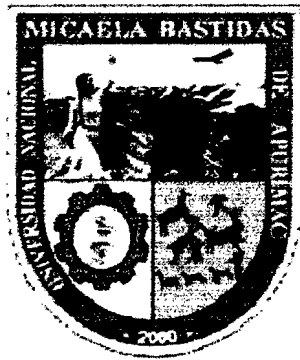


**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA
BASTIDAS DE APURÍMAC**

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**SUSTITUCIÓN PARCIAL DE LÚPULO (*Humulus lupulus*) POR
HARINA DE COCA (*Erythroxylum coca*) EN LA ELABORACIÓN
DE CERVEZA TIPO ALE, UTILIZANDO UNA CEPA NATIVA DE
*Saccharomyces sp.***

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL

LUCIO OTERO ORTIZ

ASESOR: MSc. Víctor H. Sarmiento Casavilca

Abancay – Perú

2010



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURIMAC	
CÓDIGO	MFN :
T IAE 0 2010	BIBLIOTECA CENTRAL
FECHA DE INGRESO:	28 MAR 2012
Nº DE INGRESO:	00227



SUSTITUCIÓN PARCIAL DE LÚPULO (*Humulus lupulus*) POR HARINA DE COCA (*Erythroxylum coca*) EN LA ELABORACIÓN DE CERVEZA TIPO ALE, UTILIZANDO UNA CEPA NATIVA DE *Saccharomyces sp.*



APROBADO POR:

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS
DE APURÍMAC

Ing. M.Sc. Víctor Hugo Sarmiento Casavilca
DOCENTE

MSc. Víctor H. Sarmiento Casavilca
Asesor

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS-APURÍMAC
FACULTAD DE ING. METALURGIA INDUSTRIAL
Ing. Ricardo Paredes Quiroz
D.G. LUIS RICARDO PAREDES QUIROZ
DOCENTE

Ing. Ricardo Paredes Quiroz
Presidente del jurado

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS
DE APURÍMAC
Quim. Melquijades Barragán Condori
DOCENTE

Quim. Melquijades Barragán Condori
Miembro del jurado

Ing. Jorge B. Mendoza Cáceres
DOCENTE
Ing. Jorge B. Mendoza Cáceres
Miembro del Jurado

DEDICO ESTA TESIS

**A MÍ QUERIDA FAMILIA OTERO ORTIZ,
POR SU APOYO Y CONSEJOS
PERMANENTES**



RESUMEN

En la presente investigación se evaluó el efecto de la sustitución parcial del lúpulo por harina de coca en 20% y 30% p/p sobre los valores físicos, químicos y las características sensoriales de sabor, aroma y color, utilizando un 3% y 5% v/v de inóculo, encontrándose que el porcentaje de sustitución no tiene influencia significativa sobre la concentración final de etanol, contrariamente al porcentaje de inóculo, obteniéndose valores promedio de contenido de etanol 5,395% con 3% de inóculo y de 4.975% con 5% de inóculo; en cuanto a la concentración de acidez fija y volátil, el porcentaje de sustitución tiene una ligera influencia que se da de manera inversa respecto al porcentaje de sustitución, hallándose valores de 1.440 g/L y 1.438 g/L con 20% y de 1.335 g/L con 30% de sustitución, respecto al pH tiene la misma incidencia que en la acidez; respecto al peso específico y ácido fosfórico no se encuentra una incidencia significativa en relación al porcentaje de sustitución ni del porcentaje de inóculo encontrándose valores de 1.0088 g/L y 1.0079 g/L para peso específico de 0.036% y 0.037% para el ácido fosfórico.

A cerca del contenido de proteína, la sustitución no presentó influencia, encontrándose valores entre 0.94 g/L y 1.0 g/L. Contrariamente, si presentó una influencia significativa sobre el contenido de calcio, la cual aumenta de manera proporcional al incremento de sustitución, encontrándose valores de 141.42 mg/L con sustitución de 20% y valores de 196.98 mg/L con 30% de sustitución, debido a que la harina de coca presenta un contenido elevado de calcio.

De la misma forma se evaluó la influencia de la sustitución sobre las características de sabor, aroma y color, los análisis estadísticos demostraron que el porcentaje de

sustitución, tienen incidencia significativa sobre los sabores y aromas amargos y a coca en la cerveza, lo cual se da de manera inversamente proporcional. No se encontró una incidencia marcada sobre las otras características de sabor. Asimismo, los análisis estadísticos demostraron que no tienen influencia marcada sobre el color final de la cerveza.

PALABRAS CLAVE: sustitución, inóculo, fermentación.

ABSTRACT

In the present study evaluated the effect of partial substitution of coca flour hops by 20% and 30% p / p on the physical, chemical and sensory characteristics of flavor, aroma and color, using a 3% and 5 % v / v of inoculum and found that the replacement rate has no significant influence on the final ethanol concentration, contrary to the percentage of inoculum, yielding average values of 5.395% ethanol content. with 3% inoculum and 4,975% with 5% inoculum, in terms of concentration of volatile acidity and the replacement rate is a slight given inversely to the percentage of substitution, being values of 1,440 g / L and 1,438 g / L with 20% of 1,335 g / L with 30% substitution with respect to the pH has the same effect that the acidity with respect to specific weight and phosphoric acid is not a significant impact on the replacement rate or the percentage of inoculum finding values of 1.0088 g / L and 1.0079 g / L for weight 0.036% and 0.037% for phosphoric acid.

About the protein, the replacement had no influence, finding values between 0.94 g / L and 1.0g / L. Conversely, if presented a significant influence on the content of calcium, which increases in proportion to the increase of substitution, finding values of 141.42mg / L with 20% replacement value of 196.98mg / L with 30% substitution, because to coca flour has a high calcium content.

In the same way we studied the effect of substitution on the characteristics of flavor, aroma and color, statistical analysis showed that the replacement rate, have a significant impact on the flavors and bitter flavors in beer and coca, which is given inversely proportional. We found no strong impact on other flavor characteristics. Furthermore, statistical analysis showed no marked influence on the final color of the beer.

KEY WORDS: replacement, inoculum, fermentation.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer al doctor Waldir D. Estela Escalante, que ha hecho posible la realización de esta tesis a través de los constantes consejos y apoyo incondicional en las diferentes etapas de realización de la tesis. Y gracias por el optimismo que nos has transmitido en todo momento, que es de vital importancia para los que estamos empezando en esta tarea difícil de la investigación.

Quiero expresar mi mayor gratitud a mi familia, a mis padres, por sus consejos y apoyo moral, a mi madre por ser un gran ejemplo de mujer, a mis hermanos por su apoyo permanente e incondicional y sus palabras de aliento.

Al MSc. Víctor Sarmiento Casavilca por su constante apoyo durante la ejecución de la tesis y por los alcances brindados a la misma.

A mis compañeros de laboratorio Anderson, Jorge, Joseantonio, y Jinmer, con quienes formamos un grupo especial de trabajo y de amistad que durará por el resto de nuestros días.

Así mismo a todas aquellas personas que forman parte de las distintas áreas o departamentos de la universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, que siempre me prestaron su ayuda desinteresada por lo cual han hecho que mi trabajo resulte fácil y fructífero durante su desarrollo.



ÍNDICE

INTRODUCCION	1
2. MARCO TEÒRICO	3
2.1. Generalidades sobre la cerveza	3
2.2. Materias primas utilizados en la elaboración de cerveza	5
2.2.1. Malta	5
2.2.1.1. Malteado	5
2.2.1.2. Proceso de malteado	6
2.2.2. Lúpulo	12
2.2.4. Agua	14
2.2.6. Levadura	15
2.2.6.2. Levadura cervecera	15
2.2.7. Otras materias primas utilizadas en la elaboración de cerveza (adjuntos)	16
2.3. Estudio de la levadura	16
2.3.1. Aislamiento de levaduras	16
2.3.2. Identificación de levaduras	18
2.3.2.1. Estudio fisiológico de las levaduras	19
2.3.2.2. Pruebas bioquímicas	20
2.3.2.3. Métodos moleculares de identificación de levaduras	21
2.3.3. Morfología y composición celular	21
2.4. Coca	22
2.4.1. Valor nutritivo de la harina de coca (<i>Erythroxylum coca</i>)	22
2.4.2. Usos de la coca	24
2.5. Biorreactores	25
2.5.1. Tipos de biorreactores	25
2.6. Proceso tecnológico de elaboración de la cerveza	27
2.6.1. Molienda	27
2.6.2. Maceración	28
2.6.3. Filtración del Mosto	29
2.6.4. Ebullición del Mosto	30
2.6.5. Enfriamiento del Mosto	32
2.6.6. Fermentación	32



2.6.6.1. Principales transformaciones que tiene lugar durante la fermentación	33
2.6.6.2. Efectos durante la fermentación	36
2.6.7. Maduración	37
2.6.8. Filtración	38
2.6.9. Envasado	39
2.7. Tipos de cerveza	39
2.8. Tipos de fermentaciones	39
2.8.1. Fermentación alta o cervezas <i>ale</i>	40
2.8.2. Fermentación baja o cervezas <i>Lager</i>	40
2.9. Control de calidad de la cerveza	40
2.9.1. Calidad sensorial	40
2.9.2. Calidad microbiológica de la cerveza	42
2.9.3. Calidad nutricional	44
2.9.4. Calidad funcional	46
3. PARTE EXPERIMENTAL	
3.1. Elaboración de cerveza con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca	47
3.1.1. Preparación de inóculo	47
3.1.2. Fermentación en biorreactor	47
3.2. Evaluación de la calidad de la cerveza	50
3.2.1. Evaluación físico y químico	50
3.2.2. Evaluación sensorial	50
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Análisis físicos y químicos de la cerveza durante la fermentación	53
4.2. Análisis físicos y químicos de la cerveza madura	57
4.2.1. Análisis del contenido de proteína y calcio	58
4.3. Análisis sensorial	63
4.3.1. Sabor y aroma	63
4.3.2. Color	69
4.3.3. Aceptabilidad	70

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
5.1. Conclusiones	72
5.2. Recomendaciones	74
BIBLIOGRAFÍA	75



LISTA DE TABLAS

Tabla 01: Contenido porcentual de los componentes de lúpulos comerciales	13
Tabla 02: Composición de la célula de levadura	22
Tabla 03: Valor nutricional de las hojas de coca por cada 100 g.	23
Tabla 04: análisis fisicoquímico de la cerveza madura	57
Tabla 05: Promedio de puntuaciones obtenidas durante la evaluación sensorial de sabor y aroma en las cervezas elaboradas.	64
Tabla 06: Promedio de los valores de percepción de color realizado en las cervezas con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca.	69
Tabla 07: Aceptabilidad por el consumidor de las diversas muestras de cerveza elaborada con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca.	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Degradación enzimática del almidón	29
Figura 02: Proceso de isomerización de la humulona en iso-humulona	30
Figura 02: ruptura de los puentes de hidrogeno en la estructura terciaria de la proteína	31
Figura 03: Ciclo de los ácidos tricarbónicos (ciclo de Krebs)	34
Figura 04: Ciclo de Embden-Meyerhof-Parnas	36
Figura 05: Diagrama de flujo de la elaboración de cerveza sustituyendo parcialmente lúpulo con harina de coca.	49
Figura 06: Biorreactor utilizado durante la fermentación de cerveza tipo ale con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca.	52
Figura 07: Cerveza tipo ale obtenidas con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca.	52
Figura08: Progreso de la disminución del pH y aumento de la acidez (g/L) respecto al tiempo de fermentación.	53
Figura09: Progreso de la producción de etanol durante la fermentación de cerveza con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca.	54
Figura 10: Variación de los valores de densidad del mosto durante el proceso de fermentación de cerveza	56
Figura 11: Contenido de proteína de las cervezas obtenidas con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca.	59
Figura 12: (a) Diagrama de Pareto estandarizada para proteína, (b) Efectos principales para proteína.	60



Figura 13: Contenido de calcio de las cervezas obtenidas sustituyendo parcialmente lúpulo por harina de coca	61
Figura 14: (a) Diagrama de Pareto estandarizada para calcio, (b) Efectos principales para calcio	62
Figura 20: Atributos sensoriales evaluados en las cervezas tipo ale con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca	68

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1: Hoja de Evaluación del Panel Sensorial

Apéndice 2: Resultados de los análisis físicos y químicos

Apéndice 3: Resultados de análisis de varianza

Apéndice 4: Levaduras

Apéndice 5: Malta

Apéndice 6: Fotografías del germinador, agitador orbital y biorreactor

I. INTRODUCCION

La cerveza es una bebida natural obtenida por fermentación alcohólica de un extracto acuoso de cebada malteada. Las materias primas necesarias para la fabricación de cerveza son cuatro: malta de cebada, agua, levadura y lúpulo, aunque la mayoría de las cervezas comerciales utilizan además otra fuente de hidratos de carbono (habitualmente un cereal no malteado), un antioxidante y un estabilizante de espuma (Lewis y Young, 1995).

La cebada aporta el aroma específico de la cerveza. Los saborizantes amargos proceden de las flores femeninas de la planta del lúpulo. Estos compuestos amargos también tienen importancia tecnológica: precipitan proteínas, estabilizan la espuma y actúan como conservantes (Gonzales y col, 2000) en ocasiones también se aromatizan las cervezas con frutas o algunas yerbas, las cuales también contribuyen de manera directa al flavor final de la cerveza.

No obstante cualquier cerveza contiene más de 400 componentes, muchos de estos componentes proceden de las materias primas y no han sufrido modificaciones en el proceso de elaboración; otros constituyentes, entre los que se encuentran el anhídrido carbónico y el alcohol etílico, son consecuencia de la transformación experimentada por las materias primas. Los componentes de ambos grupos se encuentran siempre presentes en la cerveza y confieren las propiedades nutritivas y funcionales de esta bebida (Williams y Philpott, 1996)

La fabricación de cerveza implica procesos que determinan su calidad final, como son: maceración, filtración, ebullición, fermentación y maduración.

Los objetivos de la investigación fueron los siguientes:

Objetivo general:

Elaborar una cerveza con características de calidad adecuadas sustituyendo parcialmente lúpulo (*Humulus lupulus*) por harina de coca (*Erythroxylum coca*), utilizando una cepa nativa de *Saccharomyces sp.* Para la fermentación alcohólica.

Objetivos específicos:

- Evaluar la relación de sustitución de lúpulo (*Humulus lupulus*) por harina de coca (*Erythroxylum coca*) para obtener una cerveza con características de calidad adecuadas.
- Evaluar la concentración de inóculo durante la fermentación alcohólica en las características sensoriales de la cerveza.
- Evaluar las características físicas, químicas y sensoriales de la cerveza elaborada con sustitución parcial de lúpulo (*Humulus lupulus*) por harina de coca (*Erythroxylum coca*).

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades sobre la cerveza

La cerveza es una bebida de bajo grado alcohólico, obtenida de la fermentación alcohólica de un extracto acuoso de cebada malteada. Sus constituyentes provienen de cuatro materias primas principales: malta, lúpulo, agua y agregados. Los agregados son fuentes de carbohidratos tales como arroz, maíz, trigo y otros cereales. El componente más abundante de la cerveza es el agua, que se acompaña de otros compuestos como el etanol, ácidos, compuestos nitrogenados, carbohidratos, sales minerales, vitaminas, sustancias espumantes, sustancias aromáticas y compuestos fenólicos (Gonzales y col, 2001; Castañe, 1997 y Lewis y Young, 1995).

Con el empleo de la microscopía de barrido electrónico, se ha demostrado que algunos granos habían germinado antes de ser triturados y usados en la producción de la cerveza; los granos de almidón de tales muestras recuperados mostraron los signos característicos causados por el ataque enzimático. Los granos sin germinar también fueron utilizados y parecían haber sido cocidos con agua caliente antes de ser fermentados. De la misma forma, existe evidencia de haberse utilizado granos tostados, supuestamente para impartir color y aroma (flavor) al producto. La abundancia de lactobacilos en algunos de los nichos cervecedores, indican que estos microorganismos intervinieron o participaron en la fermentación junto con la levadura (Hornsey, 2003).

Las prácticas de elaboración de cerveza floreció en Egipto hasta final del ciclo octavo después de Cristo, en que los árabes musulmanes conquistaron la región (el Corán prohíbe la fabricación, venta y consumo de bebidas alcohólicas), aunque el arte de la elaboración de la cerveza se había difundido más allá de los confines del Oriente Medio; los comerciantes hacia y desde la región, heredaron los fundamentos esenciales de la fabricación de la cerveza, extendiéndose así las técnicas (Hornsey, 2003).

Durante la época medieval, la actividad cervecera quedó más o menos confinada a los monasterios, tanto en las Islas Británicas como en la Europa continental. Muchos de nuestros estilos de cerveza actuales datan de aquellos tiempos (cervezas de fermentación baja y alta) (Hornsey, 2003 y Barbados, 2003).

Los lúpulos fueron usados por primera vez en el año 736 d.C. por los frailes cerveceros de la región Hallertau de Baviera y su uso fue generalizándose gradualmente por el Norte de Europa continental, aunque no alcanzó las Islas Británicas hasta 1524, vía los colonos flamencos de Kent (Hornsey, 2003).

En el siglo XIV surgen grandes fábricas de cerveza en Alemania de gran reputación por su calidad y con un producto muy exportable. En 1376, en el mayor centro cervecero del mundo en esta época, Hamburgo. Hacia finales del siglo XVI se produjo una cierta recesión de la producción cervecera alemana, que coincidió con el auge de la británica. Así, las cervezas de las islas llegaron a imponerse en el mercado francés (Barbados, 2003).

En 1516, las autoridades bávaras introdujeron las leyes de pureza de la cerveza (Reinheitsgebot) que restringieron las materias primas aptas para su elaboración a cebada malteada, agua y lúpulo. Faltaba un pequeño detalle que sería descubierto recién más de tres siglos después: la levadura (Barbados, 2003).

En el siglo XX y actualmente la cerveza es conocida en todo el mundo: Europa, América, África y en China y Japón (Barbados, 2003).

2.2. Materias primas utilizados en la elaboración de cerveza

Para la elaboración de la cerveza se utilizan diversas materias primas como la cebada, el arroz, el mijo, etc. cada una de las cuales tienen una importancia imprescindible en el proceso y además le brinda las propiedades nutricionales y organolépticas características, estas se detallan a continuación:

2.2.1. Malta

Se entiende por malta a la cebada seleccionada que se sometió a un proceso de germinación y secado para activar los procesos enzimáticos del grano que ocurren durante la germinación, para luego utilizarlo en el proceso de elaboración de la cerveza (Barbado, 2003).

2.2.1.1. Malteado

El objetivo del malteado es preparar y transformar las reservas nutritivas del grano a sustratos apropiados para macerar, en el proceso de elaboración de cerveza (Hornsey, 2003).

En este proceso el embrión pasa del estado de vida latente a un estado de actividad, induciéndose la secreción de diversas enzimas que difunden por todo el endospermo. Este comienzo de la germinación es el malteado y a la cebada germinada y tostada se la denomina malta (Moralejo, 1993).

2.2.1.2. Proceso de malteado

El proceso de malteado comprende varias etapas para asegurar la transformación del almidón de la cebada en azúcares más simples que sean fácilmente asimilables por las levaduras, estas etapas comprenden:

a. Remojo

Para comenzar el malteado los granos se remojan con agua para aumentar su contenido de humedad, hasta el que necesite la germinación, normalmente 42-46%. Para entonces, es probable que el grano haya comenzado a germinar (revelar raicillas) (Hough, 1990 y Hornsey 2003).

En el remojo, el contenido en agua de los granos aumenta rápidamente a partir de la inmersión, pero la velocidad de incremento del contenido de agua desciende luego de un modo progresivo. La velocidad de la rehumidificación es función de las condiciones de cultivo de la cebada, de la variedad de esta, del tamaño de los granos y de la temperatura del agua. Está también considerablemente influida por el daño mecánico que hayan podido sufrir los granos antes del remojo (Hough, 1990).

Los granos no solamente se remojan en agua estática, sino que se someten a periodos intensivos de drenaje (llamadas paradas de aireación), en los que se hace pasar aire a través de la cuba de remojo. Esto permite dispersar el dióxido de carbono, favoreciendo así la germinación. Los ciclos de remojo dependen de la eficiencia del equipo disponible, aunque un ciclo habitual podría ser: (Hornsey, 2003)

- 8 horas de remojo (humedad hasta 32-34%)
- 14 horas de drenado
- 8 horas de remojo (humedad hasta 38-42%)
- 10 horas de drenado
- 8 horas de remojo (humedad hasta 44-46%)

Los granos cuando muestran los primeros signos de germinación, en forma de un pequeño brote, se transfieren entonces a la zona de germinación. Si el agua es muy escasa en la fase de remojo, los granos desarrollan un germen o embrión débil (raicillas largas) y deficiente degradación y finalmente poco extracto cervicero. El remojo excesivo, produce super degradación y altas pérdidas en el malteado e incluso la muerte del germen (Hornsey, 2003).

b. Germinación

La germinación se realiza tradicionalmente, con una capa de grano de un grosor de unos 20-25 cm. A medida que transcurre la germinación, se genera calor a causa del metabolismo, que se disipa mediante un rastrillo o volteo regular con

palas (Horssey, 2003 y Hough, 1990). Esta acción permite eliminar el dióxido de carbono producido por respiración; proporciona aire fresco a los embriones; iguala las temperaturas, que tienden a elevarse en virtud de la respiración y evita el enraizamiento, es decir que las raicillas se entrelacen y formen una red. La velocidad de crecimiento de las raicillas, una vez que han comenzado a salir de la vaina de la raíz es grande (Hornsey, 2003).

La temperatura se mantiene en torno a los 15 – 19°C, el tiempo de germinación puede realizarse de 4 días hasta 6 días (Hough, 1990). Si la temperatura sube demasiado, la capa debe esparcirse para que sea más delgada y, por el contrario, si la temperatura ambiental descende, la capa deberá amontonarse y hacerse más gruesa (Hornsey, 2003).

El control de la humedad es importante, al objeto de evitar la desecación excesiva de los granos para lo cual se hace pasar de abajo a arriba una corriente de aire saturado de agua a unos 15°C con lo que se asegura la disponibilidad de oxígeno por parte de los embriones, la eliminación del dióxido de carbono y el mantenimiento de una temperatura constante en todo el lecho (Hough, 1990).

El primer signo de la germinación propiamente dicha, es la protuberancia de la coleoriza o camisa de la raíz. Este es el indicador del maltero, que se encuentra en la base del grano, posteriormente producirá raicillas o brotes. En este momento el coleoptilo, conteniendo la primera hoja, crece hasta el ápice del grano, entre el epispermo y el pericarpio, a este crecimiento se denomina

plúmula y sirve al maltero para estimar la velocidad de germinación. Cuando la plúmula alcanza aproximadamente tres cuartos de la longitud del lado dorsal del grano, el proceso de germinación se considera completo, debiendo evitarse entonces todo crecimiento ulterior, lo que se realiza calentando en horno (Hornsey, 2003).

Principales sucesos durante el germinado

Desde el punto de vista fisiológico, existe una continuidad entre el remojo y la germinación, como las reservas de nutrientes inmediatamente disponibles son limitadas, resulta necesario movilizar las del endospermo, mucho más abundantes, lo que se logra merced a la secreción por el embrión o el escutelo de enzimas que degradan las proteínas, el almidón y las paredes celulares del endospermo (Hough, 1990). El grano de cebada sin maltear contiene cantidades considerables de β -amilasa latente, en forma tanto soluble como insoluble. Durante el malteado, la enzima se solubiliza totalmente (Hornsey, 2003).

La α -amilasa se produce durante el malteado como respuesta al ácido giberélico (formación de α -amilasa influenciada por la giberelina). El ácido giberélico, es producida por el embrión durante la germinación y es transportado durante el proceso de malteado a la capa de aleurona, donde realmente estimula la producción de enzimas a partir de precursores complejos o bien de los aminoácidos (Hornsey, 2003 y Hough, 1990). Además de la α -amilasa, el ácido giberélico también provoca la activación de endo β -glucanasa, pentosanas, endoproteasas dextrinasa límite. Hacia el final del proceso de malteado, las

diversas enzimas líticas (degradativas) provocadas por el ácido giberélico, han sido transferidas al endospermo donde causaran la modificación de la textura del almidón, de una masa amorfa a un sustrato más degradable (Hornsey, 2003). La degradación enzimática del endospermo avanza, por tanto, del extremo embrionario del grano al extremo distal del mismo y de las capas externas a las más internas. (Hough, 1990).

Los aspectos prácticos más importantes del malteado son la degradación de los β -glucanos de la pared celular del endospermo (por las glucanasas) y la consiguiente exposición de las partes proteicas, que rodean a los gránulos de almidón, al ataque de las proteasas. Lo ideal, es que un 75% del β -glucano de las paredes celulares sea degradado y que alrededor del 40% de la proteína sea solubilizado (Hornsey, 2003).

Durante el malteado, el almidón de la cebada se degrada fundamentalmente a una mezcla de moléculas de poliglucosa, algo menos complejas que las originales. Para los procesos respiratorios y biosintéticos embrionarios, solo se libera una cantidad limitada de azúcares simples. Las enzimas capaces de degradar en la cebada el almidón no gelatinizado son: fosforilasa, α glucosidasa, α amilasa, β amilasa y enzimas desramificadores (Hough, 1990) La excesiva hidrólisis del almidón durante el malteado determina un excesivo crecimiento del embrión que proporciona extractos pobres para cervecería (Hornsey, 2003).

c. Secado y tostado

El proceso de germinación es detenido desecando los granos de malta. Se pueden obtener una malta poco degradada para malta lager; mas desagregada para ale; o malta muy desagregada para ser usada en las destilerías y en la elaboración de vinagre (Hough, 1990).

Son numerosos los factores que afectan a la velocidad de deshidratación del grano; cabe citar entre ellos: el volumen de aire que pasa a través del lecho de grano, la profundidad del lecho, el peso del agua a ser eliminado del lecho del grano, la temperatura del aire utilizado para la deshidratación, la humedad relativa del aire y el carácter higroscópico de la malta (Hough, 1990).

Al término de la germinación, el contenido de humedad es de un 45%. Esta fase secado tostado puede durar entre 16 y 60 horas (Hornsey, 2003). Las temperaturas tienen que controlarse muy cuidadosamente, secando la malta verde lo más rápido posible, sin destrucción de las enzimas producidas durante el malteado, estas enzimas son muy vulnerables cuando el grano está húmedo y por lo tanto las temperaturas al comienzo del secado son bastante bajas 50-70°C. en tal momento, la temperatura real de los granos estará en la región de 25-30°C (Hornsey, 2003 y Hough, 1990). La actividad enzimática durante esta fase, especialmente de proteasa y amilasas se encuentra potenciada, desarrollando colores como consecuencia de una reacción de aminoácidos y azúcares, que producen las llamadas melanoidinas. Cuando la malta haya alcanzado el 15-18

% de humedad, las proteínas se hacen estables, lo que se denomina punto de ruptura (Hornsey, 2003).

En esta etapa, el agua de la cebada se extrae sin restricciones y por razones económicas se ajusta el flujo de aire de manera que su humedad relativa sea del 90-95% en el aire del extremo de salida. Cuando se ha eliminado aproximadamente el 60% del agua, la deshidratación subsiguiente se ve dificultada por la naturaleza ligada del agua residual. Llegado este punto de ruptura se sube la temperatura del aire de entrada a 65-75°C y se reduce aún más la velocidad de flujo. La extracción del agua es lenta. Finalmente, a una humedad de 5-8%, dependiendo de la variedad de la cebada, la temperatura del aire de entrada se eleva a 80 – 100°C, hasta que se alcance el color y la humedad requeridos. Las maltas lager típicas se secan hasta una humedad del 4,5%, pero las maltas ale se deshidratan hasta un contenido de agua de un 2-3% (Hough, 1990).

2.2.2. Lúpulo

El lúpulo (*Humulus lupulus*), es una planta perteneciente a la familia de las cannabinaceas, es dioica, presentando flores masculinas y femeninas en plantas diferentes (Hornsey, 2003 y Hough, 1990).

El lúpulo se cultiva sólo en climas templados y resiste al invierno como un rizoma (Hough, 1990). Para satisfacer las necesidades de la industria cervecera, ahora el lúpulo se cultiva en todas las regiones templadas del mundo y a ello se debe, que



las especies dentro del conjunto, muestren considerable variación (Hornsey, 2003).

La mayoría del amargor propio del lúpulo está concentrada en la fracción de resina blanda, la cual a su vez puede dividirse en dos categorías principales, según su reacción con solución de acetato de plomo. Se forma un precipitado amarillo, que representa la fracción de α -ácidos. El sobrenadante, representa la fracción de β -ácidos (Hornsey, 2003 y Hough, 1990).

Tabla 01: Contenido porcentual de los componentes de lúpulos comerciales

Componente	% de la muestra
Agua	10,0
Resinas totales	15,0
Aceites esenciales	0,5
Taninos	4,0
Pectina	2,0
Lípidos y ceras	3,0
Monosacáridos	2,0
Proteínas (Nx6,25)	15,0
Aminoácidos	0,1
Celulosa y lignina	40,4
contenido de ceniza	8,0

Fuente: Hough, (1990)

Los principales α -ácidos son humulona, cohumulona y adhumulona, mientras que los β -ácidos más importantes son la lupulona, colupulona y adlupulona (Hornsey, 2003). Los α -ácidos humulonas constituyen el principal componente amargo de la cerveza. Los β -ácidos, o lupulonas, forman una familia de compuestos similares, pero menos importantes (Hough, 1990).

Los realmente importantes para el fabricante de cerveza son los relativos a resinas y aceites esenciales, las cuales se muestran en la tabla 01. Sin embargo, y aunque en pequeñas cantidades, durante la elaboración de cerveza se extraen proteínas, aminoácidos y azúcares. (Hough, 1990).

Durante la cocción del lúpulo, o sus productos, en el mosto, los α -ácidos se organizan o isomerizan. Los compuestos generados, iso α -ácidos o ishumulonas, son mucho más amargos y mucho más solubles que los α -ácidos. Los β -ácidos tienden, por el contrario, a oxidarse durante la ebullición, para dar una serie de derivados amargos y no amargos (Hough, 1990).

2.2.4. Agua

Para la elaboración de la cerveza es suficiente que el agua sea potable, es decir, que no contenga bacterias patógenas que puedan provocar enfermedades al ser humano. Para la elaboración de diferentes estilos de cerveza es necesario que el agua tenga las mismas características que el agua de la ciudad de donde procede este estilo de agua (Barbado, 2003).

El agua, de forma natural, contiene una cierta cantidad de sales que influyen de manera definitiva en la calidad final de la cerveza. En muchos casos esa influencia es norme, llegando a determinar las típicas características de cervezas como la Pilsen, Burton, etc. (Madrid, 2001).



La dureza del agua es uno de los parámetros fundamentales. Las cervezas ligeras necesitan un agua con bajo contenido en sales carbonatadas. Las cervezas fuertes y oscuras admiten aguas más duras (Madrid, 2001).

2.2.6. Levadura

Las levaduras son hongos unicelulares que se reproducen principalmente por gemación, son organismos eucarióticos (Adams *et al*, 1998),

Las levaduras son las causantes principales de la fermentación de los alimentos, lo cual puede ser perjudicial (deterioro) o favorable (producción de cervezas, vinos, pan, quesos, enzimas, etc.) (Adams *et al*, 1998).

2.2.6.2. Levadura cervecera

Saccharomyces cerevisiae tiene como característica que al final de la fermentación se va al fondo del tanque, se conoce como levaduras de profundidad y su temperatura óptima de fermentación es de 10-14 °C (Aguilar, 2003).

Una célula de levadura cervecera típica tiene, cuando se halla plenamente desarrollada, entre 8 y 14 μm de diámetro y una masa de materia seca de 40 pg. Por tanto 10^{12} células desecadas pesan unos 40 g., prensadas, ese mismo número de células pesan unos 200 g (Hough, 1990).

Tienen gran importancia en el proceso de la fermentación de la cerveza, ya que son las responsables de la transformación del mosto cervecero en cerveza y CO_2

por medio de la asimilación de los azúcares simples que conforman el mosto cervecero. Muchas veces las levaduras son consideradas como un sub producto que es recuperable y contribuye a un menor costo de producción. (Broderick, 1977).

2.2.7. Otras materias primas utilizadas en la elaboración de cerveza (adjuntos)

Cualquier producto distinto a la malta que se use en el proceso cervecero para producir extracto en la cuba de maceración (Hornsey, 2003).

Los cereales con altas temperaturas de gelatinización del almidón como arroz, maíz y sorgo, frecuentemente son fragmentados en pequeñas partículas llamadas grits o sémola antes de la cocción y la subsiguiente introducción a la cuba de mezcla. Técnicamente es posible producir cerveza aceptable con un 5% de sémola de malta y un 95% de adjuntos, siempre que se incorporen a la cuba de mezcla enzimas producidas industrialmente (Hornsey, 2003).

2.3. Estudio de la levadura

2.3.1. Aislamiento de levaduras

Este es un proceso dinámico, de forma que, al comienzo de la fermentación van a ser numerosas las diferentes especies de levaduras presentes en el mosto, para ir disminuyendo a lo largo del proceso el número de las mismas, hasta llegar en la fase postfermentativa a predominar una/s especie/s. La evolución que se produce

en la flora blastomicética es debida a cambios en el medio de desarrollo (Ruiz *et al*, 1986).

Los aislamientos que se realizan para llevar a cabo la identificación de la flora levaduriforme de un mosto determinado se han de efectuar en tres momentos muy bien definidos del proceso fermentativo:

El primero de los aislamientos mencionados, se ha de efectuar durante este periodo de inducción o fase I, cuando el desprendimiento de anhídrido carbónico no es perceptible. En este momento, las condiciones del medio prácticamente no se modifican para una serie de parámetros tales como el pH y los nutrientes. Sin embargo, y de una forma muy rápida, la concentración de oxígeno en el mosto disminuye a causa del consumo celular. El medio anaerobio inhibe el crecimiento de las especies oxidativas, favoreciéndose por el contrario el de las especies de menor poder fermentativo. Como especie de alto poder fermentativo más representativa que se aísla de forma habitual en esta fase cabe destacar a *Saccharomyces Cerevisiae* (Lagos, 1999).

Un segundo análisis del mosto, del contenido levaduriforme de éste, se ha de realizar cuando se encuentra en fermentación tumultuosa (fase II) y el desprendimiento de CO₂ es máximo. En este momento la temperatura del mosto crece de forma considerable, y la velocidad fermentativa es máxima. En esta fase no se suele encontrar un predominio claro entre las especies de alto y bajo poder fermentativo. Sin embargo, ya a este nivel si se origina una importante

disminución de la diversidad de especies que permanecen viables en el mosto (Lagos, 1999). Generalmente, aparecen en este momento especies de poder fermentativo intermedio del tipo *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces uvarum* y *Kluyveromyces veronae*. De idéntica forma que en la primera fase, la especie de alto poder fermentativo predominante es *Saccharomyces cerevisiae*. El desarrollo del proceso fermentativo hace que la concentración de alcohol vaya incrementándose. Este aumento del grado alcohólico origina una disminución de la multiplicación celular y suprime las levaduras poco tolerantes al mismo (Sánchez y col, 1985).

Finalmente un tercer aislamiento se ha de realizar en la fase post fermentación tumultuosa que se corresponde con el descenso en la intensidad fermentativa (fermentación lenta o fase III). La fermentación se hace lenta, y una fuerte disminución en el desprendimiento de CO₂ nos indica el inicio de esta tercera fase. En este momento, la concentración de etanol suele ser muy elevada, los nutrientes escasos y el pH bastante bajo (Lagos, 1999).

En estas condiciones el número de especies que son capaces de sobrevivir en el mosto es mínimo, no resultando extraño que las especies aisladas en esta fase se reduzcan a una sola especie predominante, generalmente *Saccharomyces cerevisiae*, quien finalmente es la responsable de terminar la fermentación (Lagos, 1999).

2.3.2. Identificación de levaduras

La caracterización de levaduras hasta el nivel de especie es de relevancia desde el punto de vista industrial, debido a que muchos grupos forman parte de la microflora natural de alimentos y bebidas fermentadas y/o participan en el proceso de obtención de éstos (Fernández y col, 2000). De ahí la necesidad de poseer métodos de identificación rápidos, precisos y fáciles, que puedan ser aplicados al control de la calidad en la industria, con el fin de asegurar que la cepa de partida, la que conduce el proceso y la que rinde el producto final, sea la misma (Fernández y col, 2000). Las áreas de comparación taxonómica en las cuales se enmarca la taxonomía de levaduras incluyen la Morfología, Fisiología, Genética, Bioquímica, Ecología y Biología Molecular (Boekhout y Kutzman, 1996).

2.3.2.1. Estudio fisiológico de las levaduras

De forma convencional, la identificación de levaduras se ha basado en criterios morfológicos o fisiológicos (Barnett y col, 1990; Kreger-van, 1984). Sin embargo, estas características pueden variar en función de las condiciones de cultivo (Scheda y Yarrow, 1966 y 1968; Yamamoto y col, 1991), y en ocasiones, las especies están delimitadas por una única característica fisiológica controlada por un solo gen.

La identificación en base a las características morfológicas y fisiológicas requiere la realización de unas 100 pruebas, lo cual es laborioso, complejo y consume tiempo (Esteve y col, 1999). Se estudia la morfología del estado asexual y sexual,

presencia de homo y heterotalismo, etc., características que solo permiten la identificación hasta el nivel de género (Boekhout y Kutzman, 1996).

Las principales pruebas fisiológicas utilizadas en identificación de levaduras son las de fermentación, asimilación de fuentes de carbono, asimilación de compuestos nitrogenados, requerimientos vitamínicos, resistencia a cicloheximida y termotolerancia. Éstas no siempre son estables ni reproducibles, debido a que las fuentes de carbono y nitrógeno pueden metabolizarse por rutas comunes y en ocasiones su metabolismo es controlado por varios genes (Boekhout y Kutzman, 1996; Loureiro y Querol 1999). La prueba de fermentación de azúcares no es muy exacta debido a que las levaduras de fermentación lenta no liberan el CO₂ de forma tan inmediata para que sea atrapado en un tubo Durham, lo cual ha provocado que especies consideradas durante mucho tiempo no fermentativas, hayan tenido que reclasificarse (Boekhout y Kutzman 1996).

2.3.2.2. Pruebas bioquímicas

Los métodos bioquímicos para la diferenciación de levaduras, están basados en el análisis de proteínas totales de la célula (Vacannet y col, 1991; Van Vuuren y Van der Meer, 1987), patrones de isoenzimas (Duarte y col, 1999) de Resonancia Magnética Nuclear, el número de unidades de isopreno en la coenzima Q (Boekhout y Kutzman, 1996; Loureiro y Querol, 1999), y análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases (Cottrell y col, 1986; Moreira da Silva *et al*, 1994; Tredoux y col, 1987). Estos métodos son más rápidos y más fácilmente estandarizables. Sin embargo, la reproducibilidad de estas técnicas es cuestionable

ya que depende del estado fisiológico de las levaduras que puede variar según las condiciones de cultivo (Golden *et al*, 1994, Boekhout y Kutzman, 1996; Loureiro y Querol, 1999).

2.3.2.3. Métodos moleculares de identificación de levaduras

Los métodos moleculares basados en el polimorfismo de los ácidos nucleicos constituyen la mejor alternativa a los métodos tradicionales, ya que al no depender del estado fisiológico de la célula, son más reproducibles. Además, poseen otras ventajas como la elevada precisión y discriminación, así como rapidez y sencillez en la realización de la técnica. Esta técnica permite la identificación a nivel de especie y a nivel de cepa (Martorell, 2006).

Los métodos moleculares de identificación de levaduras y microorganismos en general, se basan en el estudio de las moléculas de DNA y RNA. En levaduras se iniciaron con el estudio de complementariedad del DNA nuclear, determinándose la existencia de relaciones coespecíficas entre cepas cuyos caracteres fisiológicos y morfológicos considerados determinantes para discernir entre especies eran diferentes (Kurtzman, 1994).

2.3.3. Morfología y composición celular

Saccharomyces cerevisiae tiene forma esférica, elipsoide u ovoide. Su tamaño varía con la edad de la célula pero generalmente oscila entre 4 y 14 micras. Puede vivir aislada o formando colonias (Aguilar y Fran Yios, 2003). Presenta ascos con hasta 4 ascosporas esféricas o elipsoides y de pared lisa en su interior. Las

colonias en agar sabouraud son cremosas, blandas, de color crema o blanco, con apariencia húmeda y brillante y con bordes irregulares (White, 1995).

Tabla 02: Composición de la célula de levadura

COMPONENTE	CANTIDAD
P-glucanos (polisacárido)	40%
Mananos (polisacárido)	40%
Proteínas	8%
Lípidos (grasas)	7%
Sustancias inorgánicas	3%
Hexosamina y quitina	2%

Fuente: White, 1995

2.4. Coca

Es una planta oriunda de Sudamérica cuyo nombre científico es *Erythroxylum coca*, de la que existen más de 250 especies. En la actualidad crece principalmente en Colombia, Perú, Bolivia, norte de Argentina. Contiene altas cantidades de nutrientes (calcio, hierro, tiamina, caroteno, fósforo, entre otros), además de 14 alcaloides (Machado, 1969, Plowman, 1979, Collazos y col, 1965 y Cabieses, 1978).

2.4.1. Valor nutritivo de la harina de coca (*Erythroxylum coca*)

Uno de los argumentos más alegados en la defensa del uso de la coca es su valor nutritivo. Varios estudios lo han confirmado, entre los que sobresalen los de Collazos, Urquieta y Alvistur (1965), Carter y Mamani (1978), Escobar (1994) y Serrano (1994), en el Cusco, quienes analizaron los componentes y las cantidades

de nutrientes que poseen las hojas y desarrollaron productos alimenticios experimentales como los elaborados por Urrunaga (1994) en el Cusco.

Tabla 03: Valor nutricional de las hojas de coca por cada 100 g.

CONSTITUYENTES	UNIDAD	VALORES ENCONTRADOS
Proteína	g	17.8-22.6
Humedad	%	7.2-8.0
Grasa	g	3.4-4.6
Ceniza	g	4.6-8.8
Fibra cruda	g	13.8-17.2
Carbohidratos	g	41.0-50.8
Calorías	cal	281.0-315.0
Alfa caroteno	mg	1.7-4.7
Beta caroteno	mg	5.8-20.0
Vit. A	ui	12,000-35,600
Vit. C	mg	3.2-10.5
Vit. E	mg	15.0-68.4
Tiamina	mg	0.6-0.8
Riboflavina	mg	0.8-0.9
Niacina	mg	6.0-11.0
Calcio	mg	686.0-2,097.0
fosforo	mg	206.2-1,114.0
Potasio	mg	1,545.0-1,985.0
Magnesio	mg	194.0-470.7
Sodio	mg	39.4-39.6
Aluminio	mg	10.2-32.3
Bario	mg	0.3-13.7
Hierro	mg	13.7-43.2
Estroncio	mg	1.0-16.6
Boro	mg	2.8-10.4
cobre	mg	1.0-1.4
Zinc	mg	1.7-2.7
manganeso	mg	6.9-12.7
Cromo	mg	0.1-0.15
Total alcaloides	g	0.25-2.25

Fuente: Hurtado, 2006

Las hojas de coca integrales contienen todos sus componentes naturales: hidratos de carbono, proteínas, caroteno, tiamina, riboflavina, vitamina C, niacina, calcio, fósforo, hierro, sodio, potasio y alcaloides naturales entre los que se encuentra la cocaína (Llosa y col, 2006).

2.4.2. Usos de la coca

Existen referencias que indican que desde épocas preincaicas la planta coca ha sido utilizada para una serie de actividades laborales, sociales, rituales religiosos y medicinales. Sin embargo, muy pocos saben que hace más de cien años existió un millonario imperio europeo desarrollado con la coca andina. Pero el auge comercial e industrial de la coca y su internacionalización comenzó en Europa después de 1860 en que se aisló su alcaloide cocaína, con la cual se prepararon decenas de medicinas, cremas, bebidas infusiones, lociones, pastas, harinas, alimentos, energizantes, pomadas y anestésicos que hicieron aun más famosa a la descubierta cocaína hasta que se evidenciaron reacciones tóxicas y adictivas por su mal uso o por su uso exagerado o inadecuado, por lo que la cocaína se retiró de los mercados farmacéuticos. (Llosa y col, 2006).

Decenas de productos a base de hojas de coca se vendían libremente y una gran industria y un variado e internacional comercio fue desarrollado por muchas personas, cuyas máximas expresiones fueron el famoso *Vino Mariani* y la bebida no alcohólica *Coca Cola*, que es la única sobreviviente de aquella época de oro. A más de 100 años de esa historia que parece cuento de hadas, sólo existe una tímida industria, en gran parte artesanal y limitadamente moderna industrial en Bolivia

(Coincoca), Colombia (Coca Sek) y Perú, especialmente en la línea de mates y mixturas aromáticas, emolientes, galletas y golosinas diversas como caramelos y toffees, chocolates, licor de coca, cremas, jabones, lociones, bebidas energizantes harina de coca, cápsulas energizantes de coca conteniendo harina de coca micropulverizada, multicereales reportenciados con harina de coca, y últimamente un desarrollo de productos fundamentalmente a base de harina de coca. A ello hay que añadir la artesanía de joyas que utiliza hojas de coca decorativas y la industria bibliográfica sobre la coca y sus derivados (Llosa y col, 2006).

2.5. Biorreactores

Un biorreactor es un equipo en el que se pueden realizar reacciones bioquímicas para convertir cualquier sustrato en un producto de utilidad por la acción de biocatalizadores (enzimas, células o estructuras subcelulares) (Chisti y Moo-Young, 2002), proporcionando un medio controlado que permite el crecimiento eficaz de las células y la formación de un producto (Ward, 1991). Los biorreactores se emplean en la manufactura de productos comerciales como metabolitos primarios (ácido acético, acetona, alcohol, ácidos orgánicos, aminoácidos, vitaminas y polisacáridos); metabolitos secundarios (antibióticos); enzimas industriales; cultivo de células (biomasa) y tratamiento de aguas residuales (Chisti, 1989; Smith, 1996).

2.5.1. Tipos de biorreactores

Existen distintos tipos de biorreactores, básicamente tres (McNeil y Harvey, 1990):



- Fermentadores bucle agitado por aire (air-lift)
- Fermentadores de torre
- Fermentadores con agitación mecánica

El tipo de fermentación a emplear condiciona el diseño de los fermentadores en donde va tener lugar la fermentación, sin embargo, el uso creciente de fermentadores cilindrocónicos y similares hace que la diferencia en función al cumplimiento de la levadura sea cada vez menos determinante (Varnam y Sutherland, 1996).

Las cervezas tipo ale, se fermentan tradicionalmente en depósitos circulares o rectangulares relativamente poco profundos, de los cuales se elimina la levadura de la superficie mediante desnatado. El uso de una fermentación baja en la elaboración de cervezas lager soslaya la necesidad del desnatado pero se utiliza depósitos similares, si bien son muy profundos (Varnam y Sutherland, 1996).

Con fermentadores cilindrocónicos se pueden elaborar cervezas ale como lager y presenta una serie de ventajas derivadas de su estructura geométrica. Entre estas ventajas se encuentra la alta capacidad de fermentación referida a su volumen, la utilización de lúpulo debido a la ausencia de la tela de levadura superficial que absorbe las resinas del lúpulo, baja pérdida de cerveza, eficaz control de la temperatura y facilidad de limpieza. El manejo de la levadura se simplifica por la sedimentación y esta como una masa compacta en el extremo cónico del

fermentador y también esta facilitado la aplicación de CO₂ a presión (Varnam y Sutherland, 1996).

2.6. Proceso tecnológico de elaboración de la cerveza

La cerveza, al igual que otras bebidas similares producidas con cereales, es sometida a fermentación pero no a destilación. Las materias primas que intervienen en el proceso son agua, lúpulo y cebada, suplida a veces por el maíz, el arroz o el azúcar (Hough, 1990).

2.6.1. Molienda

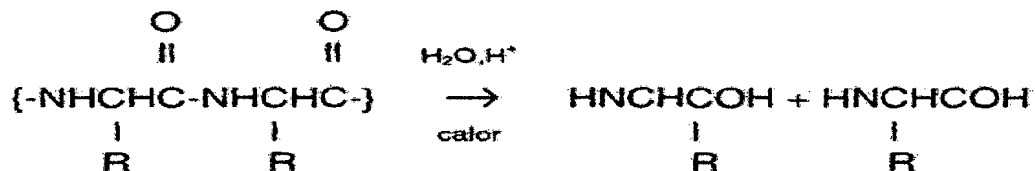
Tanto la malta como los cereales sin maltear (trigo, avena, centeno, maíz, arroz), tienen que pasar por el molino para romper el grano, dando lugar a la harina y otras partes fijas (Hornsey, 2003). Las cáscaras servirán posteriormente como lecho filtrante para la separación del mosto (Madrid, 2001).

La molienda consiste en destruir el grano, respetando la cáscara o envoltura y provocando la pulverización de la harina. La malta es comprimida entre dos cilindros pero evitando destruir la cáscara lo menos posible, pues ésta servirá de lecho filtrante en la operación de filtración del mosto; a su vez el interior del grano en una harina lo más fina posible. Estas dos condiciones, cáscara entera y harina fina no podrán respetarse si el grano no está seco (excepción molienda húmeda) y muy bien desagregado, una tercera exigencia es un buen calibrado de la malta. La molienda debe ser también regulada según el cocimiento posterior (Hornsey, 2003).

2.6.2. Maceración

Consiste en la adición de la harina o sémola de malta (y opcionalmente adjuntos, generalmente en forma de medianos de arroz y maíz como sémola, y jarabes de sacarosa/glucosa) en agua de calidad cervecera para producir soluciones o suspensiones que se procesarán más adelante. El objetivo de la maceración es obtener un alto rendimiento de extracto, de la mayor calidad posible (Canales y col, 2003).

El proceso consiste en agregar a la malta un volumen determinado de agua a una temperatura de 40 °C, con el fin de extraer las enzimas y favorecer la proteólisis; después de esto, la temperatura será mantenida a 50 °C para la proteólisis completa y la peptonización (Prescott, 1962).



Por su parte, el almidón es degradado por la acción de las amilasas, originando glucosa, maltosa y dextrinas a una temperatura óptima de 62-65°C para la obtención de maltosa y de 70-75°C para los otros azúcares y la dextrinización de la parte de almidón que quedase sin transformar por acción de las α – amilasa (Canales y col, 2003). Para obtener un grado de extracción óptimo, se deben controlar muy cuidadosamente algunos parámetros, como la temperatura, pH y tiempo de maceración, así como la relación enzima/substrato (Canales y col,

2003). En esta operación, la relación agua/grano es usualmente de 2,5: 1 y 3:1 (Ward, 1991).

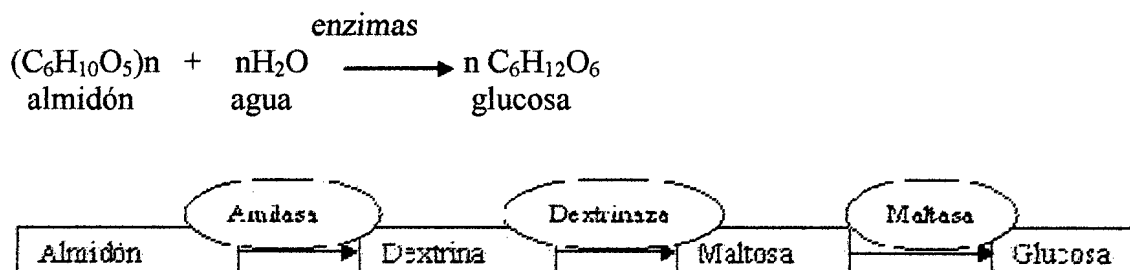


Figura 01: Degradación enzimática del almidón. Fuente: Elaboración propia

Los procesos de malteado y maceración en la fabricación de cerveza se llevan a cabo de tal manera que solo el 60 % del almidón se transforma en azúcares fermentables. El 40 % restante son dextrinas no fermentables que convierten a la cerveza en una bebida rica en calorías. Estos son los responsables también de impartir cuerpo o viscosidad a la cerveza (Jagnow, 1991).

2.6.3. Filtración del Mosto

Una vez disueltas las materias solubles por el cocimiento es necesario separar el mosto de la parte insoluble llamada orujo o afrecho. La operación se realiza en dos fases: primero el flujo del mosto y luego la operación de lavado del extracto que contiene el afrecho (Verstrepen, 2003).

El mosto y el agua de lavado deben ser claros pues si se aporta durante la operación demasiadas sustancias mal disueltas, la clarificación de la cerveza será demasiado difícil. La calidad de la cerveza puede ser también alterada por un lavado de afrecho con agua alcalina pues los polifenoles y sustancias amargas de

la cáscara de la malta se disuelven muy fácilmente en agua alcalina aún más si se tiene en cuenta que el lavado se hace en agua a una temperatura máxima de 75 °C; ésta no puede exceder ese límite, pues se corre el riesgo de disolver almidón presente aún en el afrecho, lo que conllevaría a problemas de turbiedad y fermentación posteriores (Verstrepen, 2003).

2.6.4. Ebullición del Mosto

Esta operación detiene los procesos de degradación por inactivar las enzimas de la malta, pasteuriza el mosto, completa interacciones iónicas tales como la precipitación del fosfato cálcico, desnaturaliza y precipita la proteínas y los taninos que se separan en forma de un material conocido como quiebra caliente o turbidez caliente (Adams y col, 1998). Además se consigue la extracción de sustancias amargas derivadas del lúpulo por isomerización de los ácidos que dan a la cerveza su sabor y aroma característico, la producción del color por la caramelización del azúcar, la formación de melanoidina y la destilación de volátiles (Ward, 1991; Madrid, 2001 y Verstrepen, 2003).

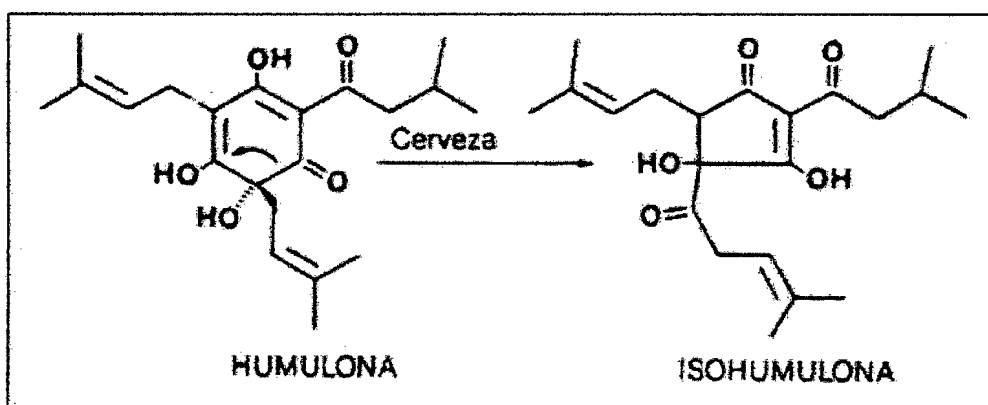


Figura 02: proceso de isomerización de la humulona en iso-humulona
Fuente: Fennema (2000).

La isomerización de los ácidos del lúpulo es incompleta debido principalmente al pH del mosto (el pH óptimo de isomerización es de 9). Existen muchas lupulonas y humulonas en el lúpulo; cada uno de estos compuestos donará su isómero respectivo; el conjunto es conocido como isohumulonas pues son esencialmente quienes donan el amargor deseado (Verstrepen, 2003).

La destrucción de las enzimas es realizada para evitar que sigan desdoblado a lo largo de la fermentación, las amilasas podrían seguir desdoblado las dextrinas y éstas se transformarían enteramente en alcohol (Hornsey, 2003).

La coagulación de proteínas es mucho más difícil, se realiza por etapas, la primera es la desnaturalización que consiste en la ruptura de puentes de hidrógeno en la molécula de proteína, pasando del estado hidratado al deshidratado, manteniéndose en suspensión únicamente por su carga eléctrica; luego de la desnaturalización se produce la coagulación propiamente dicha por agrupación de micelios deshidratados, es aquí donde el pH juega un papel muy importante, pues la coagulación será eficiente si se realiza en el punto isoeléctrico, como existen muchas proteínas en el mosto el pH más adecuado es de 5,4 (Hornsey, 2003).

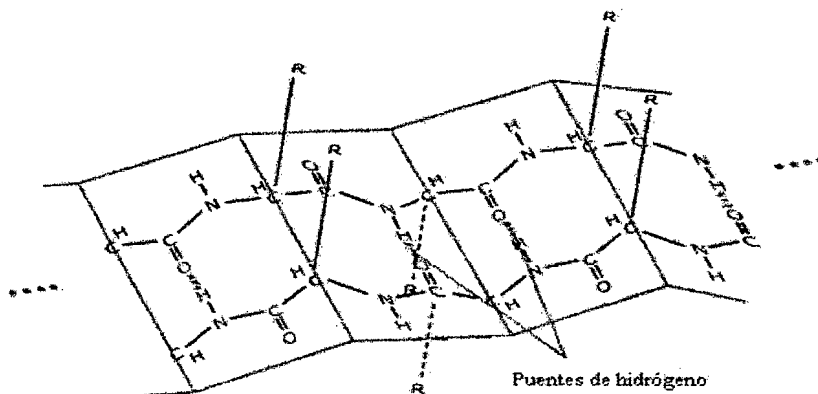


Figura03: Ruptura de los puentes de hidrogeno en la estructura de la proteína. Fuente: adaptado de Wade 2002.

2.6.5. Enfriamiento del Mosto

Luego de la ebullición del mosto, los precipitados proteicos son eliminados por sedimentación, filtración o centrifugación; el mosto es enseguida enfriado a la temperatura de inoculación de la levadura, esta temperatura depende del tipo de levadura empleada y del tipo de cerveza a fabricar entre 6 a 20°C (Hough, 1990). Durante el enfriamiento un nuevo precipitado de polifenoles-proteínas se forma, por un lado por enlaces de hidrógeno y también por la falta de solubilidad de las prolaminas. La presencia de este nuevo precipitado juega un rol esencial sobre la formación de H₂S por la levadura (Verstrepen, 2003).

La composición del mosto es muy variable en función al tipo de cerveza fabricada, su densidad puede variar entre 2 a 20 grados Plato (°P), es decir, de 2 a 20g de soluto por 100g de líquido; a su vez puede ser rico o no en aminoácidos y péptidos en función de la importancia de la proteólisis y de la proporción de adjuntos utilizados (Klimovitz, 2002).

2.6.6. Fermentación

Inicialmente, se agrega al mosto frío, levadura en una cantidad calculada, para que quede en el mosto de 8 a 10 millones de células por cc. Para la fermentación de mosto concentrado, se usa un millón de células por cc por cada grado plato del mosto. La cantidad de levadura previamente determinada se diluye en el mosto y luego se inyecta a la línea de mosto frío durante el enfriamiento. La cantidad total de levadura que se inyecta se calcula teniendo en cuenta el volumen de mosto que va contener la tina de fermentación (Hornsey, 2003).

La temperatura inicial de fermentación puede variar entre 6 a 10 °C. Una vez que se inicia la fermentación se aprecian como cambios notorios, el descenso del extracto, la producción de gas carbónico y el desprendimiento de calor; durante la fermentación se controla el descenso de la densidad regulando la temperatura con atemperadores (serpentines o chaquetas), por los cuales circula agua fría o salmuera o agua glicolada a temperaturas que oscilan entre 1 a 2 °C para el caso del agua y de -5 a -10 °C para el caso de la salmuera o el agua glicolada (Xiao y col, 2004).

Cuando se alcanza el extracto límite o sea hasta donde se le va a dejar fermentar se abre el frío para conseguir enfriar la cerveza (Xiao y col, 2004). Se consigue enfriar la cerveza hasta 5 °C y se suspende el envío de gas carbónico a la planta, luego se bombea la cerveza a los tanques de maduración y se recupera la levadura (Hornsey, 2003).

2.6.6.1. Principales transformaciones que tiene lugar durante la fermentación

Durante la fermentación, se distinguen dos procesos muy diferentes en el metabolismo de la levadura. El primero es el proceso de crecimiento o multiplicación celular, el cual es caracterizado por un incremento en el número de células. El segundo es el proceso del extracto, es decir, consumo del extracto y formación de alcohol (Klimovitz, 2002).

Después de que la célula se ha adaptado a la presión osmótica del mosto y los nutrientes han permeado hacia el interior de ella, comienza el proceso de crecimiento. La multiplicación requiere energía, esta es proporcionada por los azúcares que son metabolizados por una larga cadena de reacciones enzimáticas. Primero que todo, la energía producida por estas reacciones es usada para el principal propósito de la vida; la multiplicación (Klimovitz, 2002).

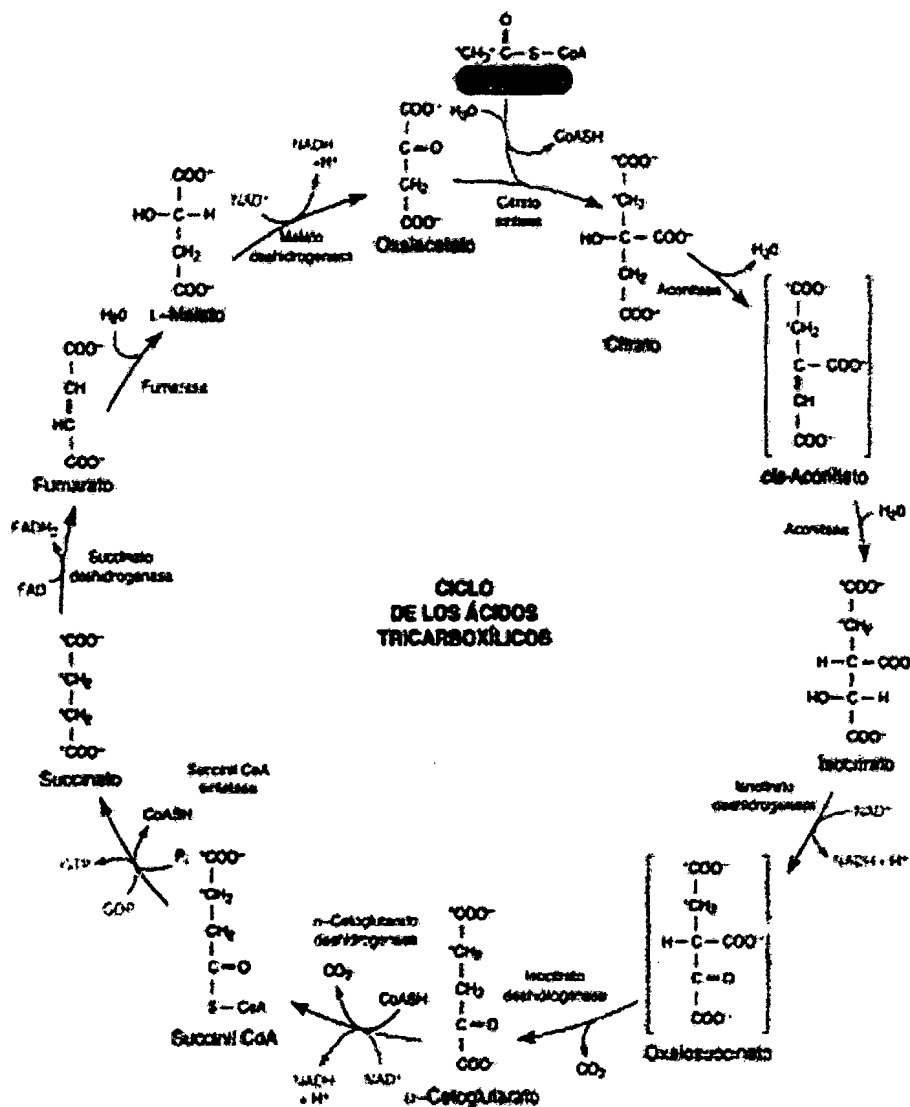


Figura 04: Ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ciclo de Krebs). Fuente: Devlin, 2004

La energía producida a partir de los carbohidratos es acumulada en forma de ATP; éste puede ser utilizado en la formación de acetil-CoA (Coenzima A) la cual reacciona de muchas formas diferentes. Durante la etapa de crecimiento la célula de levadura utiliza este compuesto activo para la síntesis de esteroides y de ácidos grasos insaturados, consumiendo el oxígeno; consecuentemente, la cantidad de oxígeno proporcionado al mosto con la aireación es decisiva para la multiplicación celular. Cuando el oxígeno ha sido consumido, cesa la síntesis de esteroides y ácidos grasos y por lo tanto la acetil-CoA puede ser utilizada en otras reacciones (Klimovitz, 2002).

Cuando se acaba el oxígeno es cuando empieza la producción de etanol y CO₂ (Madrid, 2001). El pH disminuye aproximadamente una unidad a partir de un valor inicial de 5,2. Muchos ácidos, especialmente el ácido acético, formado por oxidación del acetaldehído, contribuye a esta caída del pH (Ward, 1991).

Muchos investigadores han asociado la formación de los ésteres con el metabolismo de los lípidos por las levaduras durante la fermentación, los cuales constituyen un grupo importante entre los compuestos volátiles de la cerveza debido a su fuerte y penetrante aroma a frutas (Heggart, 1999).

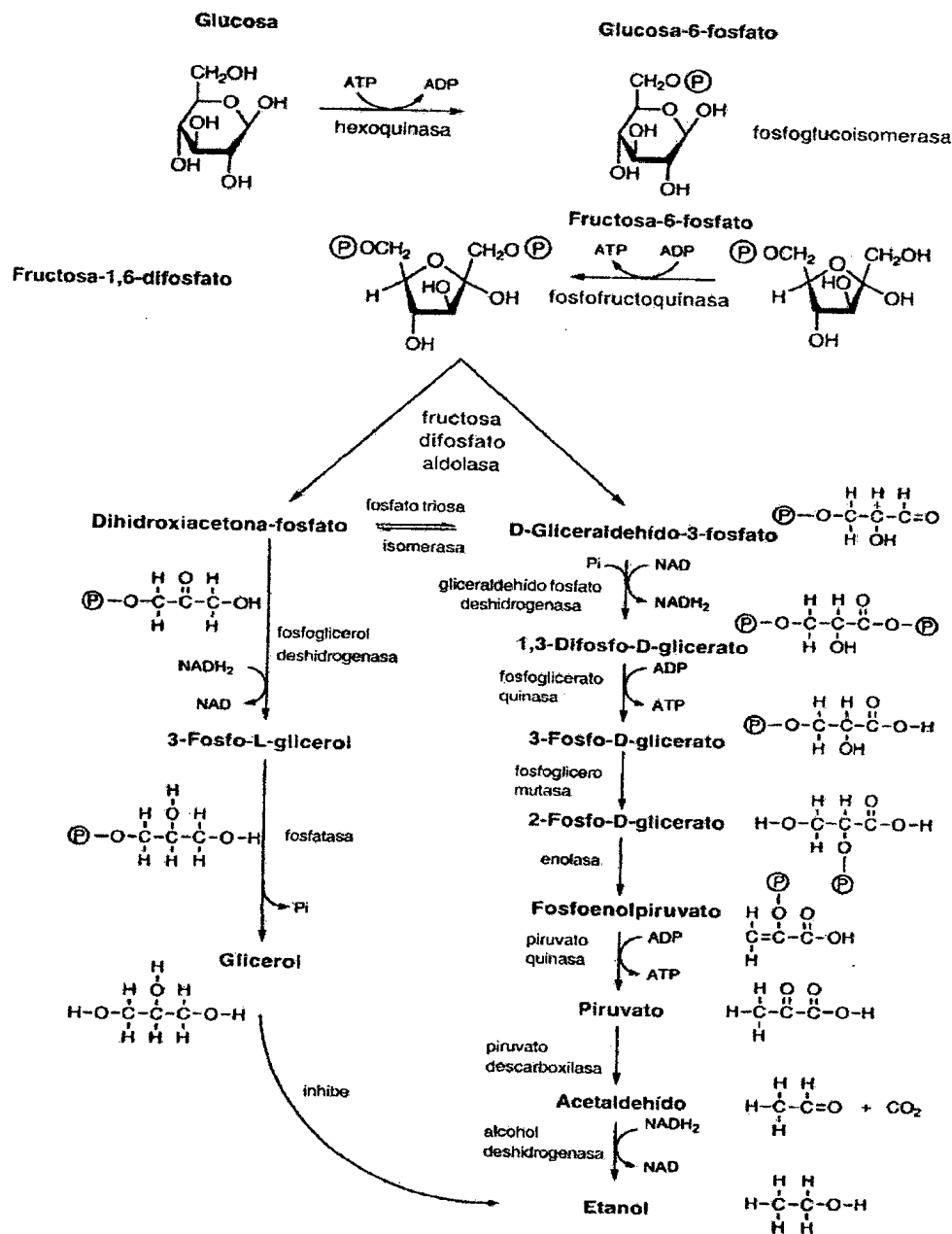


Figura 05: Ciclo de Embden-Meyerhof-Parnas. Fuente: Hornsey, 2003.

2.6.6.2. Efectos durante la fermentación

A. Efecto Pasteur

El efecto Pasteur se refiere a la inhibición de la fermentación por el oxígeno (respiración). Esto se debe a que *Saccharomyces cerevisiae* puede metabolizar los azúcares tanto en aerobiosis como en anaerobiosis y al permitir la respiración un

mejor rendimiento celular (generación de energía) se consume menos azúcar en aerobiosis que en anaerobiosis, es decir la aerobiosis conlleva a la disminución del consumo de azúcar y por ende a la disminución de la fermentación (Aycachi, 2009).

B. Efecto Crabtree

Se refiere a que, cuando la concentración de azúcar en el medio es elevada, *Saccharomyces cerevisiae* solo metaboliza los azúcares por vía fermentativa; incluso en presencia de oxígeno, la respiración es imposible (Aycachi, 2009).

2.6.7. Maduración

La maduración implica una fermentación secundaria por las levaduras residuales que pasan a la cerveza desde el fermentador primario. Durante este proceso, se asimila el diacetilo así como las pequeñas cantidades de maltotriosa residual, y la concentración de algunos ésteres aumenta (Ward, 1991).

Los objetivos de la maduración consisten en acumular o almacenar cerveza, dejar sedimentar en forma natural la materia amorfa y la levadura que aún tiene la cerveza, refinación del sabor por eliminación de las sustancias volátiles que causan el sabor verde, separación por precipitación de los compuestos que se forman al ser enfriada la cerveza, es muy importante considerar que la cerveza se enturbia al ser enfriada después de haber sido filtrada, otro de los objetivos es completar la atenuación límite que no ha sido alcanzada en la fermentación y también se busca carbonatar la cerveza (Klimovitz, 2002).

Si la maduración es muy larga o prolongada el sabor se suaviza demasiado, pierde cuerpo, pierde amargor y queda muy simple. Con respecto a la temperatura de la cerveza en maduración se especifica entre -2 y 0 °C si se hace segunda maduración se pasa a la etapa de reposo de 2 a 3°C y cuando se pasa al acabado se enfría a -2°C. Si es mayor de 0°C puede presentarse autólisis de la levadura que pasa a maduración afectando el sabor, se presentan coagulaciones de las sustancias que precipitan en frío (proteosomas o peptonas - taninos) y por tanto se obtienen cervezas químicamente inestables, también por esta temperatura alta no se obtiene una buena clarificación y por lo tanto cervezas muy turbias al final de la maduración que causan problemas en la filtración. Al subir la temperatura se puede aumentar el efecto de la oxidación (Heggart, 1999).

En referencia al tiempo de la maduración cuando se hace en una sola etapa se deja de 2 a 3 semanas. Cuando es en dos etapas el tiempo de la primera etapa dura comúnmente 2 semanas y el tiempo de acabado o segunda etapa dura aproximadamente una semana. La producción debe ser programada de tal manera que la cerveza tenga una maduración uniforme (Klimovitz, 2002).

2.6.8. Filtración

Después de la maduración y antes del embotellamiento, la cerveza pasa de nuevo por una filtración con tierra diatomácea que elimina los últimos restos que puedan quedar de la fermentación y también los restos de nitrógeno que durante la maduración han formado una especie de mucosa, lo que podría provocar más adelante que la cerveza saliera turbia (Hornsey, 2003).

2.6.9. Envasado

Antes de llevar la cerveza a la máquina de llenado se inyecta CO₂ en los tanques hasta conseguir la saturación deseada, para que la cerveza salga de su recipiente con una buena capa de espuma (Hornsey, 2003).

Para alargar el tiempo de conservación de una cerveza, sin que cambie de aspecto, se esteriliza por medio de la pasteurización después del envasado (las botellas pasan por un túnel con agua a 70°C), o con una pasteurización flash antes de envasar (durante el recorrido del tanque a la cadena de envasado la cerveza se calienta hasta 65° C) (Hornsey, 2003).

2.7. Tipos de cerveza

En el mundo existen muchas clases de cerveza y cada cual posee un particular aroma, sabor, color y cuerpo. Si bien todas se fabrican con los mismos ingredientes, cebada malteada, lúpulo, levadura y agua, lo que establece la diferencia entre una y otra son las variaciones de esas materias primas y el tipo de fermentación experimentada (De Clerck, 1957a).

2.8. Tipos de fermentaciones

La fermentación es una etapa clave en el proceso productivo, en ella el mosto o caldo de cerveza se transforma en alcohol gracias a la intervención de levaduras especiales. Dependiendo de la clase de levadura usada, las cervezas son clasificadas internacionalmente en dos categorías básicas: cervezas de alta fermentación o *Ale*, y cervezas de baja fermentación o *Lager* (Knudsen, 1977).

2.8.1. Fermentación alta o cervezas *ale*

Esta cerveza es, por tradición, el producto de la fermentación de las cepas “de superficie”, de *saccharomyces cerevisiae*, denominada así debido a que una parte de la levadura sube hasta formar una densa “cabeza de levaduras” en la superficie del fermentador (Brown y col, 1989). La fermentación se da a temperaturas más altas utilizadas (20 - 23°C) (Knudsen, 1977).

2.8.2. Fermentación baja o cervezas *Lager*

La fermentación se realiza a bajas temperaturas (10 a 12°C), y en él la levadura se mantiene al fondo del estanque permitiendo que el lúpulo y la cebada malteada dominen el aroma y sabor del producto (De Clerk, 1957b).

2.9. Control de calidad de la cerveza

2.9.1. Calidad sensorial

El término “flavor” se emplea en el sentido que implica la percepción global integrada de todos los sentidos que participan en el (olfato, gusto, vista, tacto y sonido) en el momento de la ingestión del alimento (fennema, 2000). Si se considera a la cerveza dentro de este contexto el gusto y el olor son indudablemente las propiedades más importantes (Hough y col, 1982).

La calidad de la cerveza se halla en los ojos, nariz, boca y mente del consumidor. Sin embargo, aquello que se ve, huele, saborea y piensa es a veces imposible de descubrir. La investigación del consumidor puede dar cierta información, pero a

menudo descansa en la responsabilidad del personal técnico de interpretar los deseos del segmento del mercado al cual se dirige el producto (Vicente, 1999).

Comparado con otras bebidas alcohólicas la cerveza muestra una pobre estabilidad del “flavor”. La aplicación de sistemas más rápidos, equipo de escala sobredimensionado, largas distancias de distribución, almacenamiento extendido bajo condiciones indeseables, y la tendencia a cerveza de baja gravedad están incrementando este problema. Ciertas tipos de cervezas son más o menos susceptibles a cambios en aroma y “flavor” durante la fermentación, almacenamiento y envejecimiento. El contenido de oxígeno durante el empaclado y la temperatura durante la distribución y almacenamiento son parámetros importantes que afectan la estabilidad del “flavor” en la cerveza (Charalambous, 1980). Dentro de los defectos de “flavor” en la cerveza se pueden citar los siguientes: granoso, cascaroso, astringente, diacetilo, mohocidad, medicinal, azorrillada, sulfuro de dimetilo, éster, vinoso, carácter de casa y oxidación (Master Brewing Association of the Americas, 2002).

En defecto de oxidación se puede decir con seguridad que todas las cervezas son susceptibles a la degradación de su “flavor” debido a la edad. Es casi imposible, detener el cambio de “flavor” que se da en la cerveza empaçada mientras envejece (Master Brewing Association of the Americas, 2002).

El control de los niveles de oxígeno en el producto y los ciclos de temperatura que experimenta la cerveza desde el momento en que es envasada y consumida, son

factores importantes para asegurarse de que la cerveza mantenga su “flavor” con el tiempo. Compuestos de “flavor” activos tales como trans-2-nonenal, acetaldehído y otros productos oxidativos de los constituyentes normales de la cerveza, son los responsables de impartir “flavors” a cartón, papel o paja en la cerveza vieja (Master Brewing Association of the Americas, 2002).

Meilgaard *et al*, (1991) desarrolló una rueda de sabor en un esfuerzo por regularizar el idioma de análisis de sabor. La rueda de sabor se adoptó conjuntamente en los años setenta por la Convención de la Cervecería Europea, la Sociedad Americana de Químicos Cerveceros y la Asociación de Maestros Cerveceros de las Américas (EBC, ASBC y MBAA, por sus siglas en inglés respectivamente). La rueda de sabor de cerveza es la herramienta de análisis sensorial estándar en la industria. Se empieza explorando los cuatro sabores básicos, pasando luego a través de los malos sabores y de los productos de fermentación (Vicente, 1999). La rueda de “flavor” es presentada para facilitar la ubicación de los términos dentro del sistema (Master Brewing Association of the Americas, 2002).

2.9.2. Calidad microbiológica de la cerveza

La cerveza no es un buen medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos, lo que se refleja en el escaso número de microorganismos capaces de crecer en ella. La cerveza es además un alimento seguro desde el punto de vista de la ausencia de microorganismos patógenos (Sendra y Carbonell, 1999). Además utiliza materia primas muy sencillas (agua, cebada y levadura) y

fácilmente controlables. El agua y la cebada sufren un intenso tratamiento térmico en el proceso de fabricación (Baxter, 1996).

Existen cinco factores en la cerveza que limitan el crecimiento microbiano (Vamam y Sutherland, 1994):

1. El bajo pH
2. El bajo potencial de oxido-reducción
3. El relativamente bajo contenido de nutrientes, agotados en su mayor parte por la levadura cervecera.
4. La presencia de alcohol etílico
5. La presencia de las isohumulonas del lúpulo, de marcado efecto antimicrobiano.

Estos cinco factores actúan como barreras sucesivas frente al desarrollo microbiano. Así, la capacidad para crecer en un medio con pH bajo es una característica de *Lactobacillus*, pero la tolerancia a las isohumulonas está restringida a las cepas cerveceras de este género. El crecimiento de las bacterias acidolácticas se ve limitado por el bajo contenido de aminoácidos de la cerveza (que actúan como factores de crecimiento), mientras que el bajo potencial redox limita el crecimiento de las bacterias acéticas. También la elevada concentración de anhídrido carbónico disuelto tiene un cierto efecto antiséptico (Sendra y Carbonell, 1999).

2.9.3. Calidad nutricional

La característica diferencial de la cerveza es el extracto primitivo, de la que se derivan el contenido de agua, alcohol, extracto y calorías. En cantidades absolutas, el agua es el componente mayoritario de este producto (Piendl, 1998).

Globalmente se suelen alcanzar una concentración de 0,5 a 2 g/l. de compuestos inorgánicos. Los compuestos minerales influyen sobre el sabor de la cerveza. Los cloruros dan sensación de plenitud de sabor (fullness), los sulfatos sequedad (dryness), los carbonatos producen efectos muy variados en el sabor, el sodio tiene un efecto importante sobre el sabor global, mientras que el magnesio puede conferir un sabor desagradable. Por otra parte, el hierro, plomo, cobre, zinc y estaño puede producir turbidez en cervezas (Sendra y Carbonell, 1999).

Las cervezas contienen un 2,5 a 4% de carbohidratos, en forma de mono, di, y trisacáridos, dextrinas, y β -glucanos. El 78-80% de esta cantidad, además contiene habitualmente entre 1,9 a 6,3 g/l. de componentes nitrogenados, que incluyen aminoácidos, péptidos polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos y sus productos de degradación. No obstante algunos tipos de cerveza de alto extracto original llegan hasta 11,5 g de sustanciaa nitrogenadas (Hough y col., 1982). Proceden fundamentalmente de los cereales y se modifican cualitativamente en el proceso de elaboración (Sendra y Carbonell, 1999).

Después del agua el constituyente más abundante en la cerveza es el alcohol etílico. Se produce junto con el anhídrido carbónico, en la fermentación, a razón

de un gramo de alcohol por cada 1,6 g de sustrato hidrocarbonado transformado. Participa de forma importante en el sabor de la cerveza (Sendra y Carbonell, 1999). La mayoría de las tablas de composición de cervezas dan valores próximos al 5% (Bulinski y col, 1986).

La cerveza contiene pequeñas cantidades de vitaminas del grupo B: tiamina, riboflavina, ácido pantoténico, piridoxina, biotina, mesoinisitol, cianocobalamina y niacina (Sendra y carbonell, 1999) También contiene ácido fólico y sus derivados (folatos) procedentes de la malta, incrementándose en la germinación de la cebada y sobreviviendo al tostado La cerveza contiene cantidades apreciables de compuestos fenólicos que contribuyen a la capacidad antioxidante del producto. (Piend, 1999 y Ghiselli y col, 2000).

Además la cerveza contiene una pequeña proporción de lípidos, procedentes de la malta, adjuntos y lúpulo, así como resultantes del metabolismo de las levaduras en el proceso de fermentación. Son fundamentalmente ácidos grasos ((0,33-0,76 mg/l), mono, di y triglicéridos (en conjunto hasta (0,4 mg/l), junto a trazas de esteroides y fosfolípidos. La cerveza también contiene pequeñas cantidades de ácidos orgánicos (cítrico, fumárico, láctico, málico, pirúvico, succínico, glutárico, oxálico, tartárico), que afectan al sabor y la estabilidad de la cerveza. Proceden de la malta y la actividad metabólica de la levadura (Sendra y Carbonell, 1999).

2.9.4. Calidad funcional

El valor calórico de la cerveza se debe a su contenido en alcohol (5% v/v), que aporta 7 Kcal/g, densidad 0,91g/l y su extracto seco residual, aporta 4 Kcal/g. Así, una cerveza tipo que contenga un extracto original de 11 y un grado alcohólico de 5 aporta las calorías que se muestran en el cuadro 01 (Sendra y Carbonell, 1999).

CUADRO 01: Aporte calórico por 100 g de cerveza

Alcohol: $5 \times 0,91 \times 7$	31,85 Kcal (68%)
Extracto residual $(11 - 5 \times 0,91 \times 1,6) \times 4$	14,88 Kcal (32%)
Total	46,73 Kcal (100%)

Fuente: (Sendra y Carbonell, 1999).

Un litro de cerveza aporta pues al día 467Kcal. El metabolismo basal supone unas 1850 Kcal/día en hombres de 75 kg de peso y 1600 Kcal/día en mujeres de 65 kg. Los requerimientos energéticos diarios, con una actividad física normal, se pueden estimar respectivamente en 2800 Kcal/día y 2100 Kcal/día para los dos casos citados. Un litro de cerveza supondría una aportación del 17% de las necesidades energéticas diarias de un individuo de estas características y un 22% en el caso de la mujer (Sendra y Carbonell, 1999).

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Producción de cerveza con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca

La producción de cerveza con sustitución de lúpulo por harina de coca esta dada por las siguientes etapas:

3.1.1. Preparación de inóculo

Para la preparación del inóculo se utilizó la cepa Sc BA-IA-2009-II. Para la fermentación se cultivo en mosto de malta como medio de cultivo diluyendo la concentración de azúcar hasta 2% p/v y ajustando el pH a 5,6. La propagación del cultivo se llevó a cabo en un agitador orbital a 100 rpm a 29°C ±1°C durante 48 horas (ver apéndice 4.2). La cantidad de inóculo utilizado para realizar la fermentación fue de 5y3 % v/v con respecto al volumen de fermentación.

3.1.2. Fermentación en biorreactor

Esta parte de la investigación corresponde al diseño experimental propuesto, es aquí donde se manipularon las variables independientes (factores de entrada) como la sustitución de lúpulo por harina de coca en proporciones de 20 y 30 %p/p y, la concentración de inóculo para la fermentación alcohólica en 3 y 5% v/v respectivamente.

El proceso de elaboración de la cerveza comenzó con la molienda de la malta con un 25% de cáscara, 30% grano grueso, 15% grano fino y 30% harina, determinado mediante tamices ASTM E11 con mallas N° 10 (2 mm), 20 (850

μm) y 35 (500 μm) respectivamente. La maceración se realizó por cocción durante 150 min. a temperaturas de 40, 52, y 72°C cada uno por un tiempo de 30 min., y a temperaturas de 62 - 65°C por un periodo de 60 min., con una relación de malta y agua de (1:4). Una vez concluido el proceso de cocción se realizó el filtrado a 75°C, utilizando como medio filtrante el bagazo de malta. La cocción del mosto dulce se realizó a 85 °C, al cual se le agregó lúpulo y se dejó hervir durante 15 min., luego se agregó la harina de coca la cual se dejó hervir por 15 min. en una relación de lúpulo/harina de coca de 80%/20% p/p y 70%/30% p/p, seguidamente se realizó la filtración del mosto con una franela a 75°C, seguidamente se dejó enfriar hasta 20°C.

Los ensayos de fermentación se realizaron en un biorreactor estándar de acero inoxidable de 25L con un volumen de trabajo de 1/5 del volumen total, construido para este fin (ver apéndice 6.3).

Se realizó la inoculación con levaduras en proporciones de 3% y 5% v/v respecto al volumen de fermentación. Al inicio de la fermentación el medio se aireó a razón de 68 L/hr durante 1 minuto y con una agitación de 156 rpm; luego se dejó fermentar el mosto a 20°C \pm 1°C por 72 horas. El pH inicial del mosto se ajustó a 5,6. Los controles de pH, peso específico, acidez y producción de etanol en el transcurso de la fermentación se realizaron cada 12 horas. La cerveza verde obtenida se maduró por un periodo de 14 días a una temperatura de -2 a 2°C \pm 1°C en frascos de vidrio de 4 L. Finalmente, el proceso de clarificación de la cerveza se realizó por sedimentación.

En la figura 06: Se detalla el flujo de elaboración de la cerveza utilizado en la investigación.

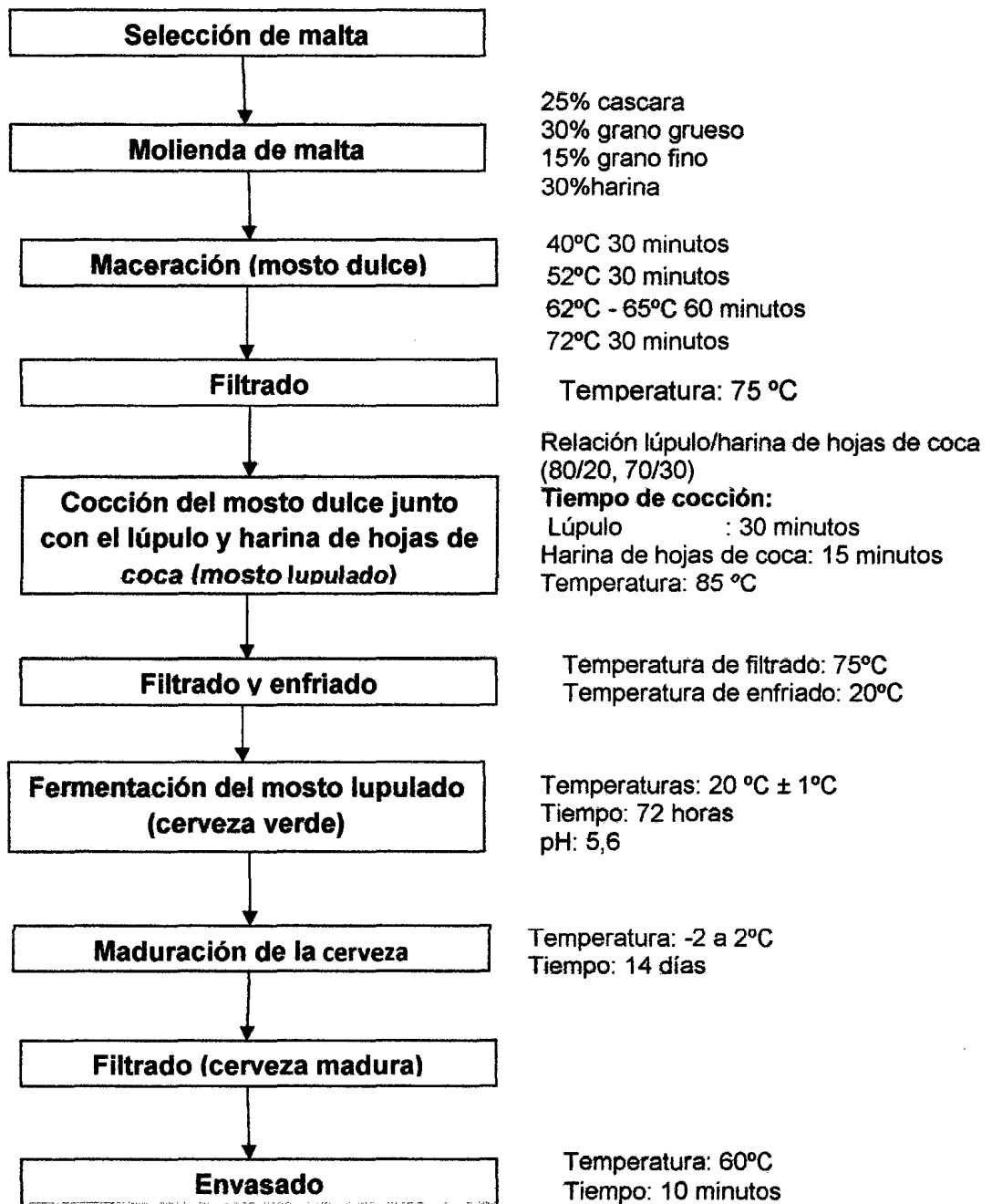


Figura 06: Diagrama de flujo de la elaboración de cerveza sustituyendo parcialmente lúpulo con harina de coca.

3.2. Evaluación de la calidad de la cerveza

En esta parte de la investigación se determinó la calidad fisicoquímica, sensorial y nutricional de la cerveza elaborada.

3.2.1. Evaluación físico y químico

La evaluación físico y químico de la cerveza incluyeron; proteína mediante la técnica micro Kjendhal (AOAC 920.53), ácido fósfórico (AOAC 10.036), calcio por la técnica de complexometría, acidez total (950.07) acidez volátil (945.10), concentración de etanol mediante la técnica de densimetría, pH (945.10) y la densidad. La acidez total, porcentaje de etanol, densidad y el pH se evaluaron cada 12 horas durante la fermentación. Todos los análisis se realizaron en el laboratorio de biotecnología y química de la carrera profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac. De la misma forma se evaluaron las características físicas y químicas a la cerveza madura, utilizando las mismas técnicas mencionadas anteriormente.

3.2.2. Evaluación sensorial

Para evaluar la calidad sensorial de la cerveza se utilizó pruebas hedónicas de aceptabilidad así como la prueba descriptiva cuantitativa para atributos de color, aroma y sabor de la cerveza de acuerdo al método internacional del la Sociedad Americana de Químicos Cerveceros.

Los paneles de juzgamiento estuvieron conformados por jueces semientrenados. Para la selección de los jueces se tomó en cuenta la edad, el sexo y el habito de

beber cerveza, se formó un panel integrado por 4 hombres y 3 mujeres, se prefirieron aquellos de edad entre 20 a 30 años que no presentaban hábitos de beber en lo posible, esto con la finalidad que no haya sesgos en el momento de la evaluación. Cabe resaltar que la evaluación sensorial se hizo con la finalidad de evaluar la aceptabilidad de la cerveza y no compararla con alguna cerveza comercial específica. Antes del juzgamiento los jueces recibieron un entrenamiento básico para evaluar aromas y sabores específicos encontrados en la cerveza, entre ellos; acetaldehído, metálico, diacetilo, coca, alcohólico y levadura. Se utilizaron cartillas de respuesta para recolectar las puntuaciones obtenidas por cada juez (ver anexo modelo de cartilla) y posteriormente se evaluaron estadísticamente.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proceso de producción de cerveza se describe en detalle en la sección 3.1.2. Para la fermentación se utilizó un biorreactor estándar con agitación mecánica (ver fig. 07). Al término de la fermentación se obtuvo una cerveza clara de apariencia agradable tal como se muestra en la fig. 08.

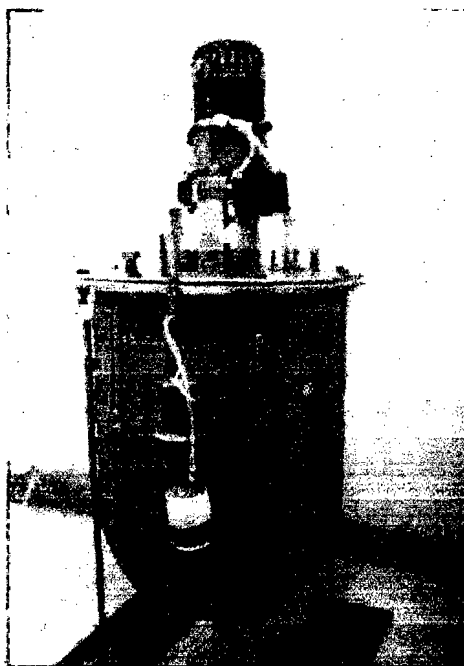


Figura 07: Biorreactor utilizado durante la fermentación de cerveza tipo ale con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca.

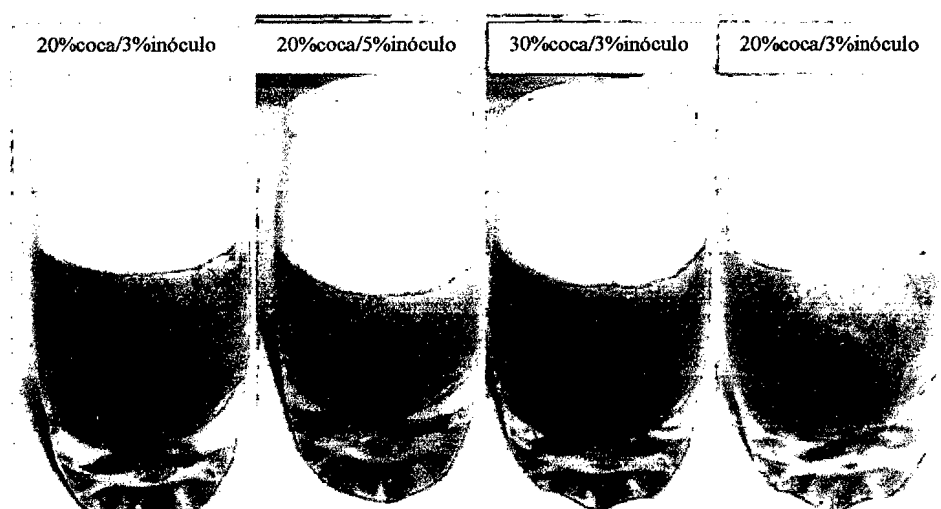


Figura 08: Cerveza tipo ale obtenidas con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca.

Una vez obtenida las cervezas se realizaron los análisis de control de calidad, los análisis incluyeron; análisis físicos, químicos y sensoriales.

4.1. Análisis físicos y químicos de la cerveza durante la fermentación

Los análisis físicos y químicos incluyeron la determinación del pH, acidez total,, contenido de etanol y densidad. Los valores promedios se reportan en los gráficos en cada caso.

En lo referente al pH y la acidez de las cervezas los valores obtenidos se muestran en la fig. 09. El rango de pH de las cervezas estuvo entre 4,3 y 4,5. Estos valores coinciden con lo señalado por Kunze (1996), el cual indica que el pH se sitúa entre 4,2 y 4,4.

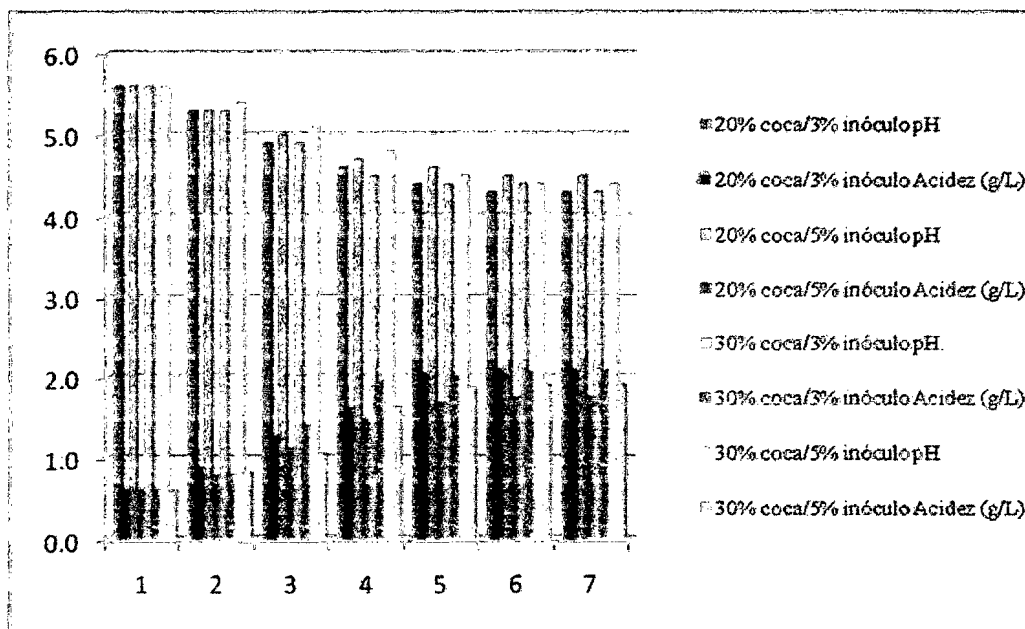


Figura 09: Progreso de la disminución del pH y aumento de la acidez (g/L) respecto al tiempo de fermentación.

Los valores de pH de las cervezas disminuyeron en promedio 1.23 unidades en todos los ensayos. Como se observa en los resultados mostrados en la fig. 09 a medida que la concentración del inóculo es mayor el valor del pH es mayor y como consecuencia el valor de la acidez es menor, esta anotación es importante ya que la concentración del inóculo juega un importante rol en el valor final del pH y la acidez. Por otro lado, la concentración de lúpulo parece no tener efecto en el valor final del pH y la acidez ya que los ácidos constituyentes permanecen hasta el final de la fermentación. Según Manfred y Jean (1991), el pH tiene un efecto considerable en la calidad de la cerveza y manifiesta que un pH menor que 4.4 acelera la precipitación de complejos coloidales inestables (proteínas y polifenoles), produce una maduración más rápida, refina el sabor de la cerveza y es un requerimiento esencial para una buena estabilidad biológica de la cerveza.

Con respecto al contenido de etanol de las cervezas los resultados se muestran en la fig. 10. Se encontró que el contenido promedio de etanol fue de 5,20% v/v.

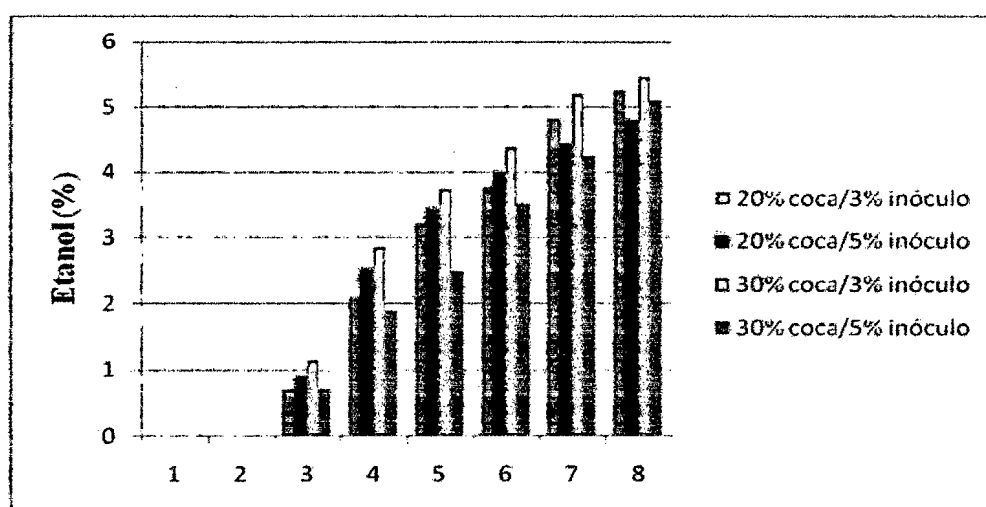


Figura 10: progreso de la producción de etanol durante la fermentación con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca.

Los resultados mostraron además que el contenido mínimo y máximo de etanol en las cervezas fueron 4,79y 5.47% respectivamente. Por otro lado, se encontró que a mayor concentración de inóculo la producción de etanol fue menor esto es interesante de notar. Este fenómeno se debería al hecho que a mayor concentración inicial de inóculo hay un agotamiento prematuro de nutrientes y entre ellos factores de crecimiento principalmente. Los resultados encontrados en este sentido corroboran lo aseverado por Hornsey (2003). Según Moctezuma y Román (2008) al utilizar 1.5 g/L de inóculo el rendimiento de la fermentación es deficiente, mientras que al utilizar 3g/L de causa en el producto sabores y olores indeseables y además de un grado de acidez bajo. En cambio, al utilizar una concentración de inoculación de 2.5 g/L, se garantiza un adecuado crecimiento de la levadura durante el proceso de fermentación. Por otro lado, la concentración de harina de coca no mostró tener efecto significativo sobre la producción de etanol. Otro parámetro importante en la fermentación es el contenido de oxígeno disuelto en el medio de fermentación. Como menciona Aycachi (2009), el oxígeno juega un rol importante en la multiplicación celular, sin embargo en presencia de concentraciones elevadas de glucosa las levaduras manifiestan el efecto Crabtree en el cual fermentan el azúcar a condiciones aerobias.

El dendidad final de la cerveza es otro parámetro que determina su calidad. El valor promedio de la densidad encontrado en las cervezas fue 1.0099g/L, este valor es corroborado con lo encontrado por Hough y Burgos (1990) entre 1.008-1.010 g/L. Los resultados de variación de densidad del mosto se muestran en la fig. 11.



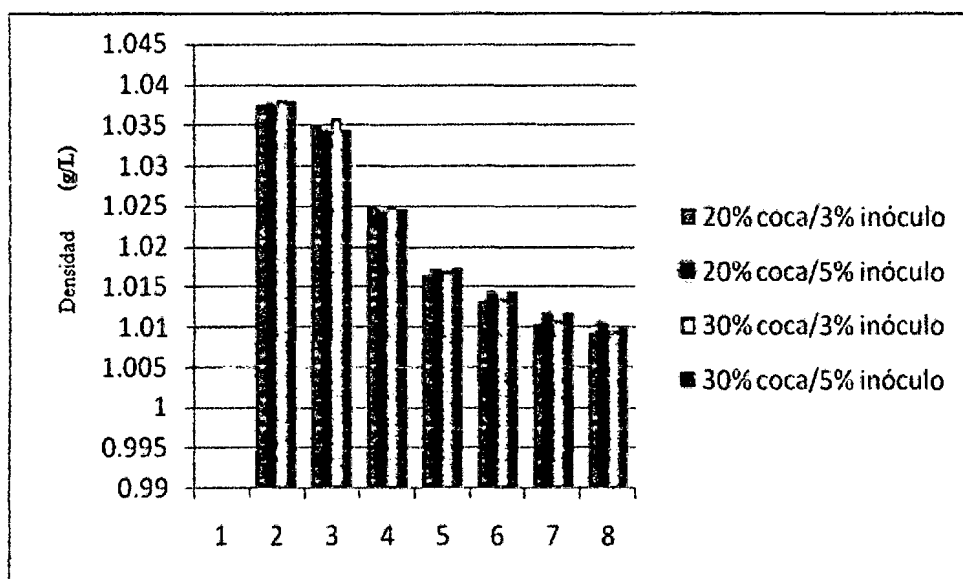


Figura 11: variación de los valores de la densidad del mosto durante el proceso de fermentación de cerveza.

El contenido de azúcares fermentables en el mosto de malta define la cantidad de etanol que será producida por la levadura durante la fermentación. El contenido de azúcares iniciales del mosto se obtiene macerando el mosto a temperaturas variables que no sobrepasan los 75°C, el valor de la temperatura seleccionada depende de la actividad de las enzimas envueltas en este proceso tales como las α y β amilasas. Para los ensayos de fermentación las densidades iniciales del mosto estuvieron en el rango de 1.0374 y 1.0382 g/L. El proceso de maceración se detalla en la sección 3.4.2.2. De los resultados mostrados en la fig. 11, se infiere que a menor concentración de inóculo (3%v/v) utilizada para la fermentación presentó una tasa mayor de utilización de azúcares, estos resultados están relacionados con la producción de etanol discutido previamente.

4.2. Análisis físicos y químicos de la cerveza madura

Los análisis realizados a la cerveza madura, elaborada con sustitución del lúpulo por harina de coca en porcentajes de 20 y 30 % p/p y utilizando inóculo como iniciador del proceso fermentativo en un 3 y 5% v/v respecto al volumen total de fermentación, se muestran en la tabla 04:

TABLA 04: análisis fisicoquímico de la cerveza madura

	3% inóculo/ 20 % de sustitución	3% inóculo/ 30 % de sustitución	5% inóculo/ 20 % de sustitución	5% inóculo/ 30 % de sustitución
Acidez total (g/L)	1.440	1.445	1,424	1,435
Acidez volátil (g/L)	0.360	0.342	0.341	0.335
pH	4,5	4,5	4,5	4,4
Densidad (g/ml)	1,0085	1,0083	1,0088	1,0079
Etanol (%)	5,30	5,49	4.80	5,15
Ácido fosfórico (%)	0,036	0,038	0,036	0,037

Como se observa en la tabla 04 los valores de pH aumentaron y los valores de acidez disminuyeron con respecto a los valores obtenidos al finalizar la primera fermentación, esto debido a que durante la maduración el valor de pH y acidez varían puesto que se forman nuevos productos a partir de la reacción de los ácidos orgánicos con alcoholes lo que hace que el pH se incremente hacia la neutralidad. La relación inversa que se encontró entre el valor de pH y la acidez se corrobora con los resultados encontrados por Manfred y Jean (1991). De la misma forma se observa que la densidad disminuye en la cerveza madura, esto debido a que en esta etapa, las proteínas de bajo peso molecular y algunos carbohidratos como las maltotriosas floculan y precipitan y además que algunos azúcares y aminoácidos y péptidos todavía son asimilados por las levaduras que se encuentran en suspensión

el el medio. Con respecto a la concentración de etanol, se observa que la concentración se mantiene sin mucha variación, aunque en esta etapa de maduración continua el proceso fermentativo, pero también algunos alcoholes forman otros compuestos con los azúcares y los ácidos, de ahí que la concentración de este metabolito primario no sufra variaciones significativas.

La concentración de ácido fosfórico se encuentra en una concentración promedio de 0.03675 %, valor que se encuentra dentro de los requisitos mínimos de la cerveza según la NPT N° 213.014-Febrero de 1973, la cual estipula un mínimo de 0.03% de ácido fosfórico en peso. Como se observa en la tabla04 no existe una variación significativa entre los diversos tratamientos realizados puesto que en su mayoría el ácido fosfórico proviene de los granos de la cebada, las cuales son degradados a partir del ácido fitico por la fitasa durante el germinado para ser utilizado por el embrión como menciona Hough (1990).

4.2.1. Análisis del contenido de proteína y calcio

Estos análisis se consideraron debido a que la harina de coca aporta al valor nutricional con calcio y proteína. Sin embargo, la cerveza normalmente contiene concentraciones considerables de algunos nutrientes que no son considerados en esta investigación. Los procedimientos para cada análisis se detallan en la sección 3.2.1.

El contenido de proteína encontrado en las cervezas fue en promedio 0.96 g/L. Los valores límites estuvieron entre 0.94 y 1.00 g/L de proteína. En la fig. 12 se muestra el contenido final de proteína de cuatro cervezas.

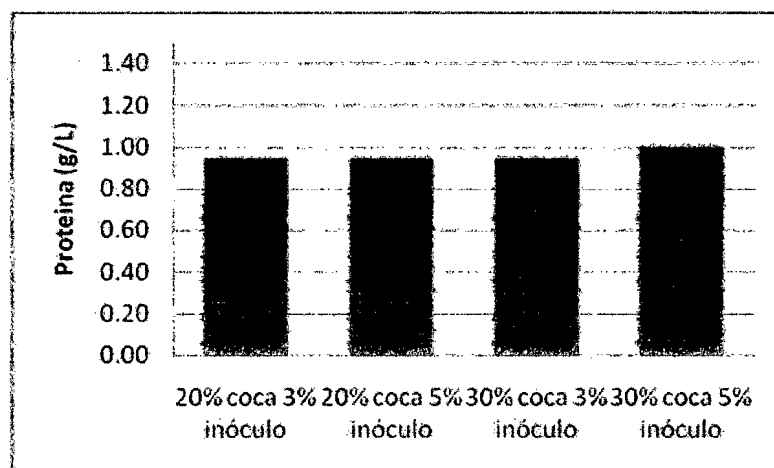


Figura 12: contenido de proteína de las cervezas obtenidas con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca.

Como se observa en los resultados mostrados en la fig. 12, el mayor contenido de proteína se obtuvo en el proceso donde se utilizó 30% p/p de harina de coca y 5% v/v de inóculo. Este valor difiere mucho de los resultados encontrados por Piendl, 1999, quien encontró valores entre 3 y 5 g/L de proteína total o cruda.

El contenido de proteína en la cerveza está influenciado principalmente por la cantidad de proteína presente en la cebada. De acuerdo a los resultados obtenidos es de pensar que la cebada utilizada en el proceso presentó un contenido bajo de nitrógeno y esto sería debido a la variedad, al manejo de cultivo y abonamiento precario. Sin embargo, el proceso fermentativo de la cerveza no mostró

inconvenientes debido a las limitaciones de fuente de nitrógeno en el mosto de malta. Por otro lado, los constituyentes nitrogenados influyen en las características fisicoquímicas y sensoriales de la cerveza tal como lo mencionan Sendra y Carbonell, 1999. La formación y estabilidad de la espuma dependen en gran medida del tipo y cantidad de proteína presente en la cerveza. Poca concentración de formación de espuma estaría relacionada con concentraciones limitantes de compuestos nitrogenados.

En la fig. 13, se muestra la influencia del porcentaje de harina de coca y concentración de inóculo en el contenido final de proteína en la cerveza. Los resultados muestran que tanto la concentración de sustitución de lúpulo y la concentración de inóculo no tienen incidencia significativa en el contenido de proteína de las cervezas.

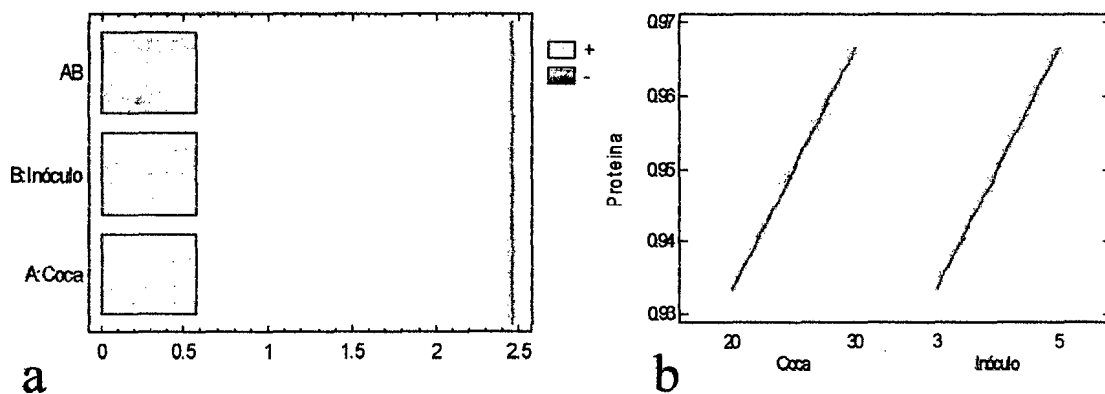


Figura 13: (a) Diagrama de Pareto estandarizada para proteína, (b) Efectos principales para proteína.

Resultados luego de utilizar el análisis estadístico de Durbin-Watson (DW) para determinar el nivel de autocorrelación a un valor de significancia de 5%, se

encontró que no existe correlación significativa entre la proporción de harina de coca sustituida o la concentración de inóculo utilizado con respecto a la concentración de proteína de la cerveza. Esto confirma una vez más que la *concentración global de proteína de la cerveza depende del contenido de proteína de la variedad de cebada utilizado en el proceso de elaboración*. Para verificar esta hipótesis se sugiere estudios adicionales de contenido de proteína de cervezas elaboradas a partir de otras variedades de cebada.

En lo referente al contenido de calcio de las cervezas, el valor promedio encontrado fue 169.20mg/L y los valores mínimo y máximo 141.42 y 196.98 mg/L respectivamente. En la fig. 14 se muestra los resultados del contenido de calcio en cuatro cervezas.

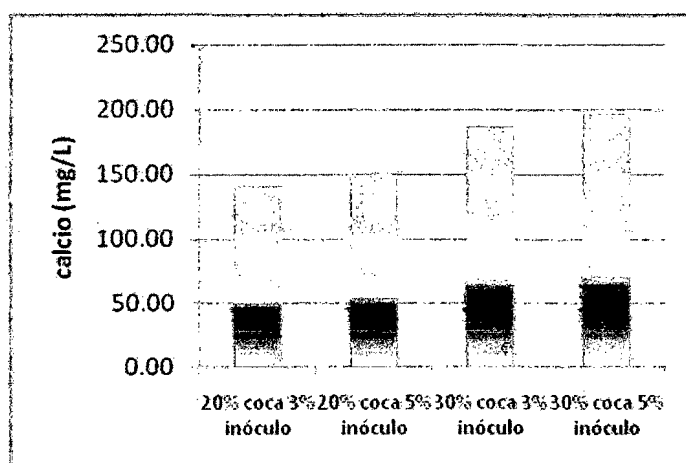


Figura 14: contenido de calcio de las cervezas obtenidas sustituyendo parcialmente lúpulo por harina de coca.

En los resultados se puede observar que el contenido de calcio en las cervezas está relacionado con el porcentaje de sustitución de harina de coca. Esta observación

es de esperarse desde que el contenido de calcio en la coca es considerablemente alto (1.798 g Ca/100 g de hojas de coca). La adición de calcio en este sentido resulta beneficiosa al valor nutricional de la cerveza comparado con las cervezas comerciales que normalmente contienen entre 40 y 140mg/l según lo reportado por Bamforth (2002). En lo referente a la concentración de inóculo los resultados muestran que no hay una influencia determinante en el contenido final de calcio de las cervezas.

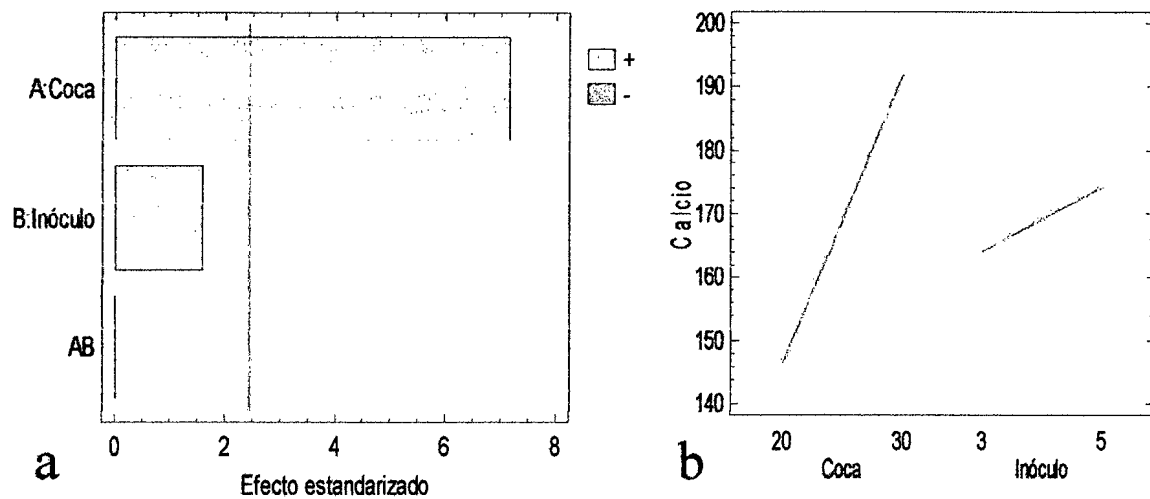


Figura 15: (a) Diagrama de Pareto estandarizada para calcio, (b) Efectos principales para calcio.

Los resultados de la fig. 15 se muestra que hay una relación directa entre el porcentaje de harina de coca adicionado al mosto durante el proceso y el contenido de calcio en la cerveza. Esto es de esperarse desde que la harina de coca aporta con concentraciones considerables de calcio a mayor proporción de sustitución. Por el contrario no se observa alguna relación significativa entre la proporción de inoculo utilizado y la concentración de calcio en la cerveza.

La utilización del análisis estadístico de Durbin-Watson (DW) para evaluar autocorrelación a un nivel de significancia de 5%, demuestra una correlación positiva entre la proporción de harina de coca sustituida y el contenido de calcio en la cerveza.

La concentración de calcio durante la fermentación es de mucha importancia ya que puede inhibir la actividad fermentativa de la levadura cuando está presente en concentraciones superiores de 1g/L. Sin embargo, su presencia puede estimular el crecimiento de la levadura sin ser un factor de crecimiento. La participación del calcio es principalmente a nivel extracelular, participa en el mantenimiento de la membrana e integridad de la pared celular de la levadura, favoreciendo así la tasa de fermentación.

Además, por otra parte los iones de calcio juegan un importante papel en el proceso de floculación al término de la fermentación (Hornsey, 2003), debido a que elevadas concentraciones de iones calcio (por encima de 1000 ppm) demora en la captación de maltosa y maltotriosa y por consiguiente se dan periodos prolongados de atenuación.

4.3. Análisis sensorial de la cerveza con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca

4.3.1. Sabor y aroma

El sabor y el aroma de la cerveza esta influenciada por los compuestos sensoriales que provienen de las materias primas que se utilizan en su elaboración, por los

compuestos que se originan durante la fermentación y por las condiciones de maduración. Los principales atributos que se evaluaron fueron; amargo, metálico, alcohólico, a coca, levadura, diacetilo, acetaldehído y cuero, estos atributos determinan características sensoriales negativas cuando el grado de percepción es muy alto, por el contrario el aroma frutal o rosal tiene influencia positiva. El procedimiento para realizar la evaluación sensorial se describe en detalle en la sección 3.2.2. Las evaluaciones han sido realizadas por un panel conformado por siete jueces y el promedio de los resultados de sus apreciaciones se muestran en la tabla 05.

Tabla 05: Promedio de puntuaciones obtenidas durante la evaluación sensorial de sabor y aroma en las cervezas elaboradas.

ATRIBUTO	PUNTUACIONES			
	20% coca 3%inóculo	30% coca 3%inóculo	20% coca 5%inóculo	30% coca 5%inóculo
	Escala 0-5	Escala 0-5	Escala 0-5	Escala 0-5
Amargo	1.65	1.51	1.69	1.50
Metálico	0.15	0.08	0.11	0.10
Alcohólico	1.36	1.37	1.29	1.27
Coca	1.37	1.47	1.40	1.49
Levadura	0.56	0.55	0.61	0.64
Diacetilo	0.18	0.12	0.16	0.16
Acetaldehído	0.44	0.41	0.44	0.43
Cuero	0.06	0.09	0.07	0.06
Frutal o rosal	3.90	3.55	3.78	3.31

El sabor amargo es una característica distintiva de las cervezas, su intensidad depende de la proporción de lúpulo adicionado durante la elaboración y del tiempo de extracción de los ácidos durante la cocción. En la tabla 05 se observa que la percepción del amargor de las cervezas disminuye con respecto a la

proporción de lúpulo sustituido, a menor sustitución el amargor es mayor, es decir que existe una relación inversa, y esto se demuestra mediante el estadístico de Durbin-Watson (DW). Esta es una importante notación desde que la concentración de harina de coca no jugaría un importante rol sobre el grado de amargor de la cerveza. Sin embargo estudios complementarios son necesarios realizar para determinar cual es la participación de la harina de coca en el grado de amargor de la cerveza.

La percepción a sabor alcohólico en la cerveza esta relacionado con la concentración de etanol producido por las levaduras y además con la presencia de otros componentes sensoriales que disminuyen su impacto en el paladar. Generalmente este atributo se relaciona con cervezas sin bouquet debido a la baja concentración de otros componentes sensoriales importantes. En la tabla 05 se observa que la percepción a alcohólico de las cervezas disminuye a medida que la concentración de inóculo disminuye. Este resultado es importante de notar ya que sugiere que cervezas cuya producción de etanol durante la fermentación es lenta involucra la producción de otros componentes sensoriales que intervienen en el enmascaramiento de la percepción de este atributo.

Por otro lado, el sabor a coca en las cervezas esta relacionado en forma directa con la concentración de sustitución. Los resultados muestran que a mayor concentración de sustitución de lúpulo, mayor percepción de sabor a coca. Así mismo los resultados de la tabla 05 muestran que en promedio el máximo valor de percepción a coca en la cerveza es 1.49 de una escala de cero a cinco, este valor

nos da una idea que su grado de percepción es bajo y no influye de manera negativa en las características sensoriales de la cerveza. Cabe mencionar que uno de los objetivos de la investigación es encontrar la concentración adecuada de harina de coca que no tenga efecto significativamente negativo en el valor sensorial del producto final. Por lo cual según el panel de catadores la sustitución adecuada es de 20% p/p en relación al lúpulo.

El sabor a “levadura” de la cerveza esta relacionado con la cantidad de inóculo utilizado durante la fermentación así mismo con procesos de maduración donde no se ha separado adecuadamente las levaduras. Es una característica sensorial negativa y los valores umbrales debe disminuirse al máximo. Los resultados de la tabla 05 muestran que la percepción a “levadura” en las cervezas aumenta a medida que la concentración de inóculo aumenta, sin embargo en forma general, sus valores de percepción son bajos (0.64 como máximo) por lo cual no influyen significativamente en el perfil sensorial global del producto.

El acetaldehído y diacetilo son componentes producidos durante la fermentación de levaduras, ellos contribuyen sensorialmente en la cerveza. Generalmente están presentes en concentraciones muy bajas, debajo de su valor de percepción. Concentraciones que excedan grandemente a su valor de percepción contribuyen negativamente al valor sensorial de la cerveza. En la tabla 05 se muestra los resultados de percepción obtenido por el panel utilizado en el juzgamiento, los valores de 0.44 para el acetaldehído y 0.18 para el diacetilo son concentraciones bajas de estos componentes en las cervezas. Sin embargo, es necesario realizar

investigaciones complementarias para determinar cuantitativamente estos componentes y su interrelación con otros componentes en las cervezas.

Respecto a los atributos “metálico” y a “cuero”, términos utilizados para la evaluación sensorial de cervezas podemos observar en los resultados mostrados que los valores de percepción son muy bajos 0.15 para el “metálico” y 0.09 para el “cuero”. Estas características no serían de importancia significativa en la calidad sensorial de las cervezas. Cabe mencionar el atributo “metálico” se refiere a un sabor como a latón, similar a la de la sangre y el atributo “cuero” está relacionado con un sabor a cuero fresco de animales, en ambos casos tienen influencia negativa en la calidad sensorial de las cervezas.

El aroma frutal o rosal es una característica positiva en las cervezas, se debe a la presencia de ésteres de ácidos grasos y ácidos orgánicos. Los ésteres son producidos mayormente por levaduras durante la fermentación alcohólica y otros durante el proceso de maduración. Los resultados en la tabla 05 muestran que la percepción frutal o rosal en las cervezas alcanzó valores mayores a tres de una escala de intensidad de cero a cinco. Por otro lado, se observa que la concentración del inóculo influye en la percepción frutal o rosal, a medida que la concentración de inóculo es menor la percepción es mayor referido con este atributo.

En la figura 16 se presenta en un gráfico de tela de araña la variación de los atributos evaluados.

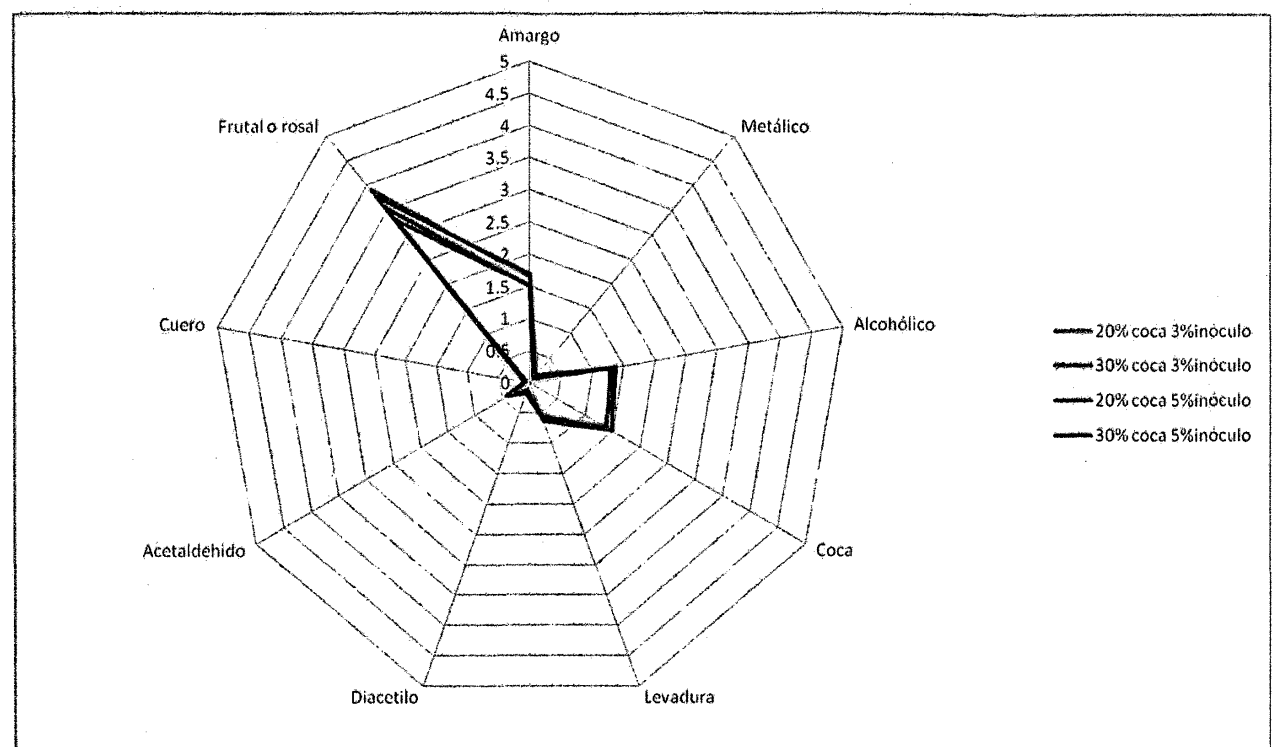


Figura 16: Atributos sensoriales evaluados en las cervezas tipo ale con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca.

En la figura 16, se observa la interrelación que existe entre los diversos atributos analizados, de lo cual se puede destacar que en todos los tratamientos los panelistas encontraron mayor niveles de percepción en lo que respecta a floral o rosal, amargor, coca y alcohólico y por el contrario niveles relativamente bajos en los demás atributos analizados.

4.3.2. Color

El color de las cervezas esta influenciado por los componentes formados durante el secado y curado de la malta y la interacción de estos con los componentes producidos durante la fermentación. La temperatura de secado de la malta y el tiempo de exposición son factores importantes que influyen en la coloración de la cerveza. La evaluación del color se realizó con la finalidad de verificar si la sustitución de lúpulo por harina de coca influye significativamente en la percepción de color en las cervezas. Los resultados de la evaluación de color se muestran en la tabla 06.

TABLA 06: Promedio de los valores de percepción de color realizado en las cervezas con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca.

Atributo	PUNTUACIONES			
	20% coca 3%inóculo	30% coca 3%inóculo	20% coca 5%inóculo	30% coca 5%inóculo
	Escala 0-5	Escala 0-5	Escala 0-5	Escala 0-5
Intensidad de color para cerveza clara	2.79	2.74	3.09	2.96

Los resultados de la tabla 06 muestran que hay una ligera variación del color de la cerveza a niveles de sustitución de harina de coca de 20y 30%, sin embargo estos valores no resultan ser significativos sensorialmente. Esta información es útil para manifestar que la harina de coca no influye sustancialmente en la variación del color en las cervezas.

4.3.3. Aceptabilidad

La preferencia que tienen los catadores por una u otra muestra de cerveza elaborada con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca, esta influenciado por los diversos aspectos sociales y culturales, de ahí que la aceptabilidad por las muestras presentadas varía como se muestra en la tabla 07.

Tabla 07: Aceptabilidad por el consumidor de las diversas muestras de cerveza elaborada con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca.

Escala de evaluación	20%coca/ 3%inóculo		20%coca/ 5%inóculo		30%coca/ 3%inóculo		30%coca/ 5%inóculo	
	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%
Me gusta mucho	1	1.67	1	1.67	2	3.33	1	1.67
Me gusta moderadamente	5	8.33	4	6.67	1	1.67	3	5.00
Me gusta levemente	4	4.67	4	6.67	3	5.00	4	6.67
No me gusta ni me disgusta	3	5.00	3	5.00	6	10.00	3	5.00
Me disgusta levemente	2	3.33	1	1.67	1	1.67	3	5.00
Me disgusta moderadamente	0	0.00	1	1.67	2	3.33	1	1.67
Me disgusta mucho	0	0.00	1	1.67	0	0.00	0	0.00

La prueba de aceptabilidad se realizó con la finalidad de determinar cual de los tratamientos tiene mayor aceptabilidad en el público consumidor de cerveza. Como se observa en la tabla 07, los resultados se encuentran dispersos, teniendo como muestras de mayor aceptabilidad las elaboradas con sustitución parcial de



lúpulo por harina de coca de 20%, en los cuales los puntos de evaluación muestran que la cerveza les ha gustado moderada y levemente en un porcentaje mayoritario y también mostraron un porcentaje significativo en el punto no me gusta ni me disgusta; mientras que las muestras elaboradas con 30% de lúpulo por harina de coca, la mayor concentración se encuentra en los puntos no me gusta ni me disgusta en las muestra elaborada con 3% de inóculo y entre me disgusta levemente hasta me gusta moderadamente en la muestra elaborada con 5% de inóculo. Aunque también se observa que a un pequeño porcentaje de los catadores las muestras les agrado mucho.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- De los resultados de análisis fisicoquímico, nutricional y sensorial se propone el siguiente proceso de elaboración de cerveza con sustitución parcial de lúpulo por harina de coca:
 1. 20% de sustitución de lúpulo por harina de coca
 2. 3% de inóculo
 3. Temperatura de fermentación de 20 ± 1 °C
 4. Por un tiempo de 72 horas
- Los valores de Ph, acidez total y acidez volátil de las cervezas producidas se encuentran dentro de los valores estándares encontrados en las cervezas comerciales (4,2-4,5 de pH), ello significa que tanto la cepa seleccionada así como el diseño del proceso son adecuados. Una importante conclusión es que los valores del pH y acidez de las cervezas están correlacionados inversamente con la concentración del inóculo. A mayor concentración de inóculo los valores de acidez son menores.
- El contenido de etanol de las cervezas se encuentra entre los valores de 4,80 y 5,49% v/v que están dentro de los rangos de las cervezas comerciales. Una importante conclusión al respecto es que la producción de etanol está relacionado inversamente con la concentración de inóculo. A mayor concentración de inóculo la tasa de producción de etanol es lenta y el

contenido final de etanol es menor comprado a si se utiliza concentraciones de inóculo menores. Esto es de utilidad en la producción de cerveza debido a que la tasa de fermentación influye en la síntesis de productos de importancia sensorial y por otro lado se alcanza rápidamente el valor de etanol deseado.

- El contenido de ácido fosfórico se encuentra dentro de los rangos establecidos por las normativas, también cabe mencionar que su concentración en la cerveza esta estrechamente ligada al contenido en la cebada de fosfatos y exclusivamente al ácido fítico y no asi al grado de sustitución del lúpulo por harina de coca.
- El contenido de proteína de la cerveza depende del contenido de proteína de la cebada utilizada en el proceso y más no de la concentración del inóculo. La harina de coca no contribuye significativamente al incremento de la proteína total en la cerveza.
- El contenido de calcio en la cerveza es una característica importante que incrementa su valor nutricional. La adición de harina de coca incrementa el contenido de calcio a concentraciones que sobrepasan los límites estándares encontrados en cervezas comerciales. Sin embargo, en la sustitución de lúpulo por harina de coca debe tenerse en cuenta el posible efecto inhibitorio del calcio en la actividad fermentativa de levaduras.

- Las características sensoriales de la cerveza están estrechamente relacionada a las materias primas utilizadas en su elaboración como la malta, lúpulo, y en este caso de la harina de coca, y además de los productos formados durante la fermentación y la interacción de estas.

5.2. Recomendaciones

- Desde el punto de vista tecnológico y científico se sugiere desarrollar estudios complementarios en los siguientes aspectos:
 1. Identificación de la especie a la cual pertenece la cepa Sc BA-IA-2009-II
 2. Efecto de la temperatura y concentración de oxígeno en la síntesis de compuestos sensoriales,
 3. Capacidad fermentativa de la cepa Sc BA-IA-2009-II a bajas temperaturas.
- Se recomienda realizar estudios cuantitativos de los atributos sensoriales como acetaldehído, diacetilo, esteres y alcoholes superiores.
- Puesto que la coca no presenta compuestos ácidos en niveles elevados se sugiere realizar estudios complementarios sobre la participación en el grado de amargor de la cerveza.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, E. 2006. Selección de levaduras autóctonas para la elaboración de vinos tintos para bodegas y viñedos de Trujillo S.L. Departamento de Tecnología de los Alimentos. Universidad Politécnica De Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. P. 115.
- Acevedo, A; Godoy, R. y Bolaños, G. 2003. Incremento de la producción de alcohol, en fermentación de melazas mediante la utilización del complejo enzimático Rhyzozyme. XXII Congreso Colombiano de Ingeniería Química. Bucaramanga. Agosto 13-15.
- Adams, A; Gottschling, D; Kaiser, C y Stearn, T. 1998. Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual. New York: The Laboratory. Chapter 1.
- Aguilar, B y FranYios, J. 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. Letter in Applied microbiology, 37: 268 – 274 pp.
- Aycachi, R. 2009. Producción de bioetanol. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Pedro Ruiz Gallo.
- Association of Official Analytical Chemists. 1975. Official Methods of Analysis 12ava edición. The Association: Washington, D.C.
- Barbado, José Luis. 2003. Secretos de la Cerveza Casera. Editorial Albatros. Buenos Aires - Argentina.
- Barnet, J.A.; Paine, R.W.; Yarrow, D. 1990. Yeast characteristics and identification. Cambridge University Press. Cambridge.

- Baxter, E.D. 1996. The fate of ochratoxin A during Malting and Brewing. *Food Additives and Contaminants*, 13, 23-24.
- Baxter, D. 1996. Beer is good for you – discuss. *Breuer*, 82, 63-66
- Bellissimi, E y Ingledew, W. 2004. Metabolic acclimatization: preparing active dry yeast for fuel ethanol production. *Process Biochemistry*. Vol 40. 2205-2213 pp.
- Boekhout T, Kutzman C. 1996. Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. En: Wolf K (Eds.) *Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook*. Berlin, Germany. 1-81.
- Broderick, H.M. 1977. *El Cervecerero En La Práctica*. Editorial Board, Segunda Edición, Estados Unidos.
- Bulinski, R. *et al.* 1986. Nutritive and energy values of polish beer. *Bromatología I Chemia Toksykologiczna*. 19, 73-76.
- Bulinski, R. y kot, A. 1988. Evaluation of polish beers; nutritional and caloric values. *Przemys Fermentacyjny I Owocowo Warzywny*. 32, 167-172.
- Calderón, N. M. 2007. Evaluación del uso de antibióticos como mecanismo para el control de contaminantes bacterianos en la fermentación para la producción de alcohol etílico. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá.
- Canales, C. *et al.* 2003. Guía de mejores técnicas disponibles en España del sector cervecero. Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental. Ministerio del Medio Ambiente. España.

- Carter W., Mamani M. 1978. Patrones de Uso de la Coca en Bolivia. En: La Coca Andina, 205-250, La Paz.
- Castañe, F.X. 1997. Beer: History, manufacture and properties. Alimentación equipos y tecnología, 16 p. 41-48.
- Cabieses, F. 1978. Conferencia, Curso Internacional sobre Fisiología del Habitante Andino, UNMSM.
- Charalambous, G. 1980. The analysis and control of less desirable flavors in foods and beverages. *Academic Press, Inc., London*, p. 358.
- Chisti, Y. 1989. Airlift Bioreactors, Elsevier Science, U.S.A., 1-14, 33-42.
- Chisti, Y. y Moo-Young, M. 2002. Biorreactor, Encyclopedia of Physical Science and Tecnology. Vol. 2, Academic Press, 247-266.
- Collazos, C.; Urquieta, R. y Alvistur, E. 1965. Nutrición y coqueo, en Simposium sobre nutrición. *Revista del Viernes Médico* 16:36-44.
- Cottrell, M., Kovk, J.K.F., Lategam, P.M., Britz, T.Z. 1986. Long chain fatty acid composition as an aid in the classification of the genus *Saccharomyces*. *Syst. Appl. Microbiol.* 8: 166-168.
- De Clerck, J. 1957a. A Textbook of Brewing. Volume One. Chapman and Hall, London. 650 p.
- De Clerck, J. 1957b. A Textbook of Brewing. Volume Two. Chapman and Hall, London. 650 p.
- Devlin, T. 2004. Bioquímica con aplicaciones clínicas. Editorial REVERTE s.a. 4ta edición. Pag. 554. España.

- Duarte, F.L., Pais, C., Spencer-Martins, I. y Leao, C. (1999) Distinctive electrophoretic isoenzyme profiles in *Saccharomyces sensu stricto*. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 1907-1913.
- Escobar M. 1994. Coca, alimento andino. Por la revalorización de la hoja de la coca. II Forum Internacional. ENACO, Lima.
- Estela E. W. 2004. Study and analysis of metabolites of sensorial importance produced by *Saccharomyces* and *non-Saccharomyces* yeasts. Tesis de Doctorado Capitulo I. Universidad de Tecnología Química. Praga – Republica Checa.
- Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Intern Jour Syst Bacteriol; 49: 329-337.
- Fennema, O. 2000. Química de los alimentos. Editorial Acribia. 1280 p. España.
- Fernández, MT, Querol A, Ramón D. 2000. Molecular characterization of yeasts strains by mitochondrial DNA restriction analysis. En: Spencer JFT, Spencer AL. (Eds.) Methods in Biotechnology. New York, Humana Press Inc: 329-333.
- Ghiselli A. *et al.* 2000. Beer Increases plasma antioxidant capacity in humans. J Nutr Blochem. 11; 76-80.
- Golden, D.A., Beuchat, L.R. y Hitchcock, H.L. 1994. Changes in fatty acid composition of *Zygosaccharomyces rouxii* as influenced by solutes, potassium sorbate and incubation temperature. Int. J. Food Microbiol. 21: 293-303.

- González, M.L., Muñiz R. P. y Valls B. V. 2001. Actividad antioxidante de la cerveza: Estudios in vitro e in vivo. Centro de información cerveza y salud departamento de biotecnología y ciencia de los alimentos Universidad de Burgos Departamento de Pediatría Ginecología y Obstetricia. Universidad de Valencia. p. 57.
- Gonzales, M. Ledrón, M. y Marcos, A. 2000. Revisión bibliográfica sobre los efectos del consumo moderado de cerveza sobre la salud. Instituto de Nutrición y Bromatología CSIC-UCM. 51 P.
- Heggart, H; et al. 1999. Factors Affecting Yeast Viability and Vitality Characteristics: A review. Technical Quarterly. Vol. 36 N° 4. 383 – 406 pp.
- Hornsey, I. 2003. Elaboración de cerveza: microbiología, bioquímica y tecnología. Ed. Acribia. España.
- Hough, J.S. y Burgos, G. 1990. Biotecnología de la cerveza y la malta. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 55 – 70 pp.
- Hough, J., Briggs, D., Stevens, R. y Young, T. 1982. Malting and brewing science. Volume II Hopped wort and beer, London New York Chapman and Hall, USA, p. 914.
- Hurtado, C. 2006 “Harina de coca – solución prodigiosa del hambre-malnutrición en el Perú y países andinos” Asociación peruana de la hoja de coca – Instituto de cultura alimentaria andina – Juan Gutemberg Editores Impresores EIRL. Perú.
- Jagnow, G. y David, W. 1991. Biotecnología: Introducción con experimentos modelos. Editorial Acribia, S.A. España.

- Klimovitz, R; et al. 2002. El Cerveceros en la Práctica. Masters Brewers Association of the Americas. St. Paul, Minnesota. Capítulos 3, 5, 6, 9, 10, 15 y 17.
- Knudsen, F. 1977. El Cerveceros en la práctica. Segunda Edición. Asociación de Maestros cerveceros de las Américas, Madison, Wisconsin. 211 p.
- Kreger-Van Rig, N.J.W., 1984. The yeast, a taxonomic study. Elsevier Science B.V. Amsterdam.
- Kunze. 1996. Technology Brewing and Malting. Berlin
- Kurtzman CP. 1994. Molecular taxonomy of the yeasts. 10: 1727-1740.
- Lagos E.M., 1999. Levaduras autoctonas aisladas en vinos de la comarca del la de Laujar de Andarax (Almería). Tesis doctoral. Universidad de Granada. Departamento de la nutrición el bromatología de y. Facultad de la farmacia. Granada. 265 pág.
- Leao C; Van Uden N. 1980. Effect of ethanol and other alkanols on the temperature relations of glucose transport and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 22: 359-363.
- Leao C; Van Uden N. 1984. Effect of ethanol and other alkanols on the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 26: 403-405.
- Lewis, M.J., y Young, T.W. 1995. *Brewing*. xii Isbn 041226420. p. 260.
- Llosa, T., Chang-F, E., Flores, E., Dongo, S., Luna, LM., Llosa, LM. 2006. *Primer Estudio Psicofisiológico y Toxicológico de la Harina de Coca*. Editorial T.Llosa, *Coca Médica*, 1: 1, Septiembre, Lima.

- Loureiro V. Querol A. 1999. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends Food Sci Technol.* 10: 1-10.
- Madrid, A. 2001. *Nuevo Manual De Industrias Alimentarias.* Editorial Ediciones Mundi-Prensa. Madrid- España.
- Manfred, M. y Jean, J.B. 1991. *Beer y Coolers, Tec & Do.-Lavosier.* Francia.
- Martorrell, P. 2006. Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes de alimentos. Tesis doctoral. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC). Departamento de Biotecnología. Universidad de Valencia.
- Master Brewing Association of the Americas. 2002. *El cervecero en la práctica.* 3ra edición. *MBAA* publised, St. Paul, Minnesota, p. 830.
- McNeil, B. y Harvey, LM. 1990. *Fermentation: a practical approach.* In: *Laboratory Fermenters.* IRL press. Oxford University.
- Meilgaard, M., Civille, G. y Carr, T. 1991. *Sensory Evaluation Techniques.* 2da edition. CRC Press. Inc. Florida, USA, p. 354.
- Moralejo Vidal, M. A. 1993. Cebadas dísticas españolas (*Hordeum vulgare* L.): filogenia, bioquímica y aplicación potencial en programas de mejora. España. Tesis doctoral en Ingeniería Agraria. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria de Lleida Universidad Politécnica de Catalunya. 170 p.
- Moreira da Silva, M., Malfeito-Ferreira, M., Aubyn, S. y Loureiro, V. 1994. Long chain fatty acid composition as criterion for yeast distinction in the brewing industry. *J. Inst. Brew.* 100: 17-22.
- NPT N° 213.014-Febrero de 1973. INDECOPI.

- Piendl, A. 1999. Inhaltsstoffe des Bieres, dargestellt am Beispiel des Pilsener Lagerbieres. En: Alkohol y alkoholfolgekrankheiten. Singer MV y Teysen S, eds. Berlin: Springer - Verlag, pp 61-5.
- Piendl, A. 1998. Inhaltsstoffe alkoholischer Getränke – Bier. En: alkoholische Getränke und Ernährungsmedizin. Kluthe R, Kasper H, eds. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. Pp 66-9.
- Prescott, S. 1962. Microbiología Industrial. Editorial Aguilar S.A. 3^{ra} edición. España.
- Ruiz, I.A.; Pelayo, R.; Arroyo, v. E Iñigo, B. 1986. Agentes de fermentación de los mostos de uva de la Comunidad Autónoma de Madrid. Alimentaria 177:53-56.
- Scheda, R. y Yarrow, D. 1966. The instability of physiological properties used as criteria in the taxonomy of yeast. Arch. Microbiol. 55: 209-225.
- Sendra, J., y Carbonell J. 1999. Centro de Información Cerveza y Salud del IATA/CSIC. Evaluación de las propiedades nutritivas, funcionales y sanitarias de la cerveza, en comparación con otras bebidas. Madrid, España, p. 65.
- Smith, J. 1996. Biotechnology. Cambridge, Gran Bretaña. 46-53.
- Serrano, C. 1994. Aceite Esencial de Hojas de Coca. II Forum Internacional. Por la Revalorización de la Hoja de Coca. ENACO, Cusco.
- Suárez, JA. 1997. Levaduras vínicas. Funcionalidad y uso en bodega. Ed. Mundiprensa.

- Tredoux, H.G., Kock, J.L.F., Lategan, P.M. y Muller, H.B. 1987 A rapid identification technique to differentiate between *S. cerevisiae* strains and other yeast species in the winery industry. *Am. J. Enol. Vitic.* 38: 161-164.
- Urrunaga R. 1994. La Coca y la Medicina Tradicional. II Forum Internacional. Por la Revalorización de la Hoja de Coca. ENACO, Cusco.
- Vacanneyt, B.P., Hennebert, G. y Kersters, K. 1991 Differentiation of yeast species based on electrophoretic whole-cell protein patterns. *Syst. Appl. Microbiol.* 14: 23-32.
- Varnam, A.H., y Sutherland, J.P. 1996 *Bebidas: Tecnología, química y microbiología*. Editorial Acrbia. Zaragoza –España. p 307-375.
- Van Vuuren, H.J. y Van Der Meer, L. 1987. Fingerprinting of yeast by protein electrophoresis. *Am. J. Enol. Vitic.* 38: 49-53.
- Verstrepen, K. 2003. Flavor – Active Esters: Adding Fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol 96 N° 2. 110 – 118 pp.
- Vicente, J. 1999. Proceso de selección y entrenamiento de panelistas especializados en la evaluación de la calidad sensorial de la cerveza. Tesis Lcdo., Universidad Agraria la Molina, Lima, Perú., p. 115.
- Wade, J. 2002. *Química orgánica*. Segunda edición. Edit. Prensa educación. México.
- Ward, P. 1991. *Biotecnología de la Fermentación*. Editorial Acribia, S.A. España.
- White, J. 1995. *Yeast Technology*. Wiley y Sons. USA. 431 p.
- Williams, D. y Philtott, J. 1996. A pint a day. *Chemistry in Britain*, 32, 41-43.


Xiao, J; Zhou, Z. y Zhang, G. 2004. Ant colony system algorithm for the optimization of beer fermentation control. *Journal of Zhejiang University Science*. 5(12):1597-1603 pp.

Yamamoto, N.; Yamamoto, N.; Amemiya, H.; Yokomori, Y.; Shimizu, K. y Totsuka, A. (1991) Electrophoretic karyotypes of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 358-363.

APENDICE

Apéndice 1: Hoja de Evaluación de Panel Sensorial

Hoja de Evaluación de Panel Sensorial

TEST DE CONTROL PARA DIFERENCIAR	
Nombre: _____ Fecha: _____ Nº de panelista: _____	
Muestra patrón: <i>Cerveza cristal (tipo ale)</i>	
Atributo: COLOR	
Instrucciones: 1. Ud. recibirá 12 muestras de prueba rotuladas con un código de 3 dígitos y una muestra patrón. 2. Evalúe de izquierda a derecha, comparando cada muestra con la muestra patrón. Determine la intensidad en color y marque con una línea vertical sobre la escala lineal mostrada abajo. Indique el código sobre la línea vertical.	
Escala Lineal	
Comentarios: _____ _____ _____ _____	



Apéndice 2: Resultados análisis físico y químico

Resultados de la acidez y pH

Tiempo (Hrs)	20% coca/3% inóculo		20% coca/5% inóculo		30% coca/3% inóculo		30% coca/5% inóculo	
	Acidez		Acidez		Acidez		Acidez	
	pH	(g/L)	pH	(g/L)	pH	(g/L)	pH	(g/L)
0	5.6	0.60	5.6	0.60	5.6	0.60	5.6	0.60
12	5.3	0.88	5.3	0.78	5.3	0.79	5.4	0.82
24	4.9	1.26	5.0	1.12	4.9	1.39	5.1	1.05
36	4.6	1.61	4.7	1.48	4.5	1.94	4.8	1.62
48	4.4	2.04	4.6	1.68	4.4	2.00	4.5	1.86
60	4.3	2.09	4.5	1.74	4.4	2.06	4.4	1.90
72	4.3	2.09	4.5	1.74	4.3	2.08	4.4	1.90

Resultados de etanol

Tiempo (Hrs)	20% coca/3% inóculo	20% coca/5% inóculo	30% coca/3% inóculo	30% coca/5% inóculo
0	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0.71	0.91	1.14	0.71
24	2.08	2.52	2.86	1.89
36	3.22	3.43	3.75	2.50
48	3.77	3.99	4.38	3.52
60	4.82	4.42	5.21	4.25
72	5.26	4.79	5.47	5.10

Resultados de la densidad

Tiempo (Hrs)	20% coca/3% inóculo	20% coca/5% inóculo	30% coca/3% inóculo	30% coca/5% inóculo
0	1.0374	1.0374	1.0382	1.0380
12	1.0352	1.0343	1.0358	1.0344
24	1.0249	1.0244	1.0250	1.0246
36	1.0165	1.0172	1.0169	1.0174
48	1.0132	1.0141	1.0135	1.0144
60	1.0103	1.0116	1.0108	1.0117
72	1.0092	1.0105	1.0096	1.0102

Resultados de proteína

Proteína (g/L)			
20% coca 3% inóculo	20% coca 5% inóculo	30% coca 3% inóculo	30% coca 5% inóculo
1.00	0.80	0.80	1.00
0.80	1.00	1.00	1.00
1.00	1.00	1.00	1.00

Resultados de calcio

Calcio mg/L			
20% coca 3% inóculo	20% coca 5% inóculo	30% coca 3% inóculo	30% coca 5% inóculo
136.35	151.50	196.95	181.80
151.50	151.50	181.80	196.95
136.35	151.50	181.80	212.10

Apéndice 3: Resultados de análisis de varianza

Apéndice 3.1: Análisis de Varianza para Proteína

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Coca	0.0008333	1	0.0008333	0.33	0.5847
B:Inóculo	0.0008333	1	0.0008333	0.33	0.5847
AB	0.0008333	1	0.0008333	0.33	0.5847
bloques	0.005	2	0.0025	1	0.4219
Error total	0.015	6	0.0025		
Total (corr.)	0.0225	11			

Apéndice 3.2: Análisis de Varianza para Calcio

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Coca	6197.11	1	6197.11	51.16	0.0004
B:Inóculo	306.03	1	306.03	2.53	0.1631
AB	0	1	0	0	1
bloques	38.2537	2	19.1269	0.16	0.8574
Error total	726.821	6	121.137		
Total (corr.)	7268.21	11			

Apéndice 3.3.: Análisis de Varianza para “flavor” Acetaldehido

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Coca	0.001805	1	0.001805	0.61	0.4487
B:Inóculo	0.000245	1	0.000245	0.08	0.7779
AB	0.000605	1	0.000605	0.21	0.6584
bloques	0.01188	4	0.00297	1.01	0.4407
Error total	0.03532	12	0.0029433		
Total (corr.)	0.049855	19			

Apéndice 3.4: Análisis de Varianza para “flavor” Amargo

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Coca	0.136125	1	0.1361250	57.78	0.0000
B:Inóculo	0.001805	1	0.0018050	0.77	0.3986
AB	0.003125	1	0.0031250	1.33	0.2719
bloques	0.02737	4	0.0068425	2.90	0.0680
Error total	0.02827	12	0.0023558		
Total (corr.)	0.196695	19			

Apéndice 3.5: Análisis de Varianza para “flavor” Metálico

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Coca	0.000405	1	0.000405	0.15	0.7045
B:Inóculo	0.004205	1	0.004205	1.57	0.2346
AB	0.009245	1	0.009245	3.44	0.0882
bloques	0.10182	4	0.025455	9.48	0.0011
Error total	0.03222	12	0.002685		
Total (corr.)	0.147895	19			

Apéndice 3.6: Análisis de Varianza para “flavor” Cuero

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Coca	0.000125	1	0.000125	0.14	0.7196
B:Inóculo	0.000405	1	0.000405	0.44	0.5207
AB	0.002645	1	0.002645	2.86	0.1166
bloques	0.09822	4	0.024555	26.55	0.0000
Error total	0.0111	12	0.000925		
Total (corr.)	0.112495	19			

Apéndice 3.7: Análisis de Varianza para “flavor” frutal o rosal

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Coca	0.86528	1	0.86528	187.53	0.0000
B:Inóculo	0.15488	1	0.15488	33.57	0.0001
AB	0.01922	1	0.01922	4.17	0.0639
bloques	0.03355	4	0.0083875	1.82	0.1903
Error total	0.05537	12	0.0046142		
Total (corr.)	1.1283	19			

Apéndice 3.8: Análisis de Varianza para “flavor” Alcohólico

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Coca	0.000045	1	0.000045	0.07	0.7930
B:Inóculo	0.036125	1	0.036125	57.8	0.0000
AB	0.000605	1	0.000605	0.97	0.3446
bloques	0.03658	4	0.009145	14.63	0.0001
Error total	0.0075	12	0.000625		
Total (corr.)	0.080855	19			

Apéndice 3.9: Análisis de Varianza para “flavor” Coca

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Coca	0.05408	1	0.05408	31.55	0.0001
B:Inócula	0.00098	1	0.00098	0.57	0.4642
AB	0.00072	1	0.00072	0.42	0.5291
bloques	0.11367	4	0.0284175	16.58	0.0001
Error total	0.02057	12	0.0017142		
Total (corr.)	0.19002	19			

Apéndice 3.10: Análisis de Varianza para “flavor” Diacetilo

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Coca	0.00032	1	0.00032	0.03	0.8574
B:Inóculo	0.00392	1	0.00392	0.41	0.5326
AB	0.00512	1	0.00512	0.54	0.4769
bloques	0.01178	4	0.002945	0.31	0.8657
Error total	0.11394	12	0.009495		
Total (corr.)	0.13508	19			

Apéndice 3.11: Análisis de Varianza para “flavor” Levadura

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Coca	0.00032	1	0.00032	0.35	0.5661
B:Inóculo	0.02312	1	0.02312	25.15	0.0003
AB	0.00128	1	0.00128	1.39	0.2608
bloques	0.30917	4	0.0772925	84.09	0.0000
Error total	0.01103	12	0.0009192		
Total (corr.)	0.34492	19			

Apéndice 3.2: Análisis de Varianza para Color

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Coca	0.0405	1	0.0405	17.39	0.0013
B:Inóculo	0.34322	1	0.34322	147.36	0.0000
AB	0.01058	1	0.01058	4.54	0.0544
bloques	0.04405	4	0.0110125	4.73	0.0160
Error total	0.02795	12	0.0023292		
Total (corr.)	0.4663	19			

Apéndice 4: Levaduras

3.1. Aislamiento e identificación de levaduras

En la investigación se utilizó cepas de levaduras nativas, las cuales se aislaron de nichos naturales, las muestras utilizadas para el aislamiento de levaduras fueron tomadas de nichos naturales, a partir de chicha de jora, de la chichería estancia – Andahuaylas, así mismo de mosto de caña de azúcar de la destilería Espinoza, del valle Pachachaca, Abancay; ambas muestras procedentes de la Región Apurímac – Perú. Las muestras que se recolectaron proceden de prácticas cotidianas de elaboración de chicha de jora y elaboración de cañazo.

3.1.1. Aislamiento de levaduras

Se tomó 5 ml de muestra y se llevó a un tubo de ensayo, luego se adicionó 10 ml de solución Rauling y posteriormente se dejó en reposo a 20 °C, durante 24 horas. El principio se basa en la actividad isotónica que produce la solución Rauling frente a la pared celular de bacterias.

Después de 24 horas se realizaron diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} en agua peptonada estéril al 1% a partir de la muestra que contiene solución Rauling. De las diluciones se tomaron asepticamente 0,5 ml que fueron sembradas en profundidad en agar Saboreaud al cual se le adicionó 300 mg/L de metabisulfito de sodio, a pH 3,5 como agente inhibidor de levaduras no *Saccharomyces*. Luego de ello se llevó a incubación durante 48 horas, a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Las colonias crecidas en el agar se resembraron en tubos con agar inclinado de igual composición, sola que en este caso el pH se ajustó a 5,6. Luego de ello, los tubos se incubaron

durante 48 horas a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. De esta manera se realizó el aislamiento de cepas de levaduras nativas.

Composición química para 100 ml de solución Rauling

- Peptona 0.50 g
- NaCl 0.85 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.90 g
- KH_2PO_4 0.15 g
- Agua destilada (enrasar a 100 ml)
- pH 7.6

3.1.2. Mantenimiento de cepas aisladas

Las cepas aisladas en agar inclinado se conservaron a 6°C con la finalidad de disminuir la variabilidad genética. Así mismo, cada cepa se resembró en agar nuevo de igual composición cada 3 meses.

3.1.3. Identificación de cepas de levadura aisladas

La identificación de géneros se realizó mediante microscopía electrónica y estudio fisiológico. Para la determinación morfológica se utilizó un microscopio electrónico Revelatium 3, USA. Así mismo, en los ensayos de fisiología se utilizaron los siguientes azúcares; glucosa, almidón, galactosa, maltosa, lactosa y sucrosa.

3.1.3.1. Estudio morfológico de colonias y células aisladas

Las colonias aisladas se observaron directamente en el microscopio a una resolución de 40X, así se determinaron el color, textura y la forma de las colonias crecidas sobre agar Sabouraud. Para la observación de células se preparó una suspensión celular a partir de las colonias aisladas y se observó en el microscopio a la misma resolución. Se determinó la forma de las células como una herramienta para la identificación de géneros de levaduras.

3.1.3.2. Estudio fisiológico de levaduras

El estudio fisiológico se realizó cultivando las cepas aisladas en un medio de cultivo líquido con 2 % p/v de fuente de carbono, 1% p/v de peptona, 0.5% p/v de extracto de levadura ajustando el pH a 5,6. Se utilizó la técnica de fermentación en tubos de ensayo conteniendo tubos Durham, para ello se tomó una porción de cada colonia crecida en agar Saboraud y se inoculó directamente en los tubos de ensayo, luego se llevó a incubación por 48 horas a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, realizando el control de producción de CO_2 y película a las 24 horas y 48 horas.

3.1.4. Estudio de la tolerancia al etanol y ácido acético

Se estudió de tolerancia al etanol y ácido acético se realizó con la finalidad de determinar la capacidad fermentativa de las cepas de levadura aisladas en presencia de ácido acético y etanol, metabolitos que normalmente producen durante la fermentación alcohólica.



3.1.4.1. Tolerancia al etanol

La tolerancia de las cepas aisladas al etanol exógeno se determinó evaluando su capacidad fermentativa. Se utilizó la técnica de cultivo en tubos de ensayo conteniendo tubos Durham en un medio líquido con 2 %p/v de fuente de carbono, 1% p/v de peptona, 0.5% p/v de extracto de levadura ajustando el pH a 5,6, al cual se le añadió etanol a 97% v/v hasta alcanzar concentraciones en los tubos de 2.5, 5, 7.5 y 10 % v/v respectivamente. La temperatura de fermentación fue 29°C \pm 1°C y se realizó el control de los resultados a las 24 y 48 horas a través de la observación de la retención de CO₂ en los tubos Durham.

3.1.4.2. Tolerancia al ácido acético

La tolerancia de las cepas aisladas al ácido acético se realizó evaluando su capacidad fermentativa, para lo cual se utilizó la técnica de cultivo en tubos de ensayo conteniendo tubos Durham en un medio líquido con 2% p/v de fuente de carbono, 1% p/v de peptona, 0.5% p/v de extracto de levadura ajustando el pH a 5.6, al cual se agregó ácido acético 98% v/v, hasta alcanzar concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L respectivamente, la fermentación se realizó a 29°C \pm 1°C durante 48 horas, y los resultados se tomaron a las 24 horas y 48 horas observando el nivel de CO₂ atrapado en los tubos Dirham.

3.1.5. Estudio de producción de etanol

El estudio de producción de etanol se realizó con la finalidad de determinar la capacidad fermentativa de las cepas de levadura aisladas utilizando un medio de cultivo de composición similar al medio que normalmente se utiliza en la

fermentación de cerveza. Así mismo se determinó la tolerancia al etanol producido por cada cepa durante la fermentación alcohólica.

3.1.5.1. Preparación de inóculo

El inóculo para los ensayos de fermentación se obtuvo cultivando las cepas aisladas en frascos Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 100 ml de mosto de malta de cebada al 2% p/v como medio de cultivo, el pH se ajustó a 5,6. La propagación del inóculo se realizó a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a 100 rpm de agitación, durante 48 horas en un agitador orbital.

3.1.5.2. Fermentación de mosto de cebada

Para determinar el volumen de etanol que las cepas seleccionadas son capaces de producir, se utilizó mosto de malta como medio de fermentación. El mosto de malta obtenido se diluyó hasta obtener 16% de sólidos totales. Las fermentaciones se realizaron a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y el pH del medio se ajustó a 5,6. Las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 200 ml de medio de fermentación estéril. A los matraces se acondicionaron gargantas de cisne conteniendo glicerol para asegurar la esterilidad del medio. Las lecturas se realizaron cada 12 horas y se determinaron la concentración de etanol, ácido acético, peso específico y el CO_2 disipado durante la fermentación. La fermentación se consideró terminada cuando el peso del medio de cultivo fue constante y no se observó producción de CO_2 . Además, la concentración de etanol producido se determinó mediante la técnica de sensitometría, y con la ayuda de una tabla de la relación de densidad y porcentaje de etanol se determinó

la concentración de etanol del medio de fermentación, y el pH (concentración de ácido acético) se realizó mediante la técnica de valoración potenciométrica.

4.2. Resultados del aislamiento e identificación de levaduras

El aislamiento de levaduras es importante porque permitió trabajar con cepas puras y así evaluar la contribución de la levadura en la definición de las características generales del producto final.

El procedimiento del aislamiento e identificación de levaduras esta descrita en el apéndice 04. La adición de metabisulfito de sodio está relacionada con el pH del medio. El pH define el grado de disociación del metabisulfito de sodio y la fracción activa antimicrobiana está conformada por SO₂ libre desde que otra parte de esta reacciona con compuestos como azúcares e intermediarios del metabolismo de levaduras como piruvato. El metabisulfito de sodio es un agente inhibidor del crecimiento y desarrollo de levaduras excepto en especies de los géneros *Saccharomyces* y *Saccharomycodes* (Estela, 2004).

Las cepas aisladas se conservaron en agar Saboreaud extracto de malta a 6 °C durante 3 meses. Las cepas aisladas pertenecientes al género *Saccharomyces* se rotularon para facilitar su identificación y fueron las siguientes:

Cepas aisladas de *Saccharomyces* sp.

Cepas	Género	Símbolo
I	<i>Saccharomyces</i> sp.	Sc BA-IA-2009-I
II	<i>Saccharomyces</i> sp.	Sc BA-IA-2009-II

Las cepas de levadura aisladas se utilizaron posteriormente en los ensayos de tolerancia a etanol, ácido acético y producción de etanol. De las cepas aisladas se seleccionó la más adecuada de acuerdo a las características del proceso de elaboración de cerveza.

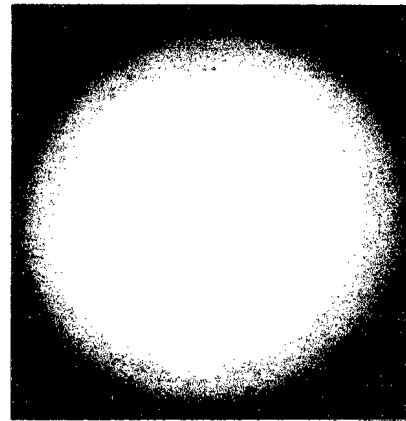
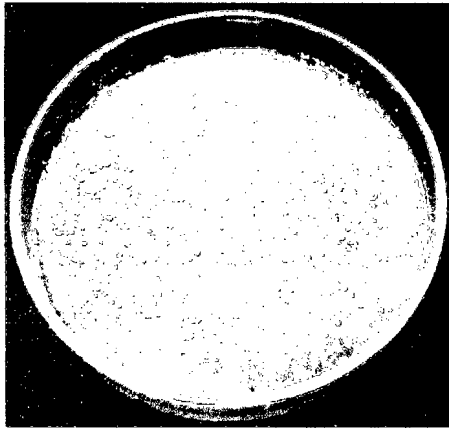
4.2.1. Identificación de cepas de levadura aisladas

La evaluación microscópica de apariencia de las colonias y el estudio fisiológico de fermentación de azúcares son técnicas básicas que permiten identificar grupos de levaduras y acercarse al género; sin embargo para la definición de especies y cepas es necesario métodos más complejos y técnicas biológicas moleculares.

4.2.1.1. Estudio morfológico de levaduras

. Los aspectos que se evaluaron fueron: textura, color, apariencia y forma de la colonia.

Las colonias aisladas en agar sabouraud presentaron textura blanda, color crema, apariencia húmeda y brillante, de forma circular con bordes irregulares y sin anillos, estas características coinciden con lo señalado por Withe, 1995 y, Aguilar y FranYios, 2003. En la figura, se muestra las imágenes de las colonias de levadura aisladas.



Apariencia de las colonias de levaduras aisladas sobre agar Saboraud e imagen de una colonia.

4.2.1.2. Estudio fisiológico de levaduras

El estudio fisiológico para la identificación de levaduras, incluye pruebas de fermentación aerobia, anaerobia y semi-anaerobia de más de 20 azúcares, pruebas de utilización aerobia y crecimiento en más 30 azúcares, y pruebas de utilización y crecimiento en fuentes de nitrógeno. El estudio fisiológico de fermentación de azúcares está detallado en la sección 3.1.3.2, y los resultados obtenidos se muestran en la tabla.

Los resultados de la tabla muestran que las dos cepas aisladas son capaces de fermentar intensamente glucosa, maltosa y sacarosa a comparación de lactosa y almidón, los resultados concuerdan con Lagos (1999), quien manifiesta que levaduras *Saccharomyces cerevisiae* fermentan glucosa y sacarosa y son variables en cuanto a la fermentación de maltosa y galactosa y no fermentan lactosa respectivamente. Estos resultados son importantes ya que contribuyen a confirmar el género de las cepas aisladas (*Saccharomyces*). Por otro lado, la fermentación de maltosa, glucosa y sacarosa ayuda a predecir la performance que tendrán las cepas aisladas en la fermentación del mosto.

Evaluación de la capacidad fermentativa de azúcares por levaduras aisladas.

Cepas		Sc BA-IA-2009-I		Sc BA-IA-2009-II	
Fuentes de Carbono		Formación de CO ₂	Formación de película	Formación de CO ₂	Formación de película
Glucosa	24 h	+++	-	+++	-
	48 h	+++	-	+++	-
Maltosa	24 h	+++	-	+++	-
	48 h	+++	-	+++	-
Almidón	24 h	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-
Sacarosa	24 h	+++	-	+++	-
	48 h	+++	-	+++	-
Galactosa	24 h	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-
Lactosa	24 h	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-

+ = Débil, ++ = Moderado, +++ = Intenso

La formación de película en la parte superior del medio de cultivo esta generalmente asociado al requerimiento de oxígeno por parte de las levaduras. Levaduras altamente reductoras tienden a formar gruesas capas de película. Las levaduras formadoras de película pertenecen comúnmente a los géneros *Kloeckera*, *Pichia*, *Hansenula* y algunas especies del genero *Saccharomyces* (Estela 2004).

En los resultados de la tabla 05 se observa que las dos cepas aisladas no producen película, esto da la idea que las levaduras no tienen carácter reductor por lo cual desde el punto de vista tecnológico es favorable ya que el requerimiento de oxígeno para su desarrollo adecuado es reducido.



4.2.2. Estudio de la tolerancia al etanol y ácido acético

El etanol y ácido acético son los principales componentes producidos durante la fermentación alcohólica, ellos tienen efectos inhibitorios en la fermentación de azúcares a medida que su concentración se incrementa durante la fermentación. En la producción de cerveza se utilizan habitualmente cepas de levadura que puedan tolerar concentraciones de etanol sobre el 5% v/v.

4.2.2.1. Tolerancia al etanol

La tolerancia al etanol por levaduras está relacionado con la composición de los lípidos de su membrana celular. Las levaduras que toleran concentraciones altas de etanol son aquellas capaces de mantener la estabilidad de su membrana celular en el transcurso de la fermentación. Los resultados se muestran en la tabla.

Evaluación de la tolerancia al etanol exógeno por levaduras aisladas.

Cepa	Conc. de etanol	Sc BA-IA-2009-I		Sc BA-IA-2009-II	
		Formación de CO ₂	Formación de película	Formación de CO ₂	Formación de película
2.50%	24 h	+++	-	+++	-
	48 h	+++	-	+++	-
5.00%	24 h	+	-	++	-
	48 h	+++	-	+++	-
7.50%	24 h	+	-	+	-
	48 h	++	-	++	-
10.00%	24 h	-	-	-	-
	48 h	-	+	-	+

+ = Débil, ++ = Moderado, +++ = Intenso

La tolerancia al etanol se determinó indirectamente observando la producción de CO₂ a 24 y 48h de cultivo. La producción de CO₂ es un indicador de la capacidad



que tienen las cepas aisladas para fermentar azúcares en presencia de una determinada concentración de etanol exógeno. Los resultados de la tabla muestran que ambas cepas de levadura fermentan intensamente aún con una concentración de 5%v/v de etanol exógeno y moderadamente aún con una concentración de 7.5%v/v de etanol adicionado externamente al medio. Estos resultados son favorables para nuestro propósito, da una idea que ambas cepas podrían utilizarse en la producción de la cerveza desde que el contenido alcohólico esperado de la cerveza será de 5% v/v. Es necesario indicar que, el efecto inhibitorio del etanol exógeno es menor al efecto inhibitorio del etanol endógeno, aquél etanol producido por las levaduras durante la fermentación de azúcares internamente, sin embargo, los resultados muestran un punto de partida para entender la habilidad fermentativa de ambas cepas aisladas y seleccionar la más adecuada para el proceso de elaboración de cerveza. Explicaciones sobre el efecto inhibitorio del etanol fueron mencionados ya en su momento por Jiménez (1986) quien manifiesta que el etanol ejerce una inhibición no competitiva en multitud de funciones. Así mismo, contribuciones para explicar el efecto del etanol sobre la membrana celular fueron previamente discernidos por Alexandre *et al.*, (1994); Leao y Van Uden, (1980,1984) respectivamente.

Una diferencia importante en los resultados está en la fermentación a las 24horas de ambas cepas a una concentración de etanol exógeno de 5%v/v. La cepa Sc BA-IA-2009-I disminuyó la producción de CO₂ a comparación de la cepa Sc BA-IA-2009-II, esto podría deberse a una extensión de la fase de adaptación en respuesta a la concentración de etanol exógeno. Este fenómeno no sería

conveniente para los propósitos ya que se necesita cepas que tengan una rápida adaptación a concentraciones elevadas de etanol para completar la fermentación alcohólica.

En lo referente a la producción de película, los resultados muestran que las cepas aún en condiciones de estrés no producen película, esto es favorable ya que una vez más confirma que las cepas aisladas no podrían ser cepas del género *Kloeckera*, *Hansenula* o *Pichia* quienes son levaduras reductoras por excelencia.

4.2.2.2. Tolerancia al ácido acético

Las levaduras durante la fermentación de azúcares producen normalmente ácido acético, se producen concentraciones que no sobrepasan 1g/L, sin embargo estas concentraciones son suficientes para inhibir el crecimiento de las levaduras y detener la fermentación alcohólica en concordancia con lo manifestado por Acevedo *et al*,(2003). Los resultados se presentan en la tabla 07. El ácido acético y el etanol en conjunto en el medio ejercen un efecto sinérgico inhibitorio a medida que sus concentraciones se incrementan durante la fermentación alcohólica.

La evaluación de tolerancia al ácido acético exógeno por las cepas seleccionadas se determinó indirectamente mediante la observación de producción de CO₂. De los resultados mostrados en la tabla se infieren que ambas cepas fermentaron vigorosamente inclusive a concentraciones de 500 mg/L de ácido acético exógeno. La producción de ácido acético por levaduras está relacionada principalmente con

Por otro lado, respecto a la formación de película, en los resultados de la tabla, se observa que sólo la cepa Sc BA-IA-2009-II produjo película durante el cultivo. Esto se debería al hecho de que la cepa necesita oxígeno para convertir el ácido acético en componentes intermediarios menos tóxicos y mantener un equilibrio de pH al interior de la célula, en este caso este fenómeno representaría un mecanismo de respuesta al efecto inhibitorio del ácido acético.

4.2.3. Estudio de producción de etanol

Las levaduras producen etanol a condiciones anaerobias en presencia de azúcares fermentables. A condiciones naturales, la síntesis de etanol continúa hasta el final de la fermentación y se detiene cuando la fuente de carbono se agota o hasta que el efecto inhibitorio de alguno de los compuestos producidos durante la fermentación afecte el metabolismo fermentativo de la célula. En procesos de fermentación controlados como en el caso de la elaboración de cerveza es posible detener la fermentación cuando se haya obtenido el volumen deseado de etanol.

Producción de etanol y CO₂ por las cepas Sc BA-IA-2009-I y Sc BA-IA-2009-II, durante la fermentación de mosto de malta a 20 ± 1°C.

Tiempo (h)	pH		CO ₂ (g/L)		Etanol (ml/L)	
	Sc BA-IA-2009-I	Sc BA-IA-2009-II	Sc BA-IA-2009-I	Sc BA-IA-2009-II	Sc BA-IA-2009-I	Sc BA-IA-2009-II
0	5.6	5.6	0	0	0	0
12	4.6	4.6	10	13	14	18
24	4.2	4.1	57	62	36	43
36	4.3	4.2	68	69	50	52
48	4.3	4.2	71	71	56	56
60	4.3	4.2	72	72	57	57
72	4.3	4.2	72	73	68	70



la naturaleza en sí de la cepa, la temperatura de fermentación y la composición del medio de fermentación como lo manifestado por Bellisimi y Ingledew, (2004). Los resultados indican que las cepas podrían producir hasta 500mg/L de ácido acético debido a que toleran dichas concentraciones, sin embargo, el control de la temperatura influye en la disminución de su producción y este factor se tomó en cuenta en el proceso de fermentación de la cerveza. Es necesario mencionar que la presencia de ácido acético en concentraciones superiores a 500mg/L tiene influencia negativa en las características sensoriales de bebidas alcohólicas y más aún en el caso de las cervezas. Según Abad (2006) a la hora de seleccionar cepas de levadura en función de la acidez volátil el límite es de 0.5 g/L de ácido acético, aunque frecuentemente y en función de los valores obtenidos, se reduce a 0.3 g/L como valor máximo.

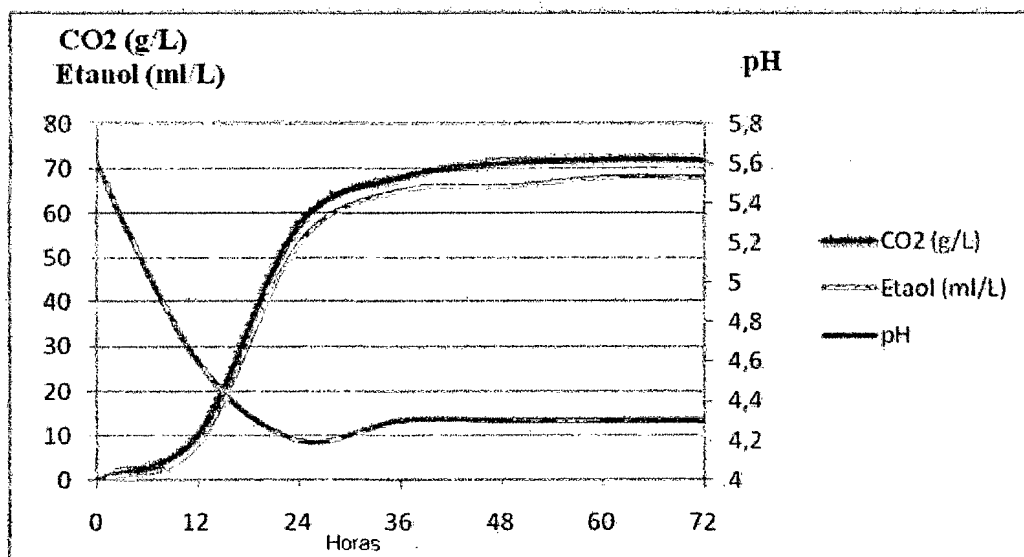
Efecto del ácido acético exógeno en la fermentación de levaduras aisladas.

Cepas		Sc BA-IA-2009-I		Sc BA-IA-2009-II	
		Formación de CO ₂	Formación de película	Formación de CO ₂	Formación de película
100ppm	24 h	+++	-	+++	+
	48 h	+++	-	+++	+
200ppm	24 h	+++	-	+++	+
	48 h	+++	-	+++	+
300ppm	24 h	+++	-	+++	+
	48 h	+++	-	+++	+
400ppm	24 h	+++	-	+++	+
	48 h	+++	-	+++	+
500ppm	24 h	+++	-	+++	+
	48 h	+++	-	+++	+

+ = Débil, ++ = Moderado, +++ = Intenso

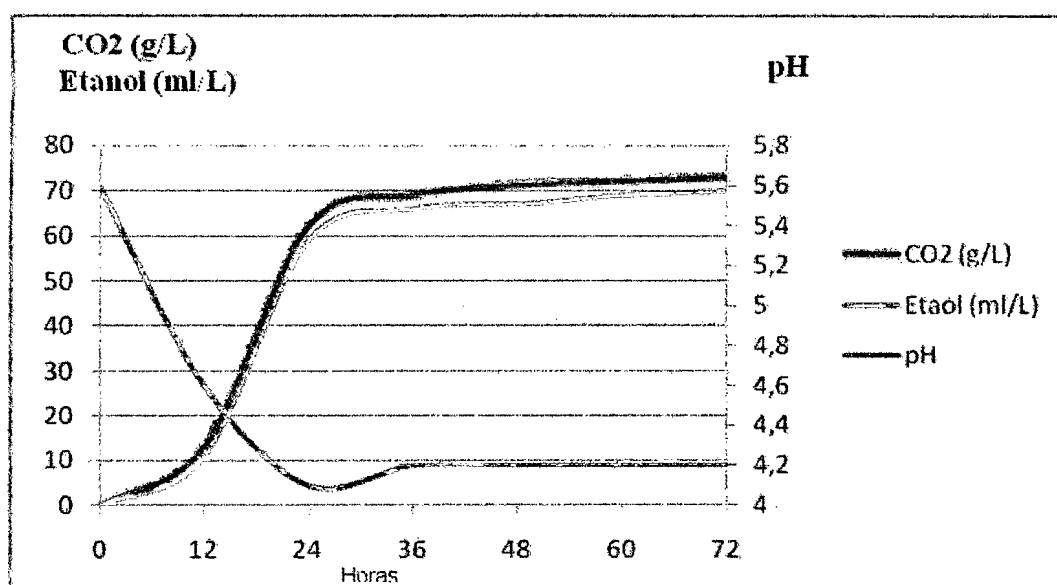


Los resultados de la tabla muestran la producción de etanol por las cepas aisladas de levadura. Se puede observar que la cepa Sc BA-IA-2009-II produce ligeramente mayor cantidad de etanol (70 ml/L) a las 72 horas de fermentación comparada con la cepa Sc BA-IA-2009-I (68ml/L), esta diferencia no es realmente relevante desde que el contenido de etanol requerido para la cerveza es de 5%v/v (50 ml/L), es decir, ambas cepas son capaces de completar la fermentación a condiciones controladas. La característica más resaltante es la velocidad de fermentación tal como se muestra en las figuras; se puede observar que la cepa Sc BA-IA-2009-II presenta la mayor tasa de producción de etanol. La tasa de producción de etanol o tasa de fermentación influye en el tiempo de fermentación y principalmente en la síntesis de componentes sensoriales resultados de la actividad fermentativa de las levaduras.



Transcurso de la fermentación con la cepa Sc BA-IA-2009-I en mosto de malta a 20±1 °C.

La producción de etanol está relacionada con la producción de CO₂, desde que la fermentación de los azúcares fermentables conduce a la formación de etanol, CO₂ y otros componentes en menor proporción. La producción de CO₂ puede controlarse indirectamente, midiendo la pérdida en peso del medio de fermentación; mediante esta técnica puede obtenerse la tasa de producción de CO₂ y así saber en qué momento la fermentación ha concluido. En los resultados se puede observar que la fermentación concluyó a las 72 horas cuando no se observó variabilidad en los pesos de los medios de fermentación.



Transcurso de la fermentación con la cepa Sc BA-IA-2009-II en mosto de malta a 20±1 °C.

Al comparar los resultados de la tabla, se confirma una vez más que el efecto inhibitorio del etanol endógeno es mayor que el efecto inhibitorio del etanol exógeno, esto es debido a que el etanol producido por la levadura actúa directamente en el aparato enzimático expuesto en el citoplasma y así mismo en la membrana citoplasmática, esta aseveración se confirma con los resultados

encontrados por Calderón (2007) y Suarez, (1997), quienes manifiestan que el alcohol producido a partir del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* puede en algún momento ser inhibitorio e incluso tóxico para sí misma pues afecta la traslocación de iones como Ca^{2+} y Mg^{2+} , que afecta la función y estabilidad de enzimas citoplasmáticas e incluso la función de los transportadores afectando el reconocimiento del sustrato, sin embargo la resistencia de algunas cepas a altas concentraciones depende de la composición lipídica de su membrana.

Referente a la variación del pH en las figuras se observan que durante las primeras 24 horas hay una disminución marcada del pH hasta alcanzar valores de 4.1 y 4.2. La disminución del pH se debe a la síntesis de ácido acético y ácido pirúvico principalmente, los resultados corroboran las conclusiones de Abad (2006) quien manifiesta que la mayor parte de los ácidos volátiles se forman en los primeros estadios de la fermentación alcohólica.

Apéndice 5: Malta

5.1. Procedimiento para la obtención de malta

Para la elaboración de la malta se utilizó cebada de la variedad seis hileras, El proceso de germinación de la cebada se realizó en un germinador construido para este fin (ver apéndice 4.1), donde se controló el flujo de aire (0.4 m/s), la humedad del grano y la temperatura durante el remojo, drenado, germinación, secado y curado. En la Figura 05 se detalla el flujo de obtención de la malta. La humedad se ha mantenido constante durante el tiempo de germinación.

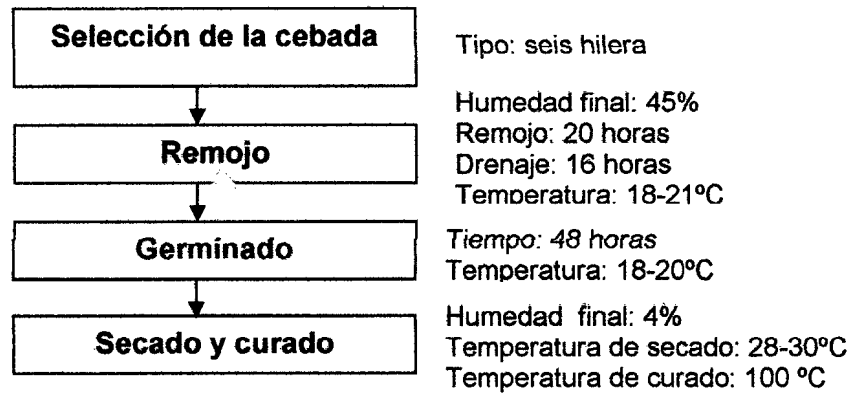
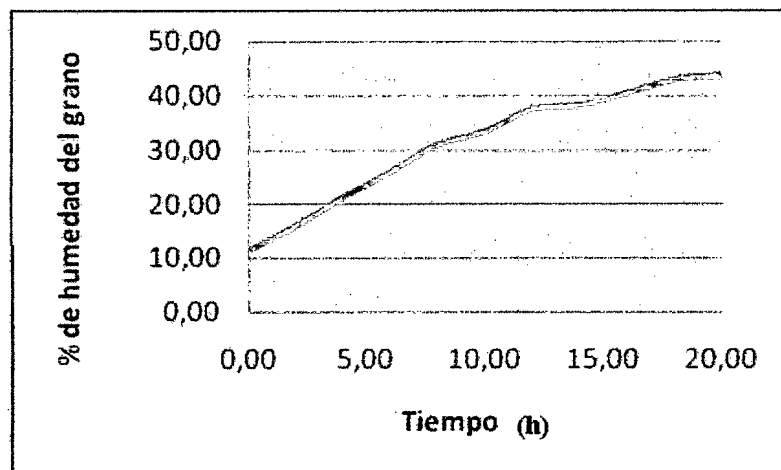


FIGURA 05: Método de obtención de malta. Acondicionado de (Horsney 2003).

5.2. Resultados de obtención de la malta

La elaboración de la cerveza comienza con la obtención de la malta. La germinación de la cebada se lleva a cabo a condiciones controladas de humedad (de 42 a 46%) y drenaje permanente durante el periodo de remojo para facilitar la dispersión del CO₂ liberado (Hough y, 1990 y Hornsey 2003). La figura muestra el transcurso del proceso de germinación.



Transcurso del incremento de humedad durante el remojo de la cebada “seis hilera” a temperatura de 19°C ±1°C.

Durante la germinación los granos alcanzaron una humedad de 43.7% a las 20 horas de remojo y 16 horas de drenado (ver figura). Cabe resaltar que la

absorción de agua está en función a la variedad, daños mecánicos sufridos antes del remojo, condiciones de cultivo, temperatura y tamaño del grano de cebada. El proceso de germinación se llevó a cabo a $19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas en un germinador construido para este fin provisto de mallas para facilitar el drenado y aireación de los granos, además un sistema de ventilación y un sistema de goteo para mantener la humedad necesaria para la germinación. Todo el proceso de germinación se realizó tomando en cuenta los procesos estándares utilizados en la obtención de malta manifestado por Hornsey (2003). Luego del proceso de germinación se determinó el porcentaje de granos germinados alcanzando un 97%, valor aceptado por la norma NMX-FF-043-SCFI-2003.

Según Hough (1990) la temperatura de germinación debe mantenerse en torno a los 15°C por un periodo de 4 a 6 días, sin embargo los resultados obtenidos demuestran que la germinación puede realizarse de manera óptima a temperaturas de 18°C a 20°C y así reducir el tiempo a 2 días y obtener un germinado uniforme.

La germinación se detuvo sometiendo los granos de malta a desecación a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 92.13 horas. La humedad en este caso se redujo de 44.30% a 26.39%. Finalmente, se realizó el curado de la malta de 80°C a 100°C por un periodo de 1 hora, obteniéndose una malta pálida de calidad cervecera con un contenido de humedad de 4.6%. Hough (1990), manifiesta que de acuerdo a la temperatura de secado se puede obtener una malta clara con gran parte de su contenido enzimático intacto, en tanto que la deshidratación rápida y a temperaturas altas rinde maltas oscuras, deficitarias en actividad enzimática.

Apéndice 6: Fotografías del germinador, agitador orbital y biorreactor

Apéndice 6.1: fotografía del germinador



Apéndice 6.2: fotografía del agitador orbital



Apéndice 4.3: fotografía del biorreactor

