



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusión de quinua

José Daniel Nítola Mery

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias, Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos
Bogotá, Colombia
2022

Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusión de quinua

José Daniel Nítola Mery

Trabajo final presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Director:

Doctor, Ingeniero Químico Juan Pablo Ortiz Rosas

Codirector:

Doctor, Ingeniero Químico Carlos Alberto Fuenmayor Bobadilla

Línea de Investigación:

Diseño y desarrollo de productos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Ciudad, Colombia

2022

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Nombre: José Daniel Nítola Mery

Fecha 11/01/2022

Agradecimientos

Quisiera agradecer el apoyo recibido en la realización de este trabajo por parte de mi director de trabajo final Juan Pablo Rosas Ortiz, por su acompañamiento, sus consejos, paciencia y enseñanzas; a mi codirector Carlos Alberto Fuenmayor Bobadilla por su asesoría y disposición en la elaboración de este trabajo; al profesor Jose Castellanos de la Universidad de Boyacá por su apoyo en los ensayos microbiológicos de la cerveza. También quisiera agradecer al personal del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos-ICTA, especialmente a la profesional especializada Carol Edith Cortes Castillo por su apoyo en la determinación del perfil de azúcares.

Igualmente agradezco a mis padres y familiares por su apoyo incondicional y comprensión en la realización de este trabajo y lo que representará para mi futuro.

Resumen

Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusión de quinua

Con la realización de este trabajo se buscó desarrollar una cerveza artesanal tipo *Ale* con bajo contenido alcohólico empleando un proceso a una escala de 25 L, para lo cual se evaluó el uso de una cepa de levadura no convencional de la especie *Saccharomyces ludwigii*, así como la inclusión de quinua sin maltear en un sustrato basado en malta. Se analizaron varios parámetros del proceso como lo son el pH, la gravedad específica, °Brix, contenido de etanol, entre otros. Además, se aplicaron pruebas afectivas para determinar cuál de las combinaciones levadura-sustrato generan el producto con un menor contenido en etanol y con una adecuada aceptación sensorial. La combinación *S. ludwigii*-sustitución parcial de 30% de malta de cebada por quinua, permitió obtener el producto con menor contenido de etanol con un valor de $3.09 \pm 0.15\%$ v/v. Sin embargo, el producto con mejor aceptación sensorial y bajo contenido en etanol fue el obtenido con la combinación *Saccharomyces cerevisiae*- sustitución parcial de 30% de malta de cebada por quinua con una puntuación de que 5.3 sobre 7, cerveza con un contenido de $3.55 \pm 0.50\%$ v/v. Aunque no se alcanzó un contenido menor al 3% sugerido por los estándares internacionales, los resultados son promisorios y permiten sugerir que el proceso que conduce a un producto de estas características, aceptable sensorialmente, se puede lograr mediante el empleo de mayores sustituciones de quinua en el sustrato, manteniendo el uso de la levadura tradicional de la especie *S. cerevisiae*.

Palabras clave: *Saccharomyces ludwigii*, fermentación, cerveza artesanal, bajo contenido de alcohol, quinua.

Abstract

Evaluation of a biological process for obtaining a low-alcohol beer including quinoa

The purpose of this work was to develop a low-alcohol Ale beer by using an artisanal process on a 25 L scale, it was evaluated the use of a non-conventional yeast strain of the *Saccharomycodes ludwigii* species, as well as the inclusion of unmalted quinoa in a malt-based substrate. Several process parameters were analyzed such as pH, specific gravity, °Brix, ethanol content, among others, in addition, affective tests were performed to determine which of the yeast-substrate combinations generated the product with the lowest ethanol content and adequate sensory acceptance. The combination *S. ludwigii*-partial substitution of 30% barley malt for quinoa, allowed to obtain the product with the lowest ethanol content with a value of $3.09\pm 0.15\%$ v/v. However, the product with the best sensory acceptance and low ethanol content was the one obtained with the combination *Saccharomyces cerevisiae*- partial substitution of 30% barley malt for quinoa with a score of 5.3 out of 7, beer with a content of $3.55\pm 0.50\%$ v/v. These results show that, although a content lower than the 3% suggested by international standards was not reached, they are promising since they allow suggesting that the process leading to a product of these characteristics and acceptable can be achieved through the use of greater substitutions of quinoa in the substrate, maintaining the use of the traditional yeast of the species *S. cerevisiae*.

Keywords: *Saccharomycodes ludwigii*, Fermentation, craft beer, low alcohol content, quinoa.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XIV
Introducción	1
1. Marco conceptual y revisión del estado del arte	8
1.1 Materias primas usadas en la elaboración de cerveza.....	9
1.1.1 Sustratos	10
1.1.2 Sustratos alternativos-quinua.....	11
1.1.3 Levadura	13
1.1.4 Lúpulo	14
1.2 Proceso de elaboración de cerveza	15
1.2.1 Malteado	16
1.2.2 Molienda.....	17
1.2.3 Maceración.....	17
1.2.4 Separación del mosto	19
1.2.5 Cocción del mosto.....	20
1.2.6 Enfriamiento	20
1.2.7 Fermentación	21
1.2.8 Carbonatación.....	21
1.2.9 Filtración o pasteurización	22
1.2.10 Maduración	23
1.3 Procesos para la elaboración de cerveza con bajo contenido de alcohol	24
1.3.1 Procesos físicos para la obtención de cervezas con bajo contenido de alcohol	25
1.3.2 Procesos biológicos para la obtención de cervezas con bajo contenido de alcohol.....	27
1.3.3 Levaduras para la elaboración de cervezas con bajo contenido de alcohol ...	28
1.3.4 <i>Comportamiento en la fermentación de Saccharomyces ludwigii</i>	29
1.4 Consideraciones sobre cervezas de bajo contenido de alcohol en otros países	32
1.5 Metabolitos asociados a la consecución de características sensoriales	33
2. Evaluación del uso de la levadura <i>S. ludwigii</i> y de la inclusión de quinua en el sustrato en la elaboración de cerveza tipo Ale.....	35
2.1 Metodología	35
2.1.1 Materiales e insumos	36

Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusión de quinua

2.1.2	Elaboración del mosto	36
2.1.3	Cocción del mosto, adición de lúpulo y enfriamiento	37
2.1.4	Fermentación	37
2.1.5	Carbonatación, envasado y maduración	38
2.1.6	Caracterización fisicoquímica de la cerveza	38
2.1.7	Perfil de azúcares durante la fermentación de las cervezas	39
2.1.8	Determinación del contenido de etanol en las cervezas	39
2.1.9	Análisis microbiológico de las cervezas	39
2.1.10	Análisis estadístico de datos	40
2.2	Resultados y discusión	40
2.2.1	Características de los mostos	41
2.2.2	pH durante la fermentación	45
2.2.3	Gravedad específica durante la fermentación	46
2.2.4	Sólidos solubles durante la fermentación	48
2.2.5	Propiedades fisicoquímicas de las cervezas después de la maduración	49
2.2.6	Contenido de etanol en la cerveza	50
2.2.7	Análisis microbiológico de las cervezas	52
2.2.8	Perfil de azúcares en las cervezas elaboradas	53
3.	Análisis sensorial	56
3.1	Metodología	59
3.1.1	Toma de datos	59
3.1.2	Análisis estadístico de datos	60
3.2	Resultados y discusión	60
3.2.1	Prueba de ordenamiento por preferencia	64
4.	Conclusiones y recomendaciones	67
4.1	Conclusiones	67
4.2	Recomendaciones	68
	A. Anexo: Curvas de calibración para el perfil de azúcares durante la fermentación	70
	B. Anexo: Formatos para las pruebas sensoriales	75
	C. Anexo: Estadísticos de prueba para los diferentes parámetros	79
	Bibliografía	92

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Esquema general de la elaboración de cerveza.....	16
Figura 2. Evolución del almidón de cebada durante el proceso cervecero.....	19
Figura 3. Procesos para la elaboración de cervezas con bajo contenido de alcohol	25
Figura 4. Imagen propia obtenida mediante microscopía óptica a 40x para la cepa WLP 618 de la especie <i>S. ludwigii</i>	30
Figura 5. Resultados de la evaluación de la aceptabilidad general.	63
Figura 6. Ordenamiento por preferencia.	65

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Composición del mosto de fermentación.....	11
Tabla 2. Azúcares presentes en la quinua.....	12
Tabla 3. Composición química del lúpulo	15
Tabla 4. Asimilación de azúcares por <i>S. ludwigii</i> , (+) significa asimilación y (-) no asimilación	31
Tabla 5. Consideraciones para cervezas libres o con bajo contenido en alcohol por diferentes países de la UE.	32
Tabla 6. Diseño experimental.	36
Tabla 7. Características fisicoquímicas de los mostos (100% cebada malteada y 70% cebada maltada +30% quinua).	41
Tabla 8. Características fisicoquímicas de cervezas elaboradas empleando dos tipos de mosto (100% cebada malteada y 70% cebada maltada +30% quinua) y dos especies de levadura (<i>S. ludwigii</i> y <i>S. cerevisiae</i>) durante la fermentación.	44
Tabla 9. Características fisicoquímicas de cervezas elaboradas empleando dos tipos de mosto (100% cebada malteada y 70% cebada maltada +30% quinua) y dos especies de levadura (<i>S. ludwigii</i> y <i>S. cerevisiae</i>) después de la maduración.	48
Tabla 10. Análisis microbiológico de las cervezas artesanales y sus duplicados.....	52
Tabla 11. Concentración de azúcares y contenido de etanol en las 4 formulaciones para el día 1 y 10 de fermentación.....	54
Tabla 12. Resultados prueba de aceptación general para cervezas artesanales tipo <i>A/le</i> obtenidas con distintas combinaciones levadura-sustrato.....	60
Tabla 13. Resultados del test de <i>Mann-Whitney</i> para la comparación de la aceptación de los productos obtenidos a partir de las diferentes combinaciones.	62
Tabla 14. Resultados de ordenamiento por preferencia para las 4 formulaciones.....	64
Tabla 15. Valor modular y significancia de las combinaciones de cerveza.	65

Introducción

La cerveza, tercera bebida más consumida en el mundo, después del té y el café, es culturalmente importante ya que es empleada como acompañante de comidas y es una de las bebidas más utilizadas en reuniones sociales; se ha postulado que fue originada en las primeras civilizaciones desarrolladas en Mesopotamia y el Antiguo Egipto (Sannino et al., 2019), razón por la cual es una bebida que ha mantenido una tradición propia de las regiones en su producción y consumo. Cuenta con un mercado importante y tiene procesos industrializados a gran escala que garantizan su oferta y distribución (Cabras & Higgins, 2016).

El sector cervecero comercial comprende la producción a gran escala, la cual está representada a nivel mundial por grandes corporaciones o conglomerados de cerveceros, siendo los más relevantes *ABInBev*, *SABMiller* y *Heineken*. Estos se caracterizan porque son grandes compañías que abarcan más del 90% del mercado. Por su parte, la cervecería artesanal ha tomado el liderazgo en la diversificación de la variedad y el “entrenamiento” de los consumidores al mejorar su conocimiento sobre el mundo de la cerveza, despertando interés en el consumidor respecto a los fundamentos de dicha diversidad de productos (Toro-González, 2017).

El sector de la cervecería artesanal en América Latina tiene un mercado en crecimiento. En particular, para el periodo comprendido entre 2008 y 2013 hubo un crecimiento de un 2.8% en esta región, de la cual Colombia es el cuarto más grande productor, siendo el doble respecto al resto del mercado mundial, que creció un 1.4% en ese mismo periodo (Toro-González, 2017). Este crecimiento puede deberse a un incremento en la demanda y oferta de los productos, por ejemplo, el aumento en la demanda debido a la resistencia del consumidor y el cambio de este en sus preferencias y de la existencia y consolidación de asociaciones de cervecerías artesanales, acceso a la información y nuevas formas de financiamiento (Garavaglia & Swinnen, 2017).

Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusión de quinua

Por otro lado, las cervezas producidas a nivel industrial tienen un costo comercial más bajo que las cervezas artesanales, ya que éstas últimas son elaboradas a partir de sustratos y levaduras menos convencionales y, además, son elaboradas en instalaciones con menor capacidad de producción. Por ejemplo, las cervezas rubias de carácter comercial tienen poca graduación y cuerpo moderado, con bajo costo y facilidad de producción. Una de las razones por las cuales existe una poca diversidad en las cervezas rubias es que el mercadeo extensivo de unas pocas marcas de cerveza ha habituado a los consumidores a un mismo sabor, asociado a la mitigación de la sed y a la generación de un efecto eufórico característico (González, 2017).

Sin embargo, la cerveza, independientemente de si es producida de manera artesanal o industrial, es una bebida alcohólica y por lo tanto su consumo excesivo puede generar efectos negativos sobre la salud. Dichos efectos adversos pueden ser nutricionales, neurológicos, teratógenos y hepáticos; inclusive puede llevar a alteraciones del sistema nervioso central, endocrino, gastrointestinal, entre otros (Téllez Mosquera & Cote Menéndez, 2006).

Hasta el momento no existen criterios unificados a nivel mundial acerca del contenido de alcohol que debe tener una cerveza para que sea denominada como de bajo contenido en alcohol o incluso libre de alcohol (Montanari et al., 2008). A nivel nacional se ha establecido en la NTC 222 (ICONTEC, 1996b) que el contenido de etanol para una cerveza debe estar en un rango entre 2.5-12% v/v, pero no se especifica a partir de cuales valores se tiene una cerveza con bajo contenido en alcohol. Por su parte, en el Decreto 1686 de 2012 (Ministerio de Salud y Protección Social, 2012) se establecen los mismos rangos que en la NTC 222 y se denomina a una cerveza sin alcohol o no alcohólicas cuando el contenido de etanol se encuentra por debajo de 2.5 grados. Este tipo de bebidas tienen algunas ventajas en su comercialización, como una menor tasa de impuestos asociados a su venta y un incremento en el interés de las personas en relación a los posibles efectos en la salud de su consumo, en especial entre la cohorte demográfica conocida como *milenials* (Bellut et al., 2018; Bellut & Arendt, 2019).

A nivel mundial el mercado ha experimentado un incremento en la demanda de cervezas bajas en alcohol de aproximadamente un 20% desde el 2011 al 2016, y se pronosticó un crecimiento de otro 24% hasta 2021 (Bellut & Arendt, 2019). Teniendo en cuenta la situación del mercado a nivel nacional e internacional, existe entonces una serie de beneficios para innovar en este sector.

Por otro lado, se observa un auge en el uso de ingredientes y sustratos alternativos a los usualmente empleados en la industria cervecera, especialmente de productos con identidad de origen. Al considerar la inclusión de la quinua como sustrato para la producción de cerveza se busca establecer un sentido de identidad en el producto considerando que este pseudocereal es originario de los Andes. Además, se ha planteado que el uso de la quinua en bebidas de amplio consumo tendría como beneficio la posibilidad de fortalecer su cadena productiva al ampliar el número de productos de los que puede ser aprovechada esta materia prima, estimulando los diferentes eslabones de la cadena de este producto agrícola (Lombana et al., 2018), lo cual es de interés particular para países productores de quinua como los son Colombia, Bolivia y Perú. De hecho, a nivel nacional desde hace algunas décadas se han propiciado acciones encaminadas a impulsar la producción y transformación de la quinua y a conformar su cadena productiva (Montoya et al., 2005).

Convencionalmente, los procesos de transformación empleados para la producción de cervezas con bajo contenido del alcohol pueden implicar operaciones unitarias de transferencia de calor como la destilación, operación que puede causar alteraciones en el color, sabor y aroma del producto. Otra opción de proceso físico involucra operaciones de separación por membranas, tecnología que se reconoce por sus elevados costos de implementación (Montanari et al., 2008). Por otra parte, con los métodos biológicos se busca restringir la formación de etanol mediante el desarrollo de fermentaciones a bajas temperaturas, la remoción de las levaduras para interrumpir el proceso fermentativo y la utilización de levaduras no convencionales incapaces de fermentar la maltosa y maltotriosa del mosto (Muller et al., 2020).

El proceso de elaboración de cervezas con menor contenido de alcohol que implica levaduras no convencionales puede ser más conveniente para el sector artesanal, considerando que su implementación no requiere de equipos u operaciones adicionales,

Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusión de quinua

como si lo demandan los otros procesos (Montanari et al., 2008). Es pertinente mencionar que las levaduras convencionales para la elaboración de cerveza artesanal tipo *Ale* son cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* caracterizadas por permitir la fermentación alta (15-25°C), mientras que las cepas de *Saccharomyces carlbergensis* son las más empleadas para la elaboración del tipo *Lager* (fermentación baja, 4-9°C) (González, 2017).

De esta manera el objetivo general del presente trabajo final fue evaluar un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol utilizando en la fermentación una cepa comercial de *Saccharomyces ludwigii* y realizando una sustitución parcial de la malta por quinua sin maltear. Los objetivos específicos fueron evaluar el efecto que tiene el uso de una cepa comercial de la levadura *S. ludwigii* y de la sustitución parcial de malta por quinua sin maltear sobre el contenido de alcohol obtenido en cervezas tipo *Ale*; y además comparar el nivel de aceptación de las cervezas obtenidas con la levadura *S. ludwigii* y con la inclusión de quinua con aquel de un producto elaborado con 100% de malta tradicional y una cepa de levadura comercial de *S. cerevisiae*.

La realización de este trabajo se llevó a cabo empleando un sistema de producción artesanal a una escala de 25 L, siguiendo las etapas convencionales en el proceso de elaboración que incluyeron la maceración de los sustratos, la cocción y adición de lúpulo, la fermentación del mosto, la carbonatación y maduración de la cerveza. Durante el proceso se realizaron mediciones de pH, gravedad específica, °Brix, contenido de etanol y perfil de azúcares, con el fin de verificar que este se desarrollara adecuadamente. Las cervezas elaboradas fueron evaluadas a través de pruebas afectivas de aceptación sensorial con el propósito de conocer la influencia del uso de quinua y/o una levadura no convencional en el proceso de elaboración. Este trabajo muestra un punto de partida para la producción de cervezas artesanales con bajo contenido en alcohol a nivel nacional.

Justificación

Cerca del periodo comprendido entre 2008-2013, el movimiento de la cervecería artesanal en Estados Unidos tuvo un gran impacto en los consumidores colombianos, debido probablemente a la influencia cultural y al alto flujo de visitantes extranjeros, lo que en últimas ha impulsado el establecimiento de negocios y ha contribuido a ampliar el conocimiento sobre la diversidad y variedad de las cervezas (Toro-González, 2017).

La cervecería artesanal crea espacios y condiciones para nuevos nichos de mercado, permite la sofisticación de los gustos de los consumidores, inclinándolos a probar productos cualitativamente diferentes. Además, en algunos países existen políticas que apoyan a los pequeños emprendedores, estimulando la diversificación de la oferta (Cabras & Higgins, 2016). Sin embargo, las grandes industrias cerveceras poseen los medios para generar cervezas de gran homogeneidad, lo cual exige de condiciones y controles más sensibles, en especial en la calidad de la materia prima y en los intervalos de variación de las temperaturas.

Debido a su naturaleza alcohólica, la cerveza es una bebida controlada, por ejemplo, con una cantidad de etanol entre 60-100 mg por cada dL de sangre, causa un aumento en la euforia, en la alteración del autocontrol y de la capacidad valorativa (Aragón et al., 2002). Estos efectos toman especial relevancia al considerar que la cerveza es una de las bebidas alcohólicas más consumidas a nivel mundial y en la mayoría de los territorios del mundo. Por este motivo, es pertinente establecer alternativas de este producto con bajos contenidos de alcohol, para las personas que se preocupan más por su salud pero que, en especial en ocasiones de celebración, desean consumir un producto que sea atractivo y que conserve los principales rasgos sensoriales de la cerveza.

Con la inclusión de quinua se pretende fortalecer su cadena productiva; un aspecto interesante es que los productos a base de quinua aún son relativamente nuevos para el resto del mundo, lo cual podría generar buenas expectativas respecto a su inclusión en productos de consumo tradicional como la cerveza, causando beneficios para el productor nacional al tener como ventaja su ubicación geográfica (Lombana et al., 2018).

Planteamiento del problema

El principal problema de la producción de cerveza artesanal radica en el dominio del mercado por parte de grandes conglomerados ya sea a nivel nacional o global (Toro-Gonzalez, 2017). Esta industria se ha enfocado en la producción masiva, por consecuencia las características sensoriales de sus cervezas no tienden a ser muy variadas. Por otro lado, se encuentra el inconveniente relacionado con las características organolépticas, ya que estos productos no gozan de una amplia aceptación por sus reducidas características sensoriales (González, 2017).

En algunos estudios se ha demostrado que las cervezas de bajo contenido en alcohol retienen el sabor a mosto (Montanari et al., 2008), de manera que se han implementado diferentes estrategias para que estas bebidas puedan ser percibidas como sabrosas (Gibson et al., 2017). De acuerdo con diversos estudios sobre las bebidas de bajo contenido en alcohol, es posible identificar que no todas se hacen a partir de los mismos sustratos y aditivos, de manera que es posible incrementar la aceptación de estos productos involucrando la evaluación de la inclusión de diferentes ingredientes para otorgar nuevas características sensoriales.

Las cervezas con bajo contenido en alcohol no tienen una amplia oferta en el mercado, debido a que son productos nuevos, en particular para Colombia en un periodo de 3 años solo se dio un incremento de 6% en la producción de estas bebidas, la cual es representada principalmente por la producción industrial y no por la artesanal (Bellut et al., 2018). Adicionalmente, sus costos de producción pueden ser más altos, debido a que se requieren operaciones unitarias adicionales respecto al proceso de producción convencional (Bellut et al., 2018). Esto cuando se realizan operaciones basadas en procesos físicos como los son las operaciones térmicas y de membranas.

A pesar de que se ha descrito que el uso de quinua como materia prima para la elaboración de cervezas podría otorgar al producto nuevos atributos sensoriales que no se encuentran presentes en las bebidas obtenidas con cereales tradicionales, lo cual está asociado a los componentes volátiles (Deželak et al., 2014), existen varios aspectos que podrían ser limitantes para la inclusión de quinua como materia prima en la elaboración de cerveza, entre los que se encuentran: la presencia de saponinas en el grano, las cuales pueden

generar amargor (Castañeda et al., 2018); la realización del malteado y su efecto en el color, turbiedad y acidez(Castañeda Terán, 2015); la relevancia de la introducción de enzimas exógenas para aprovechar los carbohidratos de la quinua cuando esta sustituye a la malta hasta en un 30% (Kordialik-Bogacka et al., 2018).

1. Marco conceptual y revisión del estado del arte

La cerveza es una bebida fermentada elaborada a partir de sustratos ricos en monosacáridos, especialmente en glucosa y otros azúcares presentes en muchos cereales; no es una bebida consumida por su aporte nutricional, sino que es empleada típicamente en celebraciones y festividades (González, 2017). Las primeras bebidas fermentadas basadas en cebada y trigo datan de 5000 AC en Mesopotamia y en el Antiguo Egipto (Sannino et al., 2019), incluso otros autores sugieren que las primeras evidencias de elaboración de este producto datan de 12000 AC en China (Cabras & Higgins, 2016). Esta práctica se ha mantenido hasta el día de hoy gracias a que existen preferencias culturales arraigadas y económicas, haciendo de este producto una de las bebidas alcohólicas más consumidas en el mundo, así mismo, existe una alta oferta de diferentes tipos de cerveza, en parte debido al desarrollo de diversas tecnologías, las cuales contribuyen a perpetuar la tradición del consumo de esta bebida.

La inclusión de lúpulo en el proceso de elaboración de cerveza data del siglo IX, ya que en el territorio que hoy corresponde a Alemania se encontró evidencia de su uso (Cabras & Higgins, 2016). Otro autor menciona que la ley Bávara de pureza de la cerveza de 1516 establece que una cerveza tradicional alemana está hecha únicamente de cebada, lúpulo y agua con adición de levadura (Zannini, 2013); el lúpulo brinda el sabor amargo y el olor característicos del producto, además contribuye a la preservación y contrarrestar la dulzura de la malta (Cabras & Higgins, 2016). La bebida actualmente conocida como cerveza incluye al menos los siguientes ingredientes: malta, lúpulo, agua y levadura; precisando que la inclusión de lúpulo dio el paso hacia la era moderna de la cerveza (Suárez, 2013).

Si bien esta bebida es producida principalmente a escala industrial y la gran mayoría de la cerveza consumida en el mundo es producida por unos pocos grupos empresariales, la

producción a pequeña escala y su distribución en microcervecías ha tenido un crecimiento importante de forma reciente. La cervecía artesanal surge con la intención de generar diferentes propiedades organolépticas y de crear bebidas a un gusto particular, cambiando el estilo que se tenía establecido por las grandes industrias (González, 2017). Su crecimiento puede atribuirse a una demanda cambiante respecto a las preferencias de los consumidores, así como a una mayor oferta en cuanto a la aparición y consolidación de asociaciones de cervecías artesanales, un mayor acceso a la información y nuevas formas de financiamiento para este tipo de emprendimientos (Garavaglia & Swinnen, 2017). Se podría decir que las diferencias entre las cervezas artesanales y las tradicionales radican en que las artesanales son elaboradas con un abanico más amplio de ingredientes, métodos y con una producción a una escala mucho menor. Cabe destacar que la elaboración de cervezas artesanales no solo implica el conocimiento del producto o de la fermentación, sino también requiere de un alto aporte del conocimiento empírico e innovación.

Recientemente se ha incrementado la creación de nuevos negocios de cervecía artesanal, entre los países que han tenido un mayor surgimiento de empresas de este tipo se encuentran EEUU, pasando de 92 empresas en 1981 a 2751 empresas en 2012; y Reino Unido aumentando de 142 empresas en 1981 a 1113 empresas en 2012 (Cabras & Higgins, 2016). De acuerdo con González (2017), los establecimientos de cervecías artesanales pueden ser de varios tipos: cervecía casera, cervecía *Pub* y cervecía artesanal o microcervecía, los cuales a su vez originan una gran variedad y estilos de cerveza. Sin embargo, a grandes rasgos se pueden distinguir dos tipos: *Ale* que es típica de fermentaciones altas 18-24°C (la fermentación ocurre en la superficie del biorreactor); y *Lager* típica de fermentaciones bajas 8-14°C (la fermentación ocurre en el fondo del biorreactor) (Sannino et al., 2019); y dentro de estos dos grupos existen una gran cantidad de subgrupos con características apreciables distintivas en su aspecto, espuma, aroma y sabor.

1.1 Materias primas usadas en la elaboración de cerveza

Para la elaboración de cerveza típicamente se utiliza un cereal (o mezclas), levadura, lúpulo y agua, componentes que tienen diferentes roles en el proceso de producción. Los cereales se caracterizan porque contienen almidón, el cual puede ser convertido en

azúcares fermentables como glucosa y maltosa, razón por la cual se le denomina convencionalmente como sustrato. La levadura realiza la transformación de los azúcares en etanol mediante la acción de su metabolismo; el lúpulo aporta el amargor característico del producto; mientras el agua aporta un medio necesario para la liberación de azúcares del cereal y para la reproducción la levadura, en las siguientes secciones se presentará una mayor descripción de las materias primas.

1.1.1 Sustratos

Los cereales son el producto agrícola de mayor importancia, dado que su producción representa el 60% del total de alimentos (Hammes et al., 2005); son el principal sustrato empleado para la elaboración de cerveza, destacándose la cebada malteada y el trigo, aunque en algunos casos también se ha utilizado arroz y quinua (pseudocereal) (Bellut et al., 2019; Castañeda Terán, 2015; Kordialik-Bogacka et al., 2018). En un principio el uso de un cereal u otro obedecía a razones culturales y geográficas, e incluso de su costo de producción. El principal componente de los cereales es el almidón el cual es un polisacárido cuya estructura química tiene numerosas unidades de glucosa unidas entre sí. Mediante la etapa de malteado el grano de cebada pasa a llamarse malta, etapa en la cual se desarrolla la actividad enzimática que permite la posterior hidrólisis del almidón contenido en el grano. Durante la maceración a partir de la malta se obtiene un mosto rico en azúcares fermentables. La mayoría de los mostos tienen un contenido del 12% de glucosa, 0.8-2.8% de fructosa, 5% de sacarosa, 65% de maltosa y 17.5% de maltotriosa (Bellut et al., 2018).

Bellut et al., (2018) reporta la composición de un mosto obtenido a partir de malta *Pilsner*, la cual es una de las más usadas para la elaboración de cervezas tipo *Ale*. Esta información es presentada en la tabla 1, donde se puede observar que los azúcares con mayor contenido son maltosa, glucosa y maltotriosa.

Tabla 1. Composición del mosto de fermentación

Composición del mosto	Unidad	Valor
Extracto seco	°P	6.63±0.01
pH	-	5.73±0.01
Maltosa	g/L	26.60±0.25
Maltotriosa	g/L	5.09±0.04
Glucosa	g/L	5.46±0.01
Sacarosa	g/L	1.70±0.04
Fructosa	g/L	1.29±0.02
Aminoácidos totales	mg/100mL	98.31±0.86
Nitrógeno libre	mg/L	110±5

1.1.2 Sustratos alternativos-quinua

La quinua (*Chenopodium quinoa* wild) es un pseudocereal que se destaca por contener todos los aminoácidos esenciales, también por presentar un contenido relativamente alto de proteínas en comparación con otros cereales como la cebada y el trigo, además se considera que este alimento es de bajo índice glicémico al contener un menor contenido de carbohidratos, por lo tanto, su consumo favorece al control metabólico (Forero et al., 2007). Específicamente el contenido de almidón de la quinua está en un rango de 58.1%-64.2% de la materia seca y de 60-74% de carbohidratos en materia seca, dentro de estos carbohidratos se pueden encontrar cerca de 4 azúcares simples como se puede observar en la tabla 2, donde la xilosa y la maltosa son las de mayor contenido, sin embargo, la xilosa no es metabolizada por las levaduras.

El contenido de almidón y carbohidratos presentes en la quinua al ser expresados en forma de NFE (extracto libre de nitrógeno) es de 52-61%, mientras otros cereales típicamente usados para la elaboración de cerveza tienen valores superiores, por ejemplo, el trigo tiene un NFE de 75.2%-82.9% y un contenido de 71% de almidón en el grano sin maltear y 59.6% en el grano malteado; en la cebada el NFE es de 72.8%-82.8% y el contenido de almidón está entre 60%-68% para el grano sin maltear y entre 58%-60% para el grano

Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusión de quinua

malteado (Castañeda et al., 2018; Galwey et al., 1989; Serna-Saldivar, 2016; Thoufeek Ahamed et al., 1998; Zannini, 2013).

Tabla 2. Azúcares presentes en la quinua

Componente	Contenido (mg/100 g)
Glucosa	19.0
Fructosa	19.6
Maltosa	101.0
D-xilosa	120.0

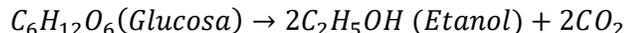
Para la elaboración de una cerveza con quinua, se tiene que considerar la elección de la variedad de quinua ya que existen variedades que presentan altas cantidades de saponinas, clasificándose estas variedades en dulces cuando contienen menos del 0.11% de saponinas o en amargas si contienen más del 0.11%. Esto implica que en algunos procesos de elaboración se involucre una etapa previa de desaponificación del grano (Castañeda et al., 2018).

A diferencia de los demás cereales, el grano de quinua se ha utilizado sin maltear y malteado, sin diferencias notables en los atributos sensoriales de la cerveza, en particular cuando se usa sustituyendo parcialmente la malta por quinua. Por ejemplo, Castañeda et al., (2018) encontraron que una cerveza elaborada con la sustitución del 50% de la malta de cebada tradicional por 50% de quinua malteada generó un producto con un buen nivel de aceptación en todos los parámetros evaluados (transparencia, color, cuerpo, aroma, sabor), aunque, los niveles de aceptación no eran muy diferentes al utilizar quinua sin maltear. En esa investigación también se encontró que al utilizar una quinua sin maltear se obtenía un producto con menor contenido de alcohol, es decir presentó una menor atenuación (entendida como una menor conversión de azúcares a alcohol). Por otro lado, Kordialik et al. (2018), encontró que con una sustitución del 30% de malta tradicional por

quinua sin maltear, se obtenía un producto con mejores atributos sensoriales que el producto de referencia.

1.1.3 Levadura

Las levaduras son microorganismos unicelulares (hongos) pertenecientes principalmente al grupo de los ascomicetos (González, 2017), han sido usadas como modelo para el análisis del genoma de las eucariotas (Pretorius et al., 2003) y están en camino de ser la primera eucariota en tener su genoma recreado sintéticamente (Gibson et al., 2017). Son capaces de metabolizar monosacáridos como la glucosa (presente en forma de almidón en los cereales), transformándolos en etanol mediante fermentación. Este proceso metabólico utiliza las enzimas de la vía glicolítica para la obtención de piruvato, y subsecuentemente este intermediario se descarboxila con la acción de la enzima piruvato descarboxilasa y se reduce con la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (Durango Londoño, 2007). El metabolismo fermentativo lo realizan las levaduras en un medio anaerobio cuando el fin es la obtención de etanol, en la siguiente ecuación se representa este proceso (Bamforth, 2016; González, 2017; Mosher & Trantham, 2017).



La especie de levadura más usada en la elaboración de cervezas tipo *Ale* es *Saccharomyces cerevisiae*, es el microorganismo comercial más importante y es considerado seguro (*GRAS, Generally Regarded As Safe*), mientras que en la elaboración de cervezas tipo *Lager* se emplea la especie *Saccharomyces carlsbergensis* (también descrita como *S. pastorianus*) (Pretorius et al., 2003). Estas especies de levaduras se utilizan porque poseen características importantes como lo son una eficiente producción de etanol y una alta tolerancia a este metabolito (Sannino et al., 2019).

Estos microorganismos tienen características que varían con la especie y con la cepa, sus propiedades pueden ser inhibidas o potencializadas por condiciones como la temperatura, el nivel de pH, la cantidad y tipo de sustrato, la cantidad de oxígeno disponible, la cantidad de alcohol producido y la actividad de agua en el sustrato, es decir, las levaduras son sensibles a cualquier cambio en el mosto, lo cual puede incidir en el desempeño de la fermentación (Mareček et al., 2002). En particular se recomienda que la actividad acuosa sea mayor a 0.8 para que la levadura este activa (Badui Dergal, 2006).

En el proceso de elaboración de cervezas tipo *Ale*, las levaduras son agregadas al mosto cuando este se encuentre a una temperatura entre 15-30°C, más comúnmente alrededor de 25°C para que las levaduras puedan crecer adecuadamente (González, 2017; Kunze, 2006; Matthew F, 2019). Las levaduras prefieren los azúcares más simples ya que están más disponibles para su asimilación, de manera que la maltosa y maltotriosa al ser unidades más complejas serán consumidas después de la glucosa. Típicamente una levadura puede producir una nueva célula hija cada 90-120 minutos en un medio adecuado (Bamforth, 2016), esta tasa de reproducción causa que las fermentaciones avancen más rápidamente durante los 3 primeros días (De Francesco et al., 2015)

1.1.4 Lúpulo

El lúpulo es un ingrediente usado para dar el sabor amargo y característico de la cerveza, particularmente es la inflorescencia de la planta enredadera *Humulus lupulus* la que se agrega en la etapa de cocción. La planta del lúpulo es perenne y es cultivada a nivel comercial para la industria cervecera, se considera que pudo haber provenido de China donde empezaron las migraciones hacia América y Europa (Alonso-Esteban et al., 2019; Graham G, Inge Russell, 2018; Matthew F, 2019). Ha sido clasificado en 5 variedades taxonómicas basadas en su geografía y morfología acorde con Alonso-Esteban et al., (2019). Los principales compuestos del lúpulo que generan el sabor amargo son los alfa-ácidos y los beta-ácidos, estos también inhiben el crecimiento de bacterias gram-positivas debido a los grupos prenilo (De Keukeleirc, 2000). Se han desarrollado alternativas distintas para la agregación de este ingrediente, dependiendo de la receta este se agrega en diferentes tiempos de la ebullición ya sea en forma de dos dosificaciones o de una y típicamente en una proporción de 6 gramos por cada 10 litros de mosto (Dennenlöhrr et al., 2020).

A continuación, se presenta en la tabla 3 la composición química del lúpulo (Castañeda Terán, 2015). donde se puede observar que su inclusión como ingrediente no influencia de manera significativa el contenido de etanol durante la etapa de fermentación, ya que este insumo solo contiene entre 2-4% de azúcares y es usado en una baja proporción de la formulación (Mosher & Trantham, 2017).

Tabla 3. Composición química del lúpulo

Parámetro	Porcentaje
Humedad después de cosecha	10-12
Resinas amargas totales	10-12
Aceites esenciales	0.5-2
Lípidos	2.5-3
Proteínas	13-18
Polifenoles	4-14
Azúcares	2-4
Aminoácidos	0.1-0.2
Celulosa	10-17
Sales minerales	7-10

El complejo sabor y aroma que confiere el lúpulo a las cervezas es debido a las diferentes interacciones de componentes para dar una impresión sensorial. Entre los compuestos volátiles se encuentran los terpenos mirceno, humulona y farneseno; mientras que entre los componentes no volátiles se encuentran las fracciones polifenólicas. Los monoterpenos nerol, linalol y limoneno presentes en el lúpulo también son considerados como contribuyentes al sabor y aroma característico del producto, incluso este grupo de compuestos pueden ser transformados enzimáticamente por algunas cepas de levaduras no convencionales, lo cual aporta mayor complejidad al análisis de los atributos sensoriales (Michel, Kopecká, et al., 2016).

1.2 Proceso de elaboración de cerveza

El proceso para la elaboración de cerveza consiste en una serie de etapas que se pueden dividir en 2 secciones, la del malteado y la producción, como se puede ver en la figura 1, se hace esta separación debido a que la sección del malteado es opcional ya que es un

Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusión de quinua

proceso que no es necesario realizar uno mismo (González, 2017; Graham G, Inge Russell, 2018).

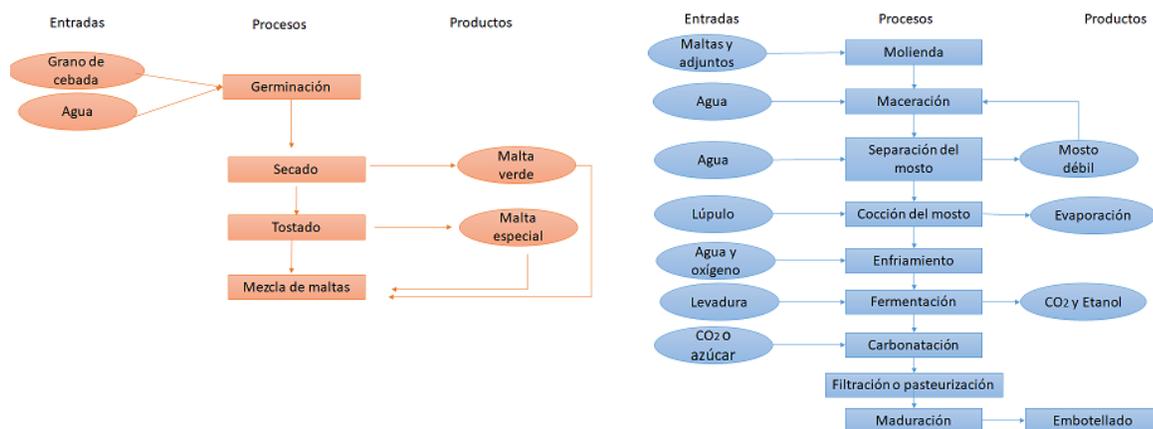


Figura 1. Esquema general de la elaboración de cerveza

1.2.1 Malteado

Esta etapa del proceso consiste en la inducción de la germinación del grano mediante su inmersión en agua por varios días, también implica su posterior tratamiento térmico para estabilizar la actividad enzimática desarrollada en la germinación, además este tratamiento induce la generación de cambios de color mediante reacciones de *Maillard*, una vez finalizada esta etapa el grano termina con una humedad de 4-4.5%, y en el caso de la cebada pasa a llamarse malta (Yu et al., 2020). Cuando el grano de cereal absorbe agua incrementa la actividad acuosa en la interface solido/gas y permite el desarrollo de varios procesos bioquímicos (Raimbault, 1998), entre estos se induce la síntesis de diferentes enzimas, entre las que se encuentran: la α -amilasa, la β -amilasa, proteasas y la β -glucanasa.

En particular la α -amilasa hidroliza los enlaces α (1-4) del almidón de manera aleatoria, es decir, es una endoglucanasa que actúa casi en cualquier parte de la cadena, siendo limitada a regiones distantes de las ramificaciones de la molécula; su actividad contribuye a que haya una alta fermentabilidad del mosto, además su actividad se desarrolla de manera eficiente a temperaturas entre 60-65°C. La β -amilasa difiere en estructura y función

de la α -amilasa, es más activa a temperaturas entre 55-65°C, esta enzima también hidroliza los enlaces α (1-4) entre monómeros de glucosa, es una exoglucanasa que genera unidades de maltosa a partir de los extremos de la molécula de almidón. Por su parte las proteasas hidrolizan proteínas e incrementan el aumento de nitrógeno libre y la β -glucanasa hidroliza β -glucanos presentes en las paredes celulares de los granos, reduciendo la viscosidad del mosto y favoreciendo su posterior filtración, es así que gracias a la actividad enzimática los azúcares presentes en el grano están más disponibles para las siguientes etapas (Linko et al., 1998; Matthew F, 2019; Mosher & Trantham, 2017; Zannini, 2013).

Por su parte los tratamientos térmicos que se realizan sobre el grano germinado permiten detener su crecimiento, ya que con esta etapa se remueve un alto contenido de humedad, lo cual implica que las enzimas ya no pueden actuar sobre el almidón y las paredes celulares del grano; conviene mencionar que las enzimas pueden actuar nuevamente sobre los sustratos en la etapa de maceración, en la que el contenido de humedad es suficiente para asegurar la actividad enzimática. Por otro lado, los tratamientos térmicos se realizan en una intensidad suficiente como para asegurar el tostado de la malta, lo cual puede influenciar en el color, sabor y aroma del producto (Mosher & Trantham, 2017).

1.2.2 Molienda

La molienda consiste en la trituración del grano (sustrato) en un molino, se disminuye su tamaño de partícula y se expone el endospermo (González, 2017) para que las enzimas tengan una mayor facilidad para hidrolizar los polisacáridos constituyentes del grano. En esta etapa de trituración mecánica no es conveniente que las cascarillas sean molidas completamente ya que estas son necesarias para crear un medio filtrante para el mosto, esta es la razón por la cual el grano no debe convertirse completamente en harina (Kunze, 2006).

1.2.3 Maceración

En esencia es la continuación del proceso de malteado, consiste en la mezcla del grano molido con agua a temperaturas comprendidas generalmente entre 62°C-68°C por un periodo de 1-2 horas y con un rango de pH de 5.2-5.6, cerca al límite inferior del rango de temperatura se da un contenido más alto de maltosa y los mostos ricos en maltosa

fermentan más rápidamente (González, 2017; Kunze, 2006; Matthew F, 2019). El malteado permite la activación completa de las amilasas (diastasas) presentes en el grano malteado, lo cual es un requisito para favorecer la hidrólisis del almidón.

El almidón es un carbohidrato que se encuentra en forma de gránulos en el endospermo de los cereales, es el componente mayoritario del grano y la evolución del almidón se puede observar en la figura 2 (Yu et al., 2020). Este polisacárido está constituido principalmente por amilosa y amilopectina, en promedio la amilosa de la cebada está constituida por 650 unidades de glucosa unidas entre sí formando enlaces α (1-4) y está dispuesta como una cadena lineal; por su parte la amilopectina de la cebada está constituida por 7000 unidades de glucosa con enlaces α (1-4) y esta ramificada (Matthew F, 2019).

En general la materia prima debe ser de buena calidad, es decir, debe estar libre de plagas y granos en mal estado, de no ser así la degradación por parte de las enzimas no será completamente funcional durante la etapa de maceración (Bamforth, 2016; González, 2017; Suárez, 2013). Estas condiciones permiten que el almidón presente en la malta se hidrolice, esto puede ocurrir en 3 etapas, estas son la gelatinización, la licuefacción y la sacarificación (Matthew F, 2019).

La gelatinización ocurre cuando el almidón absorbe agua y se hincha, estas moléculas de agua se introducen entre las de almidón rompiendo esos enlaces y finalmente el granulo de almidón se rompe y la viscosidad aumenta debido a que las moléculas de almidón son liberadas al medio. En la licuefacción la viscosidad disminuye y es cuando las principales enzimas (α y β amilasa) empiezan a hidrolizar el almidón en pequeñas cadenas. Por último, la sacarificación es la completa hidrólisis del almidón, formándose maltosa, glucosa y maltotriosa (Matthew F, 2019). Para que este proceso se lleve cabo de manera eficiente la proporción de agua y grano debe ser de aproximadamente 3-6 litros de agua por kilogramo de grano.

En la práctica la manera de verificar que la hidrólisis del almidón se está llevando a cabo correctamente es mediante la prueba de Lugol, esta prueba involucra una reacción de

formación de un complejo de color azul cuando el almidón no está hidrolizado al poner una mezcla de yodo/yoduro, mientras se obtiene un color marrón si la etapa se ha llevado a eficientemente. Así mismo, es importante tener en cuenta que el pH del agua es un factor influyente en la actividad enzimática, siendo el rango más adecuado para el proceso de 4.5 a 5.8 (González, 2017).

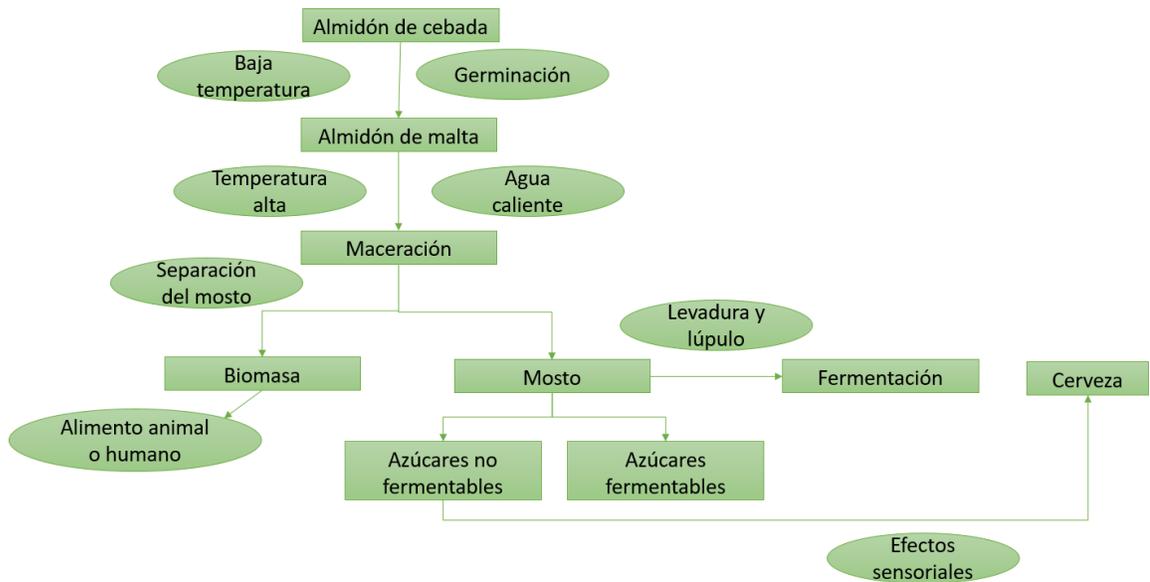


Figura 2. Evolución del almidón de cebada durante el proceso cervecero

1.2.4 Separación del mosto

El líquido rico en azúcares obtenido después de la maceración se llama mosto dulce, este líquido contiene algunas proteínas, aminoácidos individuales, ácidos, cationes metálicos (como calcio, magnesio y otros) y una mezcla de azúcares fermentables y no fermentables (Mosher & Trantham, 2017; Suárez, 2013). El mosto que sale de la etapa de maceración debe ser recuperado mediante filtración, además el grano residual es lavado para maximizar la recuperación de azúcares fermentables, todo esto mientras se evita la extracción de taninos indeseables (Graham G, Inge Russell, 2018; Matthew F, 2019). El lavado se realiza con agua aproximadamente a 78°C de manera que se arrastre y se desprendan los azúcares del grano agotado, actuando este residuo como medio filtrante, este proceso se conoce también con el nombre de *lautering* y *sparging* (Matthew F, 2019).

1.2.5 Cocción del mosto

Se parte del mosto dulce obtenido en la separación previa, esta mezcla es llevada a condiciones de ebullición por un periodo entre 60-90 minutos, es en esta etapa en la cual se agrega el lúpulo (Mosher & Trantham, 2017). Esta etapa cumple con varios objetivos entre los que se encuentran la concentración de los solutos a medida que se evapora el agua, lo cual conlleva a que los sabores, olores, colores, textura y apariencia se acentúen; se reduce la mayor cantidad de carga microbiana, otro beneficio es la inactivación de las enzimas fijando el contenido de carbohidratos en el mosto. Esta etapa del proceso es muy beneficiosa para el producto final porque se isomerizan los alfa-ácidos del lúpulo y esto va a proveer la amargura característica de la cerveza, también se eliminan componentes volátiles responsables de sabores indeseados como lo es el dimetil sulfuro causante de un sabor a maíz enlatado. Finalizando la ebullición se lleva a cabo el *whirlpool*, que consiste en crear un vórtice o torbellino en el mosto con el fin de concentrar en el centro las partículas que precipitan y deshacerse de ellas, típicamente puede durar 40 minutos (Graham G, Inge Russell, 2018; Matthew F, 2019; Mosher & Trantham, 2017;González, 2017; Kunze, 2006).

1.2.6 Enfriamiento

El objetivo de esta etapa ajustar la temperatura del mosto que proviene de la etapa de cocción a una temperatura en la que la levadura puede ser inoculada para ejercer su actividad metabólica. Como se mencionó anteriormente este rango de temperatura varía dependiendo de la levadura, si la levadura usada es la *S. cerevisiae*, comúnmente utilizada para estilos *Ale* el rango se encuentra entre 18-24°C, si se usa la *S. pastorianus*, para estilos *Lager* el rango esta entre 8-14°C. El principal reto es que el enfriamiento debe ser rápido para que no proliferen microorganismos dañinos y se coagulen mejor las proteínas que causan turbidez (González, 2017; Graham G, Inge Russell, 2018; Matthew F, 2019). De manera adicional en esta etapa se da la aireación (oxigenación) del mosto, lo cual es necesario para que la levadura pueda completar la fermentación, ya que a pesar de que las levaduras trabajan en un medio anaerobio en este proceso estas necesitan oxígeno para sintetizar nuevas membranas plasmáticas. Esta oxigenación se puede hacer al trasvasar a un tanque con filtro que es el fermentador.

1.2.7 Fermentación

Partiendo del mosto enfriado se procede a inocular la levadura, según González (2017), la inoculación consiste en la adición de la levadura al mosto, se puede agregar en su forma granular o la levadura se puede activar previamente, dependiendo de las especificaciones del productor. Por cada 100 gramos de glucosa se pueden obtener teóricamente 51.1 gramos de etanol y 48.9 gramos de CO₂, pero en la práctica el rendimiento es aproximadamente un 5% menor, este rendimiento es típico para la levadura *S. cerevisiae*. En la etapa de fermentación se debe agregar 1 millón de células viables por cada mililitro de mosto, sin embargo, esto varía dependiendo de la cantidad de azúcares que serán fermentados (gravedad específica) o grados plato (°P) usando la ecuación $\text{Inóculo} = 1 \text{ millón cel. viables} \times \text{Vol. mosto (mL)} \times \text{° Plato}$ (González, 2017).

Considerando que el proceso de fermentación alcohólica es anaerobio se debe evitar la entrada de aire mediante el uso de una válvula unidireccional, a nivel artesanal se usa un *airlock*, este dispositivo impide la entrada de aire del exterior y permite salir el CO₂ formado durante la fermentación, evitando que el fermentador tenga incrementos de presión que puedan comprometer su integridad estructural. El objetivo de esta etapa es que la levadura metabolice los constituyentes del mosto para formar etanol, CO₂, glicerol y otros productos que dan lugar a la cerveza (Graham G, Inge Russell, 2018). La fermentación tiene una duración aproximada de 7-10 días, la culminación de esta etapa es evidente de manera cualitativa cuando ya no hay un evidente desprendimiento de gas (Mosher & Trantham, 2017).

1.2.8 Carbonatación

Uno de los atributos asociados a la calidad de la cerveza está relacionado con la formación de espuma, lo cual está determinado por la cantidad de CO₂ disuelto en el producto. El dióxido de carbono se produce naturalmente durante el proceso de fermentación, pero este es liberado al ambiente, razón por la que se hace necesario desarrollar una etapa que asegure su presencia en cantidades adecuadas en el producto (González, 2017; Matthew F, 2019). Existen dos alternativas para realizar la carbonatación, entre estas se encuentran la carbonatación forzada conocida como *kegging* y la carbonatación mediante adición de azúcar que es conocida como *priming* González (2017).

La carbonatación forzada consiste en disolver el gas carbónico de un cilindro a alta presión en el seno de la cerveza, este gas pasa al tanque de manera forzada y se disuelve en la cerveza con el tiempo, es un proceso lento que depende de la presión y temperatura de la cerveza y puede realizarse mediante dos técnicas. La primera técnica es la de presión baja y tiempo prolongado, esta consiste en establecer una presión y temperatura constante y esperar varios días, ajustando el regulador a 12.9 psi; la segunda técnica es la de presión alta y tiempo breve consiste en forzar al máximo la dilución de CO₂, esta presión es de 30 psi. Por su parte la carbonatación por adición de azúcar es más sencilla y consiste en añadir azúcar ya sea en forma de jarabe a la cerveza en el barril y luego embotellarla o directamente en la botella y llenarla, es importante determinar la cantidad de CO₂ que se desea generar, la temperatura máxima de fermentación y la cantidad residual de este gas en la cerveza (González, 2017).

1.2.9 Filtración o pasteurización

La presencia de microorganismos y enzimas pueden afectar la calidad del producto por lo cual la pasteurización favorece su control (Matthew F, 2019; Mosher & Trantham, 2017). Los procesos de filtración consisten en remover levaduras, adjuntos y microorganismos basándose en su tamaño de partícula y en las diferencias de las cargas eléctricas, el objetivo de esta etapa es conservar más tiempo el producto de manera que no se produzcan cambios visibles y sensoriales. En cervecería se realizan los procesos de filtración profunda (columna) o filtración con membranas, estos últimos son una alternativa a la pasteurización (Kunze, 2006; Matthew F, 2019). En la filtración profunda el filtro es grande en comparación al tamaño de partícula que se quiere separar, sin embargo, durante el recorrido las partículas tienen gran posibilidad de ser atrapadas por el medio filtrante (Kunze, 2006; Matthew F, 2019).

Por otra parte, mediante procesos de filtración con membranas también es posible remover los microorganismos presentes en el producto, dado que las membranas tienen un tamaño de poro de 0.1-10 µm este proceso es denominado como microfiltración. Este tipo de procesos pueden operar de dos modos, el primero es la filtración perpendicular (*dead end filtration*) y consiste en forzar el producto a través de la membrana aplicando presión, por su parte, el segundo modo es la filtración tangencial (*cross-flow filtration*) y consiste en

alimentar el producto paralelamente a la membrana que se permeará a través de esta por diferencia de presión. En la industria cervecera se utilizan sistemas de microfiltración con membranas de 0.45 μm para clarificar el producto al separar la levadura y partículas coloidales (agregados de proteínas y polifenoles) responsables de la turbidez (Charcosset, 2021).

Industrialmente la pasteurización se lleva cabo mediante un túnel de calentamiento, el proceso consiste en eliminar casi todos los microorganismos de un producto mediante un tratamiento térmico en un tiempo determinado (típicamente corto), sin embargo altas temperaturas pueden cambiar el aroma y sabor de la cerveza, para que no ocurra se puede llevar a altas temperaturas pero con muy poco tiempo (pasteurización flash), permitiendo que las características del producto sean estables a través del tiempo, es decir, aumenta la vida útil del producto (Matthew F, 2019). Por otro lado a nivel artesanal no es común realizar esta etapa por las limitaciones de recursos, pero cuando se realiza se pueden exponer las botellas a un baño maría a 70°C por 10 minutos, se enfría hasta que llegue a 35°C y finalmente se mantiene en refrigeración para pasar a la siguiente etapa (Rodríguez Cruz, 2015).

1.2.10 Maduración

La cerveza ya fermentada y carbonatada se conoce como cerveza verde, la cual no corresponde aún al producto final, porque aún posee compuestos como el diacetilo y sulfuro de hidrógeno que causan atributos sensoriales indeseados, el producto cuenta con un sabor fuerte a etanol y alcoholes superiores, el cual debe ser suavizado, es por eso que se hace necesario realizar un ajuste en el producto. Esta etapa de maduración consiste en someter la cerveza verde a un período de reposo típicamente en frío (0-4°C), cuya duración esta entre 2-4 semanas. Por su parte la maduración en caliente se realiza a temperatura ambiente por pocos días, esto para las cervezas elaboradas con el estilo *Ale*, sin embargo puede requerir meses para las cervezas con el estilo *Lager* (González, 2017; Matthew F, 2019; Mosher & Trantham, 2017).

A menudo la maduración se lleva a cabo después del embarrilado o embotellado, sin embargo, para la producción artesanal puede resultar inconveniente realizar la maduración en barril, esto porque los productores deben de disponer de varios barriles que pueden ser

requeridos en otras etapas del proceso para la elaboración de otros lotes de cerveza, es decir, limita los recursos disponibles; por su parte las botellas son un recurso menos costoso y es por eso que la maduración más usada se lleva a cabo en botella (Matthew F, 2019).

1.3 Procesos para la elaboración de cerveza con bajo contenido de alcohol

En algunos países como los Estados Unidos de América la producción de bebidas de bajo contenido de alcohol fue motivada por la prohibición a la fabricación, consumo y venta de bebidas alcohólicas, es así que se crea la necesidad de elaborar procesos para fabricar bebidas con bajo contenido de alcohol para suplir la demanda. En aquellos países donde no hubo una prohibición tan marcada, las cervecerías se esforzaron por incrementar la producción general de cervezas con bajo contenido de alcohol motivados por la incursión a países con mercados altamente competitivos y a mercados de países donde el consumo de alcohol tiene restricciones religiosas, otra necesidad es la de proveer alternativas a los consumidores que están llevando a cabo actividades en las que el consumo del alcohol es prohibido y de personas que se encuentren bajo condiciones de embarazo o medicación (Brányik et al., 2012; Montanari et al., 2008).

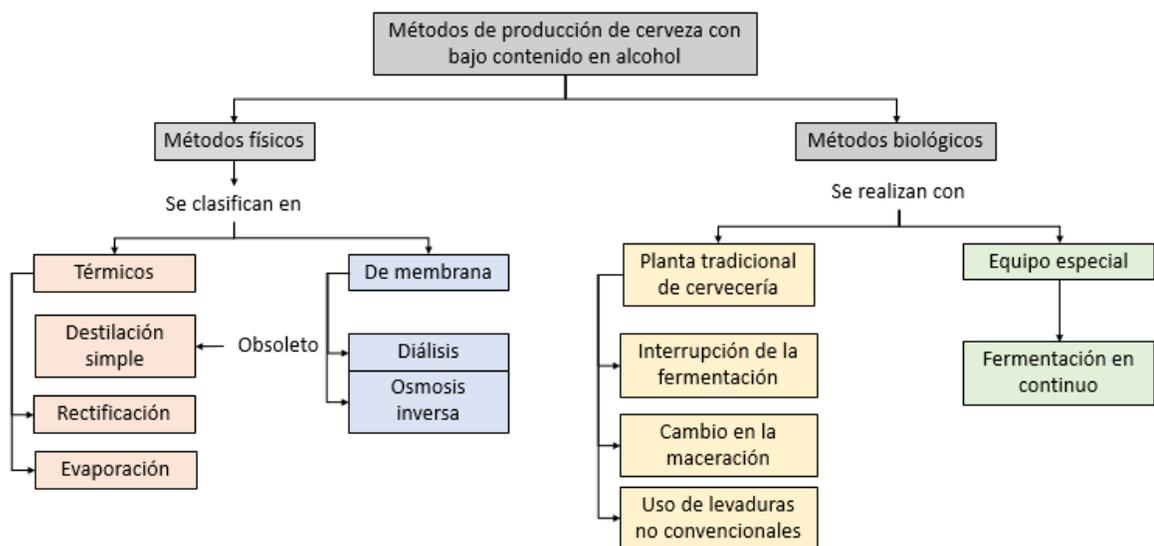


Figura 3. Procesos para la elaboración de cervezas con bajo contenido de alcohol

Los métodos para la producción de cervezas de bajo contenido en alcohol pueden ser clasificados en dos grandes grupos: los procesos físicos y los biológicos, como se puede observar en la figura 3 (Brányik et al., 2012). Los procesos físicos son aquellos que consisten en la remoción del alcohol al final del proceso de elaboración, este tipo de procesos pueden generar una pérdida en el aroma, el sabor y el cuerpo (relacionado con la viscosidad) del producto, por su relativa disponibilidad comercial son los más usados industrialmente. Los procesos físicos pueden ser térmicos como lo son: la destilación simple, la rectificación continua por vacío y la evaporación de película descendente, también pueden ser mediados por membranas como la diálisis y osmosis (Brányik et al., 2012).

1.3.1 Procesos físicos para la obtención de cervezas con bajo contenido de alcohol

La destilación es el más simple y conocido, en este proceso la cerveza se calienta para separar por diferencias en puntos de ebullición el alcohol de los demás componentes, sin embargo, la exposición del producto a temperaturas elevadas por periodos prolongados de tiempo puede degradar la calidad de la cerveza al cambiar su color, caramelizar los azúcares y eliminar algunas notas de sabor, es por eso que es una tecnología que ya no se encuentra en uso (Montanari et al., 2008; Szollosi et al., 2016). La rectificación por vacío

consiste en el precalentamiento de la cerveza (previamente desgasificada), la remoción del alcohol se da en una columna de vacío a contra flujo a temperaturas entre 42-46°C, el contacto de la cerveza con el vapor generado provoca la separación selectiva del alcohol de la cerveza (Brányik et al., 2012). Por otro lado, la evaporación de película descendente consiste en precalentar la cerveza hasta ebullición bajo condiciones de vacío, una vez precalentada es transportada a través de tubos de calentamiento verticales en donde se realiza la transferencia de calor con vapor, a medida que la película de líquido desciende esta va perdiendo etanol, proceso que ocurre en un periodo tiempo (segundos), posteriormente el etanol evaporado es recuperado en un separador conectado al evaporador, dejando la cerveza con un bajo contenido en etanol (Montanari et al., 2008).

Por su parte los procesos físicos mediados por membranas se usan para separar moléculas pequeñas como el etanol y el agua de la cerveza, a nivel industrial los métodos más usados son la diálisis y la osmosis inversa. Estos procesos no requieren el aumento de la temperatura en el producto, pero si pueden implicar costos superiores (Brányik et al., 2012). La diálisis consiste en el uso de una membrana semipermeable que hace de barrera molecular específica para ciertas moléculas, los componentes de la cerveza se mueven del área de mayor concentración hacia la de menor concentración, este mecanismo es conocido como difusión molecular (Brányik et al., 2012). La separación consiste en hacer pasar la cerveza en un sistema con una membrana de diálisis, en la cual también fluye de manera simultánea y en contracorriente un dializado libre de alcohol, el etanol fluye desde la cerveza hacia el dializado por la diferencia de concentración, sin embargo con este proceso de separación también se pueden remover componentes de bajo peso molecular que debilitan el sabor de la cerveza (Montanari et al., 2008)

Los procesos de osmosis están mediados por diferencias de presión entre dos sustancias separadas por una membrana, esta presión de debe ser sustancialmente mayor a la presión osmótica (Kozłowski et al., 2021). La separación se lleva a cabo en una membrana semipermeable de acetato de celulosa, haciendo pasar la cerveza a una presión de 40 bar, obteniéndose un permeado que es una mezcla de etanol y agua. Con este proceso se obtiene una forma concentrada del producto, razón por la cual se debe realizar una etapa de diafiltración para ajustar el contenido de agua (Montanari et al., 2008).

1.3.2 Procesos biológicos para la obtención de cervezas con bajo contenido de alcohol

Los procesos biológicos involucran métodos en los que se restringe o limita la producción de etanol en el proceso, entre ellos se encuentran la modificación del proceso de maceración, la interrupción del proceso de fermentación por la remoción de las levaduras, el uso de levaduras especiales (no convencionales) y el uso de procesos de fermentación continua (Brányik et al., 2012). Estos procesos se caracterizan por no requerir de una etapa adicional de remoción del alcohol, por lo que se han considerado convenientes para ser implementados en cervecerías artesanales (Muller et al., 2020).

La modificación del proceso de maceración busca reducir la actividad de la enzima β -amilasa al realizar la etapa a una temperatura comprendida entre 75-80°C, condición en la cual la enzima α -amilasa aún puede actuar sobre el almidón, causando una menor liberación de azúcares fermentables al mosto. Es necesario recordar que la enzima β tiene su mayor actividad en una temperatura de 62-65°C, y es la causante de la producción de la maltosa, mientras la α -amilasa produce principalmente dextrinas (Brányik et al., 2012).

En cambio, la interrupción de la fermentación consiste en la remoción de las levaduras durante el proceso, con lo cual se evita una alta conversión de azúcares a etanol, pero con esta interrupción se puede generar un producto pobre en compuestos aromáticos y con un característico sabor al mosto de partida y no a cerveza en el producto final. Otra alternativa, es llevar a cabo una fermentación prolongada a bajas temperaturas, esto causa que no se produzca etanol, pero puede ocasionar que las levaduras produzcan ésteres y mezclas de alcoholes superiores o compuestos carbonílicos, los compuestos carbonílicos pueden impartir el sabor a mosto (Montanari et al., 2008), las bajas temperaturas también pueden convertir los aminoácidos en compuestos que generen sabores no deseados, no obstante las cervezas elaboradas con fermentaciones a bajas temperaturas tienen características similares a las cervezas comunes (Muller et al., 2020). La fermentación en continuo se lleva a cabo con levaduras libres o inmovilizadas, siendo estas últimas el sistema más frecuentemente utilizado, el cual se caracteriza por bajos costos de producción y de mano de obra, al reducir el tiempo de contacto entre la levadura y el mosto durante la fermentación, esto se logra con un flujo lento y continuo del mosto sobre las levaduras inmovilizadas (Brányik et al., 2012; Kozłowski et al., 2021).

El método de utilización de levaduras no convencionales podría ser uno de los más adecuados debido a que existe un gran número de estas especies, las cuales producen cantidades bajas de alcohol debido a su incapacidad de fermentar la maltosa, azúcar que representa aproximadamente el 60% de los presentes en el mosto. De manera que naturalmente con el cambio de levadura se puede llegar a este objetivo (Brányik et al., 2012; Vidgren et al., 2005).

1.3.3 Levaduras para la elaboración de cervezas con bajo contenido de alcohol

En el contexto de la elaboración de cerveza, se denominan levaduras no convencionales a aquellas que no pertenecen al género *Saccharomyces*, sin embargo, a pesar de que las levaduras agrupan más de 1600 especies, tan solo han sido estudiados algunos géneros como *Pichia*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Scheffersomyces*, *Hanseniaspora*, *Torulaspota*, *Cyberlindera* y *Mrakia* para su uso como cultivos iniciadores en la industria cervecera (Sannino et al., 2019). Actualmente se ha mostrado el potencial que ofrecen para estas levaduras no convencionales para la obtención de bebidas alcohólicas, por ejemplo para la obtención de cervezas con nuevos perfiles de aroma y sabor y otras propiedades deseables (Grijalva-Vallejos et al., 2020).

Con el auge de las nuevas especies y cepas de levaduras ha sido necesario identificarlas correctamente para garantizar que sea seguro su uso en alimentos, correspondiente a su calidad, para ello, se han utilizado técnicas de genética molecular, como lo son cariotipo electroforético, *RFLP* (polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción), *RAPD* (ADN polimórfico amplificado al azar), *PCR* (reacción en cadena de polimerasa), *TGGE* (electroforesis en gel de gradiente de temperatura), *DGGE* (electroforesis en gel en gradiente desnaturizante) y *AFLP* (polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados) (Pretorius et al., 2003).

Las características de los atributos obtenidos con levaduras no convencionales son diversos, por ejemplo, para el caso del género *Brettanomyces* como la *B. bruxellensis* y *B. anomalus* se ha encontrado que esta levadura puede aportar características sensoriales positivas a la cerveza, pero si no es bien trabajada puede dañar el producto (Serra Colomer

et al., 2019). La procedencia de las levaduras es un factor que se debe considerar para la selección de estas, dado que el empleo de la levadura psicrófila *Mrakia gelida*, además de permitir obtener cervezas con bajo contenido en alcohol en condiciones de bajas temperaturas, también favorece la aparición de metabolitos secundarios propicios para nuevos perfiles de sabor como los etil y ésteres de acetato (De Francesco et al., 2018).

Un acercamiento diferente para la obtención de levaduras no convencionales que puedan servir como cultivos iniciadores es el estudio de los microorganismos presentes en bebidas autóctonas como la chicha, en la que se han aislado cepas de *T. delbruekii* (Grijalva-Vallejos et al., 2020). La inclusión de levaduras alternativas también ha permitido obtener cervezas con bajo contenido en alcohol con características probióticas en el campo de los alimentos funcionales (Senkarcinova et al., 2019). Con un enfoque diferente en la última década se ha trabajado con la intención de optimizar los métodos para la selección de características específicas de levaduras para ser usadas en la fabricación de cervezas. Entre estos acercamientos se destacan las modificaciones genéticas para insertar genes específicos para causar cambios en la producción de metabolitos secundarios que conduzcan a la generación de características sensoriales más favorables (Alperstein et al., 2020).

1.3.4 Comportamiento en la fermentación de *Saccharomyces ludwigii*

La levadura *S. ludwigii* es un microorganismo unicelular (hongos) perteneciente al grupo de los ascomicetos, al igual que la especie *S. cerevisiae*, tienen una forma elongada y ovalada, como se puede observar en la figura 4 y presentan una reproducción asexual por gemación bipolar (no hay límite para producir nuevas células); este microorganismo ha sido asociado a inconvenientes en el proceso de fermentación del proceso de elaboración de vinos, especialmente por su tolerancia al SO₂ (Romano et al., 1999; Vejarano, 2018).

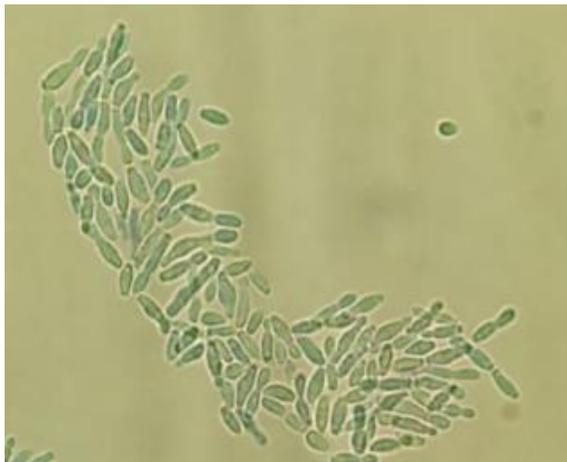


Figura 4. Imagen propia obtenida mediante microscopía óptica a 40x para la cepa WLP 618 de la especie *S. ludwigii*.

Esta levadura es usada en algunas cervecerías alemanas, italianas y checas gracias a que las cepas empleadas para la fabricación de estos productos poseen características asociadas a descriptores sensoriales positivos, como por ejemplo la baja concentración de algunos ésteres que generan sabores desagradables (De Francesco et al., 2015; Romano et al., 1999; Sannino et al., 2019). Sin embargo, se debe tener en consideración que la concentración de metabolitos secundarios que contribuyen al sabor y olor varían dependiendo del sustrato y de la cepa usada, por ejemplo, en el estudio realizado por Romano et al., (1999) se encontró que el 30% de las 19 cepas de la especie *S. ludwigii* analizadas generaban un producto con cantidades elevadas de acetato de etilo y de ácido acético. Esto sugiere que se debe evaluar la cepa de *S. ludwigii* a ser utilizada en un proceso comercial con el fin de garantizar que se obtenga un producto con una adecuada aceptación sensorial. Teniendo en cuenta la biodiversidad natural encontrada en las levaduras aisladas en este estudio el contenido de estos compuestos es un problema que se puede resolver ya que existe evidencia de cepas capaces de producir una baja cantidad de estos metabolitos indeseables.

Esta especie ha sido descrita como capaz de fermentar fácilmente azúcares simples como la glucosa, fructosa y manosa, mientras es incapaz de fermentar maltosa y maltotriosa, razón por la cual ha sido considerada como una opción interesante para la producción de

cervezas con bajo contenido en alcohol. El comportamiento respecto al consumo de azúcares por la *S. ludwigii* se presenta en la tabla 4 (Bellut et al., 2018).

Tabla 4. Asimilación de azúcares por *S. ludwigii*, (+) significa asimilación y (-) no asimilación

Azúcar	Consumo	Azúcar	Consumo
Maltosa	-	Sacarosa	+
Maltotriosa	-	Melobiosa	-
Glucosa	+	Rafinosa	+
Fructosa	+	Celobiosa	+

Respecto al potencial de producción de bebidas alcohólicas es preciso mencionar que esta levadura tiene una capacidad de tolerar etanol en niveles incluso entre el 8-12% (Ciani & Maccarelli, 1997; Waldir Estela-Escalante, Mojmír Rychtera et al., 2011), esto sugiere que el etanol producido por la levadura no influye con gran afectación el proceso de fermentación llevado a cabo por esta levadura. Además, una elevada producción de etanol está condicionada al uso de un mosto con un alto contenido de azúcares fermentables por la levadura, por ejemplo, esto ocurre cuando se emplea un mosto a base de jugo de uva el cual es rico en glucosa y fructosa (Muñoz et al., 2011).

Con relación a la productividad del proceso fermentativo realizado por *S. ludwigii* es conveniente resaltar que la velocidad de utilización de los azúcares depende de la concentración y el tipo de azúcares, ya que primero consumirá aquellos más simples, otros factores que influyen en la velocidad para usar estos azúcares son la concentración de oxígeno, la temperatura de fermentación y el pH, comportamiento que en términos generales es semejante a las levaduras empleadas de manera convencional de producción de bebidas alcohólicas (Sannino et al., 2019; Waldir Estela-Escalante, Mojmír Rychtera et al., 2011).

1.4 Consideraciones sobre cervezas de bajo contenido de alcohol en otros países

La connotación de cerveza de bajo contenido en alcohol varía dependiendo la legislación de cada país, siendo Europa uno de los continentes con mayor tradición cervecera, continente que es un buen punto de referencia para especificaciones de este tipo de productos. La Unión Europea en su conjunto no tiene leyes como tal que se refieran o especifiquen que se considera una cerveza de bajo contenido en alcohol o libre de este, sin embargo, cada país si las tiene (Montanari et al., 2008). En la tabla 5 se presentan especificaciones para este producto en Alemania, Suiza, Austria, Finlandia, Portugal, entre otros (Montanari et al., 2008).

Tabla 5. Consideraciones para cervezas libres o con bajo contenido en alcohol por diferentes países de la UE.

País	Cerveza baja en alcohol (% v/v alcohol)	Cerveza libre de alcohol (% v/v alcohol)
Austria	>0.5 y ≤1.9	≤0.5
Bélgica	>0.5 y ≤1.2 y gravedad≥2.2°P	≤0.5 y gravedad≥2.2°P
Dinamarca	-	<0.1
Finlandia	<2.8	≤0.5
Francia	-	≤1.2
Alemania	>0.5 y ≤1.2	≤0.5
Italia	-	≤1.2 gravedad ≥3° y ≤3°P
Holanda	>0.1 y ≤1.2	≤0.1
Portugal	>0.5 y ≤1.2	<0.5
España	De 1 a 3	<1
Suecia	≥2.25	-
Reino Unido	≤1.2	≤0.05
Estados Unidos	≤2.5	No hay alcohol presente

Colombia es el cuarto productor más grande de cerveza en Latinoamérica, y la producción industrial representa la mayor parte del mercado nacional, existe una preferencia en Colombia por las cervezas sobre los vinos y bebidas espirituosas, en 1825 se empezó la producción de las cervezas artesanales hasta llegar a más de 100 establecimientos entre 1830-1930 (Toro-Gonzalez, 2017), en Colombia la venta y producción de bebidas alcohólicas está regulada por el INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos), esta regulación se basa en el decreto 1686 de 2012 que establece que una bebida alcohólica es un producto apto para consumo humano y tiene una concentración no inferior a 2.5 grados alcoholímetros, además se considera que es una cerveza a partir de ese grado y hasta 12 grados alcoholímetros. Por otro lado, la NTC 3854 (ICONTEC, 1996) (Normas Técnicas Colombianas) también establece el mismo rango en lo que se refiere al contenido alcohólico para una cerveza en Colombia.

La relación entre estos temas investigativos que han venido surgiendo a lo largo del tiempo con respecto al trabajo final brindan la posibilidad de recurrir a nuevos métodos y técnicas que no se habían pensado en un principio, siempre y cuando se tenga detallado cuidado en como esa información ha de ser estructurada y estudiar cómo aplicarla al tema del trabajo final, que en última instancia es la elaboración de una cerveza con levaduras no convencionales pero que estas puedan generar la características particulares que se desean en la cerveza final, y a su vez comparar con una referencia para determinar que tan bien se ha acoplado esa levadura a las demás condiciones y si en efecto da lugar a un perfil de sabor nuevo.

1.5 Metabolitos asociados a la consecución de características sensoriales

Son componentes considerados como sabores activos como los alcoholes superiores, ésteres entre ácidos grasos y alcoholes superiores o etanol, aldehídos y dicetonas vecinales (Sannino et al., 2019), en las cervezas se pueden encontrar cerca de 40 alcoholes superiores, siendo los más influyentes el propanol, isobutanol, el feniletanol, alcohol isoamilico y amilico (Loviso & Libkind, 2019).

Otros componentes generadores de nuevos sabores son los ésteres, estos compuestos producen sabores florales y frutados, su formación depende en parte de los nutrientes

presentes en el mosto pero principalmente la genética de la levadura (Loviso & Libkind, 2018), además un nivel alto de ácidos graso insaturados en las fermentaciones pueden hacer decrecer la producción de etil ésteres (Saerens et al., 2008).

Los compuestos fenólicos son también contribuyentes a la aparición de aromas y sabores específicos en las cervezas, son compuestos provenientes de los granos y lúpulos, algunos de los compuestos fenólicos son el 4-vinilguayacol que produce un sabor ahumado y el 4-vinilfenol un sabor picante, etc. (Lentz, 2018).

Los lactones y furanones también contribuyen en sabores característicos, en especial lactones propicios de sabor del durazno y albaricoque y son originados de las maltas, lúpulos, levaduras y de aminoácidos provenientes como metabolitos secundarios (Holt et al., 2019).

2. Evaluación del uso de la levadura *S. ludwigii* y de la inclusión de quinua en el sustrato en la elaboración de cerveza tipo *Ale*

En este capítulo se presentan los resultados de la evaluación del uso de la levadura *S. ludwigii* y de la inclusión de quinua en el sustrato en la elaboración de cerveza tipo *Ale* con el fin de definir una combinación levadura-sustrato que permita obtener un producto con bajo contenido en etanol. Para ello se prepararon dos diferentes mostos, uno a partir de 100% de cebada malteada y el otro sustituyendo un 30% de la cebada por quinua sin maltear. Además, se comparó la producción de etanol al empelar una cepa de levadura comercial de *S. ludwigii* con la obtenida con una cepa comercial de *S. cerevisiae*. Durante el proceso de elaboración se siguieron parámetros que permitieron verificar el avance del mismo (pH, gravedad específica, °Brix, contenido de etanol, consumo de azúcares, etc.).

2.1 Metodología

La metodología para la elaboración de las formulaciones está dividida en 5 secciones que comprenden las etapas para la fabricación de cerveza artesanal, estas son la consecución de las materias primas, la elaboración del mosto, la cocción del mosto, la fermentación y el acondicionamiento (maduración). La realización de la evaluación de las combinaciones sustrato-levadura se llevó a cabo mediante un diseño factorial de 2 factores con 2 niveles (2^2), las combinaciones son presentadas en la tabla 6. Los ensayos E1 y E3 corresponden a cervezas producidas por levadura *S. ludwigii* con mosto de cebada malteada 100% y con reemplazo de 30% por quinua, respectivamente, y los ensayos E2 y E4 a las producidas con *S. cerevisiae*, cebada malteada 100% y con reemplazo de 30% por quinua, respectivamente.

Tabla 6. Diseño experimental.

Ensayo/Formulación	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cebada malteada 100%	E1	E2
Cebada malteada 70% quinua 30%	E3	E4

2.1.1 Materiales e insumos

La malta de cebada seleccionada para el estudio fue del tipo *Vienna*, la cual fue adquirida previamente molida de la marca *Castle Malting* (Bélgica); esta malta es recomendada por el fabricante para la elaboración de cervezas del estilo *Pale Ale*. El lúpulo utilizado fue el de la referencia *Styrian Golding (Celeia)* también de la marca *Castle Malting*. La quinua seleccionada fue adquirida de la marca Doria (grano entero sin maltear) en un almacén de cadena de la ciudad de Bogotá. Para su uso, el grano fue procesado en un molino de cuchillas de uso doméstico. La cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* empleada fue la referencia comercial *SafAle US-05* de marca *Fermentis* (Francia), cuya presentación viene en forma deshidratada y granulada. La cepa de levadura *WLP618* de la especie *Saccharomycodes ludwigii* fue adquirida de la marca *White Labs* (Estados Unidos). Por último, el agua utilizada para la preparación de los mostos fue agua mineral embotellada de la marca Cristal (Postobón, Colombia).

2.1.2 Elaboración del mosto

Esta sección corresponde a las etapas de maceración y separación del mosto. Para llevar a cabo la etapa de maceración se siguieron las instrucciones del distribuidor de la malta, para lo cual a 13.2 L de agua a una temperatura aproximada de 75°C se le adicionó una masa de 4.4 kg de cereal en una malla de 50x50 cm y aberturas de 2mm de diámetro. El macerador utilizado en esta etapa fue un recipiente de acero inoxidable, el cual tenía una válvula de drenaje en la parte inferior y un termómetro ubicado en el interior del tanque. El agua adicionada permitió asegurar que todo el grano se encontrara cubierto, y la mezcla se mantuvo a una temperatura aproximada de 65°C por 2 horas. Para verificar el avance del proceso de maceración se realizó la prueba de lugol. Para el tratamiento en el que se

utilizó quinua se realizó un lavado con agua a 20.3°C por 30 minutos de este pseudocereal previo a la etapa de maceración, con el fin de eliminar de las saponinas presentes en el mismo.

Una vez culminada la maceración se continuó con la etapa de separación del mosto, la cual se realizó en forma de cascada para aprovechar el trasvase por gravedad desde el tanque con el agua de lavado hacia el macerador, y de este hacia el recipiente de cocción. El lavado requirió un volumen de 17.5 L de agua a 78°C por un periodo de 30 minutos, con el fin de evitar que residuos sólidos de la etapa de maceración pasaran al recipiente de cocción se utilizó un filtro de mallas.

2.1.3 Cocción del mosto, adición de lúpulo y enfriamiento

El recipiente con el mosto ya filtrado se llevó a ebullición. Una vez alcanzada esta condición se retiró la espuma que se formaba por un periodo de 10 minutos, luego de lo cual se agregaron 9 g de lúpulo. Esta mezcla se mantuvo en ebullición durante 45 minutos y posteriormente se agregaron 7 g adicionales de lúpulo. Al cabo de 15 minutos se detuvo el calentamiento de esta mezcla, dando por terminada la etapa de cocción del mosto. Finalmente se enfrió la mezcla hasta los 25°C aproximadamente usando un intercambiador de calor tipo serpentín, mediante la circulación de agua de la red domiciliaria. Con el fin de evitar que residuos sólidos de la etapa de cocción pasaran al fermentador se utilizó un filtro de mallas.

2.1.4 Fermentación

La fermentación se realizó en un tanque con un volumen de 30 L de capacidad, con válvula para el desagüe en la parte inferior y *airlock* adaptado en la parte superior. En el tanque se ubicó el mosto ya filtrado y la inoculación con cada levadura fue realizada de acuerdo con las instrucciones del productor, como se describe a continuación: la cepa de *S. ludwigii* se agregó en forma líquida, empleando una relación de cultivo iniciador de 35 mL por cada 25 L de mosto, recomendada por el proveedor de la levadura en su forma de presentación comercial; para la inoculación de *S. cerevisiae* se realizó activación de la levadura granulada, resuspendiendo 11.5 g (contenido de sobre de presentación comercial) en 100 mL de agua previamente hervida y enfriada a 25°C, suspensión que fue empleada para la

inoculación del mosto, esta relación fue recomendada por el proveedor. Una vez realizada la inoculación, los tanques de fermentación fueron cerrados y se colocó el respectivo *airlock* para asegurar que se generaran condiciones anaerobias. El proceso de fermentación se llevó a cabo por 10 días a temperatura ambiente de la ciudad de Bogotá (16-20°C). Cada ensayo de fermentación se realizó por duplicado empleando siempre mosto fresco, haciendo seguimiento de la gravedad específica, el pH y el contenido de sólidos solubles en °Brix. Estas mediciones se llevaron a cabo los días 1, 5, 10 de fermentación y después de la maduración; el muestreo se realizó de manera aséptica a través de la válvula ubicada en la parte inferior del tanque de fermentación, vertiendo un volumen de 250 mL de cerveza en una probeta limpia.

2.1.5 Carbonatación, envasado y maduración

Al cabo de los 10 días de fermentación se carbonató la cerveza por el método de *priming*, que consiste en agregar sacarosa y llevar temperaturas de 0-4°C para generar CO₂. Para esto se tomaron 500 mL de la cerveza fermentada en los cuales se disolvieron 107.5 g de azúcar; esta disolución se agregó al fermentador homogeneizando de manera que no se oxigenara la cerveza. Posteriormente el líquido contenido en el tanque se envasó en botellas de vidrio ámbar de 330 mL, las cuales se taparon con una selladora manual. Finalmente, el producto envasado fue mantenido a una temperatura de 5°C por 2 semanas.

2.1.6 Caracterización fisicoquímica de la cerveza

Las características fisicoquímicas medidas durante el proceso de elaboración de la cerveza fueron el pH (método potenciométrico), la gravedad específica (por densimetría) y la concentración de sólidos solubles (°Brix, medida refractométrica). Para ello se tomaron muestras en una probeta de 250 mL y posteriormente estas propiedades fueron medidas con instrumentos portables en el momento requerido, estos fueron un pHmetro portable de marca OEM (China), un densímetro hidrómetro marca *Midwest Homebrewing and Winemaking Supplies* (EEUU) y un refractómetro portátil de marca HCO (China).

2.1.7 Perfil de azúcares durante la fermentación de las cervezas

El seguimiento realizado para los azúcares glucosa, maltosa y maltotriosa se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), empleando un cromatógrafo *JASCO LC-2000* (Japón). La separación fue realizada en una columna *Rezex monosacharide* marca *Phenomenex* (EEUU) de intercambio catiónico, empleando como fase móvil agua tipo I a 40°C. Los azúcares se detectaron por medio de un detector de índice de refracción *JASCO IR-D600* (Japón) operando a una temperatura de 40°C. Para la cuantificación se realizaron soluciones stock de los patrones de los tres carbohidratos (Sigma, EEUU), realizando una curva de calibración con 7 niveles de concentración entre 0.1 y 5 mg/mL (ver Anexo A) realizando inyecciones con un *loop* de μL . Las muestras tomadas durante el proceso fueron microfiltradas ($0.45\ \mu\text{m}$) y almacenadas a -20°C para su posterior análisis. Se realizaron diluciones adecuadas de las muestras cuando la señal (área del pico cromatográfico) registrada por el equipo superaba el umbral del límite superior de la curva de calibración. Cada azúcar fue identificado mediante los tiempos de retención del pico cromatográfico establecido en los ensayos con los patrones (maltotriosa de 9.349 minutos; maltosa de 10.300 minutos y para la glucosa de 12.225 minutos), el volumen de inyección utilizado para cada ensayo con las muestras fue también de $10\ \mu\text{L}$.

2.1.8 Determinación del contenido de etanol en las cervezas

Para la determinación del contenido de etanol en el producto final se utilizó el método volumétrico, el cual consiste en la medición de la gravedad específica del destilado de cada producto y su respectiva comparación contra una curva patrón siguiendo el procedimiento descrito en la GTC 4:1994 (ICONTEC, 1994).

2.1.9 Análisis microbiológico de las cervezas

La calidad microbiológica se evaluó mediante análisis de NMP (número más probable) de coliformes, empleando para ello el medio líquido *Fluorocult®* (Merck, Alemania), el cual permite la detección de coliformes totales y fecales. Para ello se realizaron diluciones seriadas con las muestras a analizar, las muestras fueron incubadas a 37°C por un día.

El conteo de mesófilos totales se realizó en un medio *Agar Plate Count* (Merck, Alemania), mientras el conteo de mohos y levaduras se realizó en un medio *Agar Papa Dextrosa* (PDA) (Merck Millipore, EEUU).

2.1.10 Análisis estadístico de datos

Para realizar las comparaciones de las características fisicoquímicas medidas entre los dos sustratos evaluados en el mosto mediante la prueba *t de Student* se utilizó la herramienta Análisis de datos-Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales de *Office Excel 2016* (Microsoft, EEUU).

Para realizar el análisis del efecto sustrato-levadura de las características fisicoquímicas en la cerveza después de madurada mediante la prueba *t de Student* se utilizó la herramienta Análisis de datos-Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales de *Office Excel 2016* (Microsoft, EEUU). Las comparaciones de las características fisicoquímicas medidas durante la fermentación se realizaron mediante la prueba ANOVA, se utilizó la herramienta Análisis de datos- Análisis de varianza de un factor de *Office Excel 2016* (Microsoft, EEUU). La evaluación del diseño factorial 2² utilizado para establecer si existen diferencias significativas de los factores estudiados sobre el contenido de etanol sobre la cerveza se realizó con el software *Minitab*® 2019 (Minitab Inc, EEUU).

2.2 Resultados y discusión

Se llevaron a cabo fermentaciones para la producción de cervezas empleando dos tipos de levadura, *S. ludwigii* (**E1** y **E3**) y *S. cerevisiae* (**E2** y **E4**), con dos tipos de mosto, uno convencional (**E1** y **E2**), compuesto por cebada malteada y otro en el cual el 30% de la malta de cebada fue reemplazado por quinua sin maltear (**E3** y **E4**).

El tiempo de fermentación fue de 10 días y fue seguido de carbonatación, envasado y una maduración de dos semanas a 5°C. Se analizaron muestras durante los días 0, 1, 5 y 10 de fermentación, así como del producto final luego de la maduración. En la tabla 7 se encuentran registrados los resultados de las características fisicoquímicas de las 4

formulaciones de cerveza, incluyendo el contenido de alcohol, resultados correspondientes al inicio y durante la fermentación, así como después de la maduración.

Tabla 7. Características fisicoquímicas de los mostos (100% cebada malteada y 70% cebada maltada +30% quinua).

Levadura	Características fisicoquímicas de los mostos				
	Formulación	Tiempo de fermentación (días)	pH	Gravedad específica	Sólidos solubles (°Brix)
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	100% de cebada malteada (E1)	0	5.78±0.00 ^a	1.040±0 ^a	11.9±0.8 ^a
	70% de cebada malteada y 30% de quinua sin maltear (E3)	0	5.96±0.00 ^b	1.032±0 ^b	8.7±0.3 ^b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100% de cebada malteada (E2)	0	5.81±0.04 ^a	1.039±0 ^a	12.3±0.1 ^a
	70% de cebada malteada y 30% de quinua sin maltear (E4)	0	5.84±0.00 ^b	1.032±0 ^b	10.4±0.0 ^b

*Valores en la misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$); $n=2$ (duplicados)

2.2.1 Características de los mostos

En la tabla 7 se reporta el nivel del pH para los mostos recién preparados, es decir, antes de inocular la levadura (tiempo 0 días). Para el caso de las combinaciones E1 y E2 las cuales están basadas en un sustrato con 100% de cebada malteada en el mosto, se observa que el nivel de pH fue de 5.78±0.00 y 5.81±0.04 respectivamente, mientras que las combinaciones E3 y E4, las cuales están basadas en un sustrato con 70% de cebada malteada y 30% de quinua sin maltear, tuvieron un pH de 5.96±0.00 y 5.84±0.00 respectivamente. El efecto del sustrato permitió observar que las diferencias de pH fueron significativas ($p < 0.05$), razón por la cual se puede inferir que la sustitución parcial de quinua

(30%) en el sustrato afectó levemente la acidez del mosto, más específicamente elevando ligeramente el nivel de pH alcanzado para el día 0, es decir, antes de la inoculación de la levadura.

Este efecto de la adición de quinua en mostos cerveceros ha sido reportado previamente. De acuerdo con Kordialik-Bogacka et al. (2018), la inclusión de quinua sin maltear aumenta el pH del mosto, siendo este aumento proporcional a la cantidad de quinua incluida en la formulación (dentro del rango estudiado de 10% a 30%). Así el mosto de una cerveza elaborada con 100% de cebada malteada tuvo un pH de 5.68 ± 0.04 , mientras que con una sustitución del 30% se tuvo un pH de 5.91 ± 0.05 . En contraste Castañeda Terán, (2015) reportó que la sustitución del 35% de cebada por quinua resultó en un pH del mosto de 5.25 ± 0.35 , lo cual indica que pueden existir otros factores que afecten el pH del mosto, destacando que en ninguno de los dos estudios se reporta la variedad de quinua empleada.

En términos generales el pH para los diferentes mostos estuvo entre 5.80-5.90, valores que son cercanos al nivel máximo adecuado para el inicio de la fermentación con *S. cerevisiae* si se tiene en cuenta que la levadura puede desempeñarse en intervalos de pH que van desde 4.5-5.8 (Denby et al., 2018; González, 2017; Mosher & Trantham, 2017). Para el caso del uso de la levadura *S. ludwigii*, se ha reportado un desempeño adecuado para un rango de pH comprendido entre 5.2 y 5.7, en mostos empleados para la obtención de cervezas con bajo contenido en alcohol (Bellut et al., 2018; De Francesco et al., 2015; Michel, Meier-Dörnberg, et al., 2016). No obstante, Rodríguez Cruz (2015) fijó el nivel de pH inicial en valores de 5 y 6, en mostos preparados con una sustitución parcial de 25% de quinua, identificando que el desempeño de la fermentación no se vio alterado significativamente, lo cual sugiere que el rango de pH obtenido para los mostos en el presente estudio es adecuado y consistente con los reportes de otros autores para esta etapa.

En cuanto a la gravedad específica de los mostos, en la tabla 7 se puede observar para el caso de las combinaciones E1 y E2 (100% cebada) que el valor fue de 1.040 y 1.039, respectivamente, mientras que las combinaciones E3 y E4 (sustitución de cebada por quinua) presentaron una gravedad específica de 1.032. El análisis estadístico muestra que

existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los dos tipos de mostos, lo que indica que la sustitución parcial de quinua (30%) en el sustrato afectó la gravedad específica del mosto.

La gravedad específica está relacionada con el contenido de sólidos disueltos en el mosto, que en general corresponden a los azúcares que han sido liberados en la etapa de maceración. En particular conviene mencionar que en los mostos tradicionales las gravedades específicas iniciales bajas pueden contribuir a la obtención de cervezas con bajo contenido de alcohol, por ejemplo, si la gravedad específica inicial es de 1.042 (10.37°P) el contenido de alcohol puede ser de 3.30%, 1.048 (12°P) puede fermentar para producir cervezas con un contenido de etanol del 5%, mientras que valores de 1.074 (18°P) pueden alcanzar concentraciones de 7.5% de etanol y gravedades de 1.105 (24.76°P) llegan a 9.96% de etanol, esto ocurre tanto para las cervezas tipo *Ale* (*S. cerevisiae*) como las *Lager* (*S. pastorianus*) en diferentes estilos de cervezas comerciales europeas (Maudoux et al., 1998; Puligundla et al., 2020). Para el caso de este trabajo, el rango en el que se encontró esta propiedad fue de 1.032-1.040, valores adecuados conforme a lo expresado por Bellut et al. (2019) y Callejo et al. (2019) en estudios realizados con varias cepas de *S. ludwigii*, donde se prepararon mostos con gravedades específicas entre 1.020 y 1.060. En contraste, para la elaboración de una cerveza con un contenido de alcohol convencional es usual que la gravedad específica inicial del mosto esté entre 1.020-1.076 (Callejo et al., 2019; González, 2017).

En estudios donde también se realizaba una sustitución parcial de quinua sin maltear, pero al 35%, como el realizado por Castañeda Terán (2015), se muestra que el mosto alcanza una gravedad específica de 1.053, siendo este un valor relativamente cercano al límite superior del rango obtenido en el presente trabajo, teniendo en cuenta que hay un 5% más de quinua en el estudio mencionado. De manera similar, Kordialik-Bogacka et al. (2018) realizan una sustitución parcial al 30% con quinua, obteniendo una gravedad específica de 1.048. Así pues, se evidencia que los valores obtenidos de los mostos estuvieron dentro del rango que reportan los estudios relacionados a la baja producción de alcohol en la elaboración de cerveza, pero por debajo de lo que usualmente ocurre con una cerveza tradicional, con y sin quinua.

Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusión de quinua

En la tabla 7 se pueden observar los sólidos solubles en términos de la medición en °Brix para los mostos recién preparados; para el caso de las combinaciones E1 y E2 (100% cebada), se observa que los °Brix fueron de 11.9 ± 0.8 y 12.3 ± 0.1 , respectivamente, mientras que las combinaciones E3 y E4 (con sustitución parcial de quinua) presentaron un valor de 8.7 ± 0.3 y 10.4 ± 0.00 respectivamente. Se evidenciaron diferencias significativas, es decir, la sustitución parcial de quinua (30%) en el sustrato disminuyó significativamente los sólidos solubles en el mosto y, adicionalmente, comparado con el empleo de cebada, esta materia prima aportó una mayor variabilidad al mosto en este aspecto, posiblemente debido a una menor homogeneidad respecto al uso de cebada previamente malteada. Debido a que la finalidad del trabajo es la elaboración de un producto con bajo contenido de alcohol, en el caso de un mosto con inclusión de quinua que presenta menor contenido de sólidos solubles facilita la producción de poco etanol ya que hay una menor presencia de carbohidratos hidrolizables.

Tabla 8. Características fisicoquímicas de cervezas elaboradas empleando dos tipos de mosto (100% cebada malteada y 70% cebada maltada +30% quinua) y dos especies de levadura (*S. ludwigii* y *S. cerevisiae*) durante la fermentación.

Levadura	Características fisicoquímicas durante la fermentación					
	Formulación	Tiempo de fermentación (días)	pH	Gravedad específica	Sólidos solubles (°Brix)	Contenido de alcohol
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	100% de cebada malteada (E1)	0	5.78 ± 0.00	1.040 ± 0^a	11.9 ± 0.8^a	4.48 ± 0.30
		1	5.69 ± 0.04	1.039 ± 0^a	11.0 ± 0.1^a	
		5	5.24 ± 0.25	1.034 ± 0^a	10.7 ± 0.2^a	
		10	4.70 ± 0.00	1.022 ± 0^a	8.1 ± 2.3^a	
	70% de cebada malteada y 30% de quinua sin maltear (E3)	0	5.96 ± 0.00	1.032 ± 0^{ab}	8.7 ± 0.3^{ab}	3.09 ± 0.15
		1	5.39 ± 0.04	1.027 ± 0^{ab}	8.1 ± 0.0^{ab}	
		5	4.67 ± 0.04	1.014 ± 0^{ab}	6.1 ± 0.0^{ab}	
		10	4.76 ± 0.00	1.010 ± 0^{ab}	5.1 ± 0.0^{ab}	

Levadura	Características fisicoquímicas durante la fermentación					
	Formulación	Tiempo de fermentación (días)	pH	Gravedad específica	Sólidos solubles (°Brix)	Contenido de alcohol
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100% de cebada malteada (E2)	0	5.81±0.04	1.039±0 ^{ab}	12.3±0.1 ^{ab}	5.40±2.32
		1	5.27±0.21	1.038±0 ^{ab}	10.6±2.1 ^{ab}	
		5	4.97±0.04	1.005±0 ^{ab}	5.5±0.8 ^{ab}	
		10	5.03±0.04	1.005±0 ^{ab}	5±0.00 ^{ab}	
	70% de cebada malteada y 30% de quinua sin maltear (E4)	0	5.84±0.00	1.032±0 ^b	10.4±0.00 ^b	3.55±0.50
		1	4.91±0.04	1.013±0 ^b	5.5±0.8 ^b	
		5	4.94±0.08	1.009±0 ^b	5.5±0.7 ^b	
		10	4.97±.13	1.010±0 ^b	5.0±0.0 ^b	

*Valores en la misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$); n=2 (duplicados)

2.2.2 pH durante la fermentación

En la tabla 8 se reportan los niveles de pH durante los diferentes días de seguimiento de la fermentación para las combinaciones utilizadas. Se observa que para todas las combinaciones trabajadas se presentó una tendencia de disminución del pH, como es de esperar en fermentaciones alcohólicas anaeróbicas mediadas por levaduras. El proceso de fermentación con la levadura *S. ludwigii* en los dos mostos preparados inició con un nivel de pH promedio de 5.87 y finalizó en 4.73, mientras que, para la levadura *S. cerevisiae* inició en 5.83 y finalizó en 5.00 también en los dos mostos, esto muestra que se presentó una tendencia a disminuir de este parámetro durante el proceso para las dos levaduras utilizadas. Al comparar el valor de pH entre las dos cepas y las dos formulaciones para cada día de la fermentación, no se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ninguna de las combinaciones respecto a la variación de pH a través del tiempo.

Los niveles de pH que alcanzan los mostos al final del proceso de fermentación son niveles en los que el crecimiento de las levaduras se podría ver afectado, ya que en estas condiciones el metabolismo puede ocurrir más lentamente. El descenso del pH fue más notable en aquellos mostos que fueron inoculados con la levadura *S. ludwigii*, en particular a los 10 días de la fermentación independientemente de la combinación utilizada en el sustrato. Estos valores son semejantes a los reportados por Bellut et al. (2018), en un estudio en el cual se llevó a cabo la fermentación empleando cebada como sustrato y la levadura *S. ludwigii*, obteniéndose un nivel final de 4.76. Esta disminución en el pH se ha descrito ampliamente y esta asociada al metabolismo de la levadura, dado que conforme esta se va desarrollando va consumiendo el sustrato produciendo un aumento en la cantidad de dióxido de carbono, lo cual implica una acidificación del medio, también contribuye en este efecto la transformación de aminoácidos, el consumo de fosfatos primarios y la absorción de iones de amonio y potasio (Kunze, 2006; Suárez, 2013).

2.2.3 Gravedad específica durante la fermentación

En la tabla 8 se puede observar la gravedad específica para los diferentes días de seguimiento de la fermentación para las combinaciones utilizadas. En todas ellas se presentó una tendencia de disminución de la gravedad específica. Al analizar si todas las combinaciones posibles sustrato-levadura presentaban diferencias significativas respecto a la gravedad específica a través del tiempo de fermentación, se evidenció que únicamente las combinaciones E1 (*S. ludwigii*+100% de cebada malteada) y E4 (*S. cerevisiae*+quinua) son diferentes desde el punto de vista estadístico ($p < 0.05$), combinaciones que no tenían sustratos de composición similar ni empleaban la misma levadura.

El efecto de la levadura sobre el cambio en la gravedad específica durante la fermentación fue más marcado al emplear la levadura *S. cerevisiae*, dado que con esta levadura y un sustrato basado en 100% de cebada se inició con un valor de gravedad específica de 1.039 y se finalizó con uno de 1.005, mientras que al incluir quinua en el sustrato se inició en 1.032 y finalizó en 1.010, esto representa un cambio en promedio para los dos sustratos de 0.028 unidades de la gravedad específica. Por su parte con la levadura *S. ludwigii* y un sustrato basado en 100% de cebada malteada inició con un valor de gravedad específica

de 1.040 y se finalizó con uno de 1.022, mientras que al incluir quinua inició en 1.032 y finalizó en 1.010, esto representa en promedio un cambio de 0.020 unidades de la gravedad específica, lo cual es menor al cambio descrito anteriormente para *S. cerevisiae*.

Los resultados anteriormente detallados son contrarios a los descritos por De Francesco et al., (2015) para un estudio realizado con cepas de la levadura *S. ludwigii*, dado que estas redujeron solo 0.008 unidades de gravedad específica (<2 kg/hL), lo cual implica un consumo aún más bajo de azúcares después de 10 días de fermentación, lo cual sugiere que la cepa de *S. ludwigii* utilizada en ese estudio casi no metabolizaba maltosa, ya que el descenso en la gravedad específica fue mucho menor en un mosto elaborado en su totalidad con malta base tipo *Pilsner*, muy similar a la utilizada en el presente estudio.

El efecto del sustrato sobre el cambio en la gravedad específica durante la fermentación fue más marcado al emplear 100% de cebada malteada, representando un cambio en promedio de 0.026 unidades de gravedad específica. Por su parte cuando se empleó un sustrato con sustitución parcial de cebada por quinua se presentó un cambio promedio de 0.022 unidades de gravedad específica, estadísticamente no existieron diferencias significativas para la gravedad específica en los mostos de diferente sustrato, a pesar de esto el cambio fue ligeramente más bajo con la sustitución del sustrato, lo cual implica que la inclusión de quinua no afecta fuertemente el consumo del sustrato. Teniendo en cuenta esto, se pueden ajustar las condiciones de la maceración para definir un perfil de azúcares más conveniente.

Finalmente conviene resaltar que la gravedad específica fue considerablemente mayor al final de la fermentación para el ensayo E1 (fermentación con *S. ludwigii* y 100% cebada malteada) en comparación con las demás combinaciones utilizadas, esto puede implicar que al final del proceso aún permanecían azúcares sin fermentar en el mosto. Este comportamiento puede ser explicado por dos posibles efectos; en primer lugar, el mosto basado en cebada malteada tenía la mayor gravedad específica inicial con respecto al mosto que utilizaba cebada en combinación con quinua, además, la levadura *S. ludwigii* no puede fermentar la maltosa y maltotriosa, que son componentes mayoritarios de los mostos.

2.2.4 Sólidos solubles durante la fermentación

En la tabla 8 se pueden observar los °Brix para los diferentes días de seguimiento de la fermentación, para las combinaciones utilizadas. Se observa que para todas las combinaciones trabajadas se presentó una tendencia de disminución de los °Brix, pero solo se presentaron diferencias significativas entre las combinaciones E1 (S. *ludwigii*+100% de cebada) y E4 a través del tiempo; este comportamiento apoya los resultados obtenidos para la gravedad específica ya que son parámetros que se encuentran relacionados porque tienen la capacidad de dar una medición aproximada de los azúcares disueltos en el mosto, que para esta instancia del proceso han disminuido considerablemente respecto a los valores iniciales.

Tabla 9. Características fisicoquímicas de cervezas elaboradas empleando dos tipos de mosto (100% cebada malteada y 70% cebada maltada +30% quinua) y dos especies de levadura (S. *ludwigii* y S. *cerevisiae*) después de la maduración.

Levadura	Características fisicoquímicas después de maduración				
	Formulación	Tiempo de fermentación (días)	pH	Gravedad específica	Sólidos solubles (°Brix)
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	100% de cebada malteada (E1)	Después de maduración	4.67±0.13	1.016±0 ^a	6.5±0.7 ^a
	70% de cebada malteada y 30% de quinua sin maltear (E3)	Después de maduración	4.64±0.00	1.009±0 ^b	5±0.0 ^b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100% de cebada malteada (E2)	Después de maduración	5.03±0.04 ^a	1.004 ±0	5±0.7
	70% de cebada malteada y 30% de quinua sin maltear (E4)	Después de maduración	4.88±0.08 ^b	1.004±0	4.6±0.0

*Valores en la misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes, con respecto a la levadura ($p < 0,05$); n=2 (duplicados)

2.2.5 Propiedades fisicoquímicas de las cervezas después de la maduración

En la tabla 9 se reporta el nivel del pH para la cerveza después de 2 semanas de maduración. Para el caso de las combinaciones E1 y E2 (100% cebada) se observa que el nivel de pH al cabo de la maduración fue de 4.67 ± 0.00 y 5.03 ± 0.04 respectivamente, mientras que las combinaciones E3 y E4 (sustitución parcial con quinua), tuvieron un pH de 4.64 ± 0.00 y 4.88 ± 0.08 respectivamente. El análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas en el nivel de pH al cabo de la maduración al comparar el efecto del sustrato, lo que sugiere que la inclusión de quinua no influencia el pH final después de la maduración. Por otro lado, al comparar el efecto de la levadura sí existieron diferencias encontrándose que el nivel más alto del pH fue de cuando se empleó la levadura *S. cerevisiae*.

En la tabla 9 se puede observar la gravedad específica para la cerveza después de 2 semanas de maduración. Para el caso de las combinaciones E1 y E2 (100% cebada) se observa que la gravedad específica fue de 1.016 y 1.004 respectivamente, mientras que las combinaciones E3 y E4 (sustitución parcial con quinua) presentaron una gravedad específica de 1.009 y 1.004. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0.05$) al comparar el efecto del sustrato, razón por la cual se puede inferir que la sustitución parcial de quinua (30%) en el sustrato no tiene un efecto importante sobre la gravedad específica en la cerveza. Por otro lado, comparando el efecto de la levadura sí existieron diferencias, siendo la gravedad específica más alta cuando se empleó la levadura *S. ludwigii*, implicando un menor consumo de azúcares por ese microorganismo.

Con relación a los sólidos solubles de la cerveza (tabla 7) para las combinaciones E1 y E2 (100% cebada), se obtuvieron valores de °Brix de 6.5 ± 0.7 y 5.0 ± 0.7 , respectivamente, mientras que para las combinaciones E3 y E4 (sustitución por quinua), presentaron un valor de °Brix de 5.0 ± 0.1 y 4.6 ± 0.1 , respectivamente. Desde el punto de vista estadística no se presentaron diferencias significativas. Sin embargo, se destaca la tendencia más allá del nivel de significancia, al final de la maduración los °Brix fueron mayores en las combinaciones con 100% de cebada, así como en las que utilizaban la levadura *S. ludwigii*,

lo cual puede estar asociado a la menor capacidad que tiene este microorganismo para asimilar azúcares como la maltosa, como se ha mencionado anteriormente.

2.2.6 Contenido de etanol en la cerveza

Los análisis para la determinación del contenido de alcohol observados en la tabla 8 mostraron que la graduación alcohólica de las cervezas fermentadas con *S. cerevisiae* estuvieron dentro de los valores esperados para este tipo de bebidas, y que tanto el uso de la levadura *S. ludwigii* como el reemplazo parcial de cebada por quinua, favorecieron un menor contenido alcohólico. Para las cervezas elaboradas con 100% de cebada malteada (E1) se obtuvo como resultado que la fermentación con la levadura *S. ludwigii* tuvo un $4.48 \pm 0.30\%$ de etanol, inferior al hallado con la levadura *S. cerevisiae* (E2) cuyo contenido de alcohol alcanzó $5.40 \pm 2.32\%$. Por otro lado, la combinación de 70% de cebada malteada y 30% de quinua sin maltear con la levadura *S. ludwigii* (E3) obtuvo un $3.09 \pm 0.15\%$ de etanol, mientras que la combinación de 70% de cebada malteada y 30% de quinua sin maltear con la levadura *S. cerevisiae* (E4) obtuvo un $3.55 \pm 0.50\%$ de alcohol.

No obstante, los valores de concentración de etanol obtenidos con *S. ludwigii* fueron superiores a los esperados. En estudios realizados con el fin de producir cervezas con bajo contenido de alcohol, en el que se emplearon diferentes cepas de la especie *S. ludwigii* se identificó que la producción de etanol estuvo entre 0.51-1.36% (Bellut & Arendt, 2019; De Francesco et al., 2015); es decir, valores notablemente inferiores a los obtenidos en el presente estudio, los cuales se encontraron por encima del 3% v/v para ambos tipos de mosto. Esto podría ser debido, al menos en parte, a que la cepa de levadura empleada fue diferente a las utilizadas en los estudios mencionados. De hecho, también se han reportado valores de hasta $6.88 \pm 0.1\%$ v/v de alcohol para la cepa *RIVE 16-1-5* de la misma especie, esto empleando un mosto basado en jugo de manzana (Waldir Estela-Escalante, Mojmír Rychtera et al., 2011). Lo anterior indica la alta especificidad de la cantidad de etanol obtenida durante el proceso de fermentación mediado por *S. ludwigii* en función de la composición de azúcares del sustrato. Es posible que la etapa de maceración realizada en la presente investigación, se haya dado en un tiempo suficiente para causar una hidrólisis de la maltosa en glucosa, siendo este último azúcar de más fácil asimilación por parte de la levadura.

En cuanto a las cervezas fermentadas con la levadura *S. cerevisiae* y mosto de 100% de cebada malteada en condiciones similares a las del presente estudio, se observó que el contenido de alcohol puede estar entre 5.11-5.40% (Kordialik-Bogacka et al., 2018; Rodriguez Cruz, 2015); por su parte, en un estudio donde se elaboró una cerveza negra tipo *Ale American Stout*, cuya diferencia está en las cebadas empleadas, tuvo un contenido de etanol de 3.41% de acuerdo a Vargas, (2012). Esto indica que el proceso de fermentación realizado se ajustó a lo reportado dado que el contenido de etanol fue de $5.40 \pm 2.32\%$ v/v.

El efecto de la sustitución parcial de cebada malteada por quinua sin maltear estuvo acorde a lo reportado previamente en la literatura; por ejemplo Kordialik-Bogacka et al. (2018) encontraron que una sustitución del 10% de cebada malteada por quinua sin maltear genera un contenido de alcohol de $5.20 \pm 0.3\%$, mientras que sustituciones del 20% y del 30% generan contenidos de alcohol de $4.90 \pm 0.4\%$ y de $4.90 \pm 0.3\%$ respectivamente. Otros autores observaron contenidos de alcohol en la cerveza entre 4.08-4.55% cuando la sustitución parcial fue del 25% (Marquez Farias, 2015; Rodriguez Cruz, 2015); contenidos de 5.33% cuando la sustitución es del 35%, mientras con un rango más amplio para la sustitución con quinua, incluso del 50% se puede encontrar producción de etanol entre 3.61 ± 0.13 y $5.33 \pm 0.07\%$, esto modificando condiciones en la maceración (Castañeda Terán, 2015). En general la inclusión de quinua puede disminuir el contenido de etanol, pero esta tendencia puede variar teniendo en cuenta la variedad de quinua, la cepa de levadura utilizada y las condiciones del proceso.

De acuerdo a los resultados para el contenido de alcohol, se determinó que todas las muestras cumplen con los parámetros especificados por Ministerio de Salud para el contenido de etanol en cerveza artesanal. Sin embargo, los valores obtenidos no son suficientemente bajos para que el producto pueda ser considerado como una bebida de bajo contenido de alcohol de acuerdo con los estándares internacionales (Montanari et al., 2008). Algunas alternativas para poder llevar este contenido de alcohol a los niveles deseados son la exploración de otras cepas de la *S. ludwigii*, mayor sustitución de cebada por quinua y posiblemente cambios en la temperatura de maceración.

2.2.7 Análisis microbiológico de las cervezas

En la tabla 8 se muestran los resultados de la evaluación de la calidad microbiológica de las cuatro formulaciones por duplicado (dos muestras obtenidas de manera independiente de cada tratamiento: E1-E4). Como se puede observar en la tabla 8, el análisis microbiológico de las 4 combinaciones y sus duplicados permitió identificar que 2 de las 8 muestras de cervezas elaboradas presentaron un recuento importante de coliformes (en ambos casos se trató de cervezas con mosto de 100% cebada malteada), indicando así que estaban contaminadas y por lo tanto debieron ser retiradas de las pruebas sensoriales. Las 6 cervezas restantes tenían una presencia elevada de aerobios mesófilos y levaduras. Aunque los conteos de aerobios mesófilos se encuentran por encima de los requisitos microbiológicos de la NTC 3854 (ICONTEC, 1996a) esto se debe en parte al conteo de levaduras. Estas muestras pueden ser consumidas, de acuerdo con Amaya & Pascagaza, (2019) y M. P. E. Vargas, (2017), quienes hacen mención a la aplicación específica de la norma en el sentido que aplica específicamente para cervezas pasteurizadas y que han sido sometidas a procesos de microfiltración (industriales). En este caso, la cerveza elaborada se filtró, pero no recibió un proceso de microfiltración, ni se pasteurizó, lo cual posiblemente insidó en el recuento de aerobios mesófilos y levaduras.

Tabla 10. Análisis microbiológico de las cervezas artesanales y sus duplicados.

Requisito/Cerveza	E1 <i>S.ludwigii</i> -100% de cebada malteada		E2 <i>S.cerevisiae</i> - 100% de cebada malteada		E3 <i>S. ludwigii</i> -30% de quinua sin maltear		E4 <i>S. cerevisiae</i> - 30% de quinua sin maltear	
	E1	E1D	E2	E2D	E3	E3D	E4	E4D
Coliformes totales (NMP)	23	<3	460	<3	<3	<3	<3	<3
Coliformes fecales (NMP)	23	<3	460	<3	<3	<3	<3	<3
Aerobios mesófilos Resultados UFC/mL	12.5*10 ⁶	110*10 ⁶	70*10 ⁴	44*10 ⁵	1,5*10 ⁴	30*10 ⁴	81*10 ⁴	62*10 ⁴
Levaduras Resultados UFC/mL	16*10 ⁶	188*10 ⁶	69*10 ⁴	45*10 ⁴	1*10 ⁴	1*10 ⁴	10*10 ⁵	82*10 ⁴

*La letra D hace referencia a "duplicado"; por ejemplo, E1D es una réplica de E1.

Límite para mesófilos ≤ 100 UFC/100cm³ y límite para mohos y levaduras de ≤ 20 UFC/100cm³.

2.2.8 Perfil de azúcares en las cervezas elaboradas

En la tabla 9 se puede observar la concentración promedio de la glucosa, maltosa y maltotriosa para cada formulación de cerveza al inicio (día 1) y final (día 10) de fermentación. El primer día de fermentación se evidenció la presencia de los tres azúcares en las cervezas. Para los productos que se elaboraron a partir de 100% de cebada malteada (E1 y E2) la concentración de maltotriosa y maltosa es mayoritaria con respecto a las combinaciones realizadas con sustitución de quinua (E3 y E4). Esta diferencia es más notoria en maltosa porque la cebada malteada posee mayor concentración de este disacárido que la quinua debido a que posee menos almidón un mosto que use este pseudocereal, (Bellut et al., 2019; Kordialik-Bogacka et al., 2018), lo cual es consecuente con lo esperado ya eran las etapas iniciales de la fermentación.

La concentración de glucosa fue mayor en la cerveza cuyo sustrato fue sustituido parcialmente por 30 % de quinua (17.8 mg/mL), similar a lo encontrado en el estudio llevado a cabo por Bellut et al. (2019) en el que los mostos preparados a base de diferentes pseudocereales, entre ellos la quinua (13.7 mg/mL), mostraron una cantidad significativamente mayor de glucosa que otro cereal, haciendo este azúcar el más abundante fermentable de los mostos. La combinación E4 (*S. cerevisiae*+quinua) fue la única que después de 24 h no presentó concentración de glucosa, lo cual pudo deberse al efecto combinado de una baja concentración de azúcares debido a la inclusión de quinua y al uso de una levadura que realiza el proceso de fermentación de azúcares simples como la glucosa de una manera rápida.

Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusión de quinua

Tabla 11. Concentración de azúcares y contenido de etanol en las 4 formulaciones para el día 1 y 10 de fermentación.

Día	Concentración de azúcares (mg/mL)		
	Maltotriosa	Maltosa	Glucosa
E1			
<i>S. ludwigii</i>-100% de cebada malteada			
1	20.858±0.001	62.039±0.000	7.508±0.000
10	18.201±0.001	45.577±0.000	N.D.
E2			
<i>S. cerevisiae</i>-100% de cebada malteada			
1	16.969±0.001	51.538±0.000	8.014±0.000
10	N.D.	N.D.	N.D.
E3			
<i>S. ludwigii</i>-30% de quinua sin maltear			
1	12.525±0.689	19.740±5.748	17.825±0.657
10	7.294±1.277	0.629±1.176	N.D.
E4			
<i>S. cerevisiae</i>- 30% de quinua sin maltear			
1	8.232±0.580	5.102±7.456	N.D.
10	5.411±0.729	N.D.	N.D.

N.D.: no detectado (límite de detección 0.03 mg/mL para glucosa, maltosa y maltotriosa)

Por su parte, el día final de la fermentación ocurrió una disminución de la concentración de los azúcares en todas las formulaciones. Las combinaciones inoculadas con la levadura *S. cerevisiae* (E2 y E4) presentaron la mayor disminución de azúcares; la glucosa fue el primer azúcar en ser consumido en su totalidad por todas las combinaciones, esto es de esperar ya que ninguna levadura tiene algún tipo de limitación a la hora de consumir glucosa como ocurrió en el estudio llevado a cabo por Bellut et al., (2018). La maltosa y maltotriosa fueron consumidas totalmente de acuerdo a lo esperado, sin embargo, cuando se realizó la inclusión de quinua solo se consumió el 34% de la maltotriosa que quedaba luego de la rápida fermentación en el día 1.

En cuanto a las cervezas inoculadas con *S. ludwigii*, en la formulación con 100% de cebada malteada (E1) la levadura consumió el 26.5% de maltosa y el 12.7% de maltotriosa del contenido inicial, en la formulación con 70% de cebada malteada y 30% de quinua sin maltear (E3) consumió el 96.8% de maltosa y el 40.2% de maltotriosa del contenido inicial. Teniendo en cuenta esto, la cepa *WLP618* de la especie *S. ludwigii* no fue completamente incapaz de fermentar maltosa y maltotriosa, sin embargo, sí lo hizo en menor medida en

comparación a las combinaciones en las que se había inoculado con la *S. cerevisiae*; no es posible descartar que esta fermentación haya ocurrido debido en parte a la contaminación por otro organismo que estuviese en la cerveza y que haya fermentado azúcares que la levadura *S. ludwigii* no podía.

Al comparar el efecto de la levadura sobre el contenido de alcohol en la cerveza no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$), situación similar al comparar el efecto del sustrato. Esto quiere decir que el tipo de levadura no influyó el nivel de etanol en la cerveza, sin embargo, es claro que las cervezas que presentaron menor contenido de etanol fueron las elaboradas con un sustrato con quinua. Por otro lado, los niveles de etanol alcanzados por aquellas combinaciones elaboradas con *S. ludwigii* no fueron lo suficientemente bajos para ser consideradas cervezas de bajo contenido en alcohol, posiblemente debido a que logro fermentar una parte de maltosa presente en los mostos, generando que se produjera más alcohol del esperado. Esto podría llegar a ocurrir dependiendo de la cepa de levadura empleada, como es el caso del estudio realizado por Boundy-Mills et al., (2011), en el que se estudió el crecimiento en agar con un extracto de malta del 5% y un crecimiento en caldo para las mismas condiciones para la cepa *CBS 821*, en donde encontraron que al cabo de 1 mes se había formado sedimento y un anillo pudiendo indicar que hubo un consumo de este carbohidrato, sin embargo, debido a que no muestra un consumo más alto, concluyen que no es capaz de crecer en un medio rico en maltosa. Aun se deben realizar más estudios sobre el crecimiento en estos medios para la cepa de *S. ludwigii* empleada en este trabajo.

3. Análisis sensorial

Este capítulo muestra los resultados obtenidos en la evaluación sensorial de las cervezas tipo *Ale*, elaboradas empleando diferentes combinaciones levadura-sustrato que incluyeron, como alternativas a las formulaciones convencionales, el uso de una cepa de levadura *S. ludwigii* y la utilización de un sustrato que incluía quinua sin maltear. Con la realización de los análisis sensoriales se buscó identificar cuáles de las combinaciones utilizadas generan un producto con la mayor aceptación sensorial, para así comparar la aceptabilidad de las formulaciones que incluyeron levadura y/o sustrato alternativo, frente a un producto más convencional, realizando para ello métodos afectivos en los que no se requiere entrenamiento o experiencia por parte de los panelistas.

En primer lugar, se realizó una prueba de aceptación general usando una escala hedónica con la cual se buscó identificar el nivel de gusto o rechazo; esta herramienta implica el uso de uno o más sentidos, para lo cual se emplean jueces no entrenados (consumidores) (Espinosa, 2000). Para los test afectivos de aceptación sensorial en los que se tienen datos no paramétricos comúnmente se utiliza la prueba de *Kruskal-Wallis*, este es un test de rangos múltiples de diferencias en tendencia central que permite el análisis de los datos obtenidos reemplazados por categorías de más de 3 muestras independientes basadas en datos clasificados, comúnmente es utilizado en conjunto con el test de *Mann-Whitney* o puede ser considerado una extensión de este, el cual es aplicado a pares de datos para determinar diferencias significativas entre pares de resultados (Granato et al., 2014; Van der Hoeven et al., 2013).

El estadístico de *Kruskal-Wallis* se representa como:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1) \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

k= Grupos (productos)

n= Número de observaciones por grupo (jueces)

Ri= Suma de rangos para cada uno de los grupos

N= Número total de observaciones entre todos los grupos

Este test compara las medianas, y las hipótesis son las siguientes:

$H_o =$ No existen diferencias en las respuestas obtenidas por los panelistas

$H_a =$ Al menos una respuesta es diferente

Donde:

Ho= Hipótesis nula

Ha= Hipótesis alterna

Cuando existen diferencias significativas es necesario realizar el test de *Mann-Whitney* para encontrar cuales muestras son diferentes. El estadístico se define como el mínimo de U1 y U2.

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

n1 y n2= Tamaños respectivos de cada muestra

R1 y R2= Suma de rangos de ambas observaciones

Adicionalmente, se realizó una prueba de ordenamiento por preferencia, con la cual se buscó determinar si los consumidores prefieren una muestra sobre otra, al ubicar las muestras en una escala numérica de preferencia. Para esta prueba, una herramienta

comúnmente utilizada es el test de *Friedman* o análisis de la varianza por rangos en datos ordinales, este test también es utilizado para determinar diferencias en la mediana de dos o más muestras relacionadas que presentan una ordenación, esto para pruebas unidireccionales con medidas repetidas y más de tres muestras dependientes, con el fin de determinar que productos son significativamente diferentes de otros se calcula la mínima diferencia significativa (DMS) para el nivel de confianza establecido (Castillo, 2013; Granato et al., 2014; Perez Guines et al., 2012; Rocha, 2019).

El estadístico de Friedman se representa de la siguiente manera (Domínguez, 2007; Espinosa, 2000)

$$x^2 = \left[\frac{12}{kJ(J+1)} * \sum T_j^2 \right] - 3k(J+1) \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

T= Número total de cada columna

J= Número de productos o columnas

k= Número de panelistas (juicios) o filas

Este test compara las medianas entre muestras

$H_o =$ No hay diferencias entre la suma de ordenaciones de las muestras

$H_a =$ La suma de las ordenaciones de la población no son iguales

$$DMS = Q \sqrt{\frac{kJ(J+1)}{12}} \quad \text{Ecuación 5}$$

Q= Valor tabulado según J y nivel de significancia

Posteriormente se calcula el valor modular de la diferencia de cada par de muestra y se compara con el DMS calculado

Si $|T_{i1} - T_{i2}| > DMS$ entonces hay diferencias significativas

Si $|T_{i1} - T_{i2}| < DMS$ no hay diferencias significativas

3.1 Metodología

3.1.1 Toma de datos

En la evaluación sensorial participaron voluntariamente 50 consumidores con edades comprendidas entre 21-81 años, de los cuales 22 personas se identificaron a sí mismas como mujeres y 28 como hombres. Las muestras de cerveza evaluadas fueron aquellas elaboradas en el presente estudio, codificadas como se describe en la tabla 6 (sección 2.1). A saber, las muestras E1 y E3 correspondieron a cervezas producidas por levadura *S. ludwigii* con mosto de cebada malteada 100% y con reemplazo de 30% por quinua, respectivamente, y las muestras E2 y E4 a las producidas con *S. cerevisiae*, cebada malteada 100% y con reemplazo de 30% por quinua, respectivamente.

Las muestras fueron proporcionadas a los panelistas a una temperatura entre 0-5°C, un volumen de 60 mL en copas venecianas (traslúcidas) desechables, equivalente a 2 tragos, de acuerdo a la NTC 4794 (ICONTEC, 2020), y entre cada muestra se ofrecieron galletas de soda y agua para reducir la interferencia en el sabor de una muestra con otra. Previo al comienzo de la prueba se entregó un formato de consentimiento informado en el cual se describía en qué consistía la prueba sensorial, el propósito de esta, el estado en el cual se encontraban las cervezas y cómo iban a ser utilizados los datos obtenidos. Los formatos utilizados para la aplicación de la prueba se pueden observar en el Anexo B.

Para la prueba de aceptabilidad general se hizo uso de una escala hedónica de 7 puntos con descriptores de aceptación: (7) *me gusta mucho*, (6) *me gusta bastante*, (5) *me gusta ligeramente*, (4) *ni me gusta ni me disgusta*, (3) *me disgusta ligeramente*, (2) *me disgusta bastante* y (1) *me disgusta mucho*; las formulaciones se codificaron usando números de 3 cifras para evitar que los panelistas hicieran relaciones entre las muestras, limitando sesgos de asociación.

De manera complementaria se realizó una prueba de ordenamiento por preferencia. Esta prueba consistió en asignar un valor numérico para determinar la formulación preferida usando las mismas codificaciones que en la prueba de aceptación general. El ordenamiento se realizó estableciendo el número 4 *para la cerveza más aceptable* y el número 1 *para la menos aceptable*, esto sin la posibilidad de repetir el número.

3.1.2 Análisis estadístico de datos

Con el fin de determinar si existen diferencias significativas para la aceptación general entre las cervezas elaboradas con diferentes combinaciones de sustrato-levadura, se empleó la prueba de *Kruskal-Wallis*, debido a la no parametricidad de los datos. Para identificar cuales combinaciones generaron cervezas con mayores diferencias se realizó la prueba de *Mann-Whitney*. Los análisis se llevaron a cabo usando el software *Minitab*® versión 21.1.

Teniendo en cuenta que los datos son no paramétricos los análisis se realizaron con métodos estadísticos que permitieron una mejor interpretación de estos, como lo es la prueba de *Friedman* para el ordenamiento por preferencia, realizada mediante el software *Minitab* versión 21.1. De existir diferencia entre las muestras es necesario identificar que pares de muestras son las que difieren, esto se hace calculando la diferencia mínima significativa (DMS; Ecuación 5) y se realiza la suma de rangos de cada muestra. Los cálculos fueron realizados utilizando *Office Excel* 2016.

3.2 Resultados y discusión

En las siguientes secciones se encuentran registrados los resultados del análisis sensorial de las 4 formulaciones de cerveza, incluyendo consideraciones acerca de la cantidad de personas que tuvieron opiniones positivas y negativas del producto, así como la formulación que fue mejor recibida y las posibles razones de ello.

Tabla 12. Resultados prueba de aceptación general para cervezas artesanales tipo *Ale* obtenidas con distintas combinaciones levadura-sustrato

Escala	Puntuación	Cervezas			
		<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>

		<i>S. ludwigii</i> - 100% de cebada malteada	<i>S.cerevisiae</i> - 100% de cebada malteada	<i>S. ludwigii</i> - 30% de quinua sin maltear	<i>S. cerevisiae</i> - 30% de quinua sin maltear
Me gusta mucho	7	8	19	7	10
Me gusta bastante	6	8	15	10	12
Me gusta ligeramente	5	14	13	19	18
Ni me gusta ni me disgusta	4	12	1	5	5
Me disgusta ligeramente	3	4	1	7	4
Me disgusta bastante	2	2	0	2	1
Me disgusta mucho	1	2	1	0	0
Totales		50	50	50	50

Los resultados observados en la tabla 10 corresponden a la aplicación de la prueba de aceptación en una escala hedónica de 7 puntos para las cervezas elaboradas. En las cervezas obtenidas con la combinación en la que se utilizó la levadura *S. ludwigii* con 100% de cebada malteada (E1) y la combinación con 100% de cebada malteada con la levadura *S. cerevisiae* (E2), se observó que el 60% y 94% de las personas expresaron aceptación por los productos respectivamente.

En cuanto a las formulaciones que contenían quinua en el sustrato, se observó que el 72% de los evaluadores mostraron una buena aceptación para el caso en el que la combinación utilizó la levadura *S. ludwigii* (E3), mientras que la combinación con la levadura *S. cerevisiae* (E4) tuvo una aceptación del 80%. Los resultados indican que la adición de quinua en el sustrato no afectó negativamente la calidad sensorial de la cerveza. De hecho, las cervezas con quinua se encuentran por encima del nivel medio de aceptabilidad, como ocurre en el estudio realizado (Kordialik-Bogacka et al., 2018). Sin embargo, la combinación E4 al presentar la mayor aceptación en conjunto con uno de los menores contenidos de etanol, podría ser la más adecuada para la obtención de un producto con bajo contenido de etanol que tenga el potencial de utilizarse comercialmente.

Con el propósito de identificar si las diferencias detectadas tienen significancia estadística se procedió a realizar los análisis respectivos. En primer lugar, se utilizó un test de

probabilidad de respuesta para verificar si los datos estaban distribuidos normalmente, obteniéndose que no lo estaban, lo cual confirmó la necesidad de aplicar una prueba no paramétrica para identificar si existían diferencias significativas en la aceptación de los productos evaluados. Luego de la aplicación del test de *Kruskal-Wallis* se evidencia que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) para la aceptación general de las cervezas, se rechaza la hipótesis nula en la que todos los productos tienen niveles de aceptación general iguales.

Con el fin de complementar el test, se realizó la prueba de *Mann-Whitney* para comparar la aceptación de las cervezas elaboradas con las diferentes combinaciones, evaluación que se realizó por pares de productos, el nivel de aceptación se puede identificar en la figura 6 y en la tabla 11 se observan los valores p obtenidos al realizar el test. Se encontró que existen diferencias significativas ($p < 0.00$) entre las combinaciones E1-E2 que son combinaciones con diferente levadura y un sustrato de 100% de cebada, también en las combinaciones E2-E3 que difieren tanto en levadura y sustrato, por último existen diferencias entre las combinaciones E2-E4 cuya única diferencia es el sustrato utilizado; esto quiere decir que el cambio en el sustrato y la levadura utilizados en el proceso sí es percibido y diferenciable por los panelistas, además se evidencia que la combinación mejor puntuada fue la E2 (*S. cerevisiae* + 100% de cebada), la cual corresponde a una combinación tradicional en la elaboración de cerveza.

En términos generales, los jueces no encontraron diferencias entre las formulaciones que utilizaron la levadura *S. ludwigii* (E1 y E3), productos que además presentaron el menor nivel de aceptación (me gusta ligeramente), mientras que las formulaciones elaboradas con la levadura *S. cerevisiae* (E2 y E4) si presentaron diferencias significativas, además tuvieron un mayor nivel de aceptación (me gusta bastante-me gusta ligeramente). Lo anterior muestra que, en cuanto al uso de levadura, hubo una preferencia por la cerveza cuya producción se asemeja al de una cerveza común, es decir, las personas perciben claramente cambios en el sabor del producto cuando la levadura cambia.

Tabla 13. Resultados del test de *Mann-Whitney* para la comparación de la aceptación de los productos obtenidos a partir de las diferentes combinaciones.

Combinación	Mediana	Valor p	Juicio
E1-E2	5--6	0	Existen diferencias
E1-E3	5--5	0.559	No existen diferencias
E1-E4	5--5	0.079	No existen diferencias
E2-E3	6--5	0	Existen diferencias
E2-E4	6--5	0.008	Existen diferencias
E3-E4	5--5	0.214	No existen diferencias

*Con un nivel de significancia α de 0.05

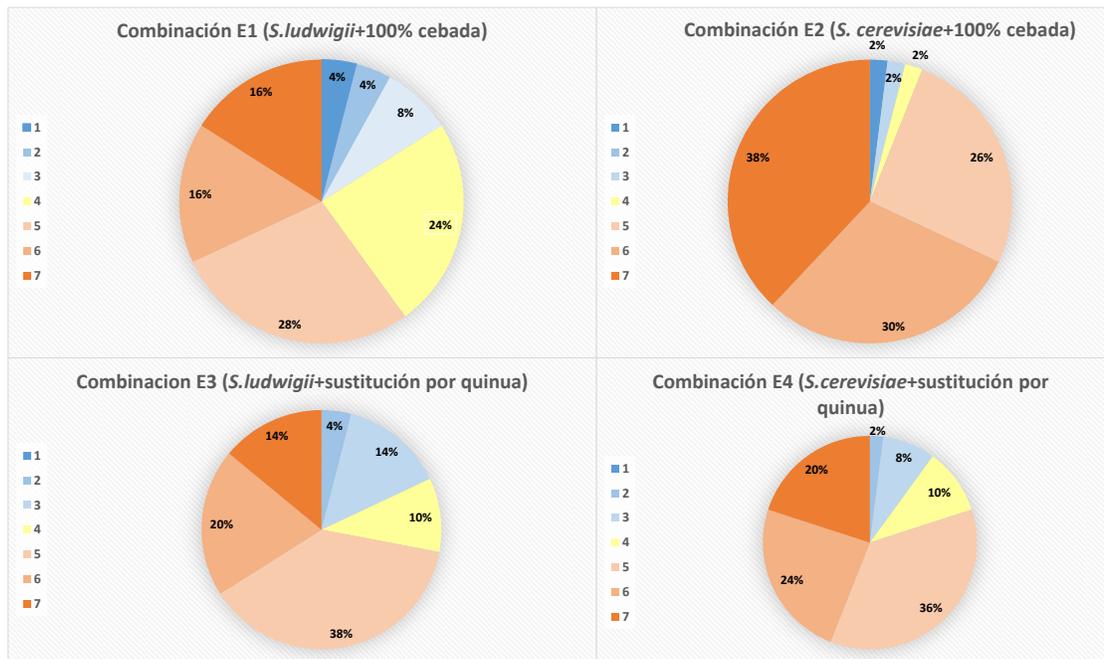


Figura 5. Resultados de la evaluación de la aceptabilidad general.

Si bien en general las 4 formulaciones obtuvieron indicadores de aceptabilidad (calificaciones de 5 o más en la escala hedónica) superiores al 60%, la más aceptada fue la cerveza E2 (*S. cerevisiae*+100% de cebada), cuya formulación es aquella de una receta estándar. Algunos panelistas lograron identificar olores descritos como ‘fuertes’ y ‘frutales’, indicaron un nivel de turbidez alto y diferenciaron claramente las cervezas elaboradas con

la levadura *S. ludwigii*. Por otra parte, los panelistas notaron sabores y aromas suaves en las cervezas que fueron elaboradas usando la levadura *S. cerevisiae*.

3.2.1 Prueba de ordenamiento por preferencia

Esta prueba se realizó con el propósito de confirmar cuales fueron los productos con mayor preferencia. Los resultados de la prueba de ordenamiento por preferencia pueden observarse en la tabla 12 y la figura 7. La formulación elaborada con la levadura *S. ludwigii* y 100% de cebada malteada fue aquella con la menor puntuación, con un 38% de los panelistas que le asignaron el número 1, es decir, la menos aceptable. Por otra parte, el 24% de personas, asignaron el valor de 1 a la combinación de esta levadura con quinua. Estos resultados confirmaron que el uso de *S. ludwigii* tuvo un efecto negativo en términos de la aceptabilidad y que, en comparación entre el uso de los dos tipos de sustratos, para esta especie de levadura, el reemplazo parcial de quinua tuvo un efecto positivo.

Los resultados obtenidos en la realización de esta prueba confirmaron que las combinaciones con la levadura *S. cerevisiae* tuvieron en general la mayor puntuación, especialmente la obtenida con la formulación tradicional de 100% de cebada malteada, mientras que, la combinación E4 fue evaluada como la segunda mejor. Si se considera E2 como un control (cerveza convencional), se podría suponer que la combinación *S. cerevisiae* y 30% de quinua sin maltear, fue la mejor evaluada entre los tratamientos alternativos.

Tabla 14. Resultados de ordenamiento por preferencia para las 4 formulaciones.

Código	1	2	3	4	Panelistas
E1	19	13	9	9	50
E2	7	7	9	27	50

E3	12	17	18	3	50
E4	12	13	14	11	50

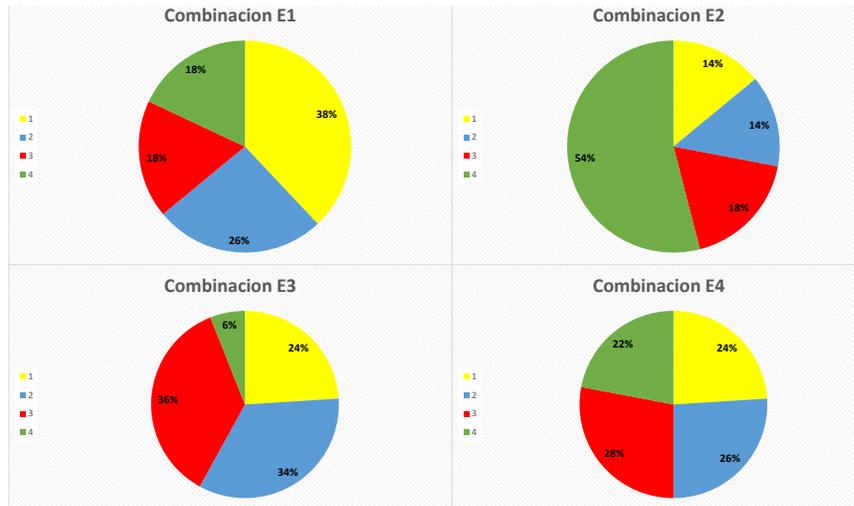


Figura 6. Ordenamiento por preferencia.

Tabla 15. Valor modular y significancia de las combinaciones de cerveza.

Productos	Valor modular	Juicio
E1-E2	4	no hay diferencia
E1-E3	48	si hay diferencia
E1-E4	16	no hay diferencia
E2-E3	44	si hay diferencia
E2-E4	12	no hay diferencia
E3-E4	32	no hay diferencia

Con el propósito de verificar que las observaciones realizadas tuvieran validez estadística se procedió a realizar el test de *Friedman*, en el que se obtuvo un valor $p=0.001$ para un nivel de significancia del 5%, esto quiere decir que el nivel de preferencia de los 4 productos es diferente. Con el fin de determinar que pares de muestras son significativamente

Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusión de quinua

diferentes para un nivel de significancia del 5% la DMS muestra que solo hay diferencias significativas entre las combinaciones E1-E3 y E2-E3 ya que el rango se encuentra por encima del valor de $DMS=34$ como se puede observar en la tabla 13, estos resultados concuerdan con los obtenidos en el test de *Kruskall-Wallis*, identificando diferencia entre el par de cervezas E2-E3.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Las combinaciones empleadas en las que se incluyó quinua en el sustrato generaron cervezas con los menores contenidos de etanol, alcanzándose el menor contenido en la que en el proceso se utilizó la combinación quinua-*S. ludwigii* con un valor de $3.09 \pm 0.15\%$ v/v. Estos resultados son coherentes con los valores obtenidos para la gravedad específica y concentración de sólidos solubles (°Brix) del mosto, que indicaron un menor contenido de azúcares fermentables en el medio respecto a mostos de 100% cebada malteada.

Los resultados obtenidos en el presente estudio a partir del uso de una cepa comercial *WLP-618* de la levadura *S. ludwigii* en el proceso de fermentación, bajo las condiciones de trabajo estudiadas, sugieren que produce un contenido de etanol menor o igual a la *S. cerevisiae*, no obstante, los niveles de etanol obtenidos con esta cepa fueron mayores a los señalados en la normatividad internacional para ser considerada como de bajo contenido de etanol.

Si bien las cervezas elaboradas empleando las diferentes combinaciones levadura-sustrato en general presentaron niveles de aceptación positivos, las pruebas afectivas con consumidores mostraron que las cervezas obtenidas con *S. ludwigii* tuvieron una menor aceptabilidad sensorial, evidenciando que el uso de esta especie de levadura para llevar a cabo la fermentación representa una dificultad en términos de la palatabilidad de los productos finales. La combinación de *S. cerevisiae* con 100% de cebada malteada (E2), con la cual se obtuvo una cerveza tipo *A/e* convencional, presentó el mayor nivel de aceptación y el mayor contenido de alcohol, demostrando que el proceso realizado para la producción de las cervezas fue realizado correctamente. Los resultados obtenidos sugieren como mejor combinación para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con una adecuada aceptación sensorial (con una puntuación promedio de 5.3/7), la elaborada a partir de *S. cerevisiae* con 70% de cebada malteada y 30% de quinua sin maltear (E4).

Aunque con ninguna de las combinaciones ensayadas se alcanzó un contenido menor al 3% sugerido por los estándares internacionales para una cerveza baja en alcohol, los resultados son promisorios ya señalan que una cerveza de estas características se puede obtener, manteniendo una adecuada aceptabilidad sensorial, mediante el empleo de mayores sustituciones de quinua en el sustrato, incluso a través del uso de cepas de la levadura tradicional de la especie *S. cerevisiae*.

4.2 Recomendaciones

Para fortalecer la investigación realizada e implementar sus resultados se propone continuar el trabajo con la quinua, dado que con la inclusión de este pseudocereal se tuvieron los mejores resultados en términos del menor contenido de etanol y de buena aceptación sensorial. Para ello se sugiere estudiar la inclusión de niveles más altos de quinua en el sustrato, teniendo en cuenta que este grano genera un menor contenido de azúcares fermentables durante la etapa de maceración. Adicionalmente es aconsejable verificar si el uso de quinua malteada permite niveles mayores de reemplazo de la malta.

Se recomienda caracterizar la quinua cultivada por pequeños y medianos agricultores, ya que el grano a ser procesado para la elaboración de cerveza debe contar con niveles bajos de saponinas y baja variabilidad a su composición, recomendándose el cultivo de una única variedad esto implica la necesidad de fortalecer la cadena de producción asociada a este cultivo en Colombia de esta manera se podría lograr un mayor interés por el producto, y podría haber más personas que podrían entrar en el nicho de cervezas a base de este pseudocereal.

Resulta interesante evaluar un método de carbonatación diferente al de *priming* porque su aplicación dificulta el control del contenido de CO₂ final en cada botella y puede contribuir a un aumento en la turbiedad del producto por el crecimiento de levaduras y a un aumento del contenido de etanol. Una alternativa para esta etapa del proceso consiste en implementar una carbonatación por inyección de gas con la cual es posible ajustar el contenido de CO₂ directamente en barril, también con un almacenamiento en frío, esto además permitiría la reducción de la turbiedad en el producto final.

Dado que el uso de levaduras no convencionales se ha considerado una estrategia clave para la obtención de cervezas con bajo contenido en etanol, se podrían evaluar otras cepas de esta levadura, e incluso de otras especies. Sin embargo, es necesario tener en cuenta el costo de los cultivos iniciadores puesto que estos pueden impactar duramente en costo del producto final. Así mismo, como se demuestra en los resultados del presente trabajo, es crítico verificar que las propiedades organolépticas del producto tengan altos niveles de aceptación por los consumidores.

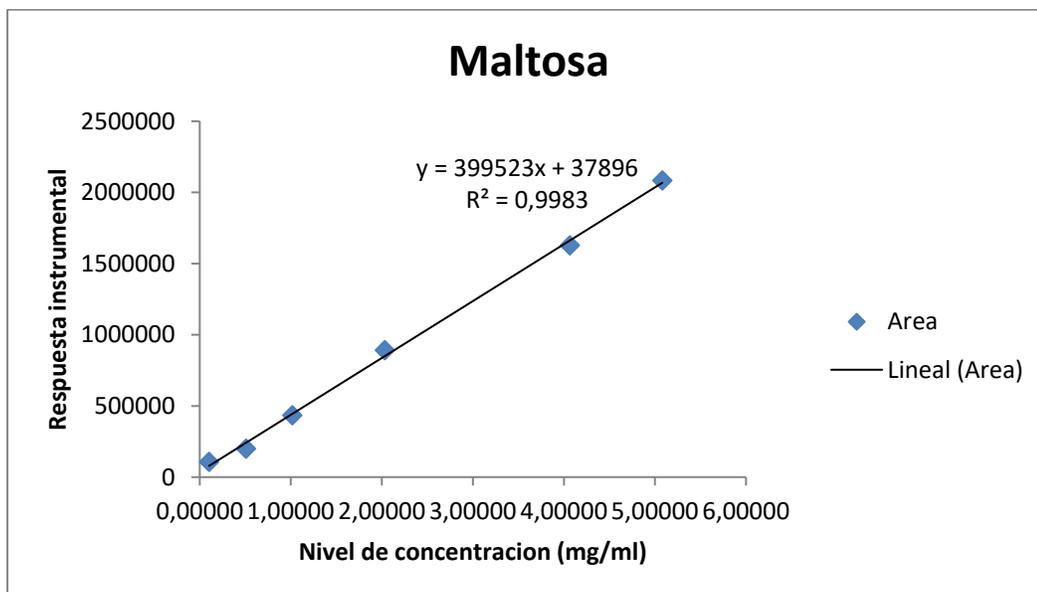
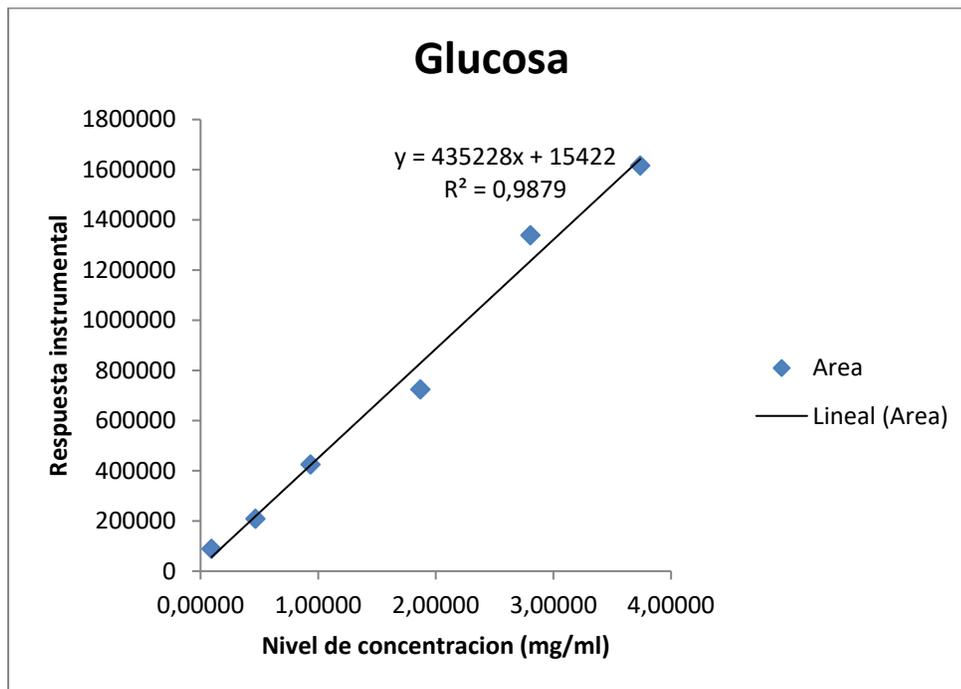
Se recomienda explorar el interés comercial de la cerveza obtenida con el uso de levadura convencional y sustitución parcial de malta de cebada por quinua como bebida artesanal con elementos ligados al origen y un carácter refrescante, teniendo en cuenta el menor contenido de alcohol respecto a una *Ale* tradicional, así como el uso del pseudocereal en la formulación. Este carácter podría ser valorizado sensorialmente a través del empleo de ingredientes que aporten notas asociadas a bebidas refrescantes, como frutales autóctonos, y también variando la proporción de lúpulo en la formulación.

Finalmente, con miras a realizar un emprendimiento que tenga en cuenta la legislación vigente para la producción y venta de cerveza, se hace necesario obtener un registro sanitario. Para ello se requiere establecer la vida útil del producto y así conocer el periodo de tiempo en el que la cerveza conserva su sabor, olor, nivel de gas y cantidad de microorganismos patógenos y no patógenos.

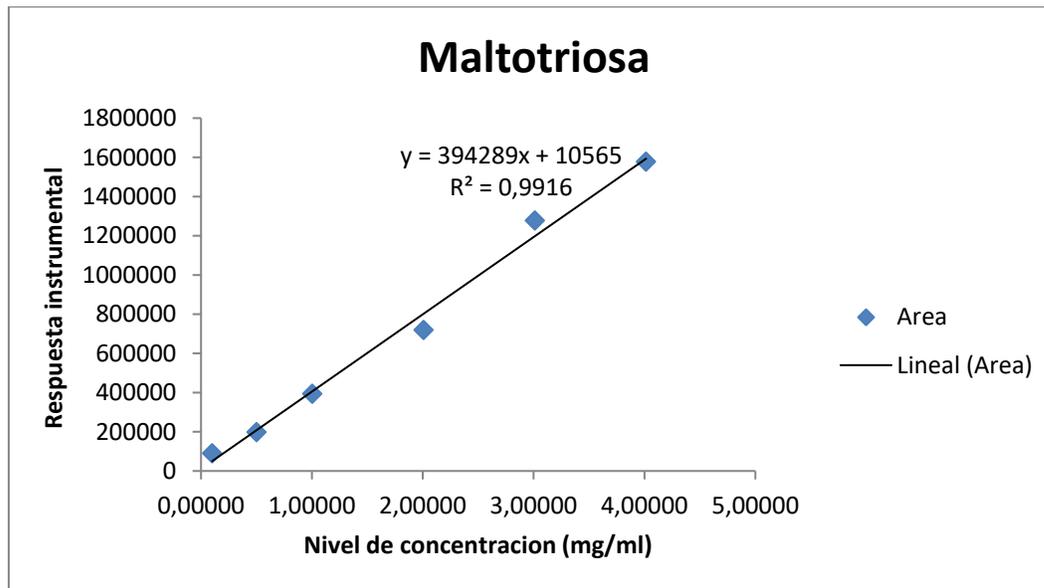
A. Anexo: Curvas de calibración para el perfil de azúcares durante la fermentación

Patrón	Masa Patrón [mg]	Masa solución [mL]	Concentración estimada [mg/mL]
Glucosa	115	6.152	18.693
Maltosa	103.5	5.093	20.322
Maltotriosa	101	5.032	20.073

Curva de calibración						
Nivel	Concentración aproximada [mg/mL]	V. glucosa [μL]	V. maltosa [μL]	V. maltotriosa [μL]	V agua [μL]	V. total [mL]
1	0.1	10	10	10	1970	2
2	0.5	25	25	25	925	1
3	1	50	50	50	850	1
4	2	100	100	100	700	1
5	3	150	150	150	550	1
6	4	200	200	200	400	1
7	5	250	250	250	250	1



Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusion de quinua



Regresión factorial: [ETOH] vs. Ceba; Sustrato

Coeficientes codificados

Término	Efecto	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante		4,126	0,424	9,74	0,001	
Ceba	0,692	0,346	0,424	0,82	0,460	1,00
Sustrato	-1,622	-0,811	0,424	-1,91	0,128	1,00
Ceba*Sustrato	-0,232	-0,116	0,424	-0,27	0,797	1,00

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,19851	52,43%	16,75%	0,00%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	6,3322	2,1107	1,47	0,349
Lineal	2	6,2241	3,1121	2,17	0,230
Cepa	1	0,9591	0,9591	0,67	0,460
Sustrato	1	5,2650	5,2650	3,67	0,128
Interacciones de 2 términos	1	0,1081	0,1081	0,08	0,797
Cepa*Sustrato	1	0,1081	0,1081	0,08	0,797
Error	4	5,7458	1,4364		
Total	7	12,0780			

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

[ETOH]	=	4,126 + 0,346 Cepa - 0,811 Sustrato - 0,116 Cepa*Sustrato
--------	---	---

Estructura de alias

Factor	Nombre
A	Cepa
B	Sustrato
Alias	
I	
A	
B	
AB	

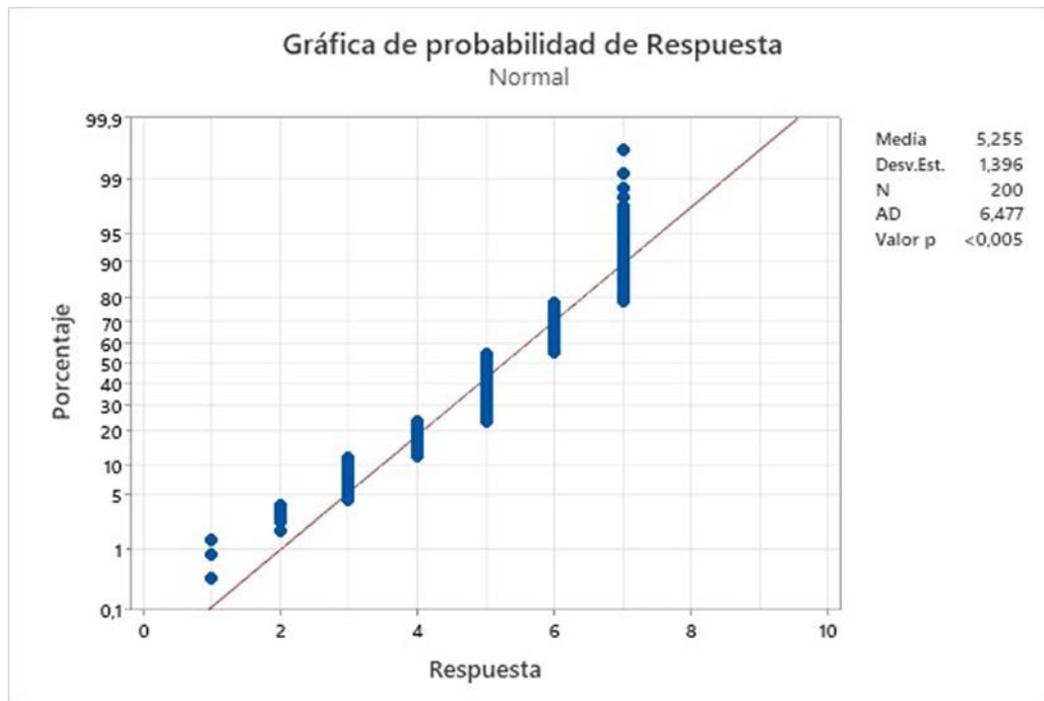
B. Anexo: Formatos para las pruebas sensoriales

Edad:	Nombre:	Fecha:		
Muestra evaluada: Cerveza artesanal				
Instrucción: Pruebe las cervezas e indique según la escala, su opinión sobre ellas. Marcando con (X) en la casilla correspondiente				
Escala	Cervezas			
	987	456	855	242
Me gusta mucho				
Me gusta bastante				
Me gusta ligeramente				
Ni me gusta ni me disgusta				
Me disgusta ligeramente				
Me disgusta bastante				
Me disgusta mucho				
Observaciones:				

Formato prueba de aceptación general.

Edad:	Nombre:	Fecha:
Muestra evaluada: Cerveza artesanal		
Instrucción: Pruebe las cervezas. escoja cuál de las muestras tiene el sabor más aceptable, siendo 4 la más aceptable y 1 la menos aceptable, no se puede asignar el mismo número a dos muestras		
Código		Rango asignado
987		
456		
855		
242		

Formato prueba de ordenamiento por preferencia.



Prueba de normalidad.

Estadísticas descriptivas

Combinación	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
E1	50	5	82,5	-2,53
E2	50	6	129,8	4,13
E3	50	5	88,2	-1,74
E4	50	5	101,5	0,14
General	200		100,5	

Prueba

Hipótesis nula H_0 : Todas las medianas son iguales
 Hipótesis alterna H_1 : Al menos una mediana es diferente

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	3	19,91	0,000
Ajustado para empates	3	21,11	0,000

Test de *Kruskall-Wallis* para las combinaciones.

<p>Estadísticas descriptivas</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Muestra</th> <th>N</th> <th>Mediana</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E1</td> <td>50</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>E2</td> <td>50</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table> <p>Estimación de la diferencia</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>IC para la Diferencia</th> <th>Confiianza</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-1 (-2; -1)</td> <td>95,02%</td> </tr> </tbody> </table> <p>Prueba</p> <p>Hipótesis nula $H_0: \eta_1 - \eta_2 = 0$ Hipótesis alterna $H_1: \eta_1 - \eta_2 \neq 0$</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Método</th> <th>Valor W</th> <th>Valor p</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>No ajustado para empates</td> <td>1959,00</td> <td>0,000</td> </tr> <tr> <td>Ajustado para empates</td> <td>1959,00</td> <td>0,000</td> </tr> </tbody> </table>	Muestra	N	Mediana	E1	50	5	E2	50	6	IC para la Diferencia	Confiianza	-1 (-2; -1)	95,02%	Método	Valor W	Valor p	No ajustado para empates	1959,00	0,000	Ajustado para empates	1959,00	0,000	<p>Estadísticas descriptivas</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Muestra</th> <th>N</th> <th>Mediana</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E1</td> <td>50</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>E3</td> <td>50</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table> <p>Estimación de la diferencia</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>IC para la Diferencia</th> <th>Confiianza</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-0,0000000 (-1; -0,0000000)</td> <td>95,02%</td> </tr> </tbody> </table> <p>Prueba</p> <p>Hipótesis nula $H_0: \eta_1 - \eta_2 = 0$ Hipótesis alterna $H_1: \eta_1 - \eta_2 \neq 0$</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Método</th> <th>Valor W</th> <th>Valor p</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>No ajustado para empates</td> <td>2442,00</td> <td>0,570</td> </tr> <tr> <td>Ajustado para empates</td> <td>2442,00</td> <td>0,559</td> </tr> </tbody> </table>	Muestra	N	Mediana	E1	50	5	E3	50	5	IC para la Diferencia	Confiianza	-0,0000000 (-1; -0,0000000)	95,02%	Método	Valor W	Valor p	No ajustado para empates	2442,00	0,570	Ajustado para empates	2442,00	0,559	<p>Estadísticas descriptivas</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Muestra</th> <th>N</th> <th>Mediana</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E1</td> <td>50</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>E4</td> <td>50</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table> <p>Estimación de la diferencia</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>IC para la Diferencia</th> <th>Confiianza</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-0,0000000 (-1; 0,0000000)</td> <td>95,02%</td> </tr> </tbody> </table> <p>Prueba</p> <p>Hipótesis nula $H_0: \eta_1 - \eta_2 = 0$ Hipótesis alterna $H_1: \eta_1 - \eta_2 \neq 0$</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Método</th> <th>Valor W</th> <th>Valor p</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>No ajustado para empates</td> <td>2276,00</td> <td>0,087</td> </tr> <tr> <td>Ajustado para empates</td> <td>2276,00</td> <td>0,079</td> </tr> </tbody> </table>	Muestra	N	Mediana	E1	50	5	E4	50	5	IC para la Diferencia	Confiianza	-0,0000000 (-1; 0,0000000)	95,02%	Método	Valor W	Valor p	No ajustado para empates	2276,00	0,087	Ajustado para empates	2276,00	0,079	<p>Estadísticas descriptivas</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Muestra</th> <th>N</th> <th>Mediana</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E2</td> <td>50</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>E3</td> <td>50</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table> <p>Estimación de la diferencia</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>IC para la Diferencia</th> <th>Confiianza</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 (-0,0000000; 1)</td> <td>95,02%</td> </tr> </tbody> </table> <p>Prueba</p> <p>Hipótesis nula $H_0: \eta_1 - \eta_2 = 0$ Hipótesis alterna $H_1: \eta_1 - \eta_2 \neq 0$</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Método</th> <th>Valor W</th> <th>Valor p</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>No ajustado para empates</td> <td>3051,00</td> <td>0,000</td> </tr> <tr> <td>Ajustado para empates</td> <td>3051,00</td> <td>0,000</td> </tr> </tbody> </table>	Muestra	N	Mediana	E2	50	6	E3	50	5	IC para la Diferencia	Confiianza	1 (-0,0000000; 1)	95,02%	Método	Valor W	Valor p	No ajustado para empates	3051,00	0,000	Ajustado para empates	3051,00	0,000
Muestra	N	Mediana																																																																																									
E1	50	5																																																																																									
E2	50	6																																																																																									
IC para la Diferencia	Confiianza																																																																																										
-1 (-2; -1)	95,02%																																																																																										
Método	Valor W	Valor p																																																																																									
No ajustado para empates	1959,00	0,000																																																																																									
Ajustado para empates	1959,00	0,000																																																																																									
Muestra	N	Mediana																																																																																									
E1	50	5																																																																																									
E3	50	5																																																																																									
IC para la Diferencia	Confiianza																																																																																										
-0,0000000 (-1; -0,0000000)	95,02%																																																																																										
Método	Valor W	Valor p																																																																																									
No ajustado para empates	2442,00	0,570																																																																																									
Ajustado para empates	2442,00	0,559																																																																																									
Muestra	N	Mediana																																																																																									
E1	50	5																																																																																									
E4	50	5																																																																																									
IC para la Diferencia	Confiianza																																																																																										
-0,0000000 (-1; 0,0000000)	95,02%																																																																																										
Método	Valor W	Valor p																																																																																									
No ajustado para empates	2276,00	0,087																																																																																									
Ajustado para empates	2276,00	0,079																																																																																									
Muestra	N	Mediana																																																																																									
E2	50	6																																																																																									
E3	50	5																																																																																									
IC para la Diferencia	Confiianza																																																																																										
1 (-0,0000000; 1)	95,02%																																																																																										
Método	Valor W	Valor p																																																																																									
No ajustado para empates	3051,00	0,000																																																																																									
Ajustado para empates	3051,00	0,000																																																																																									
<p>Estadísticas descriptivas</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Muestra</th> <th>N</th> <th>Mediana</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E2</td> <td>50</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>E4</td> <td>50</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table> <p>Estimación de la diferencia</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>IC para la Diferencia</th> <th>Confiianza</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 (0,0000000; 1)</td> <td>95,02%</td> </tr> </tbody> </table> <p>Prueba</p> <p>Hipótesis nula $H_0: \eta_1 - \eta_2 = 0$ Hipótesis alterna $H_1: \eta_1 - \eta_2 \neq 0$</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Método</th> <th>Valor W</th> <th>Valor p</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>No ajustado para empates</td> <td>2897,50</td> <td>0,010</td> </tr> <tr> <td>Ajustado para empates</td> <td>2897,50</td> <td>0,008</td> </tr> </tbody> </table>	Muestra	N	Mediana	E2	50	6	E4	50	5	IC para la Diferencia	Confiianza	1 (0,0000000; 1)	95,02%	Método	Valor W	Valor p	No ajustado para empates	2897,50	0,010	Ajustado para empates	2897,50	0,008	<p>Estadísticas descriptivas</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Muestra</th> <th>N</th> <th>Mediana</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E3</td> <td>50</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>E4</td> <td>50</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table> <p>Estimación de la diferencia</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>IC para la Diferencia</th> <th>Confiianza</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-0,0000000 (-1; 0,0000000)</td> <td>95,02%</td> </tr> </tbody> </table> <p>Prueba</p> <p>Hipótesis nula $H_0: \eta_1 - \eta_2 = 0$ Hipótesis alterna $H_1: \eta_1 - \eta_2 \neq 0$</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Método</th> <th>Valor W</th> <th>Valor p</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>No ajustado para empates</td> <td>2350,50</td> <td>0,230</td> </tr> <tr> <td>Ajustado para empates</td> <td>2350,50</td> <td>0,214</td> </tr> </tbody> </table>	Muestra	N	Mediana	E3	50	5	E4	50	5	IC para la Diferencia	Confiianza	-0,0000000 (-1; 0,0000000)	95,02%	Método	Valor W	Valor p	No ajustado para empates	2350,50	0,230	Ajustado para empates	2350,50	0,214																																														
Muestra	N	Mediana																																																																																									
E2	50	6																																																																																									
E4	50	5																																																																																									
IC para la Diferencia	Confiianza																																																																																										
1 (0,0000000; 1)	95,02%																																																																																										
Método	Valor W	Valor p																																																																																									
No ajustado para empates	2897,50	0,010																																																																																									
Ajustado para empates	2897,50	0,008																																																																																									
Muestra	N	Mediana																																																																																									
E3	50	5																																																																																									
E4	50	5																																																																																									
IC para la Diferencia	Confiianza																																																																																										
-0,0000000 (-1; 0,0000000)	95,02%																																																																																										
Método	Valor W	Valor p																																																																																									
No ajustado para empates	2350,50	0,230																																																																																									
Ajustado para empates	2350,50	0,214																																																																																									

Test de *Mann- Whytman* para las combinaciones

Consentimiento Informado

Yo _____ declaro que he sido informado e invitado a participar en una actividad denominada “prueba de aceptación general de cervezas artesanales de quinua y cebada malteada”. Esta actividad es parte de un trabajo final de maestría en Ciencia y Tecnología de alimentos de la Universidad Nacional de Colombia titulado “Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusión de quinua”.

Entiendo que este estudio busca identificar el grado de aceptabilidad de cuatro formulaciones de cerveza elaboradas a partir de quinua y cebada malteada empleando dos tipos de levadura.

Me han explicado que los productos que voy a degustar fueron elaborados con buenas prácticas de manufactura (BPM), y se me informo que los análisis microbiológicos no mostraron que el producto presente riesgos en este aspecto. Así mismo, se me indico que los datos personales suministrados de mi parte serán usados únicamente con fines académicos. Tengo conocimiento de que los resultados del estudio no me serán entregados y que no habrá retribución de ninguna índole, por la participación en el mismo. Comprendo que me puedo negar a la participación o retirarme en cualquier etapa de la investigación, sin expresión de causo ni consecuencias negativas para mí.

Acepto voluntariamente participar en este estudio.

Firma participante: _____

Fecha: _____

C. Anexo: Estadísticos de prueba para los diferentes parámetros

Test-t para el día 0

Donde formulación 1 es el mosto con 100% de cebada y la formulación 2 es el mosto con sustitución de quinua; SI hace referencia a la levadura *S. ludwigii* y Sc a la levadura *S. cerevisiae*.

pH			Gravedad específica (densímetro)		
0			0		
Datos	Formulacion 1	Formulacion 2	Datos	Formulacion 1	Formulacion 2
SI	5.78	5.96	SI	1.038	1.032
	5.78	5.96		1.042	1.032
Sc	5.78	5.84	Sc	1.034	1.032
	5.84	5.84		1.044	1.032
Día 0			Día 0		
Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Formulacion 1	Formulacion 2		Formulacion 1	Formulacion 2
Media	5.795	5.9	Media	1.040	1.032
Varianza	0.0009	0.0048	Varianza	2E-05	0
Observaciones	4	4	Observaciones	4	4
Varianza agrupada	0.003		Varianza agrupada	1E-05	
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	6		Grados de libertad	6	
Estadístico t	-2.782		Estadístico t	3.3824	
P(T<=t) una cola	0.016		P(T<=t) una cola	0.0074	
Valor crítico de t (una cola)	1.943		Valor crítico de t (una cola)	1.9432	
P(T<=t) dos colas	0.032		P(T<=t) dos colas	0.0148	
Valor crítico de t (dos colas)	2.447		Valor crítico de t (dos colas)	2.4469	

80 Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusión de quinua

°Brix		
0		
Datos	Formulacion 1	Formulacion 2
SI	11.28	8.43
	12.43	8.86
Sc	12.38	10.43
	12.28	10.43
Día 0		
Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	<i>Formulacion 1</i>	<i>Formulacion 2</i>
Media	12.09	9.54
Varianza	0.30	1.09
Observaciones	4	4
Varianza agrupada	0.695	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	6	
Estadístico t	4.334	
P(T<=t) una cola	0.002	
Valor crítico de t (una cola)	1.943	
P(T<=t) dos colas	0.005	
Valor crítico de t (dos colas)	2.447	

ANOVA durante días 1, 5 y 10 de fermentación

pH

Análisis de varianza de un factor para el pH durante la fermentación						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
E1 (<i>S.ludwigii</i> +100% cebada)	3	15.63	5.21	0.2457		
E2(<i>S.cerevisiae</i> +100% cebada)	3	15.27	5.09	0.0252		
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	0.0216	1	0.0216	0.159	0.710	7.709
Dentro de los grupos	0.5418	4	0.1355			
Total	0.5634	5				

Análisis de varianza de un factor para el pH durante la fermentación						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
E1(<i>S.ludwigii</i> +100% cebada)	3	15.63	5.21	0.2457		
E3(<i>S.ludwigii</i> +quinua y cebada)	3	14.82	4.94	0.1539		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.10935	1	0.1094	0.547	0.500	7.709
Dentro de los grupos	0.7992	4	0.1998			
Total	0.90855	5				

Análisis de varianza de un factor para el pH durante la fermentación						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
E1(<i>S.ludwigii</i> +100% cebada)	3	15.63	5.21	0.2457		
E4(<i>S.cerevisiae</i> + quinua y cebada)	3	14.82	4.94	0.0009		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.10935	1	0.1094	0.887	0.400	7.709
Dentro de los grupos	0.4932	4	0.1233			
Total	0.60255	5				

82 Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusión de quinua

Análisis de varianza de un factor para el pH durante la fermentación						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
E2(<i>S.cerevisiae</i> +100% cebada)	3	15.27	5.09	0.0252		
E3(<i>S.ludwigii</i> +quinua y cebada)	3	14.82	4.94	0.1539		
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	0.03375	1	0.0337	0.377	0.572	7.709
Dentro de los grupos	0.3582	4	0.0896			
Total	0.39195	5				

Análisis de varianza de un factor para el pH durante la fermentación						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
E2(<i>S.cerevisiae</i> +100% cebada)	3	15.27	5.09	0.0252		
E4(<i>S.cerevisiae</i> +quinua y cebada)	3	14.82	4.94	0.0009		
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	0.03375	1	0.0338	2.586	0.183	7.709
Dentro de los grupos	0.0522	4	0.0130			
Total	0.08595	5				

Análisis de varianza de un factor para el pH durante la fermentación						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>		<i>Promedio</i>		<i>Varianza</i>
E3(<i>S.ludwigii</i> +quinua y cebada)	3	14.82		4.94		0.1539
E4(<i>S.cerevisiae</i> +quinua y cebada)	3	14.82		4.94		0.0009
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0	1	0	0	1	7.709
Dentro de los grupos	0.3096	4	0.0774			
Total	0.3096	5				

Gravedad específica

Análisis de varianza de un factor para la gravedad específica durante la fermentación						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>		<i>Promedio</i>		<i>Varianza</i>
E1(<i>S.ludwigii</i> +100% cebada)	3	3.095		1.032		8E-05
E2(<i>S.cerevisiae</i> +100% cebada)	3	3.048		1.016		0.0004
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.00036817	1	0.0004	1.676	0.265	7.709
Dentro de los grupos	0.00087867	4	0.0002			
Total	0.00124683	5				

84 Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusión de quinua

Análisis de varianza de un factor para la gravedad específica durante la fermentación						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
E1(<i>S.ludwigii</i> +100% cebada)	3	3.095	1.032	8E-05		
E3(<i>S.ludwigii</i> +quinua y cebada)	3	3.051	1.017	8E-05		
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	0.00032267	1	0.0003	4.155	0.111	7.709
Dentro de los grupos	0.00031067	4	0.0001			
Total	0.00063333	5				

Análisis de varianza de un factor para la gravedad específica durante la fermentación						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
E1(<i>S.ludwigii</i> +100% cebada)	3	3.095	1.032	8E-05		
E4(<i>S.cerevisiae</i> +quinua y cebada)	3	3.03	1.010	7E-06		
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	0.00070417	1	0.00070	16.90	0.01	7.71
Dentro de los grupos	0.00016667	4	0.00004			
Total	0.00087083	5				

Análisis de varianza de un factor para la gravedad específica durante la fermentación						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
E2(<i>S.cerevisiae</i> +100% cebada)	3	3.048	1.02	0.0004		
E3(<i>S.ludwigii</i> +quinua y cebada)	3	3.051	1.02	0.0001		
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	1.5E-06	1	1E-06	0.007	0.938	7.709
Dentro de los grupos	0.000884	4	2E-04			
Total	0.0008855	5				

Análisis de varianza de un factor para la gravedad específica durante la fermentación						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
E2(<i>S.cerevisiae</i> +100% cebada)	3	3.048	1.016	0.000363		
E4(<i>S.cerevisiae</i> +quinua y cebada)	3	3.03	1.01	7E-06		
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	5.4E-05	1	5.4E-05	0.29	0.618	7.709
Dentro de los grupos	0.00074	4	0.000185			
Total	0.000794	5				

86 Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusión de quinua

Análisis de varianza de un factor para la gravedad específica durante la fermentación						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
E3(<i>S.ludwigii</i> +quinua y cebada)	3	3.051	1.017	7.9E-05		
E4(<i>S.cerevisiae</i> +quinua y cebada)	3	3.03	1.01	7E-06		
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	7.35E-05	1	7.35E-05	1.709	0.261	7.709
Dentro de los grupos	0.000172	4	4.3E-05			
Total	0.0002455	5				

Solidos solubles (°Brix)

Análisis de varianza de un factor para los °Brix durante la fermentación						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
E1(<i>S.ludwigii</i> +100% cebada)	3	29.755	9.918	2.599		
E2(<i>S.cerevisiae</i> +100% cebada)	3	21.04	7.013	9.543		
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	12.6585375	1	12.659	2.085	0.222	7.709
Dentro de los grupos	24.2838833	4	6.071			
Total	36.9424208	5				

Análisis de varianza de un factor para los °Brix durante la fermentación						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
E1(<i>S.ludwigii</i> +100% cebada)	3	29.755	9.918	2.599		
E3(<i>S.ludwigii</i> +quinua y cebada)	3	19.21	6.403	2.333		
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	18.5328375	1	18.533	7.514	0.052	7.709
Dentro de los grupos	9.86528333	4	2.466			
Total	28.3981208	5				

Análisis de varianza de un factor para los °Brix durante la fermentación						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
E1(<i>S.ludwigii</i> +100% cebada)	3	29.755	9.918	2.599		
E4(<i>S.cerevisiae</i> + quinua y cebada)	3	16.005	5.335	0.100		
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	31.5104167	1	31.510	23.35	0.01	7.71
Dentro de los grupos	5.39906667	4	1.350			
Total	36.9094833	5				

88 Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusión de quinua

Análisis de varianza de un factor para los °Brix durante la fermentación						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
E2(<i>S.cerevisiae</i> +100% cebada)	3	21.04	7.013333333	9.542633333		
E4(<i>S.cerevisiae</i> +quinua y cebada)	3	16.005	5.335	0.100225		
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	4.22520417	1	4.22520417	0.87633853	0.402204789	7.708647422
Dentro de los grupos	19.2857167	4	4.82142917			
Total	23.5109208	5				

Análisis de varianza de un factor para los °Brix durante la fermentación						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
E3(<i>S.ludwigii</i> +quinua y cebada)	3	19.21	6.403333333	2.333333333		
E4(<i>S.cerevisiae</i> +quinua y cebada)	3	16.005	5.335	0.100225		
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	1.71200417	1	1.71200417	1.40699661	0.301197378	7.708647422
Dentro de los grupos	4.86711667	4	1.21677917			
Total	6.57912083	5				

Test-t después de la maduración

Donde formulación 1 es el mosto con 100% de cebada y la formulación 2 es el mosto con sustitución de quinua

pH			pH		
DM			DM		
	Formulación 1	Formulación 2		S.ludwigii	S. cerevisiae
S.ludwigii	4.58	4.64	Formulacion 1	4.58	5.06
	4.76	4.64		4.76	5
S. cerevisiae	5.06	4.94	Formulacion 2	4.64	4.94
	5	4.82		4.64	4.82
DM			DM		
Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Formulacion 1	Formulacion 2		S.ludwigii	S. cerevisiae
Media	4.85	4.76	Media	4.66	4.96
Varianza	0.049	0.022	Varianza	0.006	0.010
Observaciones	4	4	Observaciones	4	4
Varianza agrupada	0.035		Varianza agrupada	0.0081	
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	6		Grados de libertad	6	
Estadístico t	0.676		Estadístico t	-4.714	
P(T<=t) una cola	0.262		P(T<=t) una cola	0.002	
Valor crítico de t (una cola)	1.943		Valor crítico de t (una cola)	1.943	
P(T<=t) dos colas	0.524		P(T<=t) dos colas	0.003	
Valor crítica de t (dos colas)	2.447		Valor crítico de t (dos colas)	2.447	

Gravedad específica (densímetro)			Gravedad específica (densímetro)		
DM			DM		
	Formulación 1	Formulación 2		S.ludwigii	S. cerevisiae
S.ludwigii	1.015	1.011	Formulación 1	1.015	1.001
	1.017	1.007		1.017	1.007
S. cerevisiae	1.001	1.006	Formulación 2	1.011	1.006
	1.007	1.002		1.007	1.002
DM			DM		
Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Formulación 1	Formulación 2		S.ludwigii	S. cerevisiae
Media	1.01	1.0065	Media	1.013	1.004
Varianza	5E-05	1E-05	Varianza	2E-05	9E-06
Observaciones	4	4	Observaciones	4	4
Varianza agrupada	3E-05		Varianza agrupada	1E-05	
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	6		Grados de libertad	6	
Estadístico t	0.847		Estadístico t	3.194	
P(T<=t) una cola	0.215		P(T<=t) una cola	0.009	
Valor crítico de t (una cola)	1.943		Valor crítico de t (una cola)	1.943	
P(T<=t) dos colas	0.430		P(T<=t) dos colas	0.019	
Valor crítico de t (dos colas)	2.447		Valor crítico de t (dos colas)	2.447	

°Brix			°Brix		
DM			DM		
	Formulacion 1	Formulacion 2		S.ludwigii	S. cerevisisae
S.ludwigii	6	5	Formulacion 1	6	5
	7	5		7	5
S. cerevisisae	5	5	Formulacion 2	5	5
	5	5		5	5
DM			DM		
Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Formulacion 1	Formulacion 2		S.ludwigii	S. cerevisisae
Media	5.74	4.81	Media	5.75	4.805
Varianza	1.082	0.047	Varianza	0.916666667	0.194033333
Observaciones	4	4	Observaciones	4	4
Varianza agrupada	0.565		Varianza agrupada	0.5554	
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	6		Grados de libertad	6	
Estadístico t	1.750		Estadístico t	1.793	
P(T<=t) una cola	0.065		P(T<=t) una cola	0.062	
Valor crítico de t (una cola)	1.943		Valor crítico de t (una cola)	1.943	
P(T<=t) dos colas	0.131		P(T<=t) dos colas	0.123	
Valor crítico de t (dos colas)	2.447		Valor crítico de t (dos colas)	2.447	

Bibliografía

- Alonso-Esteban, J. I., Pinela, J., Barros, L., Ćirić, A., Soković, M., Calhelha, R. C., Torija-Isasa, E., de Cortes Sánchez-Mata, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) Seeds. *Industrial Crops and Products*, *134*, 154–159.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.001>
- Alperstein, L., Gardner, J. M., Sundstrom, J. F., Sumbly, K. M., & Jiranek, V. (2020). Yeast bioprospecting versus synthetic biology—which is better for innovative beverage fermentation? In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 104, Issue 5, pp. 1939–1953). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10364-x>
- Amaya, N., & Pascagaza, L. (2019). *Evaluación de perfiles fermentativos para la elaboracion de cerveza artesanal por levaduras nativas*. *April*, 251.
- Aragón, C., Miquel, M., Correa, M., & Sanchis-Segura, C. (2002). Alcohol y metabolismo humano. In *Adicciones* (Vol. 14, Issue SUPPL. 1, pp. 23–42).
<https://doi.org/10.20882/adicciones.541>
- Badui Dergal, S. (2006). Química de los alimentos. In *Química de los alimentos*.
- Bamforth, C. W. (2016). Brewing Materials and Processes. In *Brewing Materials and Processes*. <https://doi.org/10.1016/c2013-0-13349-1>
- Bellut, K., & Arendt, E. K. (2019). Chance and Challenge: Non-Saccharomyces Yeasts in Nonalcoholic and Low Alcohol Beer Brewing—A Review. In *Journal of the American Society of Brewing Chemists* (Vol. 77, Issue 2, pp. 77–91).
<https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1569452>
- Bellut, K., Michel, M., Zarnkow, M., Hutzler, M., Jacob, F., De Schutter, D. P., Daenen, L., Lynch, K. M., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2018). Application of non-Saccharomyces yeasts isolated from kombucha in the production of alcohol-free beer. *Fermentation*, *4*(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation4030066>
- Bellut, K., Michel, M., Zarnkow, M., Hutzler, M., Jacob, F., Lynch, K. M., & Arendt, E. K. (2019). On the suitability of alternative cereals, pseudocereals and pulses in the

- production of alcohol-reduced beers by non-conventional yeasts. *European Food Research and Technology*, 245(11), 2549–2564. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03372-3>
- Boundy-Mills, K., Stratford, M., & Miller, M. W. (2011). Saccharomyces E.C: Hansen (1904). In *The Yeasts* (Vol. 2, Issue 1904). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00062-8>
- Brányik, T., Silva, D. P., Baszczyński, M., Lehnert, R., & Almeida E Silva, J. B. (2012). A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. In *Journal of Food Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.020>
- Cabras, I., & Higgins, D. M. (2016). Beer, brewing, and business history. *Business History*, 58(5), 609–624. <https://doi.org/10.1080/00076791.2015.1122713>
- Callejo, M. J., García Navas, J. J., Alba, R., Escott, C., Loira, I., González, M. C., & Morata, A. (2019). Wort fermentation and beer conditioning with selected non-Saccharomyces yeasts in craft beers. *European Food Research and Technology*, 245(6), 1229–1238. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03244-w>
- Castañeda, R., Andrade-Cuvi, M. J., Argüello, Y., & Vernaza, M. G. (2018). Efecto de la adición de quinua (*Chenopodium quinoa wild*) malteada y sin maltear en la elaboración de cerveza tipo Ale a base de cebada (*Hordeum vulgare*) malteada. *Enfoque UTE*. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v9n2.302>
- Castañeda Terán, R. A. (2015). *Elaboracion de cerveza tipo Ale en base a un sustrato de quinua (Chenopodium quinoa wild) y cebada (Hordeum vulgare)*. Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Castillo, F. (2013). *Evaluacion de la preferencia sensorial en tres marcas de gelatinas de venta en el mercado de trujillo*.
- Charcosset, C. (2021). Classical and Recent Applications of Membrane Processes in the Food Industry. *Food Engineering Reviews*, 13(2), 322–343. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09262-9>
- Ciani, M., & Maccarelli, F. (1997). Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2), 199–203. <https://doi.org/10.1023/A:1008825928354>
- De Francesco, G., Sannino, C., Sileoni, V., Marconi, O., Filippucci, S., Tasselli, G., & Turchetti, B. (2018). Mrakia gelida in brewing process: An innovative production of low alcohol beer using a psychrophilic yeast strain. *Food Microbiology*, 76, 354–362.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.018>

- De Francesco, G., Turchetti, B., Sileoni, V., Marconi, O., & Perretti, G. (2015). Screening of new strains of *Saccharomyces ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer. *Journal of the Institute of Brewing*.
<https://doi.org/10.1002/jib.185>
- De Keukeleire, D. (2000). Fundamentals of beer and hop chemistry. *Quimica Nova*, 23(1), 108–112. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422000000100019>
- Denby, C. M., Li, R. A., Vu, V. T., Costello, Z., Lin, W., Chan, L. J. G., Williams, J., Donaldson, B., Bamforth, C. W., Petzold, C. J., Scheller, H. V., Martin, H. G., & Keasling, J. D. (2018). Industrial brewing yeast engineered for the production of primary flavor determinants in hopped beer. *Nature Communications*, 9(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03293-x>
- Dennenlöhner, J., Thörner, S., Manowski, A., & Rettberg, N. (2020). Analysis of Selected Hop Aroma Compounds in Commercial Lager and Craft Beers Using HS-SPME-GC-MS/MS. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 78(1), 16–31.
<https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1668223>
- Deželak, M., Zarnkow, M., Becker, T., & Košir, I. J. (2014). Processing of bottom-fermented gluten-free beer-like beverages based on buckwheat and quinoa malt with chemical and sensory characterization. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(4), 360–370. <https://doi.org/10.1002/jib.166>
- Domínguez, M. R. (2007). Guía para la Evaluación Sensorial de Alimentos. *Instituto de Investigación Nutricional–IIN Consultora-AgroSalud*, 2–45. www.iin.sld.pe
- Durango Londoño, L. P. (2007). *Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras nativas tipo Saccharomyces spp. a nivel de laboratorio* [Universidad EAFIT].
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Espinosa, J. (2000). *La Evaluación Sensorial de los Alimentos*.
- Forero, C., Rosero, A., Ceron Ramirez, E., & Perez, D. (2007). Potencial nutricional de harinas de quinua (*Chenopodium quinoa w*) variedad piartal en los andes Colombianos segunda parte. *Bioteología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*.
- Galwey, N. W., Leakey, C. L. A., Price, K. R., & Fenwick, G. R. (1989). Chemical Composition and Nutritional Characteristics of Quinoa (*Chenopodium Quinoa Willd.*). *Food Sciences and Nutrition*, 42(4), 245–261.

- <https://doi.org/10.1080/09543465.1989.11904148>
- Garavaglia, C., & Swinnen, J. (2017). Economic perspectives on craft beer: A revolution in the global beer industry. In *Economic Perspectives on Craft Beer: A Revolution in the Global Beer Industry*. Palgrave Macmillan. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-58235-1>
- Gibson, B., Geertman, J. M. A., Hittinger, C. T., Krogerus, K., Libkind, D., Louis, E. J., Magalhães, F., & Sampaio, J. P. (2017). New yeasts-new brews: Modern approaches to brewing yeast design and development. In *FEMS Yeast Research* (Vol. 17, Issue 4). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox038>
- González, M. (2017). *Principios de Elaboración de las Cervezas Artesanales*.
www.lulu.com
- Graham G, Inge Russell, A. A. (2018). Handbook of Brewing. In *Nature* (Vol. 213, Issue 5078). <https://doi.org/10.1038/213765a0>
- Granato, D., de Araújo Calado, V. Ô. M., & Jarvis, B. (2014). Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. *Food Research International*, 55, 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.024>
- Grijalva-Vallejos, N., Aranda, A., & Matallana, E. (2020). Evaluation of yeasts from Ecuadorian chicha by their performance as starters for alcoholic fermentations in the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 317. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108462>
- Hammes, W. P., Brandt, M. J., Francis, K. L., Rosenheim, J., Seitter, M. F. H., & Vogelmann, S. A. (2005). Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1–3), 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.010>
- Holt, S., Miks, M. H., De Carvalho, B. T., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M. (2019). The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 43, Issue 3, pp. 193–222). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy041>
- ICONTEC. (1994). *Norma tecnica colombiana GTC 4 ; manual de metodos analiticos para el control de calidad de bebidas alcoholicas*.
- ICONTEC. (1996a). *Bebidas alcoholicas. Cerveza NTC 3854*.
- ICONTEC. (1996b). *BEBIDAS ALCOHOLICAS. DEFINICIONES GENERALES-NTC 222*.
- ICONTEC. (2020). *Análisis sensorial de bebidas que contienen alcohol etílico NTC 4794*.

- Kordialik-Bogacka, E., Bogdan, P., Pielech-Przybylska, K., & Michałowska, D. (2018). Suitability of unmalted quinoa for beer production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(13), 5027–5036. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9037>
- Kozłowski, R., Dziedziński, M., Stachowiak, B., & Kobus-cisowska, J. (2021). *Non and low alcoholic beer-popularity and manufacturing techniques*.
- Kunze, W. (2006). *Wolfcanc Kunze*. www.ame-kulesa.de
- Lentz, M. (2018). The impact of simple phenolic compounds on beer aroma and flavor. In *Fermentation* (Vol. 4, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010020>
- Linko, M., Haikara, A., Ritala, A., & Penttilä, M. (1998). Recent advances in the malting and brewing industry. In *Journal of Biotechnology* (Vol. 65, Issues 2–3, pp. 85–98). Elsevier Sci B.V. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00135-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00135-7)
- Lombana, J., Amashta, Y., Correa, C., & Rodríguez, M. C. (2018). Benchmarking y análisis de competitividad de las cadenas productivas de quinua en Colombia, Perú y Bolivia. *FACE: Revista de La Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales*, 17(2), 157–173. <https://doi.org/10.24054/01204211.v2.n2.2017.2891>
- Loviso, C. L., & Libkind, D. (2018). Synthesis and regulation of flavor compounds derived from brewing yeast: Esters. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(4), 436–446. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.11.006>
- Loviso, C. L., & Libkind, D. (2019). Synthesis and regulation of flavor compounds derived from brewing yeast: fusel alcohols. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(4), 386–397. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.006>
- Mareček, J., Ychra, L. S., & Ajmanová, H. N. (2002). *Effect of brewer ' s raw material on the course of main fermentation*. 2002(2), 47–53.
- Marquez Farias, A. J. (2015). *Elaboracion De Una Cerveza Organica a Partir De La Quinoa*. 1–97.
- Matthew F, R. B. (2019). *Mastering Brewing Science*.
- Maudoux, M., Yan, S. H., & Collin, S. (1998). Quantitative analysis of alcohol, real extract, original gravity, nitrogen and polyphenols in beers using NIR spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 6(1–4), 363–366. <https://doi.org/10.1255/jnirs.225>
- Michel, M., Kopecká, J., Meier-Dörnberg, T., Zarnkow, M., Jacob, F., & Hutzler, M. (2016). Screening for new brewing yeasts in the non-Saccharomyces sector with *Torulasporea delbrueckii* as model. *Yeast*, 33(4), 129–144.

- <https://doi.org/10.1002/yea.3146>
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F. J., Wagner, R. S., & Hutzler, M. (2016). Review: Pure non-Saccharomyces starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 569–587. <https://doi.org/10.1002/jib.381>
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2012). Decreto Número- 1686 De 2012. *Diario Oficial*, 40.
https://www.invima.gov.co/images/pdf/normatividad/alimentos/decretos/bebidas_alcoholicas.pdf
- Montanari, L., Marconi, O., Mayer, H., & Fantozzi, P. (2008). Production of alcohol-free beer. In *Beer in Health and Disease Prevention*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-373891-2.00006-7>
- Montoya, L., Martínez, L., & Peralta, B. (2005). Analisis de variables estrategicas para la conformacion de una cadena productiva de quinia en Colombia. *Innovar: Revista de Ciencias Administrativas y Sociales*, 15(25).
- Mosher, M., & Trantham, K. (2017). Brewing Science: A Multidisciplinary Approach. In *Brewing Science: A Multidisciplinary Approach*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46394-0>
- Muller, C., Neves, L. E., Gomes, L., Guimarães, M., & Ghesti, G. (2020). Processes for alcohol-free beer production: A review. In *Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1590/fst.32318>
- Muñoz, R., Moreno-Arribas, M. V., & Rivas, B. de las. (2011). Lactic Acid Bacteria. In *Molecular Wine Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375021-1.10008-6>
- Perez Guines et al. (2012). *Evaluación del análisis sensorial de vinos de malvasía. May 2014*.
- Pretorius, I. S., Du Toit, M., & Van Rensburg, P. (2003). Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century. In *Food Technology and Biotechnology* (Vol. 41, Issue 1, pp. 3–10).
- Puligundla, P., Smogrovicova, D., Mok, C., & Obulam, V. S. R. (2020). Recent developments in high gravity beer-brewing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 64, 102399. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102399>
- Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. In *Electronic Journal of Biotechnology* (Vol. 1, Issue 3, pp. 114–140).

<https://doi.org/10.2225/vol1-issue3-fulltext-9>

- Rocha, P. M. (2019). *Aplicacion de tecnicas estadisticas al analisis sensorial inteligente*. 86. http://eio.usc.es/pub/mte/descargas/ProyectosFinMaster/Proyecto_1673.pdf
- Rodriguez Cruz, W. E. (2015). *Efecto de la sustitución de cebada (Hordeum vulgare) por quinua (Chenopodium quinoa) u del pH inicial de maceración en las características fisicoquímicas y aceptabilidad general de una cerveza tipo Ale*. Universidad Privada Antenor Orrego.
- Romano, P., Marchese, R., Laurita, C., Saleano, G., & Turbanti, L. (1999). Biotechnological suitability of *Saccharomyces ludwigii* for fermented beverages. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(4), 451–454. <https://doi.org/10.1023/A:1008948623024>
- Saerens, S. M. G., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2008). Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2), 454–461. <https://doi.org/10.1128/AEM.01616-07>
- Sannino, C., Mezzasoma, A., Buzzini, P., & Turchetti, B. (2019). Non-conventional Yeasts for Producing Alternative Beers. In *Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application* (pp. 361–388). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21110-3_11
- Senkarcinova, B., Graça Dias, I. A., Nespör, J., & Branyik, T. (2019). Probiotic alcohol-free beer made with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *LWT*, 100, 362–367. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.082>
- Serna-Saldivar, S. O. (2016). Cereal Grains. In *Cereal Grains*. <https://doi.org/10.1201/9781439882092>
- Serra Colomer, M., Funch, B., & Forster, J. (2019). The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 56, pp. 30–35). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.009>
- Suárez, M. (2013). Cerveza: componentes y propiedades. *MBtA*, 99. [http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/19093/8/TFM_Maria Suarez Diaz.pdf](http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/19093/8/TFM_Maria%20Suarez%20Diaz.pdf)
- Szollosi, A., Nguyen, Q. D., Kovacs, A. G., Fogarasi, A. L., Kun, S., & Hegyesne-Vecseri, B. (2016). Production of low or non-alcoholic beer in microbial fuel cell. *Food and Bioproducts Processing*, 98, 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.01.012>

- Téllez Mosquera, J., & Cote Menéndez, M. (2006). Alcohol etílico: un tóxico de alto riesgo para la salud humana socialmente aceptado. *Rev. Fac. Med. (Bogotá)*, *54*(1), 32–47.
- Thoufeek Ahamed, N., Singhai, R. S., Kulkarni, P. R., & Pal, M. (1998). A lesser-known grain, *Chenopodium quinoa*: Review of the chemical composition of its edible parts. *Food and Nutrition Bulletin*, *19*(1), 61–70.
<https://doi.org/10.1177/156482659801900110>
- Toro-Gonzalez, D. (2017). The craft brewing industry in latin America: The case of Colombia. In *Economic Perspectives on Craft Beer: A Revolution in the Global Beer Industry* (pp. 115–136). Palgrave Macmillan. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58235-1_4
- Van der Hoeven, M., Osei, J., Greeff, M., Kruger, A., Faber, M., & Smuts, C. M. (2013). Indigenous and traditional plants: South African parents' knowledge, perceptions and uses and their children's sensory acceptance. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *9*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-9-78>
- Vargas, C. (2012). *Determinación y evaluación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en Cerveza Negra tipo Ale " American Stout ."* 4–6.
- Vargas, M. P. E. (2017). *Análisis comparativo de tres tipos de levaduras en la producción artesanal de cerveza.* 50.
- Vejarano, R. (2018). *Saccharomyces ludwigii*, control and potential uses in winemaking processes. *Fermentation*, *4*(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030071>
- Vidgren, V., Ruohonen, L., & Londesborough, J. (2005). Characterization and functional analysis of the MAL and MPH loci for maltose utilization in some ale and lager yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(12), 7846–7857.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.7846-7857.2005>
- Waldir Estela-Escalante, Mojmír Rychtera, K. M., Beatriz Hatta-Sakoda, Z. L.-C., & Víctor Sarmiento-Casavilca, G. C.-Q. (2011). Actividad fermentativa de *Saccharomyces ludwigii* y evaluación de la síntesis de compuestos de importancia sensorial durante la fermentación de jugo de manzana. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2011.1.42>
- Yu, W. W., Zhai, H. L., Xia, G. Bin, Tao, K. Y., Li, C., Yang, X. Q., & Li, L. H. (2020). Starch fine molecular structures as a significant controller of the malting, mashing, and fermentation performance during beer production. *Trends in Food Science and Technology*, *105*(February), 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.010>

10C Evaluación de un proceso biológico para la obtención de una cerveza con bajo contenido en alcohol con inclusión de quinua

Zannini, E. K. A. and E. (2013). *Cereal grains for the food and beverage industries* (Vol. 1).