

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería
Biotecnológica



“PRODUCCIÓN DE CERVEZA ARTESANAL ESTILO NEIPA UTILIZANDO UNA CEPA DE LEVADURA AUTÓCTONA AISLADA DE CHICHA DE GUIÑAPO DE LA CIUDAD DE AREQUIPA.”

Tesis presentada por la Bachiller:

Epezúa Castañeda, Brenda Rosy

Para optar el Título Profesional de:

Ingeniera Biotecnóloga

Asesora:

Ing. López Álvarez, Natalia

Arequipa – Perú

2021

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N° 20190000003993

N° Trámite en Fac. 422-2019

Fecha Recep. Fac. 29-01-2019

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **ESPEZUA CASTAÑEDA, Brenda Rosy**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

**"PRODUCCION ECO Y BIOSUSTENTABLE DE CERVEZA ARTESANAL FUNCIONAL (USMA)
UTILIZANDO CEPAS DE LEVADURA AUTOCTONAS DE LA REGION AREQUIPA AISLADAS DE
CHICHA DE GÜIÑAPO"**

DICTAMINADORES: *Ing. Eugenia Zeballos de Zenteno* 2) *Ing. Willy Valdivia Carpio*

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **"PRODUCCION DE CERVEZA ARTESANAL (USMA) UTILIZANDO CEPAS DE LEVADURAS AUTOCTONAS DE LA REGION AREQUIPA AISLADAS DE CHICHA DE GÜIÑAPO"**, después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

FIRMAS: *Eugenia Zeballos de Zenteno*

Willy Valdivia Carpio

FECHA 05-04-19

ASESOR: *MAG. NATALIA LÓPEZ ALVAREZ*

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Dr. Jaime Cárdenas García, Decano de la Facultad De Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, por intermedio de la presente y en mi condición de Asesor del Trabajo de investigación con cambio de título a: **"PRODUCCIÓN DE CERVEZA ARTESANAL (USMA) UTILIZANDO UNA CEPAS DE LEVADURA AUTÓCTONA AISLADA DE LA BEBIDA FERMENTADA CHICHA DE GÜIÑAPO DE LA CIUDAD DE AREQUIPA."** presentado por la recurrente, cumpla con informar, que se ha procedido a verificar el cumplimiento de los objetivos, a través de la revisión de la metodología, resultados y conclusiones correspondientes, por lo tanto, se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

FIRMA *Jaime Cárdenas García*

FECHA 25 - 08 - 2020

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Dr. Javier Roque Rodríguez
- 2) Mag. Jaime Barreda del Carpio
- 3) Ing. Willy Valdivia Carpio

DICTAMEN FINAL:

FIRMA

Jaime Barreda del Carpio FECHA

JURADOS: PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO

FECHA

HORA

LOCAL

FIRMA DEL DECANO

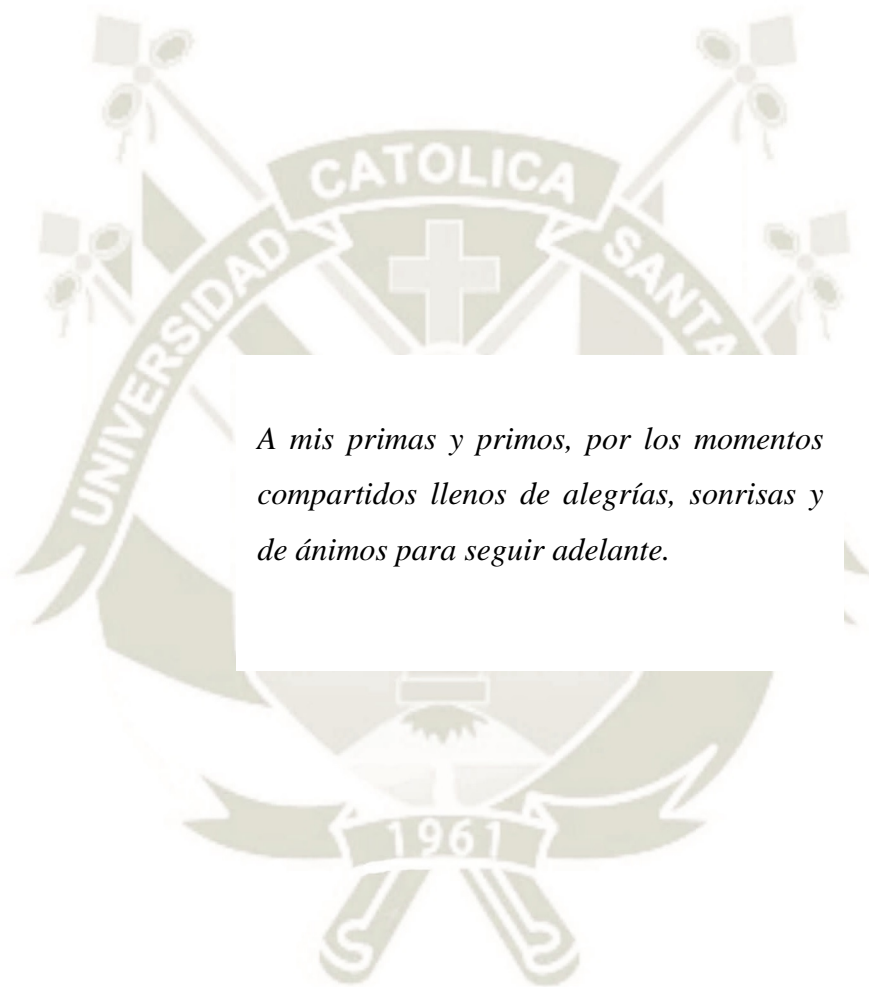
FECHA

A Dios, por guiarme en la vida, por llenar mi camino con excelentes personas, por darme una familia llena de amor y amigos incondicionales.



A mi padre Boris, mi madre Cecilia y mi abuelo Fausto por darme su apoyo, dedicación, su amor, consejos y confianza para seguir con mi carrera y dar lo mejor de mí. Por ustedes sigo adelante hacia mis metas y sueños, son la razón y motor de mi vida.

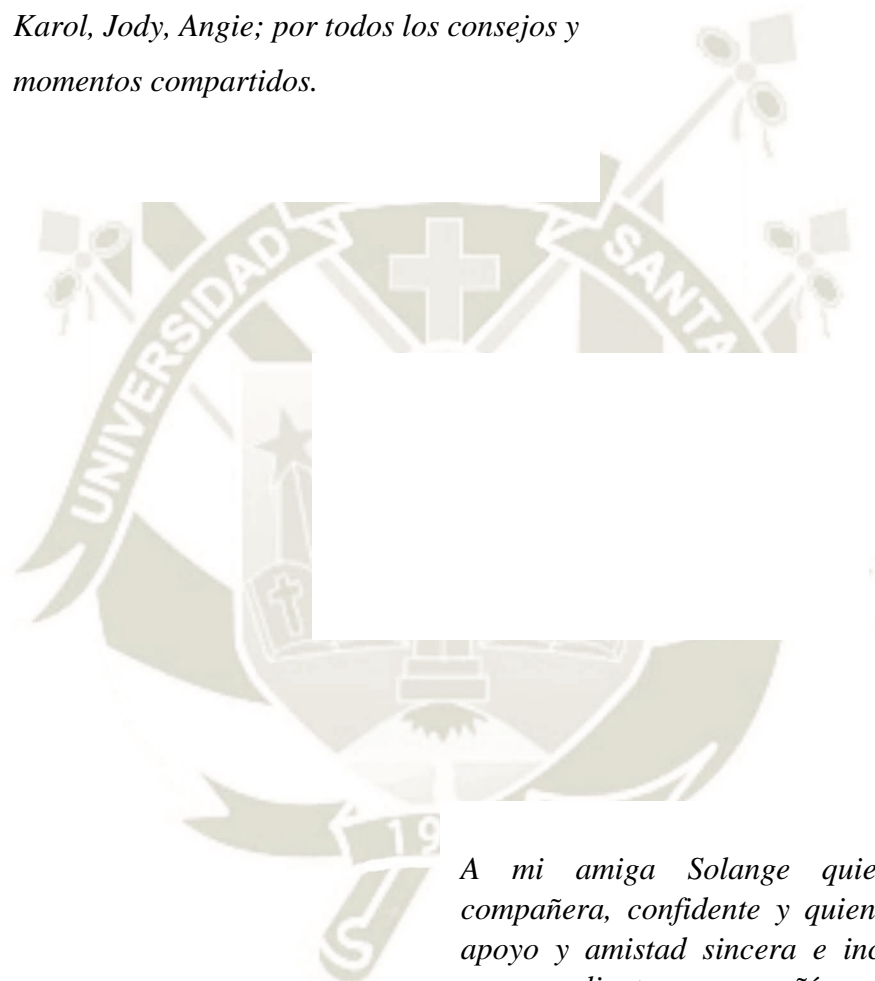
*A mi hermano Bruno, compañero de juegos,
travesuras y amigo de toda una vida; por su
apoyo y aliento.*



*A mis primas y primos, por los momentos
compartidos llenos de alegrías, sonrisas y
de ánimos para seguir adelante.*

*A mis amigos de “Fiesta patronal”,
compañeros de carpeta y de experiencias
vividas, por la amistad incondicional.*

*A mis amigas Marjory, Kelly, Danitza,
Karol, Jody, Angie; por todos los consejos y
momentos compartidos.*



*A mi amiga Solange quien fue mi
compañera, confidente y quien me dio su
apoyo y amistad sincera e incondicional,
por su aliento y compañía en momentos
valiosos.*

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido desarrollado en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María ubicados en el pabellón H- 301 y H-302 y en los laboratorios BioAL S.A.C a cargo de Mónica Santa María a quien agradezco por el apoyo brindado.

A la cervecería artesanal MACHAY, agradecimiento especial a Javier Paredes Mur por su apoyo incondicional brindándome las instalaciones y equipos de la planta cervecera para desarrollar el presente trabajo, dándome consejos para encaminarme y alegrándose por cada pequeño logro que obtuve.

A mis amigos y los amantes de la cerveza artesanal por ayudarme a la realización de la encuesta y darme la motivación para seguir enfocada en este rubro.

A la Mg. Natalia López Álvarez, por su apoyo, comprensión, paciencia y orientación del presente trabajo.

Al Ing. Javier Roque Rodríguez, al Ing. Willy Valdivia Carpio y también al Ing. Jaime Barreda del Carpio por su apoyo y acertadas correcciones en la orientación del presente trabajo.

A la Universidad Católica de Santa María de Arequipa, por la formación profesional en mi educación universitaria.

RESUMEN

La chicha de Guiñapo es una bebida fermentada tradicional de la ciudad de Arequipa, esta bebida tiene reseñas tanto históricas como en la gastronomía regional. El objetivo de esta investigación fue aislar las levaduras autóctonas presentes en la chicha de Guiñapo que son responsables de la fermentación y utilizadas para producir una cerveza artesanal de calidad.

En este trabajo se logró aislar una cepa de levadura del género *Saccharomyces* especie *cerevisiae*, identificada por su morfología celular, por pruebas bioquímicas con métodos de asimilación y fermentación, por pruebas moleculares analizando: Extracción de ADN – GeneJet Genomic, Amplicación del ADN por PCR de punto final, Secuenciación Sanger y Análisis bioinformático.

Teniendo como resultado que la levadura autóctona tiene un 97.51% de similitud con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* registrada en la base de datos de NCBI y con esta cepa de levadura se logró elaborar una cerveza artesanal en un plan piloto estilo Amber Ale y se realizó una comparación con la capacidad fermentativa de una levadura comercial (Safale-04), los resultados mostraron lo siguiente: características similares en porcentaje de Alcohol % y densidades, resaltando la turbidez que produce la levadura nativa con 6.6 % de Alcohol, cumpliendo con parámetros de densidad (inicial y final), pH, IBUS, característica del estilo NEIPA presentando una turbidez y frescura, con gran aceptación en la encuesta de análisis sensorial.

Finalmente, se logró elaborar una cerveza artesanal con una levadura nativa aislada de chicha de Guiñapo, la cual cumple con características de calidad con estándares comerciales.

Palabras clave: *Autóctona, chicha de Guiñapo, cerveza artesanal, cepa, levadura, Saccharomyces, IBU, NEIPA, análisis sensorial, PCR de punto final.*

ABSTRACT

Guiñapo's chicha is undoubtedly a traditional fermented drink of the city of Arequipa; this drink has a presence positioned within both historical and regional gastronomy reviews, resulting in a tradition that continues to endure over time. Thus, the opportunity is seen to use the native yeast responsible for the fermentation present in this drink to produce quality craft beer. Guiñapo chicha is undoubtedly a traditional fermented drink of the city of Arequipa; this drink has a positioned presence within both historical and regional gastronomy reviews, resulting in a tradition that continues to endure over time. Thus, the opportunity is seen to use the native yeast responsible for the fermentation present in this drink to produce quality craft beer.

In this work, it was possible to isolate a yeast strain of the genus *Saccharomyces* species *cerevisiae*, identified by its cell morphology, by biochemical tests with assimilation and fermentation methods, by molecular tests analyzing: DNA extraction - GeneJet Genomic, DNA amplification by PCR of end point, Sanger Sequencing and Bioinformatic Analysis.

As a result, the native yeast has a 97.51% similarity with the *Saccharomyces cerevisiae* yeast registered in the NCBI database and with this yeast strain it was possible to produce a craft beer in an Amber Ale style pilot plan and a comparison was made With the fermentative capacity of a commercial yeast (Safale-04), the results showed the following: similar characteristics in percentage of Alcohol% and densities, highlighting the turbidity produced by native yeast with 6.6% Alcohol, complying with density parameters (initial and final), pH, IBUS, characteristic of the NEIPA style presenting turbidity and freshness, with great acceptance in the sensory analysis survey.

Finally, a craft beer was made with a native yeast isolated from chicha de Guiñapo, which meets quality characteristics with commercial standards.

Keywords: *Strain, Guiñapo's chicha, craft beer, strain, yeast, Saccharomyces, IBU, NEIPA, sensory analysis, PCR of end point.*

ÍNDICE

RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS	xvi
INTRODUCCIÓN	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
HIPOTESIS	xx
OBJETIVOS	xxi
OBJETIVO GENERAL	xxi
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	xxi
CAPITULO I	1
1. MARCO TEÓRICO	2
1.1. Cerveza	2
1.2. Historia de la cerveza	2
1.3. Tipos De Cervezas	4
1.4. Composición de la cerveza	5
1.4.1. Agua	5
1.4.2. Levadura	7
1.4.3. Lúpulo	14
1.4.4. Malta	17
1.5. Elaboración de la cerveza	19
1.5.1. Materias primas y preparación de la malta	19
1.5.2. Maceración y filtración	20
1.5.3. Separación del mosto	21
1.5.4. Fermentación de la cerveza	21
1.5.5. Maduración y acondicionamiento final de la cerveza	22
1.6. Ley de pureza 1516	23
1.7. Estilo de cervezas	24
1.7.1. Estilo Amber Ale	25

1.7.2.	Estilo New England IPA	27
1.8.	Control de Calidad.....	29
1.8.1.	Dureza del agua	29
1.8.2.	Levaduras	31
1.8.3.	Lúpulo	31
1.8.4.	Malta	32
1.9.	Chicha de Guiñapo	33
1.9.1.	Historia de la Chicha, bebida emblemática de Arequipa	33
1.9.2.	Un método centenario para obtener el Guiñapo	33
1.9.3.	Proceso de elaboración de la chicha	36
1.9.4.	¿Chicha De Güiñapo O Chicha De Jora?	37
CAPITULO II		40
2.	MATERIALES Y METODOS	41
2.1.	Materiales	41
2.1.1.	Medios de cultivo.....	41
2.1.2.	Soluciones.....	41
2.1.3.	Reactivos	41
2.1.4.	Material biológico	41
2.1.5.	Material de plástico y vidrio	41
2.1.6.	Materiales de la planta cervecera Machay	42
2.1.7.	Equipos.....	42
2.2.	Metodología	43
2.2.1	Aislamiento, identificación y caracterización de la levadura autóctona de la chicha de guiñapo.....	43
2.2.2.	Caracterización fisicoquímica y con análisis estadísticos de Anova y T-student la cerveza artesanal obtenida con la levadura autóctona comparada con la comercial y realizar una aceptación sensorial por medio de una encuesta en cual por escala de Likert se evaluará apariencia, aroma, sabor e impresión final de la cerveza artesanal estilo NEIPA.....	48

2.2.3. Configurar un sistema de producción para la elaboración de la cerveza artesanal estilo NEIPA con la levadura obtenida biotecnológicamente.....	58
CAPITULO III.....	66
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
3.1.1.Aislamiento, identificación bioquímica y molecular de la levadura autóctona de chicha de guiñapo para producir cerveza artesanal.	67
3.1.2.Caracterización fisicoquímica y con análisis estadísticos de Anova y T-student la cerveza artesanal obtenida con la levadura autóctona comparada con la comercial y realizar una aceptación sensorial por medio de una encuesta en cual por escala de Likert se evaluará apariencia, aroma, sabor e impresión final de la cerveza artesanal estilo NEIPA.....	74
3.1.3.Configurar un flujograma de producción para la elaboración de cerveza NEIPA con la levadura obtenida biotecnológicamente.	77
CONCLUSIONES.....	80
RECOMENDACIONES.....	81
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXOS.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura N° 1.** Diagrama de flujo que ilustra el uso del agua en una fábrica de cerveza (8).
- Figura N° 2.** Procedimiento del método Sanger modificado (16).
- Figura N° 3.** Estructura de los ácidos α e iso α (17).
- Figura N° 4.** Estructura de los aceites esenciales típicos del lúpulo (18).
- Figura N° 5.** Diagrama de flujo de la elaboración de cerveza (26).
- Figura N° 6.** Cerveza Artesanal Rogue American Amber Ale (27).
- Figura N° 7.** Cerveza Artesanal Naparbier Natural (29).
- Figura N° 8.** El maíz en sus diferentes etapas hasta llegar a ser “Guiñapo” (35).
- Figura N° 9.** Vasos de diferentes tamaños para servir la chicha (34).
- Figura N° 10.** Local elegido para la recolección de la muestra.
- Figura N° 11.** Recolección de la muestra.
- Figura N° 12.** Observación al microscopio de la muestra 2, en proceso de fermentación.
- Figura N° 13.** Preparación del medio enriquecido Agar mosto de cerveza.
- Figura N° 14.** Campana de Durham en un medio azucarado.
- Figura N° 15.** Batería de tubos con diferentes medios para la identificación.
- Figura N° 16.** Maceración de la malta hasta 66° C.
- Figura N° 17.** Toma de la muestra filtrada para la prueba de yodo.
- Figura N° 18.** Adición de lúpulo en forma de pellets.
- Figura N° 19.** Muestra extraída previamente enfriada aproximadamente 100mL en una probeta, se procede a la medición de densidad inicial.
- Figura N° 20.** Inóculo en frasco estéril.
- Figura N° 21.** Activación de ambas levaduras por agitación.

Figura N° 22. Formación de sedimento al cabo de 4 días de la activación de la levadura.

Figura N° 23. Izquierda: Cerveza con levadura autóctona, Derecha: Cerveza con levadura comercial.

Figura N° 24. Carbonatación natural con adición de azúcar.

Figura N° 25. Cervezas embotelladas.

Figura N° 26. Modelo de la ficha de degustación de cerveza.

Figura N° 27. Adición de la malta a la olla.

Figura N° 28. Prueba de yodo.

Figura N° 29. Adición de cloruro de calcio.

Figura N° 30. Adición de sulfato de calcio.

Figura N° 31. Cornelius ya con la levadura activada y con un respirador artificial.

Figura N° 32. Primera adición del lúpulo a los Cornelius.

Figura N° 33. Segunda adición del lúpulo en una malla.

Figura N° 34. Carbonatación de la cerveza en los nuevos Cornelius.

Figura N° 35. Embotelladora semi automática “M-Maq”.

Figura N° 36. Levaduras encontradas en la muestra 2 a 40x en el microscopio.

Figura N° 37. Crecimiento de un solo tipo de colonia de levadura comercial (-) y la levadura autóctona (+).

Figura N° 38. Crecimiento exponencial celular de ambas levaduras.

Figura N° 39. Sistema de producción para la elaboración de cerveza NEIPA.

Figura N° 40. Cerveza estilo NEIPA elaborada con levadura autóctona.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Composición iónica del agua en los centros productores de cerveza (mg L⁻¹) (8).

Tabla N° 2. Composición de lúpulos comerciales (21).

Tabla N° 3. Adición del lúpulo de acuerdo a su contenido de amargor (19).

Tabla N° 4. Algunas especificaciones típicas establecidas por los cerveceros para varias maltas; para la malta destinada a la fabricación de ale se indican las variaciones toleradas (26).

Tabla N° 5. Tipos de malta, cantidad y porcentaje.

Tabla N° 6. Datos de la maceración: temperatura y tiempo.

Tabla N° 7. Datos del recirculado y lavado de malta: temperaturas, tiempo y adición de sales para la dureza del agua.

Tabla N° 8. Datos del hervor del lúpulo: Variedad, cantidad, %Alfa-ácidos y tiempo.

Tabla N° 9. Tipos de malta, cantidad y porcentaje.

Tabla N° 10. Datos de Temperatura y tiempo.

Tabla N° 11. Datos de recirculado y lavado de malta: temperaturas, tiempo y adición de sales para la dureza del agua.

Tabla N° 12. Datos del hervor del lúpulo: Variedad, cantidad, %Alfa-ácidos y tiempo.

Tabla N° 13. Resultados de los medios de cultivo por el método de Asimilación.

Tabla N° 14. Resultados de los medios de cultivo por el método de Fermentación.

Tabla N° 15. Resultados obtenidos por el Método Sanger en la levadura autóctona.

Tabla N° 16. Resultados obtenidos por el Método Sanger en la levadura safale (04)

Tabla N° 17. Identificación de la especie de la levadura autóctona por análisis bioinformático.

Tabla N° 18. Identificación de la especie de la levadura safale 04 por análisis bioinformático.

Tabla N°19. Conteo celular de la levadura autóctona comparada con levadura comercial.

Tabla N° 20. Resultados de los grados de amargor, densidades inicial y final.

Tabla N° 21. Resultados de los °Brix, pH y densidad.

Tabla N° 22. Resultados estadísticos de °Brix, pH y densidad.

Tabla N° 23. Resultados estadísticos de °Brix, pH, prueba T de student.

Tabla N° 24. Resultados de las características de la cerveza estilo NEIPA.



ÍNDICE DE ANEXOS

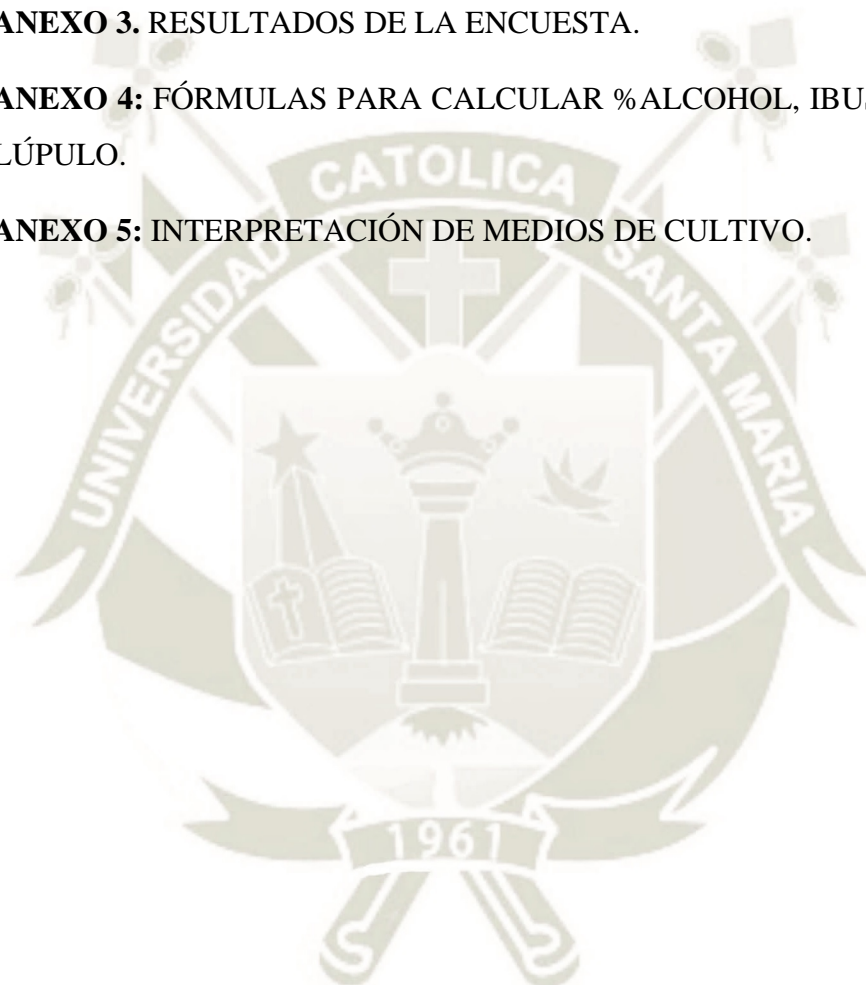
ANEXO 1. APLICACIÓN DEL MARCADOR COI POR PCR DE PUNTO FINAL DE LA LEVADURA NATIVA.

ANEXO 2. APLICACIÓN DEL MARCADOR COI POR PCR DE PUNTO FINAL DE LA LEVADURA SAFALE 04.

ANEXO 3. RESULTADOS DE LA ENCUESTA.

ANEXO 4: FÓRMULAS PARA CALCULAR %ALCOHOL, IBUS, GRAMOS DE LÚPULO.

ANEXO 5: INTERPRETACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.



INTRODUCCIÓN

La chicha de Guiñapo es una bebida fermentada tradicional de la ciudad de Arequipa, esta bebida tiene presencia dentro de reseñas tanto históricas como en la gastronomía regional, teniendo como resultado una tradición que sigue perdurando con el paso del tiempo.

La base esencial de esta chicha que es el Guiñapo, maíz característico de esta región; en las últimas décadas se ha perdido zonas de cultivo del mismo, mencionando también que si no fuera por las picanterías tradicionales que son puntos de consumo directo esta bebida pasaría al olvido. La elaboración de la chicha de Guiñapo es un trabajo tedioso, siendo esta una de las razones por la cual se está perdiendo el interés de elaborarla, actualmente solo existen 4 “Guiñaperos” en la ciudad, los cuáles se encargan de abastecer a las picanterías en su mayoría para su elaboración. La sociedad picantera de Arequipa conformada hace 8 años aproximadamente, tiene como misión revalorar esta bebida consumida por los beneficios que aportan sus nutrientes y que también es utilizada para la elaboración de platos típicos (Saida Villanueva, 2018).

Este trabajo busca un reconocimiento a esta bebida fermentada, ya que gracias al proceso de fermentación que ocurre en la “Chomba” se puede llegar a obtener con estudios biotecnológicos de aislamiento e identificación de una cepa de levadura, microorganismo responsable de la fermentación; con la que se puede elaborar otra bebida fermentada consumida a nivel mundial que es la cerveza.

La cerveza artesanal es un “boom” a nivel mundial ya que permite explorar, crear y mejorar estilos a partir de 4 elementos básicos: Agua, malta, levadura y lúpulo; siendo los 3 últimos insumos importados. Esta bebida alcohólica ha tomado mayor auge en el Perú ya que es una oportunidad de negocio y emprendimiento considerando que nuestro país está dentro de los mayores consumidores de cerveza a nivel mundial.

A diferencia de las cervezas producidas industrialmente, la cerveza artesanal presenta una amplia gama de estilos y tipos de fermentación. Sin mencionar también que la cerveza artesanal no lleva conservantes químicos por lo que su tiempo de vida es mucho más corto que una cerveza industrial.

En nuestro país existen alrededor de 100 cervecerías artesanales (38), las cuáles siempre buscan optimizar su elaboración reduciendo tiempo y también costo de los insumos, con este trabajo se pretende marcar un precedente en la elaboración de cerveza artesanal utilizando levadura nativa de la chicha de Guiñaipo.



LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

BioAl: Biotecnología de alimentos S.A.C.

CS: Medio Citrato de Simmons.

EMB: Medio Eosina Azul de Metileno.

IBU: International Bittering Unit (Unidad internacional de amargor).

LIA: Lysine Iron Agar (Lisina y Hierro).

MRVP: Medio Rojo de metilo, medio Voges proscauer.

OG: Densidad inicial.

O-F: Medio Oxido- fermentación.

OF: Densidad final.

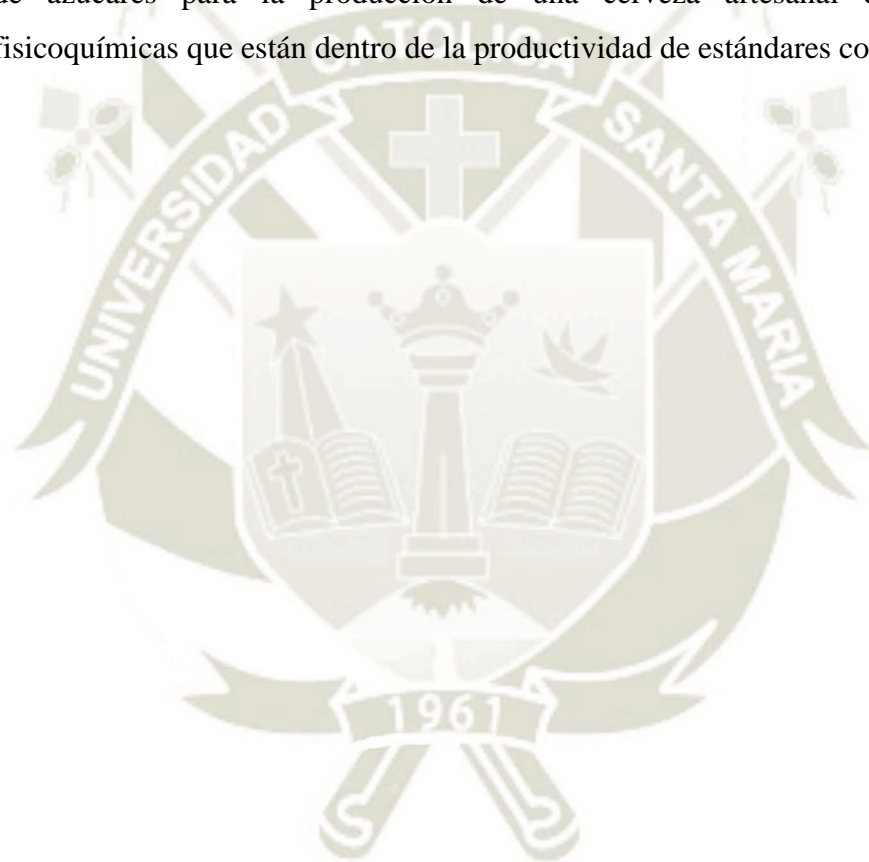
SIM: Sulfide Indole Motility (medio de sulfuro indol para movilidad).

TL: Teelöffel, término alemán significa “cucharada”.

TSI: Triple Sugar Iron Agar (triple azúcar y hierro).

HIPOTESIS

Debido a que la chicha de guñapo es una fuente microbiológica de levaduras autóctonas no caracterizadas, es posible que al aislar e identificar bioquímica y molecularmente una levadura autóctona, esta presente una alta capacidad fermentativa de azúcares para la producción de una cerveza artesanal con propiedades fisicoquímicas que están dentro de la productividad de estándares comerciales.



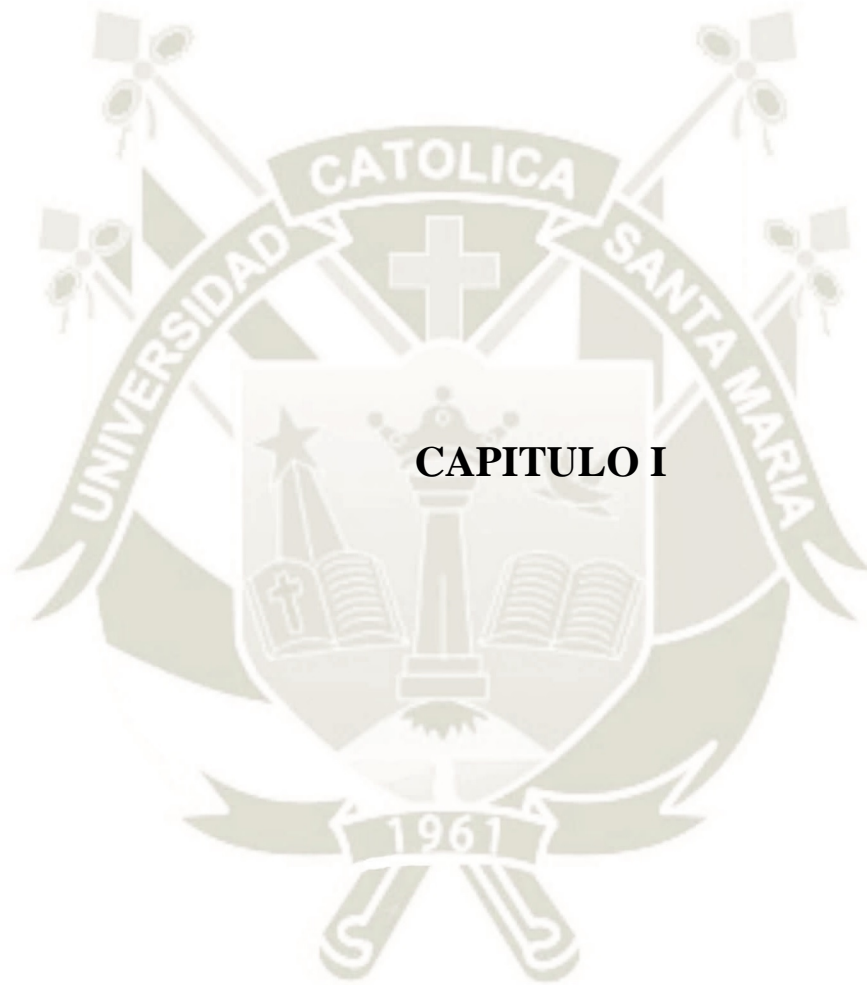
OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Producir cerveza artesanal estilo NEIPA utilizando una cepa de levadura autóctona aislada de chicha de guiñapo de la ciudad de Arequipa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar, identificar bioquímica y molecularmente la levadura autóctona de la chicha de guiñapo.
2. Caracterizar fisicoquímicamente y con análisis estadísticos de Anova y T-student la cerveza artesanal obtenida con la levadura autóctona comparada con la comercial y realizar una aceptación sensorial por medio de una encuesta en cual por escala de Likert se evaluará apariencia, aroma, sabor e impresión final de la cerveza artesanal estilo NEIPA.
3. Configurar un flujograma de producción para la elaboración de cerveza artesanal estilo NEIPA con la levadura obtenida biotecnológicamente.



1. MARCO TEÓRICO

1.1. Cerveza

Es la bebida resultante de la fermentación alcohólica, mediante levadura seleccionada, de un mosto procedente de malta de cebada, solo o mezclado con otros productos amiláceos transformables en azúcares por digestión enzimática, al cual se agrega lúpulo y/o sus derivados y se somete a un proceso de cocción (1).

Los cereales que contienen almidón no pueden fermentar directamente, sino que primero, mediante las enzimas fragmentadoras de almidón (amilasas), germinen y activarlos a azúcar de malta (maltosa) y “romperlos” a azúcar de uva (glucosa) (2).

1.2. Historia de la cerveza

Ya hace 6000 a 8000 años en Mesopotamia, entre los ríos Éufrates y Tigris (hoy Irak), dominaron el arte de la preparación de la cerveza. De los cereales germinados produjeron una bebida nutritiva, duradera y embriagadora. Para ello humedecían cebada o trigo Emmer, una antigua forma de trigo, llevando el cereal a la germinación. De los cereales germinados, la malta, se preparaba entonces el pan de cerveza, se desmenuzaba y se mezclaba con agua. En los climas calurosos de Oriente esto era importante, pues con ello se encontraba disponible una mezcla higiénicamente perfecta para disfrutar de ella. El alcohol es azúcar fermentado, un producto final del metabolismo de las levaduras. Un 2 o 3% de alcohol cambia la permeabilidad (fluidez) de la membrana citoplasmática de las bacterias e inhibe con ello su crecimiento (2). Existen evidencias de la elaboración de cerveza que pertenecen al apogeo de las civilizaciones egipcias y babilónica, de unos 4,300 años de antigüedad (3).

Los egipcios aprendieron que la fermentación empezaba más rápido si utilizaban de nuevo los restos de una cerveza próspera y descubrieron también la manera de repartir la cerveza en la edificación de una pirámide en jarras en el lugar de la construcción. Las cervezas egipcias eran principalmente oscuras; muchas veces tenían un contenido de alcohol del 12 al 15%; se preparaban de panes de cebada tostada (2).

En la Edad Media la elaboración de cerveza fue considerada un misterio, cuyos detalles eran celosamente guardado por los maestros cerveceros y sus gremios. Y ciertamente lo era, porque se desconocían las razones que justifican las diversas etapas del proceso de elaboración, la mayor parte de los cuáles, como la fermentación, fueron

descubiertas por casualidad. Así, el malteado consistía en la inmersión de la cebada en agua y en permitirle que germinara, pero no se conocía por qué la cebada se ablandaba y se hacía dulce. De un modo similar se desconocían por qué convenía secar la cebada germinada a temperaturas relativamente frías, a lo que se buscaban explicaciones esotéricas (4).

La palabra “bier” (en alemán cerveza) se debió obtener de los antiguos sajones *bere* o sea cebada. Los fabricantes de cerveza prósperos del pasado no podían saber, por supuesto, que la fermentación era causada por seres vivos, las levaduras.

Fue **Antonie van Leeuwenhoek** (1632 – 1723) quien vio por primera vez las primeras bacterias, con su microscopio de una lente y encontró perlas amarillas de levadura en una muestra de cerveza. En los tiempos de Leeuwenhoek se utilizaban ya levaduras de forma concentrada y purificada, tanto para la cocción del pan y la fabricación de cerveza (2).

Posteriormente entre 1836 y 1837 tres investigadores, Cagniard-Latour, Schwann y Kutzing manifestaron independientemente su opinión de que las levaduras eran una “cosa” viva, idea que fue ridiculizada por un cierto número de químicos eminentes, entre ellos Berzelius, Wholer y von Liebig. En 1847, Blondeau, profesor de física, estudió las fermentaciones que implicaban a los ácidos láctico, butírico y acético y a la urea y parece que fue el primero en manifestar que las diferentes fermentaciones eran llevadas a cabo por distintos “hongos”. A pesar de estas observaciones, no fue hasta 1856 cuando Louis Pasteur, llevó a cabo investigaciones detalladas acerca de las fermentaciones de la cerveza, concluyendo finalmente que las levaduras vivas fermentaban el azúcar en etanol y dióxido de carbono, cuando eran obligadas a vivir en ausencia de aire. Otro hito importante en el avance de la microbiología industrial y médica data del 1881, cuando Robert Koch, médico, exploró el desarrollo de técnicas de cultivo puro así como otros métodos bacteriológicos clásicos utilizados hasta la fecha (5).

La pasteurización ha permitido que la cerveza pase de una escala de producción local a nacional e internacional. Las industrias cerveceras han pasado rápidamente de ser unidades artesanales a grandes complejos cuyo objetivo es el mantener un producto de características uniformes aun cuando las materias primas, la planta y la escala de

operación estén cambiando continuamente. Para conseguir un producto reproducible, el proceso de fermentación se ha normalizado mediante el control de parámetros tales como la velocidad de inoculación, la viabilidad y condiciones de almacenamiento de las levaduras, las concentraciones de oxígeno disuelto, los contenidos de nitrógeno soluble y de azúcares fermentables del mosto y la temperatura del proceso. Se han llevado a cabo innovaciones como el uso de procesos de fermentación continuos, la obtención de cerveza con concentraciones de mosto elevadas, el empleo de cereales no malteados y enzimas microbianos y la producción de cervezas bajas en carbohidratos, obteniéndose diversos niveles de éxito. También se ha aplicado las técnicas genéticas convencionales para mejorar las propiedades deseables de las levaduras y eliminar sus características indeseables (6).

1.3. Tipos De Cervezas

La mayor parte de las cervezas producidas hasta la segunda mitad de siglo XIX eran fermentadas por levaduras que ascendían a la superficie al final del proceso y podían “desnatarse”. Es muy probable que muchos cerveceros de las primeras épocas de la historia de la elaboración de la cerveza no se percatasen del valor de la nata recogida y la descartaran. El lúpulo se introdujo en Gran Bretaña desde Flandes en el siglo XVI, por inmigrantes de este origen. Entre los fabricantes de la cerveza tradicional, sin lúpulo, y los elaboradores de la nueva cerveza se estableció una dura competencia que generó algunos conflictos. Hoy, el término cerveza es una expresión genérica que abarca tanto lo que en Gran Bretaña se denomina “Ale”, una bebida a la que se añade lúpulo, fabricada con levaduras de fermentación alta, cómo a aquellas otras bebidas de malta a las que se añada lúpulo y son fermentadas con levaduras bajas. Las levaduras bajas son aquellas que al final de la fermentación se hunden y van al fondo, las cuales rinden un producto de calidad superior al generado por la mayor parte de la levaduras altas. No es, por tanto, sorprendente que a partir del momento en que los bávaros las difundieron en otras regiones, estas levaduras bajas hayan ido reemplazando progresivamente a las levaduras altas en la mayor parte del mundo. Las levaduras de fermentación alta se utilizan para producir las cervezas llamadas “lagers”, palabra alemana que significa guarda o permanencia en bodega (7).

Los progresos experimentados por el análisis químico a finales del siglo XIX y principios del siglo XX permitieron un conocimiento detallado de la composición iónica de las aguas naturales (tabla1).

Tabla 1. Composición iónica del agua en los centros productores de cerveza (mg L⁻¹) (8).

	Na ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	HCO ₃ ⁻
Burton-on-Trent	54	24	352	16	820	320
Pilsen	32	8	7	5	6	37
Munich	10	19	80	1	6	333
London	24	4	90	18	58	123
Dublin	12	4	119	19	54	319
Dortmund	69	23	260	106	283	549

Simultáneamente se desarrollaron procedimientos para ablandar el agua y se idearon mezclas de sales que podían añadirse al agua ablandada para obtener otra con características idénticas a las de Burton-on-Trent o la de cualquier otro lugar del mundo. Los avances en el conocimiento de la bioquímica del malteado y de la producción del mosto, hace evidente la enorme importancia de dos iones en el control del pH. Se trata del calcio y el carbonato (o bicarbonato). Los iones de calcio juegan muchos otros papeles en la elaboración de cerveza. Los fabricantes de cerveza ajustan, por ello, la composición química del agua utilizada en la elaboración de esta bebida, lo que ayuda a controlar el pH, a disponer de suficientes iones de calcio y a ajustar la concentración de otros iones importantes para el aroma de la cerveza (8).

En la limpieza y en la producción de vapor se gastan grandes volúmenes de agua; la composición óptima de esta agua es muy distinta a la que se utiliza como agua de composición de la cerveza. A primera vista, podría sugerirse que debiera ser agua completamente exenta de sales. En la práctica, el agua desprovista de sales tiende a corroer las tuberías de metal solubilizando cantidades no deseadas de metal. Es, por tanto, preferible usar agua ligeramente dura, que forme una película pasiva en la cara interior de las tuberías. Un agua de este tipo puede desionizarse fácilmente con bajo costo para la alimentación de las calderas, utilizarse en la limpieza sin modificación alguna y ser tratada con sales apropiadas para su empleo como agua de composición de la cerveza (8).

1.4.2. Levadura

Las levaduras se cuentan entre los hongos (*fungi*), en concreto pertenecen a la clase de los hongos con micelio tabicado (*Ascomycetes*), el tipo más abundante de la clasificación de los hongos. En contraste con las bacterias procariotas, las eucariotas (del griego *Karyon*, núcleo) tienen una estructura celular compleja (compartimientos como mitocondrias) y un auténtico núcleo celular (9).

Las levaduras son hongos unicelulares que se encuentran generalmente en forma de células únicas y que se reproducen mediante gemación. Algunas levaduras están formadas únicamente por células individuales y a veces cadenas cortas, mientras que otras se encuentran con un cierto rango de formas celulares, incluyendo diversos tipos de filamentos. Una característica de la población en crecimiento de las células de levaduras es la presencia de yemas, producidas cuando la célula se divide. Las levaduras constan solamente de una única célula, Esta célula madre forma en la esporulación varias protuberancias, brotes hijos, que se separan, son a su vez visibles y pueden formar nuevas células.

La célula hija comienza siendo una pequeña yema, que va creciendo hasta que alcanza un tamaño similar al de la madre y entonces se separa. En las levaduras, la envoltura celular incluye la membrana citoplásmica, constituida por lípidos, proteínas y mananos, el espacio periplásmico y la pared celular, que contiene algunas proteínas y gran cantidad de glucano y manano (10).

Se denominan también hongos productores de esporas, porque se multiplican sobre todo asexualmente (vegetativos) mediante esporulación. Sin embargo, también se pueden reproducir sexualmente por copulación de dos células esporas haploides. Éstos tienen una composición cromosómica completa simple. Las levaduras se clasifican según el tipo de reproducción de los diferentes tipos de hongos (11).

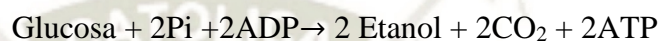
Crecen de modo heterótrofo (a partir de nutrientes, sin fotosíntesis) preferentemente a valores de pH ácidos.

La cerveza se origina mediante fermentación alcohólica a partir de hidratos de carbono de las semillas de los cereales. Sin embargo, éstos se encuentran en gran parte como

polisacáridos y están disponibles para las enzimas de la glucólisis de las células de la levadura, si son degradados a disacáridos y monosacáridos por las amilasas (11).

1.4.2.1. Biología de fermentaciones con levaduras

Aproximadamente el 96% de la fermentación del etanol se lleva a cabo mediante cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o especies relacionadas, particularmente *S. uvarum*. El etanol se produce en la ruta de Embden – Meyerhof – Parnas (EMP), en la que el piruvato producido durante la glucosilación se convierte en acetaldehído y etanol. La reacción global es la siguiente:



La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico exotérmico, es decir que libera energía y moléculas de ATP necesarias para las levaduras en cuanto a su función metabólica. Debido a las condiciones de ausencia de oxígeno durante el proceso, la respiración celular de la cadena del ADP en ATP queda completamente bloqueada, siendo la única fuente de energía para las levaduras la glicólisis de la glucosa con la formación de moléculas de ATP mediante la fosforilación a nivel de sustrato. El balance a nivel molecular del proceso se puede decir que genera 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa.

El rendimiento teórico de 1g de glucosa es de 0,51g de etanol y 0,49g de CO₂. Sin embargo, en la práctica, aproximadamente el 10% de la glucosa se transforma en biomasa y el rendimiento en etanol y CO₂ alcanzan el 90% del valor teórico. El ATP formado se utiliza para las necesidades energéticas de la célula.

La envoltura de la célula de levadura incluye una membrana plasmática, un espacio periplásmico y una pared celular constituida principalmente por polisacáridos y una pequeña cantidad de péptidos. La pared tiene una estructura semirrígida permeable al soluto que proporciona a las levaduras una considerable fuerza comprensional y tensil. Los grupos carboxilo de los péptidos de la pared celular confieren a las levaduras utilizadas en la elaboración de cerveza una capacidad de floculación importante, lo que facilita la separación sólido-líquido después de la fermentación. Se cree que la floculación se debe a la formación de puentes salinos entre los iones calcio y estos grupos carboxilo de la pared celular.

1.4.2.2. Condiciones de la fermentación

En la fermentación las levaduras utilizadas para la elaboración de cerveza (*S.cerevisiae*) utilizan los azúcares fructosa, sacarosa, maltosa y maltotriosa en este orden. La sacarosa es hidrolizada primeramente por la invertasa localizada en el espacio periplásmico extracelular. Los azúcares son transportados a través de la membrana celular por transporte activo o pasivo, mediado por permeasas producidas constitutivamente o inductibles. La maltosa y la maltotriosa son hidrolizadas intracelularmente por la α -glucosidasa. El *Saccharomyces uvarum* (*S. carlsbergensis*) se distingue taxonómicamente del *S. cerevisiae* en que también utiliza melibiosa. El *Kluyveromyces fragilis* y *Kluyveromyces lactis*, que a diferencia de *S. cerevisiae* pueden fermentar la lactosa, tienen un sistema lactosa-permeasa para transportar la lactosa dentro de la célula, donde se hidroliza a glucosa y galactosa, que entran en la glicolisis. Excepto los *Saccharomyces diastaticus*, que no son adecuadas para la elaboración de cerveza, todas las levaduras *Saccharomyces* son incapaces de hidrolizar el almidón y las dextrinas, por consiguiente, el uso de materiales basados en almidón para la fermentación alcohólica requieren la acción de enzimas exógenas como las α y β -amilasas de la malta o enzimas microbianos como α -amilasa, amiloglucosidasa (glucoamilasa) y pululanasa. Los azúcares mayoritarios del mosto son la glucosa, fructosa; puesto que el *S.cerevisiae* metaboliza preferencialmente la glucosa; el azúcar no fermentado que permanece en el mosto resultante es la fructosa.

Muchas cepas de *S. cerevisiae* pueden producir concentraciones de etanol de hasta el 12-14%. Existe un cierto interés en el empleo de levaduras tolerantes de cantidades elevadas de alcohol en los procesos de fabricación de cerveza con gravedad elevada y en la producción de alcohol para la destilación con vistas a incrementar la productividad de la planta y disminuir los costos de destilación. Existen cepas seleccionadas capaces de producir hasta un 18-20% de alcohol. Aunque la velocidad de fermentación se ve fuertemente reducida cuando la concentración de etanol aumenta. Los mostos con un contenido muy elevado de azúcares fermentan únicamente con levaduras osmofílicas como *Saccharomyces rouxii* y *S.bailli*, que poseen una gran capacidad para fermentar la fructosa (12).

1.4.2.3. Identificación de levaduras

Las levaduras tienen una amplia aplicación en la biotecnología tradicional y moderna. Desde la antigüedad se han reconocido como protagonistas en la producción de alimentos y bebidas por fermentación; actualmente son utilizadas como fuentes de obtención de vitaminas del complejo B, pigmentos, cofactores, proteínas de organismos unicelulares, biomasa y otros productos con valor añadido. Aunque son variadas las aplicaciones en el campo de la biotecnología que se le atribuyen a las levaduras, aún quedan muchos hábitats naturales por explorar en busca de nuevas especies, de forma tal que puedan diseñarse tecnologías novedosas protagonizadas por estos microorganismos. 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. 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. Las áreas de comparación taxonómica en las cuales se enmarca la taxonomía de levaduras incluyen la Morfología, Fisiológica, Genética, Bioquímica, Ecología y Biología Molecular. Estas técnicas se basan en el estudio del genoma nuclear, ribosómico y mitocondrial (13).

1.4.2.4. Métodos clásicos de identificación

Tradicionalmente, las levaduras han sido clasificadas e identificadas según sus características morfológicas y sus propiedades, fisiológicas y bioquímicas. Entre los criterios morfológicos, se contaba con su reproducción vegetativa, sexual, esporulación, morfología celular, aspecto de colonia, etc. Entre los criterios fisiológicos y bioquímicos están la fermentación, asimilación de azúcares, poder fermentativo, asimilación de nitratos, etc.

- **Métodos moleculares: Identificación a nivel de especie**

Estas técnicas se basan en la caracterización e identificación de especies utilizando marcadores moleculares, normalmente de ADN, de cada especie o cepa.

.Secuenciación de genes ribosomales: Los genes ribosomales presentan una secuencia bastante conservada a nivel de género y especie en los organismos eucariotas, por lo

que se trata de análisis genéticos muy útiles para establecer relaciones filogenéticas. La técnica consiste en amplificar estas regiones conservadas por PCR (Polymerase Chain Reaction) y posteriormente secuenciar los fragmentos amplificados. Esta técnica también permite diferenciar especies.

. PCR: Las dos cadenas de ADN se separan seguidamente se amplifica una región del genoma; posteriormente estos fragmentos amplificados se someten a una electroforesis en gel de poliacrilamida. Los fragmentos se separan según su tamaño. Esta técnica se emplea en la caracterización e identificación de levaduras y bacterias vínicas, también en estudios de biodiversidad (14).

- **Métodos moleculares: Identificación a nivel de cepa**

A veces no es suficiente con la identificación de especies por lo que es necesario entonces ir más allá. Para poder diferenciar a nivel de cepas, existen otras técnicas de biología molecular:

PCR a tiempo real: La reacción en cadena de la polimerasa, se puede producir múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora.

La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de nuestro genoma de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia, de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del “quencher” y emite durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando.

En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando (14).

PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR)

Reacción de PCR cuya principal característica es que permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presentes en la muestra original, o para identificar con una muy alta probabilidad, muestras de ADN específicas a partir de su temperatura de fusión (también denominado valor T_m , del inglés melting temperature). Se puede dividir en las técnicas basadas en fluorocromos no específicos y en las técnicas basadas en sondas específicas. En las técnicas basadas en fluorocromos el ADN, que se ve multiplicada su cantidad con cada ciclo, se une al fluorocromo (generalmente SYBR Green) produciendo fluorescencia que es medida por el termociclador apto para PCR en tiempo real. Permite cuantificar sólo una secuencia por reacción pero tiene la ventaja de utilizar cebadores normales para su realización. Es mucho más económica que la que usa sondas específicas. Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan una sonda unida a dos fluorocromos que hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo (forward) y el inverso (reverse); cuando la sonda está intacta, presenta una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Dicha FRET no se produce cuando la sonda está dañada y los dos fluorocromos están distantes, producto de la actividad 5'-3' exonucleasa de la ADN polimerasa. Esto permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen (15).

La mayoría de estos inconvenientes se han solucionado con la introducción de la PCR realizada en tiempo real (Q-PCR), que elimina cualquier proceso post-PCR puesto que monitoriza la progresión de la amplificación en el momento en que ocurre. A diferencia de la PCR convencional (en punto final), que mide la acumulación del ADN al final de un número predeterminado de ciclos, con Q-PCR esto se hace durante el proceso de amplificación usando fluorescencia, de forma que su aumento es proporcional a la cantidad de ADN formada. El proceso se puede automatizar fácilmente usando un sistema que realice la amplificación (termociclador) y que a su vez sea capaz de leer fluorescencia. Existe una amplia oferta de aparatos en el mercado. La mayoría pueden trabajar con las diversas opciones de marcado fluorescente y son

"abiertos", es decir, permiten programar las condiciones de amplificación y lectura de forma que su uso no queda limitado a unos reactivos determinados (15).

- **Método de secuenciación Sanger**

Primero se calienta la mezcla para desnaturalizar el molde de ADN (separar las cadenas) y luego se enfría para que el cebador pueda unirse al molde de cadena sencilla. Una vez que se ha unido el cebador, se eleva la temperatura para que la ADN polimerasa pueda sintetizar ADN nuevo a partir del cebador. La ADN polimerasa añadirá nucleótidos a la cadena hasta que aleatoriamente agregue un nucleótido didesoxi en lugar de uno normal. A partir de ese momento, no es posible agregar más nucleótidos y la cadena termina con el nucleótido didesoxi (16).

Este proceso repite cierto número de ciclos. Cuando los ciclos terminan, está prácticamente garantizado que se ha incorporado un nucleótido didesoxi en cada una de las posiciones del ADN blanco en al menos una reacción. Es decir, el tubo contendrá fragmentos de diferentes longitudes que terminan respectivamente en cada una de las posiciones de los nucleótidos del ADN original (Fig.2). Los extremos de los fragmentos tendrán el pigmento que indica su nucleótido final (16).

Cuando la reacción termina, los fragmentos se hacen pasar a través de un tubo largo y delgado que contiene una matriz de gel en un proceso llamado **electroforesis capilar en gel**. Los fragmentos cortos se mueven rápidamente a través de los poros del gel, mientras que los fragmentos largos se mueven más lentamente. Cuando cada fragmento cruza la "línea de meta" al final del tubo, un láser lo ilumina y permite la detección del pigmento asociado. El fragmento más pequeño (que termina justo un nucleótido después del cebador) es el primero que cruza la línea de meta, seguido por el próximo fragmento más pequeño (que termina justo dos nucleótidos después del cebador) y así sucesivamente. De esta manera, se puede reconstruir nucleótido por nucleótido la secuencia del fragmento de ADN original a partir de los colores de los pigmentos registrados uno tras otro por el detector. Los datos registrados por el detector consisten en una serie de picos en la intensidad de la fluorescencia, como se muestra en el **cromatograma**. La secuencia del ADN se lee a partir de los picos en el cromatograma (16).

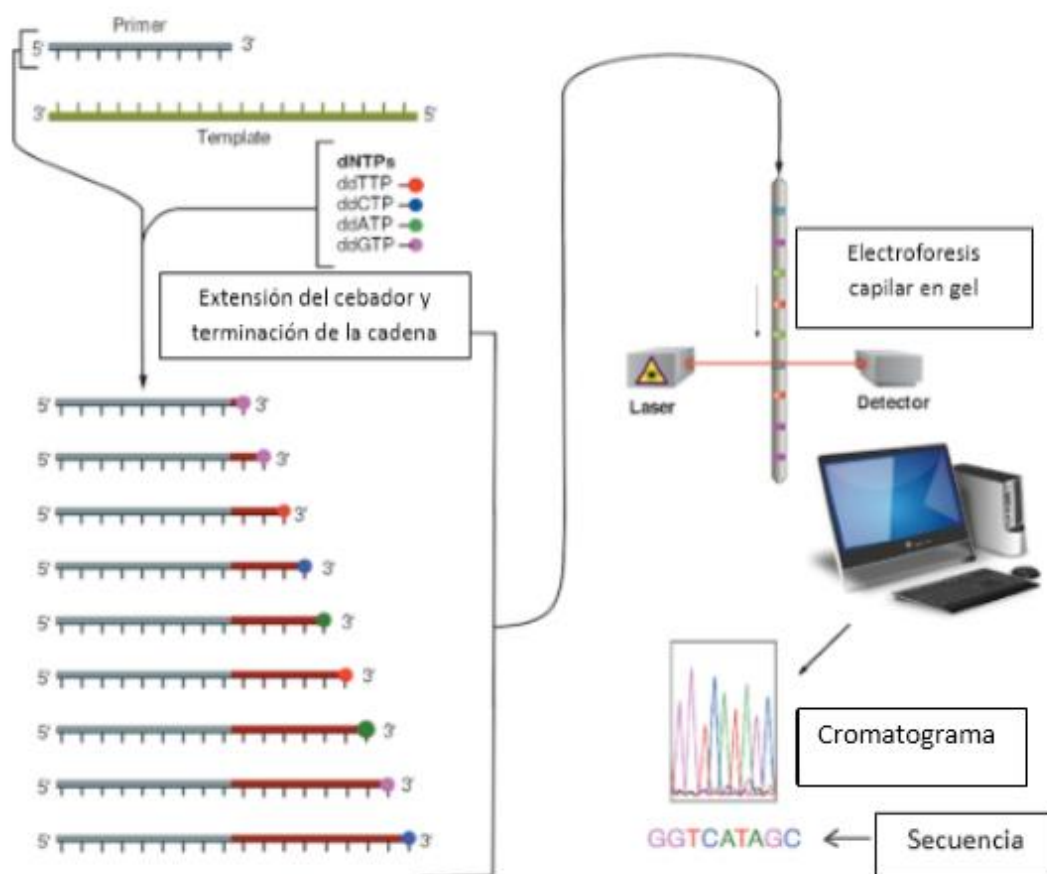


Figura 2. Procedimiento del método Sanger modificado (16).

1.4.3. Lúpulo

1.4.3.1. Historia del lúpulo

El lúpulo ya se conocía en la antigüedad como aditivo de la cerveza, pero luego evidentemente cayó en el olvido hasta la Edad Media en que volvió a utilizarse en la producción de esta bebida. El lúpulo cumple en la cerveza diversos cometidos:

- Precipita proteínas, por lo que actúa como clarificante.
- Favorece la formación de espuma.
- Confiere a la cerveza su agradable sabor amargo.
- Favorece la conservación de la cerveza.

El lúpulo crece en Alemania únicamente en zonas con buen clima, siendo una de las más conocidas el territorio de Saaz. Hallertau, cerca de Ingolstadt, y la región de Tett nang son conocidas comarcas germanas productoras de lúpulo (19).

1.4.3.2. Cultivo del lúpulo

El lúpulo pertenece a la familia de las cannabináceas, pero, a pesar de su parentesco con el Cannabis, el lúpulo comercial, *Humulus lupulus*, no contiene sustancias alucinógenas. Las flores femeninas se desarrollan en plantas distintas de las que producen las flores masculinas y, en la mayor parte de las plantaciones comerciales, se eliminan las plantas que producen flores masculinas (20). Para la fabricación de cerveza sólo tienen valor las plantas femeninas, ya que las flores deben utilizarse únicamente en estado no fecundado. Las plantas de lúpulo proporcionan rendimiento sólo a partir del tercer año de cultivo, o como mucho en el segundo año, pese a lo cual un cultivo de lúpulo puede ser productivo hasta veinte años. Para lograr un rendimiento seguro, es importante separar las plantas mediante un intenso clareado. Las porciones vegetales separadas pueden aprovecharse como verduras (19). El lúpulo se cultiva sólo en climas templados y resiste el invierno como un rizoma (cepa); está provisto de raíces largas, que penetran profundamente en un suelo que, para explotaciones industriales, tiene que ser profundo y rico. En la primavera, comienza a echar brotes a partir de la corona de la raíz; los tallos son trepadores y se adhieren a cualquier tipo de guía; tiene pelos en forma de ganchos dirigidos hacia atrás a partir de los pedúnculos y peciolos y se enrollan en el sentido de las agujas del reloj (20).

1.4.3.3. Química del Lúpulo

En la tabla 2 se recoge la composición de los lúpulos comerciales; de los datos que se tiene, los realmente importantes para el fabricante de cerveza son los relativos a resinas y aceites esenciales. Sin embargo, y aunque en pequeñas cantidades, durante la elaboración de cerveza se extraen proteínas, aminoácidos y azúcares. Las resinas del lúpulo fresco son solubles en éter de petróleo (hexano). Estas resinas, llamadas blandas, están fundamentalmente constituidas por α y β ácidos. A medida que el lúpulo envejece y se oxida, aumenta la proporción de resinas insolubles en éter de petróleo, denominadas resinas duras, a causa fundamentalmente de las transformaciones sufridas por los ácidos α y β .

Tabla 2. Composición de lúpulos comerciales (21).

	Porcentaje (%)
Agua	10
Resinas totales	15
Aceites esenciales	0.5
Taninos	4
Monosacáridos	2
Pectina	2
Aminoácidos	0.1
Proteína (N x 6.25)	15
Lípidos y ceras	3
Cenizas	8
Celulosa, lignina, etc.	40.4
Total	100

Los ácidos α , o humulonas, representan una familia de compuestos como se observa en la figura 3. Se diferencian en la cadena lateral unida al carbono 2 del anillo hexacarbonado. Constituyen el principal componente amargo de la cerveza. Durante la cocción del lúpulo, o sus productos, en el mosto, los α ácidos se reorganizan o se isomerizan. Los compuestos generados, iso α ácidos o isohumulonas, 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 (Fig. 3). Durante el envejecimiento, a lo largo de su almacenaje, sus α y β ácidos generan productos de oxidación, algunos de los cuáles son amargos y otros no. Los cambios que tienden a producirse son (i) oxidación de las cadenas laterales, (ii) pérdida de las mismas y (iii) transformación de los anillos hexagonales en pentagonales.

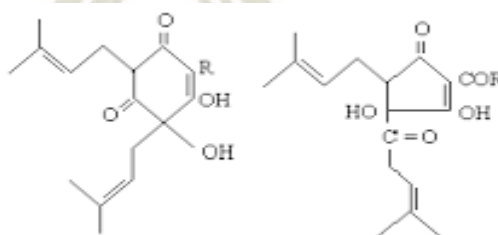


Figura 3. Estructura de los ácidos α e iso α (izquierda y derecha respectivamente) (17).

Los aceites esenciales de los conos de lúpulo son una mezcla compleja de varios cientos de componentes. Los solubles en hexano son hidrocarburos terpenoides (Fig.4). El resto, soluble en éter etílico, son compuestos que contienen oxígeno, como ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos y alcoholes. Algunos son extremadamente potentes, como el tiohexanoato de metilo, que tiene un umbral de percepción de 0,3 ppb. Los aceites esenciales influyen tanto en el sabor como en el aroma de la cerveza, aunque la mayor parte del aceite añadido a la cerveza durante la cocción se pierde por destilación, lo que es una suerte, porque una tasa elevada de aceites esenciales haría imbebible de la cerveza. Si el aceite mejora o empeora la calidad global de la cerveza, depende de la proporción entre sus numerosos componentes. Los aceites esenciales se oxidan y se hacen menos atractivos durante su almacenamiento; además aceleras la oxidación de las resinas (21).

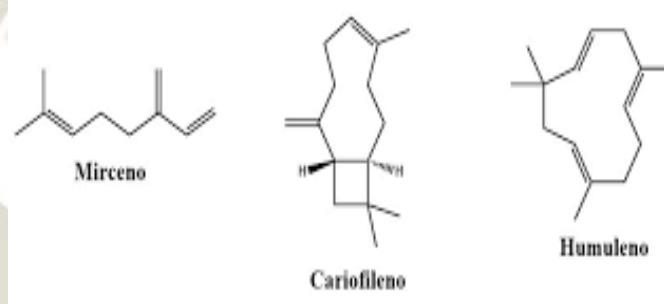


Figura 4. Estructura de los aceites esenciales típicos del lúpulo (18).

1.4.4. Malta

1.4.4.1. Selección de la malta para la elaboración de cerveza

La materia prima fundamental para la fermentación de la cerveza es la malta; proporciona sustratos y enzimas apropiados para obtener un extracto soluble o mosto. La malta debe proporcionar este extracto fácilmente y de forma barata; también debe proporcionar cascarilla, que forma un eficaz lecho filtrante para la clarificación del mosto. La composición del extracto, o mosto, es un factor fundamental para el éxito de la fermentación por la levadura y juega un importante papel en el desarrollo del aroma, el color y en la estabilidad del producto final, la cerveza. Para obtener materias primas tan uniformes como sea posible y a un costo razonable, los cerveceros establecen especificaciones muy ajustadas. Estas especificaciones dependen de los métodos analíticos, por lo que el análisis de la malta cumple dos funciones: (i) estimar

el valor que para el cervecero tiene la malta, (ii) constituir la base de las transacciones comerciales (22).

1.4.4.2. Importancia de la Malta

Debe tenerse siempre muy presente que la malta es uno de los ingredientes de partida más importantes en la fabricación de cerveza. Pero, existe mucha confusión sobre lo que es en realidad la malta.

La malta se obtiene principalmente de la cebada, aunque también se maltea el trigo. Las cervezas de trigo, blanca o berlinesa se elaboran con malta de trigo, En teoría, también pueden maltearse todos los demás cereales. Pero las pruebas realizadas indican que, por diversas razones, las demás clases de cereales no dan maltas adecuadas. Por ello, la malta de cebada es el principal ingrediente de partida.

La cebada sin tratar, es decir, en estado natural, no serviría para la fabricación de bebidas alcohólicas, ya que la levadura sólo puede generar alcohol a partir del azúcar, y la cebada contiene una mínima cantidad de azúcar, en cambio tiene elevada proporción de almidón. El almidón, químicamente considerado, no es otra cosa que una sustancia formada por muchas partículas de azúcar, o, dicho con más exactitud, por moléculas unidas en cadena de glucosa, que es una clase de azúcar. Una molécula de almidón puede contener hasta 2.000 moléculas de glucosa.

El almidón contenido en el grano de cebada es la reserva alimenticia para el embrión de la futura planta. Pero tampoco se puede utilizar el almidón directamente, debe degradarse primero en la semilla con la ayuda de enzimas. Éstos son sustancias semejantes a las proteínas que aceleran reacciones químicas, pero sin formar parte de los productos originados en estas reacciones. Estas enzimas se producen en la germinación y su objetivo es transformar el almidón en azúcar y proporcionar ésta al embrión como sustancia nutritiva.

Este proceso de formación de enzimas se completa en el malteado, al germinar el cereal. Cuando se ha producido ya suficiente cantidad de enzima, el proceso de desarrollo del embrión de la cebada se interrumpe mediante calentamiento y desecación, con lo que la malta se tuesta más o menos, según el método empleado. Esta desecación debe realizarse con mucho cuidado, para conservar las enzimas. Como

veremos, las enzimas generadas en el malteado deben originar más tarde, en la maceración o mezcla con agua, la transformación del almidón en azúcar. Como enzimas que degradan el almidón están:

- Las amilasas, así llamadas porque actúan sobre la amilosa (= almidón); desempeñan su importante función en cantidades muy pequeñas. Pero en el malteado se producen además otras enzimas:
- Proteasas, que degradan a las proteínas (= sustancias proteicas).
- Citasas (de citos = célula), encargados de disolver las paredes celulares. También estas enzimas deben volverse a activar en la maceración (23).

1.5. Elaboración de la cerveza

1.5.1. Materias primas y preparación de la malta

Los cereales malteados se han utilizado tradicionalmente en la elaboración de cerveza porque el proceso de malteado da lugar a la producción de los enzimas necesarios para la extracción y conversión del almidón en azúcares fermentables. En el proceso de malteado, los granos se sumergen en agua a temperaturas de 10 a 25 °C durante 48-60 horas, tiempo durante el cual el contenido de humedad crece desde el 10-12 % al 44-50 %. Una vez remojado el grano, la germinación se lleva a cabo a temperaturas comprendidas entre 15 y 21 °C, dependiendo del tipo de malta, en tambores o en compartimientos con suelo perforado, controlado la humedad y el flujo de aire, con lo que se producen diversos enzimas hidrolíticas, entre ellos α -amilasa, bioglucanasas y peptidasas que conducen a la degradación enzimática de hemicelulosa, β -glucano, péptidos y algo de almidón. La β -amilasa, ligada a otras proteínas en la cebada no germinada, se libera durante este proceso. Una vez logrado el grado de modificación deseado, la malta se seca hasta que su contenido de humedad sea de aproximadamente el 6 % inicialmente a una temperatura de 65 °C, y después a 80-85 °C para reducir aún más su humedad, hasta el 4,5 %, con lo que se detienen los procesos respiratorios de la germinación, se inhibe el crecimiento microbiano y se fomenta la reacción de Maillard, que contribuye a dar el aroma y color oscuro a la malta. La malta de buena calidad tiene suficiente actividad enzimática como para facilitar la extracción y conversión de mezclas de maceración que contienen hasta el 60-70 % de cereales además de la propia malta. Las enzimas microbianas industriales pueden sustituir a la

malta como fuente enzimática para la producción de mosto de cerveza, y por consiguiente, las bebidas alcohólicas basadas en cereales pueden obtenerse ahora a partir de una gran variedad de cereales, como cebada, trigo, arroz y maíz, o combinaciones de cereales, con o sin la inclusión de cereal malteado (24).

1.5.2. Maceración y filtración

Durante la maceración, los componentes se extraen con agua, con lo que se solubilizan, hidrolizan enzimáticamente y extraen del cereal los carbohidratos y otros nutrientes necesarios para la fermentación bajo condiciones de calentamiento controlado. En esta operación, la relación agua: grano es usualmente de 2,5-3,0 a 1,0. La temperatura empleada varía de una cervecería o destilería a otra y depende de consideraciones tales como la naturaleza del cereal utilizado, las propiedades de las enzimas dependientes de la temperatura, las características del producto deseado, la naturaleza y capacidad del equipo. La mayoría de los sistemas de infusión o decocción o como una combinación de ambos. En la maceración por infusión, empleando malta bien elaborada, el grano se introduce en un cámara de maceración, cuyo fondo está constituido por una placa filtrante, parcialmente llena de agua caliente, a una temperatura que se mantiene constante a unos 65 °C para permitir la conversión enzimática y la extracción del mosto. A continuación el mosto se separa por filtración y la masa que sale se deshace para lavar los azúcares residuales hasta que el peso específico del líquido que sale es de 1,005 (24).

La temperatura óptima de las proteasas, α -amilasa, β -amilasa y β -gluconasa de la malta dicta las condiciones de la maceración. En el proceso por infusión la temperatura de la masa favorece la actividad de la amilasa y la β -gluconasa, siendo más satisfactoria con las maltas bien modificadas en las que durante el malteado ya se ha producido una degradación proteica considerable. La masa sometida a decocción tiene usualmente temperaturas iniciales de 50-55 °C para una actividad proteolítica óptima, a 63-65 °C para la degradación óptima del almidón y los β -glucanos y a 73 °C para la separación óptima del mosto. La temperatura se eleva hasta el 67 °C, lo que favorece la amilolisis y después se calienta hasta 73 °C con objeto de reducir la viscosidad antes de la filtración. Cuando una masa se convierte predominantemente utilizando enzimas microbianas, las temperaturas utilizadas reflejarán la actividad y estabilidad térmica de estas enzimas (24).

1.5.3. Separación del mosto

Una vez clarificado el mosto, se hierve durante 60-90 minutos con objeto de favorecer (a) la inactivación de las enzimas, (b) la esterilización del mosto, (c) la precipitación de las proteínas y los taninos, (d) la extracción de sustancias amargas derivadas del lúpulo, (e) la producción de color, aromas y sabores por la caramelización del azúcar, la formación de melanoidina y la oxidación de los taninos la destilación de los volátiles. Seguidamente se separa el precipitado proteico formado durante la ebullición así como el lúpulo agotado y el resto de los sólidos, a veces con ayuda de un agente de floculación, en un separador de torbellino o mediante la combinación de un tanque de sedimentación y un filtro o una centrífuga. Una vez separados los sólidos o residuos, el mosto se enfría mediante un cambiador de calor de placas hasta la temperatura inicial de fermentación y se airea hasta que la concentración de oxígeno disuelto sea de 5-15 mg/L para favorecer la síntesis de ácidos grasos insaturados y esteroides por las levaduras (24).

1.5.4. Fermentación de la cerveza

El mosto se inocula con levaduras hasta un recuento de aproximadamente 10^7 células por mL o mayor si se necesita velocidad de fermentación más elevada. Tradicionalmente, en la producción de cerveza inglesa (ale) entre 15 y 22 °C se utilizaban levaduras de fermentación alta, que ascendían a la superficie hacia el final de la fermentación, y podían por tanto ser separadas en forma de espuma, mientras que en la producción de cerveza (lager) entre 8 y 15 °C se utilizaban levaduras que sedimentan en el fondo del recipiente hacia el final de la fermentación (levaduras de fermentación baja). Sin embargo, en particular con la introducción de los grandes depósitos fermentadores cilindro cónicos y el uso de centrífugas, la distinción entre fermentaciones “altas” y “bajas” tienden a desaparecer (24).

En las fermentaciones típicas para obtener cerveza “lager”, el recuento inicial de levaduras es de 10^7 células/mL, la concentración inicial de carbohidratos es de 12 °P (peso específico 1.050) y la temperatura inicial aproximadamente 10 °C. Al cabo de unos 3 días la población de levaduras se ha incrementado 4 ó 5 veces. La temperatura tiende a aumentar a medida que avanza la fermentación y cuando se alcanza el máximo puede ser necesario enfriar. La concentración de carbohidrato desciende a 2-2,5 °P

(peso específico 1.080-1.010) después de 5 días. Si la temperatura se mantiene entre 6 y 10 °C, la fermentación dura unos 10 días (24).

Durante el proceso de fermentación, 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, contribuyen a esta caída del pH (24).

Los azúcares fermentables que normalmente constituyen el 70-80 % de los carbohidratos del mosto se convierten en etanol durante la fermentación. El 20-30 % de los carbohidratos residuales consiste principalmente en dextrinas superiores o dextrinas límite no susceptibles de ser atacadas por las amilasas de la malta debido a la presencia de enlaces glicosídicos α -1-6. En la producción de cerveza baja en carbohidratos, estas dextrinas límite pueden ser hidrolizadas a azúcares fermentables por la amiloglucosidasa microbiana. En principio, esta enzima debe hacerse actuar sobre el mosto antes de su ebullición, ya que ésta lo inactiva. La amiloglucosidasa es también efectiva en la hidrólisis de las dextrinas límite durante la etapa de fermentación, y no se inactiva con la pasteurización posterior por lo que puede permanecer activa en el producto final (24).

1.5.5. Maduración y acondicionamiento final de la cerveza

La cerveza recién fermentada debe someterse a diversos tratamientos antes de ser envasada finalmente para su distribución. 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 dióxido de carbono así como las pequeñas cantidades de maltotriosa residual, y la concentración de algunos ésteres aumenta. El dióxido de carbono, producido en la fermentación secundaria, o el dióxido de carbono añadido, ayuda a purgar la cerveza de oxígeno, H₂S y compuestos volátiles no deseados. A veces se añaden aditivos para clarificar el mosto y ajustar el aroma, sabor y color de la bebida, y para favorecer la estabilidad de la espuma. Los tiempos y la temperatura utilizados varían de una cervecería a otra, aunque usualmente se utilizan a temperaturas bajas, de 2 a 6 °C, con un período de almacenamiento que oscila entre 4 días y 4 semanas. Después del acondicionamiento, la cerveza contiene células microbianas, precipitados proteicos y sustancias coloidales, que hay que separar

mediante diversos procesos como la floculación, centrifugación y filtración. La estabilidad microbiológica se consigue por filtración estéril y/o pasteurización (24).

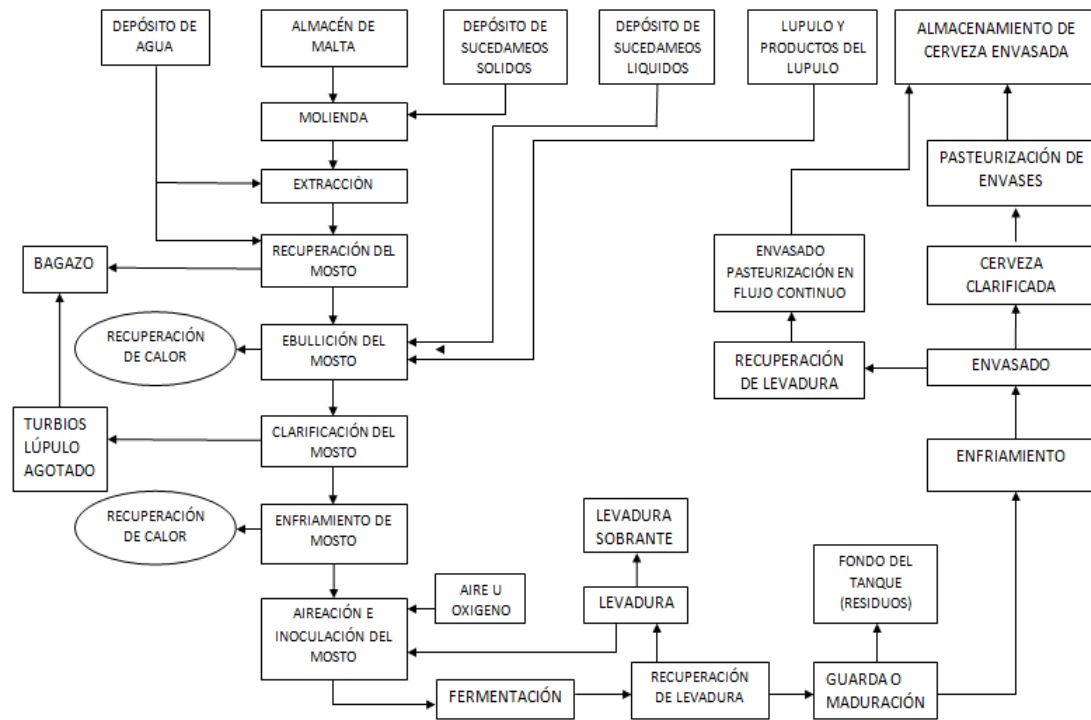


Figura 5: Diagrama de flujo de la elaboración de cerveza (26).

1.6. Ley de pureza 1516

Hablamos del Reinheitsgebot (reinheits-pureza, gebot- ley) ordenado por Guillermo IV que determinaba los ingredientes permitidos en la elaboración de cualquier cerveza. El 23 de abril de 1516, durante una reunión con la nobleza bávara celebrada en la ciudad de Ingolstadt, el duque Guillermo IV de Baviera, junto a su hermano Luis X, promulgó una orden que regulaba tanto el precio de la cerveza, como los tiempos de elaboración y los componentes empleados en su fabricación.

Desde ese momento cualquier cerveza elaborada en tierras bávaras sólo podría ser producida con tres ingredientes básicos: agua, lúpulo y cebada, prohibiendo el uso de cualquier otro componente tales como edulcorantes u otras maltas distintas a la de cebada. “Además, queremos enfatizar que de ahora en adelante en todas las ciudades y pueblos de este país, los únicos ingredientes utilizados para la elaboración de cerveza deberán ser la cebada, el lúpulo y el agua. Quien conscientemente violara o no

respetara esta ordenanza será castigado por las autoridades judiciales, confiscando cada uno de esos barriles de cerveza sin excepción”.

No se trataba de la primera regulación de este tipo, aunque quizás sí la más importante hasta la fecha, ya que con algunos pequeños cambios y ajustes se ha mantenido vigente prácticamente hasta ahora cuando las normas de la Unión Europea han introducido pequeñas modificaciones que sólo afectan a las cervezas exportadas al resto de países, pero no a las destinadas para un consumo interior (25). Estas leyes se fueron gradualmente introduciendo en toda Alemania, de tal modo que en 1918 obligaban a todos los fabricantes de cerveza que pretendieran exportarla. En otros numerosos países europeos, como Noruega, Grecia y Suiza, se dictaron leyes similares. En el resto del mundo es habitual que entre las materias primas para la elaboración de la cerveza se incluyan fuentes baratas de almidón o azúcares, como cereales no malteados y jarabes de almidón de papa, de azúcar de caña o remolacha, o de cereales. También se utilizan en la elaboración de cerveza pequeñas cantidades de productos orgánicos e inorgánicos que actúan como conservadores o que se usan para eliminar la turbidez. En épocas recientes, son numerosos los países que ha introducido controles estrictos de estos aditivos y se exige mencionar su empleo, en las etiquetas. Hace muchos años que se controla la tasa de ácido arsénico y plomo. Recientemente se han introducido también límites al contenido en nitrosaminas, tanto en la cebada malteada como en las cervezas (26).

1.7. Estilo de cervezas

Se denomina estilos a los resultados de ingredientes locales los cuales en su mayoría están ligados o vinculados con las tradiciones de determinada región o país. Estos resultados normalmente son variaciones básicas en las técnicas de elaboración de cerveza o en los ingredientes que conlleva esta elaboración.

Las diferencias entre estilos deben ser cuantificables en las características generales y sabor de la cerveza por medio de un análisis sensorial.

1.7.1. Estilo Amber Ale

American Amber Ale

No es necesario remontar mucho en el tiempo para encontrar los orígenes de las American Amber Ale, un estilo de cerveza moderno que nació a finales del siglo XX en las áreas americanas del Norte de California y del Noroeste del Pacífico. También denominadas “Red Ales”, las American Amber Ales se consideran hermanas de las rubias American Pale Ales, pero con un nivel de amargor menor.

El lúpulo se percibe entre bajo y moderado, con un aroma típico de las variedades de lúpulo americanas (Cítrico, Floral, Resinoso, Herbal, Fruta Tropical, Melón, etc.). Es frecuente encontrar el carácter cítrico de los lúpulos, aunque no es una característica obligatoria. El carácter maltoso es entre moderadamente bajo y moderadamente alto, a menudo con unas notas caramelizadas que equilibran la cerveza o hasta enmascaran el tono lupulizado. La presencia de ésteres es entre moderada e inexistente.

Su color es entre ámbar y marrón cobrizo. La capa de espuma, por su parte, suele ser amplia y blanca, con buena retención. Aunque una American Amber Ale suele ser bastante clara, las cervezas a las que se les ha aplicado el dry-hopping pueden ser ligeramente más turbias.

El sabor a lúpulo es entre moderado y alto, con las características típicas de los lúpulos americanos, tal y como sucede en el aroma. Los sabores maltosos son de moderados a fuertes, a menudo con una dulzura inicial seguida de un sabor moderado a caramelo. Los sabores amargos derivados de la malta y los lúpulos suelen apoyarse mutuamente. En cuanto a los ésteres afrutados, pueden variar entre moderados e inexistentes. La dulzura procedente malta caramelo y el amargor o el sabor de lúpulo, además, pueden persistir hasta el final del trago.

La sensación en boca es que el cuerpo de la cerveza es entre medio y alto. La carbonatación también es entre media y alta. Por otro lado, el acabado es suave y sin astringencia. Las versiones más fuertes, además, suelen transmitir la calidez del alcohol.

En resumen; se trata de una cerveza artesanal americana, una Amber moderadamente fuerte con un sabor a malta de caramelo. Las versiones pueden variar bastante entre

ellas; algunas cervezas tienen un carácter claramente maltoso, mientras que otras están agresivamente lupulizadas. Las versiones más lupulizadas y amargas, sin embargo, no deberían chocar con el perfil de la malta caramelo.

Tenemos como ingredientes para esta cerveza; la malta Pale Ale, típicamente norteamericana y de dos carreras, y también malta Cristal. Adicionalmente, se pueden añadir otros granos que añadan un carácter adicional y único. Se suelen usar lúpulos americanos, a menudo con un sabor cítrico, aunque también se pueden utilizar otros (27).

Características generales:

- Densidad inicial: 1.045 – 1.060
- Densidad final: 1.010 – 1.015
- IBUs: 25 – 40
- Color (SRM): 10-17
- Nivel de alcohol: 4.5 – 6.2% (27)



Figura 6. Cerveza Artesanal Rogue American Amber Ale (27).

1.7.2. Estilo New England IPA

Un estilo moderno de cerveza artesanal originario de la región de Nueva Inglaterra de los Estados Unidos. Se cree que Alchemist Heady Topper es el ejemplo original y la inspiración para muchas otras interpretaciones que crecieron en popularidad a principios y mediados de la década de 2010. Los cerveceros continúan innovando y evolucionando el estilo, y el estilo tiende hacia una presentación menos amarga hasta el punto de burlarse del término "IPA" (28).

Una IPA estadounidense con sabores y aromas intensos a frutas, un cuerpo suave y una sensación en la boca suave, y a menudo opaco con una bruma sustancial. Menos amargura percibida que las IPA tradicionales, pero siempre saltan masivamente hacia adelante. Este énfasis en el salto tardío, especialmente el salto seco, con lúpulo con cualidades de frutas tropicales le da el carácter 'jugoso' específico por el que se conoce este estilo.

Aroma intenso a lúpulo, típicamente con cualidades frutales (la fruta de hueso, la fruta tropical y los cítricos son los más comúnmente presentes), reflejo de las nuevas variedades de lúpulo estadounidenses y del Nuevo Mundo sin ser herbáceas o herbáceas. Malta limpia y neutra en el fondo, potencialmente con un ligero sabor a pan dulce sin caramelo ni tostadas. La ausencia de cualquier carácter de malta es una falta. Carácter de fermentación neutro a afrutado que está bien integrado con el lúpulo. Un aroma cremoso, mantecoso o ácido es inapropiado. Cualquier carácter de alcohol percibido debe ser restringido y nunca caliente.

El color varía de paja a amarillo, a veces con un tono naranja. Brumoso, a menudo opaco, claridad; No debe estar turbio o turbio. La opacidad puede agregar un "brillo" a la cerveza y hacer que el color parezca más oscuro. Cualquier partícula flotante visible (materia de lúpulo, grumos de levadura, etc.) es una falla. Cabeza blanca de merengue de mediana a rocosa con retención de alta a muy alta.

El sabor del lúpulo es de alto a muy alto, y refleja las mismas características que el aroma (el énfasis en la fruta, siendo la fruta tropical madura, la fruta de hueso y los cítricos los más comunes). La amargura percibida puede ser algo baja a media-alta, a menudo enmascarada por el cuerpo y el final de la cerveza. El carácter del lúpulo en el retrogusto no debe ser agudo ni áspero. Sabor a malta bajo a medio, generalmente

neutro, a veces con un sabor a pan, granulado y ligeramente dulce. Los sabores notables de tostadas o caramelo son un defecto. El carácter de fermentación es neutral a afrutado, pero al igual que con el aroma, apoya el lúpulo. De seco a medio acabado. Los sabores cremosos, almidonados o azucarados son inapropiados, aunque un alto nivel de éster y un amargor más bajo pueden dar la impresión de una dulzura hasta moderada.

La sensación en la boca es de cuerpo medio a medio completo con un carácter suave. Sin astringencia dura derivada del lúpulo. El calor del alcohol puede estar presente en versiones más fuertes, pero nunca debe estar caliente. La carbonatación media es estándar. La cerveza no debe tener una sensación en la boca cremosa o viscosa, un toque ácido ni una textura de almidón crudo.

El estilo todavía está evolucionando, pero este es esencialmente un IPA estadounidense más suave, más peligroso y más jugoso. En este contexto, "jugoso" se refiere a una impresión mental de jugo de fruta o de comer fruta fresca y completamente madura. Los ejemplos pesados que sugieren batidos, cremas o batidos de frutas están más allá de este rango. La turbidez proviene del régimen de salto seco, no de levadura suspendida, neblina de almidón, pectinas fraguadas u otras técnicas; es deseable un brillo brumoso, no un desorden turbio y turbio.

Los ingredientes característicos son similares a los estilos IPA estadounidenses más nuevos, pero a menudo con más avena o trigo en el grano, y menos caramelo o maltas especiales. Opción de lúpulo restringida a variedades americanas o del Nuevo Mundo con un carácter de frutas tropicales, frutas de hueso o cítricos. Cepa de levadura neutra a esterilizada. El agua varía desde el equilibrio entre sulfato y cloruro hasta el uso de más cloruros. Lúpulo muy seco, en parte durante la fermentación activa, utilizando una variedad de dosis y temperaturas de salto para enfatizar la profundidad del aroma y el sabor del lúpulo sobre el amargor. La biotransformación de los aceites de lúpulo durante la fermentación puede aumentar el carácter de la fruta.

En comparación con la American IPA, New England IPA tiene una sensación en la boca más completa y suave, una expresión de lúpulo tardío más frutal, un equilibrio de amargor percibido más restringido y una apariencia más peligrosa. Muchas IPA americanas modernas son afrutadas y algo confusas. Si tienen un acabado seco y

crujiente, en la mayoría de los cuerpos medianos, y un alto grado de amargura, estos ejemplos deben ingresarse como IPA estadounidenses. Las adiciones notables de fruta, lactosa u otros materiales para aumentar el carácter afrutado y suave deben ingresarse en otra categoría definida por el aditivo por ejemplo, cerveza de frutas, cerveza de especialidad (28).

Características generales:

- Densidad inicial: 1.060 – 1.085
- Densidad final: 1.010 – 1.015
- IBUs: 25 – 60
- Color (SRM): 3-7
- Nivel de alcohol: 6 – 9% (28)



Figura 7. Cerveza Artesanal Naparbier Natural (29).

1.8. Control de Calidad

1.8.1. Dureza del agua

La dureza total se mide en grados hidrotimétricos alemanes (°DH) “Deutsche Härte” que se interpretan de la siguiente manera:

0 – 5°DH = agua muy blanda

5 – 9°DH = agua blanda

9 – 13°DH = agua de dureza media

13 – 19°DH = agua moderadamente dura

19 – 30°DH = agua dura

Más de 30°DH = agua muy dura

Se produce agua “dura” cuando el agua de lluvia, originariamente “blanda”, se carga de sales, principalmente sales de calcio y magnesio al contactar con la tierra del suelo. Si estos metales forman sales con el ácido carbónico (carbonatos), se origina la dureza carbonatada. Las sales de estos metales con otros ácidos (ácido sulfúrico, ácido clorhídrico) causan dureza no carbonatada; ambas juntas, carbonatadas y no carbonatadas, constituyen la dureza total. La dureza no carbonatada no es muy importante en la fabricación de cerveza; en cambio, la carbonatada es de la máxima trascendencia. Las relaciones existentes entre la dureza del agua y la calidad de la cerveza son extraordinariamente complejas. En síntesis se puede decir: la dureza (carbonatada) del agua actúa de manera tanto más perjudicial cuanto más clara y rica en lúpulo sea la cerveza. Una cerveza oscura y con poco lúpulo, como es la clásica de Munich, puede fabricarse sin inconveniente con agua de esta capital germana (dureza carbonatada superior a 14°DH). Una cerveza tipo Pilsen requiere en cambio agua particularmente blanda. El agua de la cerveza Pilsen tiene una dureza carbonatada de apenas 1,3°DH, razón principal de la fama adquirida por la cerveza Pilsen (30). Como sobre la dureza del agua puede influirse poco, en cada lugar de fabricación de cerveza debe elegirse el método de elaboración que mejor se adapte a las disponibilidades locales de agua. Esto condiciona, pues, el tipo de cerveza a fabricar. Con los medios técnicos existentes, hoy se puede fabricar prácticamente cualquier tipo de cerveza con cualquier clase de agua. Por la misma razón, también es posible elaborar cerveza tipo Pilsen en todo el mundo, y no sólo en esta localidad germana (30).

1.8.1.1. Reducción de la dureza del agua (ablandamiento)

Inicialmente, lo más sencillo es utilizar el agua local disponible sin ningún tratamiento. Si los resultados de la fabricación de la cerveza no son satisfactorios, se debe buscar, estudiando paso a paso el proceso, la mejora del mismo. La posibilidad de lograrlo está siempre en el agua. Cuando el grado hidrotimétrico es inferior a 10°DH, apenas tiene el cervecero aficionado que modificar el agua, si bien las industrias cerveceras incluso ablandan estas aguas para elaborar cervezas claras con mucho lúpulo del tipo Pilsen.

Las aguas duras necesitan tratarse cuando se quiera fabricar cerveza clara con más de 30 g de lúpulo por 10 litros y la proporción de dureza carbonatada sea alta. En cambio, para la cerveza oscura o negra y con baja cantidad de lúpulo, pueden emplearse también aguas muy duras. En el extranjero es frecuente elevar una dureza *deficiente* del agua agregando determinadas sales. Por ejemplo, para 10 litros de agua puede agregarse:

1 TL de Ca SO_4 (yeso)

$\frac{1}{2}$ TL de Mg SO_4 (sal de Epsom)

Ambos productos pueden adquirirse en la farmacia (30).

1.8.2. Levaduras

En las levaduras, los valores de pH comprendidos entre 3 y 6 son la mayoría de las veces favorables al crecimiento y actividad fermentativa; esta última es mayor cuanto mayor sea el pH y se produce una caída notable a valores de pH de 3-4. El pH influye en la formación de subproductos; por ejemplo, a valores de pH elevados se incrementa la formación de glicerol (10).

Las temperaturas óptimas de la fermentación, la respiración de las levaduras y el crecimiento celular son claramente diferentes. La velocidad de fermentación aumenta generalmente con la temperatura entre los 15 y los 35°C y los niveles de glicerol, acetona, buteno-2,3-diol, acetaldehído, piruvato y 2-cetoglutarato se elevan en los caldos de fermentación. La formación de niveles elevados de alcohol también depende de la temperatura (10).

1.8.3. Lúpulo

El lúpulo se clasifica de acuerdo con su origen. Así, se habla de “lúpulo de Saaz”, del “lúpulo de Hallertau”, etc. Las diversas clases de lúpulo se diferencian bastante entre sí de acuerdo con su contenido en amargor, lo que debe de tenerse en cuenta al dosificar el lúpulo (19).

Tabla 3. Adición del lúpulo de acuerdo a su contenido de amargor (19)

	Elevada adición de lúpulo	Escasa adición de lúpulo
Dureza del agua	Agua blanda	Agua dura
Método cervecero	Infusión	Decocción
Color cerveza	Cerveza clara	Cerveza oscura
Ingredientes principales	Extracto seco alto	Extracto seco bajo
Grado fermentación	Fermentado alto	Malteado excesivo
Tiempo maduración	Largo	Corto

El cervecero aficionado puede adquirir en Alemania distintas clases de lúpulo, si bien resulta difícil encontrar un suministrador de una clase muy específica. Por tanto, debe aceptarse buenamente el disponible. Haciendo los ensayos oportunos, se llega a saber cuál es la cantidad adecuada. Es recomendable comprar el lúpulo en forma de Pellets, que no son más que polvo de lúpulo comprimido. Sin embargo, también puede utilizarse el lúpulo presentado de otra manera (hojas enteras, extracto, etc.) (19).

1.8.4. Malta

Las especificaciones más importantes son las que aparecen en la tabla 4 junto con sus valores típicos. De lo hasta ahora dicho, resulta fácil deducir que el cervecero necesita conocer: (i) contenido en agua, (ii) proteína o nitrógeno totales, (iii) extracto obtenible de la malta fina y groseramente molida, (iv) contenido en nitrógeno soluble del extracto, (v) actividad enzimática, (vi) fermentación del extracto y (vii) color. Algunos fabricantes de cerveza están interesados también en medidas de la dureza de la malta y de la viscosidad y en el contenido en β -glucanos y en aminoácidos del extracto. Algunos autores estiman que los valores del extracto, el cociente de nitrógeno soluble/nitrógeno total y la dureza constituyen los parámetros que más información proporcionan sobre la calidad de la malta (26).

Tabla 4. Algunas especificaciones típicas establecidas por los cerveceros para varias maltas; para la malta destinada a la fabricación de ale se indican las variaciones toleradas (26).

	Malta americana de 6 filas	Malta europea de 2 filas para la elaboración de "lager"	Malta europea de 2 filas para la elaboración de "Ale"
Agua (%)	4	3.5	2±0.2
Extracto tras una molienda fina (% en peso seco)	77	79	80±0.4
Extracto tras una molienda grosera (% en peso seco)	75.3	77.4	78.6±0.4
Nitrógeno total (%)	2.1	1.75	1.7±0.7
Nitrógeno soluble (cociente respecto del nitrógeno total)	40	39	39.5±1
Poder diastásico (grados Lintner)	140	75	65±5
Actividad α amilasa (Un, dextr.)	40	35	-
Color (grados EBC)	3.8	2.9	6±1

1.9. Chicha de Guiñapo

1.9.1. Historia de la Chicha, bebida emblemática de Arequipa

Desde inicios de la colonia, la elaboración de la chicha fue una actividad estrictamente realizada por mujeres, de diferentes razas. Pero al incrementarse a lo largo del tiempo la cantidad de consumidores de esta bebida se requirió el servicio de más personas especializadas (guiñaperas) solo en la elaboración del guiñapo (maíz germinado secado y molido) (31).

Para fines del siglo XVII la producción de la chicha se fue especializando.

1.9.2. Un método centenario para obtener el Guiñapo

El insumo principal para la preparación de esta chicha es el maíz, pero no de cualquier tipo, sino el "Kulli" o "Colli", conocido también como Negro Criollo. En distritos como Tiabaya, que aún se produce aunque en poca cantidad. Posteriormente, si se requiere mucho Guiñapo se utilizará el "poyo"; si se necesita menos cantidad recurrirá a la "crecedera", variando igualmente las proporciones de agua y de tiempo (32).

En un estudio realizado por los doctores Manuel A. Velásquez y Ángel Maldonado (1919), se explica detalladamente el método para la obtención del guíñapo, que sigue utilizándose hasta el día de hoy salvo algunas modificaciones secundarias que no afectan en nada a las características básicas.

En una vasija ancha de barro cocido, de una capacidad de unos 10 litros o menos, sin fondo; llamada Crecedera puesta en un rincón de un cuarto abrigado, y cubierto el fondo o suelo y las paredes con hojas de col mojadas en agua, se deposita en ella una capa de unos 10 centímetros de altura, de maíz, que previamente ha sido remojado en agua durante tres días y tres noches y privado del excesos de agua colocándolo en una canasta hecha de caña, a manera de criba, una vez depositado el maíz en la Crecedera, se le cubre con otras hojas del col; y el todo se cubre con abundantes telas de lana, para que sude el maíz y reviente; en los meses de octubre a enero, a los ocho días se descubre la crecedera y se retira el maíz germinado; en los demás meses y principalmente en el invierno es preciso esperar alrededor de 15 días para retirar el maíz (32).

Una vez que el Huiñapu se retira de la Crecedera se echa en los patios y azoteas de las casas, al sol, hasta que se endurezca y esté apto para ser molido. Cuando no hay hojas de maíz (cubierta del fruto), remojadas en agua. Cuando no hay Crecedera. Hacen germinar el maíz sobre hojas de col o panccas y el todo lo cubren con panccas, y prosigue como si se hicieran en las Crecederas; pero no se consigue buen Huipaño pues, en pocos granos brota el sullo (germinan) (32).

Cuando la cantidad de maíz por transformar en Huiñapu es grande, se le hace germinar en un Poyo y es el procedimiento que ordinariamente se sigue. El Poyo es un pozo que mide 1.50 metros de ancho por 3 metros de largo y 30 centímetros de alto, cuyo piso está constituido por un empedrado de pequeños cantos rodados o por ladrillos ajustados entre sí; sin argamasa en sus juntas; y sus paredes están hechas de Sillar unidos con una mezcla de cal y arena llamada Caliche; de modo que constituyen un pozo cuyo fondo es permeable en las juntas de los cantos rodados y sus paredes muy porosas, pues el Sillar absorbe gran cantidad de agua. No siempre los Poyos son tan grandes. Generalmente se construyen dos poyos juntos, de modo de poderlos irrigar con una acequia que pasa entre los dos y al nivel superior del poyo (32).

Sobre el poyo seco, se echa el maíz en capa de unos 10 centímetros de alto, se le recubre con una gruesa capa de paja de trigo y la paja se presiona poniendo encima de ella cierta cantidad de cantos rodados, en seguida se le da el primer riego o llenada inundando el poyo de modo que el agua cubra por completo los cantos rodados que presionan la paja; al día siguiente en la tarde se le da un riego o llenada y al siguiente día otro riego por la tarde, es decir, un total de tres riesgos o llenadas; en verano se escarba (se recoge) el Huiñapo a los ocho días y en invierno a los quince días. Después de los tres riesgos, día a día, las Huiñaperas descubren en las cuatro esquinas del poyo el maíz para darse cuenta de cómo marcha el proceso de germinación; si observan que el maíz está duro aún y que necesita más agua, rocían una cantidad de agua sobre el Poyo, ellas por la práctica saben en qué momento debe detenerse el proceso de la germinación; cuando se ha añadido demasiada agua al poyo, el maíz entra en descomposición y exhala un olor desagradable (32).

Cuando se reconoce que ya el maíz está lo necesariamente germinado, se retiran los cantos rodados y la paja que los recubría: se encuentran los granos de maíz apretados unos contra los otros entrelazados por las raicesillas y los embriones formando un compacto que se extrae del poyo por medio de una lampa y se le pone sobre una qquepiña (manta de lana o de algodón) y en ella se traslada al secadero (azotea o patio empedrado) y a mano se separan los granos de maíz germinado y se extienden en capa delgada que se remueve varias veces al día cuidando de no romper las raicesillas y los embriones, pues disminuiría de volumen y es de advertir que este se vende al volumen; al hacer la desecación hay que evitar que la lluvia caiga sobre él y es preciso removerlo varias veces al día para favorecer la desecación y que el Huiñapu no se caliente (entre en fermentación y tome olor desagradable y baje su precio) (32).



Figura 8. El maíz en sus diferentes etapas hasta llegar a ser “Guiñapo” (35)

1.9.3. Proceso de elaboración de la chicha

Tras el proceso de molienda, el Guiñapo es remojado en agua por un par de horas y luego se remueve con una “ccahuina” o cuchara de madera. Después, con la ayuda de un “huinco” se traslada a una paila u olla grande para cocinarlo moviendo de vez en cuando, de cuatro a seis horas, dependiendo de la cantidad que se desea preparar, hasta que suelte todo el almidón y su dulzor natural. Más adelante se filtra la preparación utilizando la “ceisuna”. Esta es sujeta por dos mujeres, a las que se conoce como “hacedoras”. Con el “huinco” se saca el líquido que se está cocinando, se vierte en medio de la “ceisuna” y se filtra, en medio de ciertos movimientos de vaivén de las “hacedoras” que poco a poco van envolviendo la “ceisuna” en sentidos contrarios, hasta que todo el líquido se termine de filtrar. El contenido que queda en la “ceisuna” se conoce como “anchi” (utilizado como alimento para gallinas y chanchos) (33).

Al líquido que se ha filtrado/cernido se le llama “usma” (mosto), la que le deja entibiar para poder envasarla en una “chomba” y dejar que fermente juntos con el “concho” (el sedimento de la chicha anterior o lo que en panadería se la llama masa madre, que es la que hace fermentar la levadura), que ayuda que la chicha ya está madura. Se trasvasa a una “chomba”, pero antes se vuelve a filtrar en la “coladera”, pedazo de tocuyo que se coloca en la boca de la “chomba” (33).

Al momento de servir la chicha se le suele agregar azúcar, a diferencia de años atrás cuando la costumbre era beberla sola, porque el maíz tiene su propio dulzor. La

primera chicha que se sirve es el “cogollo” y, por esa razón, el vaso utilizado toma el mismo nombre. El primer vaso servido tiene una significación ritual de probar y calificar la calidad de la chicha, costumbre que hoy en día se mantiene. El vaso conocido como “bebe” era un premio que se ofrecía a quien era enviado a comprar la chicha (“mandado”), iba a chacras, anexos u otros pueblos y recorría largas distancias, por lo que se le invitaba el “bebe” para que pudiera reponer las fuerzas y emprender el regreso (33).



Figura 9. Vasos de diferentes tamaños para servir la chicha (34)

En épocas pasadas se usaba cantidades proporcionales de Guiñapo y agua (mitad y mitad) y se obtenía una chicha espesa, con cuerpo. Pero ahora se la prepara más suelta porque así lo piden los clientes. Por ejemplo, si se quiere preparar 50 litros de chicha de guiñapo se emplearán 15 kilos de harina de maíz. Para cocinar una buena chicha se requiere además de un buen fuego, constante y duradero, proporcionado por la leña del molle (33).

1.9.4. ¿Chicha De Guiñapo O Chicha De Jora?

En Arequipa la bebida tradicional asumida y muy querida es la chicha de guiñapo, cuyo insumo principal es la harina de maíz germinado. En la zona norte se la conoce como chicha de jora, que utiliza el mismo insumo. Entonces, ¿cuál es la diferencia entre ambas?

“Jora es voz de origen quechua, derivada de sora, que quiere decir “maíz germinado”. En el norte, el proceso de germinación consiste en extender el grano seco sobre la arena, aunque algunas personas utilizan hojas de plátano o una manta de yute o de rafia para que no tenga contacto directo con la arena. Sobre este maíz esparcido se colocan hojas de plátano hasta cubrirlo por completo, se vierte agua hasta que las raicillas alcancen los 10cm como promedio. Se recoge el maíz germinado, se hace secar y se tritura en los molinos (33).

Por su parte “Guiñapo” provendría de la voz aimara wiñapu, que quiere decir “bebida de maíz que recién empieza a germinar o germinación interrumpida”, proceso en el que se utiliza un pozo o “poyo”, y que ya hemos descrito (33).

En el diario La Voz (2015), el economista arequipeño Rolando Linares Linares publicó un artículo a manera de pronunciamiento, pidiendo respecto a la identidad de su región ante la aparente confusión de personas que llaman “chicha de jora” a la bebida tradicional de Arequipa. Ronaldo explica que la diferencia está en el proceso de obtención del maíz germinado.

1.9.4.1. Se llama “chicha de Guiñapo”

Según investigaciones con historiadores, arqueólogos, antropólogos, sociólogos se pudo encontrar que el término “es el que corresponde desde los orígenes del Imperio Incaico a la fecha”; es así que es bueno señalar a grandes rasgos cómo se procesa el Guiñapo y luego la chicha (33).

En nuestra área rural existen unos pozos llamados “poyos”, más o menos de 2.50cm de ancho por 3 de largo y con una altura de 0.50cm. La característica de este “poyo” es que debe ser empedrado, allí se echa el maíz, encima se le adiciona una capa de paja, sobre la paja se colocan piedras más o menos del diámetro que se utiliza para empedrar, hecho este trabajo se procede a inundarlo de agua y se le deja por espacio de 8 días, tiempo en el que obtenemos que al maíz le han salido raíces “sullo”, luego se retiran las piedras, se retira la paja y encontramos el maíz parecido a una chamba de pasto, a esto es lo que llamamos “Güiñapo” y finalmente lo sometemos a una exposición del medio ambiente y al sola hasta cuando se seque, para luego enviarlo al molino donde se procesa, saliendo la “ Harina de Güiñapo”, la misma que se convierte en materia prima fundamental para elaborar la “chicha de Güiñapo”(33).

La diferencia en cuanto a la forma de obtención del maíz germinado es evidente, pero tanto en Arequipa como en la zona norte el producto final e insumo para la preparación de la chicha de maíz es el mismo: Harina de maíz germinado.

Como se ha podido constatar la denominación, preparación y consumo de chicha de guiñapo eran ya conocidos en Arequipa desde la época colonial. Por tanto fue, es y seguirá siendo el nombre de nuestra bebida de bandera. Por algo el historiador peruano Jorge Basadre decía: “Arequipa es patria de la mejor chicha” (33).





2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Medios de cultivo

- Caldo Saboraud (10% Sacarosa), Agar Extracto de Malta
- YPD

2.1.2. Soluciones

- 2% Tritón X-100
- 1% SDS
- 100 Mm NaCl
- 10 Mm Tris-HCl
- 1 Mm Na-EDTA
- Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)
- TE (Tris HCl 10 Mm, Na-EDTA 1 Mm)
- Acetato de amonio 4 M
- RNAsa A

2.1.3. Reactivos

- Agua destilada
- Azul de bromotimol
- Cristal violeta
- Azul de lactofenol
- Safranina
- Kovacs
- Rojo metilo
- Rojo fenol
- KOH
- α - Naftol

2.1.4. Material biológico

- Chicha de guiñapo

2.1.5. Material de plástico y vidrio

- Portaobjetos

- Cubreobjetos
- Placas Petri
- Tubos de ensayo
- Tubos Falcon de 15 MI, 50 MI
- Balón 1L
- Matraces 250 MI, 500 MI
- Probeta 100 MI
- Tubos eppendorf
- Gorro
- Guantes
- Mascarilla

2.1.6. Materiales de la planta cervecera Machay

- Ollas de acero inoxidable. (10 L)
- Cocina industrial.
- Densímetro
- Termómetro
- Botellas de vidrio (300MI)
- Materiales de limpieza (Detergente)
- Embotelladora “M-Maq”

2.1.7. Equipos

- Balanza analítica
- Autoclave
- Incubadora
- PCR
- Centrifugadora
- Micropipetas (10, 50, 200, 1000 μ L)
- Microscopio de Luz
- Refrigeradora
- Cámara de Neubauer
- Shaker

2.2. Metodología

2.2.1 Aislamiento, identificación y caracterización de la levadura autóctona de la chicha de guiñapo.

La metodología fue basada en el trabajo de investigación realizado por la Universidad Nacional de Trujillo que tuvo por objeto aislar levaduras productoras de etanol a partir de una Chicha de Jora del Mercado “Mayorista” de Trujillo, dirigido por Heber Robles Castillo en el año 2012 (36).

Con la diferencia que tanto la evaluación de la capacidad fermentativa como la identificación molecular de la cepa; fue por pruebas bioquímicas y PCR en tiempo real respectivamente.

La chicha de Guiñapo fue recolectada de la picantería Cau cau II siendo su propietaria doña Saida Villanueva Salas da una explicación de la elaboración de la chicha de Guiñapo y la importancia de cada etapa de la misma. Doña Saida es miembro de la sociedad picantera de Arequipa la cual aspira a la protección, promoción y desarrollo de la picantería arequipeña reconocida como “patrimonio cultural del Perú”.

Las muestras se recolectaron en 3 botellas de plásticos estériles de 500ml, cada botella contiene la chicha de guiñapo en diferentes etapas de su elaboración (antes de la fermentación (1), durante (2) y después de la misma (3)). La botella 1 contiene la “Usma” (mosto) antes de la fermentación; pero para poder visualizar las levaduras activas en el proceso de fermentación de la chicha se toma una muestra de la botella 2 para observar al microscopio a 4x, 10x y 40x.



Figura 10. Local elegido para la recolección de la muestra.



Figura 11. Recolección de la muestra.



Figura 12. Observación al microscopio de la muestra 2, en proceso de fermentación.

Para aislar las levaduras se preparó Agar Saboraud (10% Sacarosa) teniendo el caldo Saboraud como medio de crecimiento general con 0,05gr de cloranfenicol actuando como bactericida, se siembra la muestra dejándola incubar a 37°C durante 48 a 72 horas.

La cepa crecida se siembra ahora en un medio Agar Extracto de malta o mosto de cerveza como medio enriquecido para el crecimiento exclusivo de levaduras, la preparación de este medio es diluirlo con agua destilada en relación 1 a 3 (100mL de mosto de cerveza por 300mL de agua destilada) este medio posee una alta concentración de maltosa y otros sacáridos como fuentes de energía considerando que su pH permite el crecimiento únicamente de levaduras, restringiendo así crecimiento de bacterias. Se preparó 1L de este medio, se autoclavó y se procedió a plaquear, dejando incubar las placas a 37°C por 48 horas.



Figura 13. Preparación del medio enriquecido Agar mosto de cerveza.

2.2.1.1. Identificación por pruebas bioquímicas

Se prepararon tubos y placas con diferentes medios de cultivo para las 3 muestras que tenemos: 2 levaduras comerciales (safale-04 y safale-05) y la levadura autóctona aislada.

La interpretación de los resultados que se puede dar en cada medio de cultivo se encuentra detallados en el Anexo 5.

Para la identificación se realizaron dos métodos: Asimilación y fermentación.

- **Método de Fermentación**

Para este método se utiliza 3 tubos de ensayo cada uno contiene la campana de Durham en un medio azucarado para cada tubo: Glucosa, sacarosa y fructosa.

Se agrega un inóculo de 0.5ml a cada tubo, dejando incubar por 48 horas.

Si ha degradado el Carbohidrato entonces se tiene el pH “ácido” habiendo cambio solamente en el color a amarillo se dice que es “Asimilado” sin formación de CO₂.

Si está amarillo el medio y tiene CO₂, hay “fermentación” al observar una burbuja dentro de la campana.

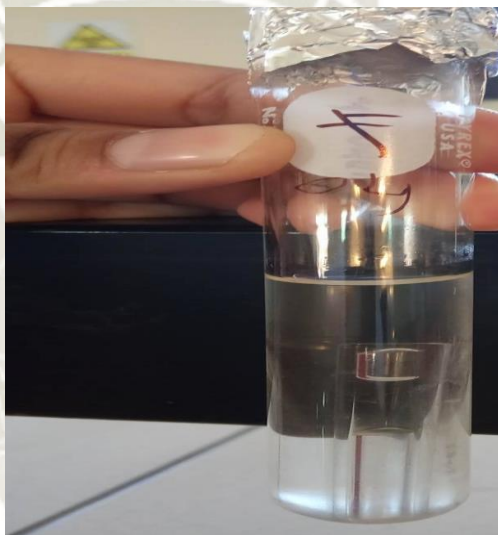


Figura 14. Campana de Durham en un medio azucarado (Fructosa).

- **Método de Asimilación**

En un medio de cultivo EMB (Eosina Azul de Metileno) se siembra la muestra por estría y se deja en incubación por 48 horas. Al ver un ligero crecimiento de colonias se deduce la degradación del Carbohidrato, el pH es ácido y el medio de color amarillo.

Seguidamente se extrae muestra del medio EMB a un tubo con medio TSI dejándolo en incubación por 48 horas.

Se evidencia cambio de color del medio TSI lo que da indicio de Asimilación.

Del tubo de TSI se extrae muestras para evaluar en los siguientes medios: Lia, Citrato de Simmons, O-F, Nitrato, MRVP, Urea, SIM y Gelatina.



Figura 15. Batería de tubos con diferentes medios para la identificación.

2.2.1.2. Identificación molecular

Para la identificación se utilizó los servicios de la empresa BioAL S.A.C. empresa que realiza análisis moleculares para el sector Biotecnológico y agroindustrial. Según indicaciones de la directora técnico de BioAL, Mónica Santa María, se enviaron las muestras que se encontraban en placa Petri en bolsas Zip plop dentro de un taper hermético lleno de hielo en gel. Los cuales hicieron los siguientes análisis: Extracción de ADN – GeneJet Genomic, Ampliación del ADN por marcador COI (Anexo 1 y 2) por PCR de punto final, Secuenciación Sanger y Análisis bioinformático.

- **Conteo Celular para el inóculo o Starter**

En un matraz de 500 mL se colocó mosto de cerveza (350 mL) siendo este el caldo de cultivo para el crecimiento celular de la levadura nativa. Se hizo conteo celular en cámara de Neubauer con azul de lactofenol, este proceso fue cada 8 horas hasta llegar al número de células más alta y óptimo para la elaboración de la cerveza, esta concentración de levaduras está dentro de un frasco estéril de 500mL conteniendo un medio de 260mL, esto fue en la etapa de fermentación de la cerveza.

2.2.2. Caracterización fisicoquímica y con análisis estadísticos de Anova y T-student la cerveza artesanal obtenida con la levadura autóctona comparada con la comercial y realizar una aceptación sensorial por medio de una encuesta en cual por escala de Likert se evaluará apariencia, aroma, sabor e impresión final de la cerveza artesanal estilo NEIPA.

Plan piloto

Para la elaboración de la cerveza artesanal, se utilizó la levadura autóctona obtenida para compararla con la levadura comercial (safale-04), teniendo en cuenta los datos obtenidos bioquímica y molecularmente se hará un análisis estadístico de Anova para los parámetros de densidad, °Brix y pH seguido de una prueba T-student para ver si hay diferencia significativa en la elaboración de cerveza con ambas levaduras.

Se preparó una cerveza artesanal estilo Amber Ale; es una cerveza cuyo cuerpo, sabor y lupulación son moderados. El sabor de la malta, tanto como el aroma y amargor dado por el lúpulo en una concentración equilibrada nos da la posibilidad de analizar de forma comparativa utilizando ambas levaduras (safale-04 y autóctona) se preparó en ambos casos una cantidad de 10L en botellas de vidrio de 5L cada una. Para esto tenemos los siguientes pasos:

Molienda de la Malta

Tabla 5. Tipos de malta, cantidad y porcentaje

GRANOS	kg	%
Malta Pale Ale	2.41	82.00%
Caramel Hell	0.25	8.50%
Red X	0.28	9.50%
TOTAL	2.93	100.00%

Se realizó la molienda de 3 tipos de malta en un molido casero de cereales, esta operación tiene como finalidad el triturado, es partir las glumas del grano de malta para liberar la masa harinosa y fragmentar esta.

Maceración

El volumen que se preparó es de 10L de agua la cual fue calentada hasta 64°C, seguidamente se adicionó la malta molida dentro de una malla que cubrió la olla de

preparación, la función de la malla es facilitar el filtrado de la malta generando un falso fondo que permite la formación de “la torta”, para esto la malta molida debe llegar a 66°C manteniéndola así por una hora.



Figura 16. Maceración de la malta hasta 66° C.

Luego se hizo la prueba de Yodo, la cual sirve para observar la degradación de almidón y también se hace una medición de pH.

Tabla 6. Datos de la maceración: temperatura y tiempo.

Inicio Mash	11:25	hs.	Fin Mash/l. Cal.	Tiempo para llegar a la T°	Fin Calentar
Temperatura / tiempo	66°C	30 min	11:55	00:00 min para 66°C	11:55
	66°C	30 min	12:25	00:00 min para 66°C	12:25
			12:25	< Prueba de yodo	



Figura 17. Toma de la muestra filtrada para la prueba de yodo.

Recirculación y lavado de malta

En esta etapa el agua recircula con el objeto de homogenizar el mosto antes de la filtración de la malta. El lavado se hace añadiendo agua (5L), todo este proceso es a 76°C.

Tabla 7. Datos del recirculado y lavado de malta: temperaturas, tiempo y adición de sales para la dureza del agua.

Recirculado	12:25	hs.	Fin Mash/l. Cal.	Tiempo para llegar a la T°	Fin Calentar
Temperatura / tiempo	76°C	10 min	12:25	00:10 min para 76°C	12:35
	76°C	0 min	12:35	00:00 min para 76°C	12:35
		0 min	12:35		
Lavado de malta	12:45	hs.			
Litros de agua de lavado	5	L		60 min para 76°C	
Temperatura de agua	76	°C		1 g CaCl ₂ 3 g CaSO ₄	

Hervor, agregado del lúpulo

Seguidamente se pasó a la adición del lúpulo (Columbus y Cascade) y el clarificante Protafloc. En este proceso se logra la desnaturalización y coagulación de las enzimas y proteínas y una esterilización y concentración del mosto.

Tabla 8. Datos del hervor del lúpulo: Variedad, cantidad, %Alfa-ácidos y tiempo.

LUPULIZACIÓN	Variedad	Gramos	% AA	Tiempo de hervor	Hora
Gramos agregados en la 1ra. adición:	Columbus	3	12.6	60 min	13:20
Gramos agregados en la 2da. adición:	Nutriente	0	-	15 min	14:05
Gramos agregados en la 3ra. adición:	Protafloc	1	-	15 min	14:05
Gramos agregados en la 4ta. adición:	Columbus	6	12.6	10 min	14:10
Gramos agregados en la 5ta. adición:	Cascade	6	7.3	0 min	14:20
Whirpool	15 min	Fin	14:40	Sedimentación hasta:	15:00



Figura 18. Adición de lúpulo en forma de pellets.

En este punto se mide la densidad inicial (OG) con un densímetro, al terminar el hervor.



Figura 19. Muestra extraída previamente enfriada aproximadamente 100mL en una probeta, se procede a la medición de densidad inicial.

Fermentación

Se adiciono la levadura comercial Safale-04 (9 gr) y la levadura autóctona aislada (Inóculo o Starter) en dos diferentes frascos estériles.



Figura 20. Inóculo en frasco estéril.

Se tomó en cuenta para evaluar la concentración de azúcar que existe y así poder determinar la cantidad de alcohol obtenido, para esto se evaluará con toma de muestras cada 12 horas en periodo de 4 días para determinar el grado de pH y Brix., luego se procedió a la filtración final para eliminar residuos sedimentados para el embotellamiento de la cerveza.



Figura 21. Activación de ambas levaduras por agitación



Figura 22. Formación de sedimento al cabo de 4 días de la activación de la levadura.

Se hizo el traspase de la cerveza dejando el sedimento que contiene levadura a otra botella de 5 litros y dejando en refrigeración. En este punto se observa una diferencia de colores.



Figura 23. Izquierda: Cerveza con levadura autóctona, Derecha: Cerveza con levadura comercial.

La cerveza con la levadura nativa denotó una mayor turbidez, mientras que con la levadura comercial la S-04 se observa una clarificación homogénea.

Al hacer una degustación notamos una cerveza no fermentada al 100%, se dejará en refrigeración una semana previamente añadiendo CO₂ para completar la fermentación y conservar más la cerveza.

Carbonatación

Luego de 2 semanas se pasó al proceso de carbonatación, adicionando azúcar en relación de 7gr /L.

Para este proceso final se hizo una carbonatación natural que fue añadiendo 30gr de azúcar en aproximadamente 50 ml de agua filtrada calentándola hasta formar un almíbar que fue añadido en cada una de las botellas de 5 litros, seguidamente con una vigorosa agitación damos activación a la levadura.



Figura 24. Carbonatación natural con adición de azúcar.

Embotellado

Se dejó las botellas a temperatura durante una semana y luego una semana en refrigeración, se hará un análisis sensorial a la cerveza con la levadura autóctona y la levadura comercial.



Figura 25. Cervezas embotelladas.

Se evaluó el %Alcohol, cantidad de IBUS, densidad inicial, densidad final, pH.

Se realizó una encuesta a 35 personas haciendo preguntas básicas de conocimiento sobre cerveza artesanal y la chicha de guiñapo, en el análisis sensorial se basó en 4 puntos importantes que son: Apariencia, sabor, aroma e impresión final, estos fueron subdivididos en diferentes intensidades utilizando una escala de Likert. (Anexo 3).

Evaluación Sensorial

Para realizar la evaluación sensorial se tomaron en cuenta las instrucciones detalladas.

Concepto de cata: Consiste en probar con atención un producto cuya calidad queremos apreciar, se trata de someterlo a nuestros sentidos (gusto, olfato y vista) y conocerlo buscando sus diferentes defectos y cualidades con el fin de expresarlos: la cata es estudiar, analizar, descubrir definir juzgar y clasificar.

Para realizar una cata de manera correcta; "Cuando cates, no observes la botella, ni la etiqueta, ni el entorno; sumérgete en ti mismo para ver como nacen tus sensaciones y como se forman tus impresiones. Cierra los ojos y mira con la nariz, la lengua y el paladar" (Pierre Poupen)

- El catador:

No trague la cerveza.

No use perfumes fuertes.

Se abstraiga de sus preferencias personales.

Este relajado y despierto, no pierda la concentración en ningún momento.

- La muestra:

Debe ser inferior a 12mL para evitar la fatiga y saturación.

Debe ser anónima.

Pruebe al final la primera muestra.

- El entorno:

La copa debe ser transparente y sin olores extraños.

El local debe tener buena luz, sin ruidos.

No fumar ni ingerir alimentos una hora antes del catado.

Tenga a mano papel y lápiz para hacer anotaciones.

Utilizando los sentidos de la vista, olfato y gusto. Se tiene en cuenta lo siguiente:

. Vista: El color de la cerveza en el borde de la copa inclinada da la primera información.

. Olfato: Se llena el vaso hasta la mitad de su capacidad.

Se agitará el vaso en redondo llevando la superficie del vaso a la nariz, respirando profundamente por ella arrastrando todos los aromas de la cerveza. Se identificarán los aromas que te recuerdan a algún ingrediente primordial de la cerveza.

. Gusto: Sobre el mismo vaso que hemos detectado los aromas procedemos a detectar su sabor, primero se da un sorbo para enjuagar la boca y garganta hasta crear una primera capa sobre las papilas gustativas estimulándolas. Luego damos un segundo sorbo con un volumen de 20mL, el que se paladeará y se catará más despacio permitiendo que la cerveza inunde todas las papilas gustativas de la lengua y pueda identificar los diferentes sabores (37).

Teniendo en cuenta esta información se realizó una ficha de degustación para la cerveza artesanal estilo NEIPA. La primera parte de la ficha se realizó preguntadas cerradas para marcar con (X) la respuesta a excepción de la edad y sexo para establecer un rango en nuestro universo de 35 personas. En la segunda parte de la ficha destacan 4 ítems importantes que son: Apariencia, Aroma, Sabor e impresión final.

FICHA DE DEGUSTACIÓN DE CERVEZA	
SEXO: <input type="text"/>	EDAD: <input type="text"/>
1. ¿ES CONSUMIDOR DE CERVEZA?: SI ___ NO ___	
2. ¿QUE TIPO DE CERVEZA PREFERE?: ARTESANAL ___ INDUSTRIAL ___	
3. ¿QUE ESTILOS DE CERVEZA ARTESANAL CONOCE?:	
4. ¿QUE ESTILO LE GUSTA MÁS?	
5. ¿CON QUE FRECUENCIA CONSUMES CERVEZA?: DIARIAMENTE ___ 1 A 2 VECES A LA SEMANA ___ 3 A 5 VECES CADA DOS SEMANAS ___ PASANDO UN MES ___	
6. ¿SABE DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANAL? SI ___ NO ___	
7. ¿ALGUNA VEZ ELABORÓ CERVEZA ARTESANAL? SI ___ NO ___	
8. ¿CONSIDERA QUE LA LEVADURA ES UN FACTOR DETERMINANTE EN LA ELABORACIÓN DE LA CERVEZA? SI ___ NO ___	
9. ¿QUE ASPECTOS VALORA DE UNA CERVEZA?: SABOR ___ AROMA ___ %ALCOHOL ___ APARIENCIA ___ ENVASE ___ PRECIO ___	
10. ¿ES CONSUMIDOR DE CHICHA DE GUIÑAPO?: SI ___ NO ___	
11. ¿PIENSA QUE EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE UNA CERVEZA ARTESANAL ES LA MISMA QUE LA CHICHA DE GUIÑAPO? SI ___ NO ___	
12. ¿PIENSA QUE LA CERVEZA DEGUSTADA OTORGA UNA VALORACIÓN A LA CHICHA DE GUIÑAPO? SI ___ NO ___	
13. ¿CONSIDERA A ESTA CERVEZA ARTESANAL UN PRODUCTO INNOVADOR? SI ___ NO ___	
14. ¿QUE ES LO QUE MÁS LE GUSTO DE ESTA CERVEZA?	
15. ¿RECOMENDARÍA ESTA CERVEZA ARTESANAL A OTRAS PERSONAS? SI ___ NO ___	

FICHA DE DEGUSTACIÓN DE CERVEZA	
NOMBRE DE CERVEZA: _____	USMA
TIPO/ESTILO: _____	NEIPA
% ALCOHOL: _____	6.6
APARIENCIA	
Color 	
Tonalidad 	Espuma
AROMA	
Intensidad 	
IMPRESIÓN GENERAL DEL AROMA 	
SABOR <input type="checkbox"/> DULCE <input type="checkbox"/> AMARGO <input type="checkbox"/> ÁCIDO <input type="checkbox"/> OTRO/ESPECIAL	
Intensidad 	Balance
Cuerpo 	Efervescencia
IMPRESIÓN GENERAL DEL GUSTO 	
IMPRESIÓN FINAL: 	

Figura 26. Modelo de la ficha de degustación de cerveza.

2.2.3. Configurar un sistema de producción para la elaboración de la cerveza artesanal estilo NEIPA con la levadura obtenida biotecnológicamente.

✓ Cerveza Artesanal NEIPA (New England IPA)

Observando los resultados del plan piloto, nuestra levadura autóctona aporta un carácter particular que se puede apreciar a primera vista que es turbidez, sin afectar el sabor o tiempo de vida de la cerveza. Al tener en cuenta este detalle se procedió a elaborar una cerveza artesanal la cual tenga turbidez como característica principal.

Haciendo una investigación sobre estilos de cerveza, se eligió elaborar una cerveza estilo NEIPA (New England IPA) que se caracteriza por tener una alta cantidad de lúpulo aromático, de bajo amargor y con gran cuerpo utilizando malta de trigo.

Molienda de malta

Tabla 9. Tipos de malta, cantidad y porcentaje

GRANOS	kg	%
Malta Pale Ale	5.14	40.00%
Malta Pilsen	5.14	40.00%
Malta Munich	0.64	5.00%
Malta Trigo	1.17	10.00%
Avena	0.69	5.00%
TOTAL	12.79	100.00%



Figura 27. Adición de la malta a la olla.

Maceración

El volumen que se preparó es de 40L de agua la cual fue calentada hasta 68°C, se realizó el mismo procedimiento del plan piloto.

Tabla 10. Datos de Temperatura y tiempo.

Inicio Mash	14:55	hs.	Fin Mash/l. Cal.	Tiempo para llegar a la T°	Fin Calentar
Temperatura / tiempo	68°C	30 min	15:25	00:00 min para 66°C	15:25
	68°C	30 min	15:55	00:00 min para 66°C	15:55
			15:55	< Prueba de yodo	

En este punto se realizó la prueba de yodo, y medición de pH.

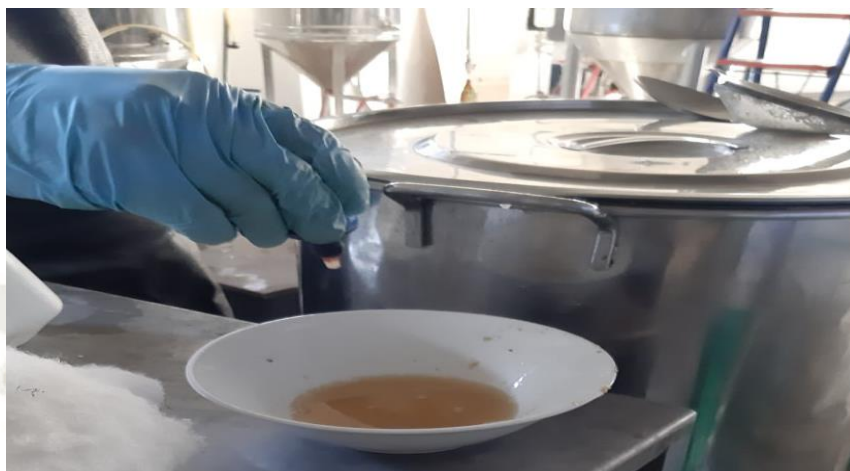


Figura 28. Prueba de yodo

Recirculación y lavado de malta

En esta etapa el agua recircula con el objeto de homogenizar el mosto antes de la filtración de la malta. Al lavado se hace añadiendo agua (18L), todo este proceso es a 76°C. En este punto se toma la densidad antes del hervor, esta es la densidad inicial (OG).

Tabla 11. Datos de recirculado y lavado de malta: temperaturas, tiempo y adición de sales para la dureza del agua.

Recirculado	15:55	hs.	Fin Mash/l. Cal.	Tiempo para llegar a la T°	Fin Calentar
Temperatura / tiempo	76°C		15:55	00:35 min para 76°C	16:30
	76°C	15 min	16:45	00:00 min para 76°C	16:45
Lavado de malta		0 min	16:45 hs.		
Litros de agua de lavado	68		L	60	min para 76°C
Temperatura de agua	76	°C		51	g CaCl ₂
				51	g CaSO ₄



Figura 29. Adición de cloruro de calcio



Figura 30. Adición de sulfato de calcio

Hervor, agregado del lúpulo

Seguidamente se realizó la adición del lúpulo (Columbus, Mosaic, Cascade y Simcoe) y el clarificante Protafloc. En este proceso se logra la desnaturalización y coagulación de las enzimas y proteínas; una esterilización y concentración del mosto. Los datos detallados en la tabla 12 corresponden al primer día de lupulación ya que para obtener el estilo se requiere de adición de lúpulo en este caso del estilo NEIPA; por lo cual se hará 2 procesos de lupulación durante la etapa de fermentación y maduración respectivamente.

Tabla 12. Datos del hervor del lúpulo: Variedad, cantidad, %Alfa-ácidos y tiempo.

LUPULIZACIÓN	Variedad	Gramos	% AA	Tiempo de hervor	Hora
Gramos agregados en la 1ra. adición:	Columbus	15	12.6	60 min	18:15
Gramos agregados en la 2da. adición:	Nutriente	2	-	0 min	19:00
Gramos agregados en la 3ra. adición:	Protafloc	4	-	15 min	19:00
Gramos agregados en la 4ta. adición:	Mosaic	92	10.6	0 min	19:15
Gramos agregados en la 5ta. adición:	Cascade	46	7.3	0 min	19:15
Gramos agregados en la 6ta. adición:	Simcoe	69	13.1	0 min	19:15
Whirlpool	15 min	Fin	19:30	Sedimentación hasta:	19:45

Fermentación

La adición de la levadura autóctona aislada, previamente agitada por 48 horas en un agitador mecánico (Shaeker) a 37°C en 400mL de medio enriquecido (agua y azúcar).

Se adicionó la levadura activada 200mL a cada uno de los Cornelius (C-30 y C-35) con un respirador artificial para que le levadura actúe.



Figura 31. Cornelius ya con la levadura activada y con un respirador artificial.

Al cuarto día se le adicionó 80gr de lúpulo en una malla a cada Cornelius:

Simcoe: 20gr, Cascade: 20gr, Mosaic: 30gr



Figura 32. Primera adición del lúpulo a los Cornelius

Al séptimo día se adicionó de nuevo 80gr de lúpulo en una malla a cada Cornelius:

Cascade: 40gr, Mosaic: 40gr



Figura 33. Segunda adición del lúpulo en una malla.

Al onceavo día se hizo el traspaso a dos nuevos Cornelius (C-10 y C-34), sacando el excedente de lúpulo que se encuentra en las mallas adicionadas.

Carbonatación

Para este proceso se usó un balón de dióxido de carbono de uso industrial, para este proceso se debe adicionar O_2 entre 14 – 20 Psi, en este caso se hizo hasta 18 Psi en ambos Cornelius.



Figura 34. Carbonatación de la cerveza en los nuevos Cornelius.

Embotellamiento

En el día 16 se procedió al embotellado con la maquina semiautomática marca “M-Maq”.



Figura 35. Embotelladora semi automática “M-Maq”.



CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.1. Aislamiento, identificación bioquímica y molecular de la levadura autóctona de chicha de guñapo para producir cerveza artesanal.

✓ Aislamiento

Las muestras recolectadas después de ser llevadas al laboratorio, se observaron la muestra de la botella 2 (Fermentación de chicha) al microscopio a 4x, 10x y 40x para determinar la morfología de los microorganismos presentes, figura 36.

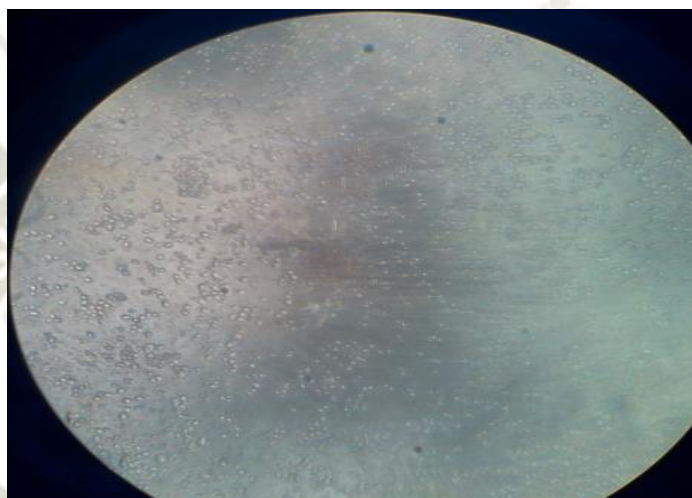


Figura 36. Levaduras encontradas en la muestra 2 a 40x en el microscopio.

Estas levaduras que fueron cultivadas en medio de Agar Saboraud (10% Sacarosa) con 0,05gr de cloranfenicol; incubadas a 37°C de 48 a 72 horas da como evidencia una colonia única de levadura. Las características microscópicas son células ovoides y circulares. Las características macroscópicas son colonias blanquecinas, contextura lechosa y viscosa.

Se hizo una siembra control (-) del medio Agar Saboraud (10% Sacarosa) con 0,05gr de cloranfenicol donde se sembró la levadura comercial (safale – 04) se observa también un solo crecimiento de colonias, tal y como se observa en la figura 37.

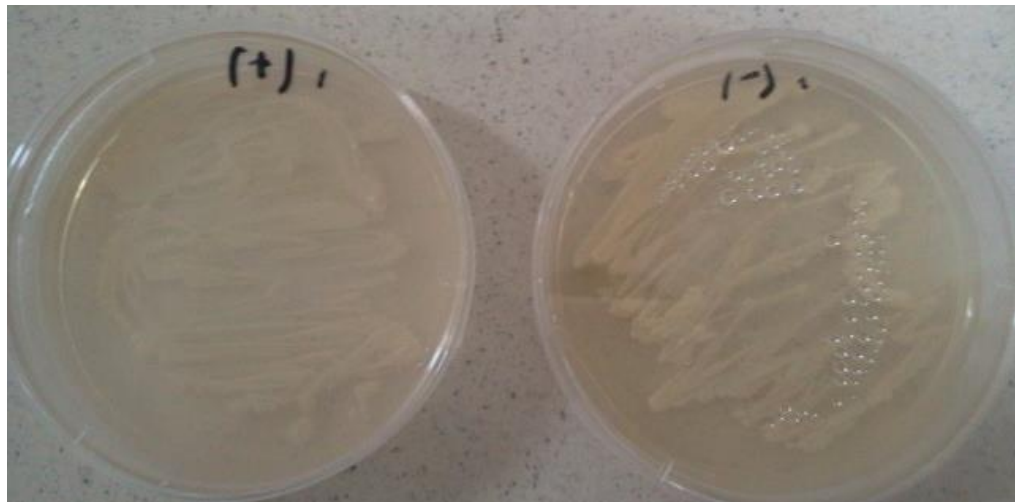


Figura 37. Crecimiento de un solo tipo de colonia en levadura comercial (-) y la levadura autóctona (+).

✓ **Identificación Bioquímica de la levadura autóctona.**

Método de Asimilación

El medio de cultivo EMB (Eosina, azul de metileno) permite una diferenciación muy clara entre las colonias de organismos fermentadores de lactosa y los que no fermentan. Se observa la degradación del Carbohidrato, el pH es ácido y el medio de color amarillo. Evidenciando un crecimiento escaso o nulo.

Se utilizó el medio TSI para evidenciar la fermentación de los azúcares, producción de sulfuro de hidrógeno y gas (CO_2).

A partir del resultado negativo de producción de sulfuro de hidrógeno y gas obtenido en el medio TSI y la diferencia notoria en la base tanto ácida (A) (levadura autóctona) como básica (K) (safale-04 y safale-05), se hizo una identificación bioquímica tanto en medio sólido como líquido, resultados detallados en la tabla 13.

Tabla 13. Resultados de los medios de cultivo por el método de Asimilación

Medios de cultivo	TSI	Lia	MRVP		Urea	Nitrato	SIM			Gelatina	CS
			MR	VP			Motilidad	Indol	H2S		
Método Asimilación											
Levadura Autóctona	A/A-	K/K	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Levadura safale 04	K/K-	K/K	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Levadura safale 05	K/A-	k/A-	+	-	-	+	-	-	-	-	-

Los resultados muestran diferencias en medio TSI, Lia y Nitrato en el cual la levadura comercial safale-05 demuestra un agotamiento en el consumo de glucosa pero demostrando una transformación de nitrito a nitrato.

Método de fermentación Se observó la degradación del carbohidrato (Fructosa, Glucosa y Sacarosa), evidenciando un cambio de color de transparente a amarillo en la campana de Durham y tiene una burbuja producto de la formación de CO₂; dando un resultado positivo al proceso de fermentación como se observa en la tabla 14.

Tabla 14. Resultados de los medios de cultivo por el método de Fermentación

Medios de cultivo	Oxido-Fermentativo	Campana de Durham		
		Fructosa	Glucosa	Sacarosa
Método Fermentación				
Levadura Autóctona	F	+	+	+
Levadura safale 04	F	+	+	+
Levadura safale 05	F	+	+	+

Al observar la tabla, notamos que las tres levaduras tanto las comerciales y la levadura nativa presentaron capacidad fermentativa en los 3 azúcares evaluados.

✓ **Identificación molecular de la levadura autóctona**

Uno de los análisis realizados fue la ampliación por PCR de punto final por medio de electroforesis (Anexo 1 y 2) tanto de la levadura comercial como de la levadura autóctona logrando así saber la cantidad de pares de bases (pb) que se encuentran dentro de las 2 fragmentaciones de ADN obtenidas de cada muestra, siendo la levadura

autóctona y comercial la muestra M1 y M2 respectivamente. Seguidamente se realizó el método de secuenciación de Sanger el cuál se desarrolla por una extracción previa de ADN, para lo cual se tomó 4 fragmentos, 2 de cada muestra para evaluar tanto su longitud normal como la longitud (QV) y % de GC. Teniendo como resultado mayor longitud y por ende el %GC mayor en la región ITS_4 de ambas muestras (M1 y M2), vemos que es un porcentaje alto en la cantidad de nucleótidos por lo cual se pasa al siguiente análisis bioinformático en el cuál se obtiene la secuenciación de los fragmentos seleccionados, la comparación entre la levadura autóctona y la levadura comercial (Safale-04) en la tabla 15 y 16 respectivamente.

Tabla 15. Resultados obtenidos por el Método Sanger en la levadura autóctona

Fragmento	Longitud (Normal)	Longitud (QV≥16)	Longitud(≥20)	GC%
st3_19-179_M1_ITS_1	780	291	89	20
st3_19-179_M1_ITS_4	974	755	755	30

La secuenciación del fragmento st3_19-179_M1_ITS_4 fue la siguiente:

```

CAAGANCATGAGAGNTTTNCNGGGCAAGNAGACAAGGANGGAGAGTCC
AGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGNTAGGCTNGTAAGTTTCTT
TCTTGNTATTCCAANCGGGTGAGAGATTTNNGTGNTTTTGTATAGGACA
ATTA AACGTTTCAATNCANCNACACTGNGGAGTTTTCATATCTTTGCA
ACTTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGRAACAAACAA
ACAATTTATNTATTCAATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAA
CTGGAAATTTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAG
AATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATT
CCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTG
GTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATT
GGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTCGTTGAGGTATAATG
CAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACT
GACGCTATtGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGAGTCTAGGCCGAACAAT
GTTCTTAAAGTTGaCCTCAA
    
```

**Tabla 16. Resultados obtenidos por el Método Sanger en la levadura comercial
(safale -04)**

Fragmento	Longitud (Normal)	Longitud (QV≥16)	Longitud(≥20)	GC%
st4_19- 179_M1_ITS_1	593	34	14	4
st4_19- 179_M1_ITS_4	766	552	494	32

La secuenciación del fragmento st4_19-179_M1_ITS_4 fue la siguiente:

```
GGAGTTTCATATYTTTGCAACTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGC
CAGAGGTTAACAAACACAAACAATTTTATYTATTCATTAAATTTTGTCAA
ACAAGAATTTTCGTA ACTGGAAATTTTAAAATATTA AAAACTTTCAACGG
ATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAA
TGTGAATTGCAGAATCCGTAGAAATCATCGAATCTTTGAACSCMCATTGC
GCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTYTCAA
ACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCT
GGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCT
TGAGGTATAATGCAAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGAGGCTA
ATCTTTTTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGTAAGAAGAGAGC
GTCTAGGCGAACAAATGTTCTTAAAGTTG
```

Para poder identificar el género y especie se hizo un análisis en 3 base de datos distintas: BOLD System, NCBI y UNITE con las cuales el porcentaje de similitud nos demuestra que la levadura autóctona posee entre 97 a 98 de similitud frente a la levadura comercial (Safale – 04) que posee 99% de similitud, véase la tabla 17 y 18 respectivamente.

Tabla 17. Identificación de la especie de la levadura autóctona por análisis bioinformático.

Familia	Género	Especie	Base de datos	Similitud (%)
Saccharomycetaceae	<i>Saccharomyces</i>	cerevisiae	BOLD System	97.24%
Saccharomycetaceae	<i>Saccharomyces</i>	cerevisiae	NCBI	97.51%
Saccharomycetaceae	<i>Saccharomyces</i>	cerevisiae	UNITE	98.00%

Tabla 18. Identificación de la especie de la levadura safale 04 por análisis bioinformático.

Familia	Género	Especie	Base de datos	Similitud (%)
Saccharomycetaceae	<i>Saccharomyces</i>	cerevisiae	BOLD System	99.10%
Saccharomycetaceae	<i>Saccharomyces</i>	cerevisiae	NCBI	99.10%
Saccharomycetaceae	<i>Saccharomyces</i>	cerevisiae	UNITE	99.00%

✓ **Conteo celular para el inóculo o Starter**

Se colocó en un matraz de 500 mL mosto de cerveza (350mL) siendo este el caldo de cultivo para el crecimiento celular de la levadura autóctona. Se realizó el conteo de células cada 8 horas en cámara de Neubauer, y se obtuvo los siguientes resultados: Las células mostraron crecimiento en la etapa de la fase exponencial desde las 16 horas hasta las 40 horas, en donde entra a una fase estacionaria de duración de 16 horas aproximadamente, para luego pasadas las 48 horas entrar en la fase de muerte celular como se observa en la figura 38.

Se evaluó la viabilidad presente en las células la cual llegó al 100% con una concentración de 10^8 células por mL a las 40 horas de su siembra y posterior incubación. Al llegar a este porcentaje se separa en 1 frasco estéril de 500mL el volumen de 260mL de inóculo de la levadura autóctona la cual se mantuvo en refrigeración hasta la elaboración de cerveza. Los resultados se muestran en la tabla 19 y en la figura 38 el crecimiento celular tanto de la levadura nativa frente a la comercial.

Tabla 19. Conteo celular de la levadura autóctona comparada con levadura comercial

Horas	Número de células x10+8	
	Autóctona	Comercial
8	695	905
16	870	1035
24	3065	3098
32	4030	4097
40	4253	4306
48	4132	4252
56	3954	4021
64	3627	3575
72	2464	2654
80	1625	1453

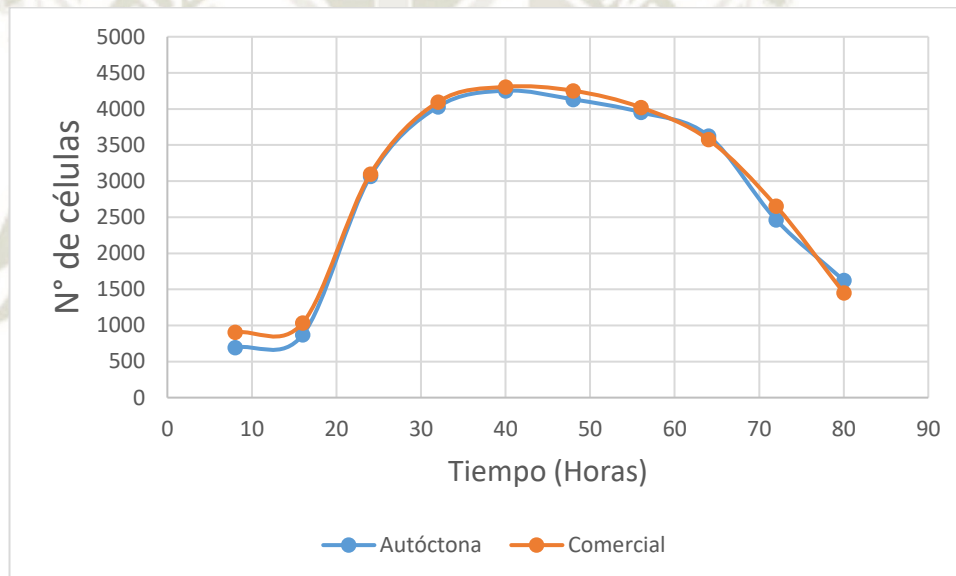


Figura 38. Crecimiento exponencial celular de ambas levaduras, color azul la levadura autóctona y de color naranja la levadura comercial, se observa un comportamiento de crecimiento muy parecido teniendo un tiempo semejante tanto en crecimiento y muerte celular.

3.1.2. Caracterización fisicoquímica y con análisis estadísticos de Anova y T-student la cerveza artesanal obtenida con la levadura autóctona comparada con la comercial y realizar una aceptación sensorial por medio de una encuesta en cual por escala de Likert se evaluará apariencia, aroma, sabor e impresión final de la cerveza artesanal estilo NEIPA

La caracterización de la cerveza artesanal, tanto el plan piloto como en la cerveza estilo NEIPA se evaluó estos aspectos:

El porcentaje de Alcohol (%), cantidad de IBUS, densidad inicial (OG), densidad final (FG) y pH.

✓ **Plan Piloto, cerveza Amber Ale**

Tabla 20. Resultados de los grados de amargor, densidades inicial y final

Amber Ale	IBUS	OG	FG
Levadura Autóctona	15	1065	1010
Levadura safale 04	15	1065	1010

Los resultados de °Brix, pH y densidad tomados cada 12 horas desde la elaboración de la cerveza hasta 2 días antes del traspase.

Tabla 21. Resultados de los °Brix, pH y densidad

A	Levadura comercial		
B	Levadura Autóctona		
Muestras	°Brix	pH	Densidad
A1	7	4	1.028
B1	8	4	1.032
A2	6.3	4	1.025
B2	8.5	5	1.034
A3	8.7	5	1.035
B3	7.6	4.5	1.030

Se tomó en cuenta las propiedades de las levaduras que las caracterizan y son usadas en la elaboración de cerveza. La levadura autóctona, no presenta un sedimento compacto, esto se debe a que esta levadura aún está consumiendo azúcares y llegó a una saturación. Siendo necesario el traspase ya realizado.

Tabla 22. Resultados estadísticos de °Brix, pH y densidad

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	6	46.1	7.68	0.84
Columna 2	6	26.5	4.42	0.24
Columna 3	6	6.184	1.03	1.43x10-05

La columna 1 corresponde a °Brix.

La columna 2 corresponde a pH.

La columna 3 corresponde a la densidad.

**ANÁLISIS
DE
VARIANZA**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	132.79	2	66.39	184.54	2.74x10-11	3.68
Dentro de los grupos	5.40	15	0.36			
Total	138.18	17				

Tabla 23. Resultados estadísticos de °Brix y densidad

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	Variable 1	Variable 2
Media	7.68	4.42
Varianza	0.84	0.24
Observaciones	6	6
Varianza agrupada	0.54	
Diferencia hipotética de las medias	0.05	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	7.58	
P(T<=t) una cola	9.37x10-06	
Valor crítico de t (una cola)	1.81	
P(T<=t) dos colas	1.87x10-05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.22	

Los resultados demuestran que no hay diferencia significativa ($P \leq 0.05$). Lo cual demuestra que el uso de la levadura autóctona en la elaboración de la cerveza artesanal estilo Amber Ale cumple con las características esperadas dentro de los rangos especificados en el estilo, demostrando su alto potencial fermentativo.

Al tener estos resultados evidenciando el potencial fermentativo alto de nuestra levadura, se elaborará la cerveza estilo NEIPA, cuya característica principal es la turbidez que presenta debido a la concentración de lúpulo y también siendo responsable la levadura. Se vio turbidez de la levadura nativa en la elaboración de la cerveza tal cómo se visualiza en la figura 23.

La cerveza artesanal estilo NEIPA fue puesta a una aceptación sensorial mediante una encuesta realizada a 35 personas haciendo preguntas básicas de conocimiento sobre cerveza artesanal y la chicha de guñapo, esta aceptación sensorial se basó en 4 puntos importantes que son: Apariencia, sabor, aroma e impresión final, estos fueron subdivididos en diferentes intensidades utilizando una escala de Likert. (Anexo 3).

Los resultados a detalle de la encuesta y análisis se encuentran en el Anexo 3.

3.1.3. Configurar un flujograma de producción para la elaboración de cerveza NEIPA con la levadura obtenida biotecnológicamente.

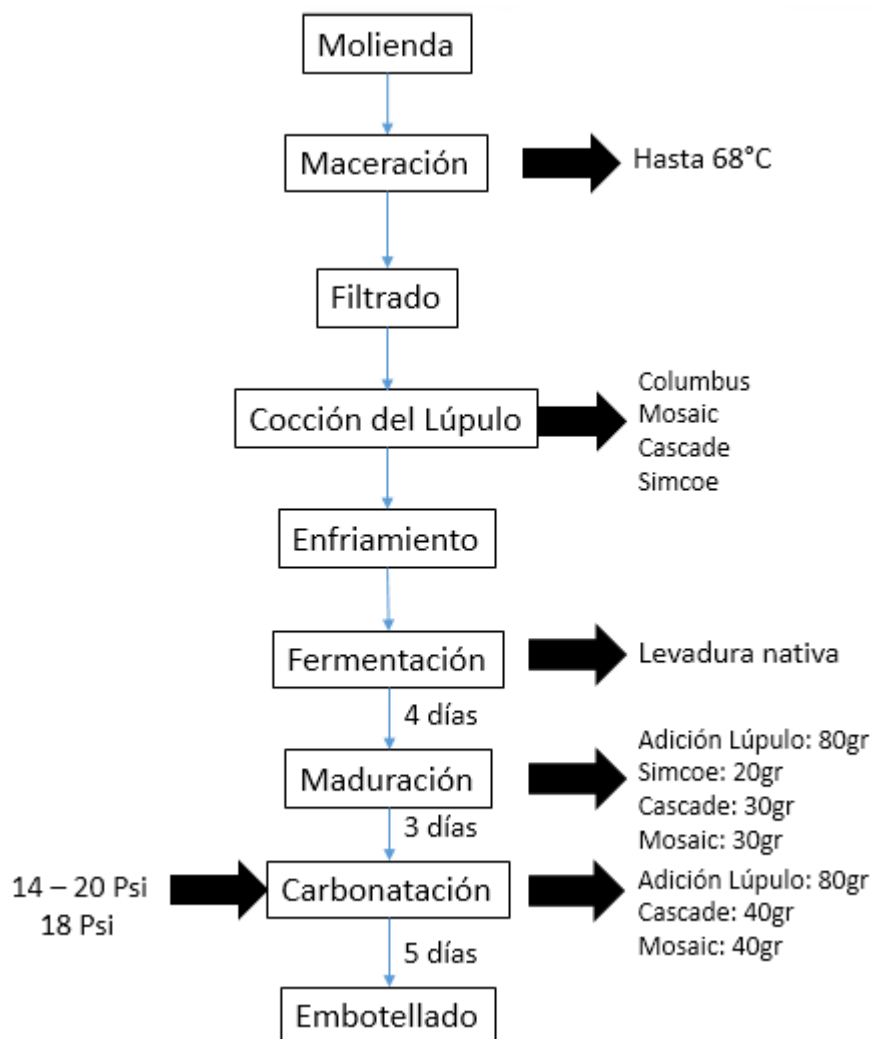


Figura 39. Flujograma de producción para la elaboración de la cerveza NEIPA

Este flujograma de producción es el resumen de toda la elaboración de la cerveza teniendo el plan piloto como premisa para la producción de cerveza artesanal, destacando puntos importantes en cada parte del proceso para llegar a las características del estilo NEIPA.

✓ **Cerveza Artesanal estilo NEIPA**

La cerveza elaborada basada en el estilo NEIPA tiene las siguientes características % Alcohol, cantidad de IBUS, densidad inicial, densidad final, pH.

Tabla 24. Resultados de las características de la cerveza estilo NEIPA

NEIPA	%Alcohol	IBUS	OG	FG	pH
Levadura autóctona	6.6	35	1060	1010	5.5

Las características de la cerveza están dentro de los rangos tanto de densidad inicial (OG), final (FG) y el porcentaje o grado de Alcohol del estilo New England IPA.

**Figura 40.** Cerveza estilo NEIPA elaborada con levadura autóctona.

Se puede observar la turbidez presente en esta cerveza lo cual es una característica específica y fundamental en el estilo NEIPA.

La cerveza artesanal estilo NEIPA tuvo la aprobación del 91% de las personas encuestadas, siendo la primera cerveza elaborada con levadura autóctona de la ciudad de Arequipa. A diferencia de otras investigaciones en la cual se utilizaba el Guiñapo como insumo primario sustituyendo en un porcentaje de 20% a la malta para la elaboración de la cerveza (39), este trabajo al tener resultados concretos del porcentaje de alcohol, densidades inicial y final los cuales son indicativos claves para saber la cantidad de azúcares disueltos que se transforman en alcohol. Por otro lado, el valor de pH es una expresión producto de la fermentación con la cual se ve un valor estable denotando el equilibrio entre la degradación de azúcares y la concentración de minerales (dureza) del agua, etc. Si bien se conoce que el valor de pH de una cerveza comercial es menor al de una cerveza artesanal debido a los aditivos en proceso de

producción de mosto y filtración (40); la levadura autóctona existente en la chicha de Guiñaño presenta la propiedad fermentativa óptima de calidad con un valor de pH aceptado dentro de los estándares comerciales que son en base a su estilo NEIPA (New England IPA).



CONCLUSIONES

Primero. Se aisló e identificó una cepa de levadura con alta capacidad fermentativa y a partir de ella se elaboró una cerveza que cumple con estándares característicos del estilo elaborado.

Segundo. Al caracterizar la levadura se evidenció una característica sensorial predominante en el plan piloto el cual fue proporcionar turbidez a la cerveza sin alterar los factores evaluados: porcentaje de Alcohol (%), cantidad de IBUS, densidad inicial (OG), densidad final (FG) y pH, siendo necesario elaborar un estilo (NEIPA) que resalte esa característica encontrada siendo teniendo una aceptación del 91% entre las personas encuestadas en el análisis sensorial, en el cual se evaluó apariencia, aroma y sabor.

Tercero. Se configuró un sistema de producción de la cerveza estilo NEIPA el cual fue producto de la comparación realizada en el plan piloto que fue una cerveza estilo Amber Ale, denotando así las diferencias en las características biotecnológicas entre la levadura comercial (safale 04) y la levadura autóctona aislada.

RECOMENDACIONES

1. Investigar sobre la carga microbiológica que contiene exactamente la chicha de guiñapo y buscar que beneficios puede presentar para la salud la microbiota.
2. Investigar a profundidad más sobre las propiedades de la chicha no fermentada y que aplicaciones en biotecnología se puede encontrar.
3. Realizar pruebas analíticas más exactas para evaluar en un universo más amplio tanto las características generales como un control de calidad a nivel comercial en una cerveza artesanal, elaborada con esta levadura aislada de la chicha de Guiñapo.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

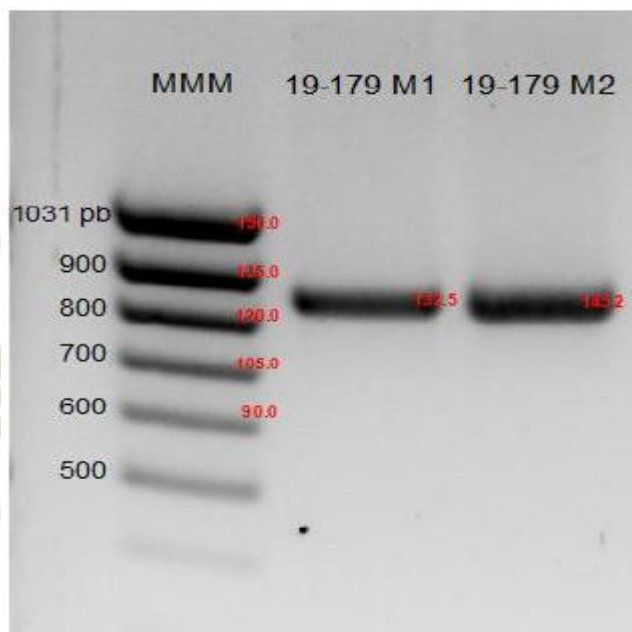
1. Internacional, I.I. Guía para la aplicación de análisis y riesgos y control de punto críticos (ARCP) en el sector cervecero; San José, Costa Rica; 1999.
2. Renneberg, R. Biotecnología para principiantes. Barcelona: Reverté;2008.
3. Hough,J.S..Biotecnología de la cerveza y de la malta. Zaragoza:ACRIBIA, S.AA;2001.
4. Hough,J.S.Biotecnología de la cerveza y de la malta. Zaragoza:ACRIBIA, S.A;2001.p.1-2.
5. Ward, Owen P.Biotecnología de la Fermentación: Principios, procesos y productos. Zaragoza:ACRIBIA, S.A;1989.p.2-3.
6. Ward, Owen P.Biotecnología de la Fermentación: Principios, procesos y productos. Zaragoza:ACRIBIA, S.A;1989
7. Hough,J.S..Biotecnología de la cerveza y de la malta. Zaragoza:ACRIBIA, S.A;2001.p.2-3.
8. Hough,J.S..Biotecnología de la cerveza y de la malta. Zaragoza:ACRIBIA, S.A;1990.p.49-52.
9. Renneberg, R. Biotecnología para principiantes. Barcelona: Reverté;2008.p.2-5.
10. Ward, Owen P.Biotecnología de la Fermentación: Principios, procesos y productos. Zaragoza:ACRIBIA, S.A;1989
11. Renneberg, R. Biotecnología para principiantes. Barcelona: Reverté;2008.
12. Ward, Owen P.Biotecnología de la Fermentación: Principios, procesos y productos. Zaragoza:ACRIBIA, S.A;1989.p.134-135.
13. Orberá Ratón,T.Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Iberoam Micol.2004;21:15-19.
14. Palacios,A.,Carrillo,D.,Iruzubieta,J.,Boutou,S.,Fleury,A.,Labadie,D.,Chatonn et,P.. Las Eficaces técnicas moleculares de identificación y cuantificación de las levaduras enológicas.Excell Ibérica.(12):2-8.
15. Tamay de Dios,L.Ibarra,C.Velasquillo,C.Fundamentos de la reacción de la cadena polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real.Investigacion en discapacidad.2013;2(2):70-78.

16. Es.khanacademy.org, [Internet]. Disponible en:
<https://es.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-molecular-genetics/hs-biotechnology/a/dna-sequencing>
17. Marcondes,L. Fervura e Tratamento do Mosto.CTS Alimentos y bebidas. [Internet]. Disponible en:
https://www.agraria.com.br/extranet_2016/uploads/AgromalteArquivo/04_fervura_e_tratamento_jornada_8h_1601583396918.pdf
18. Dciencia.es. [Internet], Disponible en: <https://www.dciencia.es/quimica-cerveza/>
19. Vogel,W..Elaboración casera de cerveza.5ªed. Zaragoza:ACRIBIA, S.A;1999.
20. Hough,J.S..Biotecnología de la cerveza y de la malta. Zaragoza:ACRIBIA, S.A;2001.
21. Hough,J.S..Biotecnología de la cerveza y de la malta. Zaragoza:ACRIBIA, S.A;2001.p.93-95.
22. Hough,J.S..Biotecnología de la cerveza y de la malta. Zaragoza:ACRIBIA, S.A;2001.p.44-45.
23. Vogel,W..Elaboración casera de cerveza.5ªed. Zaragoza:ACRIBIA, S.A;1999.p.21-22.
24. Ward, Owen P.Biotecnología de la Fermentación: Principios, procesos y productos. Zaragoza:ACRIBIA, S.A;1989.p.138-144.
25. Peel, A.Reinheitsgebot, la ley de pureza alemana y sus más de 500 años de historia.The beer times [Internet], Disponible en:
<https://www.thebeertimes.com/reinheitsgebot-la-ley-de-pureza-alemana-y-sus-500-anos-de-historia/>
26. Hough,J.S..Biotecnología de la cerveza y de la malta. Zaragoza:ACRIBIA, S.A;2001
27. El estilo American Amber Ale según el prestigioso BJCP.2014[Internet]. Disponible en: <https://cervezartesana.es/blog/post/el-estilo-american-amber-ale-segun-el-prestigioso-bjcp.html>
28. 21.B.Specialty IPA: New England IPA.2018 [Internet]. Available from:
<https://dev.bjcp.org/beer-styles/21b-specialty-ipa-new-england-ipa/>

29. Cervecearte.com[Internet]. Disponible en:
<https://www.pinterest.es/pin/707768897659915369/>
30. Vogel,W..Elaboración casera de cerveza.5ªed. Zaragoza:ACRIBIA, S.A;1999.p.34-35.
31. Alvarez Novoa,I..Picanterías y Chicherías del Perú: Patrimonio Cultural de la nación.Ed.Fondo: USMP;2017;(Pt.2).
32. Alvarez Novoa,I..Picanterías y Chicherías del Perú: Patrimonio Cultural de la nación.Ed.Fondo: USMP;2017;(Pt.2).p.62-64.
33. Alvarez Novoa,I..Picanterías y Chicherías del Perú: Patrimonio Cultural de la nación.Ed.Fondo: USMP;2017;(Pt.2).p.66-69.
34. La chicha es de guiñapo.[Internet]. Disponible en:
<https://cervezal.blogspot.com/2018/03/la-chicha-es-de-guinapo.html>
35. Los lonccos. Los lonccos Cocina Arequipeña.2020 [Internet]. Disponible en:
<https://lonccos.invadiondevs.com/conozca-la-historia-de-la-chicha-de-guinapo/>
36. Robles Castillo, H;Miranda Chávez, H; Lora Cahuas.Aislamiento de levaduras productoras de etanol a partir de chicha de jora del Mercado “Mayorista” de Trujillo(Perú).REBIOL.2012.32(2):48-55.
37. Carvajal Martinez, L;Insuasti Andrade, M. Elaboración de cerveza artesanal utilizando cebada (*Hordeum vulgare*) y yuca (Manihot Esculenta Crantz).UTN, 2010.p.124-125.
38. De Lama, M.Análisis de beneficios valorados en cervezas artesanales en Lima moderna. UPC, 2019. p.42.
39. Apaza, R., Atencio, Y. Tecnología para la Elaboración de una cerveza artesanal tipo Ale, con sustitución parcial de malta (*Hordeum Vulgare*) por Güinapo de maiz morado (*Zea Mays*).UNSA, 2017.p.138.
40. Cruz, D. Elaboración de una cerveza artesanal de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) estilo weizen. UNAM, 2019. p.52

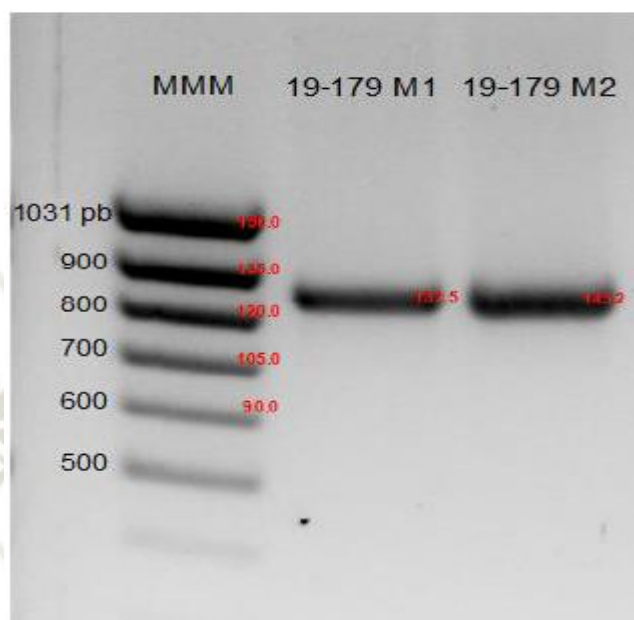
ANEXOS

ANEXO 1. AMPLICACIÓN DEL MARCADOR COI POR PCR DE PUNTO FINAL DE LA LEVADURA NATIVA.



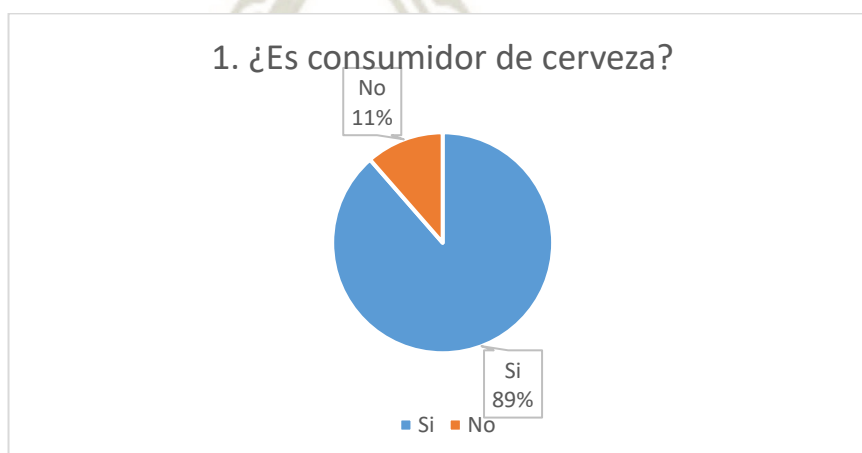
Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la amplificación de la región ITS en las muestras. La cantidad de ADN en nano gramos está indicada en letras rojas, y en letras negras, longitud de los fragmentos de ADN en pares de bases (pb).

ANEXO 2. AMPLICACIÓN DEL MARCADOR COI POR PCR DE PUNTO FINAL DE LA LEVADURA SAFALE 04.

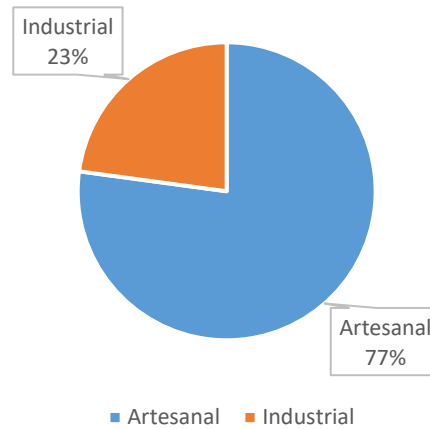


ANEXO 3. RESULTADOS DE LA ENCUESTA

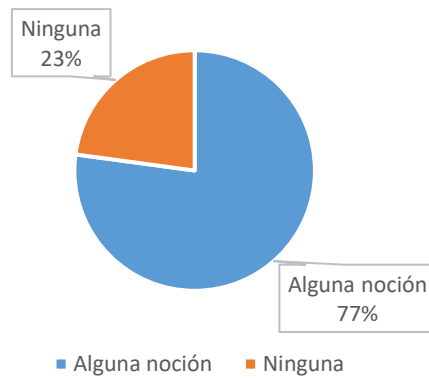
Resultados encuesta	Universo	35
Sexo	M 17	F 18
Edad	20 - 43	



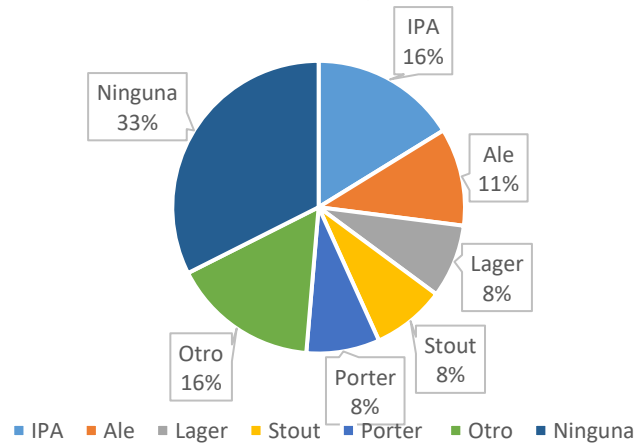
2. ¿Qué tipo de cerveza prefiere?



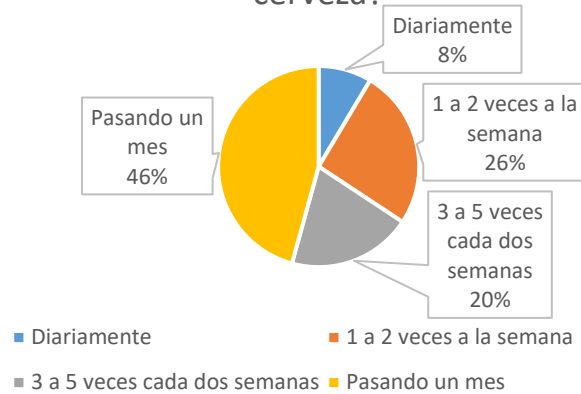
3. ¿Qué estilo de cerveza artesanal conoce?



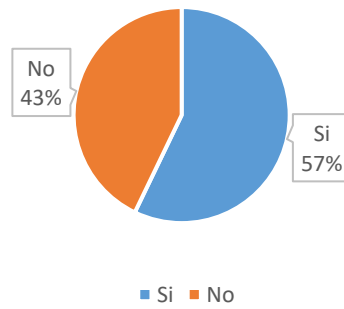
4. ¿Qué estilo le gusta más?



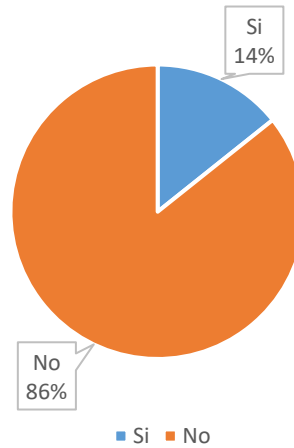
5. ¿Con que frecuencia consumes cerveza?



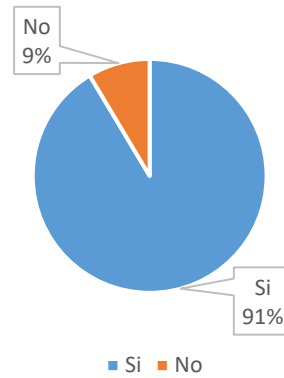
6. ¿Sabe del proceso de elaboración de cerveza artesanal?



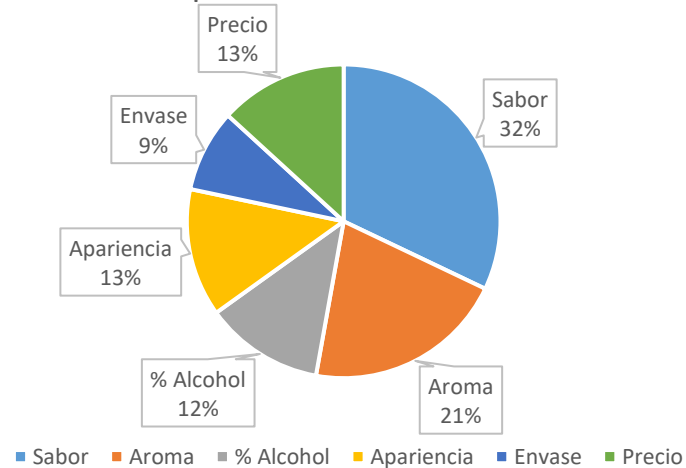
7. ¿Alguna vez elaboró cerveza artesanal?



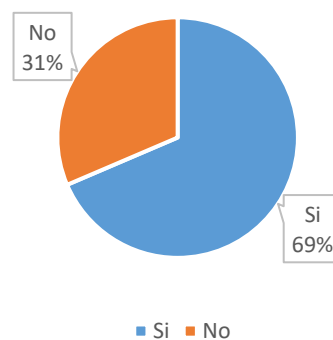
8. ¿Considera que la levadura es un factor determinante en la elaboración de la cerveza?



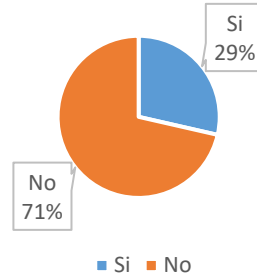
9. ¿Qué aspectos valora de una cerveza?



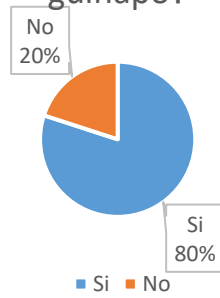
10. ¿Es consumidor de chicha de guiñapo?



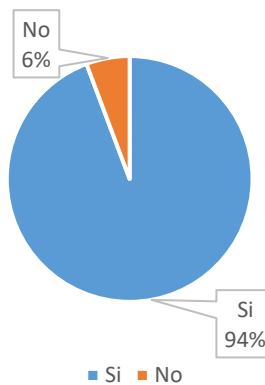
11. ¿Piensa que el proceso de elaboración de una cerveza artesanal es la misma que la chicha de guiñapo?

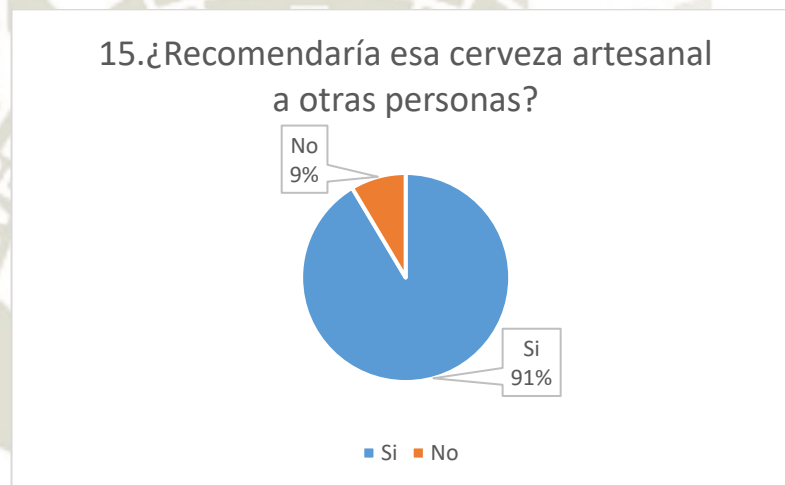
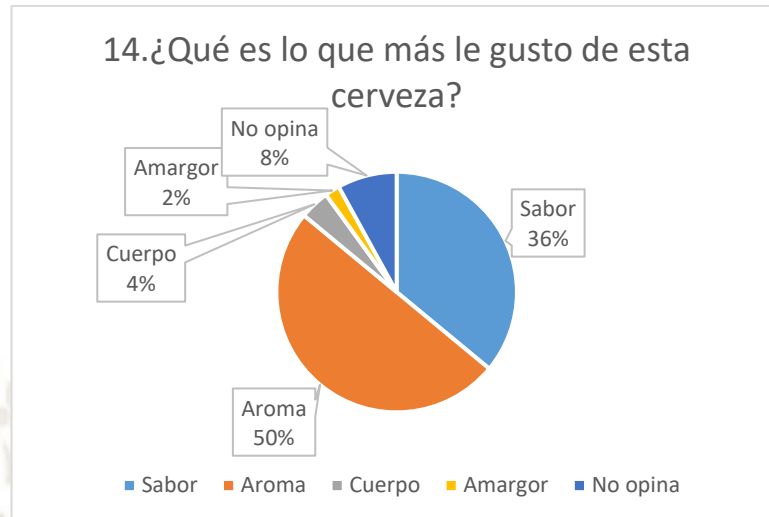


12. ¿Piensa que la cerveza degustada otorga una valoración a la chicha de guiñapo?



13. ¿Considera a esta cerveza un producto innovador?





PREGUNTAS DE ANÁLISIS SENSORIAL CON ESCALA LIKERT

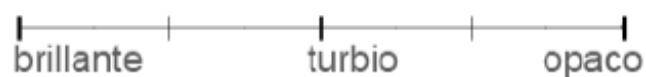
APARIENCIA

Color



A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
6	11	14		4						

Tonalidad



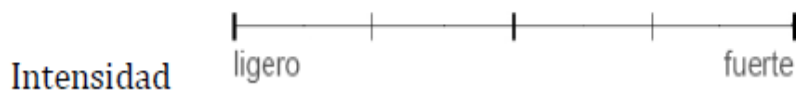
Brillante (1)	2	Turbio (3)	4	Opaco (5)
5	5	24	1	

Espuma



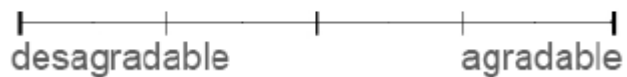
Pobre (1)	2	Correcta (3)	4	Persistente(5)
2	9	22	1	1

AROMA



Ligero (1)	2	3	4	Fuerte (5)
	5	11	16	3

IMPRESIÓN GENERAL DEL AROMA



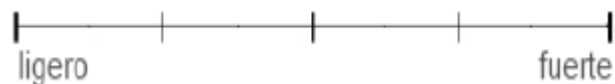
Desagradable (1)	2	3	4	Agradable (5)
	1	2	13	19

SABOR

DULCE AMARGO ÁCIDO OTRO/ESPECIAL

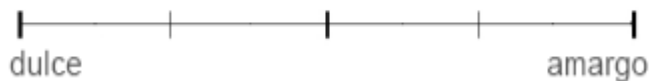
Dulce	Amargo	Ácido	Otro/especial
11	21	1	3

Intensidad



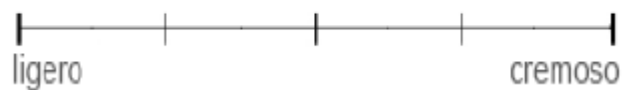
Ligero (1)	2	3	4	Fuerte (5)
	7	18	8	2

Balance



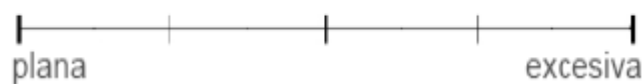
Dulce (1)	2	3	4	Amargo (5)
1	8	11	12	3

Cuerpo



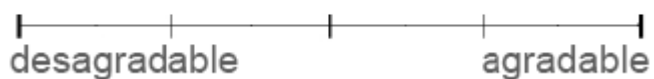
Ligero (1)	2	3	4	Cre moso (5)
1	5	15	13	1

Efervescencia



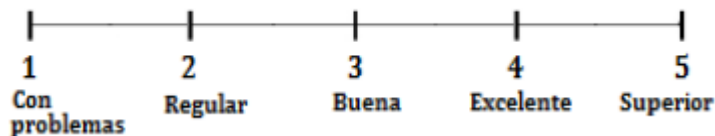
Plana (1)	2	3	4	Excesiva (5)
2	9	19	4	1

IMPRESIÓN GENERAL DEL GUSTO



Desagradable (1)	2	3	4	Agradable (5)
	2	7	9	17

IMPRESIÓN FINAL:



1	2	3	4	5
	3	14	14	4

En resumen se puede decir que la cerveza cuenta con la aprobación general del 91% de las personas encuestadas, las mismas que destacaron su gran sabor, equilibrio en intensidad y cuerpo; con lo cual concluimos que la cerveza estuvo a la expectativa de los catadores que sin duda recomendarían la cerveza al público en general

ANEXO 4: FÓRMULAS PARA CALCULAR %ALCOHOL, IBUS, GRAMOS DE LÚPULO.

TABLA DE RELACIÓN ENTRE DENSIDAD INICIAL Y TIEMPO DE HERVIDO

		Densidad inicial del mosto antes de hervir												
		1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
Tiempo de hervido	5m	6,0%	6,0%	6,0%	5,5%	5,5%	5,5%	5,0%	5,0%	4,5%	4,0%	3,5%	3,0%	2,0%
	10m	11,0%	11,0%	11,0%	11,0%	10,5%	10,5%	10,0%	10,0%	9,0%	8,5%	7,0%	6,0%	5,0%
	15m	15,0%	15,0%	15,0%	15,0%	14,5%	14,5%	14,0%	13,5%	13,0%	11,5%	11,0%	9,5%	8,0%
	30m	21,5%	21,5%	21,5%	21,0%	21,0%	20,5%	20,0%	19,5%	18,5%	17,0%	15,5%	14,0%	12,0%
	45m	26,5%	26,5%	26,5%	26,0%	26,0%	25,5%	24,5%	23,5%	22,0%	20,5%	18,5%	16,5%	15,0%
	1h	30,0%	30,0%	30,0%	29,5%	29,0%	28,5%	27,5%	26,5%	25,0%	23,0%	21,0%	19,0%	17,0%
	1,5h	35,0%	35,0%	35,0%	35,0%	34,0%	33,5%	32,5%	31,0%	29,5%	27,5%	25,0%	22,5%	20,0%
	2h	39,0%	39,0%	39,0%	38,5%	37,5%	37,0%	36,0%	34,0%	32,0%	30,0%	27,5%	25,0%	22,5%
	2,5h	42,0%	42,0%	41,5%	41,5%	41,0%	40,0%	39,0%	37,0%	35,0%	32,5%	29,5%	26,5%	24,0%
	3h	44,0%	44,0%	43,5%	43,0%	42,5%	41,5%	40,0%	38,5%	36,5%	34,0%	31,0%	28,0%	25,0%

FÓRMULA PARA CALCULAR GRAMOS DE LÚPULO

$$g \text{ de lúpulo} = \frac{L \text{ de mosto frío} \times IBU \text{ deseado} \times 10}{\% \text{ utilización} \times \% \text{ AA}}$$

FÓRMULA PARA CALCULAR CANTIDAD DE IBUS

$$IBU = \frac{g \text{ lúpulo} \times \% \text{ utilización} \times \% \text{ AA}}{L \text{ de mosto frío} \times 10}$$

FÓRMULA PARA CALCULAR EL %DE ALCOHOL (%A/V)

$$\%ALCOHOL = ((OG - FG) \times \frac{1.05}{FG}) \times \frac{100}{0.79}$$

ANEXO 5: INTERPRETACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

1. EMB

El medio EMB contiene Eosina y azul de metileno que son colorantes de anilina y van a inhibir el crecimiento de los microorganismos Gram positivos, permitiendo el crecimiento de todas las Entero bacterias.

Las colonias que fermentan la lactosa y/o sacarosa se observan de un color púrpura.

Las que no fermentan lactosa ni sacarosa se observan incoloras.

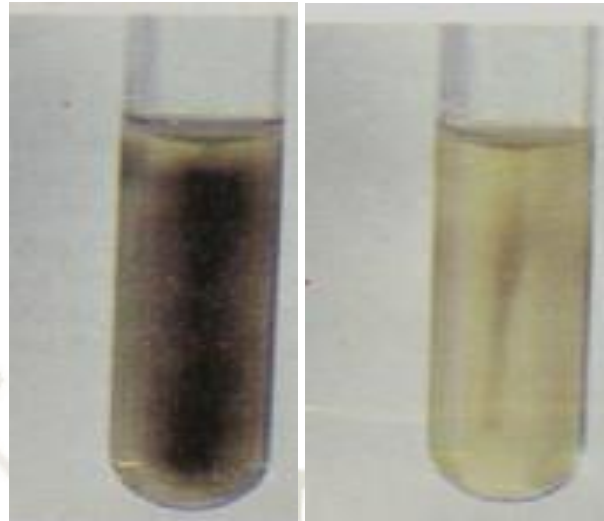
2. SIM

Tubo con medio para motilidad y producción de ácido sulfhídrico.

Los microorganismos móviles muestran desarrollo difuso hacia fuera de la línea de siembra.

Los microorganismos inmóviles crecen solamente a lo largo de la línea de siembra por punción exterior.

Se observa un color Negro debido a la producción de H₂S

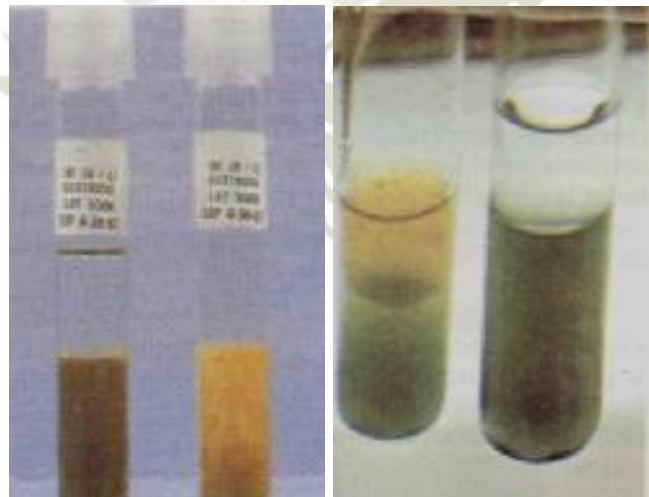


3. O-F

Utilización oxidativa de la glucosa.

Dos tubos con el medio O-F.

El tubo de la derecha se encuentra abierto a la atmósfera, mientras que el de la izquierda se encuentra cubierto con aceite mineral para evitar la exposición con el oxígeno atmosférico. Solo se ve ácido (amarillo) en la porción superior del tubo abierto, indicando que el microorganismo es capaz de oxidar la glucosa, pero no de fermentarla.



4. LIA

Estos medios no permiten visualizar colonias pero tienen muchas aplicaciones como, por ejemplo, pruebas bioquímicas que permiten: La determinación del Indol.

La reducción de nitratos a nitritos

La fermentación de la glucosa, lactosa u otro azúcar, etc.

Pueden servir para aumentar la concentración del microorganismo inoculado, es decir, realizar un inóculo, y otras aplicaciones.

Estos medios no contienen en ningún caso agar.

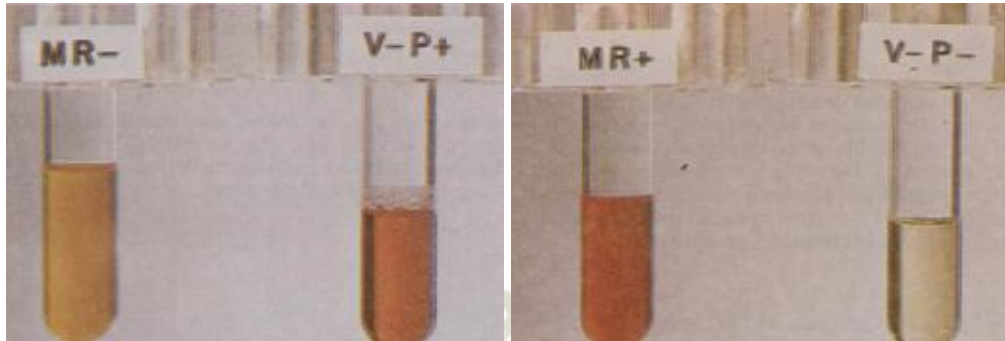


5. MRVP

Permite investigar que ruta metabólica ha utilizado el microorganismo para consumir la glucosa.

Si utiliza la vía de fermentación de los ácidos el pH resultante es menor de 4.4, y el microorganismo será Rojo de metilo (+) el cual se va a evidenciar por el agregado del indicador rojo de metilo y dará un color rojo (+) y amarillo anaranjado (-).

Los microorganismos que utilizan la vía de la acetoina serán Voges Proskauer (+) y se evidencian por un color rojo al cabo de los 10 minutos después de agregar el KOH y el alfa-naftol.

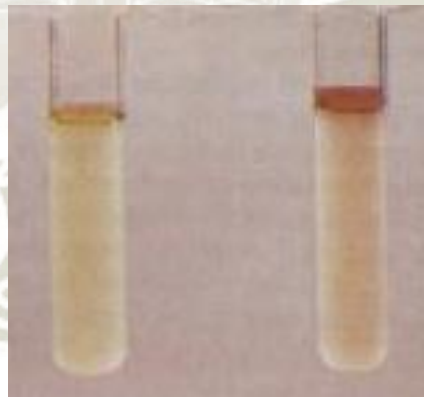


6. INDOL

La formación de indol a partir del triptofano se indica por un color rojo después del agregado del reactivo de Kovac.

El tubo de la izquierda es negativo.

El tubo de la derecha demuestra un halo de color rojo lo que indica la presencia de Indol.



7. CAMPANA DE DURHAM

Tres tubos con caldo y con tubos de Durham.

El tubo de la izquierda muestra formación de ácido a partir de glucosa (amarillo) y formación de gas. El tubo del centro muestra formación de ácido a partir de glucosa (amarillo).

El tubo de la derecha es negativo (rojo).



8. UREA

El tubo de la derecha demuestra un color rojo, lo que indica una reacción positiva.

El tubo de la izquierda no presenta viraje de color.



9. CITRATO DE SIMMONS

El tubo de arriba demuestra un color verde y ausencia de crecimiento.

El tubo de abajo muestra un color azul, lo que indica una reacción positiva.

