 Determinación de la concentración de biomasa	104
3.4.3 Procesos de fermentación	107
3.5 TOMA DE MUESTRAS	109
3.6 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	111
3.6.1 Determinación de azúcares reductores por aplicación del método DNS	112
3.6.2 Determinación de la concentración de glucosa presente en las muestras	112
3.7 PLANTEAMIENTO DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS	115
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	115
3.8.1 Prueba de homogeneidad de varianzas	115
3.8.2 Prueba de normalidad	117
3.9 ANÁLISIS DE VARIANZAS (ANOVA)	118
3.10 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA	123
3.11 ANÁLISIS DE RESULTADOS	123

3.12 PROCESOS DE FERMENTACIÓN CON LAS CEPAS P, N DEL FRUTO DE MARACUYÁ Y D DEL FRUTO DE CIRUELA	124
3.12.1 Determinación de la concentración de biomasa	124
3.12.2 Procesos de fermentación	125
3.13 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	127
3.13.1 Análisis de la concentración de glucosa por aplicación del método DNS	127
3.13.1.1 Curva de calibración	127
3.13.1.2 Determinación de la concentración de glucosa como azúcar reductor presente en las muestras	129
4. ESTABLECIMIENTO DEL DESEMPEÑO DE LA CEPA SELECCIONADA CON MEJOR PERFIL FERMENTATIVO PARA LA ELABORACIÓN DE UNA CERVEZA TIPO ALE	134
4.1 INTRODUCCIÓN	134
4.2 METODOLOGIA	134
4.2.1 Pre experimentación fermentaciones	134
4.2.2 Procesamiento de muestras	134
4.2.2.1 Determinación del potencial de hidrógeno, pH	134
4.2.2.2 Determinación de la densidad	135
4.2.2.3 Determinación del porcentaje alcohólico aproximado	136
4.2.2.4 Porcentaje de atenuación	137
4.3 ELABORACIÓN DE LA CERVEZA ARTESANAL TIPO ALE	138
4.3.1 Preparación de cerveza artesanal	138
4.3.1.1 Materias primas	140
4.3.1.2 Procedimiento	142
4.3.1.3 Caracterización de la cerveza artesanal	145
4.3.1.4 Determinación de la densidad	145
4.3.1.5 Análisis microbiológico	146
4.3.1.6 Formato sensorial BJCP	147
4.4 PRE EXPERIMENTACIÓN DE FERMENTACIONES EMPLEANDO LA CEPA D, <i>CÁNDIDA TROPICALIS</i>	150
4.4.1 Determinación de la concentración de biomasa	150
4.4.2 Procesamiento de muestras	151
4.4.2.1 Determinación de la concentración de glucosa presente en la fermentación	152
4.5 PRE EXPERIMENTACIÓN DE FERMENTACIONES EMPLEANDO LA CEPA PATRÓN, <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> (SAF ALE K-97)	153
4.5.1 Determinación de la concentración de biomasa	153
4.5.2 Procesamiento de muestras	154
4.5.2.1 Determinación de la concentración de glucosa presente en la fermentación	155

4.6 CARACTERIZACIÓN DE LA CERVEZA ARTESANAL TIPO ALE EMPLEANDO LA CEPA D	156
4.6.1 Análisis microbiológico	158
4.6.2 Análisis sensorial de la cerveza artesanal empleando la cepa “D”	162
4.7 CARACTERIZACIÓN DE LA CERVEZA TIPO ALE EMPLEANDO LA CEPA PATRÓN	167
4.7.1 Análisis sensorial de la cerveza artesanal empleando la cepa patrón	169
5. CONCLUSIONES	174
6. RECOMENDACIONES	176
BIBLIOGRAFIA	177
ANEXOS	186

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Ecuación de Monod	38
Ecuación 2. Numero de datos para el análisis de varianzas	119
Ecuación 3. Suma de cuadrados totales	119
Ecuación 4. Suma de cuadrados entre factores A	119
Ecuación 5. Suma de cuadrados entre factores B	119
Ecuación 6. Suma de cuadrados entre factores AB	119
Ecuación 7. Suma de cuadrados dentro de tratamiento	120
Ecuación 8. Ecuación para determinación del porcentaje alcohólico aproximado	137
Ecuación 9. Porcentaje de atenuación	138
Ecuación 10. Numero de datos para el análisis de varianzas.	235
Ecuación 11. Suma de cuadrados totales	235
Ecuación 12. Suma de cuadrados entre factores A	235
Ecuación 13. Suma de cuadrados entre factores B	235
Ecuación 14. Suma de cuadrados entre factores AB	235
Ecuación 15. Suma de cuadrados dentro de tratamiento	236

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Equipos y materiales utilizados en la experimentación	50
Cuadro 2. Composiciones de la galería API 20AUX	69
Cuadro 3. Siembra de la dilución 1:100.000	71
Cuadro 4. Denominación de las cepas	71
Cuadro 5. Morfología de las colonias	72
Cuadro 6. Primer y cuarto pase de la cepa L	77
Cuadro 7. Quinto Pase de la cepa A junto con las cepas de referencia	79
Cuadro 8. Asilamiento en agar sabouraud con cicloheximida	81
Cuadro 9. Identificación del género de la cepa P a partir de pruebas API 20 C AUX	85
Cuadro 10. Identificación del género de la cepa D a partir de pruebas API 20 C AUX	86
Cuadro 11. Identificación del género de la cepa N a partir de pruebas API 20 C AUX	87
Cuadro 12. Identificación del género de la cepa L a partir de pruebas API 20 C AUX	88
Cuadro 13. Identificación del género de la cepa A a partir de pruebas API 20 C AUX.	89
Cuadro 14. Equipos y materiales utilizados en la experimentación	91
Cuadro 15. Cantidades de materia prima utilizadas para la elaboración de la cerveza artesanal	142
Cuadro 16. Equipos y materiales utilizados en la elaboración de la cerveza artesanal	142

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Matriz de decisión para la elección de los frutos seleccionados para el proceso de aislamiento	54
Tabla 2. Interrelación de los rangos y niveles	99
Tabla 3. Tabla de análisis de varianza ANOVA	101
Tabla 4. Datos de la concentración de glucosa	115
Tabla 5. Resultados de la Prueba de normalidad para el factor cepa seleccionada	118
Tabla 6. Resultados de la Prueba de normalidad para el factor tiempo	118
Tabla 7. Análisis de varianza ANOVA	120
Tabla 8. Valores de la media estadística como estadístico descriptivo, de cada una de las cepas	123
Tabla 9. Datos del peso inicial de los tubos Falcon y peso final con la biomasa seca	124
Tabla 10. Datos de la concentración de biomasa para cada cepa y sus réplicas	125
Tabla 11. Datos promedio de la concentración de biomasa de cada una de las cepas	125
Tabla 12. Tabla de datos de solución patrón de glucosa y agua destilada	128
Tabla 13. Promedio y desviación estándar de los datos de absorbancia	128
Tabla 14. Datos para la curva de calibración	128
Tabla 15. Comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo en los procesos de fermentación con la cepa N	130
Tabla 16. Comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo en los procesos de fermentación con la cepa P	130
Tabla 17. Comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo en los procesos de fermentación con la cepa D	131
Tabla 18. Parámetros de calificación	149
Tabla 19. Datos del peso inicial de los tubos Falcon y peso final con la biomasa seca, cepa D	150
Tabla 20. Datos de la concentración de biomasa de la cepa D y sus réplicas	150
Tabla 21. Resultados de los parámetros determinados en la pre experimentación con la cepa D	151
Tabla 22. Datos promedio de absorbancia y la concentración de glucosa obtenidos con la cepa D	152
Tabla 23. Datos del peso inicial de los tubos falcon y peso final con la biomasa, cepa patrón	153
Tabla 24. Datos de la concentración de biomasa de la cepa Patrón y sus réplicas	154

Tabla 25. Resultados de los parámetros determinados en la pre experimentación con la cepa patrón	154
Tabla 26. Datos promedio de absorbancia y concentración de glucosa obtenidos con la cepa patrón	155
Tabla 27. Resultados de los parámetros determinados en la cerveza artesanal elaborada con la cepa D	158
Tabla 28. Análisis microbiológico de la cerveza artesanal	161
Tabla 29. Análisis maestro cervecero Juan Sebastián Rodríguez	163
Tabla 30. Análisis maestro cervecero César Salcedo	164
Tabla 31. Análisis maestro cervecero Juan Carlos Riveros	165
Tabla 32. Análisis maestro cervecero Daniel Amezquita	166
Tabla 33. Resultados de los parámetros determinados en la cerveza artesanal elaborada con la cepa patrón	169
Tabla 34. Análisis maestro cervecero Juan Sebastián Rodríguez	170
Tabla 35. Análisis maestro cervecero César Salcedo	171
Tabla 36. Análisis maestro cervecero Juan Carlos Riveros	172
Tabla 37. Análisis maestro cervecero Daniel Amezquita	173

LISTA DE ILUSTRACIONES

	pág
Ilustración 1. Transformación de piruvato a etanol	28
Ilustración 2. Reacciones en el proceso del glucólisis	29
Ilustración 3. Curva de crecimiento	36
Ilustración 4. Procesos de elaboración de cerveza tradicional	42
Ilustración 5. Cambios sensoriales de la cerveza a través del tiempo	47
Ilustración 6. Pre enriquecimiento de la microbiota	57
Ilustración 7. Procesos de fermentación 72 horas, cepa N	126
Ilustración 8. Procesos de fermentación 72 horas, cepa P	126
Ilustración 9. Procesos de fermentación 72 horas, cepa D	126
Ilustración 10. Determinación de la densidad en la cerveza artesanal con la cepa D	157
Ilustración 11. Recuento de hongos y levaduras, dilución 10^{-3}	159
Ilustración 12. Recuento de hongos y levaduras, dilución 10^{-2}	159
Ilustración 13. Recuento de hongos y levaduras, dilución 10^2	160
Ilustración 14. Recuento de E. coli y coliformes	160
Ilustración 15. Recuento de mesófilos aerobios, dilución 10^{-2}	161
Ilustración 16. Recuento de mesófilos aerobios, dilución 10^{-1}	161
Ilustración 17. Determinación de la densidad en la cerveza artesanal con la cepa patrón	168

LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Distribución F para la homogeneidad de varianzas de los datos	117
Gráfica 2. Distribución F para el factor A, efecto del tiempo sobre la concentración de glucosa	121
Gráfica 3. Distribución F para el factor B, efecto de la cepa seleccionada sobre la concentración de glucosa	121
Gráfica 4. Distribución F para el factor de interacción AB, efecto de la interacción entre el tiempo de fermentación y la cepa seleccionada sobre la concentración de glucosa	122
Gráfica 5. Curva de calibración de glucosa	129
Gráfica 6. Comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo para la cepa N	131
Gráfica 7. Comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo para la cepa P	132
Gráfica 8. Comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo para la cepa D	132
Gráfica 9. Comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo para la cepa D en la pre experimentación	153
Gráfica 10. Comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo para la cepa patrón.	156
Gráfica 11. Distribución F para el factor A, efecto del tiempo sobre la concentración de glucosa.	236
Gráfica 12. Distribución F para el factor B, efecto de la cepa seleccionada sobre la concentración de glucosa.	237
Gráfica 13. Distribución F para el factor de interacción AB, efecto de la interacción entre el tiempo y la cepa seleccionada sobre la concentración de glucosa	238

LISTA DE DIAGRAMAS

	pág.
Diagrama 1. Aislamiento de microbiota presente en frutos	56
Diagrama 2. Aislamiento a partir de caldos en medio de cultivo sólido, Agar Sabouraud con cloranfenicol	59
Diagrama 3. Caracterización morfológica de las cepas	60
Diagrama 4. Diferenciación de levaduras en agar lisina y agar Sabouraud en cicloheximida	61
Diagrama 5. Pases de las cepas de Maracuyá (A, B, N, P), Guayaba (I, J, G, H), Ciruela (L, M, C, D). y cepa patrón en medio de cultivo agar lisina	64
Diagrama 6. Distinción de cepas del genero <i>Saccharomyces</i> de No <i>Saccharomyces</i>	65
Diagrama 7. Cepas diferenciadas en agar lisina	66
Diagrama 8. Aislamientos en agar sabouroud con cicloheximida	67
Diagrama 9. Pruebas API 20 C AUX	70
Diagrama 10. Procedimiento para la elaboración de las fermentaciones para el diseño de experimental propuesto	103
Diagrama 11. Procedimiento para la para la preparación del inóculo	104
Diagrama 12. Procedimiento para la determinación de la concentración de biomasa	106
Diagrama 13. Procedimiento para el montaje de los procesos de fermentación	108
Diagrama 14. Procedimiento para la toma de muestras de las unidades de fermentación	110
Diagrama 15. Proceso para el procesamiento de muestras	111
Diagrama 16. Procedimiento para la determinación de la concentración de glucosa aplicando el método DNS	114
Diagrama 17. Determinación del potencial de hidrogeno, pH	135
Diagrama 18. Determinación la densidad relativa de las muestras	136
Diagrama 19. Procedimiento para la elaboración de la cerveza artesanal	139
Diagrama 20. Procedimiento obtención de cervezas	144
Diagrama 21. Determinación de la densidad	146

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Ficha técnica caldo sabouraud dextrose broth	187
Anexo B. Ficha técnica agar sabouraud con cloranfenicol	191
Anexo C. Ficha técnica agar lisina	192
Anexo D. Ficha técnica del agar sabouraud con cloranfenicol y cicloheximida	194
Anexo E. Diluciones seriadas de 1:5 hasta 1:100.000	196
Anexo F. Pases completos de las doce cepas en agar lisina por siembra en agotamiento	198
Anexo G. Quinto pase de cepas seleccionadas junto con las cepas de referencia	228
Anexo H. Desarrollo de la curva de calibración para la determinación de azúcares reductores totales	232
Anexo I. Protocolo para la preparación del reactivo DNS	234
Anexo J. Calculos del análisis de varianza anova para el diseño de experimentos	235
Anexo K. Especificaciones potenciometro SI Analytics	239
Anexo L. Ficha técnica levadura <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> , agente emulsionante E491	240
Anexo M. Formato sensorial de la organización beer scoresheet (BJCP)	241
Anexo N. Determinación del porcentaje alcoholico aproximado de la cerveza artesanal	242
Anexo Ñ. Determinación del porcentaje de atenuación de la cerveza artesanal	243
Anexo O. Análisis del maestro cervecero Juan Sebastián Rodríguez cerveza cepa D	244
Anexo P. Análisis del maestro cervecero Cesar Salcedo cerveza cepa D	245
Anexo Q. Análisis del maestro cervecero Juan Carlos Riveros cerveza cepa D	246
Anexo R. Análisis del maestro cervecero Daniel Amezquita cerveza cepa D	247
Anexo S. Análisis del maestro cervecero Juan Sebastián Rodríguez cerveza cepa patrón	248
Anexo T. Análisis del maestro cervecero Cesar Salcedo cerveza cepa patrón	249
Anexo U. Análisis del maestro cervecero Juan Carlos Riveros cerveza cepa patrón	250
Anexo V. Análisis del maestro cervecero Daniel Amezquita cerveza cepa patrón	251

GLOSARIO

AISLAMIENTO: es la separación de un determinado microorganismo del resto de microorganismos que le acompañan. El método más usual es la siembra por estría sobre un medio de cultivo sólido adecuado dispuesto en una placa de petri¹.

ALE: estilo de cerveza de origen inglés. Para su elaboración se utiliza levadura ale que fermenta en la parte superior del fermentador y a una temperatura entre los 18 y 24 grados centígrados².

ALFA ÁCIDOS: es una de las resinas que se encuentran en el lúpulo utilizado para la elaboración de la cerveza. Su mayor aporte es el amargor, de modo que, a mayor porcentaje de alfa ácidos, mayor amargor³.

ANÁLISIS SENSORIAL: es el examen de los atributos de la cerveza mediante los sentidos (vista, olfato, gusto y tacto), obteniendo datos cuantificables y objetivos, siendo útil para medir atributos en cerveza artesanal⁴.

CERVEZA: líquido resultante de la fermentación alcohólica de un mosto rico en azúcares obtenido a partir de cereales malteados⁵.

DESAMINACIÓN: el AA pierde el grupo amino y pasa a α -cetoácido. Esta reacción reversible puede convertir el GLU en α -cetoglutarato para su degradación, pero también puede sintetizar GLU⁶.

¹ AISLAMIENTO. En: Introducción. [sitio web]. [consultado: 21 julio 2019]. Disponible en: <https://www.ugr.es/~pomif/pom-bac/pb-iv/pb-iv-2-introduccion.htm>.

² BAVARIA. Su cata cervecera. En: cata cervecera bavaria. (consultado 28 octubre 2019) Archivo pdf. Disponible en: <https://www.bavaria.co/sites/default/files/201709/cata-cervecera-bavaria.pdf>

³ AGUDELO, Luisa y VARGAS. Miller. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CERVEZA ARTESANAL "TAWALA" USANDO KIWI COMO FRUTA ADICIONAL. Trabajo de grado. Fundación Universidad de América, 2018. P. 17 [Consultado: 15 septiembre 2019]. Disponible en: <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6835/1/6132130-2018-IQ.pdf>.

⁴ PEREZ, Carolina. Evaluación Sensorial de Cerveza. En: B.A. Malt S.A. [sitio web]. [Consultado 13 julio 2019]. Archivo pdf. Disponible en: http://somoscerveceros.com/wp-content/plugins/downloadsmanager/upload/3_evaluacion_sensorial_santafe2008.pdf.

⁵ BAVARIA, Op., cit. p.71.

⁶ REACCIONES GENERALES DE AMINOACIDOS. En: metabolismo de compuestos nitrogenados. [sitio web].2011. [Consultado 18 agosto 2019]. Disponible en: http://www3.uah.es/bioquimica/Tejedor/bioquimica_quimica/R-T20-1-Rgenerales.pdf.

DESCARBOXILACIÓN: conocido propiamente como lisina descarboxilasa, siendo inducida a una elevada acidez extracelular, baja tensión oxígeno y concentraciones elevadas de aminoácido en cuestión⁷.

DIACETILO: este compuesto es producido por la levadura durante la fermentación y posteriormente es absorbido por ella⁸.

DNS: el ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) es el encargado de calcular la concentración de azúcares reductores en distintos materiales⁹.

ESTERES: compuestos aromáticos formados a partir de alcoholes por acción de la levadura, típicamente huele a afrutado¹⁰.

FERMENTACIÓN: la fermentación alcohólica es un proceso anaerobio realizado por las levaduras y algunas clases de bacterias, estos microorganismos transforman el azúcar en alcohol etílico y dióxido de carbono¹¹.

IBU: acrónimo de International Bitterness Unit. Unidad norteamericana usada para medir el amargor de la cerveza. Un IBU es igual a un miligramo de alfa-ácido por cada litro de cerveza¹².

⁷ REVELLES. Olga. Catabolismo de lisina en bacterias. En: Caracterización de las rutas de catabolismo del L- Lisina en Pseudomonas putida KT2440. Trabajo de grado. Universidad de granada, 2005. p. 20. [Consultado: 22 septiembre 2019]. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/15437346.pdf>

⁸ CHAMORRO. David. Elaboracion de un plan de negocios para la produccion de cerveza artesanal.Trabajo de titulacion. Universidad Austral de chile. Chile. 2012.p.5.(consultado: 28 octubre 2019).Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2012/bpmfcic448e/doc/bpmfcic448e.pdf>

⁹ BELLO, Daniel, CARRERA, Emilia y DIAZ, Yuset. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. [en línea]. En: ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, mayo-agosto, 2006, vol. XL .p. 45-50. [Consultado 22 septiembre 2019]. ISSN. 0138-6204. Diponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120664006>.

¹⁰ CAHMORRO, Op., cit. p. 5.

¹¹ BRIÑEZ. Sebastian, FORERO.Andres. Plan de negocio para la producción de cerveza artesanal r ubia en el municipio de cogua - Cundinamarca. Trabajo de tesis. Universidad católica de Colombia. Colombia. 2017. P. 8. (consultado: 28 octubre 2019). Disponible en: <https://repository.ucatolica.edu.co/bitstream/10983/15601/1/PLAN%20DE%20NEGOCIO%20PARA%20LA%20PRODUCCI%C3%93N%20DE%20CERVEZA%20ARTESANAL%20RUBIA%20EN%20EL%20MUNICIPIO%20DE%20COGUA%20-%20CUNDINAMARCA.pdf>

¹² REVELLES, Op., cit. p. 17.

INOCULAR: introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento¹³.

MACERACIÓN: proceso de extracción entre materias de diferentes estados físicos de sólido-líquido, en el cual los compuestos químicos de interés se encuentran en la materia sólida, y que estos poseen solubilidad; se usa un líquido que permita su extracción¹⁴.

MOLIENDA: operación unitaria que reduce el volumen promedio de las partículas de una muestra sólida¹⁵.

NO SACCHAROMYCES: forman parte de un consorcio fundamental en la fermentación de bebidas alcohólicas, ya que son estas las responsables de aportar la mayoría de las características organolépticas a los fermentos, los cuales en la mayoría de los casos enriquecen el aroma y/o sabor de las bebidas alcohólicas¹⁶.

¹³ SANTAMBROSIO, Eduardo. ORTEGA, Marta y GARIBALDI, Pablo. Siembra y recuento de microorganismos. En: Catedra de biotecnología. [sitio web]. [Consultado: 23 junio 2019]. Archivo pdf. Disponible en: https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicolll.pdf

¹⁴ BRIÑEZ, Op., cit. p. 8.

¹⁵ Ibid. p. 8.

¹⁶ ACEVEDO, Aaron. Et al. Importancia de las levaduras no- Saccharomyces durante la fermentación de bebidas alcohólicas. [en línea]. En: Investigación y Ciencia, mayo- agosto, 2015, Vol. 23. P. 73-79. [Consultado 28 septiembre 2019]. ISSN. 1665-4412. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/674/67443217010.pdf>

RESUMEN

El consumo de cervezas artesanales cada vez toma mayor fuerza, puesto que el mercado se enfrenta a un consumidor que desea nuevas experiencias y sabores a los tradicionalmente ofrecidos por la industria cervecera, por lo anterior es de interés la búsqueda de nuevas materias primas (maltas) e incluso microorganismos fermentadores que puedan ofrecer otras características organolépticas, a partir de ello se realizó el aislamiento y estudio de levaduras que pudieran ofrecer otras características sensoriales a la cerveza tradicional tipo ale de una de las principales cervecería artesanales de Bogotá.

Los aislamientos se concentraron en levaduras nativas, las cuales son las encargadas de metabolizar los azúcares contenidos en el mosto para convertirlos en etanol. Para esto, se seleccionaron tres frutos maduros (maracuyá, ciruela y guayaba) los cuales tendían un alto contenido de microbiota, que fue aislada en medios selectivos para eucariotas, luego se realizó una selección de cepas de levaduras, las cuales se diferenciaron en *Saccharomyces* y *No Saccharomyces*, en agar lisina y posteriormente en agar Sabouraud con cicloheximida (antibiótico). Por último, se aplicaron pruebas API 20C AUX las cuales permiten determinar el género de las levaduras, en donde se obtuvo como resultado, el aislamiento de cepas correspondientes al género *Candida tropicalis*.

Para la determinación de la cepa con mejor perfil fermentativo se llevó a cabo un análisis estadístico, que determinó cuál de las cepas P, N (aisladas del maracuyá) y D (aislada de ciruela), podría describir una mejor concentración de glucosa como azúcar reductor presente en el mosto, siendo el parámetro a analizar (variable respuesta); dicha concentración de glucosa fue determinada por la técnica de cuantificación de azúcares reductores DNS. Las fermentaciones del mosto estándar se realizaron por las tres cepas en un tiempo total de 96 horas. Una vez seleccionada la cepa de mejor perfil fermentativo se elaboró una cerveza artesanal tipo Ale con características organolépticas propias generadas por estas cepas.

Finalmente se llevó a cabo la determinación de compuestos aromáticos de manera cualitativa presentes en el producto final por medio de una evaluación sensorial guiada por el programa de certificación de Beer Judge Certification Program (BJCP); en donde cuatro catadores certificados evaluaron las características organolépticas de la cerveza obtenida empleando la cepa seleccionada y de la cerveza obtenida empleando una cepa patrón (tipo *Saccharomyces*), que es la levadura utilizada actualmente por la cervecería artesanal, con el objetivo de determinar los nuevos perfiles sensoriales encontrados.

Palabras claves: perfiles fermentativos, cerveza artesanal, levaduras nativas.

INTRODUCCIÓN

Una de las razones que motivaron a la creación de esta Cervecería Artesanal, en el año 2011, fue la necesidad de generar una cerveza tipo gourmet que invitaba a experimentar nuevos sabores, marcando un equilibrio entre un producto gastronómico y una bebida alcohólica. Teniendo en cuenta la gran diversidad que posee Colombia, y la oportunidad tangible de ser aprovechada, en cuanto a frutos se refiere, se busca, la obtención de levaduras aptas en el proceso de fermentación para la elaboración de una cerveza artesanal diferente a las ya ofrecidas al consumidor, ya que esto permite conservar la esencia de esta bebida, la cual se elabora como su nombre lo dice de manera artesanal, manteniendo un mayor control desde el inicio hasta el fin, diferenciándola en muchos aspectos de una cerveza elaborada industrialmente teniendo en cuenta que su proceso de elaboración es estandarizado, haciendo que se pierda la oportunidad de innovar ampliamente en características organolépticas.

De esta manera a partir de los microorganismos provenientes de tres frutos (Maracuyá, guayaba y ciruela) implementando la técnica de aislamiento de levaduras nativas, se podrá generar un lado distintivo en la cerveza a elaborar, de manera que se aprovechen las múltiples propiedades que brindan los frutos colombianos y así lograr el uso de los recursos naturales para generar una oportunidad de negocio.

Por lo tanto, hemos desarrollado el estudio de los perfiles fermentativos de dichos microorganismos, a partir del proyecto titulado: “Evaluación de perfiles fermentativos para la elaboración de cerveza artesanal por levaduras nativas”.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar perfiles fermentativos para la elaboración de cerveza artesanal por levaduras nativas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Aislar las levaduras con perfiles fermentativos a partir de tres frutos (maracuyá, ciruela y guayaba) a través de medios de cultivos selectivos.
- ✓ Analizar los perfiles de fermentación de las cepas seleccionadas bajo pruebas preliminares de fermentación.
- ✓ Establecer el desempeño de la cepa seleccionada con el mejor perfil fermentativo para la preparación de una cerveza artesanal tipo ale.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 FERMENTACIÓN

La fermentación se conoce como un proceso de oxidación y reducción donde la energía se produce por fosforilación del sustrato empleado a través de diversas transformaciones moleculares donde el producto obtenido es un compuesto orgánico más energía¹⁷.

De acuerdo con la literatura existen dos tipos de fermentación, la fermentación oxidativa que se clasifica en: acética, oxálica, cítrica y fumárica entre otras, en la cual actúa la presencia del oxígeno y fermentación anoxidativa que se clasifica en: alcohólica, láctica, propiónica y butírica en la cual no hay presencia de éste y en su lugar actúan compuestos orgánicos como los aldehídos¹⁸.

Por otro lado, el producto obtenido del proceso de fermentación depende del sustrato que se emplee en ésta, de si se lleva a cabo en condiciones aerobias o anaerobias, es decir con o sin la presencia del oxígeno y de otros factores externos involucrados a lo largo de dicho proceso.¹⁹

1.1.1 Fermentación alcohólica. En el caso de la elaboración de cerveza el tipo de fermentación involucrada se denomina fermentación alcohólica en la cual, ocurre un proceso de transformación bioquímica para la obtención de energía (ATP), dicho proceso se lleva a cabo en ausencia de oxígeno, esto hace referencia a condiciones anaerobias, empleando como sustrato azúcares que se puedan fermentar con facilidad, es decir azúcares de cadenas cortas y simples llamados monosacáridos ya que las levaduras carecen de la enzima diastasa (amilasa) y por esto no podrían llegar a fermentar moléculas de alta complejidad como por ejemplo los almidones los cuales se deben reducir para ser metabolizados por estas, es por esta razón que en el proceso de elaboración de cerveza es utilizada la malta, también llamada

¹⁷ ESPITIA, Lady Carolina. Determinación de la concentración de alfa y beta amilasas comerciales en la producción de etanol a partir de almidón de cebada empleando *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de grado Microbióloga Industrial. Bogotá D.C. Pontificia Universidad Javeriana. 2009. p.36. [Consultado 15 junio 2018]. Disponible en: <https://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis206.pdf>

¹⁸ JORGENSEN Alfred. Algunas nociones de la fisiología de los microorganismos. En: Microbiología de las fermentaciones industriales. 7 ed. Barcelona, Buenos Aires, México: Hansen Albert 1959. p 80.

¹⁹ MULLER, Ludwig. Fermentación alcohólica. Manual de laboratorio de fisiología vegetal. [En línea]. En: Manual de laboratorio de fisiología vegetal. 1 ed. Turrialba, Costa Rica. 1964.p 92. [Consultado 20 junio 2018]. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=9l8gAQAIAAJ&printsec=frontcover&dq=manual+de+laboratorio+de+fisiologia+vegetal+muller&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiA7Knlwt3kAhXCzVvKHbHfC5UQ6AEIKDAA#v=onepage&q=manual%20de%20laboratorio%20de%20fisiologia%20vegetal%20muller&f=false>

cebada germinada, ya que durante la etapa de germinación produce almidón, el cual debe ser reducido en azúcares fermentables facilitando así su metabolismo.²⁰ Luego de la obtención de azúcares fermentables se llega a la etapa de fermentación alcohólica, donde los productos de mayor importancia a obtener son el etanol, y el dióxido de carbono CO_2 . Cabe resaltar que en el proceso se llega a un punto donde la proporción de etanol en la bebida impide que el microorganismo siga actuando, sin importar que el azúcar haya sido consumido y transformado en su totalidad, y es hasta ese punto donde el microorganismo cumple con su labor sin tener en cuenta si la cantidad de etanol producida es máxima o mínima; por otro lado una de las características más comunes que se debe tener en cuenta al seleccionar la levadura que se va a utilizar, es el nivel de alcohol tolerado, el cual generalmente no excede del 15% al 18% aproximadamente.²¹

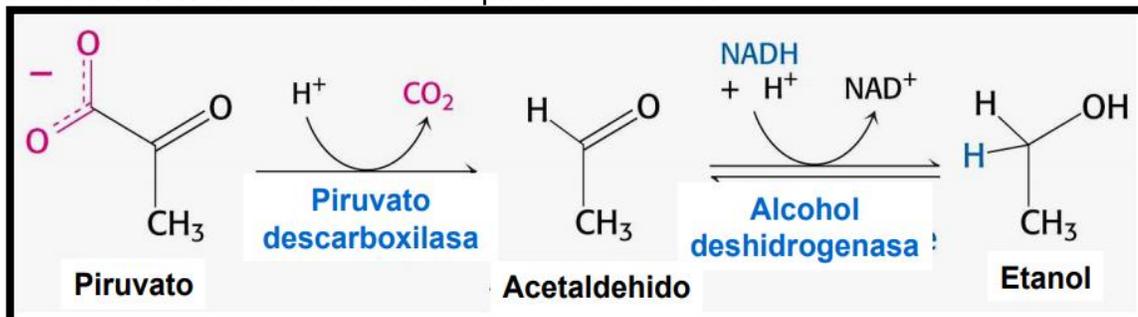
Para la obtención de etanol en el proceso de fermentación alcohólica se debe obtener en primera medida el piruvato, el cual es transformado en aldehído por medio de una descarboxilación generando una pérdida de CO_2 (anhídrido de carbono), una vez generado el aldehído este se convierte en etanol por medio de una reacción de reducción de la coenzima NADH a NAD catalizada por el alcohol deshidrogenasa para finalmente producir etanol o alcohol etílico²² como se muestra en la ilustración 1.

²⁰ MÜLLER. Op. cit., p 92.

²¹ Ibid., p 92.

²² ESPITIA. Op. cit., p. 36.

Ilustración 1. Transformación de piruvato a etanol



Fuente: BERG, Jeremy. TYMOCZKO, Jhon y STRYER, Lubert. Enzima: conceptos básicos y cinética. En: Bioquímica. España: Reverté S.A. 2008. p.216. [Consultado: 18 septiembre 2018]. Disponible en: https://books.google.com.co/books?id=HRr4MNH2YssC&pg=PR1&hl=es&source=gbs_selected_pages&cad=3#v=onepage&q&f=false. ISBN. 978-84-291-7600-1.

Para dar inicio a la producción del etanol se debe obtener el piruvato o ácido pirúvico y para esto es necesario metabolizar los hidratos de carbono también llamados hexosas. Dentro de estos hidratos se encuentra la glucosa, la cual es metabolizada a través de múltiples reacciones químicas por medio de un proceso denominado glucólisis o glicolisis anaerobia, esta vía metabólica tiene como objetivo principal almacenar la energía obtenida de los hidratos de carbono en forma de ATP y NADH para ser utilizada en el proceso de transformación y así obtener el producto deseado, etanol.²³

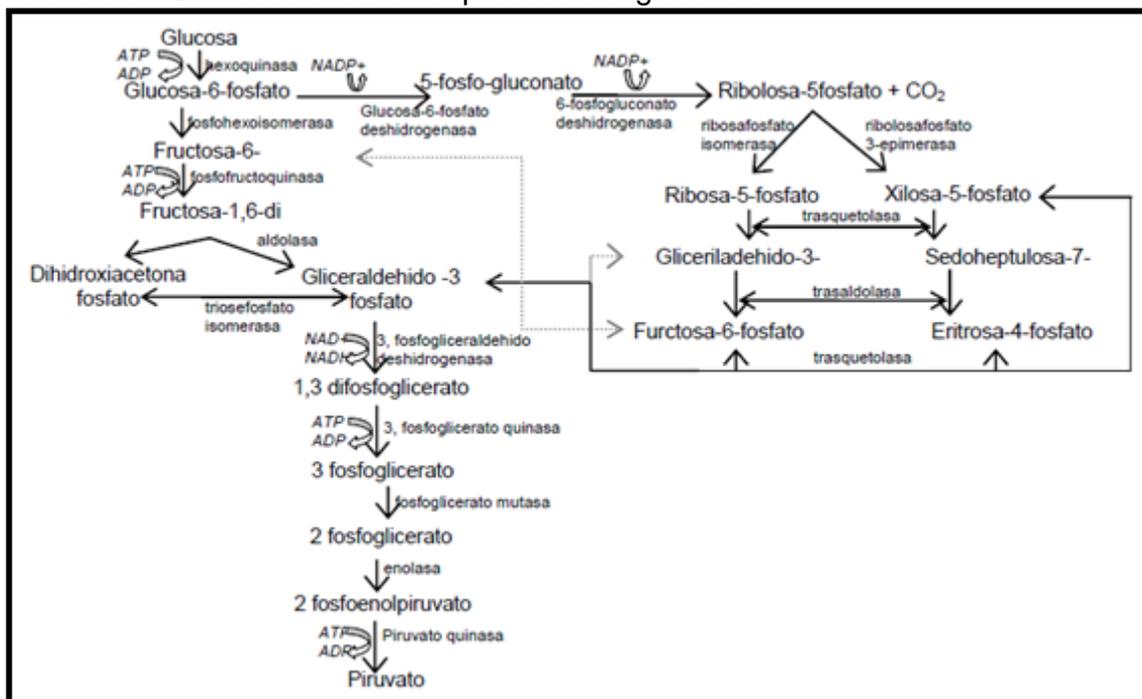
Como se observa en la ilustración 2 las reacciones involucradas en este proceso inician con la reducción de moléculas como la glucosa-6-fosfato (G6P) o fructosa-6-fosfato (F6P) a partir de glucosa, hasta obtener el piruvato dentro de las rutas "Embden-Meyerhof-Parnas" (EMP) y la vía fosfato-pentosa (PP).²⁴ Estas reacciones de oxidación y reducción que se generan a lo largo del proceso de glucólisis se presentan de manera secuencial por medio de procesos como la Fosforilación, isomerización, división y oxidación.²⁵

²³ BERG, Jeremy. STRYER, Lubert y TYMOCZKO, John. Transducción y almacenamiento de la energía. [En línea] En: Bioquímica con aplicaciones clínicas. 7 ed. Barcelona, España. Reverté, 2008. p 447. [Consultado 18 julio 2018]. Disponible en: <http://www.libreriaherrero.es/pdf/REVE/9788429176025.pdf>. ISBN: 978-84-291-7602-5.

²⁴ ACOSTA, Carolina. Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel. Tesis de investigación Magíster en Ingeniería Química. Bogotá D.C. Universidad Nacional de Colombia. 2012. p 5. [Consultado 25 julio 2018]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/9933/1/300060.2012.pdf>.

²⁵ CAMPBELL, Mary. FARRELL, Shawn. La Glucolisis. [En línea]. En: Bioquímica. 4 ed. México. Thomson 2004. p 466. [Consultado 1 agosto 2018]. ISBN: 970-686-335-4.

Ilustración 2. Reacciones en el proceso del glucólisis



Fuente: ACOSTA, Carolina. Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel. Tesis de investigación Magíster en Ingeniería Química. Bogotá D.C. Universidad Nacional de Colombia. 2012. p 6. [Consultado 25 julio 2018]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/9933/1/300060.2012.pdf>.

Por último, cabe resaltar que en el proceso de obtención de etanol también se podrían llegar a generar metabolitos secundarios por medio del piruvato ya que éste puede tomar vías alternas. Estas situaciones son estudiadas en la actualidad con el objetivo de obtener características distintas en un producto final.²⁶

1.1.2 Fermentaciones espontáneas. Las cepas de levaduras convencionales y no convencionales tienen la capacidad de producir etanol bajo distintas condiciones operativas y nutricionales durante el proceso de fermentación, mostrando distintos rendimientos en la producción de biomasa y etanol. Se puede determinar que las fermentaciones espontáneas son las que se producen de forma natural, en donde los procesos no son producto de una sola especie sino de una sucesión de especies y cepas de levaduras diferentes a medida que avanza la fermentación²⁷, ésta se produce por acción de levaduras salvajes.

²⁶ ACOSTA. Op. cit.,p.7.

²⁷ PEREZ, *et al.* Caracterización fermentativa de las levaduras productoras de etanol a partir de jugo de Agave cupreata en la elaboración de mezcal. [En línea]. En: Revista Mexicana de Ingeniería Química. Diciembre,2013. Vol. 12, No. 3. Pág. 452. [Consultado 15 abril 2019] ISSN. 1665-2738. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62029966008>

Los procesos de fermentación espontánea están mediados principalmente por levaduras No *Saccharomyces*, y la especie de levadura que interviene en éste proceso depende de la concentración etanólica del fermento y de la composición del sustrato²⁸. Por otro lado, se demuestra que los métodos y efectos de la fermentación espontánea han aumentado de una manera considerable, se determinan diferentes investigaciones frente a las interacciones levadura- levadura, levadura- bacteria, y las necesidades nutricionales de las fermentaciones en colonias mixtas. Se encuentra la probabilidad de que las fermentaciones espontáneas produzcan mayores características sensoriales que las que se pueden encontrar por lo general en fermentaciones inoculadas, esos procesos pueden ser encontrados en viñedos y bodegas en donde la micro flora va variando según la región en donde se encuentre.²⁹

En épocas anteriores la fermentación espontánea era el único tipo de fermentación que se conocía, ésta ocurre naturalmente cuando se estimula la propagación de la levadura salvaje y los microorganismos que las uvas traían en ellas desde el viñedo.³⁰

Se puede evidenciar que una levadura salvaje puede generar subproductos ya sea en sus olores o sabores inusuales, se ha encontrado que los aromas y estrés imprescindibles generados por la levadura salvaje es lo que puede agregar a su complejidad, donde se genera una naturaleza interesante y sofisticada siendo otorgado por la fermentación espontánea, por lo general este tipo de fermentación se observa en el proceso de vinificación. En este proceso no se pueden predecir los resultados, pero si requiere de mayor cuidado y atención frente a la fermentación inoculada.³¹

²⁸ CASAS, Aarón. et al. Importancia de las levaduras no *Saccharomyces* durante la fermentación de bebidas alcohólicas [En línea]. En: Investigación y ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Mayo- agosto. 2015. Vol. 23. p.75. [Consultado 18 octubre 2018]. ISSN 1665-4412. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67443217010>.

²⁹ MANSFIELD, Anna y TAHIM, Camila. Spontaneous Fermentations [En línea]. En: Wines Vines Analytics. April. 2016, p 1-2. [Consultado 5 agosto 2019]. Disponible en: <https://winesvinesanalytics.com/features/article/168028/Spontaneous-Fermentations>.

³⁰ DIETER, Simon. Spontaneous Fermentation – What’s It All About? [En línea]. En: Weinjournal mit Weinführer. Octubre, 2011. P 1-2. [Consultado 12 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.bonvinitas.com/en/>.

³¹ CHORNIK, Jeff. Wild Yeast: The Pros and Cons of Spontaneous Fermentation. [En línea]. En: Wine marker creating you own great wines. Manchester, 2019. P. 1. [Consultado 17 agosto 2019] Disponible en: https://winemakermag.com/contact_

1.1.3 Microorganismos fermentadores en industria de alimentos. En la industria de los alimentos fermentados existen microorganismos encargados de transformar materias primas para brindar productos al consumidor con características sensoriales distintas como el sabor, el aroma, aspecto visual entre otras.³² Con la particularidad de que estos productos en un inicio eran elaborados de manera artesanal, pero con el paso del tiempo han ido incursionando en la industria, gracias a sus características propias que poseen y por ende la rentabilidad que generan.

Entre los alimentos fermentados que se pueden elaborar desde la antigüedad se encuentran el pan, las bebidas a base de leche como el yogurt, el koumiss, el queso, entre otros, por otro lado se tienen las bebidas alcohólicas como la cerveza y el vino³³, tema que será abordado en este escrito.

En la industria de los alimentos fermentados más específicamente de las bebidas alcohólicas existen microorganismos que cumplen la función de metabolizar los azúcares también conocidos como glúcidos en alcohol o ácidos orgánicos como los aldehídos y las cetonas, en ocasiones produciendo dióxido de carbono u otros gases.

Por medio de la función que cumplen estos microorganismos se logra la obtención de alcoholes como el etanol y ácidos como el acético y el láctico, bebidas fermentadas como la cerveza, el vino, la sidra entre otras; no todos los microorganismos en la naturaleza pueden desempeñar esta función, los encargados de ésta principalmente son las levaduras, pero también existen microorganismos como los hongos filamentosos y las bacterias ácido lácticas (producción de ácido láctico) que pueden hacerlo.³⁴

La mayoría de microorganismos que se encuentran en la literatura se usan en la producción de etanol a escala laboratorio, pero muy pocos se estiman a nivel industrial. Las cepas silvestres por sus diversas características adoptan diferentes compuestos los cuales transforman en etanol, generan distintos rendimientos y subproductos con un estrecho rango de asimilación lo cual hace que tengan poca aplicabilidad a escala piloto y a nivel industrial. Las cepas *Saccharomyces* utilizan

³² RAMÍREZ José. et al. Bacterias lácticas importancia: en alimentos y sus efectos en la salud. Unidad académica de medicina veterinaria y zootecnia. [en línea]. En: Universidad Autónoma de Nayarit. Abril-junio, 2011.p. 2. [consultado 14 noviembre 2018]. ISSN. 2007-0713. Disponible en: <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>

³³ GARIBAY, Mariano. RAMIREZ, Rodolfo y LÓPEZ Agustín. Alimentos y bebidas fermentados tradicionales. [en línea]. En: biotecnología alimentaria. 5 ed. México: Limusa S.A. 2004. p 313. [consultado 15 diciembre 2018]. Disponible en: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/tvolke/Biotecnologia_Alimentaria-Libro.pdf. ISBN.968-16-4522-6.

³⁴ JORGENSEN. Op. cit., p. 2.

sustratos fermentables tales como glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, maltotriosa, galactosa y manosa en condiciones anaerobias a temperaturas de 30 a 37°C, mientras que *Kluyveromyces marxianus*, *Candida shehatae*, *Clostridium thermocellum* utilizan otros sustratos fermentables.³⁵

Las bacterias ácido lácticas se presentan como microorganismos que degradan carbohidratos en ausencia de oxígeno como la lactosa.³⁶ En diferentes ambientes se encuentran muchas de estas bacterias, ya sea en productos lácteos, vegetales, plantas, cereales o carnes donde se emplean para la conservación y manufactura. Este grupo de microorganismos está conformado por diferentes géneros incluyendo: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*.³⁷ Estas bacterias son utilizadas por su habilidad de acidificar y preservar los alimentos de las esporas (microorganismos contaminantes), siendo implicadas en el olor, sabor, textura y aroma desarrollando un papel importante en la fermentación. La función principal de este grupo de bacterias está en la formación de ácidos orgánicos, principalmente de ácido láctico a una velocidad adecuada asegurando que el proceso de fermentación sea consistente y exitoso.³⁸

1.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS LEVADURAS

Las levaduras se encuentran clasificadas como hongos unicelulares, eucariotas los cuales no poseen una taxonomía específica, se pueden encontrar en distintos tamaños, formas (ovaladas, esféricas, cilíndricas o elípticas) y colores³⁹. Por otro lado, su crecimiento es viable a temperaturas entre 0°C y 50°C, pero generalmente ocurre entre 25°C y 30°C ya que este es un rango óptimo para su crecimiento. Su reproducción es asexual y se lleva a cabo por gemación también conocida como fisión binaria, donde una pequeña célula se desprende de la célula adulta para convertirse en levadura por sí misma o por reproducción sexual a través de la formación de esporas que en su proceso de crecimiento tienden a formar colonias

³⁵ MARISCAL, Juan. Evaluación y selección de microorganismos para la producción de etanol a nivel industrial. Magister en ingeniería química. Universidad Nacional de Colombia. 2011. p.9. [Consultado 15 abril 2019]. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/4791/1/8108502.2011.pdf>.

³⁶ VEGA, Melvys. Bacterias del Ácido Láctico un Potencial para la Producción de Alimentos Probióticos Fermentados en la Industria Láctea de Panamá. [En línea]. En: Science and Technology Conference. Febrero, 2018. p. 38-47. [Consultado 8 mayo 2019]. Disponible en: <https://knepublishing.com/index.php/KnE-Engineering/article/view/1411/3426>.

³⁷ PARRA, Ricardo. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. [En línea]. En: Facultad de ciencias agropecuarias. Enero-junio, 2010, vol. 8, p. 93. [Consultado 10 julio 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>.

³⁸ Ibid., p. 96.

³⁹ SUÁREZ, Caridad. GARRIDO, Antonio y GUEVARA, Carmen. Levadura *Saccharomyces Cerevisiae* y la producción de alcohol. [en línea]. En: Instituto cubano de investigaciones sobre los derivados de la caña de azúcar ICIDCA. Enero-abril, 2016, vol. 50. p. 21. [consultado 22 enero 2019]. ISSN. 0138-6204. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420004>.

en el medio en el que se encuentran⁴⁰ y a su vez, tienen la capacidad de desarrollarse y reproducirse en medios ácidos, es por esto que un rango óptimo de pH para las levaduras se encuentra entre 4.5 y 6.5 aproximadamente, pero cabe aclarar que en su mayoría las levaduras resisten un pH entre 3 y 10.⁴¹ Las levaduras se encuentran principalmente en hábitats donde hay azúcares ya sea en frutas, flores o corteza de árboles.⁴²

En la naturaleza existen levaduras aptas para el consumo humano utilizadas en el procesamiento de alimentos, bebidas fermentadas y para la producción de antibióticos.⁴³ Estos microorganismos son comúnmente requeridos en industrias como la cervecera, allí los estudian y adquieren ya que pueden ser aprovechables por sus características como la capacidad de ser anaerobios facultativos, es decir que al no tener oxígeno en el medio en el que se encuentran estos fermentan los azúcares para producir etanol y dióxido de carbono,⁴⁴ pero, al crecer en medios que contengan oxígeno estos metabolizan los azúcares por medio de una respiración aeróbica para producir dióxido de carbono y agua y a su vez, son capaces de competir por el sustrato con bacterias como la *Streptococcus bovis*, principal generador de ácido láctico el cual es un gran contaminante en bebidas como la cerveza. Las levaduras generan un interés en las industrias por la rentabilidad que generan y porque no son patógenas, es decir aptas para consumo humano o GRAS (Generally Recognized As Safe).⁴⁵

1.2.1 Levadura de género *Saccharomyces cerevisiae*. Como se mencionó anteriormente las levaduras poseen características que son aprovechadas por la industria de los alimentos, entre muchas otras. Dentro de la industria de los alimentos se encuentra la industria cervecera la cual utiliza la levadura del género *Saccharomyces* (azúcar de hongos),⁴⁶ este género en especial ya que se caracteriza por actuar de manera óptima en el proceso de fermentación en la

⁴⁰ ARTIGAS Florencia y MACHADO Virginia. Aislamiento, Selección e identificación de levaduras nativas con propiedades enológicas en uvas Tannat. Título de Licenciado en Biotecnología. Universidad ORT Uruguay. 2017. p. 17. [consultado 25 febrero 2019]. Disponible en: <https://bibliotecas.ort.edu.uy/bibid/86672/file/4521>.

⁴¹ SUÁREZ. Op. Cit., p. 21

⁴² URIBE, Liz. Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. 2007.p. 37. [Consultado 25 septiembre 2019]. Disponible en: <https://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis276.pdf>.

⁴³ JORGENSEN. Op. cit., p.

⁴⁴ ARTIGAS. Op. Cit., p. 17

⁴⁵ SUÁREZ. Op. Cit., p. 21

⁴⁶ VARGAS Jorge. Aislamiento de una cepa nativa *Saccharomyces sp.* y determinación de los parámetros en la fermentación de la chica de jora. Tesis para título de ingeniero agroindustrial. Abancay. Escuela académico profesional de ingeniería agroindustrial. 2010. 39 p. [consultado 13 noviembre 2018]. Disponible en: <http://repositorio.unamba.edu.pe/handle/UNAMBA/330>.

elaboración de cerveza, *Saccharomyces* en unión con la especie *Cerevisiae* brinda grandes rentabilidades al producir la cerveza ya que es capaz de producir etanol de manera eficiente por medio de múltiples sustratos de cadena simple como lo son la glucosa, la maltosa, la fructosa, entre otros. Otra de las razones por la cual esta tiene gran uso en esta industria es porque este es un microorganismo no patógeno o GRAS⁴⁷.

Saccharomyces cerevisiae es una levadura que crece en medios de cultivos nutritivos como el agar Sabouraud, en este medio se puede visualizar con ayuda de caracterizaciones macroscópicas de colores como el beige o el blanco de textura cremosa y apariencia húmeda con bordes irregulares, con la capacidad de desarrollarse en colonias y en su caracterización macroscópica se puede describir como redonda, ovoide, elipsoide, cilíndricas o filamentosas.⁴⁸

En cuanto a su reproducción estas la llevan a cabo por un proceso de gemación y son asexuales como la mayoría de su género o también logran reproducirse sexualmente produciendo esporas. Entre los requerimientos que necesita para desarrollarse y reproducirse se encuentran macronutrientes, vitaminas, fuentes de carbono como la glucosa y fuentes de nitrógeno, las cuales provienen de los aminoácidos y de los péptidos (di- y tri-) del medio en el que se encuentren como lo puede ser el mosto, los cuales son aportados por la malta al inicio del proceso de elaboración de la cerveza.⁴⁹ *Saccharomyces cerevisiae* es industrialmente la más utilizada por sus rendimientos, rápido crecimiento, resistencia a etanol y es modificable genéticamente.

1.2.2 Levaduras No *Saccharomyces*. Los estudios realizados han demostrado que algunas especies de levaduras *No-Saccharomyces* también contribuyen durante la fermentación, ya que sobreviven más de lo que inicialmente se suponía, pudiendo alcanzar crecimientos significativos que influyen en la composición organoléptica de las bebidas alcohólicas⁵⁰. Las levaduras *No Saccharomyces* son importantes ya que estas sintetizan una gran variedad de compuestos volátiles, estas levaduras no convencionales se reproducen en la primera etapa de fermentación, siendo una población drásticamente reducida debido a una supuesta intolerancia al etanol. Sin embargo, se ha determinado que estas levaduras tienen rendimientos entre 25 y 49 g/L de etanol llegando a producir concentraciones de

⁴⁷ ROMERO, Carolina. Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel. Tesis de investigación Magíster en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. 2012. 31 p. [consultado 15 diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/9933/1/300060.2012.pdf>

⁴⁸ VARGAS. Op. cit., p.40.

⁴⁹ ROCHA. Op. cit., p.32.

⁵⁰ PEREZ. Op. cit., p.452.

etanol incluso semejantes a las del género *Saccharomyces*, siempre y cuando las condiciones en donde se cultive sean las óptimas para su desarrollo⁵¹.

Las principales características que aportan las levaduras No *Saccharomyces* frente cualquier tipo de fermentación son el aroma y sabor, siendo relacionados con la materia prima a fermentar, los aromas y sabores son el resultado de los diferentes metabolitos de desecho que produce cada cepa. Las levaduras No *Saccharomyces* aportan la mayoría de las características organolépticas a los fermentos⁵². Las levaduras que se encuentran presentes de manera significativa en algunos frutos y en el mosto, que intervienen en procesos fermentativos están representadas en algo más de quince géneros, entre ellos se pueden encontrar: *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Torulaspora*, *Rhodotorula*, *Metschnikowia*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Dekkera*.⁵³

1.2.3 Requerimientos ambientales y nutricionales para el crecimiento y desarrollo óptimo de la levadura. El crecimiento, desarrollo y reproducción de un microorganismo como la levadura, se ven influenciados por diversos factores que se encuentran en el entorno, (actividad vital) entre ellos están:

Velocidad de crecimiento: este se encuentra definido por la curva de crecimiento de un microorganismo, la cual representa el comportamiento del crecimiento de dicho microorganismo en el tiempo. Con el objetivo de determinar cuándo se produce la mayor cantidad de biomasa o de metabolitos primarios o secundarios.⁵⁴ En la ilustración 3 se evidenciara la curva de crecimiento.

⁵¹ Ibid., P. 452.

⁵²CASAS, Op. cit., p. 76.

⁵³ OCON, María. Diversidad de levaduras no- *Saccharomyces*. en diferentes ecosistemas vitivinícolas. Tesis doctoral. Universidad de la Rioja. 2014. p.8. [consultado 12 julio 2019]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es> > [descarga](#) > [tesis](#).

⁵⁴ HERNANDEZ, Alicia. Las Fermentaciones. [en línea]. En: Microbiología Industrial. Costa Rica: EUNED, 2003. p. 47. [Consultado 14 noviembre 2018]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&sitesec=reviews&rview=1&rf=ns:0&hl=es-419&lr=&sa=N&start=20>. ISBN: 978-9968-31-255-4.

Ilustración 3. Curva de crecimiento



Fuente: JAWETS, Ernest. *et al.* Crecimiento, supervivencia y muerte de microorganismos. [en línea]. En: Microbiología médica. 27 ed. New York: McGraw-Hill Medical. 2016. p. 1-850. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.worldcat.org/title/jawetz-melnick-adelbergs-medical-microbiology/oclc/939866301>. ISBN. 9780071824989 0071824987.

Esta curva presenta cuatro fases importantes: la fase de latencia, la logarítmica, la estacionaria y la de muerte.

Fase de latencia (fase lag): esta es la primera etapa, seguida de la inoculación de la levadura, está definida como el tiempo en el que logra adecuarse el microorganismo a nuevas condiciones tanto nutricionales como ambientales al medio en el que se encuentra. El microorganismo puede o no presentar esta fase, es decir, puede pasar sin ningún problema a la fase siguiente. Es importante resaltar que durante esta fase no hay un aumento celular ya que la energía es utilizada para sintetizar las enzimas que necesita para su desarrollo óptimo en el medio en el que se encuentra ahora.⁵⁵

Fase logarítmica o exponencial: es en ésta fase donde las células se multiplican o crecen de manera exponencial a la máxima velocidad, hasta que sus fuentes nutricionales se hayan acabado o por la acumulación de sus propios compuestos tóxicos, provenientes de su metabolismo.⁵⁶

⁵⁵ Ibid., p.47.

⁵⁶ GUTIÉRREZ, José. Alteración de origen microbiano. [en línea]. En: Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos. Madrid: Díaz de Santos S.A, 2000. p. 355. [Consultado 27 noviembre 2018]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/DesireSomale/ciencia-bromatologica-principiosgeneralesdelosalimentosmedilibroscom>. ISBN. 978-84-7978-447-8.

Este crecimiento puede ser cuantificado por el número de células que se producen o por el aumento de biomasa en un tiempo determinado. La velocidad de crecimiento durante éste periodo es constante e independiente de la concentración de sustrato, estando este en exceso. Esta etapa culmina al producirse algunas de estas condiciones:

- a. Agotamiento de nutrientes.
- b. Alteración de condiciones ambientales.
- c. Producción por parte de la célula de metabolitos tóxicos para ella, afectando su reproducción.⁵⁷

Fase estacionaria: en esta fase como primera medida se presenta una disminución en la velocidad de crecimiento⁵⁸, siendo la reproducción del microorganismo igual a la velocidad de su muerte. Cabe resaltar que aquí se debe tener en cuenta que se desea obtener como producto final, para tomar la decisión de continuar con la última fase o llegar hasta ella. En el caso de la fermentación alcohólica no sería necesario continuar con la última fase, ya que al alcanzarla se obtiene la máxima concentración de células, haciendo que la producción de etanol disminuya, lo cual no sería algo rentable para la industria.⁵⁹

Fase de muerte: en esta última fase es donde los requerimientos tanto ambientales como nutricionales necesarios para la reproducción del microorganismo son reducidos, a su vez empieza la producción de sustancias tóxicas que lo atacan a sí mismo impidiendo la multiplicación de las células.⁶⁰

Ecuación de Monod

La velocidad de crecimiento de los microorganismos se encuentra asociada con la ecuación de Monod, la cual relaciona la velocidad específica de crecimiento (μ) del cultivo y la concentración del sustrato limitante (S) del mismo, y se representa con la ecuación 1.

⁵⁷ HERNANDEZ. Op. cit., p. 47-48.

⁵⁸ GUTIÉRREZ. Op. cit., p. 355.

⁵⁹ HERNANDEZ. Op. cit., p. 48.

⁶⁰ Ibid., p. 48.

Ecuación 1. Ecuación de Monod

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \cdot \frac{S}{(K_s + S)}$$

Fuente: HERNANDEZ, Alicia. Las Fermentaciones. [En línea].
En: Microbiología Industrial. Costa Rica: EUNED, 2003. p. 49.
[Consultado 14 noviembre 2018]. Disponible en:
<https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&sitesec=reviews&rview=1&rf=ns:0&hl=es-419&lr=&sa=N&start=20>.
ISBN: 978-9968-31-255-4.

Donde, S corresponde a la concentración del sustrato limitante como se mencionó anteriormente, $\mu_{\text{máx}}$ hace referencia a la velocidad específica de crecimiento máximo y K_s es la constante específica de cada sustrato.

Temperatura: dependiendo del rango de temperatura adecuada para el crecimiento del microorganismo, estos se clasifican en: termófilos, los cuales normalmente manejan un rango de crecimiento entre los 45°C y 55°C, algunos alcanzando a crecer hasta en una temperatura de 70°C. Por otro lado, se encuentran los mesófilos, manejando un rango de crecimiento óptimo a temperaturas entre los 20°C y 45°C. Y por último se encuentran los psicrófilos o también llamados criofílicos, los cuales manejan temperaturas muy bajas de crecimiento, entre los 10°C y 20°C, algunos alcanzando a crecer en temperaturas de -10°C⁶¹.

Para el caso de las levaduras la temperatura de crecimiento se ve influenciada por los distintos procesos involucrados en la elaboración de cerveza y por las distintas materias primas utilizadas, es por esto que su óptimo crecimiento se encuentra entre 28°C y 30°C clasificando a este microorganismo como mesófilo según lo anteriormente explicado⁶².

Presión osmótica: la presión o tolerancia osmótica hace referencia a la capacidad de un microorganismo de soportar un medio con osmolaridades variadas. Es decir, la capacidad de soportar un medio con menor contenido de sales, que el que posee la célula (medio hipotónico) o la capacidad de sobrevivir en un medio con mayor contenido de sales, que el que posee la célula (medio hipertónico). Al presentarse

⁶¹ MENDEZ José y BRICEÑO Aleida. Aspectos microbiológicos. [en línea]. **En:** Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas. Caracas, Venezuela: EQUINOCCIO, 2006. p 47. [Consultado 15 febrero 2019]. Disponible en: https://books.google.com.co/books?id=r7y3XuFAB8UC&pg=PR2&pg=PR2&dq=MENDEZ+BARREIRO+Jos%C3%A9+A.++Aspectos+microbiol%C3%B3gicos.&source=bl&ots=VPTKpovUgt&sig=ACfU3U2NMJdBweFGDPsqE_FsMBrHC7g48A&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjI2L3s7ODkAhWjiOAKHUAZB_kQ6AEwBXoECAkQAQ#v=onepage&q=MENDEZ%20BARREIRO%20Jos%C3%A9%A9%20A.%20%20Aspectos%20microbiol%C3%B3gicos.&f=false. ISBN. 980-237-210-2.

⁶² VARGAS. Op. Cit., p. 37.

alguno de estos la célula se expone a daños internos o incluso la muerte⁶³. Las levaduras poseen la capacidad de soportar concentraciones de soluto (azúcares) aproximadamente del 40%, levaduras clasificadas como osmofílicas pueden soportar concentraciones mayores y sobrevivir.⁶⁴

Hidratación: el microorganismo al perder agua se ve afectado en su crecimiento, desarrollo y reproducción óptimas como tal afectando su actividad celular habitual⁶⁵, ocasionalmente la célula tiene la capacidad resistir periodos de deshidratación sin que se ve afectada en su interior, estos periodos no se deben exceder ya que el microorganismo estaría en riesgo de muerte⁶⁶.

pH: las levaduras poseen la capacidad de desarrollarse en medios más ácidos, lo que las clasifica como microorganismos ácido-tolerantes soportando rangos de 3.5 a 5.5, lo cual es una ventaja al no tener que competir por el sustrato (glucosa) con las bacterias las cuales, generan contaminación en medios como el mosto en el caso de la elaboración de cerveza ya que algunos de estos no toleran rangos de pH tan bajos dejando de ser un problema en el producto final.⁶⁷

Medio de cultivo: este debe tener los nutrientes necesarios para un óptimo crecimiento y desarrollo, alguna alteración de puede afectar la reproducción del microorganismo.⁶⁸

Alcohol (etanol): la levadura tiende a soportar niveles de etanol hasta del 8% según la literatura consultada, al sobrepasarlo este puede actuar como un inhibidor en el proceso de fermentación, y de este modo afectar al producto en dicha etapa.⁶⁹

Nutrientes: microorganismos como las levaduras se nutren con el consumo de sustratos como los azúcares, más específicamente los de cadenas cortas como la glucosa para generar o producir etanol. Por otro lado estos microorganismos también necesitan del oxígeno para su óptimo desarrollo, donde este lo obtienen de las sales de amonio y de las proteínas, al no contar con la disponibilidad de oxígeno

⁶³ HERNANDEZ. Op. cit., p. 48.

⁶⁴ GONZÁLEZ Marcos. Ingredientes. En: Principios de Elaboración de cervezas artesanales. Morrisville, carolina del norte USA, Lulu Enterprises. – Lulu Press Inc. p 49-97. ISBN 978-1-365-67284-2

⁶⁵ SUÁREZ. Op. Cit., p. 22.

⁶⁶ JORGENSEN. Op. Cit., p 298.

⁶⁷ GONZÁLEZ G. Op. Cit., p. 68.

⁶⁸ HERNANDEZ. Op. cit., p. 27.

⁶⁹ SUÁREZ-MACHÍN. Op. Cit., p. 22.

en el medio la levadura se alimenta de sus propias proteínas dándose el proceso de autólisis en esta, lo que genera la presencia de sulfuro de hidrógeno y se presentan malos olores en la cerveza, para evitar esto se agregan sales de amonio en el producto, otro de los nutrientes importantes para este microorganismo es la vitamina B, la cual contribuye con el crecimiento de este.⁷⁰

Es importante mencionar que el exceso o escasez de éstos puede afectar el crecimiento, buen desarrollo y/o cumplimiento de sus funciones del microorganismo, es por ello que deben ser controlados en gran medida a lo largo del proceso y se debe tener en cuenta lo que se desea como producto final.

1.2.4 Nichos ecológicos de las levaduras. Las levaduras residen normalmente en la superficie de las frutas azucaradas, en épocas de invierno, hay probabilidad de que las levaduras sobrevivan en el suelo siempre y cuando se encuentre cerca de frutos caídos. Es posible que se contemple que la levadura *Saccharomyces* como tal no se encuentra en un nicho específico, ésta levadura tiene la capacidad de adaptarse en diferentes entornos. Los protocolos de aislamiento de *Saccharomyces* se realizan utilizando medios de enriquecimiento ya sea en superficies de plantas, con altos o bajos contenidos en azúcar para la generación de etanol en medio aerobio o anaerobio. El método de enriquecimiento puede generar sobre o subestimación de la levadura *Saccharomyces* en ciertos ambientes. La aparición de competidores fuertes en muestras naturales produce una subestimación de la presencia de la levadura, pero por otro lado una falta de levaduras competidores con respecto a la *Saccharomyces* hace que esté presente una sobreestimación; por ende, la unión entre levadura y las frutas o robles es un suceso determinado por los medios de enriquecimiento haciendo que la levadura crezca mejor en lugares diferentes. Si se realiza un estudio metódico sobre la abundancia de la levadura silvestre en un amplio rango de hábitats sería una manera más útil para la identificación de factores bióticos y abióticos para el desarrollo de la levadura *Saccharomyces*.

La levadura *Saccharomyces* se adapta con facilidad en ámbitos ya sea en hábitat de frutas o en robles, debido a que los hábitats ricos en azúcar no cuentan con disponibilidad en la totalidad del año, la levadura necesita un lugar donde ésta pueda permanecer por el tiempo en que no haya presencia de azúcar, siendo la corteza utilizada como un cobijo del invierno de la levadura. Introdujeron la "hipótesis del reservorio de la fruta" sugiriendo que *S. cerevisiae* existe en una etapa esporulada como un reservorio de baja abundancia difusa en diferentes nichos de bosques como el suelo y la corteza de los árboles, desde los cuales se dirige a ricos

⁷⁰ Ibid., p. 68.

en azúcar frutas por insectos, donde prolifera y al final de la temporada de fructificación, una fracción de esta población regresará al ambiente forestal”⁷¹.

Los estudios realizados para determinar el nicho de la levadura no son tan frecuentes, ya que no hay procedimientos de muestreo estandarizados, lo que hace que los estudios se dificulten debido a la utilización de diversos métodos y maneras de proceder para la obtención de los resultados. Siendo que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se encuentra en un amplio rango de hábitats, este organismo se utiliza para determinar si al mezclar los hábitats se presenta algún efecto genéticamente, estos lugares ya sean frutas, flores o insectos son hábitats transitorios para la levadura, determinando que la mezcla genética es alta en hábitats transitorios y baja por parte de la levadura en su estabilidad. *S. cerevisiae* es encontrada en hábitats silvestres como cortezas de árboles y sus suelos asociados⁷², flores y follaje de hojas.⁷³ Al enumerar estos diferentes hábitats frutales son denominados hábitats estacionales manteniendo poblaciones poco continuas de ésta levadura.

1.3 INDUSTRIA CERVECERA

La obtención de cerveza se trata de un proceso en el cual los ingredientes y equipos de producción son fundamentales, así como las técnicas que son utilizadas en la fabricación. Se debe tener presente los parámetros tanto cualitativos como cuantitativos para la obtención del producto, siendo por tal razón indispensable determinar diferentes protocolos durante la fabricación, garantizando estabilidad en todas las propiedades organolépticas.

1.3.1 Proceso de elaboración de la cerveza. La preparación de la cerveza es un proceso en donde intervienen distintas especialidades científicas y tecnológicas. La cerveza es la bebida alcohólica más amplia y de mayor consumo en el mundo, siendo la tercera bebida más popular de manera general. Se encuentran cervezas artesanales las cuales pertenecen a una categoría de productos con un alto valor

⁷¹ KNIGHT, Sarah y GODDARD, Matthew. Quantifying separation and similarity in a *Saccharomyces cerevisiae* metapopulation. [en línea]. En: The ISME Journal Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology. July,2014. Vol.9. p. 361–370. [Consultado 24 marzo 2019]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/ismej2014132>. ISSN 1751-7370.

⁷² NAUMOV, G. I; GAZDIEV, D.O and NAUMOVA, E.S. The Finding of the Yeast Species *Saccharomyces bayanus* in Far East Asia. [en línea]. En: Translated from Mikrobiologiya .June, 2003. Vol. 72. p. 834–839. [Consultado 16 abril 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/226155700_The_Finding_of_the_Yeast_Species_Saccharomyces_bayanusin_Far_East_Asia.

⁷³ ROBINSON, Heather. The geographic distributions of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*, and the potential to detect past yeast populations with ancient DNA. Doctor of Philosophy En: The University of Manchester. 2016. Pag 32-36. [Consultado 9 enero 2019]. Disponible en: https://www.research.manchester.ac.uk › portal › files › FULL_TEXT

en el mercado, haciendo formulaciones y procesos de producción innovadores y diferentes para dar un sello a nivel industrial. A continuación, se describe el proceso de elaboración de la cerveza en la ilustración 4.

Ilustración 4. Procesos de elaboración de cerveza tradicional.



Fuente: SUAREZ, María. Cerveza: componentes y propiedades. Master universitario en biotecnología alimentaria. Oviedo. Universidad de Oviedo. Julio, 2013. p. 7.[consultado: 3 diciembre 2018] Disponible en: http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/19093/8/TFM_%20Maria%20Suarez%20Diaz.pdf.

Para la elaboración de la cerveza se determina la malta como una de las materias primas empleadas para su producción, empleando diferentes granos que podrían ser malteados, como la cebada ya que poseen características aptas para ser utilizados. En el transcurso del tiempo se han otorgado nuevos aromas de cerveza a partir de la cebada malteada, además de esto la cebada que se ha de utilizar es rica en almidón lo que genera que se presente un extracto fermentable, conteniendo proteínas las cuales poseen ciertos aminoácidos necesarios para el crecimiento de la levadura y la espuma siendo las sustancias nitrogenadas importantes para la formación de la misma.

La cebada (*Hordeum vulgare*) es una planta de origen asiático. En la industria maltera la cebada, debe cumplir con características organolépticas para un buen rendimiento. Esta debe poseer granos redondos y gruesos que sean uniformes, su color se presenta como amarillo claro, con olor fresco y pajoso, la cascarilla de la cebada debe ser rizada y fina, libre de microorganismos que la puedan infectar.

El grano de cebada está compuesto por la cáscara, germen y el endospermo (almidón insoluble y fuerte). Luego de ser cosechados, los granos se deberán limpiar, secándolos alcanzando un nivel de humedad de aproximadamente 12%, después se guardan por un tiempo de seis semanas para que vuelvan a su estado activo de germinación recuperando el secado. El grano deberá ser pasado en remojo el cual consiste en tres sesiones de sumersión en agua limpia y tres expuesto al aire. Al llegar a un nivel de humedad de 35% los granos empezaran a germinar manteniendo éste proceso a una temperatura aproximadamente de 15°C. Se necesita una combinación de agua y aire haciendo que el grano llegue a una humedad suficiente más o menos del 46%, para que se pueda presentar la modificación que se desean del almidón en el endospermo. Al mantener las condiciones adecuadas el “embrión libera unas sustancias, principalmente ácido giberélico, que activan las enzimas que degradan las proteínas y el almidón a formas más solubles y fáciles de metabolizar”⁷⁴, por último el proceso de germinación se detiene con calor llevándolo a un horno. Cabe resaltar que se pueden presentar modificaciones mínimas en el proceso, si se quiere obtener otras tonalidades o sabores en el proceso de la malta.

Otra materia prima implicada en la fabricación de la cerveza es el Humus Lúpulus, una planta perdurable, tiene habilidades de treparse llegando a tener entre 5 metros o más de altura, es la responsable de dar aroma y un sabor amargo a la cerveza.

La siguiente materia prima primordial en el proceso es el agua, cada tipo de cerveza utilizará diferentes estilos de agua, ya sea de baja mineralización, o con mucha cal. Estos tipos de agua son escogidos dependiendo del cervecero y el uso que desee dar, ésta materia prima se encuentra entre un 85% y 92% durante el proceso.

Por último, se utilizará la levadura, como ya se ha venido explicando es un hongo que principalmente consume azúcar formando alcohol y anhídrido carbónico. Se encuentran muchas especies de levaduras, éstas son clasificadas dependiendo de sus características de forma celular, hábitat, reproducción y también su fisiología. La principal levadura utilizada en este proceso es la *Saccharomyces cerevisiae* la cual es la encargada en el proceso de alta y baja fermentación.

El proceso de la cerveza puede ser dividido en operaciones esenciales: molienda de la malta, maceración del mosto, filtraje, cocción y adición del lúpulo, refrigeración, fermentación, maduración y envasado.⁷⁵

⁷⁴ SUAREZ, María. Cerveza: componentes y propiedades. Master universitario en biotecnología alimentaria. Oviedo. Universidad de Oviedo. Julio, 2013. p. 7-21.[consultado: 3 diciembre 2018] Disponible en: http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/19093/8/TFM_%20Maria%20Suarez%20Diaz.pdf.

⁷⁵ SOMARRIBA, Adner y ROSTRAN, Julio. Estudio comparativo de cervezas de consumo nacional en relación a sus parámetro fisicoquímicos y sensoriales. Monografía al título de licenciado en química. Nicaragua-León. Universidad Nacional Autónoma. 2006. p. 5-13. [consultado: 15 diciembre 2018] Disponible en: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/4449/1/200086.pdf>.

Molienda: en esta operación se muele o se quiebra el grano del cereal aumentando las superficies de contacto con las enzimas de la malta favoreciendo la hidrólisis, ésta etapa tiene relación directa con las transformaciones fisicoquímicas, de rendimiento, clasificación y envase final de la cerveza.

Maceración: en la maceración, la molienda y el agua son mezcladas entre sí (macerados). Los componentes de la malta entran así en solución y, con ayuda de las enzimas, se los obtienen como extractos.⁷⁶ En esta etapa se emplea un control riguroso de los tiempos y las temperaturas para así poder favorecer las reacciones bioquímicas necesarias para este proceso.

Filtración: este proceso tiene como objetivo separar la parte sólida del mosto, llamada el bagazo de la malta utilizada para el alimento de los animales, mientras que el líquido es el que contiene todo lo que se ha extraído del grano disolviéndose en agua.

Cocción y adición de lúpulo: se somete el mosto a una cocción entre una y dos horas principalmente para eliminar a los microorganismos que hayan podido introducirse en el mosto. En esta etapa ocurre la adición del lúpulo el cual se hace al inicio y final de la cocción, responsable de conceder el amargor característico de la cerveza.

Enfriamiento: el no lograr incubar la levadura a temperaturas más altas que 35°C, el mosto es enfriado para evitar la presencia de cualquier otro microorganismo no deseado. Luego de esto se introduce el cultivo de la levadura determinado para este proceso.

Fermentación: éste proceso se inició luego de la inoculación de la levadura con un mosto ya debidamente frío y aireado, en esta etapa ocurre la liberación de dióxido de carbono. Esta etapa es importante ya que se puede ver la espuma y un burbujeo. Al quedarse sin oxígeno la levadura comenzará a consumir el azúcar transformándolo en alcohol. La duración de esta etapa esta entre una o tres semanas.

Maduración: las cervezas normalmente reciben un tiempo de maduración para el desarrollo adecuado de sabores, en esta etapa ocurren importantes reacciones fisicoquímicas de transformación y de aspecto visual de la bebida en la producción de aromas y sabores característicos.

⁷⁶ KUNSE, Wolfgang. Maceración. [en línea]. En: Tecnología para cerveceros y malteros. Berlín, Alemania. VLB,2006. P. 246. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/302896602/Tecnologia-para-cervecedores-y-malteros-Kunze-tomo-2>. ISBN. 3921690544.

Envasado: por último, las cervezas son envasadas conservando todos los parámetros de calidad evitando el ingreso de aire y clasificadas en función de la calidad, proporción de materias primas y las técnicas utilizadas para la elaboración de dicho proceso.

1.3.2 Microorganismos alteradores de la cerveza. Así como existen bacterias en la naturaleza que contribuyen al proceso de elaboración de cerveza como es el caso de las lactobacterias empleadas para la acidificación de algunas cervezas⁷⁷, también existen distintos tipos de microorganismos que afectan el proceso dejando como resultado final una cerveza de calidad deficiente, esto puede ser consecuencia de la falta de asepsia a lo largo del proceso de producción, del proceso de envasado o del almacenamiento del producto terminado causando así contaminaciones en la bebida, es claro que ésta se encuentra altamente expuesta a la contaminación, si no se tienen los cuidados requeridos,⁷⁸ estas contaminaciones deben ser evitadas ya que pueden alterar las características sensoriales del producto tales como el sabor (presencia de compuestos secundarios), el aspecto visual, el aroma, entre otras. Es por esta razón que para obtener de un producto de óptima calidad es necesario tener precauciones al momento de su elaboración, teniendo un control en cada una de sus etapas.

Cabe resaltar que los microorganismos capaces de desarrollarse en éste medio son pocos, ya que a medida que transcurre el proceso se van añadiendo materias primas como el lúpulo el cual contiene iso- α -ácidos, que posee propiedades antimicrobianas, también cuando se llega al proceso de fermentación se produce etanol y dióxido de carbono causando que el medio tenga un pH ácido y por último se presenta una limitación de oxígeno, creando así un ambiente poco adecuado para el crecimiento de microorganismos distintos a las levaduras. No obstante a pesar de todos estos factores inadecuados que tiene el medio para su desarrollo y reproducción en ocasiones se presenta el crecimiento de algunos microorganismos resistentes en la bebida, gracias a elementos genéticos que éste posee y a pesar de tener que competir por el sustrato ellos encuentran en este medio un ambiente óptimo para desarrollarse sin ningún problema⁷⁹.

Como fuentes principales de crecimiento de estos microorganismos está la inoculación de levaduras empleadas para el proceso de fermentación, el proceso de fermentación mismo y también el proceso de embotellamiento en la fase final del

⁷⁷ JORGENSEN. Op. cit., p. 514.

⁷⁸ GARCÍA, Jorge. Distribución de bacterias contaminantes de cerveza *lactobacillus* y *pediococcus* en el ambiente de elaboración de cerveza. Doctor en ciencias con orientación en biotecnología. Universidad autónoma de Nuevo León. 2017. p.3. [Consultado: 17 enero 2019]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/13964/1/1080218472.pdf>.

⁷⁹ Ibid., p. 4-5.

proceso de producción. Otras fuentes podrían ser el uso de equipos, instrumentos o utensilios sin esterilizar previamente a su uso.⁸⁰

1.3.2.1 Sabores indeseados en la producción de la cerveza. Los sabores indeseados son relacionados con el envejecimiento de la cerveza. La disminución de sabor fresco de la cerveza se presenta por diferentes factores que interfieren ya sea en la reacción del proceso o diferentes condiciones que hacen que prevalezcan estos sabores no deseados.

A continuación, se presentará la nota del sabor indeseado, la descripción y debido a que factor es producido.

- **Acetaldehído:** se relaciona con las manzanas verdes, es parecido al pasto. Este es presentado como un indicador de oxidación en una cerveza muy vieja. Su sabor también se puede presentar por una infección bacteriana “(*Zymomonas*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*)”⁸¹
- **Ácido Caproico:** presenta un sabor rancio, desabrido. Este sabor indeseado es producido conforme a cómo va envejeciendo la cerveza se asocia con la descomposición de ácidos grasos.
- **DMS (Sulfato de Metilo):** posiblemente podría disminuir con el tiempo al reaccionar con otros, como feniletanol. Los sabores relacionados se encuentran maíz cocido, sopa de verduras, siendo estos sabores causas de tiempos insuficientes en el proceso de hervir o también por el exceso de oxígeno.
- **Sabor a carne:** este sabor indeseado se encuentran en las cervezas fuertes con presencia de levadura presentando notas saladas parecidas al glutamato mono sódico, éste es producido por la autólisis de la levadura.
- **Cerveza con sabor a pan:** se presenta en la cerveza que es sometida a altas temperaturas generando sabores oxidados y cocidos.
- **Papel:** son causados por altos niveles de oxígeno, generado principalmente en el empaquetamiento derivándose a través de reacciones químicas.

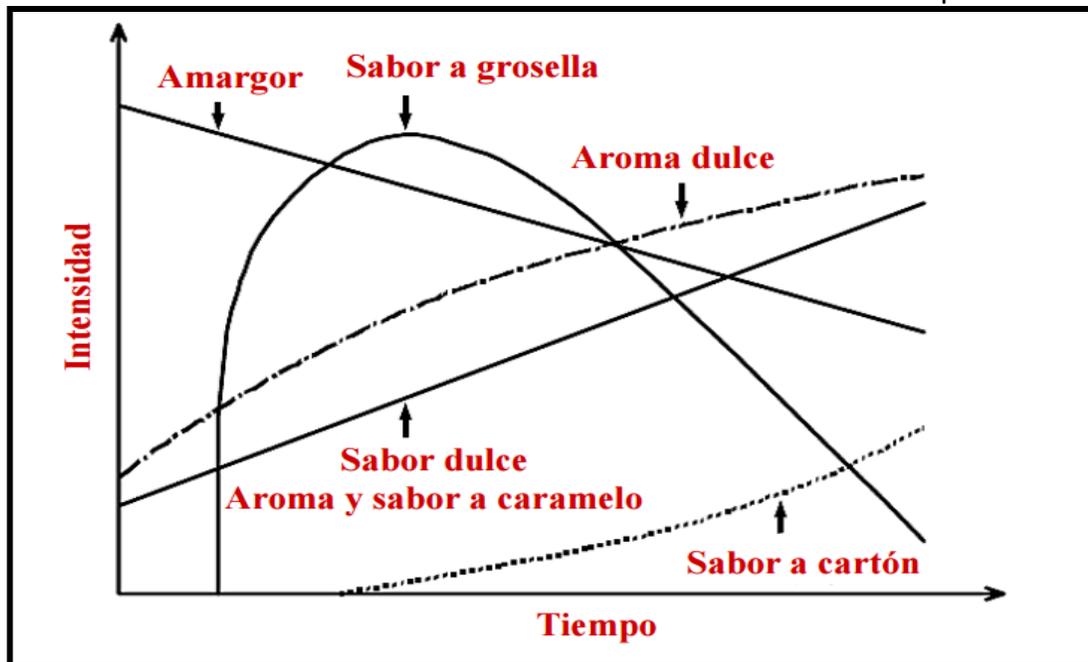
⁸⁰ GARCÍA. Op. cit., p.7.

⁸¹ Guía de buenas prácticas de producción, distribución y comercialización para la cerveza artesanal de calidad. En: Brewers Association. [Sitio web]. [Consultado: 10 noviembre 2018]. Archivo pdf. Disponible en: https://s3uswest2.amazonaws.com/brewersassoc/wpcontent/uploads/2017/04/Best_Practices_Guide_To_Quality_Craft_Beer_Spanish.pdf.

- **Azorrillado:** la cerveza envasada en vidrios verdes o transparentes son susceptibles a presentar estos sabores indeseados, ya que los ácidos de lúpulo que son los compuestos que le dan el sabor amargo a la cerveza, reaccionan con los compuestos de azufre en presencia de la luz, generando notas sulfurosas parecidas a el aroma de zorrillo.
- **Azufre:** su sabor es parecido al de un huevo podrido emergiendo dicho sabor en la segunda fermentación de la cerveza acondicionadas en botella.

La ilustración 5 muestra los cambios sensoriales nombrados anteriormente presentes en la cerveza a través del tiempo.

Ilustración 5. Cambios sensoriales de la cerveza a través del tiempo.



Fuente: SUAREZ, María. Cerveza: componentes y propiedades. Master universitario en biotecnología alimentaria. Oviedo. Universidad de Oviedo. Julio, 2013. p. 7-28.[consultado: 3 diciembre 2018] Disponible en: http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/19093/8/TFM_%20Maria%20Suarez%20Di%20az.pdf.

Por lo general la calidad de la cerveza disminuye durante el almacenamiento generando sabores desagradables y formación de turbidez.

1.4 MARCO LEGAL

El decreto 1686 de 2012 tiene por objeto establecer el reglamento técnico a través del cual se señalan los requisitos sanitarios que deben cumplir las bebidas alcohólicas para consumo humano que se fabriquen, elaboren, hidraten, envasen, almacenen, distribuyan, transporten, comercialicen, expendan, exporten o importen en el territorio nacional, con el fin de proteger la vida, la salud y la seguridad humana y, prevenir las prácticas que puedan inducir a error o engaño al consumidor.

La cerveza es la bebida obtenida por fermentación alcohólica de un mosto elaborado con cebada germinada y otros cereales o azúcares, adicionado de lúpulo o su extracto natural, levadura y agua potable, a la cual se le podrán adicionar sabores naturales permitidos por el Ministerio de Salud y Protección Social. Esta bebida está comprendida entre 2.5 y 12 grados alcoholimétricos. Las cervezas con una graduación alcoholimétrica, inferior a 2.5 grados alcoholimétricos, se denominarán cervezas sin alcohol o cervezas no alcohólicas y se clasificarán como alimento.

Se presentan prácticas en la elaboración de bebidas alcohólicas que serán permitidas para estos procesos entre las que se encuentran:

1. Añejamiento.
2. Centrifugación.
3. Decantación y sedimentación.
4. Desodorización y decoloración.
5. Destilación continua o discontinua.
6. Fermentación controlada.
7. Filtración.
8. Hidratación.
9. Maceración, extracción, decoloración.
10. Pasterización.
11. Rectificación.
12. Trasiego.
13. Tratamiento de calor y frío.⁸²

⁸² COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. DECRETO 1686 de 2012. Por el cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que se deben cumplir para la fabricación, elaboración, hidratación, envase, almacenamiento, distribución, transporte, comercialización, expendio, exportación e importación de bebidas alcohólicas destinadas para consumo humano. En: Diario Oficial, Agosto, 2012. Nro. 48517. p.6.

2. AISLAMIENTO DE LAS LEVADURAS CON PERFILES FERMENTATIVOS A PARTIR DE TRES FRUTOS (MARACUYÁ, CIRUELA Y GUAYABA) A TRAVÉS DE MEDIOS DE CULTIVOS SELECTIVOS

2.1 INTRODUCCIÓN

Se debe llevar a cabo un aislamiento ya que en los frutos seleccionados (maracuyá, ciruela y guayaba) se desarrolla distintas clases de microorganismos como hongos filamentosos, levaduras y bacterias. Teniendo en cuenta la diversidad de microbiota que pueden presentar los frutos seleccionados, debido a su alto contenido de azúcares, se realizó un proceso de aislamiento selectivo hacia microorganismos eucariotas, haciendo énfasis en levaduras. Para este fin se utilizó Caldo y agar Sabouraud logrando una selectividad desde el principio del estudio, ya que contiene nutrientes como tripteína, peptona y glucosa que promueven un óptimo desarrollo de levaduras y hongos filamentosos, inhibiendo el crecimiento de bacterias por la presencia de un antibiótico de amplio espectro como el cloranfenicol.

Siguiendo con el proceso de aislamientos selectivos, posterior a tener un grupo de levaduras, se utilizó Agar Lisina para la diferenciación de levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces*, basado en la descarboxilación y desaminación del aminoácido lisina por levaduras No- *Saccharomyces* que se encuentren presentes en el medio.

Cabe resaltar que estos procesos de aislamiento y selección de la levadura estuvieron asesorados por un profesional en microbiología.

2.2 MATERIALES Y EQUIPOS

2.2.1 Equipos y materiales utilizados en la experimentación. En el cuadro 1 se muestran los equipos y materiales utilizados para realizar cada uno de los procedimientos de la experimentación.

Cuadro 1. Equipos y materiales utilizados en la experimentación

Materiales y equipos	Definición
<p data-bbox="509 306 695 338" style="text-align: center;">Microscopio</p> 	<p data-bbox="915 306 1458 485">Instrumento que permite observar distintos objetos que no son apreciables al ojo humano, mediante la amplificación de la imagen del objeto observado⁸³.</p>
<p data-bbox="518 825 686 856" style="text-align: center;">Cajas Petri</p> 	<p data-bbox="915 825 1458 930">Es un instrumento utilizado en el laboratorio para el aislamiento e identificación de microorganismos⁸⁴.</p>

⁸³ TP LABORATORIO QUÍMICO, Microscopio. [sitio web]. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/microscopio.html>

⁸⁴ QUIMICOS QUIMIREL, Cajas de Petri. [sitio web]. Bogotá. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <https://quimirel.com.co/cajas-de-petri/>

Cuadro 1. (Continuación)

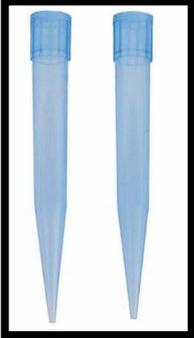
Materiales y equipos	Definición
<p style="text-align: center;">Autoclave</p> 	<p>Equipo utilizado en el laboratorio para esterilizar material de vidrio o sustancias químicas que trabaja a altas presiones⁸⁵.</p>
<p style="text-align: center;">Incubadora agitadora <i>Shaker</i> de laboratorio</p> 	<p>Equipo que se utiliza para mezclar, homogenizar donde se mantiene un rango de agitación y temperatura, se aplica en suspensiones bacterianas, cultivos de células, entre otros⁸⁶.</p>
<p style="text-align: center;">Micropipeta</p> 	<p>Instrumento empleado en el laboratorio para tomar pequeños volúmenes de líquidos, en unidades de microlitros⁸⁷.</p>

⁸⁵ EQUIPOS Y LABORATORIO DE COLOMBIA, Autoclaves de laboratorio. [sitio web]. Colombia. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: https://www.equposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=1498

⁸⁶ FISHER SCIENTIFIC, Thermo Scientific agitadores resistentes el dióxido de carbono. [sitio web]. Madrid. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.fishersci.es/shop/products/co2-resistant-shaker-31/p-6259022#>

⁸⁷ EQUIPOS Y LABORATORIO DE COLOMBIA, Micropipetas (operación y manejo). [sitio web]. Colombia. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: https://www.equposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=1031

Cuadro 1. (Continuación)

Materiales y equipos	Definición
<p data-bbox="363 310 841 342">Puntas azules para micropipeta</p> 	<p data-bbox="915 310 1456 415">Material que es utilizado con la micropipeta que ayuda a tomar volúmenes pequeños de líquidos⁸⁸.</p>
<p data-bbox="472 726 732 758">Tubos de ensayo</p> 	<p data-bbox="915 726 1456 831">Recipiente de vidrio utilizado en el laboratorio para deposita muestras solidas o liquidas⁸⁹.</p>
<p data-bbox="542 1064 662 1096">Gradilla</p> 	<p data-bbox="915 1064 1456 1127">Herramienta de laboratorio que permite apoyar tubos de ensayo⁹⁰.</p>

⁸⁸ EQUIPOS Y LABORATORIO DE COLOMBIA, Micropipeta (Operación y manejo). [sitio web]. Colombia. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: https://www.equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=1031

⁸⁹ INSTRUMENTOS DE LABORATORIO, Uso de tubos de ensayo [sitio web]. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <https://instrumentosdelaboratorio.org/>

⁹⁰ TP LABORATORIO QUÍMICO, Gradilla. [sitio web]. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/gradilla-3.html>

Cuadro 1. (Continuación)

Materiales y equipos	Definición
<p style="text-align: center;">Asa bacteriológica</p> 	<p>Instrumento utilizado en el laboratorio para trasladar de un medio a otro, ya sea líquido o sólido un inoculó determinado⁹¹.</p>

Fuente: elaboración propia

2.3 METODOLOGÍA

2.3.1 Selección y preparación de frutos para el proceso de aislamiento. Para llevar a cabo la selección de los frutos los cuales fueron implementados para llevar a cabo los aislamientos y así seleccionar la cepa con el mejor perfil fermentativo, se realizó una matriz de decisión, la cual permite la toma de decisiones o resolución de problemas de manera ordenada fundamentadas en criterios específicos⁹². Para este caso se tuvieron en cuenta criterios como el contenido de pectina en la cascara, su precio en el mercado, la disponibilidad o cosecha, el tiempo de maduración y el contenido de azúcares (°Brix), ya que este mide la cantidad aproximada de azúcares en zumo de fruta utilizándolo para hacer un seguimiento in situ en la evolución de la maduración de los frutos.⁹³ Este criterio fue el que mayor puntuación se le otorgó para así tener una selección más confiable al momento de elegir las frutas. A continuación en la tabla 1 se muestra la matriz de decisión realizada.

⁹¹ LANCETAHG, Asa de nicromo calibrada 10 uL [sitio web]. Mexico. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.lancetahg.com.mx/productos/81/asa-de-nicromo-calibrada-10-u-l>

⁹² BHUVAN, Unhelkar. Construction of matrix and eMatrix for mobile development methodologies. En: Handbook of research in mobile business. p.115. [sitio web]. New york. [Consultado: 24 octubre 2019] Archivo pdf. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=JlpFnu8hMK4C&pg=PT150&dq=matriz+de+decision+pugh+que+es&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiHg86lzsTIAhWMrVvkKHRY5AfwQ6AEIKDAA#v=onepage&q=matriz%20de%20decision%20pugh%20que%20es&f=false>

⁹³ DOMENE, Miguel. SEGURA, Marilío. Parámetros de calidad interna de hortalizas y frutas en la industria agroalimentaria. En: Ficgas de trasferencia. p.1. [sitio web]. España. [Consultado: 24 octubre 2019] Archivo pdf. Disponible en: <http://chilorg.chil.me/download-doc/86426>.

Tabla 1. Matriz de decisión para la elección de los frutos seleccionados para el proceso de aislamiento

Fruta/ Criterio	Valor	Maracuyá	Mora	Ciruela	Gulúpa	Guayaba	Melón
Precio	1	+	+	+	+	+	-
Contenido de pectina en la cascara	2	+	+	+	+	+	+
Tiempo de maduración	2	+	0	+	-	+	-
Contenido de azucares (Brix)⁹⁴	3	+	-	+	-	+	+
Cosecha o Disponibilidad	3	+	+	+	+	+	-
Sumatoria							
	+	11	6	11	6	11	5
	-	0	1	0	5	0	6
Total		11	5	11	1	11	-1

Fuente: elaboración propia

Para la matriz de decisión se tiene valores del 1 al 3, y calificaciones de (+) positivo, (-) negativo y (0) neutro, donde:

- 1 Poco importante
- 2 Importante
- 3 Muy importante

Basados en las propiedades investigadas de cada una de las frutas bibliográficamente y con la matriz de decisión, las frutas que mejores puntajes obtuvieron en los criterios de selección fueron: Maracuyá, ciruela y guayaba, siendo los grados Brix y la cosecha o disponibilidad de conseguir la fruta los criterios de mayor valor, obteniendo una calificación de 11 puntos para estos tres frutos, siendo seleccionados para el posterior proceso de selección y preparación de los frutos. Ya que el maracuyá y la ciruela contienen un porcentaje mínimo de sólidos solubles por refractometría de 18. 0%, y la guayaba un 12%. Mientras que por otro lado la mora sumó un total de 5 puntos debido a que el tiempo de maduración es más lento que el de los otros frutos y su porcentaje de grados Brix es de 9%. La Gulúpa con un

⁹⁴ RESOLUCUON DE 2011. Ministerio de salud y protección social. Disponibles. [Sitio web]. El MINISTERIO DE LA PROTECCION SOCIAL. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: https://members.wto.org/cnattachments/2011/tbt/COL/11_2297_00_s.pdf

puntaje de 1, posee un tiempo de maduración mayor que el de los demás y un porcentaje de grados Brix de 10.2; en última instancia encontramos al melón con un porcentaje considerable de grados Brix de 11, pero con un precio menor y tiempo de maduración prolongado obteniendo un puntaje de -1.

De acuerdo con la matriz de selección, se determinó que los frutos seleccionados fueron, el maracuyá, la ciruela y la guayaba, estos son clasificados como frutas climáticas⁹⁵, es decir que continúan madurando después de la cosecha, siendo ésta asociada con el cambio de composición. En estas frutas se evidencia significativamente el cambio de color de la piel externa siendo un indicador práctico del estado de madurez pos cosecha.

Los frutos como el maracuyá, el cual es tropical, prospera en lugares semi cálidos y a mayor altura sobre el nivel del mar⁹⁶, la ciruela es sembrada en zonas templadas, requiriendo una temperatura óptima de 12 a 22°C, donde también requiere de suelos sueltos, profundos y drenados, ricos en materia orgánica⁹⁷ y por último la guayaba, se cultiva principalmente en áreas calientes de América, se desarrolla muy bien en aquellos lugares con temperaturas entre 16-34°C.⁹⁸ Estos frutos fueron comprados en la ciudad de Bogotá D.C., en supermercados “la vid”, ya que son directamente traídos de los cultivos provenientes donde se cosecha cada fruta para así evitar que sean blanqueados y se pierda la microbiota proveniente del campo.

Para la preparación de los frutos, éstos no fueron blanqueados ya que así mantienen la microbiota adquirida en el campo, predominando las levaduras y los

⁹⁵ ABHISHEK, R. U. et al. Artificial ripening of fruits misleading ripe and health risk. [en línea]. En: Everyman’s Science. February 16. Vol.6. Pág. 364. [Consultado: 15 febrero 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Abhishek_Umesh4/publication/326207587_Artificial_ripening_of_fruits-misleading_ripe_and_health_risk/links/5b3e125c0f7e9b0df5f4bac3/Artificial-ripening-of-fruits-misleading-ripe-and-health-risk.pdf.

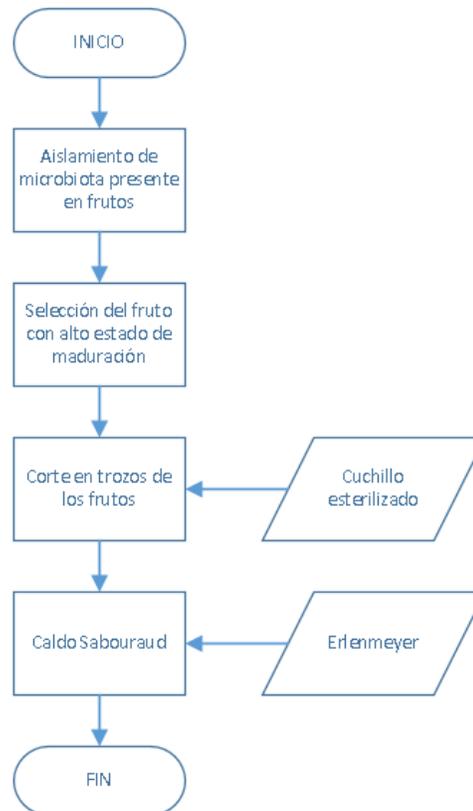
⁹⁶ CASTRO. Julio. Cultivo de maracuya. En: Gerencia Regional Agraria. [sitio web]. Peru. [Consultado: 30 octubre 2019]. Archivo pdf. Disponible en: http://www.agrolibertad.gob.pe/sites/default/files/MANUAL%20DEL%20CULTIVO%20DE%20MARACUYA_0.pdf

⁹⁷ CALVO. Ivan. El cultivo del ciruelo. En: proyecto microcuenca Plantón. [sitio web]. Costa Rica. Consultado: 30 octubre 2019]. Archivo pdf. Disponible en: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/AV-0983.pdf>.

⁹⁸ GARCIA, Mario. Cultivo de guayaba. En: Guia técnica del cultivo de la guayaba.[sitio web]. [Consultado: 30 octubre 2019]. Archivo pdf. Disponible en: <http://centa.gob.sv/docs/guias/frutales/GUIA%20CULTIVO%20GUAYABA.pdf>

mohos,⁹⁹ por esto se optó por cortar los frutos facilitando el crecimiento de microorganismos suspendidos en el medio de cultivo caldo Sabouraud (anexo A). En el diagrama 1 se mostrará el procedimiento para el proceso de aislamiento de microbiota presente en frutos.

Diagrama 1. Aislamiento de microbiota presente en frutos



Fuente: elaboración propia

2.4 PRE- ENRIQUECIMIENTO DE MICROBIOTA PRESENTE EN FRUTOS

Para realizar el pre enriquecimiento de la microbiota se utilizó como medio de cultivo Dextrosa Sabouraud (caldo Sabouraud), el cual contiene un antibiótico de amplio espectro que limita el crecimiento de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, éste posee los nutrientes necesarios para promover el crecimiento selectivo de hongos a su vez contiene un pH ácido, lo cual evita el crecimiento de

⁹⁹ CARRILLO, Leonor y AUDISIO, Carina. Frutas y hortalizas. [en línea]. En: Manual de Microbiología de los Alimentos. Argentina: Alberdi.2007. p .76. [Consultado: 15 febrero 2019]. Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/0%20portada%20manual.pdf>. ISBN 978-987-05-3214-9.

microorganismos indeseados. De la misma manera para contribuir al crecimiento tanto de hongos filamentosos como de levaduras en el medio de pre enriquecimiento fue necesario tener las condiciones ambientales óptimas, por esta razón los caldos mostrados en la ilustración 6 de las frutas seleccionadas fueron llevados a incubación en el shaker (agitador) a una temperatura de 30 °C a 100 rpm durante 48 horas, estas condiciones fueron tomadas de investigaciones anteriores y por recomendación del microbiólogo asesor, los cuales indican que el crecimiento y desarrollo de estos microorganismos es óptimo¹⁰⁰.

Ilustración 6. Pre enriquecimiento de la microbiota



Fuente: elaboración propia

2.4.1 Aislamiento en medio sólido Sabouraud, a partir de los caldos de pre enriquecimiento. Partiendo del pre enriquecimiento en caldo Sabouraud, el cual permite el desarrollo de levaduras y hongos filamentosos, se lleva a cabo el aislamiento en medio de cultivo sólido, agar Sabouraud con cloranfenicol, este medio de cultivo fue seleccionado dado que la búsqueda de microorganismos capaces de llevar a cabo procesos de fermentación para este estudio se sesga a levaduras, por tanto los medios de selección desde las primeras fases del estudio corresponden a medios de cultivo que solo permite el crecimiento de hongos filamentosos y levaduras (eucariotas), evitando el crecimiento de bacterias^{101 102},

¹⁰⁰ ZAPATA José, HOYOS Margarita, QUINCHÍA Lida. Parametros cineticos de *Scharyomyces cerevisiae* en presencia de un campo magnético variable de baja intensidad y alta frecuencia. [En línea]. En: *vitae* Revista de la facultad química farmacéutica. 2005. p. 39. [Consultado: 28 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169815869005.pdf>

¹⁰¹ BRAVO Carlos, ACEVEDO José, JARAMILLO Carlos. Aislamiento y caracterización de una levadura floculante para producir etanol del banano de rechazo. [En línea]. En: *Biocnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. Julio – Diciembre. 2014. Vol. 2. p. 153. [Consultado: 28 octubre 2019]. Disponible en: <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotechnology/article/view/354/547>

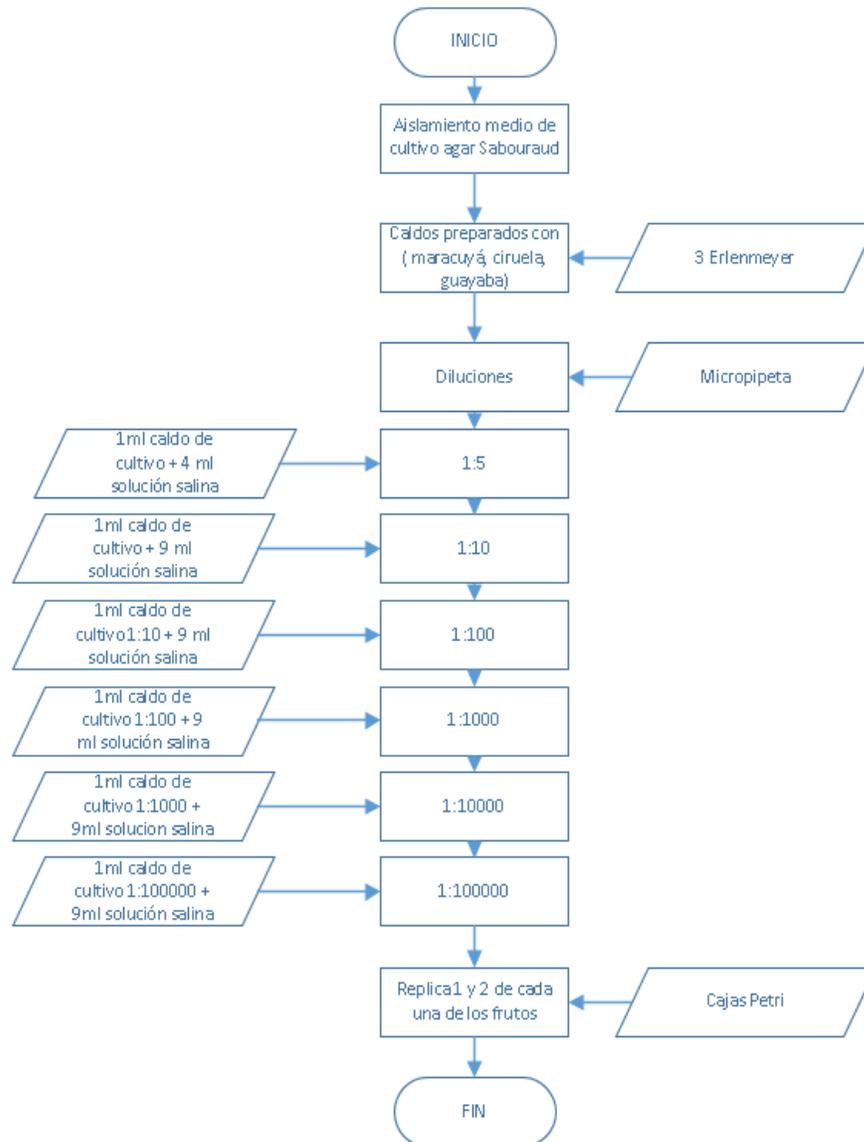
¹⁰² GUIUSIANO G.E., MANGIATERRA M.L. Diferenciación e identificación presuntiva rápida de levaduras con el medio CHROM-agar *Candida*. [En línea]. En: *Revista Argentina de Microbiología*. 1998. p. 101. [Consultado: 28 octubre 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Gustavo_Giusiano/publication/13541908_Rapid_differentiation

(anexo B) realizando diluciones seriadas guiadas bajo el criterio del microbiólogo competente de (1:5, 1:10 y 1:100) de los caldos inoculados, obteniendo un crecimiento de microorganismos abundantes imposibilitando el conteo de cada cepa, por ende, se realizaron nuevamente diluciones seriadas de (1:1000, 1:10.000 y 1:100.000) con el fin de realizar el recuento estadísticamente significativo y aislamiento de colonias individuales que permitan diferenciar la morfología macroscópica de los microorganismos.

Se efectuaron replicas (R1 y R2) para cada una de las diluciones y frutos, evaluando así, el proceso de crecimiento de los microorganismos. En el diagrama 2 se muestra el procedimiento para seleccionar la mejor dilución.

[_and presumptive identificaiton of yeasts using Candida CHROM-agar medium/links/5d017959a6fdccd1309692c0/Rapid-differentiation-and-presumptive-identificaiton-of-yeasts-using-Candida-CHROM-agar-medium.pdf](https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2014.05401.x)

Diagrama 2. Aislamiento a partir de caldos en medio de cultivo sólido, Agar Sabouraud con cloranfenicol

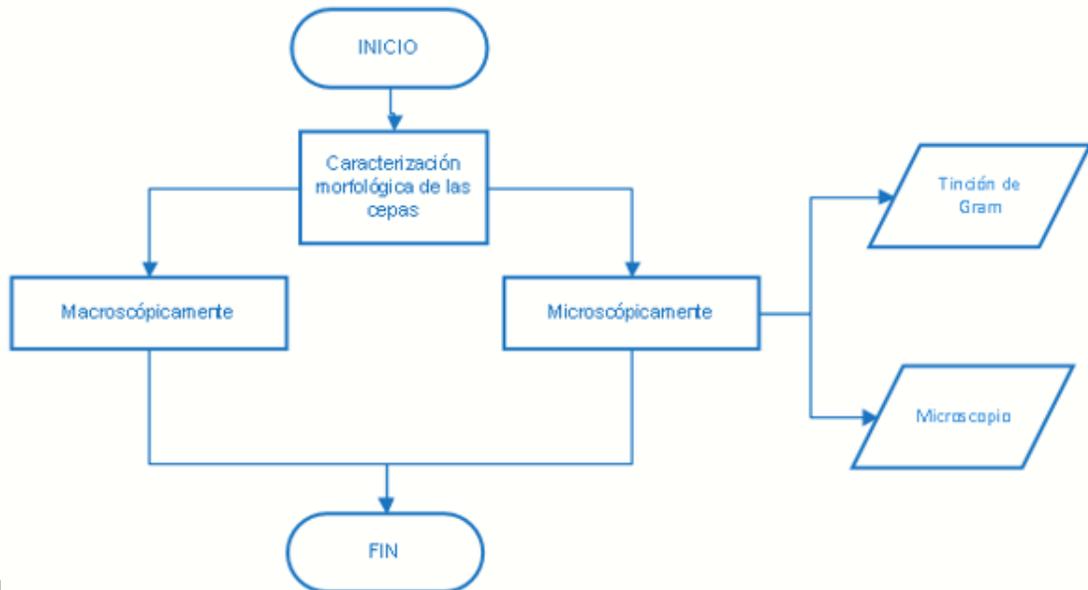


Fuente: elaboración propia

2.4.1.1 Caracterización de los aislamientos en medio sólido Agar Sabouraud con cloranfenicol. Para el proceso de selección, recuento y caracterización de levaduras adecuada, fue utilizada la dilución (1:100.000) para cada uno de los frutos, ya que allí no demostró un crecimiento masivo como en las anteriores diluciones, posibilitando el recuento y las caracterizaciones de las colonias a identificar.

En la descripción morfológica de las colonias se realizaron caracterizaciones macroscópicas y microscópicas. En las caracterizaciones macroscópicas se tuvo en cuenta forma, borde, textura y color, por otro lado en las caracterizaciones microscópicas utilizando un microscopio óptico con un aumento de 100X y la técnica por coloración tinción de Gram¹⁰³, se realizó una descripción morfológica de las levaduras presentes en el medio, descritas en el diagrama 3.

Diagrama 3. Caracterización morfológica de las cepas



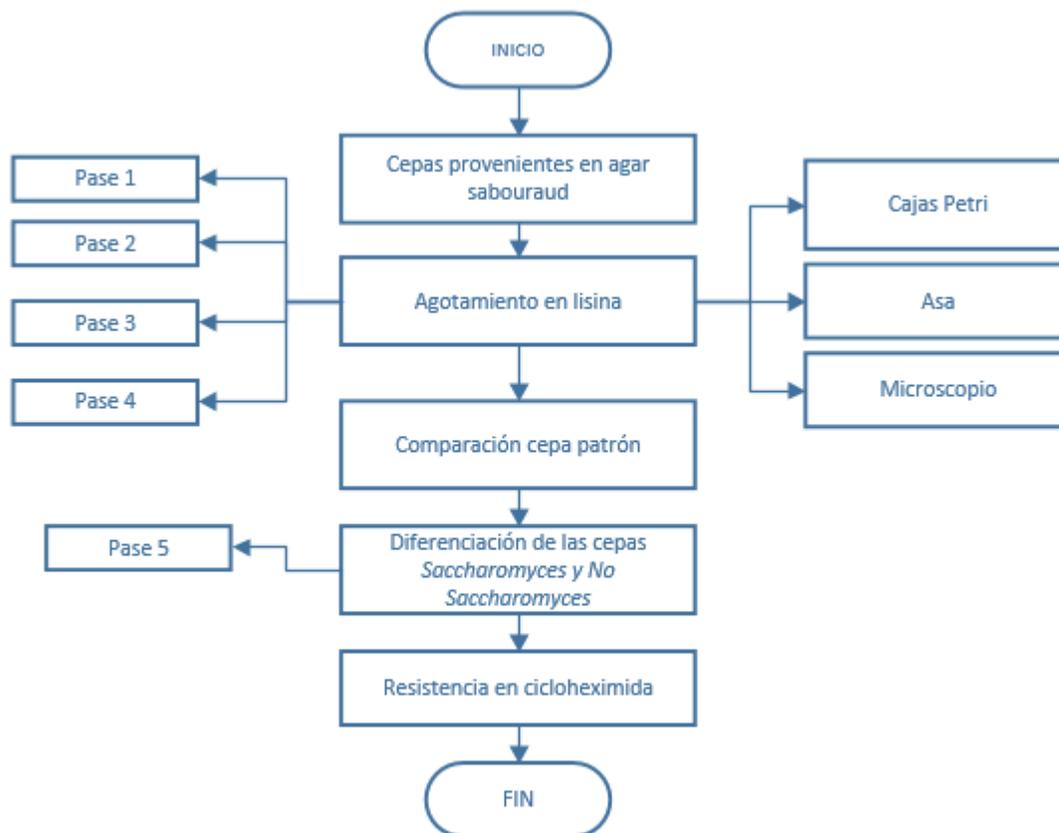
Fuente: elaboración propia

2.5 DIFERENCIACIÓN DE LEVADURAS EN AGAR LISINA Y AGAR SABOURAUD CON CICLOHEXIMIDA

Después del aislamiento de las colonias desarrolladas en medio agar Sabouraud y teniendo en cuenta la morfología de las cepas encontradas allí, identificadas como levaduras, se llevó a cabo la diferenciación de las cepas entre las pertenecientes al género *Saccharomyces* y las que no, denominadas No *Saccharomyces*, para ello se utilizó agar lisina (Anexo C). Posteriormente se procedió a evaluar el crecimiento de las cepas aisladas en agar Sabouraud con cicloheximida. En el diagrama 4 se mostrará el procedimiento anteriormente descrito.

¹⁰³ LOPEZ, Luis. et al. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. [En línea]. En: investigación en discapacidad. Enero-marzo 2014. Vol.3. p.12. [Consultado: 18 abril 2019]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b.pdf>.

Diagrama 4. Diferenciación de levaduras en agar lisina y agar Sabouraud en cicloheximida



Fuente: elaboración propia

2.5.1 Diferenciación en medio sólido lisina. La elección del medio sólido lisina se realizó ya que según investigaciones realizadas, la morfología de levaduras silvestres en este medio se ve afectada por factores como la temperatura de incubación, el tiempo de incubación, entre otros¹⁰⁴, es por esta razón que este medio de cultivo permite la diferenciación de microorganismos del género *Saccharomyces* y No *Saccharomyces* capaces de brindar características organolépticas distintas a bebidas alcohólicas como la cerveza.¹⁰⁵ La diferenciación en este agar se

¹⁰⁴ FOWELL, R. R. The identification of Wild Yeast Colonies on Lysine Agar [En línea]. En: Journal of Applied Bacteriology. Diciembre 1965. Vol.28. p 373. [Consultado: 28 octubre 2019]. Disponible en: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.1965.tb02167.x>

¹⁰⁵ MAIO Di, *et al.* A Method to Discriminate Between the *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* in Mixed Fermentation on WLD and Lysine Agar Media. [en linea]. En: Istituto Regionale della Vite e del Vino. June- August. 2010. Vol.32. p.35-41. [Consultado: 7 marzo 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/220007334_A_method_to_discriminate_between_the_Candida_stellata_and_Saccharomyces_cerevisiae_species_in_mixed_fermentation_on_WLD_and_Lysine_Agar_media.

fundamenta en la descarboxilación y desaminación del aminoácido lisina como única fuente de nitrógeno, para lo cual se realizaron cuatro siembras o pases sucesivos, con el fin de asegurar que el crecimiento del microorganismo a partir del segundo pase se debe a la capacidad de metabolizar el aminoácido lisina.¹⁰⁶

La presencia de microorganismos del género *Saccharomyces* en este medio de cultivo se evidencia por un cambio de coloración en este pasando de una coloración purpura a amarilla, ya que en particular este género no posee la capacidad de metabolizar este aminoácido presente como única fuente de nitrógeno, por lo que su crecimiento se puede llegar a ver inhibido en este medio, es por ello también que las pocas colonias individuales que logran crecer allí, se atribuyen a este género demostrando esta incapacidad de crecer allí incluso durante varios días.¹⁰⁷ Por otro lado los microorganismos del género *No Saccharomyces* utilizan la lisina para su aislamiento y enumeración selectiva, manteniendo el medio con su coloración original purpura ya que cuentan con la habilidad de utilizar la lisina como fuente de nitrógeno para metabolizarla y colonizar en este medio sin presentar dificultad alguna, estas levaduras son capaces de seguir desarrollándose después de realizar dos siembras consecutivas en el medio¹⁰⁸.

Este medio cuenta como indicador de pH con Purpura de bromocresol el cual vira a color amarillo a valores de pH 5 o inferiores. La utilización de la glucosa provoca la acidificación del medio (amarillo), lo cual favorece la actividad enzimática descarboxilasa y la metabolización de la lisina que resulta en la elevación del pH, tornando el medio nuevamente al color purpura.¹⁰⁹

¹⁰⁶ NAGODAWITHANA, Tilak. Recent Developments. [en línea]. En: Yeast Technology. Copyright. 1991. p. 149. [Consultado 15 junio 2018]. Disponible en: https://books.google.com.co/books?id=zvrOBgAAQBAJ&pg=PA141&dq=Lysine+agar+culture+medium&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiGnr-j4NjkAhWStIkKHeTdD_gQ6AEIaDAI#v=onepage&q=Lysine%20agar%20culture%20medium&f=false. ISBN 978-94-011-9773-1.

¹⁰⁷ GONZALES, Magali. Evaluación de la persistencia de levaduras *Saccharomyces* en viñedos de la zona alta del Río Mendoza. Licenciatura en Bromatología. Estación Experimental Agropecuaria Mendoza – INTA. 2015. p. 14. [Consultado: 30 junio 2019]. Disponible en: http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/6714/tesis-gonzalez-magali.pdf.

¹⁰⁸ REZENDIS, Rios, *et al.* Aprovechamiento de levadura enológicas nativas no-*Saccharomyces* para su uso como agentes fermentativos en elaboración de cerveza artesanal. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 2018. P. 10. [Consultado: 23 marzo 2019]. Disponible en: <https://repositorio.unam.mx/contenidos/107764>.

¹⁰⁹ DELOST, Maria. Identification. [en línea]. En: Introduction to diagnostic microbiology for the laboratory sciences. Youngstown: Jones & Bartlett learning. 2015. p. 193. [Consultado 23 mayo 2019]. Disponible en: https://books.google.com.co/books?id=GS_FDAAAQBAJ&pg=PA193&dq=lysine+agar+decarboxylation+and+deamination+of+the+amino+acid+lysine&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjp7_aa5NjkAhVGwFkKHZrRBxEQ6AEIKDAA#v=onepage&q=lysine%20agar%20decarboxylation%20and%20deamination%20of%20the%20amino%20acid%20lysine&f=false. ISBN. 978-1-284-03231-4.

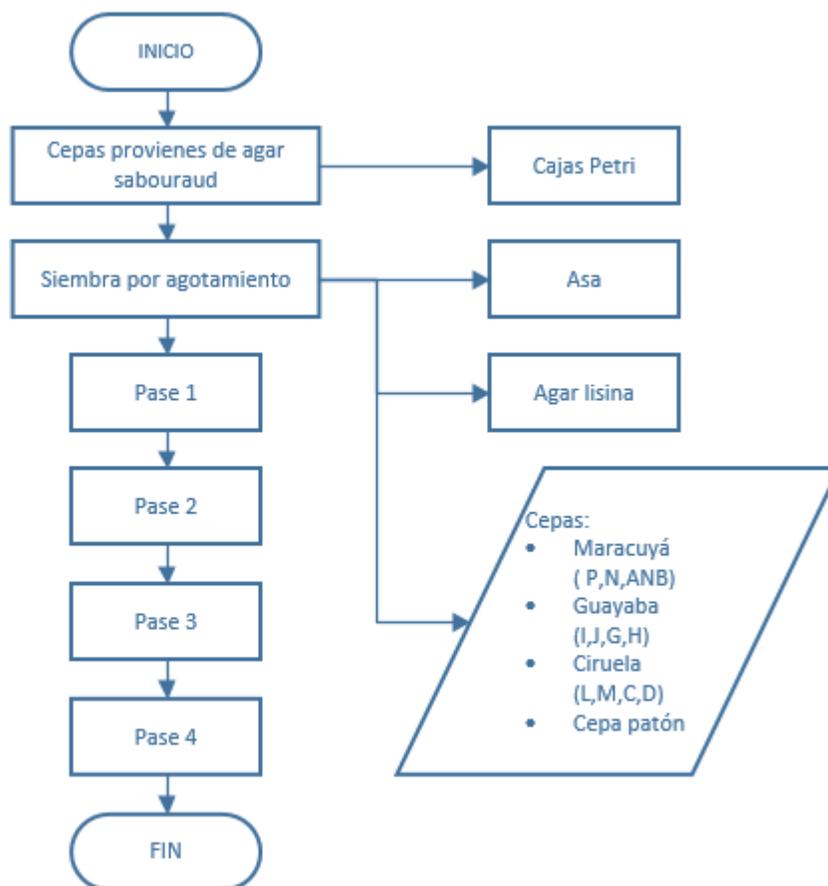
Para este proceso de diferenciación, las doce colonias aisladas en agar Sabouraud por agotamiento procedentes de los tres frutos: Maracuyá (A,B,N,P) Guayaba (I,J,G,H) Ciruela (L,M,C,D) fueron cultivadas en agar lisina nuevamente por la técnica de siembra por agotamiento.

Se realizaron cuatro pases o siembras sucesivas a cada una de las cepas anteriormente nombradas, y a la cepa de referencia, denominada *cepa patrón*, la cual corresponde a una cepa comercial del género *Saccharomyces* utilizada en los procesos de elaboración de cerveza por la cervecería Artesanal, la cual se utilizó como referencia para realizar caracterizaciones morfológicas y de crecimiento con las cepas seleccionadas anteriormente y determinar su pertenencia al género *Saccharomyces* ya que éste microorganismo es un referente común en la fermentación de cervezas. Estos pases se realizaron tomando como referencia investigaciones anteriores, ya que estas indican que luego de dos pases sucesivos en este medio y hasta que el microorganismos agote las fuentes de nitrógeno que puede traer de otros medios de cultivo, toma la lisina como única fuente de nitrógeno y se considera microorganismos del género No *Saccharomyces*¹¹⁰.

A continuación, por medio del diagrama 5 se explicará el proceso de los cuatro pases realizados a cada una de las cepas incluida la patrón en medio de cultivo agar lisina.

¹¹⁰ GODOY, Ana. Aislamiento e Identificación molecular de especie de levaduras No-*Saccharomyces* presentes en uvas. Tesis de grado licenciatura en bioquímica. Montevideo. Universidad de la república de Uruguay. 2013. p 23-24. [Consultado: 28 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/1544/1/uy24-16718.pdf>

Diagrama 5. Pases de las cepas de Maracuyá (A, B, N, P), Guayaba (I, J, G, H), Ciruela (L, M, C, D). y cepa patrón en medio de cultivo agar lisina



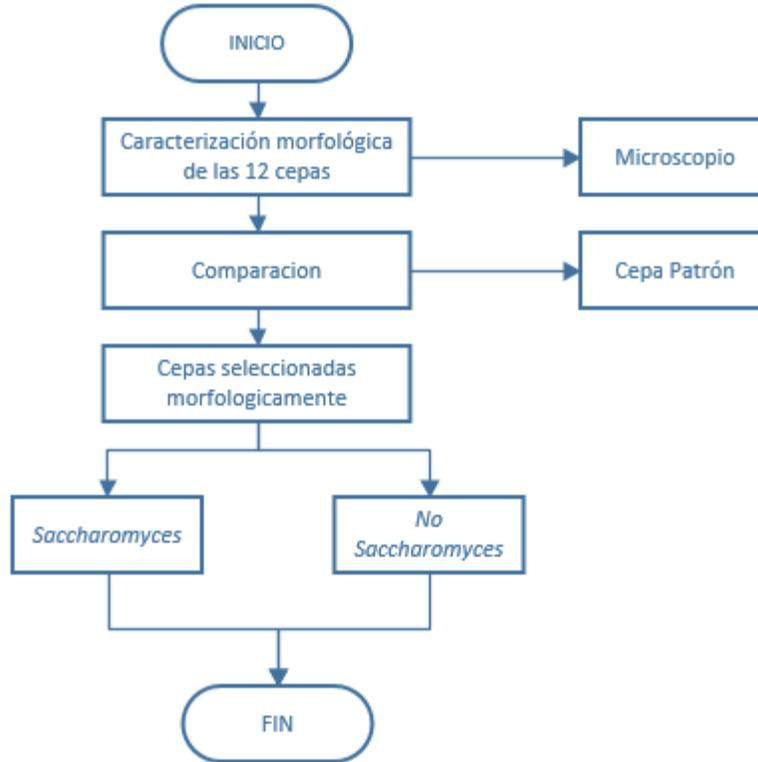
Fuente: elaboración propia

2.5.1.1 Caracterización morfológica de los pases en agar lisina. Con el objetivo de llevar un seguimiento de la presencia del género *Saccharomyces* en el medio de cultivo agar lisina se realizaron caracterizaciones macroscópicas y microscópicas de los pases realizados anteriormente. Esto se llevó a cabo por medio de la técnica de tinción de Gram.

2.5.1.2 Comparación morfológica entre las 12 cepas obtenidas en agar lisina y la cepa control. Posterior a la caracterización morfológica de las 12 cepas maracuyá (A,B,N,P), ciruela (L,M,C,D), guayaba (I,J,G,H) y la cepa patrón en medio de cultivo agar lisina, se elaboró una comparación para establecer diferencias y similitudes en cuanto a crecimiento (capacidad de metabolizar Lisina) y morfología entre éstas, tomando como referencia la cepa patrón, con el fin de diferenciar las cepas que tuvieran características similares a las del genero *Saccharomyces* y las que no.

En el diagrama 6 se determinará el procedimiento para la diferenciación de cepas.

Diagrama 6. Distinción de cepas del genero *Saccharomyces* de No *Saccharomyces*

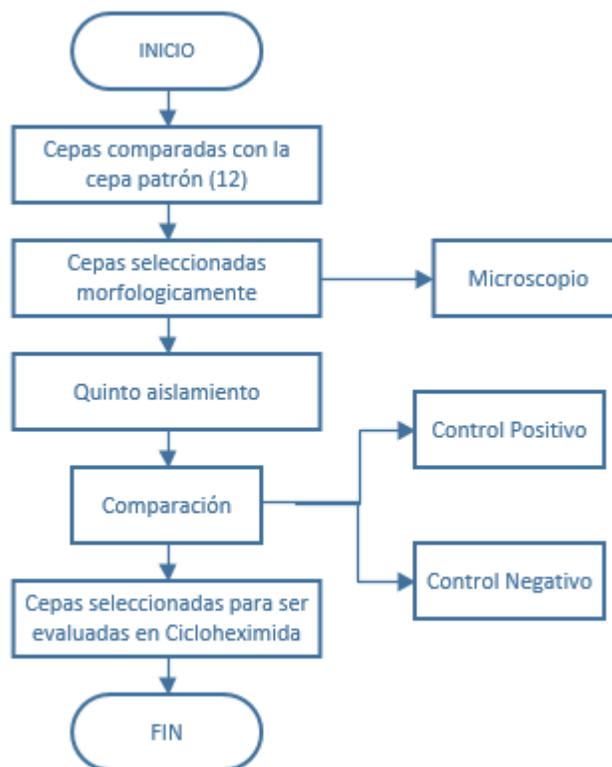


Fuente: elaboración propia

2.5.1.3 Selección de cepas diferenciadas en agar lisina. Teniendo en cuenta la comparación anteriormente realizada de las 12 cepas maracuyá (A, B, N, P) ciruela (L, M, C, D) guayaba (I, J, G, H) con la cepa patrón, se seleccionaron las cepas morfológicamente similares a la patrón y con baja capacidad de crecimiento en lisina para ser evaluadas en un quinto pase en medio de cultivo agar lisina.

En el diagrama 7 se muestra el procedimiento para la realización del quinto pase.

Diagrama 7. Cepas diferenciadas en agar lisina



Fuente: elaboración propia

2.5.1.4 Diferenciación en agar Sabouraud con cicloheximida. Por lo general, las cepas *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de la naturaleza, son muy sensibles a cicloheximida (inhibidas). La cicloheximida es un antibiótico que impide el crecimiento de las células eucariotas por inhibición de la síntesis de proteínas en los ribosomas.¹¹¹

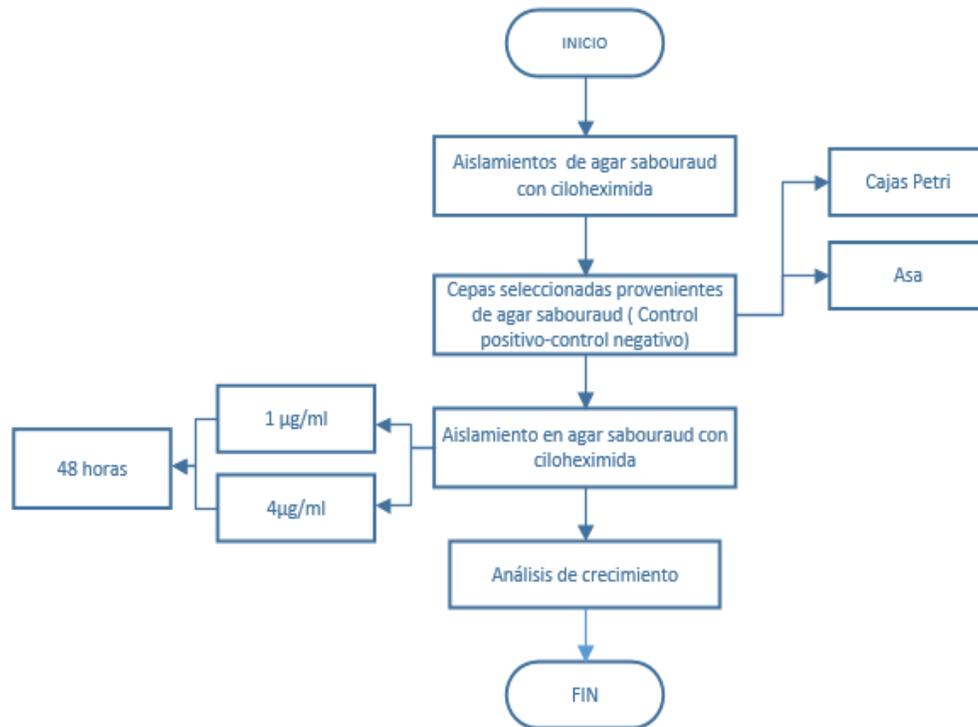
Por tal razón se escogieron las cepas que morfológicamente son similares a la levadura comercial para observar la resistencia a cicloheximida y así poder determinar con mayor claridad las que cumplen con las características para ser comparadas con levaduras *Saccharomyces*, dado que los resultados en Agar lisina no fueron concluyentes.

Para ello se tomaron las cepas seleccionadas junto con el control negativo que es la cepa patrón y un control positivo que se tomó como referencia guayaba J, (levadura No *Saccharomyces*), para ver la resistencia que las cepas presentan frente a dicho antibiótico, agar Sabouraud con cicloheximida (anexo D),.

¹¹¹ REGODON, José. Obtención y caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la elaboración estandarizada de vinos de calidad. Universidad de Extremadura. p .90. [Consultado 4 febrero 2019]. Disponible en: <http://biblioteca.unex.es/tesis/8477236496.PDF>.

Se dejaron 48 horas en incubación para posteriormente tener los resultados. Esta experimentación se realizó con dos concentraciones de cicloheximida primero con $1\mu\text{g/ml}$ (Univeral Beer Agar) y luego con $4\mu\text{g/ml}$ (WL Nutrient Agar) concentraciones utilizadas en cervecera ¹¹² En el diagrama 8 se darán a conocer los pasos para el aislamiento con cicloheximida.

Diagrama 8. Aislamientos en agar sabouraud con cicloheximida



Fuente: elaboración Propia

2.6 PRUEBAS API

Como soporte al proceso de identificación de levaduras *Saccharomyces* y No *Saccharomyces*, se emplearon pruebas API 20C AUX (Prueba Bioquímica) con el fin de aproximar los distintos géneros de levaduras aislados tipo No *Saccharomyces*, esta técnica aporta un 89% (BioMerieux*) de confiabilidad sobre la identificación de las cepas.

* “Ficha técnica api® 20C AUX BioMerieux”.

¹¹² SIGMA- ALDRICH. Product information cycloheximide solution (Actidion solution). [En línea] [consultado 6 junio 2019]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/us-export.html>

Este proceso se realizó inoculando cúpulas, que permiten que las levaduras se reproduzcan utilizando solo un tipo de sustrato correspondiente, siendo posible identificar un total de 34 especies diferentes.¹¹³ A esta prueba fueron sometidos las 5 cepas seleccionadas en los procesos de diferenciación descritos anteriormente (Lisina /Cicloheximida).

Para la determinación de estas pruebas se partió de un cultivo joven, utilizando un tubo falcon de 15 ml agregando 10 ml de solución salina estéril junto con la levadura en suspensión, luego se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro de la mezcla anterior, tomando como blanco la solución salina. Posterior a la toma del valor de absorbancia, se transfirió del tubo falcon 100 μ L de la suspensión a una ampolla C médium homogenizando evitando la formación de burbujas, llenando las cúpulas con la suspensión anterior creando un nivel horizontal para obtener resultados correctos, seguidamente se incubaron durante 48-72 horas. La composición de la galería API 20C AUX se puede observar en la siguiente lista de sustratos consignada en el cuadro 2.

¹¹³ LINARES, María y SOLIS, Francisco. Identificación de levaduras. [en línea]. En: Revista Iberoamericana de Micología. España: 2007. Asociación española de micología. p. 13. [Consultado 15 julio 2019]. Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf>. ISBN: 978-84-611-8776.

Cuadro 2. Composiciones de la galería API 20AUX

ENSAYOS	SUBSTRATOS
0	Ninguno
GLU	D-GLUcosa
GLY	GLYcerol
2KG	2-ceto-Gluconato cálcico
ARA	L-ARAbinosa
XYL	D-XYLosa
ADO	ADOnitol
XLT	XyLiTol
GAL	D-GALactosa
INO	INOsitol
SOR	D-SORbitol
MDG	Metil-D-Glucopiranosida
NAG	N-Acetil-Glucosamina
CEL	D-CELLobiosa
LAC	D-LACtosa
MAL	D-MALtosa
SAC	D-SACarosa
TRE	D-TREhalosa
MLZ	D-MeleZitosa
RAF	D-RAFinosa

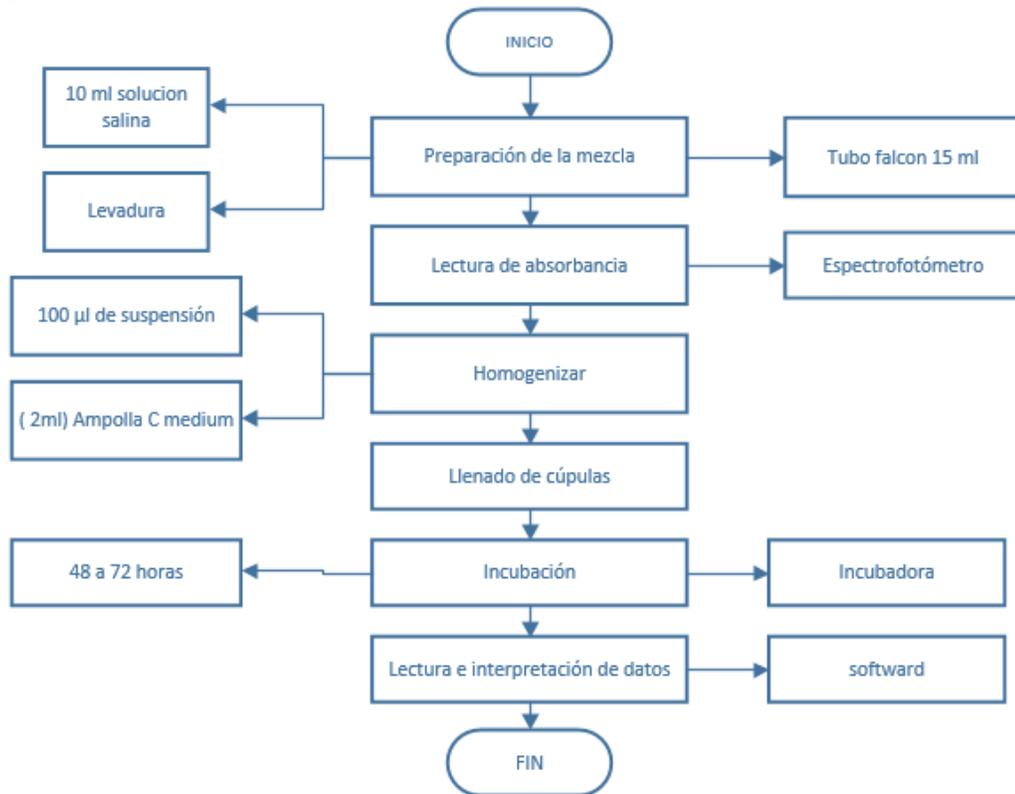
Fuente: API 20 C AUX. Sistema de identificación de levaduras. [En línea] [Consultado: 25 mayo 2019]. Disponible en: http://biotech.spip.ac-rouen.fr/IMG/pdf/API_20C_Aux.pdf.

Por último, se hizo la lectura e interpretación de los datos mediante el software de identificación por parte de BioMerieux*, el cual ofrece soluciones de diagnóstico que mejoran la salud del paciente y garantizan la seguridad del consumidor¹¹⁴. En el diagrama 9 se relatarán los pasos correspondientes a las pruebas API 20C AUX.

*Software de identificación por la marca comercial “BioMerieux”.

¹¹⁴ API 20 C AUX. Sistema de identificación de levaduras. [En línea]. En: BioMerieux. [Consultado: 24 octubre 2019]. Disponible en: http://biotech.spip.ac-rouen.fr/IMG/pdf/API_20C_Aux.pdf.

Diagrama 9. Pruebas API 20 C AUX

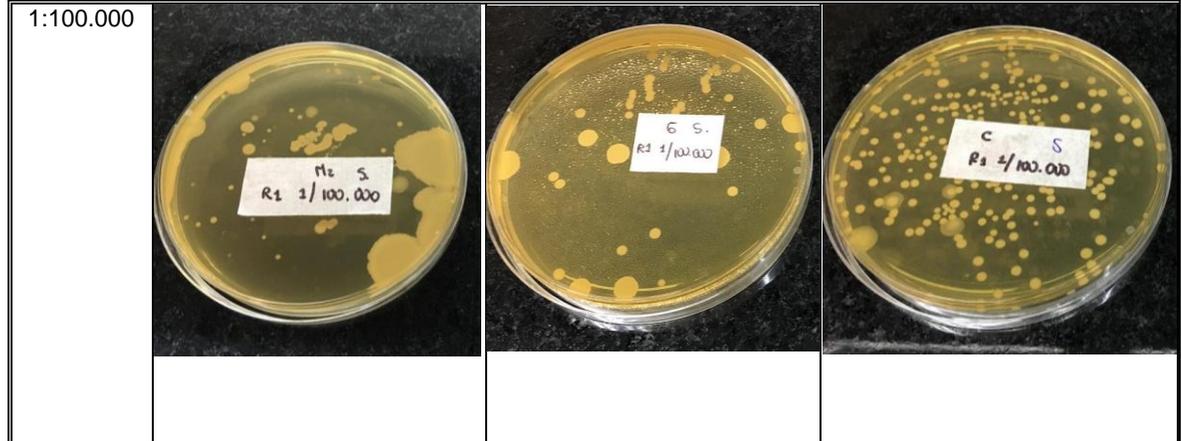


Fuente: elaboración propia

2.7 AISLAMIENTO DE LEVADURAS A PARTIR DE CALDOS SABOREAUD CON FRUTOS MADUROS

A partir de cada uno de los caldos incubados con cada uno de los frutos, se realizó la siembra de estos en medio sólido agar saboreaud con cloranfenicol. Con el fin de realizar un recuento aproximado de colonias, fue necesario realizar una serie de diluciones, hasta hallar en la que se pudiera realizar el recuento (anexo E). En el cuadro 3 se observa la dilución 1:100.000 la cual fue seleccionada para el recuento y aislamientos.

Cuadro 3. Siembra de la dilución 1:100.000



Fuente: elaboración propia

Para un mejor conteo de cepas se determinó que la mejor dilución en donde se logra hacer un recuento significativo estadísticamente es (1:100.000), donde es recomendable poder cuantificar de 10 a 400 UFC y a su vez caracterizar morfológicamente las colonias.

2.7.1 Caracterización morfológica de las colonias en dilución de 1:100.000. Por medio de la técnica de Tinción de Gram se realizaron caracterizaciones de las cepas obtenidas en la dilución de 1:100.000 en donde se determinaron 12 cepas las cuales son clasificadas por fruto presentado en el cuadro número 3.

En el cuadro 4 se nombrarán las colonias que fueron seleccionadas para su posterior caracterización.

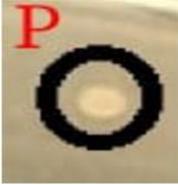
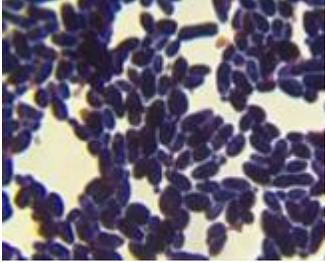
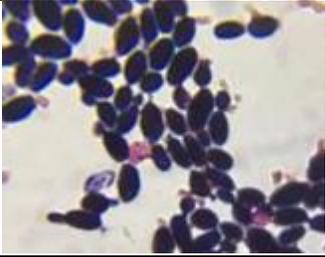
Cuadro 4. Denominación de las cepas

Frutas	Nombre de la colonia
Maracuyá	P
Maracuyá	N
Guayaba	I
Guayaba	J
Ciruela	L
Ciruela	M
Maracuyá	A
Maracuyá	B
Guayaba	G
Guayaba	H
Ciruela	C
Ciruela	D

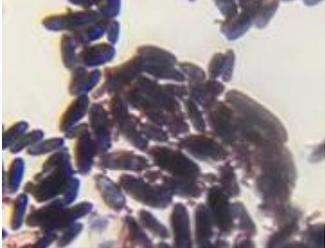
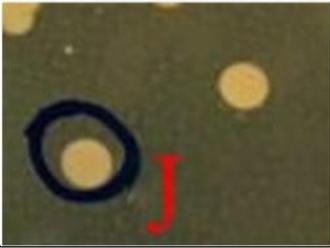
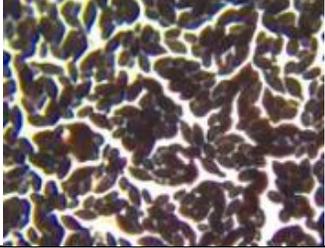
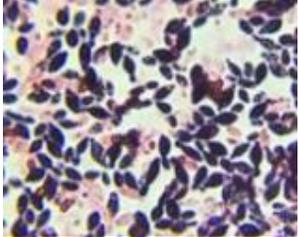
Fuente: elaboración propia

La descripción de las caracterizaciones macroscópicas y microscópicas de las 12 cepas seleccionadas se mostrará a continuación en el cuadro 5.

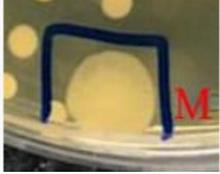
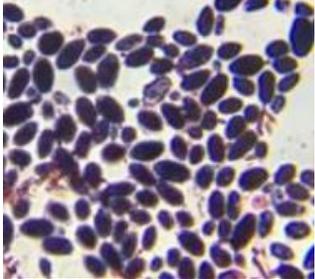
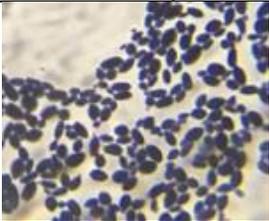
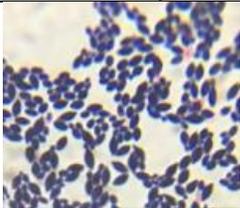
Cuadro 5. Morfología de las colonias

Origen	Maracuyá P (A. Sabouraud) 1:100.000
UFC/ml	53×10^5
Macroscópico	Microscópico
	
Forma: Circular y plana Bordes: Regular Textura: cremosa Color: Beige	Células apicales
Origen	Maracuyá N (A. Sabouraud) 1:100.000
UFC/ml	53×10^5
Macroscópico	Microscópico
	
Forma: Circular y plana Bordes: Irregular Textura: cremosa Color: Beige	Células apicales

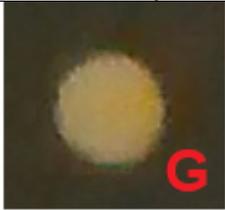
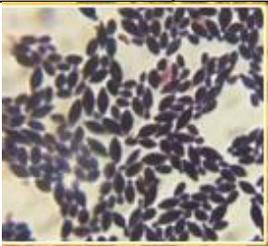
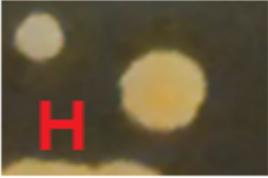
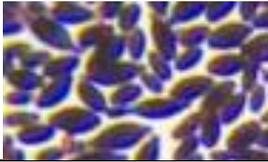
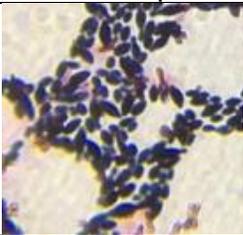
Cuadro 5. (Continuación)

Origen	Guayaba I (A. Sabouraud) 1:100.000
UFC/ml	54×10^5
Macroscópico	Microscópico
	
Forma: Circular y plana Bordes: Irregular Textura: Cremosa Color: Beige	Células apicales y ovaladas de gran tamaño.
Origen	Guayaba J (A. Sabouraud) 1:100.000
UFC/ml	54×10^5
Macroscópico	Microscópico
	
Forma: Circular y plana Bordes: Regular Textura: Cremosa Color: Beige	Células apicales con tamaño reducido.
Origen	Ciruela L (A. Sabouraud) 1:100.000
UFC/ml	257×10^5
Macroscópico	Microscópico
	
Forma: Circular y plana Bordes: Regular Textura: Cremosa Color: Beige	Células apicales.

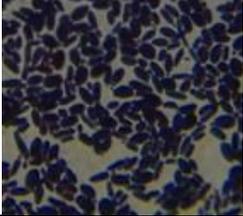
Cuadro 5. (Continuación)

Origen	Ciruela M (A. Sabouraud) 1:100.000
UFC/ml	257×10^5
Macroscópico	Microscópico
	
Forma: circular y plana Bordes: Irregular Textura: Cremosa Color: Beige	Células apicales.
Origen	Maracuyá A (A. Sabouraud) 1:100.000
UFC/ml	83×10^5
Macroscópico	Microscópico
	
Forma: circular y plana Bordes: Irregular Textura: Cremosa Color: Beige	Células apicales de tamaño pequeño
Origen	Maracuyá B (A. Sabouraud) 1:100.000
UFC/ml	34×10^5
Macroscópico	Microscópico
	
Forma: circular y plana Bordes: Regular Textura: Cremosa Color: Beige	Células apicales de tamaño pequeño

Cuadro 5. (Continuación)

Origen	Guayaba G (A. Sabouraud) 1:100.000
UFC/ml	114×10^5
Macroscópico	Microscópico
	
Forma: circular y plana Bordes: Regular Textura: Cremosa Color: Beige	Células apicales y ovaladas de mayor tamaño
Origen	Guayaba H (A. Sabouraud) 1:100.000
UFC/ml	58×10^5
Macroscópico	Microscópico
	
Forma: circular y plana Bordes: Irregular Textura: Cremosa Color: Beige	Células apicales y ovaladas de mayor tamaño
Origen	Ciruela C (A. Sabouraud) 1:100.000
UFC/ml	165×10^5
Macroscópico	Microscópico
	
Forma: circular y plana Bordes: Regular Textura: Cremosa Color: Beige	Células apicales

Cuadro 5. (Continuación)

Origen	Ciruela D (A. Sabouraud) 1:100.000
UFC/ml	180×10^5
Macroscópico	Microscópico
	
Forma: circular y plana Bordes: Regular Textura: Cremosa Color: Beige	Células apicales menor tamaño

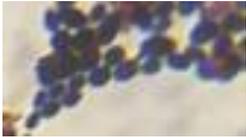
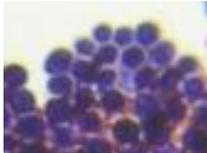
Fuente: elaboración propia

Las caracterizaciones macroscópicas de todas las cepas son muy similares entre sí siendo circulares y planas, de color beige, con una textura cremosa, más en lo único que se diferencian es en los bordes ya sean regulares o irregulares. Por otra parte, en las características microscópicas se encuentra diferencia entre las frutas siendo en las aisladas de Guayaba y Maracuyá células apicales y ovaladas de mayor tamaño a diferencia de las aisladas de Ciruela las cuales son células apicales de menor tamaño encontrándose con morfologías típicas de levaduras salvajes.

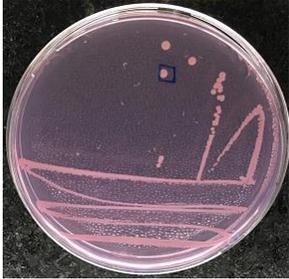
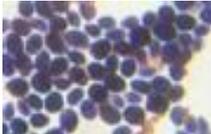
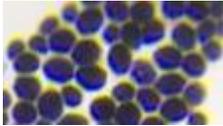
2.8 PASES EN MEDIO DE CULTIVO DISTINTIVO AGAR LISINA

Teniendo en cuenta los aislamientos realizados en medio de cultivo agar Sabouraud de las cepas de maracuyá (A, B, N, P) ciruela (L, M, C, D) y guayaba (I, J, G, H), se realizaron cuatro pases sucesivos, en medio de cultivo agar lisina junto con la cepa patrón, por medio de la técnica de siembra por agotamiento, con el propósito de aislar colonias, esto con el fin de diferenciar entre cepas tipo *Saccharomyces* (bajo o ausencia de crecimiento por no poder utilizar la Lisina como única fuente de Nitrógeno) y *No Saccharomyces*. Por medio de caracterizaciones morfológicas se analizó cada una de las cepas, para posteriormente realizar una comparación, mostrando secuencialmente aislamientos del primer al cuarto pase, para cada una de las cepas nombradas anteriormente. En el cuadro 6 se evidencian solamente el primer y el cuarto pase de la cepa L (aislada a partir de ciruela) junto con la cepa patrón, las once cepas restantes se podrán encontrar en el anexo F.

Cuadro 6. Primer y cuarto pase de la cepa L

Primer pase	
Caracterización macroscópica	
Ciruela Cepa L	Cepa Patrón
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	
	
<p>Posee células circulares pequeñas homogéneas.</p>	<p>Posee células circulares pequeñas homogéneas.</p>

Cuadro 6. (Continuación)

Cuarto pase	
Caracterización macroscópica	
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.

Fuente: elaboración propia

Al tomar como referencia la cepa patrón se pueden determinar la morfología de las 12 cepas tanto macroscópicamente como microscópicamente. Las características macroscópicas son especificadas como borde, forma, textura y color presentándose en las doce cepas similitud frente a la patrón. Se puede determinar que aún en el cuarto pase de la cepa patrón correspondiente al género *Saccharomyces* se observa un crecimiento a pesar de no contar con las enzimas necesarias para utilizar la Lisina como fuente de nitrógeno, demostrando que el uso de agar lisina no es definitivo para determinar la presencia del género *Saccharomyces*, por tanto se acude a una prueba aleatoria que es la resistencia al antibiótico cicloheximida. En cuanto a las características microscópicas se analizó que las cepas A, P y N (obtenidas del fruto de maracuyá) y las cepas L y D (provenientes del fruto de ciruela) presentan una morfología similar a la del género *Saccharomyces* al ser comparadas con la cepa patrón, mientras que las cepas I, J, G y H (aisladas de guayaba), junto con la cepa B (obtenida del fruto de maracuyá) y las cepas C y M (obtenidas del fruto de ciruela), presentan una morfología distinta en comparación con la cepa patrón, siendo éstas células alargadas y heterogéneas.

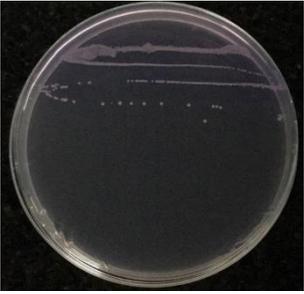
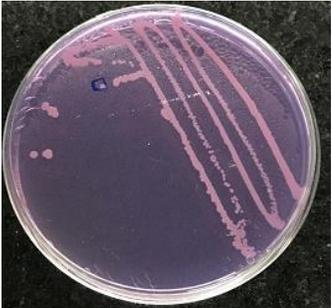
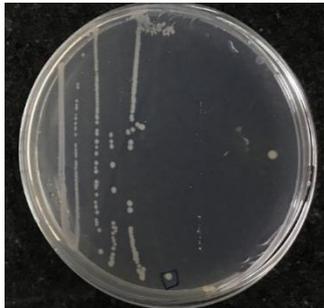
2.9 CEPAS SELECCIONADAS POR MORFOLOGÍA SIMILAR AL GÉNERO *Saccharomyces*

Las cepas seleccionadas se determinaron debido a la similitud que tienen morfológicamente con respecto a la cepa patrón *Saccharomyces* las cuales fueron maracuyá (A, N y P) y ciruela (D y L). Se realizó un quinto pase simultaneo entre las cinco cepas seleccionadas, la cepa patrón y una de las cepas con morfología distinta la cual fue seleccionada como control para las cepas tipo No *Saccharomyces*, esta fue la cepa J proveniente de la guayaba.

Esto se realizó con el objetivo de hacer una última comparación de las características morfológicas tomando como referencia la cepa patrón, y de esta manera justificar la selección realizada de las cinco cepas anteriormente nombradas las cuales serían analizadas posteriormente en medio de cultivo Sabouraud con cicloheximida.

Para evaluar el desarrollo de cada cepa seleccionada en el quinto pase, se realizaron caracterizaciones macroscópicas y microscópicas tomando como referencia las dos cepas, *Saccharomyces* y No *Saccharomyces*. En el cuadro 7 se determinará una de las cinco cepas seleccionadas y en el (anexo G) se podrán evidenciar las cepas restantes.

Cuadro 7. Quinto Pase de la cepa A junto con las cepas de referencia

Quinto Pase		
Cepa control (<i>Saccharomyces</i>)	Cepa seleccionada	Cepa control (No <i>Saccharomyces</i>)
Cepa A		
Caracterización macroscópica		
		

Cuadro 7. (Continuación)



Fuente: elaboración propia

Se confirmaron que las 5 cepas seleccionadas del fruto de maracuyá (A, N, P) y del fruto de ciruela (L,D) en el quinto pase, son morfológicamente similares a la cepa patrón, siendo estas una posible referencia de una levadura *Saccharomyces* y la cepa J para evidenciar morfologías *No Saccharomyces*. Estas cepas seleccionadas fueron evaluadas en cicloheximida como prueba para la determinación y confirmación del género como pruebas no moleculares.

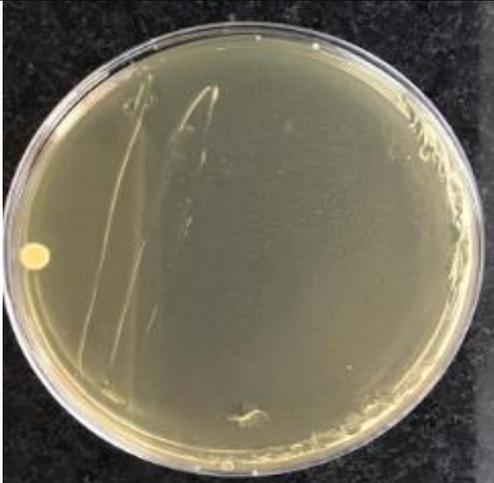
2.10 AISLAMIENTO EN AGAR SABOURAUD CON CICLOHEXIMIDA

Teniendo en cuenta la baja resistencia del género *Saccharomyces* a la cicloheximida, se tomaron dos concentraciones de cicloheximida (1 $\mu\text{g/ml}$ / 4 $\mu\text{g/ml}$) trazadas para determinar el crecimiento de las levaduras se realizó una comparación con los dos controles, positivo (*No Saccharomyces*) y negativo (*Saccharomyces*) obteniendo los siguientes resultados mostrados en el cuadro 8.

Cuadro 8. Asilamiento en agar sabouraud con cicloheximida

Aislamiento en agar sabouraud con cicloheximida	
Cepa control Negativo	
Concentración de $\frac{1\mu g}{ml}$	Concentración de $\frac{4\mu g}{ml}$
	
Cepa control Positivo	
Concentración de $\frac{1\mu g}{ml}$	Concentración de $\frac{4\mu g}{ml}$
	

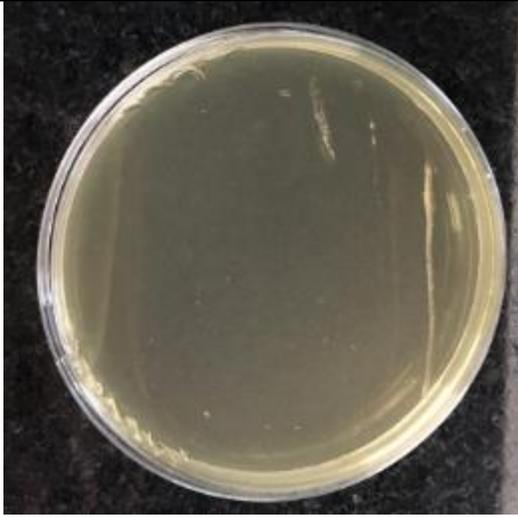
Cuadro 8. (Continuación)

Aislamiento en agar sabouraud con cicloheximida	
Maracuyá A	
Concentración de $\frac{1\mu g}{ml}$	Concentración de $\frac{4\mu g}{ml}$
	
Maracuyá N	
Concentración de $\frac{1\mu g}{ml}$	Concentración de $\frac{4\mu g}{ml}$
	

Cuadro 8. (Continuación)

Aislamiento en agar sabouraud con cicloheximida	
Maracuyá P	
Concentración de $\frac{1\mu g}{ml}$	Concentración de $\frac{4\mu g}{ml}$
	
Ciruela D	
Concentración de $\frac{1\mu g}{ml}$	Concentración de $\frac{4\mu g}{ml}$
	

Cuadro 8. (Continuación)

Aislamiento en agar sabouraud con cicloheximida	
Ciruela L	
Concentración de $\frac{1\mu g}{ml}$	Concentración de $\frac{1\mu g}{ml}$
	

Fuente: elaboración propia

Al ser comparadas las cepas seleccionadas junto con las cepas de control, positivo y negativo, en cada uno de las diferentes concentraciones, se logró observar que la cepa control negativo no presento crecimiento en ninguna de las concentraciones aplicadas al agar con cicloheximida por lo que posiblemente indica la presencia de la levadura *Saccharomyces*, mientras, que en el control positivo, la cepa J, proveniente del fruto de guayaba, se observó un crecimiento clasificándola como levadura salvaje. En las cepas identificadas como maracuyá A y P se evidencia crecimiento en las dos concentraciones aplicadas, por otro lado maracuyá N y ciruela D se observó un mayor crecimiento con $\frac{1\mu g}{ml}$ de cicloheximida y disminuyo al estar en $\frac{4\mu g}{ml}$ de antibiótico. La cepa que no presento crecimiento en ninguna de las dos concentraciones fue ciruela L, por lo cual es más cercana al género especificado como levadura *Saccharomyces* y posteriormente analizada.

2.11 PRUEBAS API 20C AUX

Los resultados obtenidos al implementar las pruebas API 20 C AUX permitieron la identificación precisa de las levaduras que se encontraron en las cinco cepas anteriormente seleccionadas. Luego de 72 horas de incubación se observa el crecimiento de las levaduras frente a la cúpula patrón en la cual se evaluó la levadura *Saccharomyces* directamente de la cervecería artesanal. A partir de la identificación numérica y con ayuda del catálogo analítico (Programa de

identificación) *apiweb*TM se obtuvieron los siguientes resultados consignados para la cepa P cuadro 9, cepa D cuadro 10, cepa N cuadro 11, cepa L cuadro 12, cepa A cuadro 13.

Cuadro 9. Identificación del género de la cepa P a partir de pruebas API 20 C AUX

Nombre	Maracuyá Cepa P																																																																																											
																																																																																												
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> API 20 C AUX V5.0 Instrucciones Chequear colores </div> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> <table style="margin: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">-</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td><td style="text-align: center;">2</td><td style="text-align: center;">4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">O</td><td style="text-align: center;">GLU</td><td style="text-align: center;">GLY</td> <td style="text-align: center;">2KG</td><td style="text-align: center;">ARA</td><td style="text-align: center;">XYL</td> <td style="text-align: center;">ADO</td><td style="text-align: center;">XLT</td><td style="text-align: center;">GAL</td> <td style="text-align: center;">INO</td><td style="text-align: center;">SOR</td><td style="text-align: center;">MDG</td> <td style="text-align: center;">NAG</td><td style="text-align: center;">CEL</td><td style="text-align: center;">LAC</td> <td style="text-align: center;">MAL</td><td style="text-align: center;">SAC</td><td style="text-align: center;">TRE</td> <td style="text-align: center;">MLZ</td><td style="text-align: center;">RAF</td><td style="text-align: center;">H/PH*</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">6</td><td></td><td></td> <td style="text-align: center;">5</td><td></td><td></td> <td style="text-align: center;">7</td><td></td><td></td> <td style="text-align: center;">6</td><td></td><td></td> <td style="text-align: center;">1</td><td></td><td></td> <td style="text-align: center;">7</td><td></td><td></td> <td style="text-align: center;">1</td><td></td><td></td> </tr> </table> </div>		-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	O	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	H/PH*	6			5			7			6			1			7			1									
-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-																																																																								
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4																																																																								
O	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	H/PH*																																																																								
6			5			7			6			1			7			1																																																																										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr style="background-color: #0056b3; color: white;"> <th colspan="7">IDENTIFICACION ACEPTABLE EN EL GENERO</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="background-color: #ffff00;">Galería</td> <td colspan="6">API 20 C AUX V5.0</td> </tr> <tr> <td style="background-color: #ffff00;">Perfil</td> <td colspan="6">6 5 7 6 1 7 1</td> </tr> <tr> <td style="background-color: #ffff00;">Nota</td> <td colspan="6">POSIBILIDAD DE <i>Candida tropicalis</i></td> </tr> <tr style="background-color: #ffff00;"> <th>Taxón significativo</th> <th>% ID</th> <th>T</th> <th colspan="4">Pruebas en contra</th> </tr> <tr> <td><i>Candida famata</i></td> <td>46.6</td> <td>0.69</td> <td>CEL 89%</td> <td>RAF 75%</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><i>Candida lusitanae</i></td> <td>37.8</td> <td>0.66</td> <td>XLT 20%</td> <td>CEL 80%</td> <td>HYPH 75%</td> <td></td> </tr> <tr style="background-color: #ffff00;"> <th>Taxón siguiente</th> <th>% ID</th> <th>T</th> <th colspan="4">Pruebas en contra</th> </tr> <tr> <td><i>Candida guilliermondii</i></td> <td>8.7</td> <td>0.5</td> <td>ARA 79%</td> <td>CEL 95%</td> <td>RAF 95%</td> <td></td> </tr> <tr style="background-color: #ffff00;"> <th>Pruebas complementarias(s)</th> <th>TIAMINA</th> <th>RAMNO SAas</th> <th colspan="4">ESC (HYD.)</th> </tr> <tr> <td><i>Candida famata</i></td> <td>+</td> <td>38%</td> <td colspan="4">65%</td> </tr> <tr> <td><i>Candida lusitanae</i></td> <td>-</td> <td>100%</td> <td colspan="4">58%</td> </tr> <tr> <td><i>Candida tropicalis</i></td> <td>+</td> <td>0%</td> <td colspan="4">0%</td> </tr> </tbody> </table>		IDENTIFICACION ACEPTABLE EN EL GENERO							Galería	API 20 C AUX V5.0						Perfil	6 5 7 6 1 7 1						Nota	POSIBILIDAD DE <i>Candida tropicalis</i>						Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra				<i>Candida famata</i>	46.6	0.69	CEL 89%	RAF 75%			<i>Candida lusitanae</i>	37.8	0.66	XLT 20%	CEL 80%	HYPH 75%		Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra				<i>Candida guilliermondii</i>	8.7	0.5	ARA 79%	CEL 95%	RAF 95%		Pruebas complementarias(s)	TIAMINA	RAMNO SAas	ESC (HYD.)				<i>Candida famata</i>	+	38%	65%				<i>Candida lusitanae</i>	-	100%	58%				<i>Candida tropicalis</i>	+	0%	0%			
IDENTIFICACION ACEPTABLE EN EL GENERO																																																																																												
Galería	API 20 C AUX V5.0																																																																																											
Perfil	6 5 7 6 1 7 1																																																																																											
Nota	POSIBILIDAD DE <i>Candida tropicalis</i>																																																																																											
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra																																																																																									
<i>Candida famata</i>	46.6	0.69	CEL 89%	RAF 75%																																																																																								
<i>Candida lusitanae</i>	37.8	0.66	XLT 20%	CEL 80%	HYPH 75%																																																																																							
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra																																																																																									
<i>Candida guilliermondii</i>	8.7	0.5	ARA 79%	CEL 95%	RAF 95%																																																																																							
Pruebas complementarias(s)	TIAMINA	RAMNO SAas	ESC (HYD.)																																																																																									
<i>Candida famata</i>	+	38%	65%																																																																																									
<i>Candida lusitanae</i>	-	100%	58%																																																																																									
<i>Candida tropicalis</i>	+	0%	0%																																																																																									

Fuente: elaboración propia

Cuadro 10. Identificación del género de la cepa D a partir de pruebas API 20 C AUX

Nombre	Ciruela Cepa D
--------	----------------

Cepa D

API 20 C AUX V5.0 [Instrucciones](#) [Chequear colores](#) ▶

-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
O	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	H/PH*

MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 5 5 6 1 7 1
Nota	POSIBILIDAD DE <i>Candida tropicalis</i>

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Candida lusitanae</i>	64.1	0.76	CEL 80%	HYPH 75%		
<i>Candida parapsilosis</i>	21.5	0.57	ARA 89%	HYPH 99%		
<i>Candida tropicalis</i>	6.9	0.55	GLY 9%	HYPH 99%		
<i>Candida famata</i>	6.7	0.61	XLT 75%	CEL 89%	RAF 75%	

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Candida guilliermondii</i>	0.3	0.33	ARA 79%	XLT 92%	CEL 95%	RAF 95%

Pruebas complementarias(s)	RAMNOSAas	TIAMINA	ESC (HYD.)	
<i>Candida famata</i>	38%	+	65%	
<i>Candida lusitanae</i>	100%	-	58%	
<i>Candida parapsilosis</i>	0%	+	0%	
<i>Candida tropicalis</i>	0%	+	0%	
<i>Candida tropicalis</i>	0%	+	0%	

Fuente: elaboración propia

Cuadro 11. Identificación del género de la cepa N a partir de pruebas API 20 C AUX

Nombre	Maracuyá Cepa N
--------	-----------------

API 20 C AUX V5.0 [Instrucciones](#) [Chequear colores](#)

-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
O	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	H/PH*
4			5			7			2			1			3			1		

PERFIL INACEPTABLE

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	4 5 7 2 1 3 1
Nota	POSIBILIDAD DE <i>Candida tropicalis</i>

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Candida lusitaniae			GLU 100%	XLT 20%	CEL 80%	TRE 100%
			HYPH 75%			
Candida famata			GLU 100%	MDG 99%	CEL 89%	TRE 96%
			RAF 75%			
Candida guilliermondii			GLU 100%	ARA 79%	MDG 88%	CEL 95%
			TRE 99%	RAF 95%		
Candida albicans 1			GLU 100%	GLY 14%	MDG 85%	TRE 97%
			MLZ 5%	HYPH 99%		
Candida parapsilosis			GLU 100%	ARA 89%	XLT 3%	MDG 89%
			TRE 93%	HYPH 99%		

Fuente: elaboración propia

Cuadro 12. Identificación del género de la cepa L a partir de pruebas API 20 C AUX

Nombre	Ciruela Cepa L
--------	----------------

Cepa L

API 20 C AUX V5.0 [Instrucciones](#) [Chequear colores](#)

-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
O	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	H/PH*
6			0			0			0			0			0			0		

BAJA DISCRIMINACION

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 0 0 0 0 0
Nota	POSIBILIDAD DE <i>C.lambica</i> O <i>C.lipolytica</i> POSIBILIDAD DE <i>Geotrichum candidum</i>

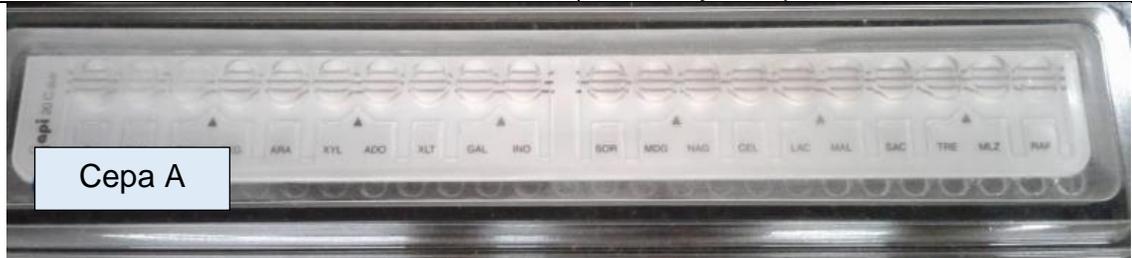
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Candida krusei/inconspicua</i>	33.2	0.87	HYPH 79%			
<i>Candida norvegensis</i>	32.0	0.82	HYPH 93%			
<i>Saprochaete capitata</i>	22.2	0.8	HYPH 95%			
<i>Candida glabrata</i>	8.8	0.71	GLY 20%	TRE 94%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Prototheca wickerhamii</i>	2.9	0.65	TRE 100%			

Pruebas complementarias(s)	ACTIDIONA	GLN	TIAMINA	GLUCOSAac
<i>Candida glabrata</i>	0%	0%	-	+
<i>Candida krusei</i>	3%	6%	+	+
<i>Candida inconspicua</i>	0%	83%	-	-
<i>Candida lambica</i>	0%	89%	-	+
<i>Candida lipolytica</i>	100%	3%	-	-
<i>Candida norvegensis</i>	0%	100%	-	v
<i>Saprochaete capitata</i>	92%	0%	-	-
<i>Geotrichum candidum</i>	100%	0%	+	v

Fuente: elaboración propia

Cuadro 13. Identificación del género de la cepa A a partir de pruebas API 20 C AUX.

NOMBRE	Maracuyá Cepa A																																							
																																								
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> API 20 C AUX V5.0 Instrucciones Chequear colores </div>																																								
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">- + +</td> <td style="text-align: center;">- + +</td> <td style="text-align: center;">- - +</td> <td style="text-align: center;">- - -</td> <td style="text-align: center;">- - -</td> <td style="text-align: center;">- - -</td> <td style="text-align: center;">+ - -</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1 2 4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">O GLU GLY</td> <td style="text-align: center;">2KG ARA XYL</td> <td style="text-align: center;">ADO XLT GAL</td> <td style="text-align: center;">INO SOR MDG</td> <td style="text-align: center;">NAG CEL LAC</td> <td style="text-align: center;">MAL SAC TRE</td> <td style="text-align: center;">MLZ RAF H/PH*</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">6</td> <td style="text-align: center;">6</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">1</td> </tr> </table>		- + +	- + +	- - +	- - -	- - -	- - -	+ - -	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4	O GLU GLY	2KG ARA XYL	ADO XLT GAL	INO SOR MDG	NAG CEL LAC	MAL SAC TRE	MLZ RAF H/PH*	6	6	4	0	0	0	1											
- + +	- + +	- - +	- - -	- - -	- - -	+ - -																																		
1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4																																		
O GLU GLY	2KG ARA XYL	ADO XLT GAL	INO SOR MDG	NAG CEL LAC	MAL SAC TRE	MLZ RAF H/PH*																																		
6	6	4	0	0	0	1																																		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr style="background-color: #4a7ebb; color: white;"> <th colspan="2">PERFIL INACEPTABLE</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="background-color: #ffff00;">Galería</td> <td>API 20 C AUX V5.0</td> </tr> <tr> <td style="background-color: #ffff00;">Perfil</td> <td>6 6 4 0 0 0 1</td> </tr> <tr> <td style="background-color: #ffff00;">Nota</td> <td> POSIBILIDAD DE <i>Geotrichum candidum</i> Rhodo: PIGMENTATION/POSIBILIDAD DE <i>R. glutinis</i> Rhodotorula: PIGMENTO ROSA ROJIZO O NARANJA </td> </tr> </tbody> </table>		PERFIL INACEPTABLE		Galería	API 20 C AUX V5.0	Perfil	6 6 4 0 0 0 1	Nota	POSIBILIDAD DE <i>Geotrichum candidum</i> Rhodo: PIGMENTATION/POSIBILIDAD DE <i>R. glutinis</i> Rhodotorula: PIGMENTO ROSA ROJIZO O NARANJA																															
PERFIL INACEPTABLE																																								
Galería	API 20 C AUX V5.0																																							
Perfil	6 6 4 0 0 0 1																																							
Nota	POSIBILIDAD DE <i>Geotrichum candidum</i> Rhodo: PIGMENTATION/POSIBILIDAD DE <i>R. glutinis</i> Rhodotorula: PIGMENTO ROSA ROJIZO O NARANJA																																							
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr style="background-color: #ffff00;"> <th>Taxón significativo</th> <th>% ID</th> <th>T</th> <th colspan="4">Pruebas en contra</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Geotrichum klebahnii</i></td> <td></td> <td></td> <td>ARA 0%</td> <td>SOR 88%</td> <td>MLZ 0%</td> <td>HYPH 92%</td> </tr> <tr> <td><i>Rhodotorula mucilaginosa 2</i></td> <td></td> <td></td> <td>MAL 98%</td> <td>SAC 100%</td> <td>TRE 95%</td> <td>RAF 98%</td> </tr> <tr> <td rowspan="2"><i>Rhodotorula minuta</i></td> <td rowspan="2"></td> <td rowspan="2"></td> <td>2KG 99%</td> <td>GAL 0%</td> <td>NAG 85%</td> <td>SAC 95%</td> </tr> <tr> <td>TRE 95%</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><i>Candida rugosa</i></td> <td></td> <td></td> <td>ARA 1%</td> <td>SOR 94%</td> <td>MLZ 0%</td> <td>HYPH 99%</td> </tr> </tbody> </table>		Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra				<i>Geotrichum klebahnii</i>			ARA 0%	SOR 88%	MLZ 0%	HYPH 92%	<i>Rhodotorula mucilaginosa 2</i>			MAL 98%	SAC 100%	TRE 95%	RAF 98%	<i>Rhodotorula minuta</i>			2KG 99%	GAL 0%	NAG 85%	SAC 95%	TRE 95%				<i>Candida rugosa</i>			ARA 1%	SOR 94%	MLZ 0%	HYPH 99%
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra																																					
<i>Geotrichum klebahnii</i>			ARA 0%	SOR 88%	MLZ 0%	HYPH 92%																																		
<i>Rhodotorula mucilaginosa 2</i>			MAL 98%	SAC 100%	TRE 95%	RAF 98%																																		
<i>Rhodotorula minuta</i>			2KG 99%	GAL 0%	NAG 85%	SAC 95%																																		
			TRE 95%																																					
<i>Candida rugosa</i>			ARA 1%	SOR 94%	MLZ 0%	HYPH 99%																																		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr style="background-color: #ffff00;"> <th>Taxón siguiente</th> <th>% ID</th> <th>T</th> <th colspan="4">Pruebas en contra</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2"><i>Candida utilis</i></td> <td rowspan="2"></td> <td rowspan="2"></td> <td>ARA 0%</td> <td>GAL 5%</td> <td>MAL 98%</td> <td>SAC 96%</td> </tr> <tr> <td>RAF 79%</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra				<i>Candida utilis</i>			ARA 0%	GAL 5%	MAL 98%	SAC 96%	RAF 79%																								
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra																																					
<i>Candida utilis</i>			ARA 0%	GAL 5%	MAL 98%	SAC 96%																																		
			RAF 79%																																					

Fuente: elaboración propia

A partir de los datos arrojados por los cuadros de identificación, se determinaron los géneros de las levaduras en donde la cepa D proveniente del fruto de ciruela, podría corresponder a *Candida tropicalis*, la cepa L de este mismo fruto a *Geotrichum candidum*, la cepa P obtenida del fruto de maracuyá a *Candida tropicalis*, la cepa N también obtenida del fruto de maracuyá fue identificada como *Candida tropicalis*, y por último la cepa A extraída del fruto de maracuyá podría corresponder a *Geotrichum candidum*. Según el resultado anterior se determinó que las cepas N, P y D serán seleccionadas para ser utilizadas en el posterior proceso de fermentación ya que presentan la mejor afinidad para dicho procedimiento, identificadas como *Candida tropicalis*.

En general, las levaduras que no son *Saccharomyces* representan un gran recurso de biodiversidad para la producción de nuevas cervezas teniendo el potencial de una aplicación más amplia a otros campos industriales y de bebidas. Dado el renovado interés en el uso de levaduras No *Saccharomyces* para elaborar cervezas tradicionales y su posible aplicación para producir cerveza baja en alcohol o libre de alcohol, las características de fermentación y sabor de diferentes especies de cultivos puros que no son *Saccharomyces* fueron examinadas para el potencial de elaboración de la cerveza, encontrándose entre ellas la cepa *Candida tropicalis*, la cual se puede encontrar en diferentes tipos de alimentos y bebidas fermentadas autóctonas.¹¹⁵ Las cepas de *Candida tropicalis* son en su mayoría capaces de fermentar glucosa, sacarosa y maltosa, también puede crecer y producir alcohol a diferentes condiciones de temperatura, pH y agitación. Cuentan con el potencial de crecer a concentraciones elevadas de mezcla de azúcares y cofermentar hexosas y pentosas, además de producir alcohol en medio mínimo de sales en ausencia de vitaminas. Este género es capaz de asimilar diferentes fuentes de carbono individuales o en mezclas tales como: glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa, xilosa y arabinosa siendo los principales azúcares para la producción de etanol.¹¹⁶

Actualmente *Candida tropicalis* también está siendo estudiada para ser utilizada en procesos de fermentación para producir etanol de segunda generación o bioetanol, gracias a sus capacidades fermentativas¹¹⁷.

¹¹⁵ MAXIMILIAN, Michel. Et al. Pure non- *Saccharomyces* started cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. [en línea]. En: Institute of Brewing & Distilling. September, 2016. p. 569-587. [Consultado 4 septiembre 2019]. ISSN. 122: 569–587. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jib.381>.

¹¹⁶ URZÚA. Evarito. Cepa de *Candida tropicalis* y su uso en proceso de fermentación de mezclas de azúcares para la producción de alcohol. En: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. [sitio web]. [Consultado 22 agosto 2019]. Archivo pdf. Disponible en: <https://ciatej.mx/patentes/35%20esp.pdf>.

¹¹⁷ HERMANSYAH. Bioethanol production from cellulose by *Candida tropicalis*, as an alternative microbial agent to produce etanol from lignocellulosic biomass. En: Sriwijaya journal of environment. [sitio web]. [Consultado 29 octubre 2019]. Archivo pdf. Disponible en: <http://ojs.pps.unsri.ac.id/index.php/ppsunsri/article/view/7>

3. ANALIZAR LOS PERFILES DE FERMENTACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS BAJO PRUEBAS PRELIMINARES DE FERMENTACIÓN

3.1 INTRODUCCIÓN

A partir del aislamiento y posterior selección de tres cepas de levaduras (denominadas como cepa P, N y D) en medios selectivos y que tras su identificación bioquímica correspondieron a *Candida tropicalis* (No *Saccharomyces*), se procedió a evaluar su capacidad fermentativa en mostos ricos en azúcares.

En esta fase experimental se describe como las cepas fueron evaluadas respecto a su perfil fermentativo con el fin de seleccionar la cepa con mejor perfil, para la elaboración de una cerveza artesanal. Para este proceso de selección se elaboró un diseño de experimentos, que permitió identificar los efectos al variar el tiempo y las cepas sobre la variable respuesta (concentración de glucosa), también se realizó un análisis de la estadística descriptiva de cada una de las cepas, donde se tuvo en cuenta el menor valor de la media estadística.

3.2 MATERIALES Y EQUIPOS

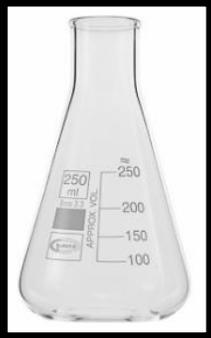
3.2.1 Equipos y materiales utilizados en la experimentación. En el cuadro 14 se muestran los equipos y materiales utilizados para realizar cada uno de los procedimientos de la experimentación.

Cuadro 14. Equipos y materiales utilizados en la experimentación

Materiales y equipos	Definición
<p data-bbox="467 1182 727 1222">Mecheros Fisher</p> 	<p data-bbox="906 1182 1463 1289">Es un instrumento utilizado en laboratorios que tiene como objetivo calentar sustancias y esterilizar¹¹⁸.</p>

¹¹⁸MATERIALES DE LABORATORIO, Mechero de fisher [sitio web]. España. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <https://materialesdelaboratorio.pro/mechero-de-fisher/>

Cuadro 14. (Continuación)

Materiales y equipos	Definición
<p data-bbox="451 302 743 340">Matraz Erlenmeyer</p> 	<p data-bbox="906 302 1461 485">Recipiente de vidrio utilizado en laboratorios para calentar y conservar sustancias, resistente a altas temperaturas (limitadas) durante periodos de tiempo largos¹¹⁹.</p>
<p data-bbox="496 716 699 753">Tubos falcon</p> 	<p data-bbox="906 716 1461 827">Recipientes utilizados para la separación (centrifugación) por medio de diferencias de densidades¹²⁰.</p>

¹¹⁹ MATRAZ AFORADO, Matraz Erlenmeyer [sitio web]. Madrid. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <https://matrazaforado.com/matraz-erlenmeyer/>

¹²⁰ FISHER SCIENTIFIC, Tubos conicos para centrifuga falcon de 15 ml [sitio web]. Madrid. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.fishersci.es/shop/products/falcon-15ml-conical-centrifuge-tubes-5/p-193301>

Cuadro 14. (Continuación)

Materiales y equipos	Definición
<p data-bbox="467 310 732 338">Tubos Eppendorf</p> 	<p data-bbox="906 310 1459 415">Recipientes utilizados para procesamiento de muestras, apto para aplicaciones de cultivo celular¹²¹.</p>
<p data-bbox="467 718 732 745">Balanza analítica</p> 	<p data-bbox="906 718 1459 823">Equipo utilizado en el laboratorio para determinar con exactitud peso de objetos pequeños o muestras¹²².</p>
<p data-bbox="407 1117 792 1144">Centrifuga de laboratorio</p> 	<p data-bbox="906 1117 1459 1222">Equipo que trabaja con velocidad de rotación, permitiendo la separación de dos compuestos¹²³.</p>

¹²¹ AVANTOR, Tubos Eppendorf 5.0 ml [sitio web]. California. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <https://es.vwr.com/store/product/11717117/tubos-eppendorf-5-0-ml>

¹²² TP LABORATORIO QUÍMICO, Balanza analítica [sitio web]. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/balanza-analitica.html>

¹²³ INSTRUMENTOS DE LABORATORIO, Centrifuga de laboratorio [sitio web]. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <https://instrumentosdelaboratorio.org/centrifuga-de-laboratorio>

Cuadro 14. (Continuación)

Materiales y equipos	Definición
<p data-bbox="456 308 740 338">Espectrofotómetro</p> 	<p data-bbox="906 308 1459 375">Instrumento utilizado en el área química para cuantificar sustancias¹²⁴.</p>
<p data-bbox="488 686 708 716">Refractómetro</p> 	<p data-bbox="906 686 1459 787">Equipo óptico utilizado para la medida del índice de refracción y %°Brix de una sustancia¹²⁵.</p>

¹²⁴ EQUIPOS Y LABORATORIO DE COLOMBIA, Que es y usos del espectrofotómetro. [sitio web]. Colombia. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: https://www.equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=1311

¹²⁵ TP LABORATORIO QUÍMICO, Refractómetro [sitio web]. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/refractometro.html>

Cuadro 14. (Continuación)

Materiales y equipos	Definición
<p data-bbox="440 264 760 338">Plancha de agitación</p> 	<p data-bbox="906 302 1463 449">Equipo que permite la mezcla automática constante de un líquido promoviendo la disolución de un sólido en este¹²⁶.</p>
<p data-bbox="467 716 732 753">Pipeta graduada</p> 	<p data-bbox="906 716 1463 863">Instrumento de laboratorio volumétrico, el cual permite la medida y transferencia de un líquido con exactitud¹²⁷.</p>
<p data-bbox="483 1073 716 1110">Pipeta Pasteur</p> 	<p data-bbox="906 1073 1463 1146">Material utilizado en el laboratorio que se utiliza para succionar líquidos¹²⁸.</p>

Fuente: elaboración propia

¹²⁶ TP LABORATORIO QUÍMICO, Agitador magnético. [sitio web]. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/agitador-magnetico.html>

¹²⁷ MATERIALES DE LABORATORIO, Pipeta graduada [sitio web]. España. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <https://materialesdelaboratorio.pro/pipeta-graduada/>

¹²⁸ LAB BRANDS. Pipeta pasteur en PE 3ml-LB Pro [sitio web]. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <http://www.labbrands.com/pasteur-plastica/567-pipeta-pasteur-en-pe-3ml-lb-pro.html>

3.3 METODOLOGÍA

3.3.1 Diseño de experimentos. A continuación se muestra el desarrollo del diseño de experimentos propuesto.

3.3.2 Identificación de la pregunta de investigación. Por medio del uso de las cepas P, N provenientes del fruto de maracuyá y D del fruto de ciruela en los procesos de fermentación, se buscó determinar la cepa con mejor perfil fermentativo para la elaboración de una cerveza artesanal tipo Ale, para esto se llevaron a cabo los análisis estadísticos.

3.3.3 Elección de los factores, los niveles y los rangos. Luego de identificar la pregunta de investigación se establecieron los factores o variables para ser estudiados en la experimentación. Estas variables se clasifican en variables dependientes y variables independientes del proceso, las cuáles serán mostradas a continuación.

3.3.3.1 Identificación de las variables dependientes. La variable dependiente (Y) se describe como el resultado del cambio o manipulación a los valores de una variable independiente (X), éstas se relacionan por medio de una función matemática determinada. Esta variable es tomada como la variable de respuesta para investigar y medir en el diseño de experimentos propuesto¹²⁹.

Las variables dependientes del proceso de fermentación se describen a continuación:

- **Concentración de etanol:** esta variable se refiere a la concentración de etanol después del proceso de fermentación, siendo determinada frente a diferentes rangos establecidos en el proceso.
- **pH:** en el proceso de fermentación el pH es una condición constante de medir, presentando una relación directa con la temperatura dando un rango que permitirá el inicio de la fermentación y el crecimiento microbiano.
- **Concentración de sustrato final:** a medida que pasa el tiempo, luego del inicio de la fermentación, la concentración del sustrato es consumida por el microorganismo, siendo complejo predecir el consumo.

¹²⁹ DÍAZ, Abel. Principios del diseño de experimentos. [En línea] En: Diseño estadístico de experimentos. 2 ed. Medellín. Editorial Universidad de Antioquia 2009. p. 6. [Consultado 1 septiembre 2018]. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=0x0DW6dNiyAC&pg=PA8&dq=Principios+del+dise%C3%B1o+de+experimentos.&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi3w8jMjPLkAhXQTd8KHfqED4MQ6AEIMzAC#v=onepage&q=Principios%20del%20dise%C3%B1o%20de%20experimentos.&f=false>. ISBN 978-958-714-264-8.

- **Concentración final de microorganismos:** luego de la inoculación en el medio de cultivo se hace difícil predecir el crecimiento de los microorganismos, es una variable que no se puede controlar directamente y depende de factores ideales para su crecimiento, metabolismo y producción de etanol¹³⁰.
- **Concentración de azúcares reductores:** esta variable se refiere a la concentración de azúcares reductores del proceso de fermentación. Se debe determinar la mayor concentración de azúcares reductores después de la fermentación, modificando diferentes variables, niveles y rangos, como las cepas seleccionadas y el tiempo de fermentación.

Teniendo en cuenta las diferentes variables dependientes del proceso de fermentación, se seleccionó como variable respuesta la concentración de glucosa, la cual se explicará más adelante.

3.3.3.2 Identificación de las variables independientes. Las variables independientes se presentan como las que el investigador puede modificar afectando la variable respuesta del diseño, es decir la(s) variable(s) dependientes del proceso. A continuación, se muestran las variables independientes involucradas en el proceso de fermentación¹³¹.

- **Tiempo de fermentación:** se determinan tiempos diferentes para ser directamente involucrados frente al resultado de la variable respuesta controlando el proceso de fermentación.
- **Cepas seleccionadas:** esta variable está implicada directamente con variable respuesta, ya que las cepas o levaduras seleccionadas son las que consumen los azúcares presentes en el mosto, lo que indica la producción de etanol en las fermentaciones demostrando así la evolución del proceso.
- **Ph inicial:** esta variable presenta relación directa con la temperatura, siendo una condición constante en el momento de la fermentación. Se evidencia un rango óptimo permitiendo el inicio de la fermentación generando un mejor rendimiento que influye en el producto final.

¹³⁰ SALAZAR, Iván, VILLAMIZAR, Jorge. Evaluación de la obtención de bioetanol partiendo de la fermentación de los azúcares concentrados en las bebidas gaseosas carbonatadas vencidas por medio de *Saccharomyces cerevisiae*. Fundación Universidad de América. Bogotá. 2019. Pág.72.

¹³¹ ALAZAR, Ivan y VILLAMIZAR, Jorge. Evaluación de la obtención de bioetanol partiendo de la fermentación de los azúcares concentrados en las bebidas gaseosas carbonatadas vencidas por medio de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de grado. Fundación Universidad de América, 2019. P. 72. [Consultado: 14 abril 2019]. Disponible en: <http://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/7404>.

- **Temperatura:** para determinar el estilo de cerveza debe existir un rango óptimo permitiendo el proceso de la fermentación. Es importante tener en cuenta esta variable para el crecimiento de los microorganismos ya que si no está dentro del rango correcto se puede presentar una inhibición o muerte del microorganismo. Esta variable es constante frente al proceso de fermentación.
- **Concentración de sustrato inicial:** la fermentación es una degradación aerobia o anaerobia de sustancias orgánicas a diversos productos. La cantidad de sustrato presente en una fermentación es fundamental para el crecimiento y metabolismo de los microorganismos. Se pueden presentar inhibiciones en presencia de altas concentraciones de sustrato, ocasionando alta presión osmótica evitando el libre movimiento del microorganismo en el medio de cultivo¹³².

Considerando las variables independientes involucradas en el proceso de fermentación para llevar a cabo el diseño de experimentos se seleccionaron los factores tiempo de fermentación y cepas seleccionadas, puesto que dependiendo de estas, se evalúa el comportamiento de la concentración de glucosa, la cual fue seleccionada como variable respuesta.

Luego de ser seleccionados los factores para el diseño de experimentos, se determinaron los rangos para este, los cuales se muestran a continuación.

- **Tiempo de fermentación:** el tiempo óptimo estipulado para el proceso de fermentación se da entre un rango de 24 a 72 horas, tomando 3 niveles 24, 48 y 72 horas. Este tiempo de fermentación se tomó ya que según investigaciones realizadas previamente, es el tiempo promedio al cual ocurre el proceso de fermentación y hay un consumo considerable de azúcares presentes en el mosto¹³³.
- **Cepas seleccionadas:** las cepas seleccionadas para ser utilizadas en el diseño de experimentos, se determinaron por medio de aislamientos realizados en el capítulo anterior, los cuales arrojaron 3 cepas *Candida tropicalis* con características fermentativas las cuales fueron denominadas cepas P, N provenientes del fruto de maracuyá y D del fruto de ciruela, tomando estas como los 3 niveles.

¹³² *Ibíd.*, Pág. 73.

¹³³ Silva Ramírez, M., Huayama Sopla, P. M., & Izquierdo Pacheco, María. Elaboración de bebida alcohólica de Inga feuillei “guaba” suplementado con panela y fermentado con *Saccharomyces cerevisiae*. [En línea]. En: Conocimiento para el Desarrollo, Revista oficial de investigación científica. Julio-Diciembre, 2015. Vol. 6, No. 2. Pág. 90. [Consultado 15 junio 2019] ISSN. 2225-0794. Disponible en: <https://revista.usanpedro.edu.pe/index.php/CPD/article/view/83>

En la tabla 2 se muestran las interrelaciones de los rangos y niveles de las variables independientes que se evaluarán en el diseño de experimentos.

Tabla 2 Interrelación de los rangos y niveles

Tiempo	Cepa		
	N(1)	P(2)	D(3)
24	Y111	Y121	Y131
	Y112	Y122	Y132
	Y113	Y123	Y133
48	Y211	Y221	Y231
	Y212	Y222	Y232
	Y213	Y223	Y233
72	Y311	Y321	Y321
	Y312	Y322	Y322
	Y313	Y323	Y333

Fuente: elaboración propia

3.3.4 Selección de la variable respuesta. La variable respuesta se define como la variable dependiente que brinda información importante al proceso que se está estudiando. Una de las características más importantes de esta es que debe ser medible ¹³⁴.

La variable de respuesta seleccionada fue la concentración de glucosa presente en el mosto. Esta variable proporciona información útil frente al proceso de la fermentación, ya que se relaciona con la producción de etanol y otros alcoholes presentes en la bebida, del mismo modo esta se seleccionó por la viabilidad de su medida en la experimentación.

Esta variable también se considera importante en la investigación, ya que a partir de esta se determinarán las condiciones adecuadas para el proceso de fermentación en la elaboración de la cerveza artesanal, por medio de la variación de los factores tiempo y cepas seleccionadas a los distintos rangos y niveles propuestos.

3.3.5 Elección del diseño experimental. En el análisis estadístico a desarrollar se quiere estudiar la varianza del tiempo, las cepas seleccionadas y su interacción con la concentración de glucosa presente en el mosto, para esto se escogió realizar un análisis de varianzas ANOVA.

¹³⁴ MONTGOMERY, Douglas. Diseño y análisis de experimentos. 2 ed. México: Limusa Wiley, 2002. p. 15. ISBN 9681861566.

Teniendo en cuenta previamente los factores seleccionados, la variable respuesta y tomando como referencia el objetivo del planteamiento del análisis estadístico, se realizó la formulación de las hipótesis.

En donde:

Factor A: tiempo de fermentación.

Factor B: cepas seleccionadas.

Variable respuesta: concentración de glucosa.

Factor A.

$H_0: \alpha = 0$: no hay efecto del tiempo de fermentación sobre la concentración de glucosa.

$H_i: \alpha \neq 0$: hay efecto del tiempo de fermentación sobre la concentración de glucosa.

Factor B.

$H_0: \beta = 0$: no hay efecto de la cepa seleccionada sobre la concentración de glucosa.

$H_i: \beta \neq 0$: hay efecto de la cepa seleccionada sobre la concentración de glucosa.

Interacción de los factores A y B

$H_0: \beta = 0$: no hay efecto en la interacción del tiempo de fermentación y las cepas seleccionadas sobre la concentración de glucosa.

$H_i: \beta \neq 0$: hay efecto en la interacción del tiempo de fermentación y las cepas seleccionadas sobre la concentración de glucosa.

A su vez para el análisis estadístico de los datos, se escogió un diseño factorial 3^2 haciendo uso de 3 réplicas. Siendo así, se encuentran dos factores A y B con niveles a y b respectivamente, por ende, de cada replica se incluyen todas las combinaciones de tratamiento ab.

Teniendo en cuenta lo anterior se seleccionó el análisis de varianzas ANOVA para el análisis de los datos de la pre experimentación realizada, ya que allí se analizaron los efectos de cada uno de los factores involucrados y su interacción, sobre la variable respuesta. A continuación, en la tabla 3 se determinó la estructura de la tabla de análisis de varianza ANOVA.

Tabla 3 Tabla de análisis de varianza ANOVA

ANOVA				
Fuentes variación	<u>SC</u>	GI	CM	F
Entre Factores A	<u>SCE_A</u>	a-1	CME _A	F _A
Entre factores B	<u>SCE_B</u>	b-1	CME _B	F _B
Interacción AB	SCE _{AB}	(a-1)(b-1)	CME _{TR}	F _{AB}
Dentro de tratamiento	SCD _{ER}	ab(n-1)	CMD _{ER}	
Total	SCT	N-1	CMT	

Fuente: MONTGOMERY, Douglas. Diseño y análisis de experimentos. 2 ed. México: Limusa Wiley, 2002. p. 15. ISBN 9681861566

Finalmente, para el análisis de varianzas se tomó un nivel de significancia teórico de 0.05, éste valor se tomó ya que los datos se consideran confiables puesto que fueron tomados por las investigadoras.

3.4 PROCESOS DE FERMENTACIÓN CON LAS CEPAS P, N (MARACUYÁ) y D (CIRUELA)

La fermentación es generada por una serie de reacciones de oxidación y reducción de una sustancia orgánica llamada sustrato, el cual es consumido por microorganismos como las levaduras, donde se obtiene como producto final llamado metabolito. Este proceso puede ocurrir en ausencia o presencia de oxígeno¹³⁵.

Para que el proceso de fermentación se lleve a cabo, se deben realizar una serie de procedimientos previamente como la preparación del inóculo y la determinación de la concentración de biomasa, ya que de esto depende la eficiencia del proceso¹³⁶.

¹³⁵ HERNANDEZ. Op.cit., p.37-38.

¹³⁶ Ibid., p. 27-29.

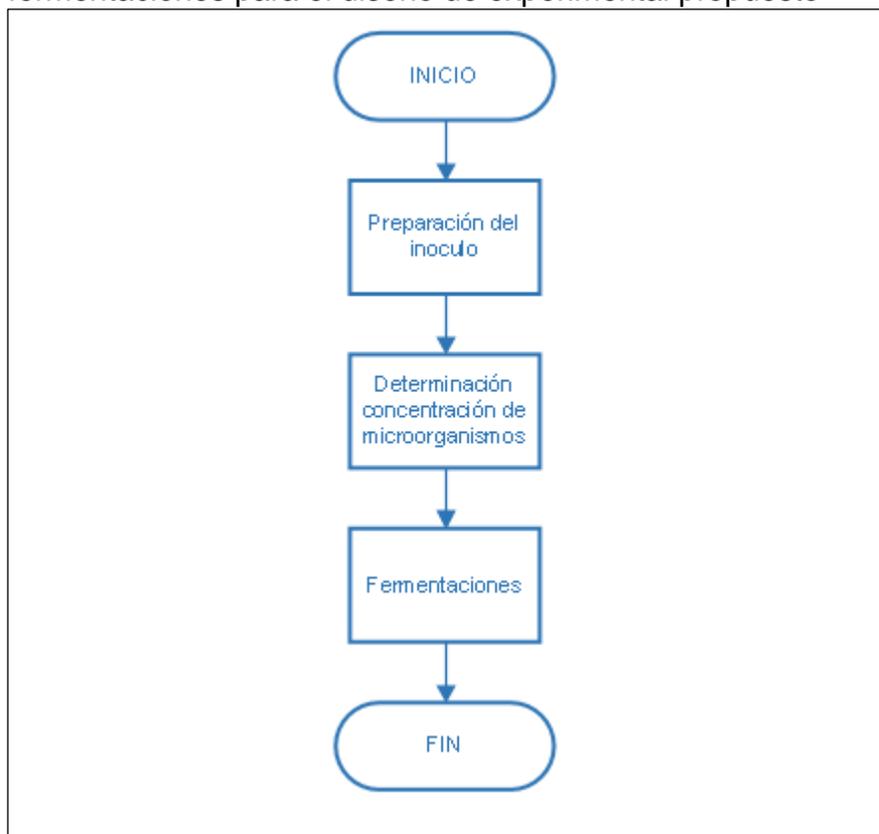
Estos procedimientos fueron guiados por manuales de prácticas de laboratorio de microbiología^{137 138}.

Todo esto se realizó con el fin de determinar, la cepa de mejor perfil fermentativo y el tiempo adecuado para llevar a cabo el proceso de fermentación. El diagrama 10 muestra el procedimiento que se realizó para la elaboración de las fermentaciones para el diseño de experimentos propuesto.

¹³⁷ RAMOS, Maria de los angeles. Métodos de cultivo y descripción morfológica de hongos [en línea]. En: Manual de prácticas del laboratorio de microbiología general. Universidad autónoma metropolitana, unidad Iztapalapa. 2004. p. 46. [Consultado 29 octubre 2019]. Disponible en: uamlinea.uam.mx/materiales/licenciatura/diversos/AQUIAHUATL_RAMOS_MARIA_DE_LOS_ANGELES_Manual_de_practicas_de.pdf ISBN 970-31-0141-0.

¹³⁸ CERA, Hecto, FERNANDEZ, Maria. Crecimiento microbiano. [en línea]. En: Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos. Asociación argentina de microbiología. 2013. p. 9. [Consultado 29 octubre 2019]. Disponible en: <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf> ISBN 978-987-26719-3-1

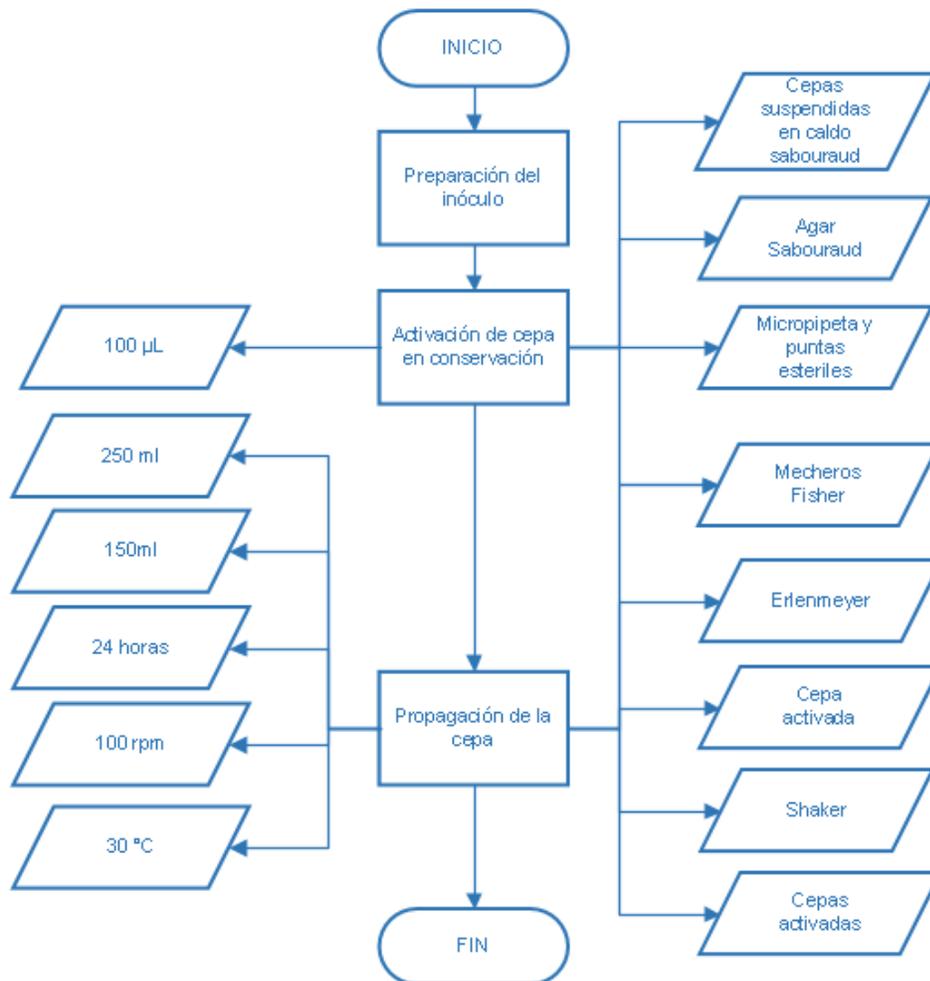
Diagrama 10. Procedimiento para la elaboración de las fermentaciones para el diseño de experimental propuesto



Fuente: elaboración propia.

3.4.1 Preparación del inóculo. La preparación del inóculo, se inició con la activación de las cepas P, N y D, las cuales se encontraban criopreservadas en una mezcla o suspensión de glicerol al 5% y caldo sabouraud; dicha activación se realizó por medio de siembras en medio de cultivo agar sabouraud y un tiempo de incubación de 48 horas a 30°C. Luego de esto se inició la propagación con la inoculación de cada una de las cepas en 150 ml de caldo sabouraud estéril en matraces Erlenmeyer de 250ml, esto se llevó a incubación al *shaker* por 24 horas a 30°C y 100 rpm. En el diagrama 11 se muestra el proceso para la preparación del inóculo.

Diagrama 11. Procedimiento para la para la preparación del inóculo



Fuente: elaboración propia

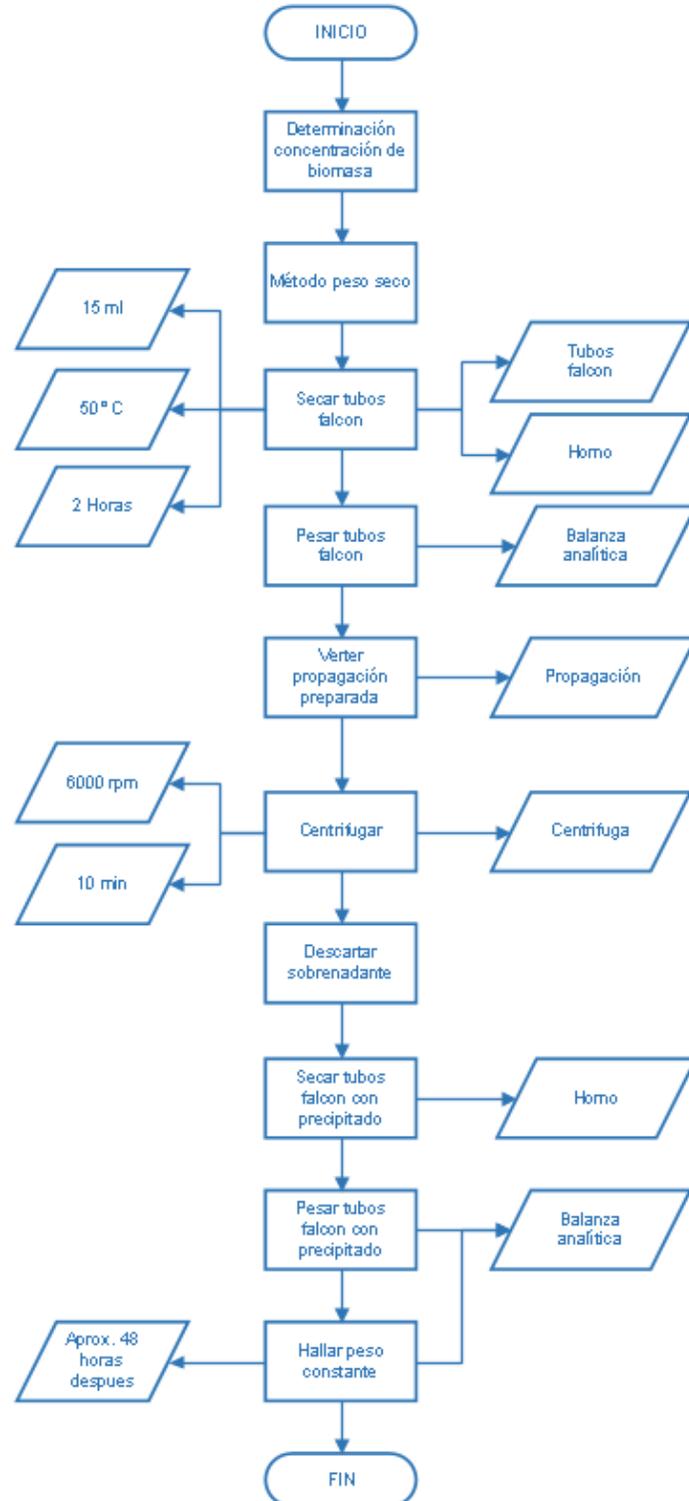
3.4.2 Determinación de la concentración de biomasa. Luego de la preparación del inóculo se determinó la concentración de biomasa presente en este, por ende se aplicó el método directo gravimétrico de peso seco, donde la separación de la biomasa se llevó a cabo por centrifugación, este método busca obtener el peso constante de los residuos secos de la muestra, por medio de la relación entre el peso del recipiente seco vacío y el peso del recipiente seco con los residuos de la muestra, los resultados se expresan en peso seco de la muestra por unidad de volumen¹³⁹. Como primer paso se tomaron tubos falcon de 15 ml y se les retiro la humedad, para esto se llevaron al horno a 50°C por 2 horas, y por ultimo estos fueron pesados, utilizando una balanza analítica para determinar su peso final,

¹³⁹ Ibid., p. 27.

posteriormente se tomó la muestra del cultivo en los tubos falcon previamente tarados, se centrifugó a 6000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante, se tomaron los tubos con el precipitado (biomasa) y se enviaron al horno a 50°C hasta retirar toda la humedad de la biomasa y hallar su peso constante, aproximadamente luego de 72 horas se determinó el peso de la biomasa obtenida.

En el diagrama 12 se muestra el proceso para la determinación de la concentración de biomasa.

Diagrama 12. Procedimiento para la determinación de la concentración de biomasa

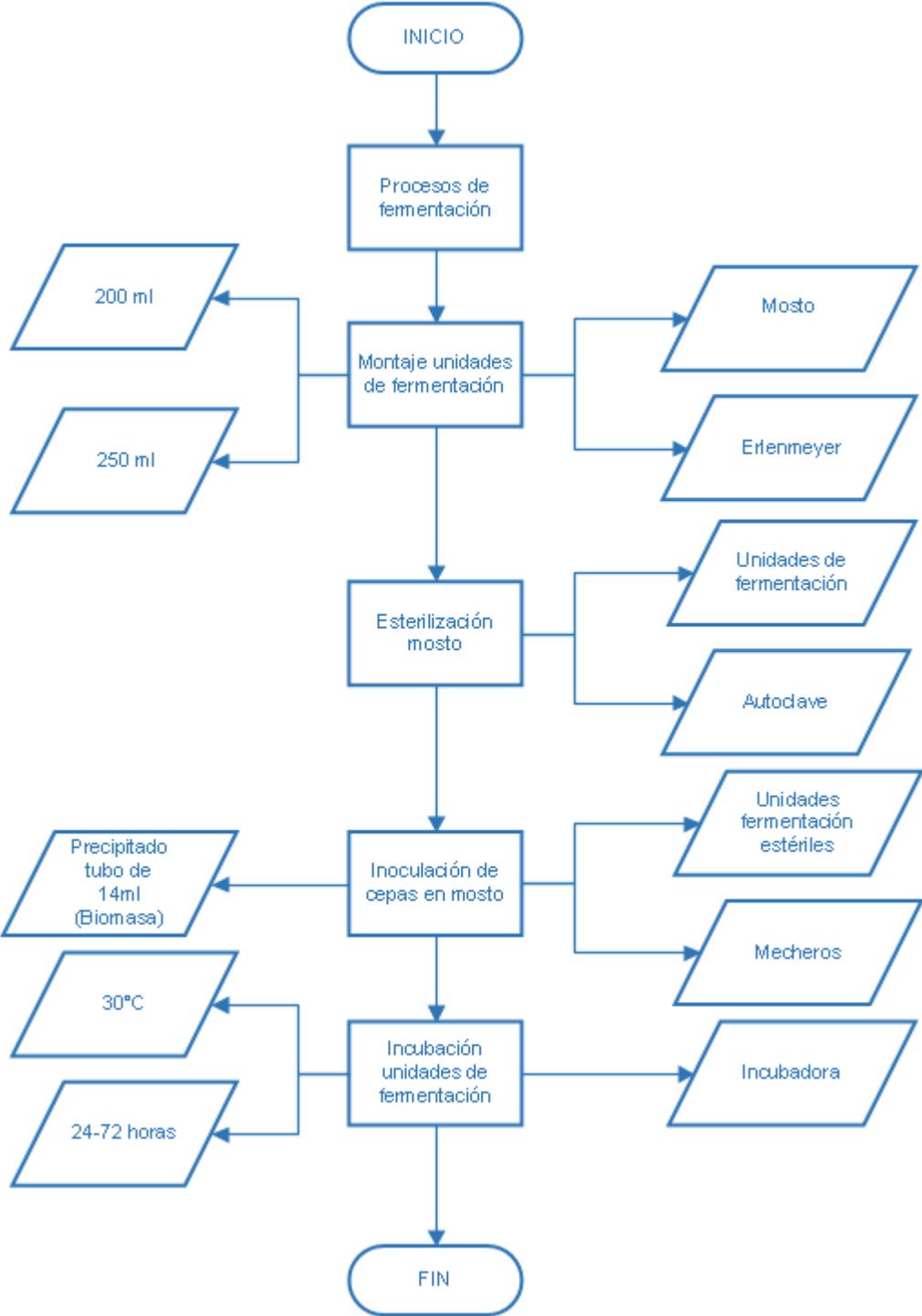


Fuente: elaboración propia

3.4.3 Procesos de fermentación. Para iniciar los procesos de fermentación con cada una de las cepas se realizaron los montajes en matraces Erlenmeyer de 250 ml, denominados unidades de fermentación. Por cada una de las cepas se realizaron dos replicas, para la elaboración del diseño de experimentos propuesto. Para cada unidad de fermentación se utilizaron 150 ml de mosto estándar (mosto para una cerveza con un perfil de maceración de una cerveza tipo Ale) elaborado por la cervecería artesanal, el cual está compuesto por proteínas 10%, azúcares como glucosa 15%, maltosa 65% y maltotriosa 10%.

Cada unidad fue esterilizada en autoclave a 15 lb, 121°C durante 15 min y así reducir contaminaciones procedentes de materias primas anteriormente agregadas, luego cada una de las unidades fue inoculada con una concentración de biomasa promedio de 0,002 g/ml. Las fermentaciones se llevaron a cabo durante 72 horas a 30°C. A continuación, el diagrama 13 muestra el proceso para el montaje de las unidades de fermentación.

Diagrama 13. Procedimiento para el montaje de los procesos de fermentación



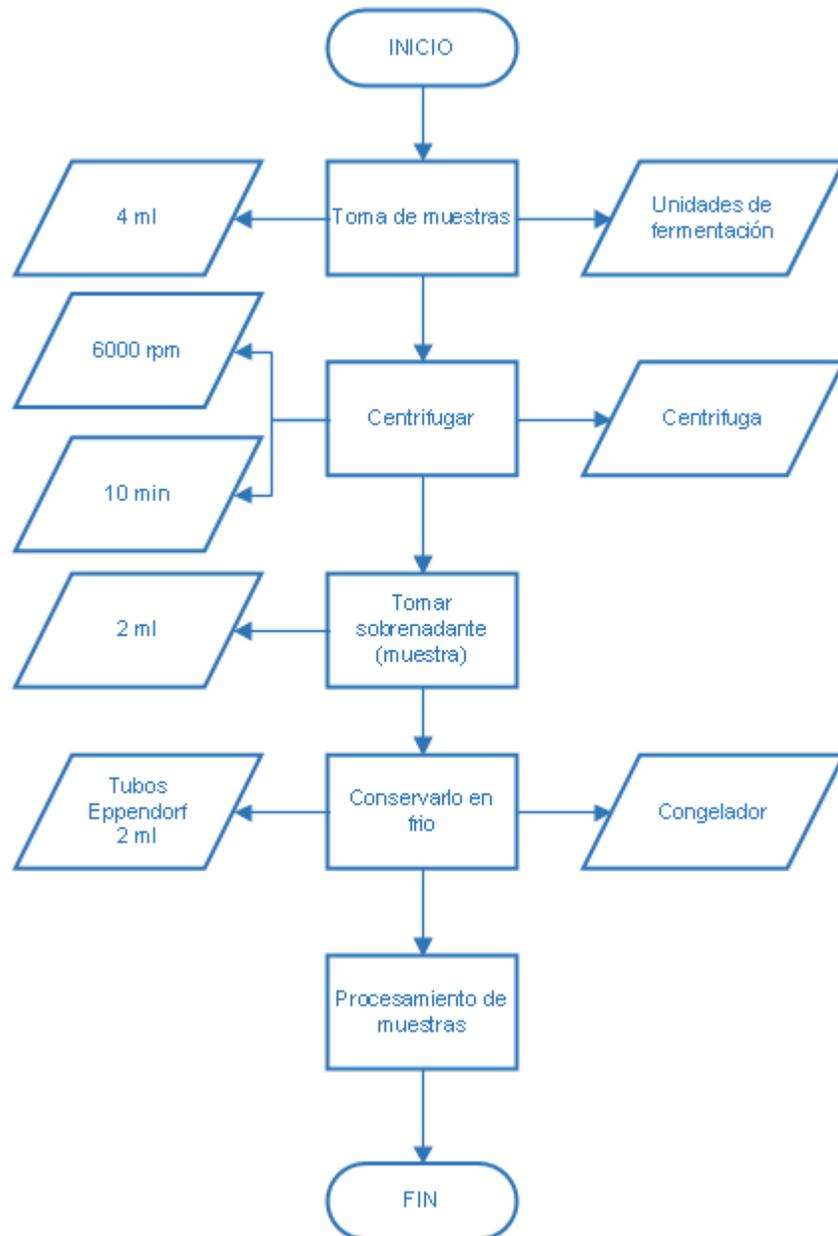
Fuente: elaboración propia

3.5 TOMA DE MUESTRAS

Para la toma de muestras se utilizó un volumen de 4 ml de cada una de las unidades de fermentación, en los tiempos establecidos para el análisis de éstas, posteriormente se centrifugaron a 6000 rpm por 10 minutos para tomar 2 ml del sobrenadante y conservándolo en tubos Eppendorf para luego ser analizado en el procesamiento de muestras.

A continuación, el diagrama 14, se muestra el proceso para la toma de muestras de las unidades de fermentación.

Diagrama 14. Procedimiento para la toma de muestras de las unidades de fermentación



Fuente: elaboración propia

3.6 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Luego de la toma de las muestras de las unidades de fermentación y realizar su respectiva preparación, se conservó el sobrenadante y se les determinó la concentración de glucosa como azúcar reductor presente en estas, luego se aplicó la técnica de DNS¹⁴⁰ y por medio de la lectura de la absorbancia de cada una y utilizando la ecuación obtenida del ajuste lineal realizado a la curva de calibración, se obtuvo la concentración final. Cabe resaltar que en el procesamiento de muestras se determinó únicamente la concentración de glucosa como uno de los azúcares reductores presente en las muestras.

A continuación, por medio del diagrama 15 se explicará el procedimiento que se llevó a cabo para el procesamiento de muestras.

Diagrama 15. Proceso para el procesamiento de muestras



Fuente: elaboración propia

¹⁴⁰ BELLO, CARRERA, y DIAZ, Yuset. Op. Cit., p. 45-50.

3.6.1 Determinación de azúcares reductores por aplicación del método DNS.

Para la determinación de azúcares reductores se aplicó la técnica DNS, método colorimétrico que se encuentra fundamentado en la reacción de reducción y oxidación en calor que ocurre entre el reactivo ácido 3,5- dinitrosalicílico, DNS el cual se compone de ácido 3,5-Dinitrosalicílico (ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzónico), como agente oxidante, sal de Rochelle (tartrato sódico-potásico), que evita la disolución de oxígeno en el reactivo e hidróxido de sodio, que promueve la reacción de oxidación- reducción entre el ácido y los azúcares reductores presentes en la muestra a analizar¹⁴¹.

A medida que transcurre esta reacción se adquiere un cambio de tonalidad en la solución o muestra de amarillo a rojo, estos cambios se leen con ayuda de un espectrofotómetro a una longitud de onda establecida, donde se obtiene una medida de absorbancia de la muestra, con esta se puede determinar la concentración de azúcares que se encuentran en la muestra, por medio de la ecuación obtenida de la línea recta realizada a la curva de calibración que se obtiene a partir de una solución patrón de glucosa, donde en el eje "X" se encuentra la concentración de glucosa presente en la muestra o solución y en el eje "Y" su absorbancia¹⁴².

3.6.2 Determinación de la concentración de glucosa presente en las muestras.

Para determinar la concentración de glucosa por las tres cepas P, N y D en las fermentaciones realizadas, se desarrolló el siguiente proceso.

Se inició con el procedimiento para la curva de calibración utilizando una solución patrón de glucosa, el cual se describe en el anexo H.

Para la aplicación del método DNS en cada una de las muestras de las fermentaciones, fue necesario la preparación de diluciones en tubos de ensayo marcados ordenadamente, ya que la concentración de azúcares era elevada y los datos no se ajustarían a la curva de calibración. Las diluciones se iniciaron desde la más concentrada 1:5 donde por 1 ml de muestra se agregó 4 ml de agua destilada, 1:10, en la que por 1 ml de muestra tomada de la dilución de 1:5 se agregaron 9 ml de agua destilada, hasta la más diluida en este caso es la dilución de 1:100, en la cual por 1 ml de muestra tomada de la dilución de 1:10 se agregó 9 ml de agua destilada.

¹⁴¹ ÁVILA, Itzayana. Estudio experimental para la obtención de azúcares reductores a partir de la vaina de *pisum sativum* L. (arveja) mediante hidrólisis en agua súper crítica. Trabajo de grado Ingeniero Ambiental y Sanitario. Bogotá D.C.: Universidad de la Salle, 2016. Facultad de Ingeniería. Programa de ingeniería ambiental y sanitaria. p. 24. [Consultado 20 junio 2018]. Disponible en: <http://repository.lasalle.edu.co/handle/10185/18459>.

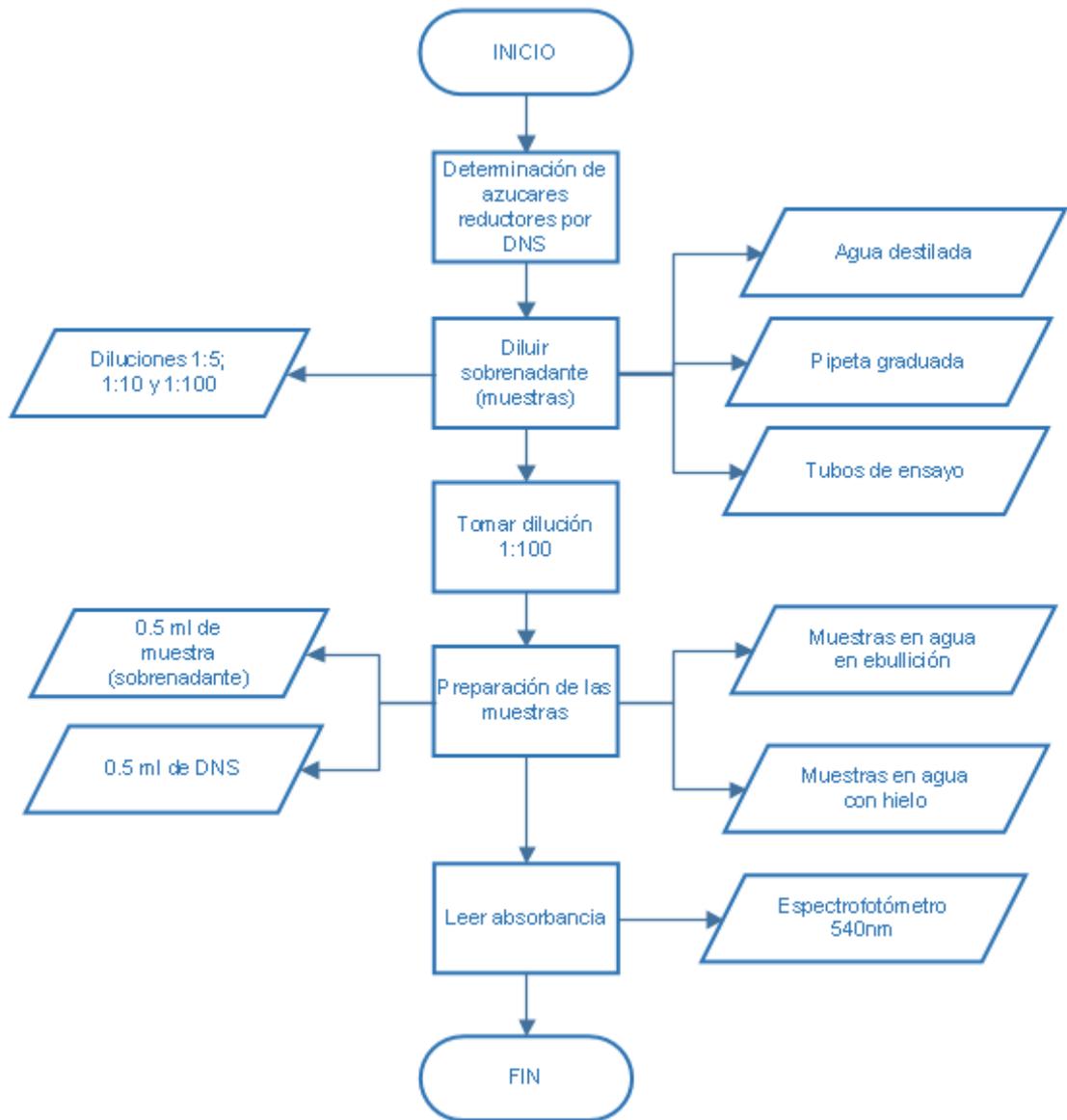
¹⁴² SALAZAR y VILLAMIZAR. Op. Cit., p.55.

Para realizar la lectura de la absorbancia en las muestras de fermentación se preparó el reactivo DNS, este procedimiento se encuentra descrito en el anexo I.

A continuación se seleccionaron las 9 muestras de menor concentración, es decir la dilución 1:100, ya que ésta permite obtener valores de absorbancia que se ajustan a la curva de calibración entre 0 y 1, se tomó un volumen de 500 μ L tanto para la muestra como para el reactivo DNS, luego se vertió agua en un vaso de precipitado y se llevó a ebullición, se colocaron los 9 tubos dentro del vaso de precipitado por 5 minutos, luego de este tiempo se tomó un vaso de precipitado de 1000 ml que contenía agua con hielo y se colocaron los 9 tubos con la muestra allí por 5 minutos hasta que se enfriaran generando un choque térmico. Para terminar se les agregaron a los 9 tubos 500 μ L de agua destilada para diluir las muestras, y con las muestras preparadas se realizó la lectura de la absorbancia de cada una de ellas a una longitud de onda de 540 nm en el espectrofotómetro.

El diagrama 16 explica el procedimiento para la determinación de la concentración de glucosa aplicando el método DNS.

Diagrama 16. Procedimiento para la determinación de la concentración de glucosa aplicando el método DNS



Fuente: elaboración propia

3.7 PLANTEAMIENTO DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS

A continuación, se presentan los datos empleados para el análisis de varianzas ANOVA, los cuales son la concentración de glucosa obtenida en cada muestra al variar los factores cepa seleccionada y tiempo de fermentación. Los datos consignados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4.Datos de la concentración de glucosa

Tiempo (horas)	Cepa		
	N(1)	P(2)	D(3)
24	0,872	1,250	1,106
	0,974	0,607	1,065
	1,182	0,9.53	1,096
48	1,093	0,839	0,904
	0,833	0,949	0,817
	0,946	1,063	1,018
72	0,964	0,655	0,630
	0,803	0,836	0,621
	1,059	0,840	0,655

Fuente: elaboración propia

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para realizar el análisis de varianzas ANOVA, se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas y la prueba de normalidad a los datos obtenidos posterior a la experimentación. Ya que estas permiten obtener una validez o soporte estadístico para realizar dicho análisis, los resultados de estas pruebas se obtuvieron por medio del uso del software SPSS, los cuales serán mostrados a continuación.

3.8.1 Prueba de homogeneidad de varianzas. Esta prueba o supuesto de homogeneidad de varianzas se refiere a la igualdad que existe entre las varianzas de los datos, lo cual asegura la confiabilidad de los datos obtenidos en la experimentación y de los análisis estadísticos a realizar en el proyecto.

Esta prueba plantea dos hipótesis, la hipótesis nula, la cual representa la igualdad de las varianzas y la hipótesis alterna, que representa la diferencia de las varianzas de los datos, estas dos son mostradas a continuación. ¹⁴³

¹⁴³ LAHOZ, Rafael, ORTEGA, J. y FERNANDEZ, C. Métodos estadísticos. [en línea]. En: Métodos estadísticos en Biología del comportamiento. Madrid, España: Editorial COMPLUTENSE, 1994. p 101. [Consultado 5 septiembre 2018]. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=kvXSoAGJylwC&printsec=frontcover&dq=M%C3%A9todos+>

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3$$

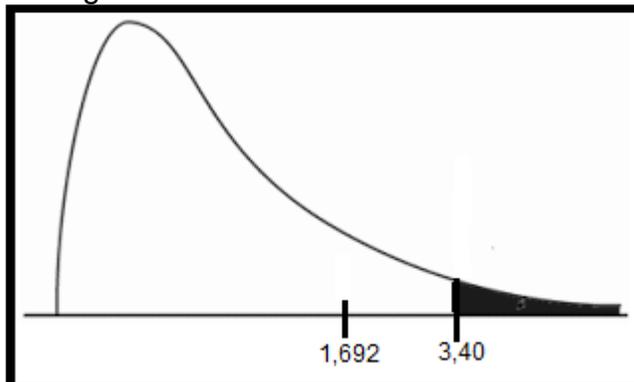
$$H_1: \sigma^2_1 \neq \sigma^2_2 \neq \sigma^2_3$$

Para realizar la prueba de homogeneidad de varianzas se seleccionó el estadístico de Levene a un nivel de significancia teórico de 0.05 y se comparó, entre el valor F dado por el software luego de realizar el análisis y valor F obtenido por medio del uso de las tablas de distribución F a una significancia de 0.05; estos dos valores fueron graficados para determinar la aceptación o rechazo de la hipótesis nula planteada anteriormente.

Teniendo en cuenta lo anterior, el resultado que se obtuvo de la prueba de homogeneidad de varianzas analizada por medio del estadístico de Levene fue, un valor F de tablas de 3,40 y un valor F arrojado por el análisis realizado en el software de 1,692, lo cual indica que la hipótesis nula es aceptada, es decir que existe la homogeneidad de varianzas en los datos. Este resultado se puede evidenciar por medio del gráfica 1, denominado grafico de distribución F para la homogeneidad de varianzas.

estad%C3%ADsticos+en+Biolog%C3%ADa+del+comportamiento&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi3o8PvjfLkAhUBbq0KHdyjBoYQ6AEIKTAA#v=onepage&q=M%C3%A9todos%20estad%C3%ADsticos%20en%20Biolog%C3%ADa%20del%20comportamiento&f=false. ISBN 84-7491512-0.

Gráfica 1. Distribución F para la homogeneidad de varianzas de los datos



Fuente: elaboración propia

Otra manera de comprobar la homogeneidad de varianzas de los datos fue por medio de la comparación entre el valor de significancia teórico de 0.05 y el valor de significancia arrojado por el software, el cual fue de 0.205, siendo este valor mayor que el nivel de significancia teórico (0,05), se determinó que se acepta la hipótesis nula, lo que confirma que existe la homogeneidad de varianzas en los datos.

3.8.2 Prueba de normalidad. Otra de las pruebas estadísticas realizadas para elaborar un análisis de varianza (ANOVA), fue la prueba de normalidad de los datos obtenidos en la experimentación, este se determinó con el fin de tener confiabilidad de los datos para realizar los cálculos estadísticos posteriores¹⁴⁴.

Para la prueba de normalidad de los datos obtenidos de la concentración de glucosa presente en las fermentaciones, se comparó el nivel de significancia teórico de 0.05 y el nivel de significancia arrojado por el análisis realizado en el software, donde al ser mayor este valor de significancia obtenido en el análisis, se dice que se acepta la hipótesis nula, es decir existe normalidad en los datos. Los resultados obtenidos de la prueba de normalidad de los datos para el factor cepa seleccionada con respecto a la concentración de glucosa, se muestran en la tabla 5 y para el factor tiempo con respecto a la concentración de glucosa se muestran en la tabla 6.

¹⁴⁴ MONTGOMERY. Op. cit., p. 64.

Tabla 5. Resultados de la Prueba de normalidad para el factor cepa seleccionada

	Cepa	Nivel de significancia
Concentración de glucosa	N	0,848
	P	0,749
	D	0,093

Fuente: elaboración propia

Tabla 6. Resultados de la Prueba de normalidad para el factor tiempo

	Tiempo	Nivel de significancia
Concentración de glucosa	24	0,454
	48	0,437
	72	0,209

Fuente: elaboración propia

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se determinó, que en todos los niveles de significancia se evidencia que existe normalidad en los datos, tanto por el factor tiempo, como por el factor cepa seleccionada, ya que todos los valores son mayores a 0,05, aceptándose la normalidad en los datos.

Finalmente verificando que en los datos existe la homogeneidad de varianzas y la normalidad, se confirma que al realizar el análisis de varianzas ANOVA, los resultados serán confiables.

3.9 ANÁLISIS DE VARIANZAS (ANOVA)

A continuación, se muestran los cálculos y el análisis de varianza ANOVA para demostrar la significancia estadística de las variables de tiempo (h) y cepa seleccionada.

También se realizó una base de cálculos para el desarrollo del análisis de varianza ANOVA mostrado en el Anexo J, los resultados condensados del análisis se muestran a continuación.

Ecuación 2. Numero de datos para el análisis de varianzas

$$N = a * b * n_{replicas}$$

$$N = 3 * 3 * 3 = 27$$

Fuente. WALPOLE,Ronald; MYERS,Raymond and MYERS,Sharon. Probabilidad y estadística para ingenieros ; sexta ed. México FC: Pearson Educación, 1999. 465 p.

Luego de esto se calculó la suma de cuadrados totales.

Ecuación 3. Suma de cuadrados totales

$$SCT = SCE_A + SCE_B + SCE_{AB} + SCD_{ER}$$

$$\sum Y_{ijk}^2 - \frac{Y_{...}^2}{N}$$

$$SCT = 0,8156$$

Fuente. WALPOLE,Ronald; MYERS,Raymond and MYERS,Sharon. Probabilidad y estadística para ingenieros ; sexta ed. México FC: Pearson Educación, 1999. 465 p.

Ecuación 4. Suma de cuadrados entre factores A

$$SCE_A = \frac{1}{bn} \sum Y_{i..}^2 - \frac{Y_{...}^2}{N}$$

$$SCE_A = 0,2422$$

Fuente. WALPOLE,Ronald; MYERS,Raymond and MYERS,Sharon. Probabilidad y estadística para ingenieros ; sexta ed. México FC: Pearson Educación, 1999. 465 p.

Ecuación 5. Suma de cuadrados entre factores B

$$SCE_B = \frac{1}{an} \sum Y_{.j.}^2 - \frac{Y_{...}^2}{N}$$

$$SCE_B = 0,04473$$

Fuente. WALPOLE,Ronald; MYERS,Raymond and MYERS,Sharon. Probabilidad y estadística para ingenieros ; sexta ed. México FC: Pearson Educación, 1999. 465 p.

Ecuación 6. Suma de cuadrados entre factores AB

$$SCE_{AB} = \frac{1}{n} \sum Y_{ij.}^2 - \frac{Y_{...}^2}{N} - SCE_A - SCE_B$$

$$SCE_{AB} = 0,1348$$

Fuente. WALPOLE,Ronald; MYERS,Raymond and MYERS,Sharon. Probabilidad y estadística para ingenieros ; sexta ed. México FC: Pearson Educación, 1999. 465 p.

Ecuación 7. Suma de cuadrados dentro de tratamiento

$$SCD_{ER} = SCT - SCE_A - SCE_B - SCE_{AB}$$

$$SCD_{ER} = 0,3938$$

Fuente. WALPOLE, Ronald; MYERS, Raymond and MYERS, Sharon. Probabilidad y estadística para ingenieros; sexta ed. México FC: Pearson Educación, 1999. 465 p.

Después de ser calculada la suma de cuadrados A, B y la interacción presente entre ellos, en la tabla 7 se muestra la construcción y análisis de varianza ANOVA.

Tabla 7. Análisis de varianza ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F
A: Tiempo	0.2422	2	0.1211	5,5359
B: Cepas seleccionadas	0,0447	2	0,02236	1,02226
AB	0,1348	4	0,03371	1,5409
Error residual	0,3938	18	0,02187	-----
Total	0,8156	26	-----	-----

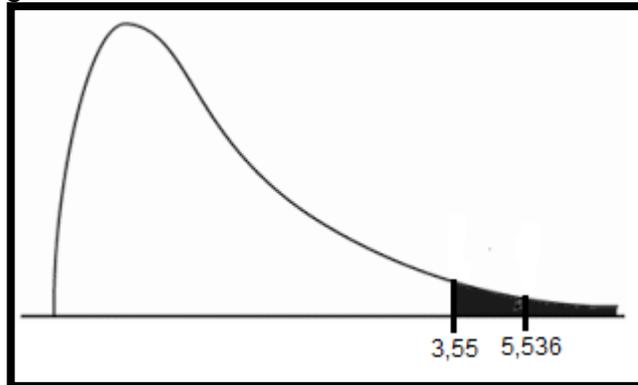
Fuente: elaboración propia

Teniendo en cuenta el análisis de varianzas ANOVA realizado anteriormente se elaboró el análisis de los resultados de cada factor y de su interacción, los cuales se muestran a continuación.

Factor A (Tiempo de fermentación)

Para este factor, la tabla de análisis de varianzas muestra un valor F_A calculado de 5,536 y un valor F de tablas de 3,55 a un nivel de significancia de 0.05. Con estos valores se elaboró la gráfica 2 para determinar la aceptación o rechazo de la hipótesis nula H_0 .

Gráfica 2. Distribución F para el factor A, efecto del tiempo sobre la concentración de glucosa



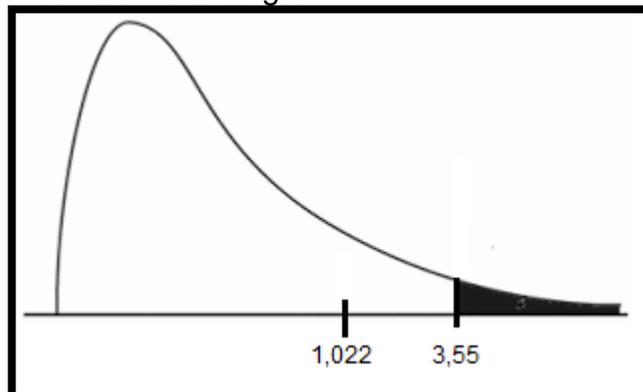
Fuente: elaboración propia

Como se observa el valor de F_A calculado de 5, 536 queda en la zona de rechazo de la hipótesis nula, H_0 , con esto se concluye que hay efecto significativo del tiempo sobre la concentración de glucosa.

Factor B (Cepa seleccionada)

Para el factor B, la tabla de análisis de varianza arroja un valor F_B calculado de 1,022 y un valor F de tablas de 3,55 a un nivel de significancia de 0.05. Con estos valores se elaboró la gráfica 3 para determinar la aceptación o rechazo de la hipótesis nula H_0 .

Gráfica 3. Distribución F para el factor B, efecto de la cepa seleccionada sobre la concentración de glucosa



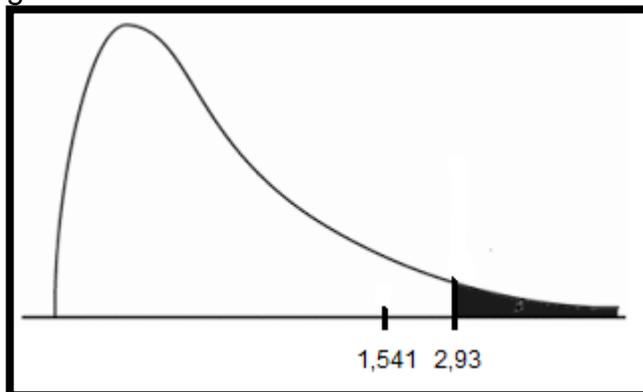
Fuente: elaboración propia

Como se observa el valor de FB calculado de 1,022 queda en la zona de aceptación de la hipótesis nula, H_0 , con esto se concluye que no hay efecto de la cepa seleccionada sobre la concentración de glucosa.

Interacción de los factores A (Tiempo de fermentación) y B (Cepa seleccionada).

Para el factor de interacción AB, la tabla de análisis de varianzas muestra un valor F_{AB} calculado de 1,541 y un valor F de tablas de 2,93 a un nivel de significancia de 0.05. Con estos valores se elaboró la gráfica 4 para determinar la aceptación o rechazo de la hipótesis nula H_0 .

Gráfica 4. Distribución F para el factor de interacción AB, efecto de la interacción entre el tiempo de fermentación y la cepa seleccionada sobre la concentración de glucosa



Fuente: elaboración propia

Como se observa el valor de F_{AB} calculado de 1,541 queda en la zona de rechazo de la hipótesis nula, H_0 , con esto se concluye que no hay efecto de la interacción entre el tiempo de fermentación y la cepa seleccionada sobre la concentración de glucosa.

Por medio del análisis de varianzas ANOVA realizado se obtuvieron una serie de resultados estadísticos que para el objetivo de la experimentación que es seleccionar la cepa con mejor perfil fermentativo, indican que no hay diferencia entre la selección de la cepa, sino del tiempo de fermentación, es decir que cualquiera de las tres cepas darían los resultados esperados, teniendo en cuenta que el tiempo de fermentación sea mayor o igual a 72 horas, con lo cual se espera que haya un consumo de azúcares mayor lo que genera una mayor producción de alcoholes.

Como el objetivo es seleccionar una de las cepas, dicha selección se realizará a través del análisis de la estadística descriptiva, esta selección se hará comparando

la estadística descriptiva de cada cepa y será seleccionada la que tenga un mejor comportamiento estadístico por medio del menor valor de la media estadística.

3.10 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Por medio de la estadística descriptiva se realizó la selección de la cepa con el mejor perfil fermentativo, tomando como indicador el menor valor para la media estadística con respecto a la concentración de glucosa, a un intervalo de confianza de 95%. Los resultados obtenidos para la media estadística de cada una de las cepas, con respecto a la concentración de glucosa se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Valores de la media estadística como estadístico descriptivo, de cada una de las cepas

	Cepa	Media o promedio
Concentración de glucosa	N	0,9694
	P	0,8880
	D	0,8791

Fuente: elaboración propia

Tomando los valores reportados en la tabla 8, se determinó que la cepa con mejor perfil de fermentación es la cepa D, ya que presenta el menor valor de la media estadística, lo que quiere decir que esta cepa es la que presentó una menor concentración de glucosa como azúcar reductor, al terminar el proceso de fermentación y por ende una posible producción de alcoholes.

3.11 ANÁLISIS DE RESULTADOS

De acuerdo a los resultados arrojados por el análisis de varianzas ANOVA, se determinó que solo existe efecto del tiempo sobre la variable respuesta concentración de glucosa, al no tener efecto de la cepa, ni de su interacción sobre la variable respuesta, la selección de la cepa con mejor perfil fermentativo se realizó por medio de la estadística descriptiva, donde se tomó como criterio el menor valor de la media estadística.

3.12 PROCESOS DE FERMENTACIÓN CON LAS CEPAS P, N DEL FRUTO DE MARACUYÁ Y D DEL FRUTO DE CIRUELA

Como se mencionó anteriormente para realizar los procesos de fermentación es importante tener en cuenta previamente procedimientos como la preparación del inóculo, seguida la determinación de la cantidad de biomasa en el inóculo y finalmente la elaboración de los montajes de las fermentaciones, todo esto con el fin de determinar la cepa de mejor perfil fermentativo y el tiempo adecuado para llevar a cabo el proceso de fermentación. Los resultados obtenidos del proceso experimental se muestran a continuación.

3.12.1 Determinación de la concentración de biomasa. Luego de la preparación del inóculo se determinó la concentración de biomasa presente en este, por medio de la aplicación de la técnica gravimétrica de peso seco, donde se calculó el peso seco de la biomasa de cada cepa por unidad de volumen.

En la tabla 9 se muestra el peso inicial de los tubos Falcon y los pesos finales con la biomasa seca.

Tabla 9. Datos del peso inicial de los tubos Falcon y peso final con la biomasa seca

Cepa	Réplica	Peso inicial tubo Falcon	Peso tubo Falcon + biomasa seca (peso constante) 72 horas aprox.
N	1	5,7361	5,7496
	2	5,3874	5,4006
	3	5,6156	5,6298
P	1	5,4731	5,4842
	2	5,8100	5,8224
	3	5,4820	5,4939
D	1	5,3671	5,4062
	2	5,4860	5,4964
	3	5,3979	5,4048

Fuente: elaboración propia

En la tabla 10 presentan los resultados obtenidos de la concentración de biomasa para cada cepa y sus respectivas réplicas.

Tabla 10. Datos de la concentración de biomasa para cada cepa y sus réplicas

Cepa	Réplica	Concentración de biomasa (g/ml)
N	1	0,001929
	2	0,001886
	3	0,002029
P	1	0,001586
	2	0,001771
	3	0,001700
D	1	0,005586
	2	0,001486
	3	0,000986

Fuente: elaboración propia

Finalmente, la tabla 11 muestra el valor promedio obtenido de la concentración de biomasa para cada una de las cepas con los que se inocularon las unidades de fermentación.

Tabla 11. Datos promedio de la concentración de biomasa de cada una de las cepas

Cepa	Concentración de biomasa(g/ml)
N	0,001948
P	0,001686
D	0,002686

Fuente: elaboración propia

3.12.2 Procesos de fermentación. Como se mencionó anteriormente, una vez determinada la concentración de biomasa para dar inicio a las fermentaciones con las cepas N y P obtenidas del fruto de maracuyá y D proveniente del fruto de ciruela, se realizaron los montajes de las unidades de fermentación para cada una con sus respectivas replicas. Las ilustraciones 7, 8 y 9 muestran el progreso de los procesos de fermentación de cada cepa hasta las 72 horas (3 días) donde se evidencio el avance del proceso de fermentación.

Ilustración 7. Procesos de fermentación
72 horas, cepa N



Fuente: elaboración propia

Ilustración 8. Procesos de fermentación
72 horas, cepa P



Fuente: elaboración propia

Ilustración 9. Procesos de fermentación
72 horas, cepa D



Fuente: elaboración propia

Como se observa en las ilustraciones 7, 8 y 9 , en las fermentaciones realizadas con las cepas N y P al cabo de 72 horas, bajo una caracterización cualitativa, no se observa una producción de dióxido de carbono, lo que posiblemente indica que estas dos cepas requieren más de 72 horas para consumir los azúcares presentes en el mosto; por el contrario, en los procesos de fermentación con la cepa D a las 72 horas de fermentación, se evidencio la producción de espuma, lo que puede indicar la posible presencia de dióxido de carbono¹⁴⁵, demostrando así un consumo de azúcares más eficiente en comparación con las otras dos cepas analizadas, lo cual concuerda con los resultados de la estadística descriptiva mostrados en el numeral 3.10 y el seguimiento de la concentración de glucosa como azúcar reductor determinado por medio del método DNS, durante 96 horas reportado más adelante en la tabla 17.

3.13 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

En el procesamiento de muestras se realizó el análisis del concentración de azúcares por el método DNS por medio de la curva de calibración, donde su elaboración se explica a continuación.

3.13.1 Análisis de la concentración de glucosa por aplicación del método DNS.

Analizando la concentración de glucosa en las unidades de fermentación donde se aplicó el método DNS, se observó que esta disminuye con respecto al tiempo, lo que demuestra una producción de etanol. En esta sección se realizó un seguimiento de los procesos de fermentación de las cepas N y P obtenidas del fruto de maracuyá y D proveniente del fruto de ciruela, por medio de la cuantificación de la concentración de glucosa como azúcar reductor presente en el mosto.

3.13.1.1 Curva de calibración. Para la curva de calibración se prepararon cinco soluciones de glucosa, para las cuales se tomaron los datos mostrados en la tabla 12.

¹⁴⁵ SALAZAR, VILLAMIZAR Op. cit., p. 153.

Tabla 12. Tabla de datos de solución patrón de glucosa y agua destilada

Número de tubo	Volumen solución patrón de glucosa (ml)	Volumen agua destilada (ml)
1	0.1	9.9
2	0.3	9.7
3	0.5	9.5
4	0.7	9.3
5	1	9

Fuente: elaboración propia

Luego se hallaron las concentraciones finales de glucosa para cada una de las soluciones preparadas, ya que la curva de calibración está en función de dicha concentración y de su absorbancia.

Posteriormente las soluciones se llevaron al espectrofotómetro para realizar la lectura de su absorbancia a una longitud de onda de 540nm y así obtener la curva de calibración, con la cual fueron analizadas las muestras de las fermentaciones, este proceso se realizó para las tres replicas elaboradas. Luego, se realizó un promedio de los valores de absorbancia obtenidos para realizar la curva de calibración; también se determinó la desviación estándar de los datos para así tener una confiabilidad estadística de la curva de calibración realizada. La tabla 13 muestra el promedio y la desviación estándar de los datos obtenidos de la absorbancia y la tabla 14 enseña los datos que se utilizaron para elaborar la curva de calibración.

Tabla 13. Promedio y desviación estándar de los datos de absorbancia

Número de tubo	Concentración (C2)	Absorbancia Réplica 1	Absorbancia Réplica 2	Absorbancia Réplica 3	Promedio de la absorbancia	Desviación estándar
1	0.00181	0.037	0.045	0.039	0.040	0.00416
2	0.00545	0.109	0.104	0.109	0.107	0.00288
3	0.00909	0.186	0.180	0.176	0.181	0.00503
4	0.0127	0.379	0.385	0.377	0.380	0.00416
5	0.0182	0.586	0.582	0.585	0.584	0.00208

Fuente: elaboración propia

Tabla 14. Datos para la curva de calibración.

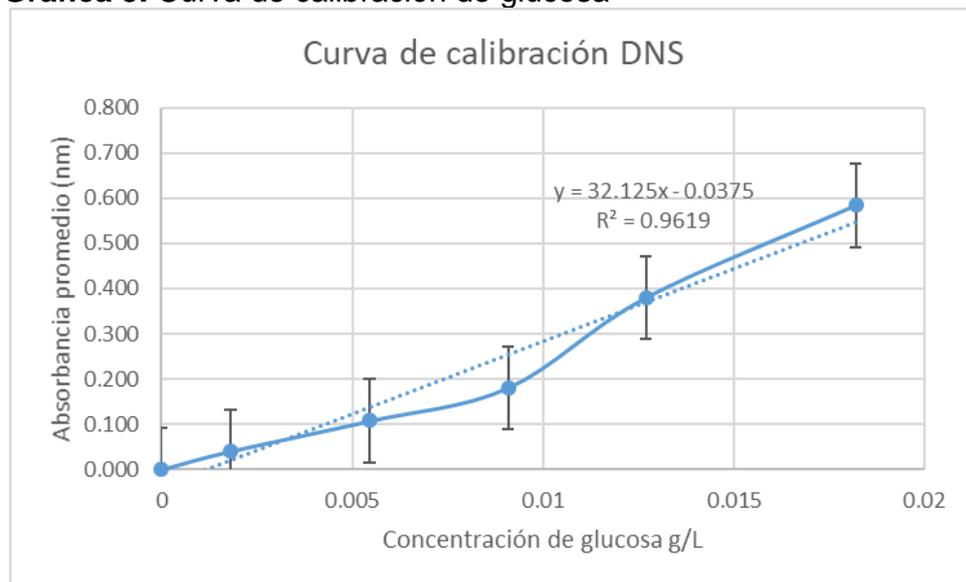
Número de tubo	Concentración (C2)	Absorbancia promedio
1	0.00181	0.040
2	0.00545	0.107
3	0.00909	0.181
4	0.0127	0.380
5	0.0182	0.584

Fuente: elaboración propia

Teniendo en cuenta la desviación estándar de los datos de absorbancia obtenidos de las tres replicas realizadas, se determinó que esta no es apreciable y por lo tanto la curva de calibración realizada es confiable para determinar la concentración de glucosa como azúcar reductor presente en las muestras de las fermentaciones posteriormente.

A esta curva de calibración se le realizó un ajuste lineal de los datos, donde se obtuvo un coeficiente de determinación de 0,9619 y una ecuación con la cual finalmente se determinó la concentración de glucosa de cada una de las muestras de las fermentaciones, en la cual “Y” es la absorbancia a una longitud de onda de 540nm de cada una de las muestras de las fermentaciones analizadas y “X” es la concentración de glucosa presente en las muestras. La gráfica 5 muestra la curva de calibración obtenida.

Gráfica 5. Curva de calibración de glucosa



Fuente: elaboración propia

3.13.1.2 Determinación de la concentración de glucosa como azúcar reductor presente en las muestras. Para la determinación de la concentración de glucosa como azúcar reductor presente en las muestras de las fermentaciones preparadas por medio de la centrifugación, se tomó el sobrenadante para ser analizado y se les aplicó el método DNS.

Primero, al sobrenadante conservado con anterioridad se le realizaron diluciones 1:5; 1:10 y 1:100, seleccionando la más diluida 1:100 para realizar el análisis. Después se tomaron 0.5µl de la dilución seleccionada y se llevó a cabo el procedimiento descrito anteriormente para determinar la concentración de azúcares reductores por medio del método DNS presente en la muestra a analizar.

Finalmente, a cada una de éstas muestras se les tomaron los datos de absorbancia con ayuda de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

En la tabla 15, 16 y 17 se muestra el comportamiento de las concentraciones de glucosa con respecto al tiempo, presentes en los procesos de fermentación con las cepas N, P y D.

Tabla 15. Comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo en los procesos de fermentación con la cepa N

Cepa N			
Tiempo (horas)	Absorbancia promedio (540 nm)	Concentración de glucosa promedio (g/L)	Desviación estándar
0	0,311	1,085	0,199
24	0,274	0,968	0,248
48	0,270	0,957	0,249
72	0,248	0,887	0,218
96	0,244	0,877	0,0872

Fuente: elaboración propia

Tabla 16. Comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo en los procesos de fermentación con la cepa P

Cepa P			
Tiempo (horas)	Absorbancia promedio (540 nm)	Concentración de glucosa promedio (g/L)	Desviación estándar
0	0,276	0,976	0,280
24	0,275	0,973	0,0825
48	0,261	0,928	0,286
72	0,237	0,853	0,132
96	0,188	0,701	0,119

Fuente: elaboración propia

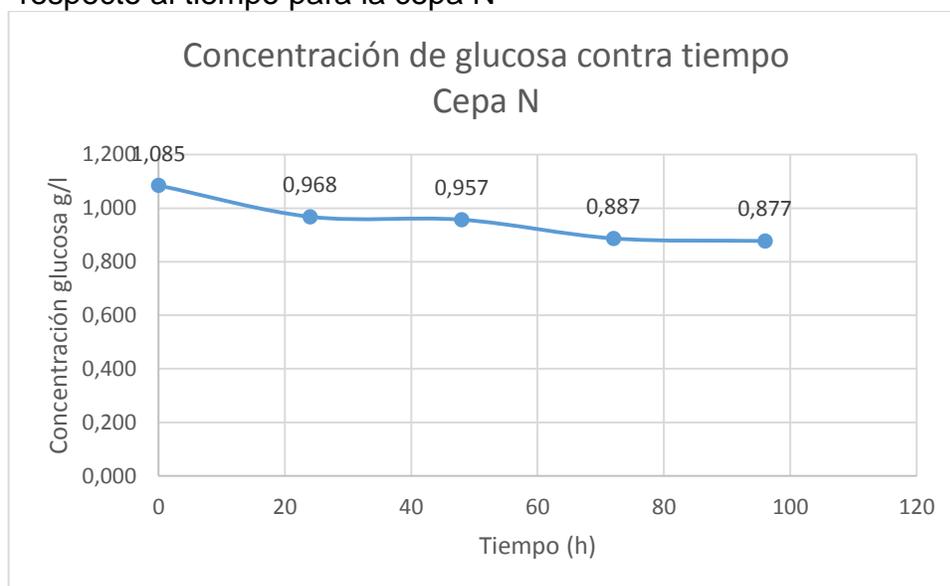
Tabla 17. Comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo en los procesos de fermentación con la cepa D

Tiempo (horas)	Absorbancia promedio (540 nm)	Concentración de glucosa promedio (g/L)	Desviación estándar
0	0,350	1,207	0,0696
24	0,281	0,991	0,127
48	0,231	0,835	0,116
72	0.190	0,709	0,0389
96	0.143	0,562	0,00933

Fuente: elaboración propia

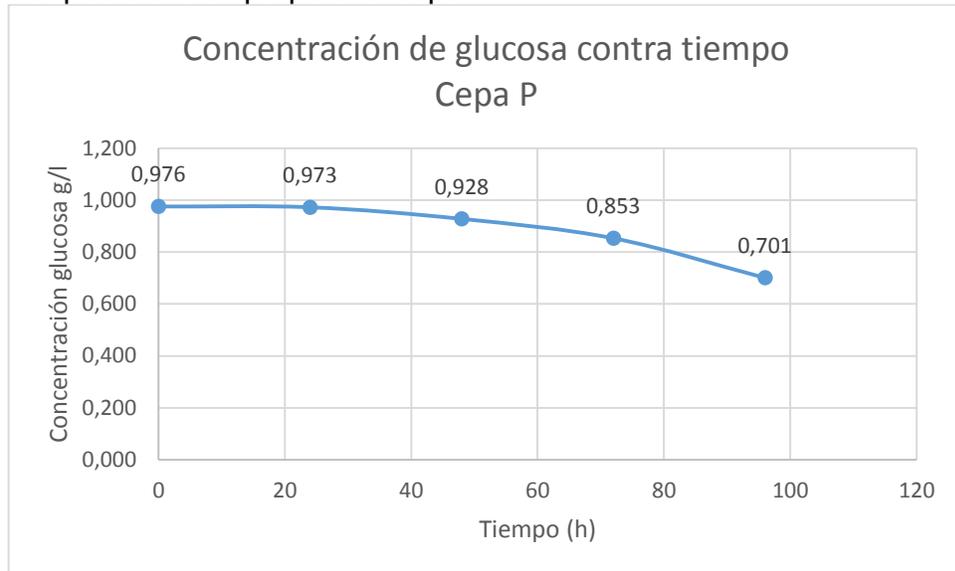
Las gráficas 6, 7 y 8 muestran el comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo de cada cepa.

Gráfica 6. Comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo para la cepa N



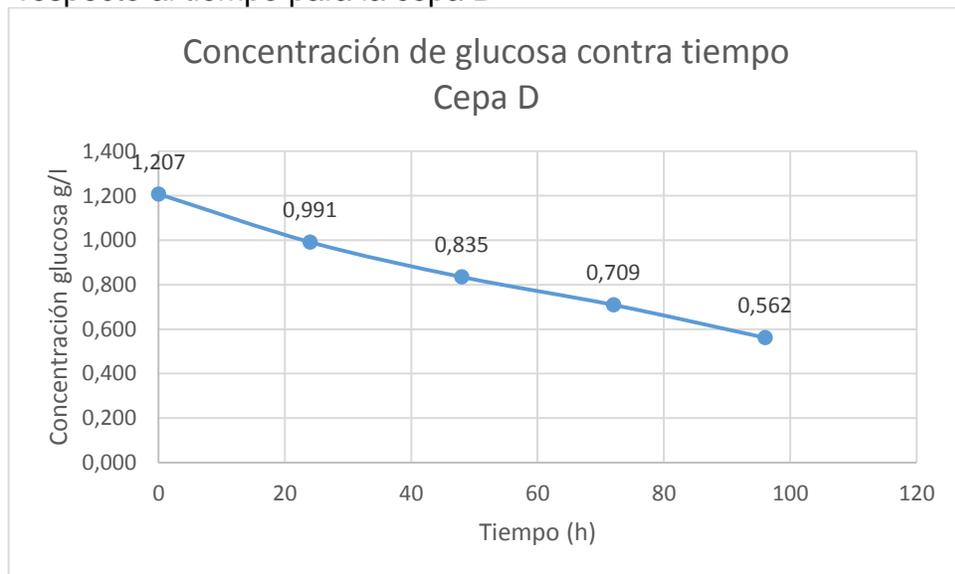
Fuente: elaboración propia

Gráfica 7. Comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo para la cepa P



Fuente: elaboración propia

Gráfica 8. Comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo para la cepa D



Fuente: elaboración propia

Teniendo en cuenta las gráficas anteriores, se determinó que la cepa N procedente del fruto de maracuyá consumió el 20% de la glucosa presente en el mosto durante las 96 horas de fermentación, por otro lado, el consumo de este azúcar para la cepa P aislada del fruto de maracuyá fue de 28,18%, lo cual confirma que estas dos cepas necesitan más tiempo en el proceso de fermentación, ya que se evidencia un consumo de menos del 50% de la glucosa presente en el mosto. En el caso de la cepa D obtenida del fruto de ciruela esta consumió el 53,43% de glucosa al cabo de las 96 horas de fermentación, lo cual indica una conversión de la mitad de la glucosa presente en el mosto en este tiempo de fermentación, con lo cual corrobora la elección de esta cepa por su eficiencia al fermentar en comparación con las cepas N y P.

4. ESTABLECIMIENTO DEL DESEMPEÑO DE LA CEPA SELECCIONADA CON MEJOR PERFIL FERMENTATIVO PARA LA ELABORACIÓN DE UNA CERVEZA TIPO ALE

4.1 INTRODUCCIÓN

Luego de haber sido seleccionada la cepa D, *Cándida tropicalis*, por presentar un mejor consumo de azúcares en el proceso de fermentación, se procedió a realizar fermentaciones a escala laboratorio, las cuales se denominaron pre experimentaciones, esto con el fin de obtener datos previos a la elaboración de la cerveza tipo ale.

Se evaluaron los siguientes parámetros: concentración de glucosa, potencial de hidrógeno (pH), porcentaje alcohólico aproximado y el porcentaje de atenuación. Posterior a ello, se elaboró una cerveza artesanal tipo Ale con la cepa seleccionada y otra con una cepa patrón tipo *Saccharomyces*, a las cervezas se le evaluaron características sensoriales, por medio de una cata por maestros cerveceros, siguiendo el formato de la *Beer ScoreSheet* de la organización BJCP.

4.2 METODOLOGIA

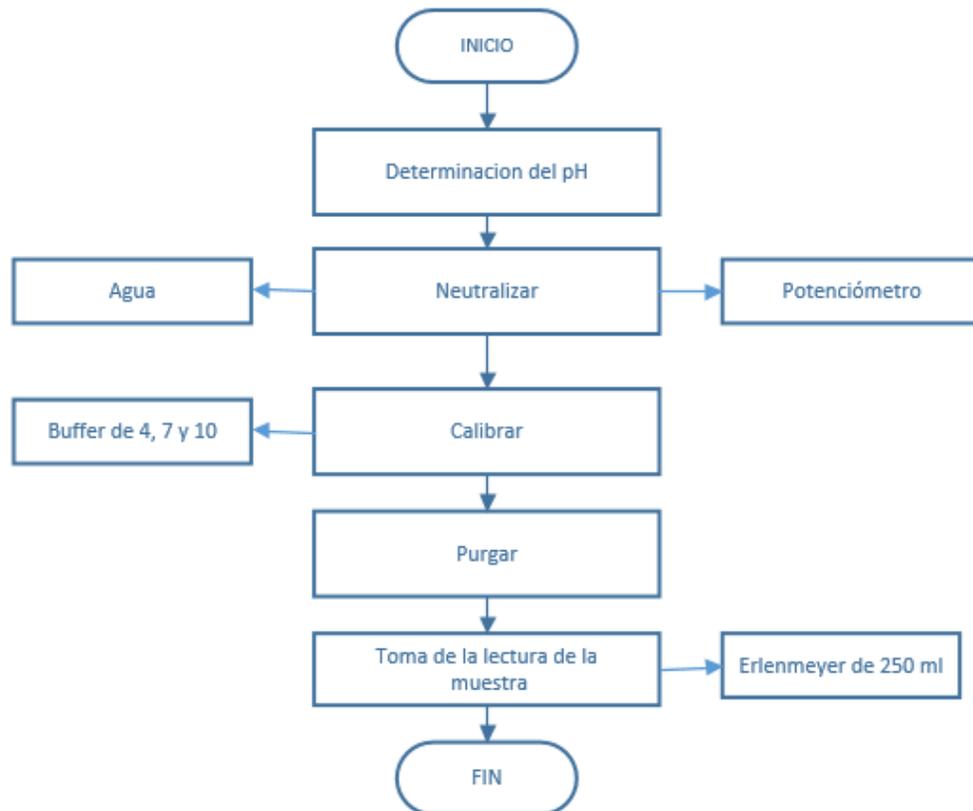
4.2.1 Pre experimentación fermentaciones. Para dar inicio a la pre experimentación con la cepa D, *Cándida tropicalis* proveniente del fruto de ciruela y la cepa patrón *Saccharomyces cerevisiae*, se realizó la preparación del inóculo, y posterior a ello los procesos de fermentación, metodología que se encuentra detallada en el numeral 3.3.

4.2.2 Procesamiento de muestras. Para el procesamiento de las muestras se llevó a cabo el mismo procedimiento explicado en el numeral 3.6, donde el parámetro que se determinó, fue la concentración de glucosa. En este numeral se explicarán nuevos parámetros como el potencial de hidrogeno, pH, porcentaje alcohólico aproximado, la densidad aparente y el porcentaje de atenuación, los cuales se describirán a continuación.

4.2.2.1 Determinación del potencial de hidrógeno, pH. Para poder determinar la acidez o alcalinidad, el parámetro a analizar en el mosto fermentado es el potencial de hidrógeno, en éste se utilizó un potenciómetro SI ANALYTICS en donde, sus especificaciones se encuentran en el anexo K. El cambio presentado en el pH durante el proceso de fermentación se da debido a la transformación de los aminoácidos; para la utilización del potenciómetro primero se neutralizo el electrodo con abundante agua, seguido de esto se calibró con 3 buffer diferentes de 4,7 y 10 purgando la muestra con el mosto. Por último, se colocó la muestra en un

Erlenmeyer de 250 ml para tomar la lectura del pH¹⁴⁶. Se ha podido comprobar que el pH óptimo para el crecimiento de levaduras *Saccharomyces* está entre 4.4- 5.5 siendo el promedio de estos dos el mejor.¹⁴⁷ En el diagrama 17 se determinarán los pasos a seguir para la determinación del pH.

Diagrama 17. Determinación del potencial de hidrogeno, pH



Fuente: elaboración propia

4.2.2.2 Determinación de la densidad. Para la determinación de la densidad en las muestras de las fermentaciones se empleó el picnómetro, el cual es un recipiente de vidrio pequeño útil para determinar las densidades relativas de los líquidos.

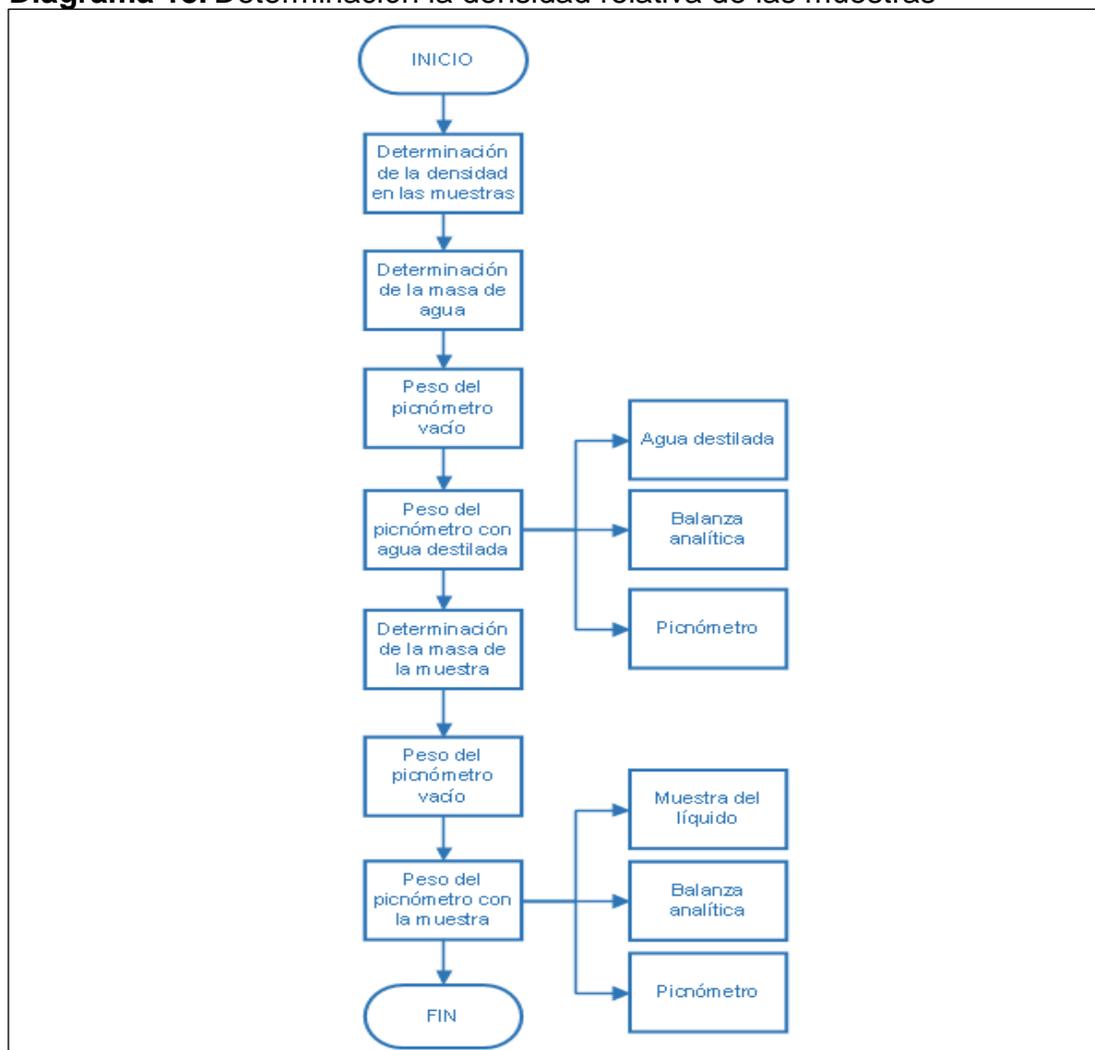
Para iniciar se pesa el picnómetro vacío con el tapón, luego de esto se llena este con la muestra y se coloca el tapón esmerilado, teniendo en cuenta que no puede haber burbujas de aire dentro, este se pesa de nuevo para obtener la masa de la muestra. Para conocer el volumen del picnómetro primero se determina la masa de agua destilada que el picnómetro es capaz de contener y esta se multiplica por la

¹⁴⁶ SALAZAR y VILLAMIZAR. Op. Cit., p. 90.

¹⁴⁷ SUAREZ. Op. cit., p. 64.

densidad del agua la cual se tomó como 0,997 g/ml¹⁴⁸. Y finalmente para determinar la densidad de la muestra se divide su masa entre el volumen anterior. En el diagrama 18 se muestra el procedimiento experimental realizado.

Diagrama 18. Determinación la densidad relativa de las muestras



Fuente: elaboración propia

4.2.2.3 Determinación del porcentaje alcohólico aproximado. Para la determinación del porcentaje alcohólico aproximado de la cerveza se utilizó la

¹⁴⁸ BUMS, Ralph. Mediciones fundamentales. [En línea] En: Fundamentos de la química. 5ta edición Pearson Educación, México, 2011. p. 60-63. [Consultado 1 septiembre 2018]. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=9K5qyKH0UwC&pg=PA35&dq=BURNS,+Ralph.+Mediciones+fundamentales&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjp2ontlYDIAhXStlKHd6FB0IQ6AEIKTAA#v=onepage&q=BURNS%2C%20Ralph.%20Mediciones%20fundamentales&f=false>

ecuación 8, la cual permite tener un valor aproximado teniendo en cuenta el descenso de la densidad del mosto a medida que transcurre el proceso de fermentación, esta ecuación empírica es comúnmente utilizada en cervecería artesanal¹⁴⁹. Esta densidad fue determinada por medio de la técnica de determinación de densidades con picnómetro.

Ecuación 8. Ecuación para determinación del porcentaje alcohólico aproximado

$$\text{Porcentaje de Alcohol} = \frac{1000 * (DI - DF)}{7,4}$$

Fuente: GONZÁLEZ Marcos. Ingredientes. En: Principios de Elaboración de cervezas artesanales. Morrisville, carolina del norte USA, Lulu Enterprises. – Lulu Press Inc. p 121. ISBN 978-1-365-67284-2.

Donde:

DI: densidad inicial del mosto.

DF: densidad final

7,4 corresponde a una constante.

4.2.2.4 Porcentaje de atenuación. El porcentaje de atenuación es una de los parámetros más comunes que se determinan en cervecería, este permite medir la disminución de azúcares durante el proceso de fermentación, por medio de la relación entre la densidad inicial y la densidad final de la bebida, la cual está dada por la ecuación 9¹⁵⁰.

¹⁴⁹ GONZALEZ. Op.cit., p 121.

¹⁵⁰ Ibid., p. 120.

Ecuación 9. Porcentaje de atenuación

$$\text{Atenuación} = \frac{100 * (DI - DF)}{DI - 1}$$

Fuente. GONZÁLEZ Marcos. Ingredientes. En: Principios de Elaboración de cervezas artesanales. Morrisville, carolina del norte USA, Lulu Enterprises. – Lulu Press Inc. p 120. ISBN 978-1-365-67284-2.

Donde:

DI: corresponde a la densidad inicial del mosto.

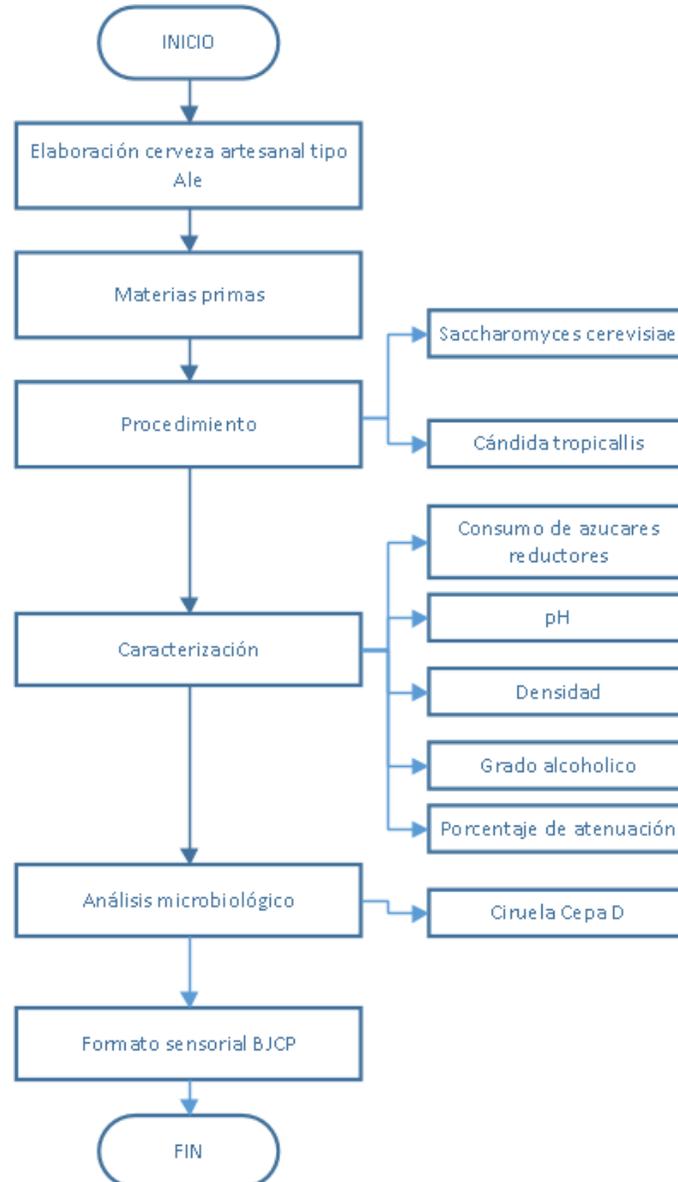
DF: corresponde a la densidad final.

4.3 ELABORACIÓN DE LA CERVEZA ARTESANAL TIPO ALE

Para la elaboración de la cerveza artesanal son necesarios ciertos insumos los cuales se presentan indispensables en la producción, entre ellos se encuentran: lúpulo, mosto (malta Pilsen, centeno pailido y trigo), levaduras (comercial: *Saccharomyces cerevisiae* y obtenida: *Cándida tropicalis*) siendo utilizadas en el proceso de fermentación hasta llegar a un producto.

4.3.1 Preparación de cerveza artesanal. Para la preparación de las cervezas artesanales, se realizó la descripción de las materias primas empleadas, el procedimiento seguido en la elaboración, junto con la caracterización, estableciendo parámetros como la concentración de glucosa como azúcar reductor presente en el mosto por medio de la aplicación del método DNS, determinación del potencial de hidrógeno pH, densidad aparente, porcentaje alcohólico aproximado y el porcentaje de atenuación. A su vez se determinó un análisis microbiológico para verificar y certificar que su consumo es seguro. Por último, se realizó un análisis sensorial del Programa de Certificación de Beer Judge determinando las características organolépticas. En el diagrama 19 se describirá el procedimiento general.

Diagrama 19. Procedimiento para la elaboración de la cerveza artesanal



Fuente: elaboración propia

4.3.1.1 Materias primas. Para la elaboración de la cerveza artesanal son necesarios ciertos insumos los cuales se presentan indispensables para su producción, entre ellos se encuentran: lúpulo, las maltas y la levadura; para el caso se emplearon dos tipos de levaduras para la elaboración de las dos cervezas artesanales, por un lado, se empleó la levadura comercial, *Saccharomyces cerevisiae* y para la otra cerveza se utilizó la cepa obtenida, *Cándida tropicalis*, la descripción de estos insumos se explica a continuación.

Mosto: el mosto utilizado en la preparación, está compuesto por 25% de Centeno Palido, 25% de Trigo Palido, 50% de Malta Pilsen y lúpulo presentando 50 grados IBU. Tiene un pH de 5,32 y una medida de grados Brix ente 17 y 18. A continuación, se determinarán las características principales de cada compuesto referenciados por Weyerermann Malting ya que, se especializa en la innovación de sabores siendo de gran acogida por los consumidores¹⁵¹.

Centeno pálido: esta malta brinda un aroma y sabor a pan, posee una concentración de proteínas elevada lo que lleva a tener retención de la espuma en la bebida y le permite tener cuerpo¹⁵². La malta de centeno Weyermann es utilizado en cervezas estacionales, cervezas de centeno (Ale y Lager de centeno), cervezas de centeno de alta fermentación y cervezas especiales. El sistema visual European Brewing Convention (EBC) ¹⁵³ presenta un rango de color entre 4-10. Al ser utilizado el centeno se tiene posibilidad de obtener una cerveza típica de centeno de alta fermentación, cervezas aromáticas, típicos aromas de centeno con algunas notas de pan¹⁵⁴.

Trigo: esta es clasificada como una malta básica para las cervezas de trigo, incrementando el sabor y el mejoramiento de espuma en cervezas de alta fermentación¹⁵⁵. También brinda a la cerveza un sabor dulce y fresco,

¹⁵¹ VOIGT, Jens. WEYERMANN, Thomas y RICHTER, Andreas. A New Approach to Malt Flavor Characterisation. En: Weyermann © Specialty Malts. [Sitio web]. Luxemburg. [Consultado: 26 septiembre 2019]. Archivo pdf. Disponible en: http://www.agraria.com.br/extranet/arquivos/agromalte_arquivo/roda_de_aromas_weyermannr_malt_aroma_wheelr_-_ing.pdf.

¹⁵² INSUMOS DE CERVEZA. Guia definitiva de la malta. En: Cerveza Artesana Homebrew S.L. [sitio web]. [Consultado: 10 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.cervezartesana.es/blog/post/la-guia-definitiva-de-la-malta.html>

¹⁵³ MEASURING THE COLOUR OF BEER – SRM AND EBC METHODS. En: Jenway spectrophotometer. [sitio web]. [Consultado: 28 septiembre 2019]. Archivo pdf. Disponible en: http://www.jenway.com/adminimages/Spectrophotometers_Measuring_the_colour_of_beer.pdf.

¹⁵⁴ RICHTER, Andreas. Bioland Rye Malt. En: Weyermann. [sitio web]. Germany. [Consultado: 1 octubre 2019]. Archivo pdf. Disponible en: www.weyermannmalt.com.

¹⁵⁵ INSUMOS DE CERVEZA. Materias primas. En: Distrines. [sitio web]. [Consultado: 15 agosto 2019]. Disponible en: <http://distrines.com/maltas/7/malta-trigo>.

comúnmente se añade entre un 20% y un 50% de trigo del total a utilizar¹⁵⁶. El trigo palido Weyerman es utilizado en cervezas de trigo y en cervezas muy fermentadas tipo barril, ligeras, bajas en alcohol y sin alcohol. Con un rango de color entre 3- 5. Obteniendo un típico aroma muy fermentado, agregando cremosidad y sabor a notas de pan, biscocho, miel y caramelo¹⁵⁷.

Malta Pilsen: está producida a partir de cebadas de dos hileras de cultivo orgánico, proporciona una sensación de cerveza terminada en la boca con una buena espuma. Posee un grano muy flexible con alta eficiencia de extracción para la fabricación de una cerveza confiable, la Malta Pilsen Weyermann es utilizado en cervezas Pilsen y cualquier otro tipo de cerveza, con un rango de color entre 2,5 – 4,5 (EBC) siendo utilizada como resultado en la fabricación de todas las cervezas claras y como malta base para cervezas especiales¹⁵⁸.

Lúpulo: para el tipo de cerveza que se desea obtener se emplea el lúpulo Dorado proveniente de los Estados Unidos, presentado alfa ácidos entre el 14% y el 16%, y beta ácidos comprendidos entre el 7% y el 8%. Para una mayor conservación de esta materia prima se mantuvo a 20°C y puede tener una duración de 6 meses. El aroma y los sabores típicos presentes en este son, fruta tropical y hierba¹⁵⁹. El lúpulo fue utilizado en forma de pellets para su mayor aprovechamiento.

Levadura: se utilizaron dos levaduras en la producción de la cerveza una es *Saccharomyces cerevisiae* y la otra es *Candida tropicalis*.

***Saccharomyces cerevisiae*:** safale K-97 es un tipo de levadura ale alemana seleccionada por su capacidad de formar una capa superficial de espuma muy firme y espesa durante la fermentación. Es apta para producir cerveza tipo ale con baja concentración de ésteres y puede ser utilizada para cervezas de trigo tipo belgas. Su bajo perfil de atenuación genera cervezas con buena persistencia en el paladar.

¹⁵⁶INSUMOS DE CERVEZA. Materias primas .En: cocinista [sitio web]. [Consultado: 15 junio 2019]. Disponible en:<https://www.cocinista.es/web/es/enciclopedia-cocinista/maltas-y-lupulos/malta-de-trigo.html>.

¹⁵⁷RICHTER, Andreas.Wheat Malt. En: Weyermann. [sitio web]. Germany. [Consultado: 1 octubre 2019]. Archivo pdf. Disponible en: www.weyermannmalt.com.

¹⁵⁸ RICHTER, Andreas.Organic Pilsen Malt. En: Weyermann. [sitio web]. Germany. [Consultado: 1 octubre 2019]. Archivo pdf. Disponible en: www.weyermannmalt.com.

¹⁵⁹ EL DORADO (LUPULO). Enciclopedia de la cerveza. En: Birrapedia. [Sitio web]. Estados Unidos. [Consultado: 30 septiembre 2019]. Disponible en: <https://birrapedia.com/enciclopedia-de-la-cerveza/el-dorado--lupulo-/e>.

Está compuesta por Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y agente emulsionante E491¹⁶⁰. La ficha técnica se encuentra en el anexo L.

4.3.1.2 Procedimiento. Para la elaboración de la cerveza artesanal se utilizaron el mosto y la levadura como materias primas esenciales en el proceso de fermentación y maduración para un posterior almacenamiento y empaque.

En el cuadro 15 se evidenciarán las cantidades utilizadas en la elaboración de la cerveza artesanal.

Cuadro 15. Cantidades de materia prima utilizadas para la elaboración de la cerveza artesanal

Mosto	Sabor	Fermentación
1.71 Libras de Trigo pálido	46.75 Gramos de lúpulo	15.95 Gramos de levadura (comercial)
1.71 libras de Centeno pálido		1,3 litros de suspensión celular <i>Candida tropicalis</i>
3.42 libras Malta Pilsen		

Fuente: elaboración propia

En el cuadro 16 se mostrarán los equipos y materiales utilizados en la preparación de la cerveza tipo Ale.

Cuadro 16. Equipos y materiales utilizados en la elaboración de la cerveza artesanal

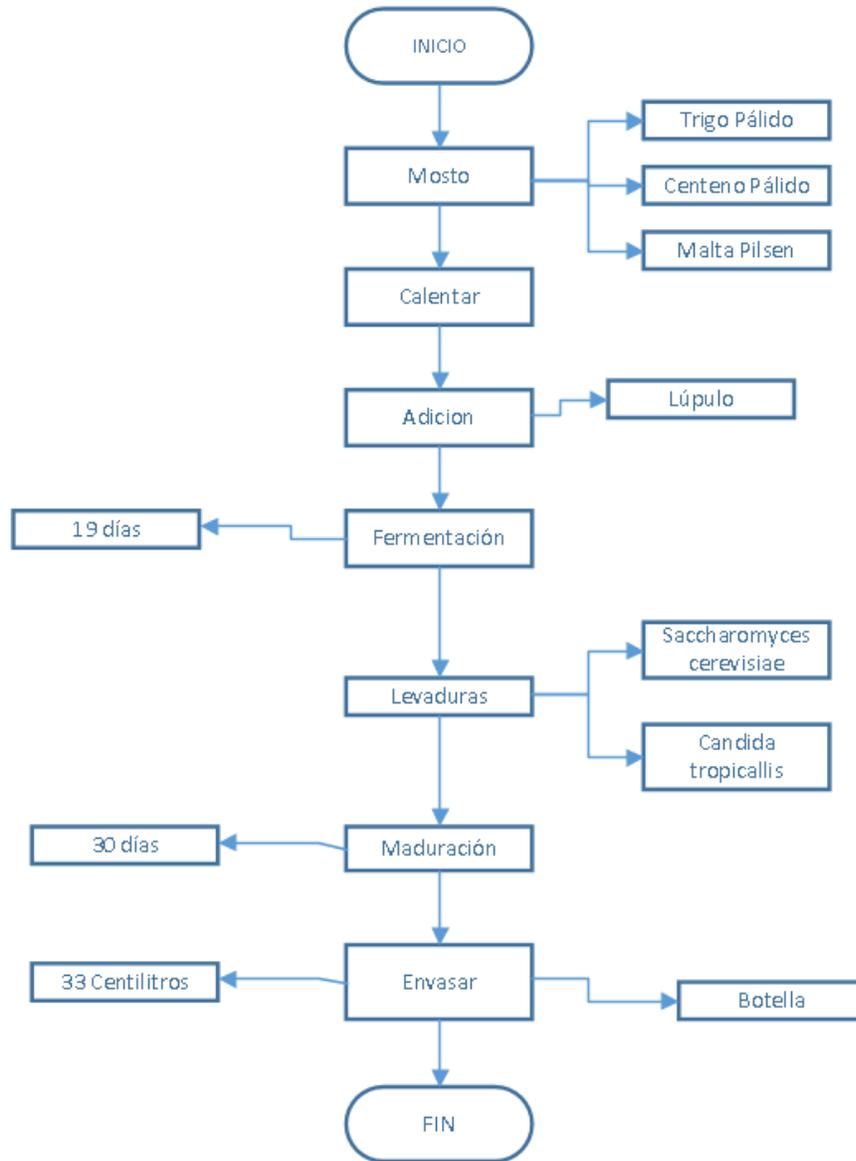
Equipos Y Materiales
1 Olla en acero inoxidable de 20L
1 balanza
1 Botellón de plástico de 20 L
Termómetro digital para alimentos

Fuente: elaboración propia

¹⁶⁰ INSUMOS DE CERVEZA. Materias primas. En: Distrines. [sitio web]. [Consultado: 15 agosto 2019]. Disponible en: <http://distrines.com/levaduras/36/safale-k-97>.

Para empezar, el mosto se encontraba previamente preparado, siendo compuesto por 1,71 libras de cebada pálida, 3.42 libras de malta Pilsen y 1,71 libras de trigo pálido. Una vez obtenido el mosto, éste fue calentado hasta llegar a su punto de ebullición, al ver la formación de espuma como primera instancia se agregó una sexta parte del lúpulo en pellets, el lúpulo se adicionó cada 15 minutos una sexta parte de éste llegando a los 55 minutos, influyendo en el amargor, sabor y aroma de la cerveza. En seguida se le agregó el restante del lúpulo llevando a la olla de acero inoxidable sobre agua fría hasta llegar a 21°C aproximadamente. Para el proceso de fermentación se utilizó un botellón plástico de 20 litros de capacidad, donde se vertieron 11 litros de mosto, y posteriormente bajo la asesoría del maestro cervecero y del microbiólogo profesional, fueron agregados 15.95 gramos de levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la elaboración de la cerveza artesanal con la Cepa de referencia, y para la preparación de la cerveza con la cepa proveniente de la ciruela nombrada como cepa D *Candida tropicalis*, se realizó una suspensión celular, donde a partir de una caja de Petri se tomó una muestra de inóculo puro de cada una de las levaduras con el fin que el inóculo fuera alrededor del 10% del volumen de fermentación, para llevar a 1,3 litros de caldo sabouraud, el cual se incubó durante 48 horas a temperatura ambiente. El proceso de fermentación se realizó durante 19 días. Por último, se presenta el proceso de maduración para acentuar los sabores siendo el tiempo necesario en las transformaciones fisicoquímicas y el aspecto visual del producto a obtener, en un tiempo de 30 días. Finalmente se envasó la cerveza en botellas de 33 centilitros. En el diagrama 20 se muestra el procedimiento de la elaboración de las cervezas tipo Ale.

Diagrama 20. Procedimiento obtención de cervezas



Fuente: elaboración propia

4.3.1.3 Caracterización de la cerveza artesanal. Como se mencionó anteriormente en la caracterización de la cerveza artesanal se determinó la medida de los parámetros antes mencionados, esto se explica a detalle en el numeral 3.5, procesamiento de muestras. Aquí se explicará la determinación de la densidad de la cerveza artesanal realizada a mayor escala, donde se utilizó una de las herramientas más usadas en cervecería, el hidrómetro.

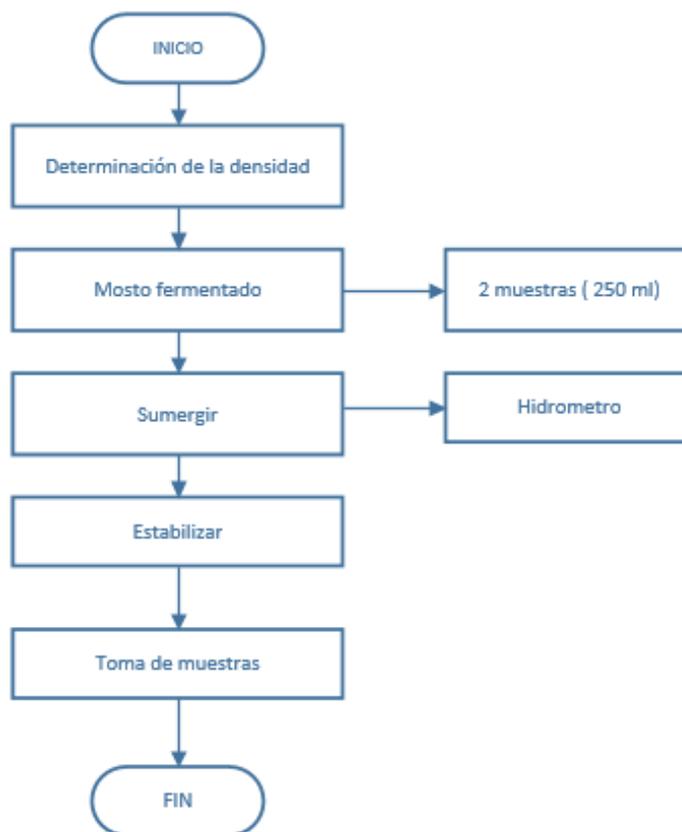
4.3.1.4 Determinación de la densidad. Para llevar a cabo la medida de la densidad, se utilizó un hidrómetro con el fin de determinar la relación masa- volumen del mosto fermentado, para así determinar el porcentaje alcohólico aproximado y el progreso de la atenuación siendo un aspecto en donde se da la conversión del azúcar en etanol por acción de la levadura¹⁶¹. El hidrómetro arroja resultados en gramos sobre mililitro.

Se tomaron 2 muestras de mosto fermentado, de cada una de las cepas seleccionadas, se vertió en una probeta de 250 ml, sumergiendo el hidrómetro evitando que éste entre en contacto con las paredes de la probeta, luego de esto, se esperó hasta que se estabilizará y entrara en reposo absoluto para, posteriormente tomar la medición.

Para llevar a cabo la determinación de la densidad el diagrama 21 muestra los pasos a seguir.

¹⁶¹ PALMER, Jhon. How To Brew. Everithing You Need to Know to Brew Great Beer Every Time. [en línea]. En: Brewers Publications. 2006, Apéndice A. p.1. [Consultado: 23 marzo 2019]. Disponible en: <https://www.doc-developpement-durable.org/file/Fabrications-Objets-Outils-Produits/bieres/53735499-How-to-brew-John-Palmer-Espanhol.pdf>.

Diagrama 21. Determinación de la densidad



Fuente: elaboración propia

4.3.1.5 Análisis microbiológico. Con el objetivo de evaluar los requisitos descritos en la norma técnica colombiana 3854 para bebidas alcohólicas, cervezas (NTC 3854) garantizando así la calidad de la cerveza artesanal, en cuanto a indicadores microbiológicos de calidad, como mesófilos aerobios, *E. coli*, coliformes, hongos y levaduras se refiere, se realizó un recuento estimado de estos, por medio del uso de placas 3M petrifilm™, Siendo sistemas que constan de medios de cultivo listos para utilizar, los cuales contienen los nutrientes necesarios para el crecimiento de estos microorganismos en el medio.

Para el recuento de microorganismos se realizaron diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^2 y 10^{-3} de la cerveza artesanal, donde se tomaron $100 \mu\text{L}$ de la muestra para cada prueba. Para el recuento de mesófilos aerobios se tomó la dilución de 10^{-1} y 10^{-2} , para *E. coli* y coliformes se tomó la muestra directamente de la cerveza y finalmente para hongos y levaduras se tomó la dilución de 10^{-2} , 10^2 y 10^{-3} , estas diluciones se realizaron para posibilitar el recuento de estos microorganismos ya que aún se tenía una presencia considerable de levadura. Posteriormente estas muestras fueron inoculadas en las placas correspondientes y se enviaron a incubación por 48 horas

a 30°C. Estos análisis microbiológicos fueron guiados y asesorados por parte del microbiólogo profesional.

4.3.1.6 Formato sensorial BJCP. Para el análisis sensorial de la cerveza elaborada con la cepa *Cándida tropicalis*, se llevó a cabo la determinación de compuestos aromáticos de manera cualitativa presentes en la cerveza como producto en proceso de maduración, por medio de una evaluación sensorial, la cual consiste en una cata de cerveza realizada por maestros cerveceros, los cuales evalúan la cerveza elaborada con levadura comercial (*Saccharomyces*) y una cerveza elaborada con la levadura *Cándida tropicalis* (No *Saccharomyces*), obtenida por tener el mejor perfil fermentativo luego del aislamiento, seguido de esto, los maestros cerveceros llenaron un formato sensorial guiado por un instructivo tomado como referencia para la evaluación de los aromáticos presentes, de la página en línea del Programa de Certificación de Beer Judge “Beer Judge Certification Program (BJCP)”, el cual brinda la información necesaria de la cerveza artesanal, contribuyendo a reconocer las habilidades de degustación y evaluación de esta. En el anexo M, se muestra el formato sensorial mencionado.

El formato Beer ScoreSheet de la organización BJCP en el cual se seleccionan diferentes características sensoriales que pueden estar presentes o no en la cerveza, facilita la evaluación e identificación de inconvenientes presentados en una cerveza. Este formato presenta descriptores organolépticos los cuales pueden ser percibidos en la cerveza en donde se pueden encontrar:

- Acetaldehído: presencia de olor o sabor similar al de una manzana verde.
- Alcoholes superiores: presencia de olor o sabor similar al del Whiskey o el Aguardiente.
- Astringencia: presenta en la boca una sensación de sequedad.
- Diacetilo: evidenciado por olor o sabor similar al de la mantequilla o una sensación aceitosa en la boca.
- Dimetilsulfuro: evidenciado por olor o sabor similar al maíz.
- Esteres: presenta olor o sabor frutal o floral.
- Herbáceo: presencia de aroma y sabor a hierva recién cortada u hojas verdes.
- Golpe de luz: evidenciado por un olor parecido al de un zorrillo.
- Metálico: presencia de sabor a lata, monedas, cobre, hierro o como sangre.

- Rancio: Aromas y sabores a rancio, húmedo, moho.
- Oxidado: Combinación de sabores y aromas a rancio, vino, cartón, papel.
- Fenólico: presencia de sabor a especias (clavo, pimienta), humo, plástico, cloro fenólico.
- Disolvente: evidenciado en sabores a la acetona u otros disolventes y lacas.
- Agrio/ Acido: presencia de aroma y sabor agrio, parecido al vinagre.
- Sulfúrico: evidencia de aroma a huevos podridos o cerillas quemadas.
- Vegetal: presencia de aroma y sabor a verduras hervidas, enlatadas o podridas (repollo, cebolla, espárragos, apio, etc.).
- Levadura: presencia de sabor o aroma a pan, azufre o levadura.

El formato también presenta una sección en donde se determina una puntuación y opción de comentarios frente al aroma (límite de 12 puntos), apariencia (límite de 3 puntos), sabor (límite de 20 puntos), sensación en la boca (límite de 5 puntos) y por último la impresión general (límite 10 puntos) para un valor total de 50 puntos.¹⁶² Los puntos van ligados a la clasificación en la que la cerveza estaría evaluada correspondiente con su proceso final. En la tabla 18 se evidenciará los rangos de puntaje, calificación y las características.

¹⁶² BEER SCORESHEET. Sanctioned Competition Program. En: Certification Beer Judge Program. [sitio web]. [consultado: 19 junio 2019]. Archivo pdf. Disponible en: <http://www.bjcp.org>.

Tabla 18. Parámetros de calificación

Puntaje	Calificación	Características
45-50	Excepcional	Ejemplo de clase mundial del estilo.
38-44	Excelente	Ejemplifica bien el estilo. Requiere de ajustes menores.
30-37	Muy buena	Generalmente dentro de los estilos. Algunos defectos menores
21-29	Buena	Pierde la marca del estilo. Fallas menores
14-20	Justa	Sabores y aromas deficientes. Poco placentera
0-13	Problemática	Sabores y aromas problemáticos. Difícil de beber

Fuente: elaboración propia

Para mayor soporte estadístico se realizó una cata de cerveza donde, el formato fue diligenciado por cuatro maestros cerveceros los cuales calificaron la cerveza clásica de la cervecería artesanal y la cerveza obtenida con la cepa D del fruto de ciruela, *Cándida tropicalis*, seleccionada por los procesos anteriormente descritos.

4.4 PRE EXPERIMENTACIÓN DE FERMENTACIONES EMPLEANDO LA CEPA D, *CÁNDIDA TROPICALIS*

Para realizar la pre experimentación de las fermentaciones con la cepa *Cándida tropicalis*, se inició con una serie de procedimientos donde los resultados serán analizados a continuación.

4.4.1 Determinación de la concentración de biomasa. Para la determinación de la concentración de la biomasa para inocular los mostos, se llevó a cabo la técnica gravimétrica de peso seco. Los resultados obtenidos del peso inicial de los tubos falcón y el peso final de la biomasa seca se muestran a continuación en la tabla 19.

Tabla 19. Datos del peso inicial de los tubos Falcon y peso final con la biomasa seca, cepa D

Cepa	Réplica	Peso inicial tubo Falcon	Peso tubo Falcon + biomasa seca (peso constante) 72 horas
"D" Candida tropicalis	1	5,423	5,437
	2	5,413	5,516
	3	5,470	5,500

Fuente: elaboración propia

A continuación, en la tabla 20 se muestran los resultados de la concentración de microorganismos para las dos cepas y sus réplicas.

Tabla 20. Datos de la concentración de biomasa de la cepa D y sus réplicas

Cepa	Réplica	Concentración de microorganismos (g/ml)
"D" Candida tropicalis	1	0,001007
	2	0,007371
	3	0,002093

Fuente: elaboración propia

Finalmente se determinó que la concentración de microorganismos a la cual se inoculó las unidades de fermentación fue de 0,00349 g/ml para la cepa D, y de esta manera se iniciaron los procesos de elaboración de la cerveza a baja escala (pre experimentación).

4.4.2 Procesamiento de muestras. En el procesamiento de muestras se determinó la medida de parámetros como la concentración de glucosa por medio del método DNS, determinación del potencial de hidrógeno pH, determinación de la densidad, determinación del porcentaje alcohólico aproximado (Anexo N) y del porcentaje de atenuación (Anexo Ñ), los resultados de los parámetros determinados en la pre experimentación se encuentran reportados en la tabla 21.

Tabla 21. Resultados de los parámetros determinados en la pre experimentación con la cepa D

<i>Cepa D, <i>Cándida Tropicalis</i></i>	
Parámetro	Resultados
Concentración de glucosa (g/l) inicio	1,262
Concentración de glucosa (g/l) final	0,224
pH inicial	5,22
pH final	3,90
Densidad inicial (g/ml)	1,070
Densidad final (g/ml)	1,004
porcentaje alcohólico aprox.	8,9%
Porcentaje de atenuación	93,85%

Fuente: elaboración propia

Teniendo en cuenta los datos reportados en la tabla 21 se determinó que el consumo de glucosa para la cepa D fue eficiente ya que consumió aproximadamente el 82% de la glucosa disponible en el mosto en 144 horas de incubación como se observa en la gráfica 9; en cuanto al pH inicial del mosto de 5,22, se determinó que el medio es óptimo para la fermentación ya que este valor se encuentra dentro del rango normal de pH para un mosto el cual se debe encontrar en un rango de 5 a 5.5. El pH final fue de 3,90, y se determinó que la cerveza artesanal tendría un carácter ácido.

En cuanto al porcentaje alcohólico aproximado, se reporta un valor de 8,9 para la cerveza realizada a baja escala, lo cual indica que posee un porcentaje alcohólico elevado de 8.9 %y finalmente para el porcentaje de atenuación se obtuvo un valor de 93,85% lo que indica que es elevado, ya que este valor indica la capacidad que tiene el microorganismo de convertir los azúcares en etanol; a un valor alto de atenuación se determina que la levadura fue capaz de consumir la mayor cantidad de azúcares presentes en el mosto, produciendo una cerveza con un porcentaje de alcohol elevado.

A continuación, se muestra el comportamiento de la concentración de glucosa por parte de la cepa D en el proceso de fermentación.

4.4.2.1 Determinación de la concentración de glucosa presente en la fermentación. Para determinar la concentración de glucosa presente en la fermentación, se realizó la preparación de la muestra a analizar, esto se encuentra explicado en el numeral 3.5.

A continuación, por medio de la tabla 22 se muestran los datos promedio de absorbancia y la concentración de glucosa obtenido con la cepa D.

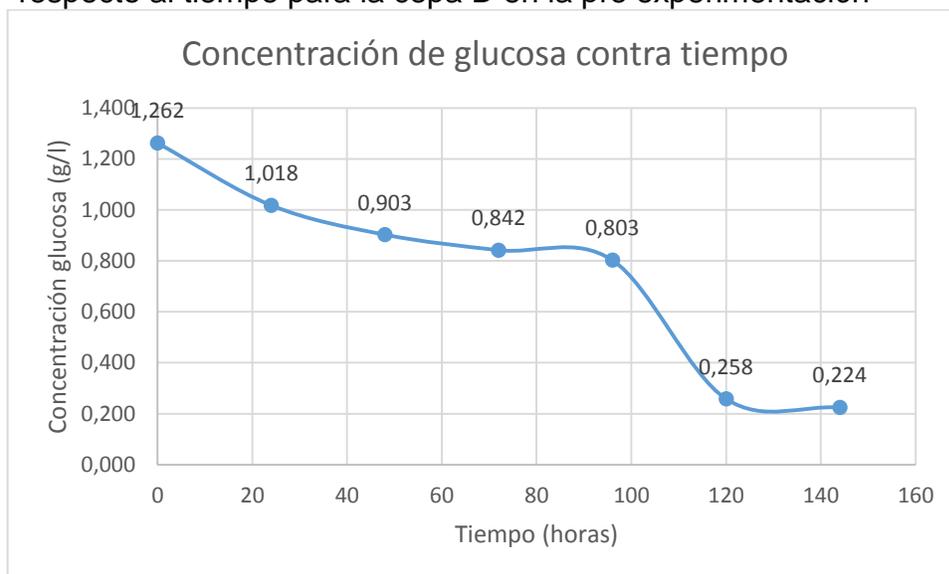
Tabla 22. Datos promedio de absorbancia y la concentración de glucosa obtenidos con la cepa D

Cepa D			
Tiempo (horas)	Absorbancia promedio (540 nm)	Concentración de glucosa promedio (540 nm)	Desviación estándar
0	0,394	1,262	0,062
24	0,315	1,018	0,125
48	0,284	0,903	0,011
72	0,252	0,842	0,048
96	0,220	0,803	0,009
120	0,042	0,258	0,002
144	0,033	0,224	0,002

Fuente: elaboración propia

La gráfica 9 muestra el comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo.

Gráfica 9. Comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo para la cepa D en la pre experimentación



Fuente: elaboración propia

En la gráfica 9 entre las 96 y las 120 horas se observó una reducción sustancial en la concentración de glucosa que se generó posiblemente por una mayor concentración de biomasa o presencia de microorganismos alteradores. Sin embargo no se realizaron pruebas para comprobar la pureza del proceso de fermentación durante las 144 horas de incubación.

4.5 PRE EXPERIMENTACIÓN DE FERMENTACIONES EMPLEANDO LA CEPA PATRÓN, *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* (SAF ALE K-97)

4.5.1 Determinación de la concentración de biomasa. Para determinar la concentración de biomasa, se empleó la técnica de peso seco. Los resultados del peso inicial de los tubos falcón y el peso final de la biomasa seca se muestran a continuación en la tabla 23.

Tabla 23. Datos del peso inicial de los tubos falcon y peso final con la biomasa, cepa patrón

Cepa	Réplica	Peso inicial tubo Falcon	Peso tubo Falcon + biomasa seca (peso constante) 72 horas
"Patrón"	1	5,405	5,435
Saccharomyces cerevisiae	2	5,413	5,473
	3	5,452	5,471

Fuente: elaboración propia

A continuación, en la tabla 24 se muestran los resultados de la concentración de biomasa para las dos cepas y sus réplicas.

Tabla 24. Datos de la concentración de biomasa de la cepa Patrón y sus réplicas

Cepa	Réplica	Concentración de biomasa (g/ml)
"Patrón"	1	0,002100
Saccharomyces cerevisiae	2	0,004307
	3	0,001407

Fuente: elaboración propia

Por último, se estableció que la concentración de biomasa que fue inoculada en las unidades de fermentación, para dar inicio a los procesos de fermentación fue de 0.00260 g/ml.

4.5.2 Procesamiento de muestras. Para el procesamiento de muestras se establecieron los mismos parámetros anteriormente analizados, la concentración de glucosa por medio del método DNS, determinación del potencial de hidrógeno pH, determinación de la densidad, determinación del porcentaje alcohólico paroximado (Anexo N) y del porcentaje de atenuación (Anexo Ñ), en la tabla 25 se reportan los resultados obtenidos.

Tabla 25. Resultados de los parámetros determinados en la pre experimentación con la cepa patrón

Cepa Patrón, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Parámetro	Resultados
Concentración de glucosa (g/l) inicio	1,198
Concentración de glucosa (g/l) final	0,218
pH inicial	5.13
pH final	3.93
Densidad inicial (g/ml)	1,070
Densidad final (g/ml)	1,002
porcentaje alcohólico aprox.	9,22%
Porcentaje de atenuación	97,47%

Fuente: elaboración propia

Considerando los resultados obtenidos en la tabla anterior, se determinó que la cepa patrón en los procesos de fermentación analizados tuvo un consumo eficiente de glucosa ya que a las 24 horas de fermentación presentó un consumo del 82% de la glucosa presente en el mosto (Gráfica 10), lo cual contrasta con la cepa D que logró este mismo porcentaje pero en 144 h, sin embargo además de establecer diferencias en los tiempos de fermentación también se esperan hallar diferencias en el perfil sensorial que se evaluó en la caracterización de las cervezas como producto.

4.5.2.1 Determinación de la concentración de glucosa presente en la fermentación. Para la determinación de este parámetro se llevó a cabo la preparación de las muestras, este procedimiento se encuentra explicado en el numeral 3.4.

A continuación, por medio de la tabla 26 se muestran los datos promedio de absorbancia y concentración de glucosa, obtenidos con la cepa patrón.

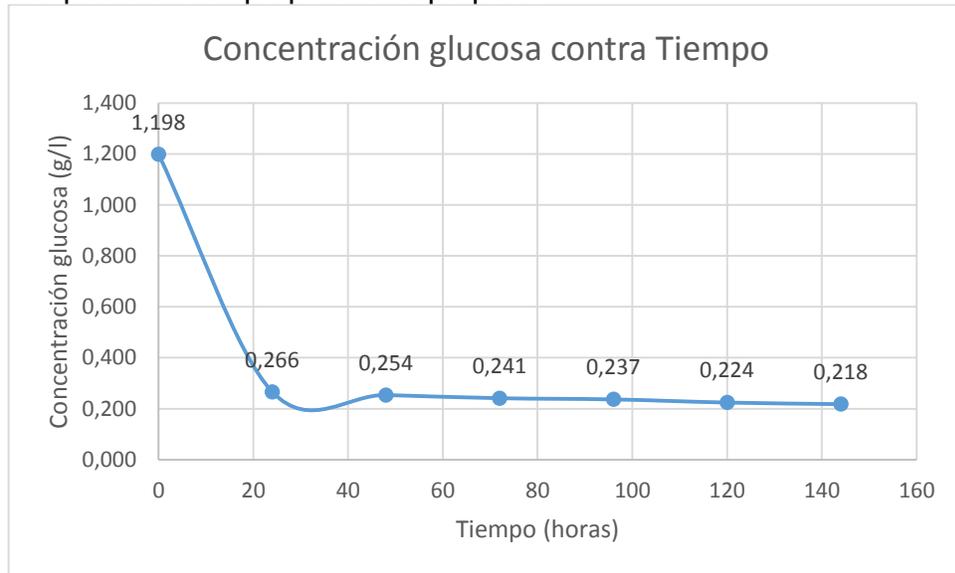
Tabla 26. Datos promedio de absorbancia y concentración de glucosa obtenidos con la cepa patrón

Cepa Patrón			
Tiempo (horas)	Absorbancia promedio (540 nm)	Concentración de glucosa (g/l) promedio	Desviación estándar
0	0,348	1,198	0,130
24	0,048	0,266	0,009
48	0,044	0,254	0,013
72	0,040	0,241	0,018
96	0,039	0,237	0,007
120	0,035	0,224	0,015
144	0,033	0,218	0,015

Fuente: elaboración propia

La gráfica 10 muestra el comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo para la cepa patrón.

Gráfica 10. Comportamiento de la concentración de glucosa con respecto al tiempo para la cepa patrón



Fuente: elaboración propia

4.6 CARACTERIZACIÓN DE LA CERVEZA ARTESANAL TIPO ALE EMPLEANDO LA CEPA D.

A continuación, se muestra la caracterización del producto, donde se determinaron parámetros como la concentración de glucosa, por medio de la aplicación del método DNS, determinación del potencial de hidrógeno pH, determinación de la densidad, esta se puede observar en la ilustración 10, determinación del porcentaje alcohólico aproximado (Anexo N), del porcentaje de atenuación (Anexo Ñ) y el valor SMR para determinar su color, también se encuentran las pruebas de calidad de la cerveza por medio del reporte de un análisis microbiológico y el análisis organoléptico empleando el formato sensorial de la BJCP.

Ilustración 10. Determinación de la densidad en la cerveza artesanal con la cepa D



Fuente: elaboración propia

Para la caracterización de la cerveza artesanal elaborada con la cepa D, se determinaron los parámetros mencionados anteriormente, los resultados de dichos parámetros determinados en la cerveza artesanal elaborada con la cepa D, serán mostrados en la tabla 27.

Tabla 27. Resultados de los parámetros determinados en la cerveza artesanal elaborada con la cepa D

Cepa D, <i>Cándida Tropicalis</i>	
Parámetro	Resultados
Concentración de glucosa (g/l) inicio	0,895
Concentración de glucosa (g/l) final	0,216
pH inicial	4,45
pH final	3,97
Densidad inicial (g/ml)	1,052
Densidad final (g/ml)	1,006
Porcentaje alcohólico aprox.	6,22%
Porcentaje de atenuación	88,46%
SRM (valor color)	2

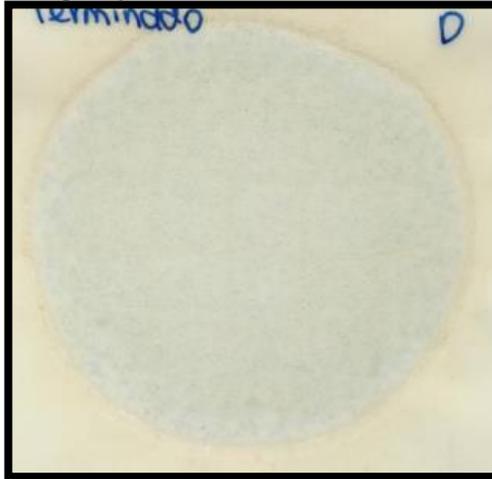
Fuente: elaboración propia

Considerando los resultados obtenidos de los parámetros anteriormente nombrados, se determinó que la cerveza elaborada con la cepa D, *Cándida tropicalis*, es una cerveza ácida, ya que su pH final se encuentra entre 3,9 - 3,97, a su vez también se considera una cerveza con un porcentaje de alcohol elevado, ya que el porcentaje de alcohol se encuentra en un rango de 6 – 8%v/v , de igual manera se clasifico con un valor SRM (Standard Reference Method)* de 2 a la bebida lo que indica que esta corresponde a una cerveza rubia.

*(Clasificación del color de la cerveza según la American Society of Brewing Chemists ASBC).

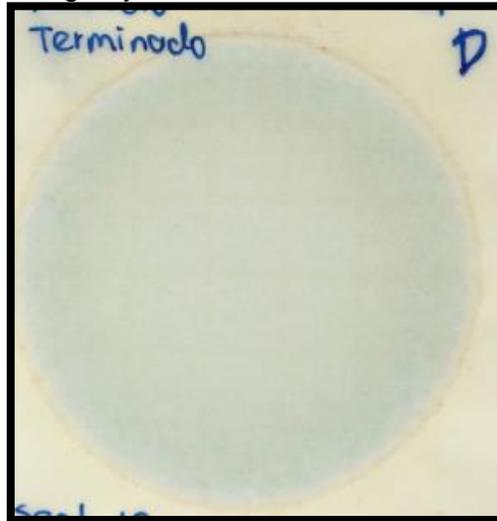
4.6.1 Análisis microbiológico. Los resultados obtenidos del análisis microbiológico para hongos y levaduras, se muestra en las ilustración 11, 12 y 13, para *E.coli* y coliformes se muestra en la ilustración 14 y para mesófilos aerobios, se muestra en la ilustración 15 y 16.

Ilustración 11. Recuento de hongos y levaduras, dilución 10^{-3}



Fuente: elaboración propia

Ilustración 12. Recuento de hongos y levaduras, dilución 10^{-2}



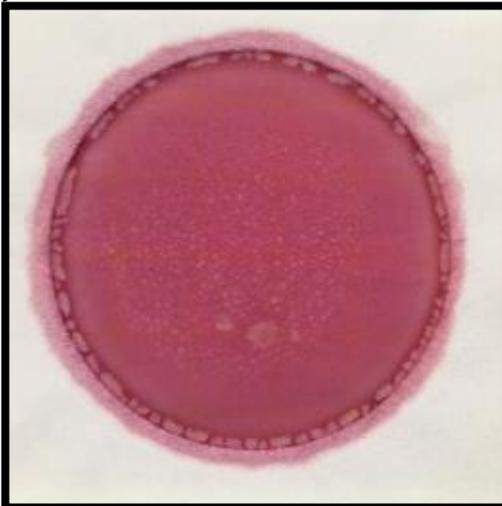
Fuente: elaboración propia

Ilustración 13. Recuento de hongos y levaduras, dilución 10^2



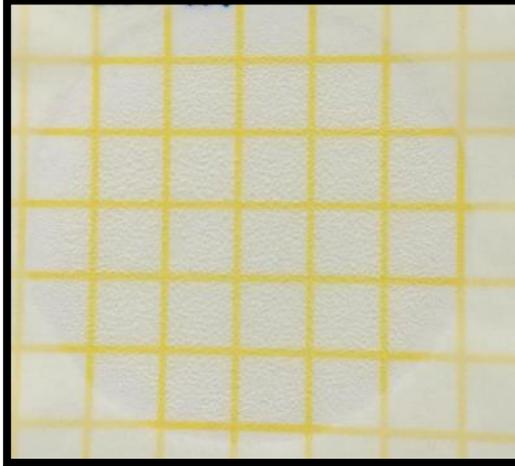
Fuente: elaboración propia

Ilustración 14. Recuento de *E. coli* y coliformes



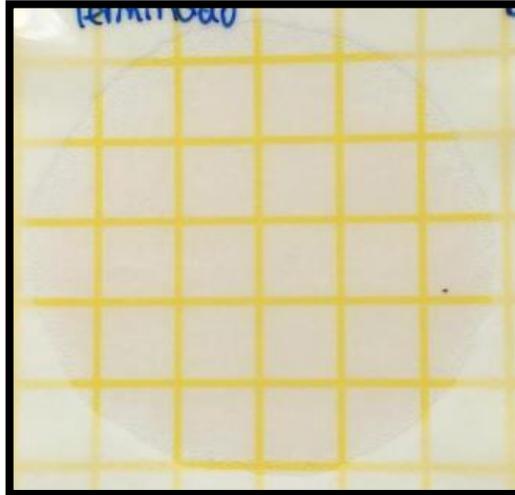
Fuente: elaboración propia

Ilustración 15. Recuento de mesófilos aerobios, dilución 10^{-2}



Fuente: elaboración propia

Ilustración 16. Recuento de mesófilos aerobios, dilución 10^{-1}



Fuente: elaboración propia

La tabla 28 muestra el reporte del análisis microbiológico cuantitativo realizado a la cerveza artesanal como producto terminado.

Tabla 28. Análisis microbiológico de la cerveza artesanal

Análisis	Resultados	NTC 3854 cerveza industrial
Recuento estimado de hongos y levaduras	$1,3 * 10^6 \text{ UFC/cm}^3$	$\leq 20 \text{ UFC/cm}^3$
Recuento estimado de E. coli. y coliformes totales	0 UFC/cm^3	0 UFC/cm^3
Recuento estimado de mesófilos aerobios	$> 10^1 \text{ UFC/cm}^3$	$\leq 100 \text{ UFC/cm}^3$

Fuente: elaboración propia

Teniendo en cuenta el análisis realizado a la cerveza artesanal elaborada y los parámetros establecidos por la NTC 3854¹⁶³ se determinó que es apta para ser consumida, ya que esta presentó un recuento estimado de hongos filamentosos y levaduras de $1,3 \cdot 10^6$ UFC/cm³ el cual es un valor superior a 20 UFC/cm³ debido a que a la cerveza realizada con la cepa D no se le realizaron procesos de microfiltración. Tampoco se evidenció la presencia de E. coli o coliformes totales en la bebida, y finalmente en el recuento estimado de mesófilos aerobios reporta un contenido de mayor a 10^1 UFC/cm³ lo que indica que se encuentra bajo la norma técnica Colombiana, cabe resaltar que la norma técnica colombiana 3854 esta descrita para cervezas industriales por lo cual esta se toma como referente para evaluar la calidad del producto obtenido.

4.6.2 Análisis sensorial de la cerveza artesanal empleando la cepa “D”. A continuación se evidenciarán los resultados reunidos de los análisis sensoriales realizados por los maestros cerveceros.

Análisis de la cerveza Ale Cepa D. Este análisis se realizó a la cerveza obtenida de la levadura aislada del fruto de ciruela seleccionada como cepa D la cual fue sujeta a un análisis sensorial mediante el formato Beer ScoreSheet de la organización BJCP siendo evaluada por cuatro maestros cerveceros los cuales anteriormente sometieron a juicio la cerveza proveniente de la levadura patrón y así se logró obtener un comparativo entre las dos cervezas obtenida tipo Ale, y así identificar las nuevas características sensoriales que brinda la cerveza elaborada con la cepa D. A continuación, se dará un resumen del análisis correspondiente por cada maestro cervecero frente a la cerveza denominada cepa D.

Maestro cervecero 1. Juan Sebastián Rodríguez. En la tabla 29 se evidencia un resumen del análisis y en el anexo O se podrá encontrar el formato en su totalidad.

¹⁶³ INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. Bebidas alcohólicas, Cervezas. NTC 3854. Bogotá D.C.: El instituto, 1996.

Tabla 29. Análisis maestro cervecero Juan Sebastián Rodríguez

	Comentarios	Puntaje
Aroma	Con aroma intenso a alcohol que pica en la punta de la nariz (Butírico), con perfil a fenoles especiales y algo de levadura residual especiada.	4/12
Apariencia	De color amarillo con buena retención y color blanco marfil.	3/3
Sabor	A malta medio con recordación a pan árabe y sensación seca, balance hacia los esteres, final largo algo ácido.	10/20
Sensación en la boca	Medio ligero de carbonatación baja, sensación seca que perdura en la boca.	4/5
Impresión general	Muy buen intento, las levaduras lograron varios factores familiares que se buscan en este tipo de estilos, aunque se generaron algunos off flavors muy marcados, recomendación revisar procesos de fermentación.	5/10
Total		26/50

Fuente: elaboración propia

Los descriptores organolépticos de esta cerveza fueron:

- Fenólico: presencia de sabor a especias (clavo, pimienta), humo, plástico, cloro fenólico.
- Alcoholes superiores: presencia de olor o sabor similar al del Whiskey o el Aguardiente.
- Disolvente: evidenciado en sabores a la acetona u otros disolventes y lacas.

- Agrio/ Acido: presencia de aroma y sabor agrio, parecido al vinagre.
- Levadura: presencia de sabor o aroma a pan, azufre o levadura.

A partir del análisis por medio de puntajes se evidencio un total de 26/50 lo cual corresponde a una cerveza **Buena**, presentando fallas menores, perdiendo un poco la marca del estilo.

Maestro cervecero 2. César Salcedo. En la tabla 30 se evidencia un resumen del análisis y en el anexo P se podrá encontrar el formato en su totalidad.

Tabla 30. Análisis maestro cervecero César Salcedo

	Comentarios	Puntaje
Aroma	Alcoholes superiores, butírico, cítricos, fenólico.	9/12
Apariencia	Amarillo pálido, carbonatación tenue, buena remanencia de espuma	3/3
Sabor	Acido medio, frutal cítrico, un poco dulzón	17/20
Sensación en la boca	Cuerpo medio, apropiado, carbonatación alta.	4/5
Impresión general	Controlar el butírico y la carbonatación con un mayor tiempo de maduración puede mejorar.	8/10
Total		41/50

Fuente: elaboración propia

Los descriptores organolépticos de esta cerveza fueron:

- Esteres: presenta olor o sabor frutal o floral.
- Fenólico: presencia de sabor a especias (clavo, pimienta), humo, plástico, cloro fenólico.
- Agrio/ Acido: presencia de aroma y sabor agrio, parecido al vinagre.

A partir del análisis por medio de puntajes se evidencio un total de 48/50 lo cual corresponde a una cerveza **Excelente**, siendo una cerveza que ejemplifica bien el estilo, solo requiere ajustes menores.

Maestro cervecero 3. Juan Carlos Riveros. En la tabla 31 se evidencia un resumen del análisis y en el anexo Q se podrá encontrar el formato en su totalidad.

Tabla 31. Análisis maestro cervecero Juan Carlos Riveros

	Comentarios	Puntaje
Aroma	Fenoles picantes, alcoholes superiores picantes y butírico presente, leve aroma a trigo y maltas palidas.	5/12
Apariencia	Cabeza de espuma baja con poca retención, turbia de color naranja.	3/3
Sabor	Malta palida y trigo on un dulzor residual y sequedad media. Alcohol picante.	8/20
Sensación en la boca	Cuero medio con carbonatación media-alta, alcohol picante y sequedad media.	3/5
Impresión general	Es una cerveza agradable pero que necesita suavizar los dulzores y eliminar el butírico para que se facilite tomar, revisar proceso de fermentación.	6/10
Total		25/50

Fuente: elaboración propia

Los descriptores organolépticos de esta cerveza fueron:

- Fenólico: presencia de sabor a especias (clavo, pimienta), humo, plástico, cloro fenólico.
- Alcoholes superiores: presencia de olor o sabor similar al del Whiskey o el Aguardiente.
- Disolvente: evidenciado en sabores a la acetona u otros disolventes y lacas.

- Agrio/ Acido: presencia de aroma y sabor agrio, parecido al vinagre.

A partir del análisis por medio de puntajes se evidencio un total de 25/50 lo cual corresponde a una cerveza **Buena**, presentando fallas menores, perdiendo un poco la marca del estilo.

Maestro cervecero 4. Daniel Amezquita. En la tabla 32 se evidencia un resumen del análisis y en el anexo R se podrá encontrar el formato en su totalidad.

Tabla 32. Análisis maestro cervecero Daniel Amezquita

	Comentarios	Puntaje
Aroma	Inicia un aroma muy caliente del alcohol, resaltando notas fenólicas y de butírico.	9/12
Apariencia	Buena carbonatación, color ámbar con turbidez, espuma de color crema, retención alta de burbujas intensas.	3/3
Sabor	Predomina notas alcohólicas, fenólicas. Fermentación limpia, ligera sensación de burbujeo, sabor seco.	10/20
Sensación en la boca	Sensación presente por la carbonatación, sabor resaltado por el alcohol con un final dulce y seco.	1/5
Impresión general	Cumple con los parámetros de una cerveza, sería interesante ver el comportamiento con el tiempo.	5/10
Total		28/50

Fuente: elaboración propia

Los descriptores organolépticos de esta cerveza fueron:

- Fenólico: presencia de sabor a especias (clavo, pimienta), humo, plástico, cloro fenólico.
- Alcoholes superiores: presencia de olor o sabor similar al del Whiskey o el Aguardiente.

- Disolvente: evidenciado en sabores a la acetona u otros disolventes y lacas.

A partir del análisis por medio de puntajes se evidencio un total de 28/50 lo cual corresponde a una cerveza **Buena**, presentando fallas menores, perdiendo un poco la marca del estilo.

Según el análisis anterior determinado por los maestros cerveceros siendo calificada la cerveza tipo Ale obtenida por medio de la levadura aislada del fruto de ciruela, se obtiene como resultado que es una cerveza Buena, la cual le falta definir un poco el estilo presentando fallas menores. Lo descriptores que más se resaltan en esta cerveza son los alcoholes superiores y fenólicos. Se recomienda tener un proceso continuo de muestreo para así corregir las fallas presentes como el olor a butírico para llegar a tener un producto que se acomode a las necesidades del consumidor.

4.7 CARACTERIZACIÓN DE LA CERVEZA TIPO ALE EMPLEANDO LA CEPA PATRÓN

En la tabla 33 se determinarán los parámetros que se tomaron en cuenta para la caracterización de la cerveza obtenida, como la concentración de glucosa, el pH, la determinación de la densidad la cual se puede apreciar en la ilustración 17, del mismo modo se le asignó el SRM para identificar su color y finalmente la determinación del porcentaje alcohólico aproximado y el porcentaje de atenuación. Los cálculos realizados para la determinación de porcentaje alcohólico aproximado se encuentran en el anexo N y para la determinación del porcentaje de atenuación anexo Ñ.

Ilustración 17. Determinación de la densidad en la cerveza artesanal con la cepa patrón



Fuente: elaboración propia

Los resultados de los parámetros determinados en la cerveza artesanal con la cepa patrón se muestran en la tabla 33.

Tabla 33. Resultados de los parámetros determinados en la cerveza artesanal elaborada con la cepa patrón

Cepa patrón, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Parámetro	Resultados
Concentración de glucosa (g/l) inicio	0,889
Concentración de glucosa (g/l) final	0,204
pH inicial	5.3
pH final	3.88
Densidad inicial	1,068
Densidad final	1,002
Porcentaje alcohólico aprox.	8,91%
Porcentaje de atenuación	97%
SRM (valor color)	2

Fuente: elaboración propia

Tomando en cuenta la caracterización para la cerveza artesanal elaborada con la cepa patrón, *Saccharomyces cerevisiae*, se determinó que esta es una cerveza ácida, su porcentaje alcohólico aproximado es elevado, su porcentaje de atenuación indica una eficiencia del 97% por parte microorganismo para convertir los azúcares en alcoholes y por último se clasifica como una cerveza rubia, al considera que se le asignó un valor de 2 en el método de referencia para asignación de color de la bebida (SRM).

4.7.1 Análisis sensorial de la cerveza artesanal empleando la cepa patrón. En seguida se muestran los resultados del análisis sensorial realizado por los maestros cerveceros.

Análisis de la cerveza Ale, Cepa patrón. Luego de cumplir con el proceso, la cerveza generada por levadura comercial *Saccharomyces Cerevisiae*, se sometió al análisis mediante el formato Beer ScoreSheet de la organización BJCP siendo evaluada por cuatro maestros cerveceros. A continuación, se dará un resumen del análisis correspondiente por cada maestro cervecero.

Maestro cervecero 1. Juan Sebastián Rodríguez. En la tabla 34 se evidencia un resumen del análisis y en el anexo S se podrá encontrar el formato en su totalidad.

Tabla 34. Análisis maestro cervecero Juan Sebastián Rodríguez

	Comentarios	Puntaje
Aroma	De aroma a malta bajo a medio bajo con caracteres a pan oliva y miel, esteres medio a medio alto de caracteres especiados y frutal (pimienta blanca y especias)	8/12
Apariencia	De color dorado pálido traslucido con espuma blanca de buena retención.	3/3
Sabor	De sabor a malta medio a medio bajo con carácter a grano y cereal con presencia de esteres a pimienta y especias.	12/20
Sensación en la boca	De cuerpo ligero a medio con baja carbonatación y final limpio pero con sensación picante en la boca que perdura.	3/5
Impresión general	Muy buena representación del estilo, con una buena fermentación con algunos tiempos a trabajar, se recomienda revisar tiempos y cantidades y que el picante está muy presente.	7/10
Total		32/50

Fuente: elaboración propia

Los descriptores organolépticos de esta cerveza fueron:

- Fenólico: presencia de sabor a especias (clavo, pimienta), humo, plástico, cloro fenólico.

A partir del análisis por medio de puntajes se evidencio un total de 32/50 lo cual corresponde a una cerveza **Muy Buena**, presentando defectos menores.

Maestro cervecero 2. César Salcedo. En la tabla 35 se evidencia un resumen del análisis y en el anexo T se podrá encontrar el formato en su totalidad.

Tabla 35. Análisis maestro cervecero César Salcedo

	Comentarios	Puntaje
Aroma	Dulce balanceado, fenólico cítrico y agradable, semillas de cilantro	12/12
Apariencia	Buena espuma, retención excelente, carbonatación baja y brillante	3/3
Sabor	Balanceado dulce – amargo, acides baja, pimienta negra, picante exótica.	18/20
Sensación en la boca	Acido agradable, cuerpo medio, picor agradable.	5/5
Impresión general	Muy agradable, no se siente carbonatación posterior.	10/10
Total		48/50

Fuente: elaboración propia

Los descriptores organolépticos de esta cerveza fueron:

- Herbáceo: presencia de aroma y sabor a hierva recién cortada u hojas verdes.
- Levadura: presencia de sabor o aroma a pan, azufre o levadura.

A partir del análisis por medio de puntajes se evidencio un total de 48/50 lo cual corresponde a una cerveza **Excepcional**, siendo un ejemplo de clase mundial del estilo Ale.

Maestro cervecero 3. Juan Carlos Riveros. En la tabla 36 se evidencia un resumen del análisis y en el anexo U se podrá encontrar el formato en su totalidad.

Tabla 36. Análisis maestro cervecero Juan Carlos Riveros

	Comentarios	Puntaje
Aroma	Fenoles y esteres medio-altos con toques cítricos a naranja y pimienta, leve aroma a malta pálida y trigo.	8/12
Apariencia	Amarillo pálido con turbidez media, cabeza mediana con baja retención.	3/3
Sabor	Malta pálida y trigo con un dulzor medio que es balanceado por las especias. Alcohol un poco picante con un final a pimienta roja y toque agresivo.	10/20
Sensación en la boca	Cuerpo medio, carbonatación media-alta, calor por alcohol y especias.	4/5
Impresión general	Buena interpretación, la adición de la pimienta roja resulta un poco fuerte y mata sutilidad de las otras especias, le quita balance a la cerveza.	6/10
Total		31/50

Fuente: elaboración propia

Los descriptores organolépticos de esta cerveza fueron:

- Esteres: presenta olor o sabor frutal o floral.
- Fenólico: presencia de sabor a especias (clavo, pimienta), humo, plástico, cloro fenólico.

A partir del análisis por medio de puntajes se evidencio un total de 48/50 lo cual corresponde a una cerveza **Muy buena**, generalmente dentro de los estilos, presentando efectos menores.

Maestro cervecero 4. Daniel Amezcua. En la tabla 37 se evidencia un resumen del análisis y en el anexo V se podrá encontrar el formato en su totalidad.

Tabla 37. Análisis maestro cervecero Daniel Amezcuita

	Comentarios	Puntaje
Aroma	La adiciones de especias, seguido de las maltas y un agradable final de lúpulo.	10/12
Apariencia	Color dorado intenso, retención media baja, buena carbonatación.	3/3
Sabor	Sabor maltoso que combina y juega con las especias y deja un final refrescante.	10/20
Sensación en la boca	Sensación sedosa y ligera, final seco.	4/5
Impresión general	Un poco picante, la pimienta no me permite jugar con la amplitud de opciones de maridaje.	8/10
Total		35/50

Fuente: elaboración propia

Los descriptores organolépticos de esta cerveza fueron:

- Esteres: presenta olor o sabor frutal o floral.
- Fenólico: presencia de sabor a especias (clavo, pimienta), humo, plástico, cloro fenólico.
- Herbáceo: presencia de aroma y sabor a herva recién cortada u hojas verdes.
- Levadura: presencia de sabor o aroma a pan, azufre o levadura.

A partir del análisis por medio de puntajes se evidencio un total de 35/50 lo cual corresponde a una cerveza **Muy buena**, generalmente dentro de los estilos, presentando defectos menores.

Como se puede observar en los formatos anteriormente diligenciados la cerveza proveniente de la cepa patrón es clasificada dentro de cervezas tipo Ale, con una calificación Muy Buena, presentando defectos menores, con unos descriptores organolépticos en su mayoría a Esteres, Herbáceos con presencia de sabor a especias en especial la pimienta.

5. CONCLUSIONES

- Teniendo en cuenta los resultados de la matriz de decisión realizada para seleccionar los frutos que fueron utilizados para el proceso de aislamiento de levaduras, se determinó que las frutas adecuadas para este fin eran ciruela, maracuyá y guayaba, ya que estas contaban con un porcentaje de sólidos solubles de 18% para la ciruela y maracuyá, 12% para la guayaba, siendo estos mayores respecto a otras frutas como la mora la cual contaba con el 5%, la gulúpa con un 10.2% y el melón con un 11%.
- La diferenciación entre cepas tipo *Saccharomyces* y *No Saccharomyces* por medio del uso de agar Lisina no fue definitiva, por lo cual fue necesario el uso de agar sabouraud con cicloheximida, para determinar por resistencia cuales podrían corresponder a *Saccharomyces*, además de la caracterización de la morfología macroscópica y microscópica, seleccionando las cepas N, P y A provenientes de maracuyá y las cepas L y D provenientes de ciruela, como las cepas más cercanas al género *Saccharomyces* de forma cualitativa.
- Las cepas N, P, A, L y D fueron sometidas a pruebas de identificación bioquímica API 20 C AUX, lo cual determinó que las cepas N, P y D pertenecen al género *Cándida tropicalis* y las cepas L y A al género *Geotrichum candidum*.
- Fueron analizados los perfiles de fermentación de las cepas previamente seleccionadas (N, P y D) y bajo un análisis estadístico (ANOVA) se encontró que no hay diferencias significativas entre las tres cepas, a partir del consumo de glucosa.
- La selección de la cepa D se realizó a través de estadística descriptiva pues presentó un menor valor de la media estadística, y experimentalmente consumió el 54% de la glucosa disponible en el mosto al cabo de 96 horas, frente a un consumo de glucosa de tan solo el 20 y 28% para las cepas N y P respectivamente, para las mismas horas de fermentación.
- Las pruebas pre experimentales de fermentación para la elaboración de una cerveza con la cepa D y la cepa patrón *Saccharomyces cerevisiae*, evidenciaron similitud en el valor de pH de 3.9 y atenuación con valores de 93% y 97% respectivamente, y diferencias en los tiempos de consumo de glucosa, ya que el 82% de esta, fue consumido en 144 horas para la cepa D y 24 horas para la cepa patrón.
- Se elaboró una cerveza tipo Ale con la cepa D y otra con la cepa patrón, las dos cervezas fueron evaluadas sensorialmente bajo el formato de la BJCP, obteniendo una valoración como “Buena” (27/50) para la cepa D y “Muy buena” (36/50) para la cepa patrón, sin embargo, la cerveza elaborada con

la cepa D, a partir de los descriptores organolépticos presento sabor y olor frutal y floral.

6. RECOMENDACIONES

- Implementar métodos moleculares para la identificación del género de las cepas aisladas.
- Realizar un estudio de las características metabólicas de *Cándida tropicalis* en mostos cerveceros.
- Realizar hidrólisis de los azúcares complejos tales como maltosa y maltotriosa presentes en el mosto, para establecer la totalidad de los azúcares fermentables.
- Experimentar con las otras dos cepas A y L para determinar si son aptas para emplearse en los procesos de fermentación.
- Prolongar los tiempos de fermentación para el análisis estadístico basado en el consumo de azúcares.
- Realizar un seguimiento del proceso de maduración y filtración de la cerveza elaborada con la cepa D.
- Evaluar el proceso de fermentación teniendo en cuenta condiciones de operación como temperatura y presión.
- Teniendo en cuenta el carácter de levadura salvaje de la cepa aislada se recomienda hacer una caracterización y cuantificación de compuestos propios del metabolismo de estos microorganismos (ácido fenólico y butírico).

BIBLIOGRAFIA

ABHISHEK, R. U. et al. Artificial ripening of fruits misleading ripe and health risk. [en línea]. En: Everyman's Science. February 16. Vol.6. Pág. 364- 369. [Consultado: 15 febrero 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Abhishek_Umesh4/publication/326207587_Artificial_ripening_of_fruits-misleading_ripe_and_health_risk/links/5b3e125c0f7e9b0df5f4bac3/Artificial-ripening-of-fruits-misleading-ripe-and-health-risk.pdf.

ACOSTA, Carolina. Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel. Tesis de investigación Magíster en Ingeniería Química. Bogotá D.C. Universidad Nacional de Colombia. 2012. p 144. [Consultado 25 julio 2018]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/9933/1/300060.2012.pdf>.

ARTIGAS Florencia y MACHADO Virginia. Aislamiento, Selección e identificación de levaduras nativas con propiedades enológicas en uvas Tannat. Título de Licenciado en Biotecnología. Universidad ORT Uruguay. 2017. p. 50. [consultado 25 febrero 2019]. Disponible en: <https://bibliotecas.ort.edu.uy/bibid/86672/file/4521>.

ÁVILA, Itzayana. Estudio experimental para la obtención de azúcares reductores a partir de la vaina de pisum sativum L. (arveja) mediante hidrólisis en agua súper crítica. Trabajo de grado Ingeniero Ambiental y Sanitario. Bogotá D.C.: Universidad de la Salle, 2016. Facultad de Ingeniería. Programa de ingeniería ambiental y sanitaria. p. 24. [Consultado 20 junio 2018]. Disponible en: <http://repository.lasalle.edu.co/handle/10185/18459>.

BEER SCORESHEET. Sanctioned Competition Program. En: Certification Beer Judge Program. [sitio web]. [consultado: 19 junio 2019]. Archivo pdf. Disponible en: <http://www.bjcp.org>.

BERG, Jeremy. STRYER, Lubert y TYMOCZKO, John. Transducción y almacenamiento de la energía. [En línea] En: Bioquímica con aplicaciones clínicas. 7 ed. Barcelona, España. Reverté, 2008. p 1050. [Consultado 18 julio 2018]. Disponible en: <http://www.libreriaherrero.es/pdf/REVE/9788429176025.pdf>. ISBN: 978-84-291-7602-5.

BUMS, Ralph. Mediciones fundamentales. [En línea] En: Fundamentos de la química. 5ta edición Pearson Educación, México, 2011. p. 60-63. [Consultado 1 septiembre 2018]. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=9K5qtyKHoUwC&pg=PA35&dq=BURNS,+Ralph.+Mediciones+fundamentales&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjp2ontlYDIAhXStIkKHd6FB0IQ6AEIKTAA#v=onepage&q=BURNS%2C%20Ralph.%20Mediciones%20fundamentales&f=false>

CAMPBELL, Mary. FARRELL, Shawn. La Glucolisis. [En línea]. En: Bioquímica. 4 ed. México. Thomson 2004. p 725. [Consultado 1 agosto 2018]. ISBN: 970-686-335-4.

CARRILLO, Leonor y AUDISIO, Carina. Frutas y hortalizas. [en línea]. En: Manual de Microbiología de los Alimentos. Argentina: Alberdi.2007. p .191. [Consultado: 15 febrero 2019]. Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/0%20portada%20manual.pdf>. ISBN 978-987-05-3214-9.

CASAS, Aarón. et al. Importancia de las levaduras no Saccharomyces durante la fermentación de bebidas alcohólicas [En línea]. En: Investigación y ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Mayo- agosto. 2015. Vol. 23. p.73-79. [Consultado 18 octubre 2018]. ISSN 1665-4412. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67443217010>.

CHORNIK, Jeff. Wild Yeast: The Pros and Cons of Spontaneous Fermentation. [En línea]. En: Wine marker creating you own great wines. Manchester, 2019. P. 1. [Consultado 17 agosto 2019] Disponible en: <https://winemakermag.com/contact>.

CUEVA, Estrella, ORTIZ, Angela y TORRES, Antony. Composición química y comportamiento fisicoquímico de los principales constituyentes del maíz y cebada. Documento de consulta. Universidad Nacional del Santa. 2014. P. 69. Disponible en: <https://es.slideshare.net/vegabner/exposicin-cebada-y-maiz>.

COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. DECRETO 1686 de 2012. Por el cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que se deben cumplir para la fabricación, elaboración, hidratación, envase, almacenamiento, distribución, transporte, comercialización, expendio, exportación e importación de bebidas alcohólicas destinadas para consumo humano. En: Diario Oficial, Agosto, 2012.Nro. 48517. p.6.

DELOST, Maria. Identification. [en línea]. En: Introduction to diagnostic microbiology for the laboratory sciences. Youngstown: Jones & Bartlett learning. 2015. p. 559. [Consultado 23 mayo 2019]. Disponible en: https://books.google.com.co/books?id=GS_FDAAAQBAJ&pg=PA193&dq=lysine+agar+decarboxylation+and+deamination+of+the+amino+acid+lysine&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjp7_aa5NjkAhVGwFkKHZrRBxEQ6AEIKDAA#v=onepage&q=lysine%20agar%20decarboxylation%20and%20deamination%20of%20the%20amino%20acid%20lysine&f=false. ISBN. 978-1-284-03231-4.

DÍAZ, Abel. Principios del diseño de experimentos. [En línea] En: Diseño estadístico de experimentos. 2 ed. Medellín. Editorial Universidad de Antioquia 2009. p. 6. [Consultado 1 septiembre 2018]. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=0x0DW6dNiyAC&pg=PA8&dq=Principios+del+dise%C3%B1o+de+experimentos.&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi3w8jMjPLkAhXQTd8KHfqED4MQ6AEIMzAC#v=onepage&q=Principios%20del%20dise%C3%B1o%20de%20experimentos.&f=false>. ISBN 978-958-714-264-8.

DIETER, Simon. Spontaneous Fermentation – What’s It All About? [En línea]. En: Weinjournal mit Weinführer. Octubre, 2011. P 1-2. [Consultado 12 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.bonvinitas.com/en/>

Doctor of Philosophy En: The University of Manchester. 2016.Pag 32-36. [Consultado 9 enero 2019]. Disponible en: https://www.research.manchester.ac.uk/portal/files/FULL_TEXT.

DOMENE, Miguel . SEGURA, Marilió. Paramrtos de calidad interna de hortalizas y frutas en la industria agroalimentaria. En: Ficgas de transferencia. [sitio web]. España. [Consultado: 24 octubre 2019] Archivo pdf. Disponivble en: <http://chilorg.chil.me/download-doc/86426.P.1>.

EL DORADO (LUPULO). Enciclopedia de la cerveza. En: Birrapedia. [Sitio web]. Estados Unidos. [Consultado: 30 septiembre 2019]. Disponible en: <https://birrapedia.com/enciclopedia-de-la-cerveza/el-dorado--lupulo-/e>.

ESPITIA, Lady Carolina. Determinación de la concentración de alfa y beta amilasas comerciales en la producción de etanol a partir de almidón de cebada empleando *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de grado Microbióloga Industrial. Bogotá D.C. Pontificia Universidad Javeriana.2009. p.114. [Consultado 15 septiembre 2018]. Disponible en: <https://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis206.pdf>

GARCÍA, Jorge. Distribución de bacterias contaminantes de cerveza *lactobacillus* y *pediococcus* en el ambiente de elaboración de cerveza. Doctor en ciencias con orientación en biotecnología. Universidad autónoma de Nuevo León. 2017. p.49. [Consultado: 17 enero 2019]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/13964/1/1080218472.pdf>.

GARIBAY, Mariano. RAMIREZ, Rodolfo y LÓPEZ Agustín. Alimentos y bebidas fermentados tradicionales. [en línea]. En: biotecnología alimentaria. 5 ed. México: Limusa S.A. 2004. p 617. [consultado 15 diciembre 208]. Disponible en: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/tvolke/Biotecnologia_Alimentaria-Libro.pdf. ISBN.968-16-4522-6.

GONZALES, Magali. Evaluación de la persistencia de levaduras *Saccharomyces* en viñedos de la zona alta del Río Mendoza. Licenciatura en Bromatología. Estación Experimental Agropecuaria Mendoza – INTA. 2015. p. 55. [Consultado: 30 junio 2019]. Disponible en: http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/6714/tesis-gonzalez-magali.pdf.

GONZALEZ, Leos. et al. Evaluación de levaduras nativas productoras de etanol presentes en el bagazo de caña de azúcar. [En línea]. En: CienciaUAT. Enero-junio, 2017, vol. 11, p. 82. [Consultado 12 junio 2019]. ISSN. 2007-7521. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=441949672006>.

GONZÁLEZ Marcos. Ingredientes. En: Principios de Elaboración de cervezas artesanales. Morrisville, carolina del norte USA, Lulu Enterprises. – Lulu Press Inc. p 49-97. ISBN 978-1-365-67284-2

Guía de buenas prácticas de producción, distribución y comercialización para la cerveza artesanal de calidad. En: Brewers Association. [Sitio web]. [Consulado: 10 noviembre 2018]. Archivo pdf. Disponible en: https://s3uswest2.amazonaws.com/brewersassoc/wpcontent/uploads/2017/04/Best_Practices_Guide_To_Quality_Craft_Beer_Spanish.pdf.

GUTIÉRREZ, José. Alteración de origen microbiano. [en línea]. En: Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos. Madrid: Díaz de Santos S.A, 2000. p. 355. [Consultado 27 noviembre 2018]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/DesireSomale/ciencia-bromatologica-principiosgeneralesdelosalimentosmedilibrocom>. ISBN. 978-84-7978-447-8.

HERNANDEZ, Alicia. Las Fermentaciones. [En línea]. En: Microbiología Industrial. Costa Rica: EUNED, 2003. p. 296. [Consultado 14 noviembre 2018]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&sitesec=reviews&rview=1&rf=ns:0&hl=es-419&lr=&sa=N&start=20>. ISBN: 978-9968-31-255-4.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. Compendio de normas para trabajos escritos. NTC 1486-6166. Bogotá D.C.: El instituto, 2018. ISBN 9789588585673 153p.

_____. Bebidas alcohólicas. Cervezas. NTC 3854. Bogotá D.C.: El instituto, 2018.

INSUMOS DE CERVEZA. Materias primas .En: cocinista [sitio web]. [Consultado: 15 junio 2019]. Disponible en:<https://www.cocinista.es/web/es/enciclopedia-cocinista/maltas-y-lupulos/malta-de-trigo.html>.

INSUMOS DE CERVEZA. Materias primas. En: Distrines. [sitio web]. [Consultado: 15 agosto 2019]. Disponible en: <http://distrines.com/maltas/7/malta-trigo>.
KNIGHT, Sarah y GODDARD, Matthew. Quantifying separation and similarity in a *Saccharomyces cerevisiae* metapopulation. [en línea]. En: The ISME Journal Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology. July,2014. Vol.9. p. 361–370. [Consultado 24 marzo 2019]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/ismej2014132>. ISSN 1751-7370.

KUNSE, Wolfgang. Maceración. [en línea]. En: Tecnología para cerveceros y malteros. Berlín, Alemania. VLB,2006. P. 246. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/302896602/Tecnologia-para-cervecedores-y-malteros-Kunze-tomo-2>. ISBN. 3921690544.

LAHOZ, Rafael, ORTEGA, J. y FERNANDEZ, C. Métodos estadísticos. [en línea]. En: Métodos estadísticos en Biología del comportamiento. Madrid, España: Editorial COMPLUTENSE, 1994. p 101. [Consultado 5 septiembre 2018]. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=kvXSoAGJylwC&printsec=frontcover&dq=M%C3%A9todos+estad%C3%ADsticos+en+Biolog%C3%ADa+del+comportamiento&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi3o8PvjfLkAhUBbq0KHdyjBoYQ6AEIKTAA#v=onepage&q=M%C3%A9todos%20estad%C3%ADsticos%20en%20Biolog%C3%ADa%20del%20comportamiento&f=false>. ISBN 84-7491512-0.

LINARES, María y SOLIS, Francisco. Identificación de levaduras. [en línea]. En: Revista Iberoamericana de Micología. España: 2007.Asociacion española de micología. p. 20. [Consultado 15 julio 2019]. Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf>. ISBN: 978-84-611-8776.

LOPEZ, Luis. et al. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. [En línea]. En: investigación en discapacidad. Enero-marzo 2014. Vol.3. p.10-18. [Consultado: 18 abril 2019].Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b.pdf>.

MAIO Di, *et al.* A Method to Discriminate Between the *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* in Mixed Fermentation on WLD and Lysine Agar Media. [en línea]. En: Instituto Regionale della Vite e del Vino.June- August. 2010.Vol.32. p.35-41. [Consultado: 7 marzo 2019]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/220007334> A method to discriminate between the *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* species in mixed fermentation on WLD and Lysine Agar media.

MANSFIELD, Anna y TAHIM, Camila. Spontaneous Fermentations [En línea]. En: Wines Vines Analytics. April. 2016, p 1-2. [Consultado 5 agosto 2019]. Disponible en: <https://winesvinesanalytics.com/features/article/168028/Spontaneous-Fermentations>.

MARISCAL, Juan. Evaluación y selección de microorganismos para la producción de etanol a nivel industrial. Magister en ingeniería química. Universidad Nacional de Colombia. 2011. p.79. [Consultado 15 abril 2019]. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/4791/1/8108502.2011.pdf>.

MAXIMILIAN, Michel. Et al. Pure non- Saccharomyces started cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. [en línea]. En: Institute of Brewing & Distiling. September, 2016. p. 569-587. [Consultado 4 septiembre 2019]. ISSN. 122: 569–587. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jib.381>.

MEASURING THE COLOUR OF BEER – SRM AND EBC METHODS. En: Jenway spectrophotometer. [sitio web]. [Consultado: 28 septiembre 2019]. Archivo pdf. Disponible en: <http://www.jenway.com/adminimages/Spectrophotometers Measuring the colour of beer.pdf>.

MENDEZ José y BRICEÑO Aleida. Aspectos microbiológicos. [en línea]. En: Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas. Caracas, Venezuela: EQUINOCCIO, 2006. p 343. [Consultado 15 febrero 2019]. Disponible en: https://books.google.com.co/books?id=r7y3XuFAB8UC&pg=PR2&lpg=PR2&dq=MENDEZ+BARREIRO+Jos%C3%A9+A.++Aspectos+microbiol%C3%B3gicos.&source=bl&ots=VPTKpovUgt&sig=ACfU3U2NMJdBweFGDPsqE_FsMBrHC7g48A&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjI2L3s7ODkAhWjiOAKHUAZB_kQ6AEwBXoECAkQAQ#v=onepage&q=MENDEZ%20BARREIRO%20Jos%C3%A9%20A.%20%20Aspectos%20microbiol%C3%B3gicos.&f=false. ISBN. 980-237-210-2.

MONTGOMERY, Douglas. Diseño y análisis de experimentos. 2 ed. México: Limusa Wiley, 2002. p. 15. ISBN 9681861566.

MULLER, Ludwig. Fermentación alcohólica. Manual de laboratorio de fisiología vegetal. [En línea]. En: Manual de laboratorio de fisiología vegetal. 1 ed. Turrialba, Costa Rica. 1964.p 165. [Consultado 20 junio 2018]. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=9I8gAQAAIAAJ&printsec=frontcover&dq=manual+de+laboratorio+de+fisiologia+vegetal+muller&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiA7KnIwt3kAhXCzVkJHbHfC5UQ6AEIKDAA#v=onepage&q=manual%20de%20laboratorio%20de%20fisiologia%20vegetal%20muller&f=false>

NAGODAWITHANA, Tilak. Recent Developments. [en línea]. En: Yeast Technology. Copyright. 1991. p. 446. [Consultado 15 junio 2018]. Disponible en: https://books.google.com.co/books?id=zvrOBgAAQBAJ&pg=PA141&dq=Lysine+agar+culture+medium&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiGnr-j4NjkAhWStlkKHeTdD_gQ6AEIaDAI#v=onepage&q=Lysine%20agar%20culture%20medium&f=false. ISBN 978-94-011-9773-1.

NAUMOV, G. I; GAZDIEV, D.O and NAUMOVA, E.S. The Finding of the Yeast Species *Saccharomyces bayanus* in Far East Asia. [en línea]. En: Translated from Mikrobiologiya .June, 2003. Vol. 72. p. 834–839. [Consultado 16 abril 2019]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/226155700> The Finding of the Yeast Species *Saccharomyces bayanus* in Far East Asia.

OCÓN, María. Diversidad de levaduras no- *Saccharomyces*. en diferentes ecosistemas vitivinícolas. Tesis doctoral. Universidad de la Rioja. 2014. p.177. [consultado 12 julio 2019]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/tesis>

PALMER, Jhon. How To Brew. Everithing You Need to Know to Brew Great Beer Every Time. [en línea]. En: Brewers Publications. 2006, Apéndice A. p.201. [Consultado: 23 marzo 2019]. Disponible en: <https://www.doc-developpement-durable.org/file/Fabrications-Objets-Outils-Produits/bieres/53735499-How-to-brew-John-Palmer-Espanhol.pdf>.

PARRA, Ricardo. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. [En línea]. En: Facultad de ciencias agropecuarias. Enero-junio, 2010, vol. 8, p. 93. [Consultado 10 julio 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>.

PEREZ, E. *et al.* Caracterización fermentativa de las levaduras productoras de etanol a partir de jugo de Agave cupreata en la elaboración de mezcal. [En línea]. En: Revista Mexicana de Ingeniería Química. Diciembre, 2013. Vol. 12, No. 3. Pág. 451-461. [Consultado 15 abril 2019] ISSN. 1665-2738. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62029966008>.

RAMÍREZ José. *et al.* Bacterias lácticas importancia: en alimentos y sus efectos en la salud. Unidad académica de medicina veterinaria y zootecnia. [en línea]. En: Universidad Autónoma de Nayarit. Abril-junio, 2011.p. 16. [consultado 14 noviembre 2018]. ISSN. 2007-0713. Disponible en: <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>

REGODÓN, José. Obtención y caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la elaboración estandarizada de vinos de calidad. Universidad de Extremadura. p. 323. [Consultado 4 febrero 2019]. Disponible en: <http://biblioteca.unex.es/tesis/8477236496.PDF>.

REZENDIS, Rios, *et al.* Aprovechamiento de levadura enológicas nativas no-*Saccharomyces* para su uso como agentes fermentativos en elaboración de cerveza artesanal. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 2018. P. 96. [Consultado: 23 marzo 2019]. Disponible en: <https://repositorio.unam.mx/contenidos/107764>.

ROBINSON, Heather. The geographic distributions of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*, and the potential to detect past yeast populations with ancient DNA.

ROMERO, Carolina. Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel. Tesis de investigación Magíster en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. 2012. 31 p. [consultado 15 diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.bdiqital.unal.edu.co/9933/1/300060.2012.pdf>.

RESOLUCION DE 2011. Ministerio de salud y protección social. Disponibles. [Sitio web]. EL MINISTERIO DE LA PROTECCION SOCIAL. [Consultado 24 octubre 2019]. Disponible en: https://members.wto.org/crnattachments/2011/tbt/COL/11_2297_00_s.pdf

SALAZAR, Ivan y VILLAMIZAR, Jorge. Evaluación de la obtención de bioetanol partiendo de la fermentación de los azúcares concentrados en las bebidas gaseosas carbonatadas vencidas por medio de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de grado. Fundación Universidad de América, 2019. P. 252. [Consultado: 14 abril 2019]. Disponible en: <http://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/7404>.

SANCHO, Ruben. Diseño de una micro- planta de fabricación de cerveza y estudio de técnicas y procesos de producción. Trabajo de grado. Universidad Politécnica de Catalunya. 2015. P. 120. [Consultado 15 marzo 2019]. Dispñible en: https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/76575/02_Memoria.pdf?sequence=5&isAllowed=y

SIGMA- ALDRICH. Product information cycloheximide solution (Actidion solution). [En línea] [consultado 6 junio 2019]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/us-export.html>

Silva Ramírez, M., Huayama Soplá, P. M., & Izquierdo Pacheco, María. Elaboración de bebida alcohólica de *Inga feuillei* “guaba” suplementado con panela y fermentado con *Saccharomyces cerevisiae*. [En línea]. En: Conocimiento para el Desarrollo, Revista oficial de investigación científica. Julio-Diciembre, 2015. Vol. 6, No. 2. Pág. 90. [Consultado 15 junio 2019] ISSN. 2225-0794. Disponible en: <https://revista.usanpedro.edu.pe/index.php/CPD/article/view/83>

SOMARRIBA, Adner y ROSTRAN, Julio. Estudio comparativo de cervezas de consumo nacional en relación a sus parámetro fisicoquímicos y sensoriales. Monografía al título de licenciado en química. Nicaragua-León. Universidad

Nacional Autónoma. 2006. p. 79. [consultado: 15 diciembre 2018] Disponible en: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/4449/1/200086.pdf>.

SUÁREZ, Caridad. GARRIDO, Antonio y GUEVARA, Carmen. Levadura *Saccharomyces Cerevisiae* y la producción de alcohol. [en línea]. En: Instituto cubano de investigaciones sobre los derivados de la caña de azúcar ICIDCA. Enero-Abril, 2016, vol. 50. p. 20-28. [consultado 22 enero 2019]. ISSN. 0138-6204. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420004>.

SUAREZ, María. Cerveza: componentes y propiedades. Master universitario en biotecnología alimentaria. Oviedo. Universidad de Oviedo. Julio, 2013. p.88.[consultado: 3 diciembre 2018] Disponible en: http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/19093/8/TFM_%20Maria%20Suar ez%20Diaz.pdf.

URIBE, Liz. Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. 2007.p. 37. [Consultado 25 septiembre 2019]. Disponible en: <https://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis276.pdf>.

URZÚA. Evarito. Cepa de *Candida tropicalis* y su uso en proceso de fermentación de mezclas de azúcares para la producción de alcohol. En: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. [sitio web]. [Consultado 22 agosto 2019]. Archivo pdf. Disponible en: <https://ciatej.mx/patentes/35%20esp.pdf>.

VARGAS Jorge. Aislamiento de una cepa nativa *Saccharomyces sp.* y determinación de los parámetros en la fermentación de la chica de jora. Tesis para título de ingeniero agroindustrial. Abancay. Escuela académico profesional de ingeniería agroindustrial. 2010. 39 p. [consultado 13 noviembre 2018]. Disponible en: <http://repositorio.unamba.edu.pe/handle/UNAMBA/330>.

VEGA, Melvys. Bacterias del Ácido Láctico un Potencial para la Producción de Alimentos Probióticos Fermentados en la Industria Láctea de Panamá. [En línea]. En: Science and Technology Conference . Febrero, 2018. p. 38-47. [Consultado 8 mayo 2019]. Disponible en: <https://knepublishing.com/index.php/KnE-Engineering/article/view/1411/3426>.

VOIGT, Jens. WEYERMANN, Thomas y RICHTER, Andreas. A New Approach to Malt Flavor Characterisation. En: Weyermann ® Specialty Malts. [Sitio web]. Luxemburg. [Consultado: 26 septiembre 2019]. Archivo pdf. Disponible en: http://www.agraria.com.br/extranet/arquivos/agromalte_arquivo/roda_de_aromas_weyermannr_malt_aroma_wheelr_ing.pdf.

ANEXOS

ANEXO A

FICHA TÉCNICA CALDO SABOURAUD DEXTROSE BROTH



Technical Data

Sabouraud Dextrose Broth (Sabouraud Liquid Medium)

M033

Intended Use:

Sabouraud Dextrose Broth (Sabouraud Liquid Medium) is used for cultivation of yeasts, moulds and aciduric microorganisms.

Composition**

Ingredients	Gms / Litre
Dextrose (Glucose)	20.000
Peptone, special	10.000
Final pH (at 25°C)	5.6±0.2

**Formula adjusted, standardized to suit performance parameters

Directions

Suspend 30.0 grams in 1000 ml distilled water. Heat if necessary to dissolve the medium completely. Sterilize by autoclaving at 15 lbs pressure (121°C) for 15 minutes. Mix well and dispense as desired.

Principle And Interpretation

Sabouraud Dextrose Agar is Carriers modifications (1) of the formulation described by Sabouraud (2) for the cultivation of fungi, particularly those associated with skin infections. The medium is also recommended by APHA (3). Sabouraud Dextrose Broth is also a modification by Sabouraud (4) and serves the same purpose as Sabouraud Dextrose Agar. Medium 3.

Sabouraud dextrose media are peptone media supplemented with dextrose to support the growth of fungi. Peptone(meat and casein) provides nitrogen, vitamins, minerals, amino acids and growth factors. Dextrose provides an energy source for the growth of microorganisms. The low pH favours fungal growth and inhibits contaminating bacteria from clinical specimens (5). The acid reaction of the final medium is inhibitory to a large number of bacteria making it particularly useful for cultivating fungi and aciduric microorganisms. For isolation of fungi from contaminated specimens, a selective medium should be inoculated simultaneously. Incubate cultures for 4 to 6 weeks before reporting as negative.

Type of specimen

Clinical : skin scrapings; Pharmaceutical samples

Specimen Collection and Handling

For clinical samples follow appropriate techniques for handling specimens as per established guidelines (7,8).

For food and dairy samples, follow appropriate techniques for sample collection and processing as per guidelines (6,3).

After use, contaminated materials must be sterilized by autoclaving before discarding.

Warning and Precautions

In Vitro diagnostic use only. Read the label before opening the container. Wear protective gloves/protective clothing/ eye protection/face protection. Follow good microbiological lab practices while handling specimens and culture. Standard precautions as per established guidelines should be followed while handling clinical specimens. Safety guidelines may be referred in individual safety data sheets.

Limitations

Since it is a general purpose medium, bacterial cultures will also grow .
Further isolation and biochemical tests should be carried out for onfirmation.

Please refer disclaimer Overleaf.

Performance and Evaluation

Performance of the medium is expected when used as per the direction on the label within the expiry period when stored at recommended temperature.

Quality Control

Appearance

Cream to yellow homogeneous free flowing powder

Colour and Clarity of prepared medium

Light amber coloured clear solution in tubes

Reaction

pH of 3.0% w/v aqueous solution at 25°C. pH : 5.6±0.2

pH

5.40-5.80

Cultural Response

Cultural characteristics was observed after an incubation at 20-25°C for 3-5 days.

Organism	Inoculum (CFU)	Growth
Cultural Response		
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (00054*)	50 -100	luxuriant
<i>Candida albicans</i> ATCC 2091 (00055*)	50 -100	luxuriant
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 (00053*)	50 -100	luxuriant
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 (00058*)	50 -100	luxuriant
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 2601	50 -100	good-luxuriant
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (00012*)	50 -100	Luxuriant (inhibited on media with low pH)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (00013*)	50 -100	good-luxuriant
<i>Escherichia coli</i> NCTC 9002	50 -100	Luxuriant (inhibited on media with low pH)
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	50 -100	luxuriant

Key : *Corresponding WDCM numbers.

Storage and Shelf Life

Store below 30°C in a tightly closed container and the prepared medium at 15-25°C. Use before expiry date on the label. On opening, product should be properly stored dry, after tightly capping the bottle in order to prevent lump formation due to the hygroscopic nature of the product. Improper storage of the product may lead to lump formation. Store in dry ventilated area protected from extremes of temperature and sources of ignition Seal the container tightly after use. Use before expiry date on the label. Product performance is best if used within stated expiry period.

Disposal

User must ensure safe disposal by autoclaving and/or incineration of used or unusable preparations of this product. Follow established laboratory procedures in disposing of infectious materials and material that comes into contact with clinical sample must be decontaminated and disposed of in accordance with current laboratory techniques (7,8)

Reference

1. Cartier G. I. M., 1984, Brit. J. Derm. Syph., 60:61
 2. Sabouraud R., 1892, Ann. Dermatol. Syphil. 3 : 1061.
 3. Downes F. P. and Ito K., (Eds.), 2001, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed., APHA, Washington, D.C.
-

Please refer disclaimer Overleaf.

ANEXO B

FICHA TÉCNICA AGAR SABOURAUD CON CLORANFENICOL



Reference: 064-PR0003 Scharlau Microbiology - Technical Data Sheet

Product: **SABOURAUD CHLORAMPHENICOL AGAR**

Specification

Solid culture medium for the isolation of fungi.

Presentation

30 Prepared Contact Plates - Irradiated
Contact Plates - Double Wrapping
with: 14 ± 1 g

Packaging Details

1 box with 5 blisters (base of aluminium, PVDC and double wrapping) with 6 contact plates/blister
Every blister exhibits an irradiation indicator

Composition

Formula in g/l

Casein peptone.....	5,0
Meat peptone.....	5,0
D(+)-Glucose.....	40,0
Chloramphenicol.....	0,05
Agar.....	15,0

Final pH 5.6 ± 0,2 at 25°C

Description

This culture medium differs from the classical Sabouraud Agar only by the addition of chloramphenicol. This thermostable antibiotic has a broad antibacterial spectrum which ensures the selective isolation of fungi from highly contaminated samples, such as exudates, faeces, nails and hair.

Usage instructions

Contact plates are used in the microbiological control of disinfection and cleaning of surfaces. It acts simultaneously as a sampler and incubation culture medium without the need for any other intermediate steps.
The plates come in a form appropriate for this function and can be used with different culture media depending on the type of microbe that needs to be controlled. On average the plates provide a contact surface of approximately 25 cm².
To use, remove the cover and gently press the culture medium on the surface to be controlled, ensuring contact between the two surfaces. The Contact plate is removed and covered with the lid to prevent air contamination. It is advisable that the lid is secured with adhesive tape and the bottom labelled with the sampling data (place, date and time). The inoculated plates are incubated at 30-35 ° C for 24-48 hours and examined daily. For fungi, the incubation is carried out at 20-25 ° C for 5 days and examined daily.
If the sample surfaces are rough, the Contact plates will not make good contact, even when the pressure is increased. In these cases it is advisable to delineate an sample surface area of 25 cm squared and rub this area vigorously with a wet sterile swab and then rub the swab over the Contact plate.
If verifying the effectiveness of a cleaning or disinfection process, Contact plates should be used within two hours after the end of the process, ensuring that the sample surface is dry. It is advisable to always include positive controls, sampling the area before disinfection or dirty areas beside the disinfected area.
The technician will determine the frequency of sampling and disinfection according to performance criteria.

Quality control

Color : Straw-coloured yellow pH: (at 25 °C) 5,6 ± 0,2

Incubation temperature: 20-25°C

Incubation time: 48 h-5 days

Inoculum: 10-100 CFU (Productivity) // 1.000-10.000 CFU (Selectivity). Spread Plate Technique

Microorganism	Growth	Remarks
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Inhibited	Selectivity
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Inhibited	Selectivity
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Productivity > 0.70	Growth & black sporulation
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Productivity > 0.70	-

Sterility Control

No growth within 48 h and 7 days at 20-25°C and 30-35°C

Storage/Shelf Life

Shelf Life	Storage
7 months	8-25°C

ANEXO C FICHA TÉCNICA AGAR LISINA

Britania[▲]

REF B0210605 REF B0210606

Lisina Hierro Agar

IVD

USO

Medio de cultivo utilizado para diferenciar microorganismos, especialmente *Salmonella* spp., basado en la decarboxilación y desaminación de la lisina y en la producción de ácido sulfhídrico.

FUNDAMENTO

En el medio de cultivo, la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas decarboxilasa y deaminasa. El citrato de hierro y amonio y el tiosulfato de sodio son los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico. El púrpura de bromocresol, es el indicador de pH (su color es amarillo a pH igual o menor a 5.2 y violeta a pH igual o mayor a 6.8) y el agar es el agente solidificante.

Los microorganismos fermentadores de glucosa acidifican el medio y provocan el viraje del color púrpura al amarillo.

El ambiente ácido favorece la actividad enzimática decarboxilasa y se metaboliza la lisina a cadaverina elevando el pH del medio de cultivo y tornándolo al color púrpura o violeta.

Los microorganismos fermentadores de glucosa que no tienen actividad lisina decarboxilasa, producen un viraje de la totalidad del medio de cultivo al color amarillo. A las 24 horas de incubación se observa el fondo del tubo color amarillo y la superficie de color violeta debido al consumo de las peptonas que producen alcalinidad. La generación de sulfuro de hidrógeno, se visualiza por el ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro de hierro.

Las cepas de los géneros *Proteus*, *Providencia* y algunas de *Morganella*, desaminan la lisina. Esto produce un ácido alfa-ceto-carbónico, el cual con la sal de hierro y bajo la influencia del oxígeno forma un color rojizo en la superficie del medio.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Código B0210605: envase x 100 g.

Código B0210606: envase x 500 g.

FÓRMULA (en gramos por litro)

PEPTONA DE GELATINA.....	5.0
EXTRACTO DE LEVADURA.....	3.0
GLUCOSA.....	1.0
LISINA.....	10.0
CITRATO DE HIERRO Y AMONIO.....	0.5
TIOSULFATO DE SODIO.....	0.04
PÚRPURA DE BROMOCRESOL.....	0.02
AGAR.....	15.0
pH FINAL: 6.7 ± 0.2	

INSTRUCCIONES

Suspender 35 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos. Calentar agitando con frecuencia y hervir durante un minuto hasta la disolución completa. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Enfriar y dejar solidificar en posición inclinada (pico de flauta profundo).

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Medio de cultivo deshidratado: color beige, homogéneo, libre deslizamiento.

Medio de cultivo preparado: color púrpura rojizo.

ALMACENAMIENTO

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

PROCEDIMIENTO

Siembra:

A partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio y mediante el uso de aguja de inoculación, inocular el medio de cultivo, picando el fondo y extendiendo sobre la superficie del mismo.

Lisina Hierro Agar

Incubación

En aerobiosis, a 35-37 °C durante 18-24 horas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Decarboxilación de la lisina:

Resultado positivo: superficie alcalina / profundidad alcalina (pico violeta / fondo violeta).

Resultado negativo: superficie alcalina / profundidad ácida (pico violeta / fondo amarillo).

Desaminación de la lisina:

Resultado positivo: superficie rojiza / profundidad ácida. Esto sucede con cepas del género *Proteus*, *Providencia* y algunas de *Morganella* spp.

Producción de SH₂:

Resultado positivo: ennegrecimiento del medio de cultivo (especialmente en el límite entre la superficie y profundidad).

Resultado negativo: el medio de cultivo permanece sin cambio de color.

CONTROL DE CALIDAD

MICROORGANISMOS	DESCARBOXILACIÓN DE LISINA (fondo)	DESAMINACIÓN DE LISINA (superficie)	PRODUCCIÓN DE SH ₂
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	- (color amarillo)	+	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	+	-	+
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	- (color amarillo)	- (color púrpura)	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	-	-

CONTROL DE ESTERILIDAD	RESULTADO
Medio sin inocular	Sin cambios

LIMITACIONES

Las especies de *Proteus* no ennegrecen el medio de cultivo al producir SH₂. El sulfuro de hierro puede no evidenciarse en microor-

ganismos que no producen lisina decarboxilasa debido a que la acidez del medio puede inhibir su formación. Por eso se recomienda realizar en paralelo la prueba de TSI Agar ([Britania](#)).

MATERIALES NECESARIOS NO PROVISTOS

Equipos y material de laboratorio, microorganismos para control de calidad, reactivos y medios de cultivo adicionales según requerimiento.

PRECAUCIONES

- Solamente para uso diagnóstico in vitro. Uso profesional exclusivo.
- No utilizar el producto si al recibirlo su envase está abierto o dañado.
- No utilizar el producto si existen signos de contaminación o deterioro, así como tampoco si ha expirado su fecha de vencimiento.
- Utilizar guantes y ropa protectora cuando se manipula el producto.
- Considerar las muestras como potencialmente infecciosas y manipularlas apropiadamente siguiendo las normas de bioseguridad establecidas por el laboratorio.
- Las características del producto pueden alterarse si no se conserva apropiadamente.
- Descartar el producto que no ha sido utilizado y los desechos del mismo según reglamentaciones vigentes.

REFERENCIAS

- MacFaddin. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Ewing. 1986. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co, Inc, New York, N.Y.
- Holt, Krieg, Sneath, Staley and Williams (ed.). 1994. Bergey's Manual™ of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Murray PR, Baron, Pfaller, Tenover and Tenover. 1999. Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

INDICACIONES AL CONSUMIDOR

Utilizar el producto hasta su fecha de vencimiento.
Conservar el producto según las indicaciones del rótulo.

SÍMBOLOS UTILIZADOS

								
DIAGNÓSTICO IN VITRO	CÓDIGO N°	ELABORADOR	ESTERIL	Nº DE DETERMINACIONES	LOT N°	FECHA DE VENCIMIENTO	LÍMITE DE TEMPERATURA	INSTRUCCIONES DE USO

HQA.2 DE 2

LABORATORIOS BRITANIA S.A.
CASA - ARGENTINA
TEL/FAX 54 11 4336 5048

www.britanialab.com info@britanialab.com

11/2015 - REV. 01

ANEXO D

FICHA TÉCNICA DEL AGAR SABOURAUD CON CLORANFENICOL Y CICLOHEXIMIDA



Technical Data

Sabouraud Cycloheximide Chloramphenicol Agar

M664

Sabouraud Cycloheximide Chloramphenicol Agar is used for selective isolation and cultivation of fungi.

Composition**

Ingredients	Gms / Litre
Peptic digest of animal tissue	10.000
Dextrose	20.000
Chloramphenicol	0.040
Cycloheximide	0.500
Agar	15.000
Final pH (at 25°C)	6.8±0.2

**Formula adjusted, standardized to suit performance parameters

Directions

Suspend 45.54 grams in 1000 ml distilled water. Heat to boiling to dissolve the medium completely. Sterilize by autoclaving at 15 lbs pressure (121°C) for 15 minutes. Mix well and pour into sterile Petri plates.

Caution : Cycloheximide is very toxic. Avoid skin contact or aerosol formation and inhalation.

Some pathogenic fungi may produce infective spores, which are easily dispersed in air, so examination should be carried out in safety cabinet.

Principle And Interpretation

Sabouraud Dextrose Agar was originally formulated by Sabouraud (1) and further modified by Emmons (2) by reducing dextrose content and adjusting the pH close to neutral.

Peptic digest of animal tissue is the source of nitrogenous growth factors while dextrose provides an energy source for the growth of microorganisms. The media can be rendered selective for fungi by antibiotics such as Chloramphenicol (4) and Cycloheximide (5), which inhibit some bacteria as well as some saprophytic and pathogenic fungi. This medium inhibits fungi like *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus*, *Nocardia*, certain *Candida* species but allow the dermatophytes to grow well.

Quality Control

Appearance

Cream to yellow homogeneous free flowing powder

Gelling

Firm, comparable with 1.5% Agar gel

Colour and Clarity of Prepared Medium

Light amber coloured clear to slightly opalescent gel forms in Petri plates

Reaction

Reaction of 4.5% w/v aqueous solution at 25°C. pH : 6.8±0.2

pH

6.60-7.00

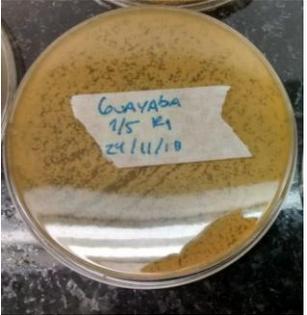
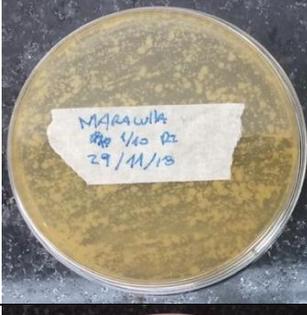
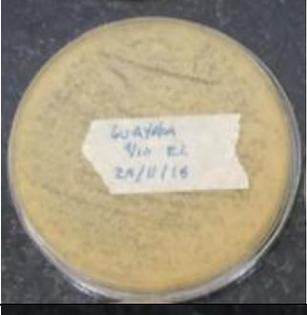
Cultural Response

M664: Cultural characteristics observed after an incubation at 25-30°C for 2-3 weeks.

Organism	Inoculum (CFU)	Growth	Recovery
Cultural Response			
* <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	50-100	none-poor	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	50-100	poor-fair	≤20%

Please refer disclaimer Overleaf.

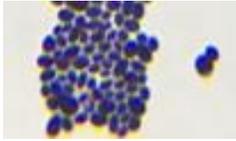
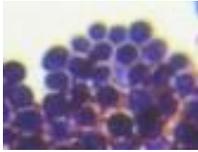
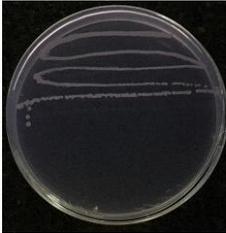
**ANEXO E.
DILUCIONES SERIADAS DE 1:5 HASTA 1:100.000.**

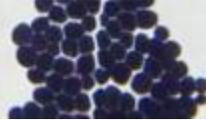
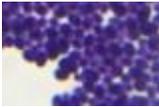
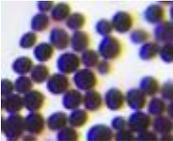
Diluciones	Fruto		
	Maracuyá	Guayaba	Ciruela
1:5			
1:10			
1:100			
1:1.000			

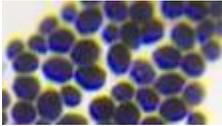
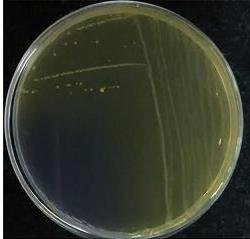


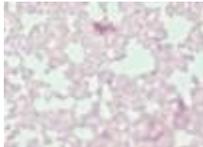
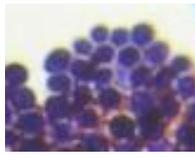
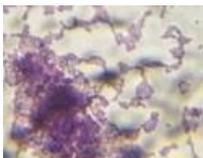
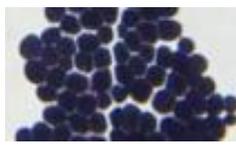
Fuente: elaboración propia

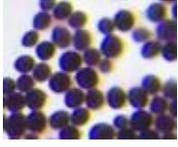
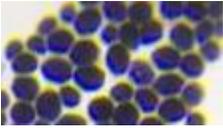
**ANEXO F.
PASES COMPLETOS DE LAS DOCE CEPAS EN AGAR LISINA POR SIEMBRA
EN AGOTAMIENTO.**

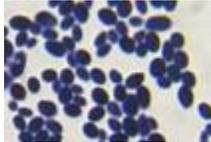
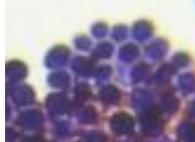
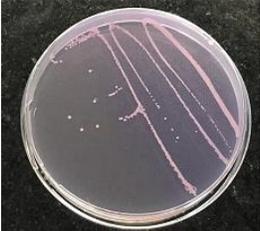
Primer pase	
Caracterización macroscópica	
Maracuyá Cepa A	Cepa Patrón
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	
	
<p>Posee células circulares pequeñas homogéneas.</p>	<p>Posee células circulares pequeñas homogéneas.</p>
Segundo pase	
Caracterización macroscópica	
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares.</p>

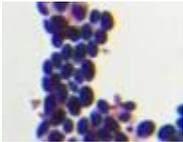
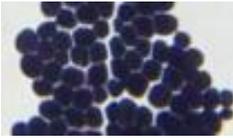
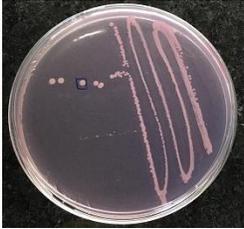
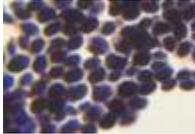
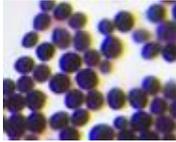
Textura: Cremosa. Color: Beige.	Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Tercer pase	
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Cuarto pase	
Caracterización macroscópica	

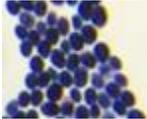
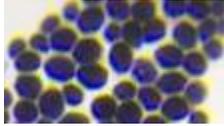
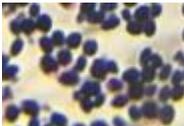
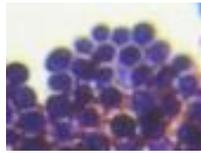
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Primer pase	
Caracterización macroscópica	
Maracuyá Cepa B	Cepa Patrón
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	

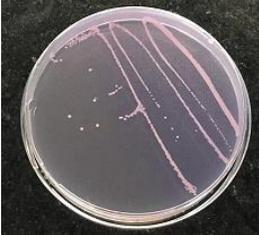
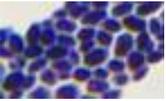
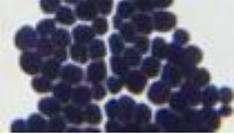
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Segundo pase	
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Tercer pase	
Caracterización macroscópica	
	

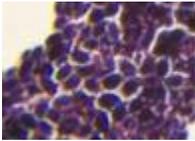
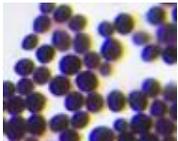
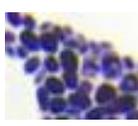
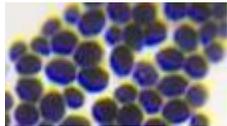
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Cuarto pase	
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Primer pase	
Caracterización macroscópica	
Maracuyá Ceba N	Ceba Patrón

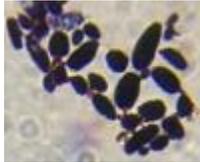
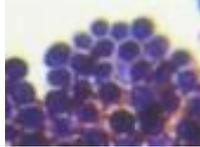
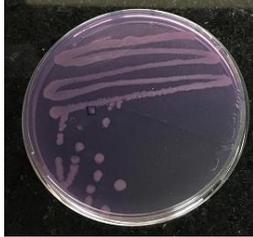
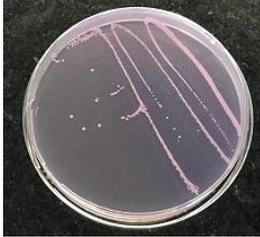
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	
	
<p>Posee células circulares pequeñas homogéneas.</p>	<p>Posee células circulares pequeñas homogéneas.</p>
Segundo pase	
Caracterización macroscópica	
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	

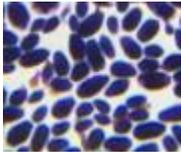
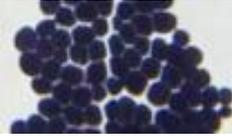
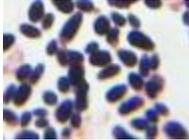
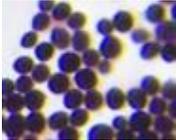
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Tercer pase	
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Cuarto pase	
Caracterización macroscópica	
	

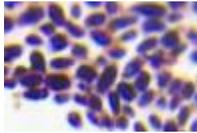
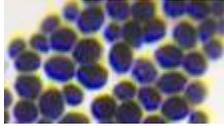
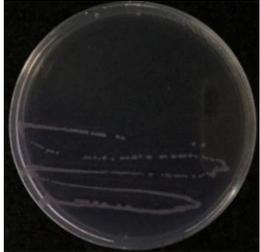
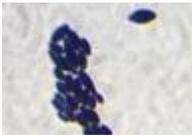
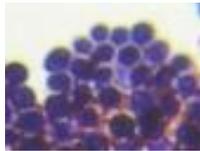
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Primer pase	
Caracterización macroscópica	
Maracuyá Cepa P	Cepa Patrón
	
Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Segundo pase	

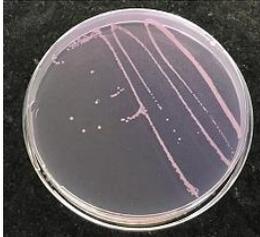
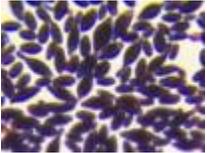
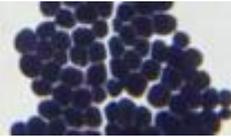
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Tercer pase	
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	

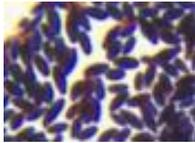
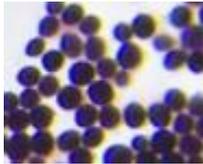
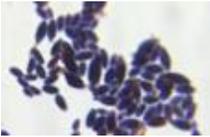
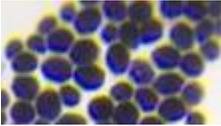
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Cuarto pase	
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Primer pase	
Caracterización macroscópica	
Guayaba Cepa I	Cepa Patrón

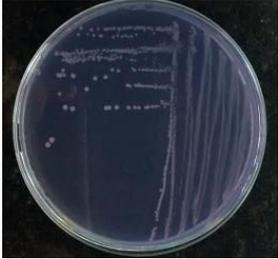
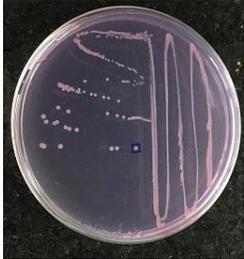
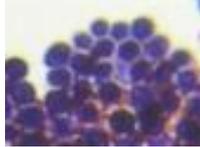
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	
	
<p>Posee células ovaladas alargadas heterogéneas</p>	<p>Posee células circulares pequeñas homogéneas.</p>
Segundo pase	
Caracterización macroscópica	
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	

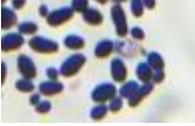
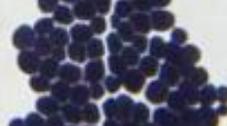
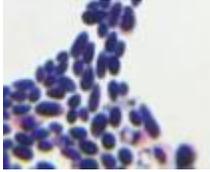
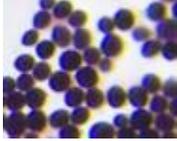
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Tercer pase	
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Cuarto pase	
Caracterización macroscópica	
	

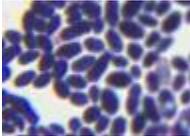
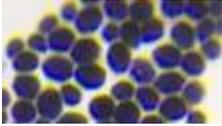
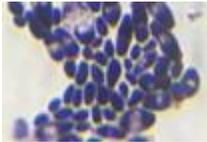
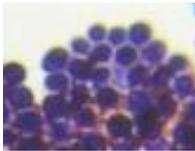
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Primer pase	
Caracterización macroscópica	
Guayaba Cepa J	Cepa Patrón
	
Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Segundo pase	

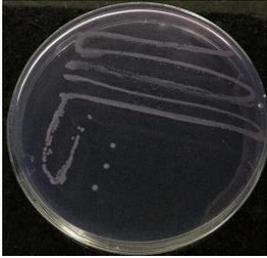
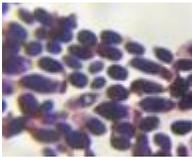
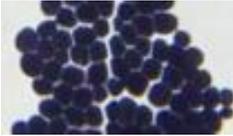
Caracterización macroscópica	
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Tercer pase	
Caracterización macroscópica	
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	

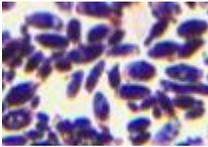
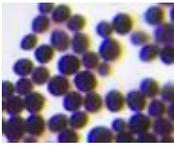
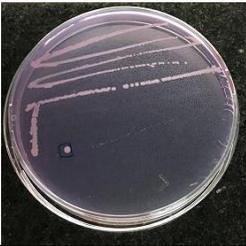
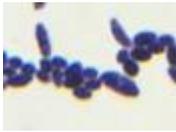
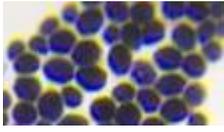
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Cuarto pase	
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Primer pase	
Caracterización macroscópica	
Guayaba Cepa G	Cepa Patrón

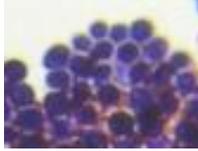
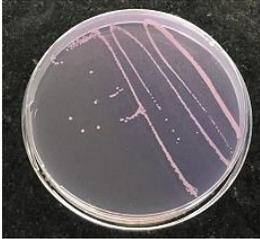
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Segundo pase	
Caracterización macroscópica	
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	

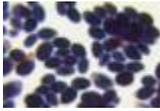
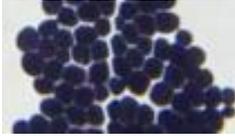
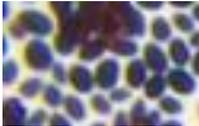
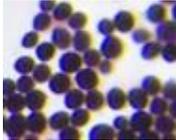
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Tercer pase	
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Cuarto pase	
Caracterización macroscópica	
	

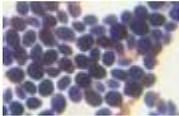
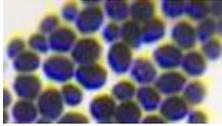
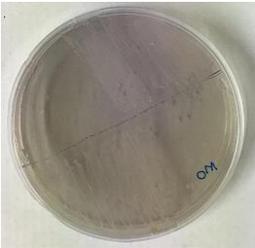
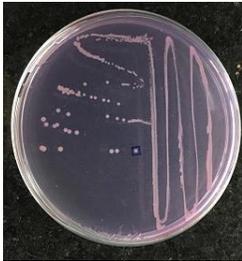
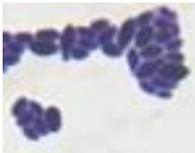
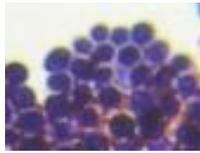
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Primer pase	
Caracterización macroscópica	
Guayaba Cepa H	Cepa Patrón
	
Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Segundo pase	

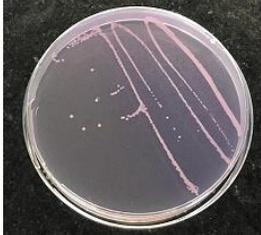
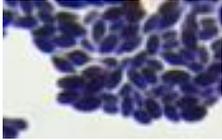
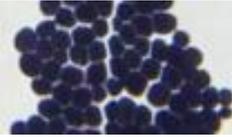
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Tercer pase	
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	

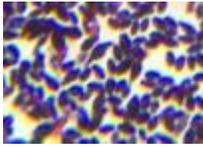
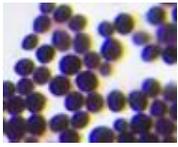
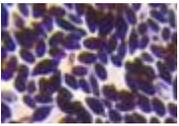
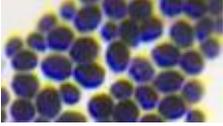
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Cuarto pase	
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Primer pase	
Caracterización macroscópica	
Ciruela Cepa L	Cepa Patrón

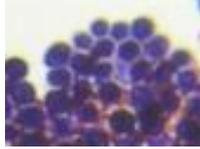
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Segundo pase	
Caracterización macroscópica	
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	

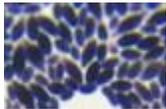
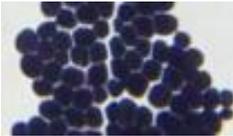
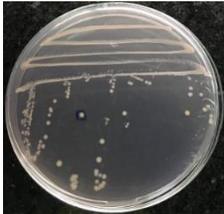
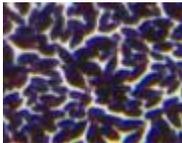
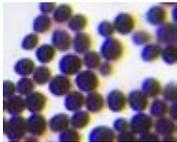
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Tercer pase	
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Cuarto pase	
Caracterización macroscópica	
	

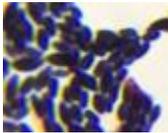
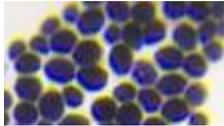
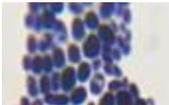
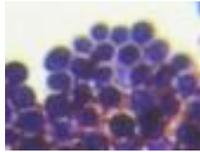
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Primer pase	
Caracterización macroscópica	
Ciruela Cepa M	Cepa Patrón
	
Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Segundo pase	

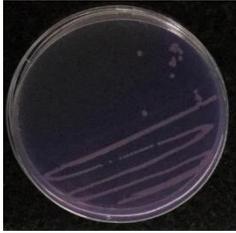
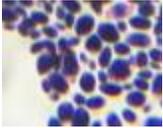
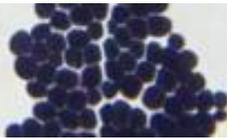
Caracterización macroscópica	
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Tercer pase	
Caracterización macroscópica	
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	

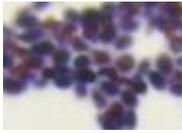
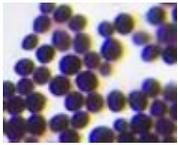
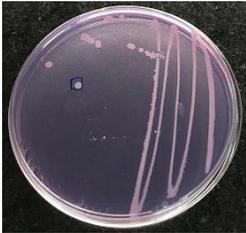
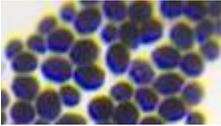
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Cuarto pase	
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Primer pase	
Caracterización macroscópica	
Ciruela Cepa C	Cepa Patrón

	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Segundo pase	
Caracterización macroscópica	
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	

	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Tercer pase	
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Cuarto pase	
Caracterización macroscópica	
	

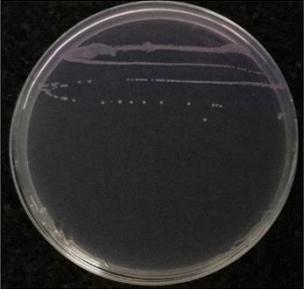
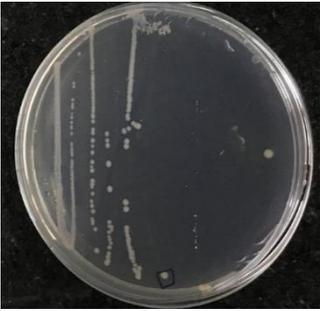
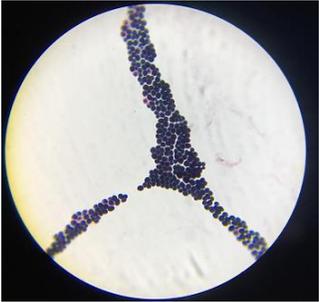
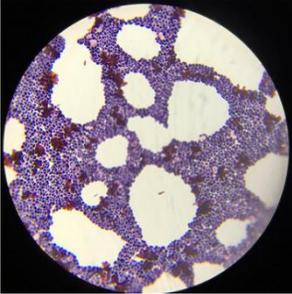
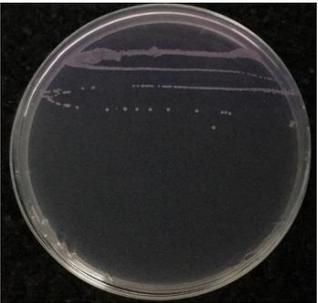
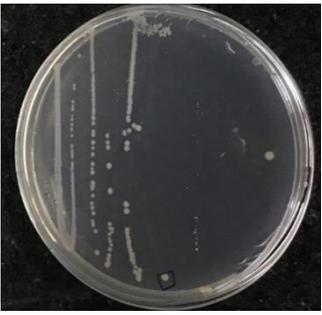
<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	
	
Posee células ovaladas alargadas heterogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Primer pase	
Caracterización macroscópica	
Ciruela Cepa D	Cepa Patrón
	
<p>Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>	<p>Forma: Circular. Bordes: Regular. Textura: Cremosa. Color: Beige.</p>
Caracterización microscópica	
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.

Segundo pase	
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Tercer pase	
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	

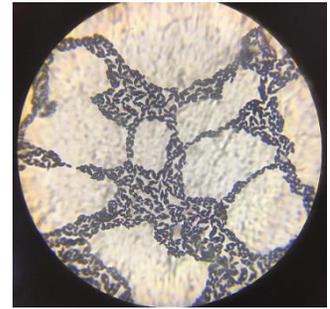
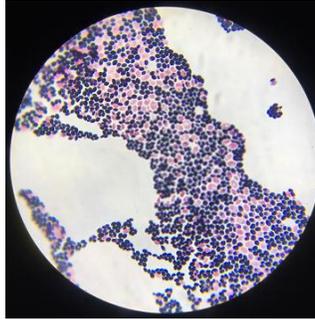
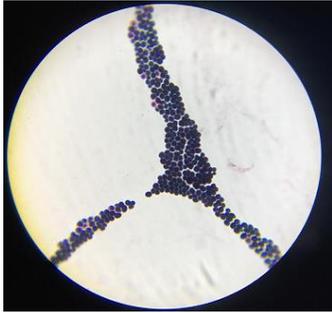
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.
Cuarto pase	
Caracterización macroscópica	
	
Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.	Forma: Circular. Bordes: Regulares. Textura: Cremosa. Color: Beige.
Caracterización microscópica	
	
Posee células circulares pequeñas homogéneas.	Posee células circulares pequeñas homogéneas.

Fuente: elaboración propia

**ANEXO G.
QUINTO PASE DE CEPAS SELECCIONADAS JUNTO CON LAS CEPAS DE
REFERENCIA.**

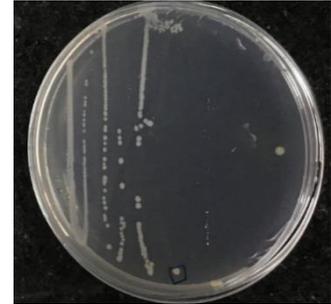
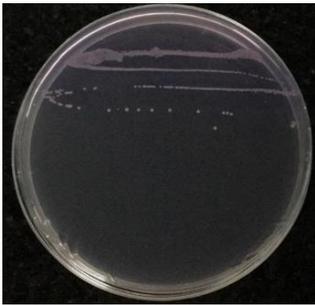
Quinto pase		
Cepa control (<i>Saccharomyces</i>)	Cepa seleccionada	Cepa control (No <i>Saccharomyces</i>)
Cepa A		
Caracterización macroscópica		
		
Caracterización microscópica		
		
Cepa N		
Caracterización macroscópica		
		

Caracterización microscópica

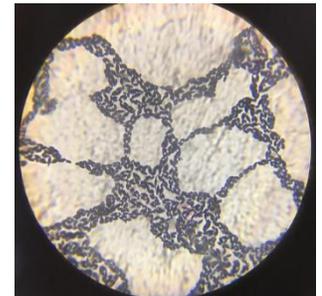
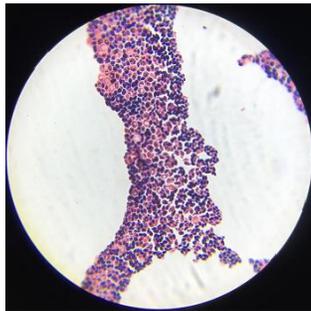
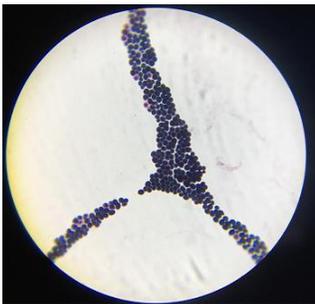


Ceba P

Caracterización macroscópica

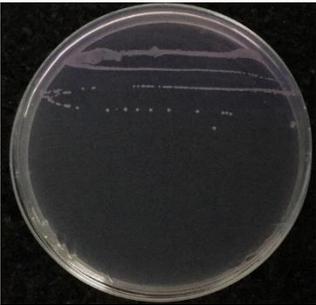
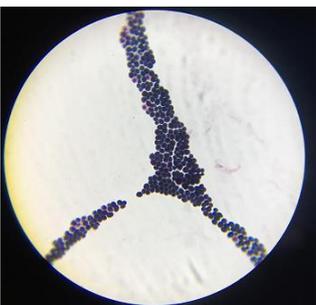
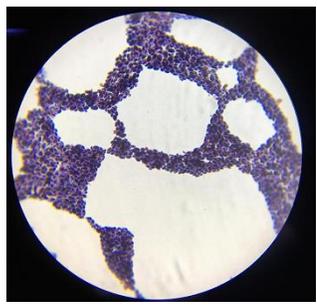
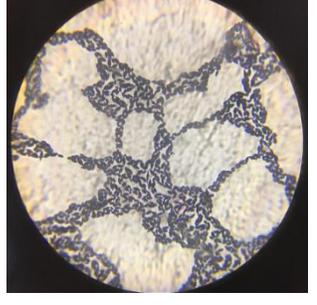
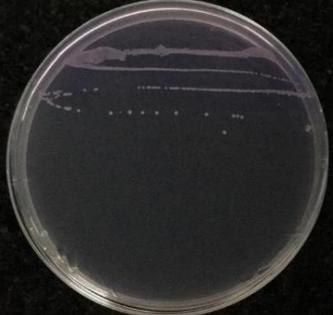
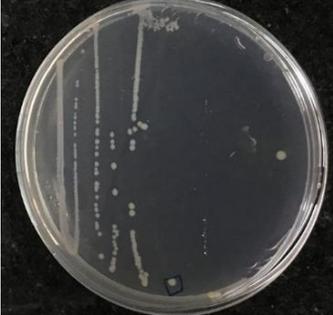


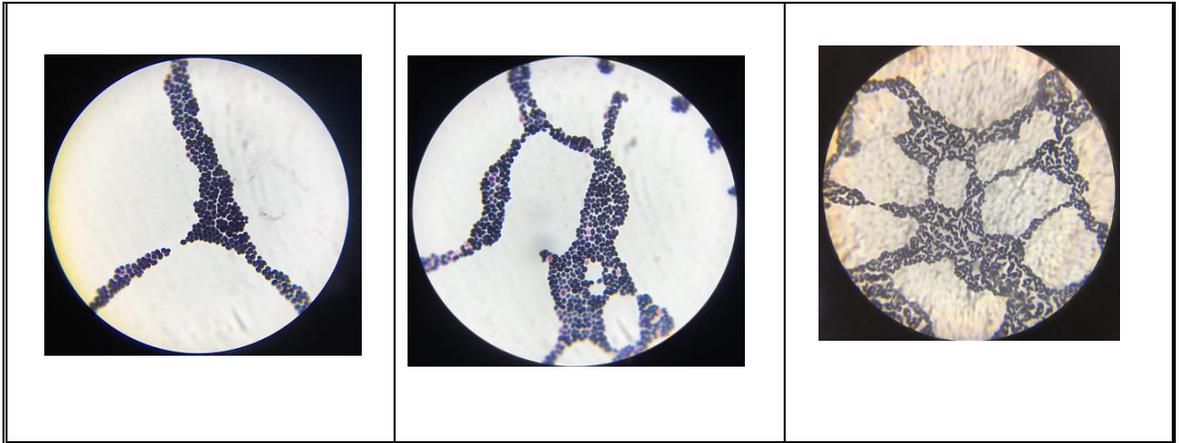
Caracterización microscópica



Ceba D

Caracterización macroscópica

		
Caracterización microscópica		
		
Cepa L		
Caracterización macroscópica		
		
Caracterización microscópica		



Fuente: elaboración propia

ANEXO H. DESARROLLO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES.

Para realizar la curva de calibración se tomó una solución patrón de glucosa, puesto que este es uno de los azúcares presentes en el mosto, el cual es utilizado como sustrato por microorganismos como las levaduras para producir etanol y a su vez este reacciona con el reactivo DNS, ya que es un monosacárido.

Se realizaron tres réplicas de la curva de calibración a partir de una solución patrón de glucosa a una concentración de 0.2 g/L.

Primero fue necesaria la preparación de 5 soluciones en tubos de ensayo marcados según la solución correspondiente, en la cual se tomaron para la solución patrón de glucosa y agua destilada las cantidades mostradas a continuación.

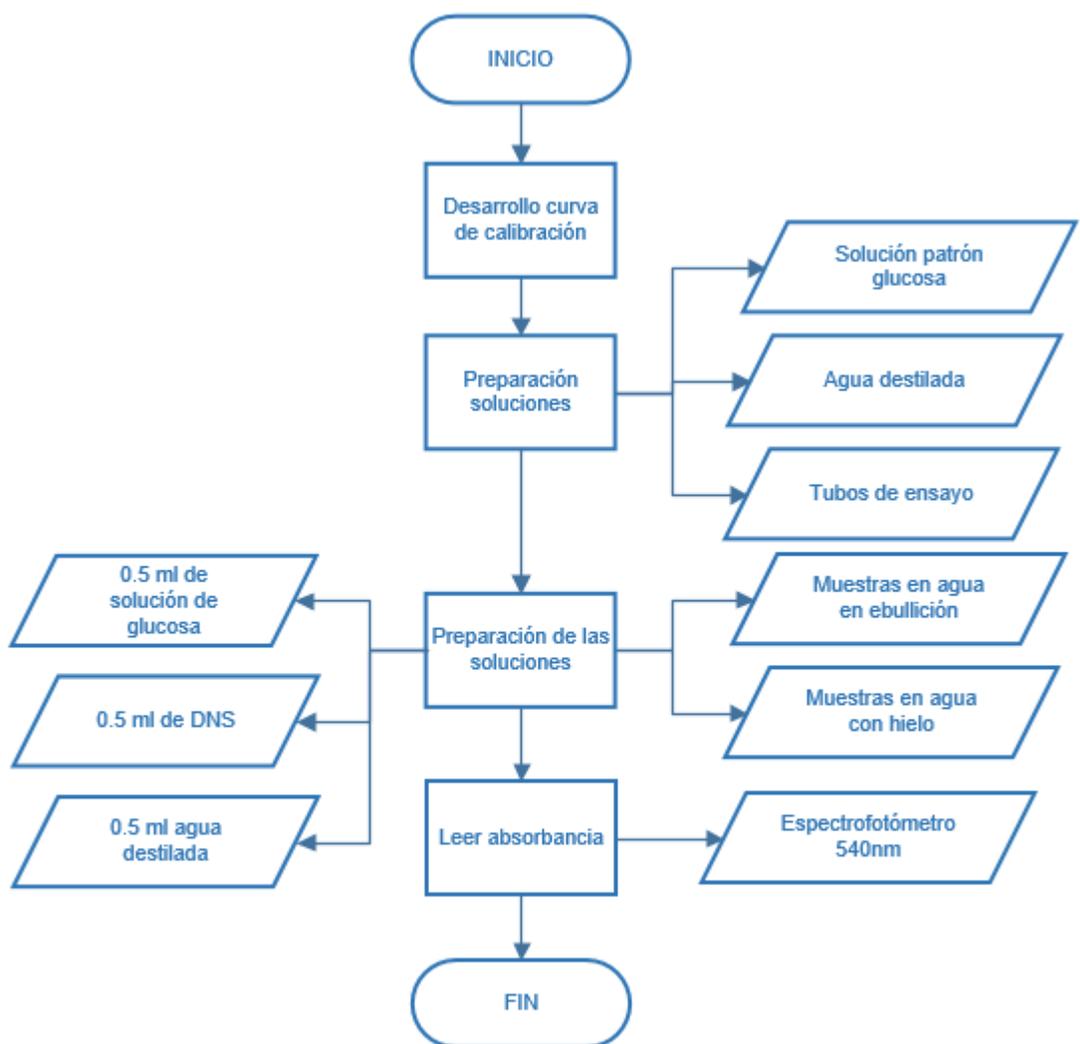
Datos para la elaboración de las soluciones de glucosa.

Numero de tubo	Volumen solución patrón de glucosa (ml)	Volumen agua destilada (ml)
1	0.1	9.9
2	0.3	9.7
3	0.5	9.5
4	0.7	9.3
5	1	9

Fuente: elaboración propia

Luego se tomó un volumen 500 μ L (0.5 ml) de solución de glucosa y de reactivo DNS, como blanco se utilizó agua destilada. En un vaso de precipitado de 1000 ml se vertió agua, se llevó a ebullición y se colocaron los 6 tubos, incluyendo el blanco, dentro del vaso de precipitado por 5 minutos, luego de este tiempo se tomó un vaso de precipitado de 1000 ml que contenía agua con hielo y se colocaron los 6 tubos por 5 minutos hasta que se enfriaran, para terminar se les agregaron a los 6 tubos 500 μ L de agua destilada para diluir las soluciones, y finalmente se realizó la lectura de la absorbancia de cada una de ellas a una longitud de onda de 540 nm.

En el diagrama se encuentra explicado el desarrollo de la curva de calibración para la determinación de azúcares reductores.

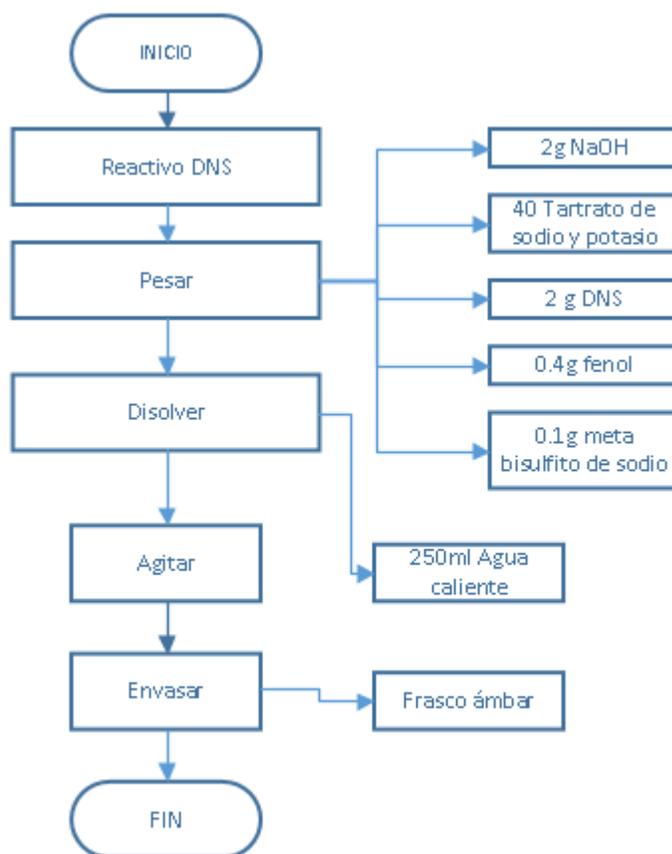


Fuente: elaboración propia

ANEXO I PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DEL REACTIVO DNS.

Para la preparación de 250 ml de reactivo DNS se pesaron 2 g de hidróxido de sodio (NaOH), 40 g de tartrato de sodio y potasio, 2 g de ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS), 0.4 g de fenol 0.1N y 0.1 g de metabisulfito de sodio, todo esto se disolvió en agua destilada caliente en agitación, se dejó enfriar y se envaso en un frasco ámbar, ya que este reactivo es fotosensible.

Protocolo de preparación para el reactivo DNS.



Fuente: elaboración propia

ANEXO J. CALCULOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA PARA EL DISEÑO DE EXPERIMENTOS.

Ecuación 10. Numero de datos para el análisis de varianzas.

$$N = a * b * n_{replicas}$$

$$N = 3 * 3 * 3 = 27$$

Fuente. WALPOLE,Ronald; MYERS,Raymond and MYERS,Sharon. Probabilidad y estadística para ingenieros ; sexta ed. México FC: Pearson Educación, 1999. 465 p.

Ecuación 11. Suma de cuadrados totales

$$SCT = SCE_A + SCE_B + SCE_{AB} + SCD_{ER}$$

$$\sum Y_{ijk}^2 - \frac{Y_{...}^2}{N}$$

$$SCT = 0,2422 + 0,04473 + 0,1348 + 0,3938$$

$$SCT = 0,8156$$

Fuente. WALPOLE,Ronald; MYERS,Raymond and MYERS,Sharon. Probabilidad y estadística para ingenieros ; sexta ed. México FC: Pearson Educación, 1999. 465 p.

Ecuación 12. Suma de cuadrados entre factores A

$$SCE_A = \frac{1}{bn} \sum Y_{i..}^2 - \frac{Y_{...}^2}{N}$$

$$SCE_A = \frac{1}{3*3} * (9,105^2 + 8,462^2 + 7,063^2) - \frac{24,63^2}{27}$$

$$SCE_A = 0,2422$$

Fuente. WALPOLE,Ronald; MYERS,Raymond and MYERS,Sharon. Probabilidad y estadística para ingenieros ; sexta ed. México FC: Pearson Educación, 1999. 465 p.

Ecuación 13, Suma de cuadrados entre factores B

$$SCE_B = \frac{1}{an} \sum Y_{.j.}^2 - \frac{Y_{...}^2}{N}$$

$$SCE_B = \frac{1}{3*3} * (8,726^2 + 7,992^2 + 7,912^2) - \frac{24,63^2}{27}$$

$$SCE_B = 0.04473$$

Fuente. WALPOLE,Ronald; MYERS,Raymond and MYERS,Sharon. Probabilidad y estadística para ingenieros ; sexta ed. México FC: Pearson Educación, 1999. 465 p.

Ecuación 14. Suma de cuadrados entre factores AB

$$SCE_{AB} = \frac{1}{n} \sum Y_{ij}^2 - \frac{Y_{\dots}^2}{N} - SCE_A - SCE_B$$

$$SCE_{AB} = \frac{1}{3} * (3,028^2 + 2,810^2 + 3,267^2 + 2,872^2 + 2,851^2 + 2,739^2 + 2,826^2 + 2,331^2 + 1,906^2) - \frac{24,63^2}{27} - 0,2422 - 0,04473$$

$$SCE_{AB} = 0,1348$$

Fuente. WALPOLE,Ronald; MYERS,Raymond and MYERS,Sharon. Probabilidad y estadística para ingenieros ; sexta ed. México FC: Pearson Educación, 1999. 465 p.

Ecuación 15. Suma de cuadrados dentro de tratamiento

$$SCD_{ER} = SCT - SCE_A - SCE_B - SCE_{AB}$$

$$SCD_{ER} = 0,8156 - 0,2422 - 0,04473 - 0,1348$$

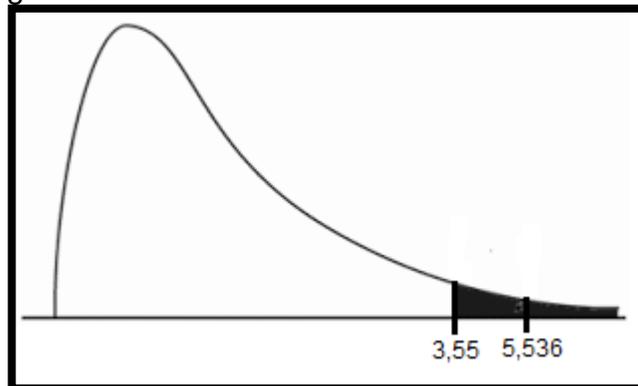
$$SCD_{ER} = 0,3938$$

Fuente. WALPOLE,Ronald; MYERS,Raymond and MYERS,Sharon. Probabilidad y estadística para ingenieros ; sexta ed. México FC: Pearson Educación, 1999. 465 p.

Factor A (Tiempo de fermentación)

Para este factor, la tabla de análisis de varianzas muestra un valor FA calculado de 5,536 y un valor F de tablas de 3,55 a un nivel de significancia de 0.05. Con estos valores se elaboró la gráfica 11 para determinar la aceptación o rechazo de la hipótesis nula H0.

Gráfica 11. Distribución F para el factor A, efecto del tiempo sobre la concentración de glucosa



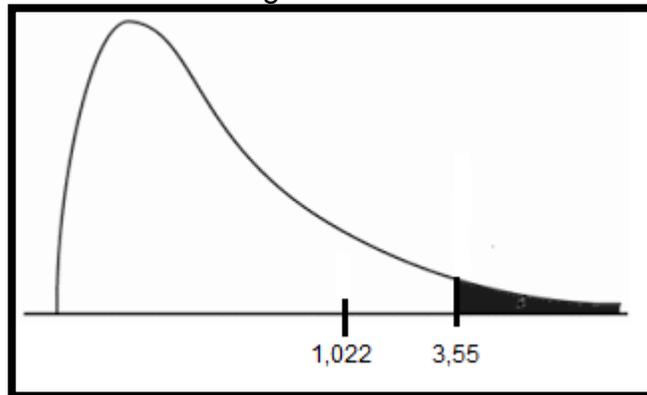
Fuente: elaboración propia

Como se observa el valor de FA calculado de 5, 536 queda en la zona de rechazo de la hipótesis nula, H0, con esto se concluye que hay efecto significativo del tiempo sobre la concentración de glucosa.

Factor B (Cepa seleccionada)

Para el factor B, la tabla de análisis de varianza arroja un valor F_B calculado de 1,022 y un valor F de tablas de 3,55 a un nivel de significancia de 0.05. Con estos valores se elaboró la gráfica 12 para determinar la aceptación o rechazo de la hipótesis nula H_0 .

Gráfica 12. Distribución F para el factor B, efecto de la cepa seleccionada sobre la concentración de glucosa



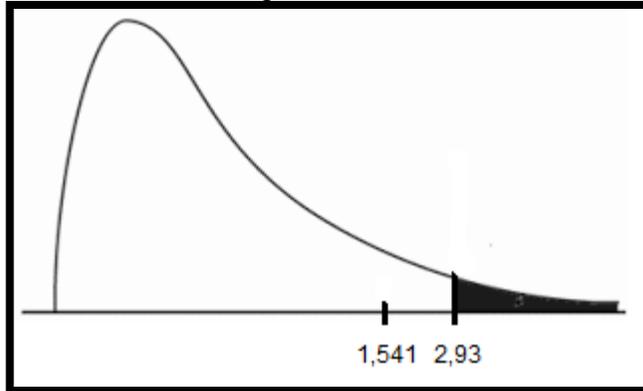
Fuente: elaboración propia

Como se observa el valor de F_B calculado de 1,022 queda en la zona de aceptación de la hipótesis nula, H_0 , con esto se concluye que no hay efecto de la cepa seleccionada sobre la concentración de glucosa.

Interacción de los factores A (Tiempo de fermentación) y B (Cepa seleccionada)

Para el factor de interacción AB, la tabla de análisis de varianzas muestra un valor F_{AB} calculado de 1,541 y un valor F de tablas de 2,93 a un nivel de significancia de 0.05. Con estos valores se elaboró la gráfica 13 para determinar la aceptación o rechazo de la hipótesis nula H_0 .

Gráfica 13. Distribución F para el factor de interacción AB, efecto de la interacción entre el tiempo y la cepa seleccionada sobre la concentración de glucosa

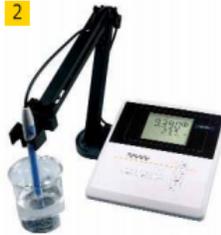


Fuente: elaboración propia

Como se observa el valor de FAB calculado de 1,541 queda en la zona de rechazo de la hipótesis nula, H_0 , con esto se concluye que no hay efecto de la interacción entre el tiempo y la cepa seleccionada sobre la concentración de glucosa.

ANEXO K. ESPECIFICACIONES POTENCIOMETRO SI ANALYTICS.

2



2 Aparato de medición del pH Lab 870

SI Analytics

Máxima seguridad al medir y calibrar gracias a la detección sin cable de electrodos ID.

- Valores de medición precisos y trasladables mediante la determinación perfecta del sistema de medición.

Electrodos y soluciones tampón

- Medición y calibración rápida del pH mediante un algoritmo optimizado de medición.

- Seguridad en la visión con el "CalClock", la evaluación del sensor y el temporizador calibrado

- Documentación rápida y simple según GLP mediante la comunicación perfecta a través de USB (Slave) y RS 232

- Identificación automática e intercambio y disposición de datos de los electrodos ID.

- El montaje del soporte especial con un clic y el soporte queda fijado con seguridad

- El material suministrado en conjunto es el siguiente:

- Aparato de medición

- Electrodo con sensor de temperatura integrado

- Soluciones tampón

- Soporte

- Fuente de alimentación

- Tapa

Especificaciones:

Margen de medición del pH:	-2.000pH a +19.999pH
	-2,00pH a +19,99pH
Exactitud (±1 dígito):	±0,005
	±0,01
Margen de medición mV:	-999.9 mV a + 999.9 mV
	-999mV a +999mV
Exactitud (±1 dígito):	±0,3mV
	±1 mV
Margen de medición de la temperatura:	-5,0°C a +120,0°C
Exactitud (±1 dígito):	0,1°C

Tipo	ud.E	Código
Lab 870 DIN Set	1	9.773 851
Lab 870 BNC Set	1	9.773 852

ANEXO L. FICHA TECNICA LEVADURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE, AGENTE EMULSIONANTE E491.



SafAle™ K-97



Levadura tipo ale alemana seleccionada por su capacidad de formar una capa superficial de espuma muy firme y espesa durante la fermentación. Es apta para producir ales con baja concentración de ésteres y puede ser utilizada para cervezas de trigo tipo belgas. Su bajo perfil de atenuación genera cervezas con buena persistencia en el paladar.

INGREDIENTES: Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), agente emulsionante E491

ÉSTERES TOTALES	ALCOHOLES SUPERIORES TOTALES	AZÚCARES RESIDUALES	FLOCULACIÓN	SEDIMENTACIÓN
23	248	10 g/l*	+	Lento
ppm a 18°P y 20°C en tubos EBC	ppm a 18°P y 20°C en tubos EBC	* 2g maltotriose/L corresponde a un atenuación aparente de 81%		

FERMENTACIÓN: ideal 15-20°C (59-68°F)

DOSIS: 50 a 80 g/hl en la fermentación primaria

INSTRUCCIONES DE SIEMBRA:

Previamente a la inoculación, se debe rehidratar la levadura seca en un recipiente con agitación hasta formar una crema. El procedimiento consiste en esparcir la levadura seca en un volumen de agua estéril o mosto 10 veces superior a su propio peso, a una temperatura de 25 a 29°C (77°F to 84°F). Una vez que el peso total de la levadura se encuentre reconstituido en forma de crema (esta etapa lleva de 15 a 30 minutos) se mantiene la agitación suave por otros 30 minutos. Posteriormente se siembra la crema obtenida en los fermentadores. Alternativamente, se puede sembrar directamente levadura seca en el fermentador, asegurando que la temperatura del mosto supere los 20 °C (68 °F). Este procedimiento consiste en esparcir la levadura seca en forma progresiva sobre la superficie del mosto, asegurando que la misma cubra toda el área disponible, evitando la formación de grumos. Se deja en reposo por 30 minutos y luego se mezcla el mosto, por ejemplo, utilizando aireación.

ANÁLISIS TÍPICOS:

% peso seco:	94.0 – 96.5
Células viables al envasado:	> 6 x 10 ⁹ /g
Bacterias totales*:	< 1 / ml
Bacterias ácido acéticas*:	< 1 / ml
Lactobacilos*:	< 1 / ml
Pediococcus*:	< 1 / ml
Levaduras salvajes no <i>Saccharomyces</i> *:	< 1 / ml
Microorganismos patógenos:	en acuerdo a la regulación vigente

*Cuando la levadura seca es inoculada a una tasa de 100 g/hl o > 6 x 10⁹ células viables / ml

ALMACENAMIENTO

Durante el transporte: el producto puede ser transportado y almacenado a temperatura ambiente durante 3 meses, sin que sea afectada su performance.
A destino: Conservar en lugar fresco (< 10 °C / 50 °F) y ambiente seco.

VIDA ÚTIL

36 meses luego de la fecha de producción. Ver la fecha máxima recomendada para su impresión en el sachet.
Los sachet abiertos deben ser sellados y almacenados a 4°C (39°F) y utilizados dentro de los 7 días posteriores a su apertura. No utilizar los sachet blandos o dañados.

Se informa que cualquier cambio en el proceso fermentativo puede alterar la calidad final del producto. Por lo tanto, se sugiere realizar ensayos de fermentación antes de utilizar comercialmente nuestra levadura.

TECHNICAL DATA SHEET - SafAle™ K-97 - Rev. NOV2016

The obvious choice for beverage fermentation

Fermentis Division of S.I. Lesaffre - BP 3029 - 137 Rue Gabriel Péri - 59703 Marcq-en-Barœul Cedex - FRANCE - Tel. +33 (0)3 20 81 62 75 - Fax. +33 (0)3 20 81 62 70 - www.fermentis.com

ANEXO M. FORMATO SENSORIAL DE LA ORGANIZACIÓN BEER SCORESHEET (BJCP)



BEER SCORESHEET

<http://www.bjcp.org>
 AHA/BJCP Sanctioned Competition Program
 <http://www.homebrewersassociation.org>

Judge Name (print) _____ Judge BJCP ID _____ Judge Email _____ <small>Use Avery label # 3160</small>	Category # _____ Subcategory (a-f) _____ Entry # _____ Subcategory (spell out) _____ Special Ingredients: _____ Bottle inspection: <input type="checkbox"/> Appropriate size, cap, fill level, label removal, etc. Comments _____
---	---

BJCP Rank or Status:

<input type="checkbox"/> Apprentice	<input type="checkbox"/> Recognized	<input type="checkbox"/> Certified
<input type="checkbox"/> National	<input type="checkbox"/> Master	<input type="checkbox"/> Grand Master
<input type="checkbox"/> Honorary Master	<input type="checkbox"/> Honorary GM	<input type="checkbox"/> Mead Judge
<input type="checkbox"/> Provisional Judge	<input type="checkbox"/> Rank Pending	<input type="checkbox"/> Cider Judge

Non-BJCP Qualifications:

<input type="checkbox"/> Professional Brewer	<input type="checkbox"/> Beer Sommelier	<input type="checkbox"/> GABF/WBC
<input type="checkbox"/> Certified Cicerone	<input type="checkbox"/> Adv. Cicerone	<input type="checkbox"/> Master Cicerone
<input type="checkbox"/> Sensory Training	<input type="checkbox"/> Other _____	

Descriptor Definitions (Mark all that apply):

Acetaldehyde – Green apple-like aroma and flavor.

Alcoholic – The aroma, flavor, and warming effect of ethanol and higher alcohols. Sometimes described as hot.

Astringent – Puckering, lingering harshness and/or dryness in the finish/aftertaste; harsh graininess; huskiness.

Diacetyl – Artificial butter, butterscotch, or toffee aroma and flavor. Sometimes perceived as a slickness on the tongue.

DMS (dimethyl sulfide) – At low levels a sweet, cooked or canned corn-like aroma and flavor.

Estery – Aroma and/or flavor of any ester (fruits, fruit flavorings, or roses).

Grassy – Aroma/flavor of fresh-cut grass or green leaves.

Light-Struck – Similar to the aroma of a skunk.

Metallic – Tinsy, coinny, copper, iron, or blood-like flavor.

Musty – Stale, musty, or moldy aromas/flavors.

Oxidized – Any one or combination of stale, winy/vinous, cardboard, papery, or sherry-like aromas and flavors.

Phenolic – Spicy (clove, pepper), smoky, plastic, plastic adhesive strip, and/or medicinal (chlorophenolic).

Solvent – Aromas and flavors of higher alcohols (fusel alcohols). Similar to acetone or lacquer thinner aromas.

Sour/Acidic – Tartness in aroma and flavor. Can be sharp and clean (lactic acid), or vinegar-like (acetic acid).

Sulfur – The aroma of rotten eggs or burning matches.

Vegetal – Cooked, canned, or rotten vegetable aroma and flavor (cabbage, onion, celery, asparagus, etc.)

Yeasty – A bready, sulfury or yeast-like aroma or flavor.

Aroma (as appropriate for style) _____ /12
 Comment on malt, hops, esters, and other aromatics

Appearance (as appropriate for style) _____ /3
 Comment on color, clarity, and head (retention, color, and texture)

Flavor (as appropriate for style) _____ /20
 Comment on malt, hops, fermentation characteristics, balance, finish/aftertaste, and other flavor characteristics

Mouthfeel (as appropriate for style) _____ /5
 Comment on body, carbonation, warmth, creaminess, astringency, and other palate sensations

Overall Impression _____ /10
 Comment on overall drinking pleasure associated with entry, give suggestions for improvement

Total _____ /50

SCORING GUIDE	Outstanding (45 - 50): World-class example of style. Excellent (38 - 44): Exemplifies style well, requires minor fine-tuning. Very Good (30 - 37): Generally within style parameters, some minor flaws. Good (21 - 29): Meets the mark on style and/or minor flaws. Fair (14 - 20): Off flavors/aromas or major style deficiencies. Unpleasant. Problematic (00 - 13): Major off flavors and aromas dominate. Hard to drink.
----------------------	---

	<input type="checkbox"/> Classic Example	<input type="checkbox"/> Stylistic Accuracy	<input type="checkbox"/> Not to Style	
<input type="checkbox"/> Flawless	<input type="checkbox"/> Technical Merit	<input type="checkbox"/> Significant Flaws	<input type="checkbox"/> Intangibles	<input type="checkbox"/> Lifeless
<input type="checkbox"/> Wonderful	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

BJCP Beer Scoresheet Copyright © 2017 Beer Judge Certification Program rev. 170612
 Please send any comments to Comp_Director@BJCP.org

**ANEXO N.
DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE ALCOHOLICO APROXIMADO DE LA
CERVEZA ARTESANAL.**

Para la determinación del porcentaje alcohólico tanto en las fermentaciones a baja escala como de las cervezas artesanales elaboradas con la cepa D, *Cándida tropicalis* y la cepa patrón, *Saccharomyces cerevisiae* se realizó el siguiente cálculo. Pre experimentación fermentación, *Cándida tropicalis*.

$$\text{porcentaje de alcohol} = \frac{1000 * (1,070 - 1,004)}{7,4} = 8,9\%$$

Cerveza artesanal con *Cándida tropicalis*

$$\text{porcentaje de alcohol} = \frac{1000 * (1,052 - 1,006)}{7,4} = 6,22\%$$

Pre experimentación fermentación, *Saccharomyces cerevisiae*

$$\text{porcentaje de alcohol} = \frac{1000 * (1,070 - 1,002)}{7,4} = 9,22\%$$

Cerveza artesanal con *Saccharomyces cerevisiae*

$$\text{porcentaje de alcohol} = \frac{1000 * (1,068 - 1,002)}{7,4} = 8,91\%$$

**ANEXO Ñ.
DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ATENUACIÓN DE LA CERVEZA
ARTESANAL**

Para la determinación del porcentaje de atenuación, tanto en las fermentaciones a baja escala como de las cervezas artesanales elaboradas con la cepa D, *Cándida tropicalis* y la cepa patrón, *Saccharomyces cerevisiae* se realizó el siguiente cálculo. Pre experimentación fermentación, *Cándida tropicalis*.

$$\text{Atenuación} = \frac{100 * (1,070 - 1,004)}{1,070} = 93,85\%$$

Cerveza artesanal con *cándida tropicalis*

$$\text{Atenuación} = \frac{100 * (1,052 - 1,006)}{1,052} = 88,46\%$$

Pre experimentación fermentación, *Saccharomyces cerevisiae*

$$\text{Atenuación} = \frac{100 * (1,070 - 1,002)}{1,070} = 97,47\%$$

Cerveza artesanal con *Saccharomyces cerevisiae*

$$\text{Atenuación} = \frac{100 * (1,068 - 1,002)}{1,068} = 97\%$$

ANEXO O. ANÁLISIS DEL MAESTRO CERVECERO JUAN SEBASTIÁN RODRÍGUEZ CERVEZA CEPA D.



BEER SCORESHEET

AHA/BJCP Sanctioned Competition Program



<http://www.bjcp.org>
<http://www.homebrewersassociation.org>

Judge Name (print) Juan Sebastian Rodriguez Category # _____ Subcategory (a-f) _____ Entry # _____

Judge BJCP ID 52953 Subcategory (spell out) Ceja D (25B)

Judge Email franchopolaco@yahoo.com Special Ingredients: _____

Use Avery label # S160

BJCP Rank or Status:

Apprentice Recognized Certified
 National Master Grand Master
 Honorary Master Honorary GM Mead Judge
 Provisional Judge Rank Pending Cider Judge

Non-BJCP Qualifications:

Professional Brewer Beer Sommelier GABF/WBC
 Certified Cicerone Adv. Cicerone Master Cicerone
 Sensory Training Other _____

Descriptor Definitions (Mark all that apply):

Acetaldehyde – Green apple-like aroma and flavor.

Alcoholic – The aroma, flavor, and warming effect of ethanol and higher alcohols. Sometimes described as *hot*.

Astringent – Puckering, lingering harshness and/or dryness in the finish/aftertaste; harsh graininess; huskiness.

Diacetyl – Artificial butter, butterscotch, or toffee aroma and flavor. Sometimes perceived as a slickness on the tongue.

DMS (dimethyl sulfide) – At low levels a sweet, cooked or canned corn-like aroma and flavor.

Estery – Aroma and/or flavor of any ester (fruits, fruit flavorings, or roses).

Grassy – Aroma/flavor of fresh-cut grass or green leaves.

Light-Struck – Similar to the aroma of a skunk.

Metallic – Tinny, coin, copper, iron, or blood-like flavor.

Musty – Stale, musty, or moldy aromas/flavors.

Oxidized – Any one or combination of stale, winy/vinous, cardboard, papery, or sherry-like aromas and flavors.

Phenolic – ~~Spicy~~ (clove, pepper), smoky, plastic, plastic adhesive strip, and/or medicinal (chlorophenolic).

Solvent – Aromas and flavors of higher alcohols (fusel alcohols). Similar to acetone or lacquer thinner aromas.

Sour/Acidic – Tartness in aroma and flavor. Can be sharp and clean (lactic acid), or vinegar-like (acetic acid).

Sulfur – The aroma of rotten eggs or burning matches.

Vegetal – Cooked, canned, or rotten vegetable aroma and flavor (cabbage, onion, celery, asparagus, etc.)

Yeasty – A bread, sulfury or yeast-like aroma or flavor.

Bottle Inspection: Appropriate size, cap, fill level, label removal, etc.

Comments: Colu shruing

Aroma (as appropriate for style) _____ 4 / 12
Comment on malt, hops, esters, and other aromatics
con aroma latentes a Alcohol que pisa en la punta de la nariz (Bottling) con perfil a Phenols especiados y algo de levadura residual especiada

Appearance (as appropriate for style) _____ 3 / 3
Comment on color, clarity, and head (retention, color, and texture)
De Color amarillo propio con burbujas intensas y color blanco Marfil

Flavor (as appropriate for style) _____ 10 / 20
Comment on malt, hops, fermentation characteristics, balance, finish/aftertaste, and other flavor characteristics
De sabor de a malta medio con recordacion a pan Araba con levadura seca con balance hacia los Estereos, Final largo algo ácido.

Mouthfeel (as appropriate for style) _____ 4 / 5
Comment on body, carbonation, warmth, creaminess, astringency, and other palate sensations
Con cuerpo medio a ligero de carbonatacion baja, Sensacion Seca que perdura un poco

Overall Impression _____ 5 / 10
Comment on overall drinking pleasure associated with entry; give suggestions for improvement
Muy Buen Interés las levaduras Lageran varal Factory Familiares que se Buscan en este tipo de estilos, aunque la intensidad natural del ejercicio genera algunos OFF Flavors muy marcados recomiendo revisar los procesos de fermentación, (FAN), temp y tiempos, llevar las mediciones de todo

SCORING GUIDE	Outstanding	(45 - 50): World-class example of style
	Excellent	(38 - 44): Exemplifies style well, requires minor fine-tuning
	Very Good	(30 - 37): Generally within style parameters, some minor flaws
	Good	(21 - 29): Misses the mark on style and/or minor flaws
	Fair	(14 - 20): Off flavors/aromas or major style deficiencies. Unpleasant
	Problematic	(00 - 13): Major off flavors and aromas dominate. Hard to drink

<p>Classic Example <input type="checkbox"/></p> <p>Flawless <input type="checkbox"/></p> <p>Wonderful <input type="checkbox"/></p>	<p>Stylistic Accuracy <input type="checkbox"/></p> <p>Technical Merit <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Intangibles <input type="checkbox"/></p>	<p>Not to Style <input type="checkbox"/></p> <p>Significant Flaws <input type="checkbox"/></p> <p>Lifeless <input type="checkbox"/></p>
--	---	---

BJCP Beer Scoresheet Copyright © 2017 Beer Judge Certification Program rev. 170612
 Please send any comments to Comp_Director@BJCP.org

ANEXO P. ANÁLISIS DEL MAESTRO CERVECERO CESAR SALCEDO CERVEZA CEPA D.



BEER SCORESHEET

AHA/BJCP Sanctioned Competition Program



<http://www.bjcp.org> <http://www.homebrewersassociation.org>

Judge Name (print) Cesar Salcedo

Judge BJCP ID _____

Judge Email Kaela2209@gmail.com
Use Avery label # 5100

BJCP Rank or Status:

Apprentice Recognized Certified

National Master Grand Master

Honorary Master Honorary GM Mead Judge

Provisional Judge Rank Pending Cider Judge

Non-BJCP Qualifications:

Professional Brewer Beer Sommelier GABF/WBC

Certified Cicerone Adv. Cicerone Master Cicerone

Sensory Training Other _____

Descriptor Definitions (Mark all that apply):

Acetaldehyde – Green apple-like aroma and flavor.

Alcoholic – The aroma, flavor, and warming effect of ethanol and higher alcohols. Sometimes described as *hot*.

Astringent – Puckering, lingering harshness and/or dryness in the finish/aftertaste; harsh graininess; huskiness.

Diacetyl – Artificial butter, butterscotch, or toffee aroma and flavor. Sometimes perceived as a slickness on the tongue.

DMS (dimethyl sulfide) – At low levels a sweet, cooked or canned corn-like aroma and flavor.

Estery – Aroma and/or flavor of any ester (fruits, fruit flavorings, or roses).

Grassy – Aroma/flavor of fresh-cut grass or green leaves.

Light-Struck – Similar to the aroma of a skunk.

Metallic – Tinny, coin, copper, iron, or blood-like flavor.

Musty – Stale, musty, or moldy aromas/flavors.

Oxidized – Any one or combination of stale, winy/vinous, cardboard, papery, or sherry-like aromas and flavors.

Phenolic – Spicy (clove, pepper), smoky, plastic, adhesive strip, and/or medicinal (chlorophenolic).

Solvent – Aromas and flavors of higher alcohols (fusel alcohols). Similar to acetone or lacquer thinner aromas.

Sour/Acidic – Tartness in aroma and flavor. Can be sharp and clean (lactic acid), or vinegar-like (acetic acid).

Sulfur – The aroma of rotten eggs or burning matches.

Vegetal – Cooked, canned, or rotten vegetable aroma and flavor (cabbage, onion, celery, asparagus, etc.)

Yeasty – A bread, sulfury or yeast-like aroma or flavor.

Category # _____ Subcategory (a-f) _____ Entry # _____

Subcategory (spell out) _____

Special Ingredients: Cepa D

Bottle Inspection Appropriate size, cap, fill level, label removal, etc.

Comments _____

Aroma (as appropriate for style) 9 / 12
Comment on malt, hops, esters, and other aromatics
alcoholes superiores, butiricos, citricos, fenil

Appearance (as appropriate for style) 3 / 3
Comment on color, clarity, and head (retention, color, and texture)
Amarillo palido, carbonatacion tenue, buena remanencia de espuma,

Flavor (as appropriate for style) 17 / 20
Comment on malt, hops, fermentation characteristics, balance, finish/aftertaste, and other flavor characteristics
Acido medio, frutal citrico, perfil de wheat beer, un poco dulce.

Mouthfeel (as appropriate for style) 4 / 5
Comment on body, carbonation, warmth, creaminess, astringency, and other palate sensations
Cuerpo medio, apropiado, carbonatacion Alta,

Overall Impression 8 / 10
Comment on overall drinking pleasure associated with entry; give suggestions for improvement
Controla el butirico y la carbonatacion con mayor tiempo de maduración puede mejorar.

Total 41 / 50

SCORING GUIDE	Outstanding	(45 - 50): World-class example of style
	Excellent	(38 - 44): Exemplifies style well, requires minor fine-tuning
	Very Good	(30 - 37): Generally within style parameters, some minor flaws
	Good	(21 - 29): Misses the mark on style and/or minor flaws
	Fair	(14 - 20): Off flavors/aromas or major style deficiencies. Unpleasant
	Problematic	(00 - 13): Major off flavors and aromas dominate. Hard to drink

CLASSIFICATION	Classic Example	<input type="checkbox"/> Stylistic Accuracy	<input type="checkbox"/> Not to Style
	Flawless	<input type="checkbox"/> Technical Merit	<input type="checkbox"/> Significant Flaws
		<input type="checkbox"/> Intangibles	<input type="checkbox"/> Lifeless
	Wonderful	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

BJCP Beer Scoresheet Copyright © 2017 Beer Judge Certification Program rev. 170612 Please send any comments to Comp_Director@BJCP.org

ANEXO Q. ANÁLISIS DEL MAESTRO CERVECERO JUAN CARLOS RIVEROS CERVEZA CEPA D.



**Beer Judge
PROGRAM**

BEER SCORESHEET

http://www.bjcp.org AHA/BJCP Sanctioned Competition Program http://www.homebrewersassociation.org



**PROFESSIONAL
HOME BREWER**

Judge Name (print) Juan Carlos Riveros

Judge BJCP ID E2348

Judge Email brewerke@gmail.com
Use Avery label # 5160

Category # _____ Subcategory (a-f) _____ Entry # _____

Subcategory (spell out) Cepa D (258)

Special Ingredients: _____

BJCP Rank or Status:

Apprentice Recognized Certified
 National Master Grand Master
 Honorary Master Honorary GM Mead Judge
 Provisional Judge Rank Pending Cider Judge

Non-BJCP Qualifications:

Professional Brewer Beer Sommelier GABF/WBC
 Certified Cicerone Adv. Cicerone Master Cicerone
 Sensory Training Other _____

Descriptor Definitions (Mark all that apply):

Acetaldehyde – Green apple-like aroma and flavor.

Alcoholic – The aroma, flavor, and warming effect of ethanol and higher alcohols. Sometimes described as *hot*.

Astringent – Puckering, lingering harshness and/or dryness in the finish/aftertaste; harsh graininess; huskiness.

Diacetyl – Artificial butter, butterscotch, or toffee aroma and flavor. Sometimes perceived as a slickness on the tongue.

DMS (dimethyl sulfide) – At low levels a sweet, cooked or canned corn-like aroma and flavor.

Estery – Aroma and/or flavor of any ester (fruits, fruit flavorings, or roses).

Grassy – Aroma/flavor of fresh-cut grass or green leaves.

Light-Struck – Similar to the aroma of a skunk.

Metallic – Tinny, coiny, copper, iron, or blood-like flavor.

Musty – Stale, musty, or moldy aromas/flavors.

Oxidized – Any one or combination of stale, winy/vinous, cardboard, papery, or sherry-like aromas and flavors.

Phenolic – Spicy (clove, pepper), smoky, plastic, adhesive strip, and/or medicinal (chlorophenolic).

Solvent – Aromas and flavors of higher alcohols (fusel alcohols). Similar to acetone or lacquer thinner aromas.

Sour/Acidic – Tartness in aroma and flavor. Can be sharp and clean (lactic acid), or vinegar-like (acetic acid).

Sulfur – The aroma of rotten eggs or burning matches.

Vegetal – Cooked, canned, or rotten vegetable aroma and flavor (cabbage, onion, celery, asparagus, etc.)

Yeasty – A bready, sulfury or yeast-like aroma or flavor.

Bottle Inspection Appropriate size, cap, fill level, label removal, etc.

Comments _____

Aroma (as appropriate for style) 5 /12
Comment on malt, hops, esters, and other aromatics
Fusels picantes, alcoholes superiores picante y butirico presente leve aroma a trigo y malta palidos.

Appearance (as appropriate for style) 3 /3
Comment on color, clarity, and head (retention, color, and texture)
Cabeza de espuma baja con poca retencion. Turbia de color naranja

Flavor (as appropriate for style) 8 /20
Comment on malt, hops, fermentation characteristics, balance, finish/aftertaste, and other flavor characteristics
Malta palida y trigo con un dulzor residual y sequedad media. Alcohol picante, ligera acidez

Mouthfeel (as appropriate for style) 3 /5
Comment on body, carbonation, warmth, creaminess, astringency, and other palate sensations
Cuerpo medio con carbonatacion media-alta, alcohol picante y sequedad media.

Overall Impression 6 /10
Comment on overall drinking pleasure associated with entry, give suggestions for improvement
Una cerveza agradable pero que necesita suavizar los alcoholes y eliminar el butirico para que sea mas facil de tomar. Es este momento a pagar por un precio revisa la coleccion y proceso de fermentacion

Total 25 /50

SCORING GUIDE

Outstanding (45 - 50): World-class example of style

Excellent (38 - 44): Exemplifies style well, requires minor fine-tuning

Very Good (30 - 37): Generally within style parameters, some minor flaws

Good (21 - 29): Misses the mark on style and/or minor flaws

Fair (14 - 20): Off flavors/aromas or major style deficiencies. Unpleasant

Problematic (00 - 13): Major off flavors and aromas dominate. Hard to drink

	Stylistic Accuracy	
Classic Example <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Not to Style <input type="checkbox"/>
Flawless <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Technical Merit <input type="checkbox"/>
Wonderful <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Intangibles <input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Significant Flaws <input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Lifeless <input type="checkbox"/>

BJCP Beer Scoresheet Copyright © 2017 Beer Judge Certification Program rev. 170612 Please send any comments to Comp_Director@BJCP.org

ANEXO S. ANÁLISIS DEL MAESTRO CERVECERO JUAN SEBASTIÁN RODRÍGUEZ CERVEZA CEPATRÓN.



BEER SCORESHEET

http://www.bjcp.org AHA/BJCP Sanctioned Competition Program http://www.homebrewersassociation.org



Judge Name (print) Juan Sebastian Rodriguez
 Judge BJCP ID 22953
 Judge Email juanchopoloco@yahoo.com
Use Avery label # 3160

Category # _____ Subcategory (a-f) _____ Entry # _____

Subcategory (spell out) 25B Saison
 Special Ingredients: Pimentón y Cascarones

Bottle Inspection Appropriate size, cap, fill level, label removal, etc.
 Comments _____

BJCP Rank or Status:

Apprentice Recognized Certified
 National Master Grand Master
 Honorary Master Honorary GM Mead Judge
 Provisional Judge Rank Pending Cider Judge

Non-BJCP Qualifications:

Professional Brewer Beer Sommelier GABF/WBC
 Certified Cicerone Adv. Cicerone Master Cicerone
 Sensory Training Other _____

Descriptor Definitions (Mark all that apply):

Acetaldehyde – Green apple-like aroma and flavor.
 Alcoholic – The aroma, flavor, and warming effect of ethanol and higher alcohols. Sometimes described as *hot*.
 Astringent – Puckering, lingering harshness and/or dryness in the finish/aftertaste; harsh graininess; huskiness.
 Diacetyl – Artificial butter, butterscotch, or toffee aroma and flavor. Sometimes perceived as a slickness on the tongue.
 DMS (dimethyl sulfide) – At low levels a sweet, cooked or canned corn-like aroma and flavor.
 Estery – Aroma and/or flavor of any ester (fruits, fruit flavorings, or roses).
 Grassy – Aroma/flavor of fresh-cut grass or green leaves.
 Light-Struck – Similar to the aroma of a skunk.
 Metallic – Tinny, coinny, copper, iron, or blood-like flavor.
 Musty – Stale, musty, or moldy aromas/flavors.
 Oxidized – Any one or combination of stale, winy/vinous, cardboard, papery, or sherry-like aromas and flavors.
 Phenolic – Spicy (clove, pepper), smoky, plastic, plastic adhesive strip, and/or medicinal (chlorophenolic).
 Solvent – Aromas and flavors of higher alcohols (fusel alcohols). Similar to acetone or lacquer thinner aromas.
 Sour/Acidic – Tartness in aroma and flavor. Can be sharp and clean (lactic acid), or vinegar-like (acetic acid).
 Sulfur – The aroma of rotten eggs or burning matches.
 Vegetal – Cooked, canned, or rotten vegetable aroma and flavor (cabbage, onion, celery, asparagus, etc.)
 Yeasty – A bready, sulfury or yeast-like aroma or flavor.

Aroma (as appropriate for style) _____ 8 /12
Comment on malt, hops, esters, and other aromatics
De aroma a malta bajo a medio bajo con carácter a pan dulce y miel, esteres medio a medio Alto de caracoles (apenas) y fustal (Pimentón y Cascarones) Fermentación limpia

Appearance (as appropriate for style) _____ 3 /3
Comment on color, clarity, and head (retention, color, and texture)
De color Ojeados palido translucida con espuma blanca de buena retención

Flavor (as appropriate for style) _____ 12 /20
Comment on malt, hops, fermentation characteristics, balance, finish/aftertaste, and other flavor characteristics
De sabor a malta medio a medio bajo con carácter a galleta y cereal con presencia de esteres a pimentón y Cascarones que son realzados por la seguridad balance hacia los Esteres con sensación "picante" en Boca.

Mouthfeel (as appropriate for style) _____ 3 /5
Comment on body, carbonation, warmth, creaminess, astringency, and other palate sensations
De cuerpo ligero a medio con baja carbonatación y fustal ligero pero sensación picante en Boca que perdura en Boca

Overall Impression _____ 7 /10
Comment on overall drinking pleasure associated with entry, give suggestions for improvement
Brindar buena representación del estilo con una muy buena fermentación con algunos temas a mejorar, me gustaría algo de cuerpo con adición de tiempo y cantidad (fermentación) que el frente es muy picante e inactivo

SCORING GUIDE

Outstanding (45 - 50): World-class example of style.
Excellent (38 - 44): Exemplifies style well, requires minor fine-tuning.
Very Good (30 - 37): Generally within style parameters, some minor flaws.
Good (21 - 29): Misses the mark on style and/or minor flaws.
Fair (14 - 20): Off flavors/aromas or major style deficiencies. Unpleasant.
Problematic (00 - 13): Major off flavors and aromas dominate. Hard to drink.

Total 32 /50

Classic Example <input type="checkbox"/>	Stylistic Accuracy <input checked="" type="checkbox"/>
Flawless <input checked="" type="checkbox"/>	Technical Merit <input type="checkbox"/>
Wonderful <input checked="" type="checkbox"/>	Intangibles <input type="checkbox"/>
	Not to Style <input type="checkbox"/>
	Significant Flaws <input type="checkbox"/>
	Lifeless <input type="checkbox"/>

BJCP Beer Scoresheet Copyright © 2017 Beer Judge Certification Program rev. 170612 Please send any comments to Comp_Director@BJCP.org

ANEXO T. ANÁLISIS DEL MAESTRO CERVECERO CESAR SALCEDO CERVEZA CEPA PATRÓN.



Beer Judge
Certification
Program

BEER SCORESHEET

http://www.bjcp.org AHA/BJCP Sanctioned Competition Program http://www.homebrewersassociation.org



Homebrewers
Association

Judge Name (print) Cesar Salcedo

Judge BJCP ID _____

Judge Email ksalcedo@cepa.com
Use Avery label # 5160

Category # 29 Subcategory (a-f) B Entry # _____

Subcategory (spell out) _____

Special Ingredients: pimentón

BJCP Rank or Status:

Apprentice Recognized Certified

National Master Grand Master

Honorary Master Honorary GM Mead Judge

Provisional Judge Rank Pending Cider Judge

Non-BJCP Qualifications:

Professional Brewer Beer Sommelier GABF/WBC

Certified Cicerone Adv. Cicerone Master Cicerone

Sensory Training Other _____

Bottle Inspection Appropriate size, cap, fill level, label removal, etc.

Comments _____

Descriptor Definitions (Mark all that apply):

Acetaldehyde – Green apple-like aroma and flavor.

Alcoholic – The aroma, flavor, and warming effect of ethanol and higher alcohols. Sometimes described as *hot*.

Astringent – Puckering, lingering harshness and/or dryness in the finish/aftertaste; harsh graininess; huskiness.

Diacetyl – Artificial butter, butterscotch, or toffee aroma and flavor. Sometimes perceived as a slickness on the tongue.

DMS (dimethyl sulfide) – At low levels a sweet, cooked or canned corn-like aroma and flavor.

Estery – Aroma and/or flavor of any ester (fruits, fruit flavorings, or roses).

Grassy – Aroma/flavor of fresh-cut grass or green leaves.

Light-Struck – Similar to the aroma of a skunk.

Metallic – Tinny, coinny, copper, iron, or blood-like flavor.

Musty – Stale, musty, or moldy aromas/flavors.

Oxidized – Any one or combination of stale, winy/vinous, cardboard, papery, or sherry-like aromas and flavors.

Phenolic – Spicy (clove, pepper), smoky, plastic, plastic adhesive strip, and/or medicinal (chlorophenolic).

Solvent – Aromas and flavors of higher alcohols (fusel alcohols). Similar to acetone or lacquer thinner aromas.

Sour/Acidic – Tartness in aroma and flavor. Can be sharp and clean (lactic acid), or vinegar-like (acetic acid).

Sulfur – The aroma of rotten eggs or burning matches.

Vegetal – Cooked, canned, or rotten vegetable aroma and flavor (cabbage, onion, celery, asparagus, etc.)

Yeasty – A bready, sulfury or yeast-like aroma or flavor.

Aroma (as appropriate for style) 12 /12
Comment on malt, hops, esters, and other aromatics

Dulce balanceado, esterozo, fenólico
Citrico agradable, semillas de
cilantro

Appearance (as appropriate for style) 2 /13
Comment on color, clarity, and head (retention, color, and texture)

Buena espuma, retención excelente
Carbonatación baja, brillante

Flavor (as appropriate for style) 18 /20
Comment on malt, hops, fermentation characteristics, balance, finish/aftertaste, and other flavor characteristics

Balanceado dulce-amargo ácido
baja pimentón resaca, picante,
exótico

Mouthfeel (as appropriate for style) 5 /5
Comment on body, carbonation, warmth, creaminess, astringency, and other palate sensations

Acido agradable, cuerpo medio, picor
agradable

Overall Impression 10 /10
Comment on overall drinking pleasure associated with entry; give suggestions for improvement

no agradable, no se siente
carbonatación pobre.

Total 48 /50

SCORING GUIDE

Outstanding (45 - 50): World-class example of style

Excellent (38 - 44): Exemplifies style well, requires minor fine-tuning

Very Good (30 - 37): Generally within style parameters, some minor flaws

Good (21 - 29): Misses the mark on style and/or minor flaws

Fair (14 - 20): Off flavors/aromas or major style deficiencies. Unpleasant

Problematic (00 - 13): Major off flavors and aromas dominate. Hard to drink

Classic Example <input type="checkbox"/>	Stylistic Accuracy	<input type="checkbox"/> Not to Style
Flawless <input type="checkbox"/>	Technical Merit	<input type="checkbox"/> Significant Flaws
Wonderful <input type="checkbox"/>	Intangibles	<input type="checkbox"/> Lifeless

BJCP Beer Scoresheet Copyright © 2017 Beer Judge Certification Program rev. 170612 Please send any comments to Comp_Director@BJCP.org

ANEXO U. ANÁLISIS DEL MAESTRO CERVECERO JUAN CARLOS RIVEROS CERVEZA CEPA PATRÓN.



BEER SCORESHEET

AHA/BJCP Sanctioned Competition Program http://www.homebrewersassociation.org



http://www.bjcp.org

Judge Name (print) Juan Carlos Riveros

Judge BJCP ID E2348

Judge Email brewerkud@gmail.com
Use Avery label # 5160

Category # 25 **Subcategory (a-f)** B **Entry #**

Subcategory (spell out) Saison

Special Ingredients: piñon de castaño
piñon rojo

Bottle Inspection: Appropriate size, cap, fill level label removal, etc.

Comments _____

BJCP Rank or Status:

Apprentice Recognized Certified

National Master Grand Master

Honorary Master Honorary GM Mead Judge

Provisional Judge Rank Pending Cider Judge

Non-BJCP Qualifications:

Professional Brewer Beer Sommelier GABF/WBC

Certified Cicerone Adv. Cicerone Master Cicerone

Sensory Training Other _____

Descriptor Definitions (Mark all that apply):

Acetaldehyde – Green apple-like aroma and flavor.

Alcoholic – The aroma, flavor, and warming effect of ethanol and higher alcohols. Sometimes described as *hot*.

Astringent – Puckering, lingering harshness and/or dryness in the finish/aftertaste; harsh graininess; huskiness.

Diacetyl – Artificial butter, butterscotch, or toffee aroma and flavor. Sometimes perceived as a slickness on the tongue.

DMS (dimethyl sulfide) – At low levels a sweet, cooked or canned corn-like aroma and flavor.

Estery – Aroma and/or flavor of any ester (fruits, fruit flavorings, or roses).

Grassy – Aroma/flavor of fresh-cut grass or green leaves.

Light-Struck – Similar to the aroma of a skunk.

Metallic – Tinny, coin, copper, iron, or blood-like flavor.

Musty – Stale, musty, or moldy aromas/flavors.

Oxidized – Any one or combination of stale, winy/vinous, cardboard, papery, or sherry-like aromas and flavors.

Phenolic – Spicy (clove, pepper), smoky, plastic, adhesive strip, and/or medicinal (chlorophenolic).

Solvent – Aromas and flavors of higher alcohols (fusel alcohols). Similar to acetone or lacquer thinner aromas.

Sour/Acidic – Tartness in aroma and flavor. Can be sharp and clean (lactic acid), or vinegar-like (acetic acid).

Sulfur – The aroma of rotten eggs or burning matches.

Vegetal – Cooked, canned, or rotten vegetable aroma and flavor (cabbage, onion, celery, asparagus, etc.)

Yeasty – A bread, sulfury or yeast-like aroma or flavor.

Aroma (as appropriate for style) 8 /12

Comment on malt, hops, esters, and other aromatics

Ferules y estera medio-altos con notas cítricas a naranja y piñonera, leve aroma a malta pálida y trigo

Appearance (as appropriate for style) 3 /3

Comment on color, clarity, and head (retention, color, and texture)

Amarillo pálido con turbidez media, cabeza media con baja retención.

Flavor (as appropriate for style) 10 /20

Comment on malt, hops, fermentation characteristics, balance, finish/aftertaste, and other flavor characteristics

Malta pálida y trigo con un dulzor medio que se balancea por los espes. Alcohol un poco piñonero con un pizca de piñonera roja un toque agresivo.

Mouthfeel (as appropriate for style) 4 /5

Comment on body, carbonation, warmth, creaminess, astringency, and other palate sensations

Cuerpo medio, carbonatación media-alta, calor por alcohol y espes

Overall Impression 6 /10

Comment on overall drinking pleasure associated with entry; give suggestions for improvement

Buena interpretación. La adición de la piñonera roja resulta un peso fuerte y mata la sutileza de los otros espes. Se quita balance a la cerveza.

Total 31 /50

SCORING GUIDE

Outstanding	(45 - 50): World-class example of style.
Excellent	(38 - 44): Exemplifies style well, requires minor fine-tuning.
Very Good	(30 - 37): Generally within style parameters, some minor flaws.
Good	(21 - 29): Misses the mark on style and/or minor flaws.
Fair	(14 - 20): Off flavors/aromas or major style deficiencies. Unpleasant.
Problematic	(00 - 13): Major off flavors and aromas dominate. Hard to drink.

Classic Example	<input type="checkbox"/>	Stylistic Accuracy	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Not to Style
Flawless	<input type="checkbox"/>	Technical Merit	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Significant Flaws
Wonderful	<input type="checkbox"/>	Intangibles	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Lifeless

BJCP Beer Scoresheet Copyright © 2017 Beer Judge Certification Program rev. 170612 Please send any comments to Comp_Director@BJCP.org

ANEXO V. ANÁLISIS DEL MAESTRO CERVECERO DANIEL AMEZQUITA CERVEZA CEPA PATRÓN.



BEER SCORESHEET

http://www.bjcp.org AHA/BJCP Sanctioned Competition Program http://www.homebrewersassociation.org



Judge Name (print) Daniel Amezcua

Judge BJCP ID _____

Judge Email amezcua@daniel
Use Avery label # 5160

Category # 30 Subcategory (a-f) A Entry # _____

Subcategory (spell out) 25B

Special Ingredients: Cardamomo, Piñón, rosa

Bottle Inspection: Appropriate size, cap, fill level, label removal, etc.

Comments _____

BJCP Rank or Status:

Apprentice Recognized Certified

National Master Grand Master

Honorary Master Honorary GM Mead Judge

Provisional Judge Rank Pending Cider Judge

Non-BJCP Qualifications:

Professional Brewer Beer Sommelier GABF/WBC

Certified Cicerone Adv. Cicerone Master Cicerone

Sensory Training Other _____

Aroma (as appropriate for style) _____ 10 /12

Comment on malt, hops, esters, and other aromatics

Las adiciones de especias, seguido de los
maltas y un agradable final de lupulo

Appearance (as appropriate for style) _____ 3 /3

Comment on color, clarity, and head (retention, color, and texture)

Color dorado, intenso, retención media baja
Buena carbonatación,

Flavor (as appropriate for style) _____ 16 /20

Comment on malt, hops, fermentation characteristics, balance, finish/aftertaste, and other flavor characteristics

Sabor maltoso se combina y juega con
las especias y da un final refrescante
perfecto para resaca

Mouthfeel (as appropriate for style) _____ 4 /5

Comment on body, carbonation, warmth, creaminess, astringency, and other palate sensations

Sensación sedosa y ligera, final seco

Overall Impression _____ 8 /10

Comment on overall drinking pleasure associated with entry, give suggestions for improvement

Un poco picante la resaca, lo que permite
gozar con la amplitud de cuerpo de
resaca

Total _____ 34 /50

SCORING GUIDE

Outstanding (45 - 50): World-class example of style.

Excellent (38 - 44): Exemplifies style well, requires minor fine-tuning.

Very Good (30 - 37): Generally within style parameters, some minor flaws.

Good (21 - 29): Meets the mark on style and/or minor flaws.

Fair (14 - 20): Off flavors/aromas or major style deficiencies. Unpleasant.

Problematic (00 - 13): Major off flavors and aromas dominate. Hard to drink.

Classic Example **Stylistic Accuracy** **Not to Style**

Flawless **Significant Flaws**

Wonderful **Lifeless**

BJCP Beer Scoresheet Copyright © 2017 Beer Judge Certification Program rev. 170612 Please send any comments to Comp_Director@BJCP.org