



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Departamento de Investigación y Posgrado
Maestría en Ciencia y Tecnología de
Alimentos



“PRODUCCIÓN DE CERVEZA TIPO LAGER CON BAJO CONTENIDO ALCOHÓLICO UTILIZANDO UN SISTEMA DE ELECTROFERMENTACIÓN Y LA EVALUACIÓN DE SU EFECTO EN EL PERFIL DE AROMAS”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en
Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta:

IBT Diana Marcial Ramírez

Dirigido por:

Dr. Aldo Amaro Reyes

Co-dirigido por:

Dr. Pedro Alberto Vázquez Landaverde

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Junio, 2021



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos



**“PRODUCCIÓN DE CERVEZA TIPO LAGER CON BAJO CONTENIDO ALCOHÓLICO
UTILIZANDO UN SISTEMA DE ELECTROFERMENTACIÓN Y LA EVALUACIÓN DE SU
EFECTO EN EL PERFIL DE AROMAS”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencia y
Tecnología de Alimentos

Presenta:

IBT Diana Marcial Ramírez

Dirigido por:

Dr. Aldo Amaro Reyes

Co-dirigido por:

Dr. Pedro Alberto Vázquez Landaverde

Dr. Aldo Amaro Reyes
Director

Dr. Pedro A. Vázquez Landaverde
Co - director

Dr. Carlos Regalado González
Secretario

Dr. Jorge Noel Gracida Gutiérrez
Vocal

Dra. Monserrat Escamilla García
Suplente

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Junio, 2021

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE: Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



I.B.T.Diana Marcial Ramírez

Resumen

La demanda de cerveza con bajo contenido alcohólico ha incrementado, sin embargo, las tecnologías disponibles para obtener esta bebida deterioran sus propiedades organolépticas. Por lo tanto, se evaluó el efecto de un sistema de electrofermentación en el contenido de etanol y el perfil aromático de una cerveza. Se realizó un diseño experimental factorial de 3^2 . Los factores fueron el material del electrodo (acero inoxidable, titanio y grafito) y el voltaje (0, 15 y 30 V), y la variable de respuesta fue el rendimiento de etanol. Además, estos tratamientos se compararon con una fermentación tradicional como control. El fermentador con el mosto y la levadura (*Saccharomyces pastorianus*) se mantuvo en un rango de temperatura de 14 - 18 °C. Las unidades experimentales se conectaron en serie y se conectaron a una fuente de alimentación con corriente continua, que suministró energía a través de los electrodos. Se recolectaron muestras cada 12 h durante 60 h para determinar las concentraciones de etanol, azúcares reductores y biomasa mediante técnicas de espectrofotometría e identificación de volátiles por HS SPME CG MS. Los resultados de los rendimientos de los electrodos indican no hay un efecto de interacción entre electrodo y voltaje, pero hay un efecto del material del electrodo en el metabolismo de la levadura. Con respecto al electrodo de grafito con 15 y 30 V, se registró un aumento de 60 % en la tasa de crecimiento, el tiempo de duplicación se redujo hasta un tercio, aceleró el consumo de azúcares reductores 0.6 veces y se presentó un aumento en la concentración de compuestos volátiles. La concentración de etanol obtenida por electrofermentación fue similar a la fermentación tradicional. La aplicación de este sistema moduló el metabolismo de la levadura para obtener una cerveza lager única en los compuestos volátiles, pero se sugiere una evaluación sensorial para satisfacer las preferencias del consumidor.

Palabras clave: cerveza baja en alcohol, electrofermentación, compuestos aromáticos

Abstract

The demand for beer with low alcohol content has had an increase, however, the available technologies to obtain this beverage are detrimental to their organoleptic properties. Therefore, the effect of an electrofermentation system was evaluated in the ethanol content and aroma profile of a beer. A 3^2 factorial experimental design was conducted. The factors were electrode material (stainless steel, titanium, and graphite) and voltage (0, 15, and 30 V), and the response variable was the ethanol yield. Besides, these treatments were compared with a traditional fermentation as a control. The fermenter with the wort and yeast (*Saccharomyces pastorianus*) were kept in a cooler with ice to maintain a temperature range of 14 - 18 °C. The experimental units were connected in series and plugged into a power source with direct current, voltage supplying energy through the electrodes. Samples were collected every 12 h during 60 h to determine the ethanol, reducing sugars, and biomass concentrations by spectrophotometry techniques and volatile identification by HS SPME GC MS. The electrode yield results indicate that there is no interaction between electrode and voltage, but there is an effect of the electrode material on yeast metabolism. The use of graphite as an electrode with 15 and 30 V registered a 60 % increase in the specific growth rate was observed, the generation time was reduced by up to a third, the consumption of reducing sugars accelerated 0.6 times and an increase in the concentration of volatile compounds was presented. The ethanol concentration obtained by electrofermentation was similar to the traditional fermentation. The application of an electrostatic system modulated yeast metabolism to obtain a beer lager unique in the volatile compounds, but a sensorial evaluation is suggested to meet consumer preferences.

Keywords: low alcohol beer, electrofermentation, aromatic compounds.

CONTENIDO

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. ANTECEDENTES	7
2.1. Historia de la cerveza	7
2.2. Mercado de la cerveza	9
2.2.1. Mercado global	9
2.2.2. Mercado nacional	9
2.2.3. Tendencias de mercado	10
2.3. Clasificación de la cerveza.....	11
2.4. Ingredientes principales de la cerveza	13
2.4.1. Agua	13
2.4.2. Cebada	14
2.4.3. Lúpulo.....	17
2.4.4. Levadura.....	20
2.5. Proceso de elaboración de la cerveza	28
2.5.1. Preparación del mosto.....	28
2.5.2. Fermentación tradicional alcohólica	29
2.5.3. Métodos comunes para eliminar alcohol	30
2.6. Sistemas bioelectroquímicos	34
2.6.1. Electrofermentación.....	35
3. JUSTIFICACIÓN	37
4. OBJETIVOS.....	38
4.1. Objetivo general	38
4.2. Objetivos específicos	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1. Materiales.....	39
5.1.1. Material biológico.....	39

5.1.2.	Materia prima.....	40
5.1.3.	Maceración y cocción de mosto	40
5.2.	<i>Diseño experimental</i>	41
5.2.1.	Diseño del sistema de electrofermentación.....	41
5.2.2.	Descripción de la unidad experimental.....	42
5.2.3.	Tratamientos.....	42
5.3.	<i>Métodos analíticos</i>	43
5.3.1.	Espectrofotometría	43
5.3.2.	Cromatografía de gases	2
5.4.	<i>Análisis estadístico</i>	41
6.	<i>RESULTADOS</i>	42
6.1.	<i>Evaluación del sistema de electrofermentación</i>	42
6.2.	<i>Identificación de compuestos aromáticos por cromatografía de gases</i>	49
7.	<i>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</i>	52
7.1.	<i>Efecto del potencial eléctrico sobre la fermentación</i>	52
7.2.	<i>Efecto de la conductividad eléctrica de los electrodos sobre la fermentación</i>	53
7.3.	<i>Efecto del campo magnético sobre la fermentación</i>	54
7.4.	<i>Comportamiento del metabolismo celular en un sistema de electrofermentación</i>	55
8.	<i>CONCLUSIONES</i>	57
9.	<i>REFERENCIAS</i>	58
10.	<i>ANEXOS</i>	67

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Estilos de cerveza	7
2	Composición de conos de lúpulo	12
3	Valores umbral de los ésteres más importantes y alcoholes superiores presentes en la cerveza lager	22
4	Composición final de azúcares fermentables en el mosto	24
5	Cervezas sin alcohol obtenidas con diferentes tecnologías de producción	26
6	Ingredientes para producir 1 L de cerveza tipo lager	35
7	Incorporación de lúpulo al mosto durante la cocción para 1 L de cerveza tipo lager	36
8	Factores y niveles de diseño experimental 3^2	38
9	Comparación de los parámetros cinéticos de <i>S. pastorianus</i> en un sistema de fermentación electrostática aplicando diferentes voltajes utilizando acero inoxidable, titanio y grafito como electrodos	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Principales países exportadores de cerveza en 2016	5
2	Estructura del grano de cebada	10
3	Estructura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
4	Ingesta de azúcares fermentables por <i>S. cerevisiae</i>	18
5	Metabolismo de <i>S. cerevisiae</i>	20
6	Esquema de los métodos más comunes para producir cerveza libre o baja en alcohol	27
7	Diseño del sistema de electrofermentación	37
8	a) Esquemmatización de la conexión de los reactores embobinados dentro de un contenedor para mantener temperatura constante entre 16±2 °C. b) Fuente de poder de corriente directa (modelo GPS-3030DD).). Rendimientos de etanol usando <i>S. pastorianus</i> en mosto para cerveza tipo lager aplicando 0, 15 y 30 V con el uso de acero inoxidable (a), titanio (b) y grafito (c) como electrodos	42
9	Dinámicas de a) generación de etanol, b) generación de biomasa y c) consumo de azúcares reductores de los tratamientos del electrodo de grafito y una fermentación tradicional (FT) de una cerveza lager bajo el efecto de un sistema electrostático durante 60 h.	44
10	Suma de áreas de picos relativa de diferentes componentes volátiles de la cerveza tipo lager realizada de forma tradicional (FT), a 15 y 30 V a las 60 h	48
11	Mapa de calor de los compuestos aromáticos presentes en la cerveza tipo lager formados durante la fermentación tradicional y los tratamientos utilizando un sistema de fermentación electrostática con un electrodo de grafito a 15 y 30 V a las 60 h.	49
12	Tipos de potencial eléctrico.	51
13	Esquema de un inductor tipo solenoide comparado con el reactor de electrofermentación	53
14		55

1. INTRODUCCIÓN

Una de las bebidas más antiguas y distinguidas del mundo es la cerveza. De acuerdo con descubrimientos arqueológicos, se sabe que se produce desde hace más de siete mil años. En la actualidad, la producción de cerveza se realiza internacionalmente y la cantidad de sabores y presentaciones es extensa. Se regula constantemente por distintas asociaciones, por lo que su evolución es más controlada.

Además de la diversificación de estilos, se han presentado otra clase de consideraciones en la comercialización. Las más recientes son en relación al contenido alcohólico. El mercado de esta índole ha aumentado en los últimos años, debido a que los consumidores tienen mayor interés en la salud, así como en evitar el abuso del alcohol. Aunque las definiciones de “bajo en alcohol” y “sin alcohol” en las cervezas varían en diferentes países, también varía su composición que por lo general es de 0 hasta 2.25 % v/v.

Ya en la industria se tienen distintos procedimientos para eliminar el etanol de la bebida. En algunos casos, puede dañar la composición aromática por los procesos aplicados. La reciente alta demanda requiere de explorar otros procedimientos para su fabricación conservando o mejorando las propiedades químicas de la cerveza. Por lo tanto, las capacidades de la fermentación deben estar en constante evolución para permitir la satisfacción del mercado.

Las tecnologías emergentes han permitido aumentar la capacidad de comprensión de los fundamentos aplicados y marcan la pauta para aumentar la capacidad de fabricación. Un concepto relativamente antiguo que recientemente ha sido retomado es la aplicación de sistema bioelectroquímicos. Uno de los modelos establecidos es la electrofermentación. Con este mecanismo, se pretende utilizar energía eléctrica para mediar las vías metabólicas, con el fin de aumentar o disminuir los productos de interés. En algunos casos, también puede disminuir el tiempo de fermentación. Usar dicho procedimiento en la generación de bebidas fermentables, en especial cerveza, puede ser una opción para disminuir el contenido

alcohólico. Además, abre la posibilidad de crear otros estilos y formar otros atributos característicos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Historia de la cerveza

De acuerdo con la definición de la Norma Oficial Mexicana NOM-199-SCFI-2017, la cerveza es “una bebida alcohólica fermentada elaborada con malta, lúpulo, levadura y agua potable. Puede adicionarse con infusiones de cualquier semilla farinácea procedente de gramíneas o leguminosas, raíces o materia prima vegetal feculenta y/o carbohidratos de origen vegetal susceptibles de ser hidrolizados o, en su caso, azúcares que son adjuntos de la malta, con adición de lúpulos o sucedáneos en éstos. El contenido alcohólico varía de 2 a 20 % v/v”.

La definición anterior coincide con la dada por la FAO (1994), donde la cerveza es hecha a partir de cereales malteados fermentados (principalmente cebada), agua y lúpulo. También pueden utilizarse cereales no malteados. Aunque la definición de la FAO difiere de las principales clasificaciones internacionales, puesto que incluye la cerveza no alcohólica.

De cualquier modo, la bebida ha pasado por un largo proceso de transformaciones. Tanto la estructura de elaboración, como las cualidades fisicoquímicas y organolépticas de la cerveza han cambiado para ser como la conocemos actualmente. Se cree que el origen de la bebida comenzó hace aproximadamente 7,000 años. Es posible que los mesopotámicos fueron iniciadores, dado que las fechas coinciden con el nacimiento de la agricultura (Damerow, 2012). En los registros de los sumerios encontrados en Sudán se describe que la fermentación se realizaba en vasijas con agua y trozos de pan. Las vasijas eran colocadas en el sol durante días y al finalizar el proceso de fermentación, la bebida era filtrada y almacenada. Esta bebida era conocida como “sikaru” o “cerveza de pan” (FAO, 2019).

En Egipto se encuentran registros con una antigüedad de 3,000 años sobre la producción de “sikaru” (Perruchini et al., 2018). La bebida se propagó por el

continente europeo, siendo los monasterios alemanes quienes mejoraron ciertos aspectos organolépticos de la bebida. Hacia el siglo VII, los mismos monasterios alemanes comenzaron a usar plantas para la conservación de la bebida, tales como mirto de bravante (*Myrica gale*) o lúpulo (*Humulus lupulus*) (Behre, 1999). En Alemania, durante 1516, se firmó la Ley de Pureza Bávara. En ella, se establecía que los únicos ingredientes para la elaboración de cerveza debían ser malta, lúpulo y agua. La levadura aún no se consideraba un ingrediente, debido a que todavía no se conocía la existencia de estos microorganismos (Unger, 2007).

Durante el siglo XIX, surgieron descubrimientos científicos importantes para la elaboración de la cerveza. Un ejemplo es el trabajo de Louis Pasteur con respecto a los procesos de fermentación, el cual tuvo un impacto en la industria alimentaria y de bebidas, así como lo fue el proceso de pasteurización. Por otro lado, Emil Christian Hansen logró el aislamiento de cepas de levaduras puras a través del cultivo. Lo anterior, ayudó a la industria cervecera a mejorar y unificar la calidad y aumentar la vida de anaquel del producto (Sánchez, 1995).

Las aportaciones microbiológicas no fueron lo único que surgió durante esta época, la revolución industrial se propagó por Europa a mediados del siglo XVII, hasta finales del siglo XIX (Li et al., 2015). La invención del motor de vapor manifestó un cambio drástico en la forma de producción cervecera. Los motores que podrían operar las máquinas, la invención del termómetro y el hidrómetro para monitorear la producción de cerveza, el desarrollo de hornos de carbón utilizados para la elaboración de malta y las pequeñas, pero muy útiles, mejoras para envasar la cerveza en venta sirvieron para aumentar la producción local (Mosher & Trantham, 2017). Lo anterior sólo marcó la diferencia para el inicio de la comercialización a gran escala, lo que provocó que la cerveza se volviera más barata y más fácil de comprar.

Por otro lado, la refrigeración también fue un avance tecnológico que benefició a las cerveceras. Antes de la refrigeración, los cerveceros sólo podían usar hielo que se recolectaba en ríos congelados o nieve durante el invierno para las fermentaciones que requerían bajas temperaturas. Además, la conservación del

producto también significaba un problema, puesto que la vida útil del producto se veía afectada (Li et al., 2015). Gracias a esta nueva invención, la cerveza podía ser transportada a mayores distancias y almacenada durante períodos más prolongados.

2.2. Mercado de la cerveza

2.2.1. Mercado global

Las bebidas fermentadas ocupan el segundo lugar de las más consumidas a nivel mundial (Mencia Sánchez & Pérez Gallegos, 2016), siendo Norteamérica el principal consumidor. No obstante, Europa es la región principal donde se consume más cerveza. Los países que más la consumen son República Checa, Alemania y Polonia, que de acuerdo con un análisis de STATISTA (2018a), consumen un promedio de 137, 98.1 y 91.0 L por persona al año, respectivamente.

Anheuser-Busch InBev N.V./S.A. (o también conocido como AB InBev) es una empresa multinacional de origen belga considerada como la mayor fabricante de cerveza del mundo. En el 2018 percibió ingresos de aproximadamente 56.4 mil millones de dólares. Lo que traduce como la dominación de una tercera parte del mercado mundial (STATISTA, 2018b). En 2012, esta compañía multinacional absorbió por completo a Grupo Modelo, la mayor cervecera de México. Grupo Modelo, instaurada en México, fue una de fundadoras de la Cámara de Cerveceros de México junto con Cuauhtémoc-Moctezuma (Cerveceros de México, 2017). Ésta última también fue absorbida por una empresa extranjera: Heineken International.

2.2.2. Mercado nacional

México, por otro lado, no es un gran consumidor a comparación de estos países europeos, pero sí es un gran productor y exportador. De acuerdo con datos del INEGI (2016), México es el cuarto productor de cerveza después de China, Estados Unidos y Brasil y es el país exportador más importante desde el 2010. En el 2016 tuvo la participación del 21.3 % de las exportaciones mundiales (Figura 1).

Lo anterior coincide con los datos registrados de STATISTA (2017). La fuente manifiesta que la producción tanto de América del Norte como del Sur fue de 595 millones de hL en el 2017, siendo Estados Unidos, Brasil y México los principales

productores. Lo que se infiere que el continente americano aportó aproximadamente un tercio de la producción mundial de ese mismo año.

Principales países exportadores de cerveza, 2016
Porcentajes respecto al valor total de las exportaciones mundiales

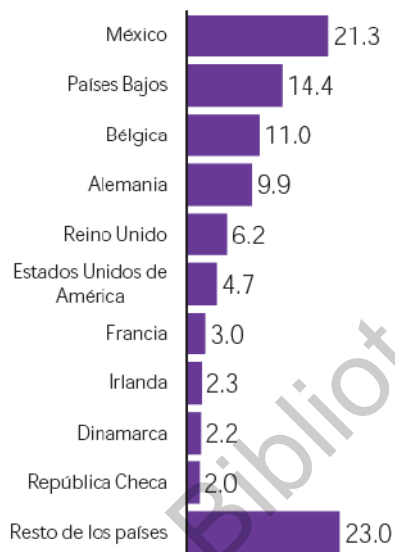


Figura 1. Principales países exportadores de cerveza en 2016 (INEGI, 2016)

Actualmente, el mercado de la cerveza tradicional se encuentra en su mejor posición en el país y en el mundo contando con un valor de mercado de 700 mil millones de dólares. Asimismo, la industria de la cerveza artesanal ha aumentado su valor en los últimos años y actualmente cuenta con un valor 100 mill millones de dólares, pero se prevé que seguirá creciendo (Ángeles & Zuñiga, 2018).

2.2.3. Tendencias de mercado

El consumo de alcohol es generalizado en todo el mundo y está influenciado por factores de vulnerabilidad social e individual. Los factores sociales incluyen los niveles de desarrollo de las sociedades, la cultura, el contexto de consumo y la producción de alcohol. Por su parte, los factores individuales que afectan el consumo de alcohol incluyen la edad, el género, los factores familiares y el estado socioeconómico (Liguori et al., 2018). Con respecto a esto, el consumo de cerveza ha cambiado, tanto a nivel mundial como nacional. Estas transformaciones se ven reflejados en los cambios de hábitos en el consumidor.

Últimamente, los individuos que buscan cervezas con bajo nivel de alcohol o sin alcohol ha aumentado (Varela & Varela, 2019). Esto puede ser debido a que los consumidores son cada vez más conscientes de los problemas de salud causados por el alcohol y buscan otras alternativas más saludables (Brányik et al., 2012).

La producción de cerveza con un menor contenido alcohólico puede aumentar el suministro de bebidas, la comercialización, y mejorar el bienestar del consumidor aprovechando las moléculas beneficiosas y el contenido restringido de alcohol (Liguori et al., 2018). De acuerdo con Wise Guy Report (2019), en un estudio de mercado sobre esta tendencia, se espera que el mercado global de cerveza baja en alcohol y sin alcohol alcance los 5.91 mil millones de dólares en el año 2023. Esto quiere decir que CAGR (en español, tasa de crecimiento anual compuesta) tendrá un crecimiento de 8.28 % durante este período estimado.

2.3. Clasificación de la cerveza

A través del tiempo y práctica, los maestros cerveceros se han dado a la tarea de experimentar con los sabores y aromas para la elaboración de diferentes cervezas. Esto es posible debido a la combinación de diferentes especies de granos, tipos de levadura o lúpulo y por la adición de otros componentes como fruta, especias, entre otros. Existen diferentes formas de hacer una cerveza, pero existen recetas y procesos parecidos entre sí. Por lo tanto, al clasificarlas se busca que sean agrupados por sus similitudes (Mosher & Trantham, 2017).

La clasificación general más aceptada se divide en dos y está basada en el tipo de levadura que se utiliza durante la fermentación: ale y lager (Li et al., 2017). Un malentendido muy común entre estas clasificaciones es la relación al color. Por lo general, se piensa que las ale son bebidas exclusivamente oscuras, mientras que las lager son claras. No obstante, tanto las ale como lager tienen una amplia gama de tonos, sabores y aromas (Palmer, 2017).

Cuadro 1. Estilos de cerveza. Recuperado de Harrison & Albanese (2017)

Tipo	País de origen
<i>Ales</i>	
Alt or altbier	Alemania
Barley wine	Inglaterra
Bitter ale	Inglaterra
Cream ale	Estados Unidos
Imperial stout	Inglaterra
India pale ale	Inglaterra
Lambic	Bélgica
Porter	Inglaterra
Saison	Bélgica
Stout	Irlanda
Sweet stout	Inglaterra
Weizenbier or wheatbeer	Alemania
<i>Lagers</i>	
Bock	Alemania
Dortmunder	Alemania
Dunkel	Alemania
Helles	Alemania
Malt liquor	Estados Unidos
Märzen	Alemania
Pilsener	República Checa
Rauchbier	Alemania
Schwarzbier	Alemania
Porter	Inglaterra
Vienna	Austo-Húngaro
Zwickelbier	Alemania

A esta variedad se le denomina *estilo*. Éstas, a su vez, también se clasifican en categorías y sub-categorías (Palmer, 2017). El tipo de malta, de lúpulo, la especie de levadura, así como el anexo de otros adjuntos como especias, granos sin maltear, lactosa en polvo, el uso de distintos tipos de lúpulo y la combinación de éstos delimitan el perfil de sabores que tiene un estilo (Stewart et al., 2018). Incluso la calidad del agua y el tipo clima en la región en conjunto con los ingredientes se acoplan para dictar el carácter de la cerveza (Harrison & Albanese, 2017). En el Cuadro 1. se muestran algunos de los estilos que existen y el país en donde se originaron.

Por ejemplo, de la categoría American Porter y Stout, se desprenden estilos como la Imperial Stout o el American Porter, mientras que de la categoría Dark British Beer, se desprenden los estilos Sweet Stout, Oatmeal Stout y Tropical Stout (Cerveceros de México, 2018). Los estilos son acotados por organizaciones con el objetivo de estandarizar los métodos de cada categoría. Un ejemplo es Brewers Association donde todos los años, entre los meses de febrero y marzo, actualiza las pautas de cada estilo (Brewers Association, 2019).

2.4. Ingredientes principales de la cerveza

Para la fabricación de la cerveza se requieren cuatro ingredientes principales: agua, malta de cebada, lúpulo y levadura. Se requiere que éstos sean de alta calidad para obtener un producto con las mejores cualidades (Mosher & Trantham, 2017). En algunos casos es posible añadir otros elementos como especias, frutas, otros cereales con o sin maltear e, inclusive agregar más de un tipo de lúpulo.

2.4.1. Agua

Al igual que otras bebidas, el agua es el componente mayoritario de la cerveza. De acuerdo a diferentes autores, el agua se considera como el ingrediente más importante. No solo es el que ocupa el 90 % en composición, sino que también, dependiendo de su composición química, puede tener un impacto relevante en el sabor de la cerveza (Stewart et al., 2018).

El contenido de sales y minerales disueltos tiene una influencia directa con la calidad sensorial. Por ejemplo, se conoce que el agua de la región de Londres y

también en partes de Irlanda contiene bicarbonato, lo que eleva el pH del agua. Esta característica del agua mejora las cualidades sensoriales de cervezas con estilos porter y stout. Asimismo, el agua con alto contenido de sulfato de calcio también tiene efectos positivos como potenciar el sabor y aroma del lúpulo (Mosher & Trantham, 2017).

Tanto los iones de calcio como los de magnesio son muy comunes en el agua potable. Ambos influyen en la *dureza* del agua, es decir, aquella con una alta concentración de sales o iones. Existen dos tipos de dureza: temporal y permanente. La primera es la que está contenida en forma de carbonato o bicarbonato y la concentración puede ser disminuida durante la ebullición del agua. La segunda se refiere a la presencia de aniones de sulfato, nitrato, clorato, entre otros, pero las concentraciones no cambian, aún cuando el agua es hervida (Mosher & Trantham, 2017).

Por otro lado, la calidad del agua tiene que cumplir ciertas reglamentaciones para poder utilizarse. La más relevante es la guía para la calidad de agua potable de la Organización Mundial de la Salud para el uso en alimentos (Bamforth, 2016). En ésta, se tienen recomendaciones para el desarrollo y ejecución de estrategias para garantizar la inocuidad y sanidad del agua. Contiene, además, requisitos mínimos razonables para cumplir prácticas seguras y proteger la salud de los consumidores (OMS, 2006).

2.4.2. Cebada

La cebada es considerada como de las primeras especies cultivables. Es el cuarto grano más cultivado en el mundo, con respecto a otros cereales. Existen dos especies principales: de 2 (*Hordeum distichum*) y 6 hileras de grano (*Hordeum vulgare*) (Shewry & Ullrich, 2014).

Los granos de cebada se usan para distintas industrias alimenticias, por ejemplo, la panificación, confitería y bebidas alcohólicas. La razón de esto es porque tiene una composición química rica en almidón y una porción moderada de proteínas. Específicamente para la producción de cerveza, esta composición de

biomoléculas ayuda a la propagación celular, así como en la formación de sabores y aromas (Li et al., 2017).

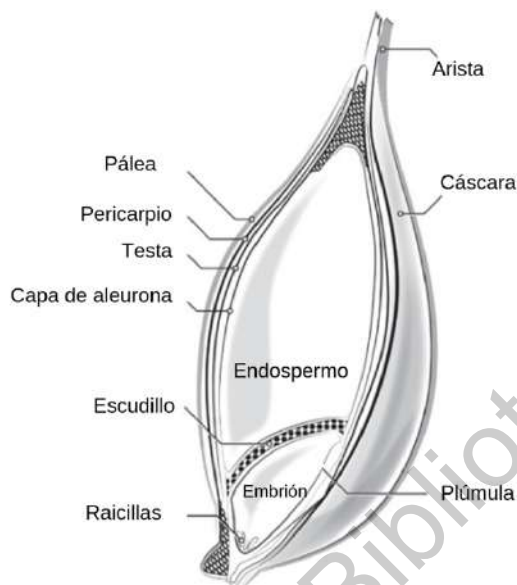


Figura 2. Estructura del grano de cebada (Mallet, 2013)

La estructura del grano está definida por cáscara, pericarpio, testa, capa de aleurona, endospermo y embrión (Figura 2). En la capa de la testa se encuentran polifenoles, también conocidos como taninos. Mientras que, en la capa de aleurona es rico en ácido ferúlico, un precursor de aroma (Mallet, 2015). El endospermo ocupa aproximadamente el 70 % p/p del tamaño total (Mosher & Trantham, 2017). Este último es la parte más importante, puesto que está conformado por almidón. El polisacárido se fragmentará y será metabolizado por las levaduras; en la planta, funciona como un almacenamiento de energía para la futura germinación (Shewry & Ullrich, 2014).

2.4.2.1. Cebada malteada

Para la cerveza, la especie que se utiliza es *H. distichum*, es decir, de dos hileras. Esto es porque los genotipos de esta especie tienen una mayor proporción de sacáridos – proteínas en comparación con los genotipos de *H. vulgare* (Bettenhausen et al., 2018)

El objetivo del malteo es inducir la producción de enzimas con la capacidad de degradar macromoléculas a moléculas solubles. El proceso completo está dividido en tres etapas: remojo, germinación y secado (Hill, 2015). Primero, la cebada se moja para inducir la germinación, es decir, que la semilla empiece a generar raíces. Después, el grano se somete a una temperatura y humedad controlada. Este paso es importante para la obtención de enzimas hidrolíticas para degradar el almidón dentro del grano (Briggs et al., 2004). Por último, el secado se controla en gran medida mediante el horneado a temperaturas y tiempos específicos. El secado se usa para inactivar a las enzimas, detener la germinación, eliminar la raíz formada y dar color, lo que hace la diferencia entre las maltas, por ejemplo, entre la pálida y chocolate (Bettenhausen et al., 2018). Este último paso también es importante para determinar el perfil de sabores que se buscan en el producto por medio de procesos químicos (Mosher & Trantham, 2017).

Entre las enzimas con mayor importancia se encuentran las hidrolasas. Éstas se producen en la capa de aleurona. Durante el malteo se exponen al almidón para su degradación en moléculas más pequeñas denominados azúcares fermentables. Las levaduras metabolizan estas moléculas en orden de simplicidad, siendo la glucosa el primer componente fermentado en el proceso (Shewry & Ullrich, 2014).

Impacto en el sabor

Las variedades del sabor de la cerveza se deben a diversos factores: el tipo de granos utilizados, procesamiento de secado, tostado de las maltas y, en cierta medida, al cultivar del grano utilizado (Stewart et al., 2018). Los sabores y precursores de sabor se forman principalmente a partir de la reacción de Maillard durante el tostado (Mallet, 2013). Algunos ejemplos son la generación de maltoxazina, maltol, isomaltol y etilmaltol que le proveen ciertas notas de pan, caramelo o algodón de azúcar a la cerveza (Bettenhausen et al., 2018).

La reacción de Maillard es una reacción de oscurecimiento no enzimática. Además de la generación del color, es fundamental para el desarrollo de los sabores y aromas más preciados para el hombre. Esta reacción se lleva a cabo en presencia de aminos y carbonilos. En la cebada, se encuentran en forma de aminoácidos o

proteínas y azúcares reductores. De los parámetros más influyentes sobre la reacción es la temperatura, composición química, actividad de agua y pH. De los anteriores, la temperatura se considera como la más relevante debido a que las enzimas que realizan dichas transformaciones necesitan mayor energía de activación. Combinado con baja actividad de agua, favorecen la producción de compuestos de sabor de notas tostadas (Reineccius, 2005).

2.4.3. Lúpulo

El lúpulo (*Humulus lupulus*) es una planta herbácea trepadora resistente perteneciente a la familia Cannabaceae (Pistelli et al., 2018). Es conocida por su participación en la industria cervecera. Está ampliamente distribuida por el mundo, siendo Alemania y Estados Unidos sus mayores productores con más del 70 % del producto cosechado a nivel mundial (Stewart et al., 2018).

Cuadro 2. Composición de conos de lúpulo Recuperado de Bamforth (2016)

Elementos	Porcentaje base seca (% p / p)
Resina	15
Proteínas	15
Monosacáridos	2
Polifenoles (terpenos)	4
Pectina	2
Aceites esenciales volátiles	0.5
Ceniza	8
Humedad	10
Celulosa	43

Es una especie dioica, es decir, que tiene plantas masculinas y plantas femeninas separadas (Bamforth, 2016). Para la elaboración de cerveza, se requiere solamente la parte femenina, puesto que éstas tienen la capacidad de producir conos o glándulas. En ellas, se encuentran las glándulas secretoras de *polen*. Éste

es una combinación de distintos elementos (Cuadro 2), donde los más importantes son la resina, aceites esenciales y polifenoles (Stewart et al., 2018).

Inicialmente esta planta era conocida por sus propiedades antiinflamatorias, antidepresivas y antimicrobianas en la edad media (Pistelli et al., 2018). Fueron los alemanes quienes le añadieron el lúpulo a la cerveza por primera vez con el propósito de su conservación (Li et al., 2017). Con el paso del tiempo, el uso de ésta ha evolucionado, no solo en la generación de variedades de sabor y aroma, sino también como estabilizante de espuma y como antioxidante. De acuerdo con MillerCoors, centro de investigación y elaboración de cerveza, el lúpulo aporta a la cerveza de amargura, aroma, sabor, textura, estabilidad de sabor, espuma y actividad antimicrobiana (Hieronymus, 2012).

2.4.3.1. Resina

La resina está dividida en dos: suave y dura. La suave es una mezcla de dos tipos de ácidos: α y β . Al conjunto de los ácidos α se les denomina comúnmente como humulonas y existen tres homólogos principales: humulona, cohumulona y adhumulona. Mientras que los ácidos β se conocen como lupulonas y, al igual que los α , existen tres homólogos: lupulona, colupulona y adlupulona (Bamforth, 2016).

Los ácidos tanto α como β , en su forma nativa, no proveen sabor u olor característico. Éstos se someten a una isomerización térmica durante el proceso, los cuales se denominan iso- α -ácidos e iso- β -ácidos. Los primeros son los principales responsables de la amargura de la cerveza, el 80 % provienen de estos compuestos (Oladokun et al., 2016). En adición, los iso- α -ácidos también tienen propiedades antibacterianas y tienen la capacidad de estabilizar la espuma. Por otro lado, los iso- β -ácidos influyen poco en el aroma y sabor de la cerveza, así como la estabilidad de la misma (Li et al., 2017).

Una forma de medir la amargura es por medio de los IBU. Los IBU son una unidad de medida definida por la Sociedad Americana de Químicos Cerveceros que significa, en sus siglas en inglés, International Bitterness Unit (Unidad Internacional de Amargor). Ésta es definida por 1 miligramo de iso- α -ácidos por cada litro de cerveza (Oladokun et al., 2017).

2.4.3.2. Aceites esenciales

Además de las resinas, un elemento importante para la composición del aroma y sabor son los aceites esenciales. Como regla general, se conoce que entre mayor sea la concentración de ácidos α , mayor es el contenido de aceites (Stewart et al., 2018). De acuerdo con análisis cromatográficos, los aceites esenciales se componen de más de 300 compuestos diferentes. Se les puede clasificar en tres categorías: terpenos, fracción oxigenada y fracción sulfurada (Pistelli et al., 2018).

Los terpenos constituyen hasta el 90 % p/p de los aceites totales, dependiendo de la variedad de lúpulo. Los más importantes son los sesquiterpenos (conformados por mirceno, α -humuleno y β -cariofileno) teniendo una presencia de hasta el 80 % de los terpenos totales. Son compuestos poco solubles en agua, pero es posible encontrar rastros de estos componentes en la cerveza si se añade lúpulo en partes específicas del proceso de elaboración (Bamforth, 2016).

La fracción oxigenada está compuesta principalmente por alcoholes, ésteres y cetonas. Por lo general, son componentes que se encuentran en muy bajas cantidades en el producto final. Lo anterior da pauta a que éstas se miden en partes por billón en lugar de partes por millón. No obstante, se cree que el rol de estos grupos tiene un efecto sinérgico importante para la calidad final de la cerveza (Stewart et al., 2018).

Por último, la fracción sulfurada también influye en la calidad del sabor. Pero la presencia de este grupo también tiene un impacto negativo. Esto es porque en grandes cantidades, los compuestos sulfurados dejan rastros de sabores característicos, además de afectar la coloración de la cerveza (Bamforth, 2016). Dichos componentes son dimetil disulfuro, trimetil disulfuro y metanotiol (Stewart et al., 2018).

2.4.3.3. Polifenoles

La cantidad y tipo de polifenoles que hay en la cerveza, depende de la cantidad y variedad de lúpulo que se use. Tienen efectos positivos tanto en el sabor, como en la estabilidad. De todos los ingredientes, el lúpulo es el que puede proveer hasta el 50 % de los polifenoles en la cerveza a pesar de ser añadido en pequeñas

cantidades (Stewart et al., 2018). Aunque, el ingrediente que provee la mayor parte de los polifenoles en el producto final es la cebada, que en ciertas ocasiones, logra atribuir hasta el 70 % (Hieronymus, 2012).

Los polifenoles se pueden dividir en cuatro categorías: ácidos fenólicos, flavonoles, catequinas y antocianidinas (Li et al., 2017). Los polifenoles de lúpulo mejoran la estabilidad del sabor debido a sus cualidades antioxidantes, que suprimen la formación de compuestos no deseados (Hieronymus, 2012). De este grupo, el compuesto más importante podría considerarse que son las flavonoides porque podrían tener efectos positivos en la salud (Li et al., 2017).

2.4.4. *Levadura*

Los microorganismos utilizados para la fermentación de bebidas alcohólicas, por lo general, son las levaduras. Éstas son microorganismos eucarióticos unicelulares de aproximadamente 5 a 10 μm de largo y 5 μm de ancho (Mosher & Trantham, 2017). Pertenecen al dominio eukarya, lo que significa que tienen estructuras endomembranas definidas como núcleo y mitocondria (Figura 3).

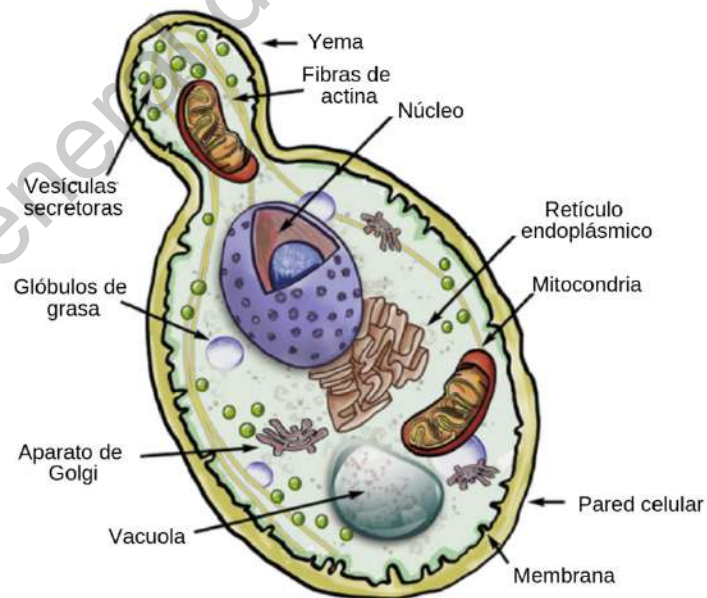


Figura 3. Estructura de *S. cerevisiae* (Walker & Stewart, 2016)

Forman parte del reino de los hongos y se caracterizan por dividirse asexual (división binaria y gemación) o sexualmente mediante ascosporas o basidiosporas

(Palmer, 2017). Estos microorganismos son la parte central del proceso debido a que la levadura realiza la conversión de azúcares para producir etanol, CO₂ y compuestos importantes para el sabor y aroma (Zainasheff & White, 2010).

La elección de levaduras juega un rol vital para la producción de bebidas alcohólicas, dado que la selección de cepas es esencial para maximizar el rendimiento de alcohol y la calidad del producto. Para fermentaciones a gran escala, la especie más utilizada, tanto para la industria cervecera como para la vinícola, así como para la producción de bebidas alcohólicas destiladas, es *Saccharomyces cerevisiae*. En producciones más pequeñas es posible que permitan fermentaciones espontáneas con la microbiota natural de la materia prima. Este es el caso de bebidas como tequila o mezcal en México, o la producción de la cachaza en Brasil (Walker & Stewart, 2016).

2.4.4.1. Levaduras cerveceras

Para la producción de cerveza, el uso del género *Saccharomyces* es habitual. Tanto el sabor así como el aroma es en gran parte definido por la cepa empleada y la composición del mosto. En cierto modo, la calidad del producto final es determinado por la levadura y los parámetros fisicoquímicos manejados durante la fermentación. Por lo anterior, las cerveceras se han animado a realizar cambios en las cepas de manera artificial con el uso de técnicas moleculares (Hill, 2015).

Tipo ale

S. cerevisiae es común en fermentaciones tipo ale y se denominan de alta fermentación. Lo anterior se refiere a que las levaduras se acumulan en la parte alta del contenedor, que por su hidrofobicidad, se adhieren al CO₂ y espuma en la superficie. Son más eficientes a temperaturas elevadas (16 a 25 °C). Los sabores que distinguen a los tipo ale son sabores más afrutados y dentro de esta clasificación se encuentran otros estilos como Brown Ale, Pale Ale e Indian Pale Ale (Li et al., 2017).

El grupo de cepas de *S. cerevisiae* es considerado como muy diverso. Muchas de ellas, se diversificaron debido a la domesticación de la levadura (Capece, 2018). Durante este tiempo, algunas cepas han conseguido habilidades o características

únicas e, incluso, la hibridación con otras especies, generando nuevas líneas celulares para cervezas tipo ale. Lo anterior fue corroborado por González et al. (2008), que reportaron que el 25 % de las cepas encontradas en cerveza tipo Belgian Trappist son híbridos entre *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii*.

Tipo lager

Actualmente, este tipo de levaduras son las responsables de la producción del 90 % de la cerveza a nivel mundial (Capece, 2018). La cepa que más se emplea es *S. pastorianus* y se sabe que es un híbrido entre *S. cerevisiae* y *S. eubayanus* (Mosher & Trantham, 2017). Además de *S. pastorianus*, algunas cerveceras utilizan cepas modificadas de *S. cerevisiae* (Li et al., 2017).

A diferencia de las levaduras tipo ale, éstas son de baja fermentación, en el que las levaduras se sedimentan en la parte baja del tanque. Tanto el proceso de fermentación como de almacenamiento se lleva a cabo a bajas temperaturas (8 a 15 °C), lo que lo convierte en un producto de mayor costo a comparación de la tipo ale (Mosher & Trantham, 2017).

Levaduras no convencionales

La búsqueda de productos innovadores ha impulsado la exploración de otras levaduras que permitan otras características en la cerveza. Desde la obtención de bajos niveles de etanol, hasta la generación de sabores diferentes, se ha experimentado con levaduras de especies diferentes al género *Saccharomyces*. No obstante, al tratarse de levaduras no domesticadas, pueden causar diferencias que afecten la calidad y sabor del producto. También puede actuar como una ventaja, es posible proponer nuevas variaciones o estilos con aromas y sabores diferentes a los convencionales (Capece, 2018).

Algunas levaduras no convencionales que actualmente se utilizan en cervecerías pertenecen a los géneros *Brettanomyces* y *Dekkera*, que están relacionadas con cervezas amargas tipo Lambic (Basso et al., 2016). Asimismo, *Brettanomyces* también es utilizado para cervezas belgas ale tipo Gueuze en combinación con otros microorganismos como bacterias ácido lácticas en conjunto con *Saccharomyces* (Bamforth, 2016). Otros géneros son *Hanseniaspora*, *Pichia*,

Torulaspora y *Wickerhamomyces*, que están siendo considerados por su capacidad para producir cerveza con contenido reducido de calorías y alcohol, además, con propiedades funcionales (Stewart, 2016).

2.4.4.2. Metabolismo durante la fermentación

El metabolismo es la suma de todos los procesos químicos que se llevan a cabo en los organismos vivos. La manifestación de dicho proceso se observa en la transformación de nutrientes en compuestos necesarios para sobrevivir. El conjunto de las reacciones químicas que actúan para la formación de estos compuestos se les denomina vías metabólicas. El metabolismo puede dividirse en dos: catabolismo y anabolismo. La primera se refiere a la liberación de energía a través de la degradación de las moléculas orgánicas, mientras que la segunda es la formación de energía por medio de las vías catabólicas (Briggs et al., 2004).

Producción de etanol y dióxido de carbono

Las levaduras tienen la habilidad de crecer en ambientes con y sin oxígeno, es decir, son anaerobios facultativos. Cuando hay ausencia de oxígeno, o en anaerobiosis, las levaduras se mantienen vivas por un mecanismo llamado fermentación (White & Zainasheff, 2010).

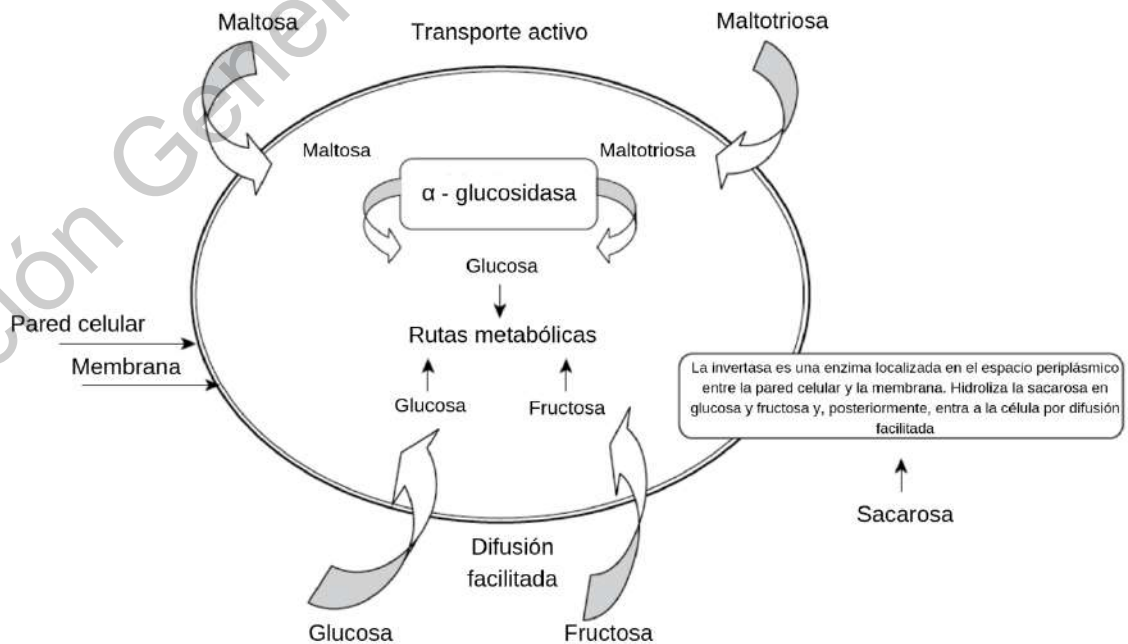


Figura 4. Ingesta de azúcares fermentables por *S. cerevisiae* (Bamforth, 2016)

Al inicio, momento en el que el mosto es inoculado con el microorganismo, las células utilizan sus reservas de glucógeno y el oxígeno que aún está disponible en el medio para adaptarse. De esta manera, se revitalizan las membranas para permitir la permeabilidad y transferencia de nutrientes que tiene disponible el mosto (Zainasheff & White, 2010). El oxígeno también es importante para la formación de esteroides y algunos ácidos grasos insaturados a partir de carbohidratos. Las células pueden continuar dividiéndose hasta que el agotamiento de los esteroides limite el crecimiento, debido a que los necesitan para el mantenimiento celular (Stewart et al., 2018).

El mosto tiene una gran variedad de biomoléculas como azúcares fermentables, aminoácidos, elementos lipídicos, vitaminas, entre otros (Stewart et al., 2018). Algunos de los azúcares disponibles en el mosto son glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, maltotriosa y dextrinas (Figura 4). Las levaduras prefieren azúcares simples, por lo que la glucosa y fructosa se introducen a través de la membrana por medio de difusión facilitada y serán los primeros en ser metabolizados. La sacarosa primero es hidrolizada en glucosa y fructosa mediante enzimas hidrolíticas localizadas entre la pared celular y la membrana antes de ser introducidas a la célula (White & Zainasheff, 2010). Por otro lado, la maltosa y la maltotriosa, compuestas por dos y tres unidades de glucosa respectivamente, no pueden entrar a la membrana de la misma manera. Éstas ingresan por medio de transporte activo, es decir, necesitan energía para poder ingresar. Por último, las dextrinas son oligosacáridos conformados de moléculas de glucosa, pero no todas las especies del género *Saccharomyces* son capaces de metabolizarla. En este último caso, las dextrinas permanecerán en la cerveza y proveerán cierta dulzura y cuerpo (Bamforth, 2016).

En presencia de oxígeno, la glucosa se rompe y se forman dos moléculas de piruvato en un proceso denominado glucólisis (Figura 5). La glucólisis consiste en un proceso de diez reacciones, donde por cada dos piruvato se tienen una ganancia neta de 2 ATP y dos moléculas de NADH. A partir de esto, se forman moléculas de alta energía, gracias a la conversión del piruvato, por medio de la respiración oxidativa. Las

moléculas de alta energía se denominan adenosin trifosfato o ATP (por sus siglas en inglés Adenosine Triphosphate) (Mosher & Trantham, 2017).

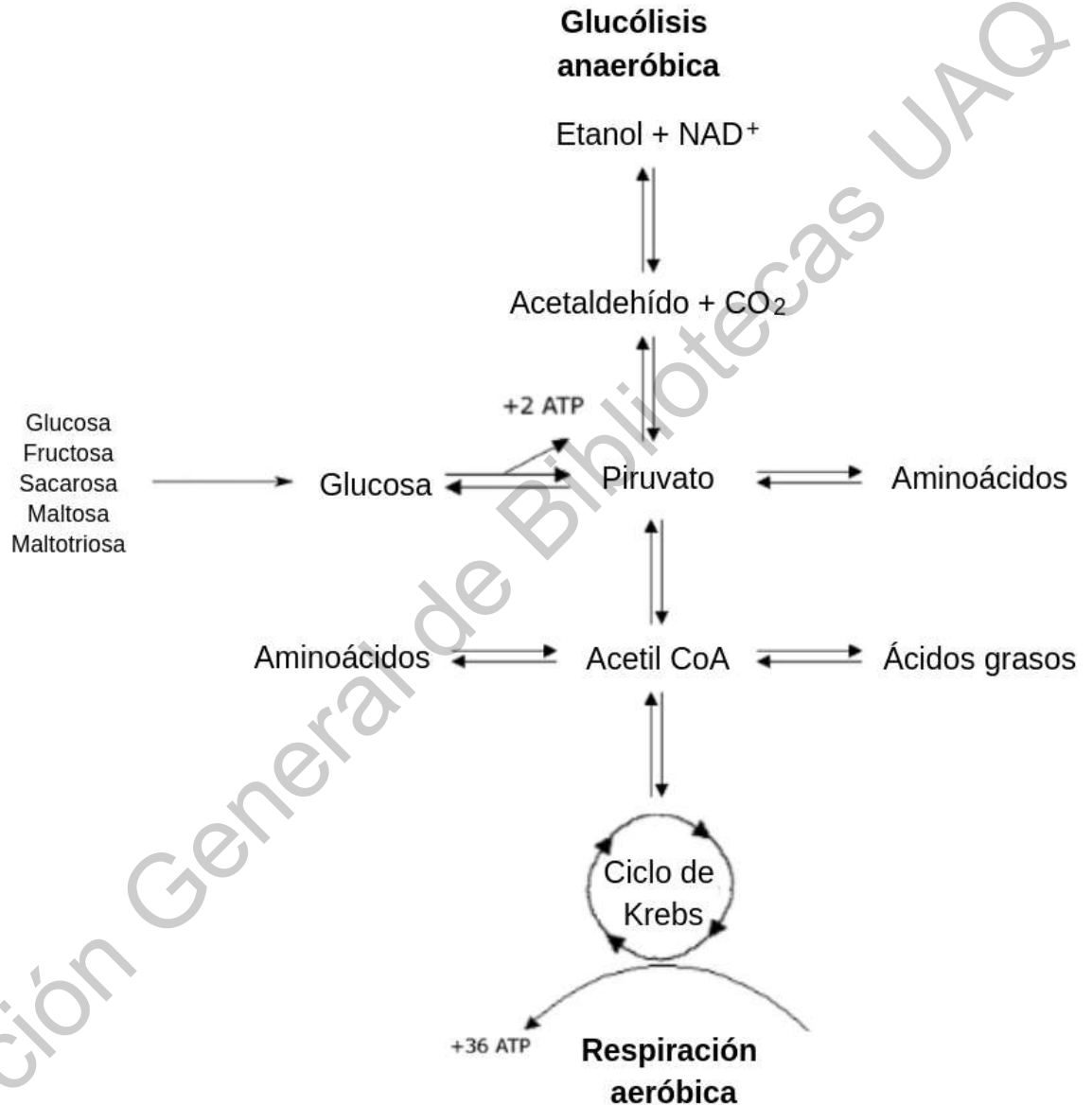
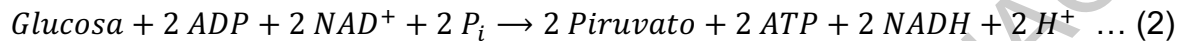


Figura 5. Metabolismo de *S. cerevisiae* (White & Zainasheff, 2010)

Cuando el oxígeno es eliminado, se verá favorecido el proceso de fermentación. Al igual que respiración aeróbica, los carbohidratos también se pasan a través de la vía de glucólisis para degradarlos a piruvato, pero a diferencia de éstos, las moléculas de

piruvato avanzaran a una vía alterna para producir etanol y dióxido de carbono (CO₂) (Mosher & Trantham, 2017). Estas reacciones se llevan a cabo en el citosol y tanto el etanol como el CO₂ son excretados al medio. Las ecuaciones 2 y 3 resumen la conversión de glucosa a etanol:



Cabe aclarar que no todo el piruvato es convertido a etanol. Una parte es dirigida a acetaldehído (Figura 5) (White & Zainasheff, 2010).

Impacto en el sabor y apariencia

La tarea de la levadura no solo se limita a la producción etílica, sino que también colabora en la gestación de sabores. Durante la fermentación, la levadura produce metabolitos que contribuyen sensorialmente a la cerveza gracias al metabolismo anaeróbico. Los principales son alcoholes superiores, aldehídos, ésteres y ácidos orgánicos (Briggs et al., 2004). La excreción de estos productos depende de diversos factores como el contenido del mosto, la cepa de la levadura, la temperatura de incubación, el nivel adjunto, el pH del mosto, la capacidad de amortiguación, la gravedad del mosto, el oxígeno, la presión, etc. (Stewart et al., 2018).

Los aminoácidos son el elemento más importante del mosto. De los ingredientes, los granos cebada proveen la mayor cantidad de aminoácidos en el caldo. Gracias a éstos, se llevan a cabo dos procesos importantes para la formación de compuestos volátiles: la reacción de Maillard y la generación de alcoholes superiores (Ferrera & Guido, 2018). El primero se debe a la presencia de azúcares y aminoácidos durante el secado y tostado de la malta, mientras que el segundo se lleva a cabo por la vía de Ehrlich a causa del metabolismo durante la fermentación (Pires et al., 2014).

Cuadro 3. Valores umbral de los ésteres más importantes y alcoholes superiores presentes en la cerveza lager. Adaptado de Pires et al. (2014)

Compuesto	Umbral (mg · L ⁻¹)	Aromas
<i>Ésteres de acetato</i>		
Etil acetato	25 – 30	Frutal, solvente
Isoamil acetato	1.2 – 2	Plátano
Feniletil acetato	0.2 – 3.8	Rosas, miel
<i>Alcoholes superiores</i>		
n-Propanol	600	Alcohol, dulce
Isobutanol	100	Solvente
Isoamil alcohol	50 – 65	Alcohólico, plátano
Amil alcohol	50 – 70	Alcohólico, solvente
2-Feniletanol	40	Rosas

La vía de Ehrlich es un proceso catabólico donde los aminoácidos se transforman en alcoholes superiores. Éstos son los compuestos organolépticos más abundantes presentes en la cerveza. Para formarse, los aminoácidos pasan por una serie de modificaciones que consta de tres etapas: transaminación, descarboxilación y reducción. El intermediario más relevante en este proceso es el α -cetoglutarato, esta molécula puede provenir de otros compuestos de síntesis de novo (proceso anabólico) (Pires et al., 2014).

Otros metabolitos excretados por la levadura son los ésteres y ésteres de acetato (Cuadro 3). A comparación de los alcoholes superiores, los ésteres de acetato están en muy bajas concentraciones. Son los compuestos más deseables, puesto que son aquellos que brindan tanto aromas y sabores característicos, como tonos florales y frutales (Stewart et al., 2018). Se han aislado alrededor de 100 ésteres diferentes. Si bien estas moléculas son deseables, pueden dar un sabor amargo si se sobreproduce (Pires et al., 2014).

Los compuestos sulfurados son otros compuestos que se forman durante el metabolismo. Los compuestos de azufre son importantes en la elaboración de la cerveza debido a que trazas de compuestos de azufre volátiles como el sulfuro de hidrógeno, dimetil disulfuro, dióxido de azufre y tioles contribuyen significativamente al sabor de la cerveza. Además son de los elementos más difíciles de controlar (Stewart et al., 2018)

2.5. Proceso de elaboración de la cerveza

El proceso general involucrado en la elaboración de la cerveza y la fermentación es la conversión del almidón de cereal en alcohol para hacer una variedad de bebidas apetecibles. Esta producción generalmente es en una escala de producción de pequeña a moderada, algunas a nivel de fábrica, pero en gran medida a nivel de hogar o local (Rosentrater & Evers, 2018). La elaboración de cerveza consta de seis pasos: malteado, maceración, cocción, fermentación, maduración y carbonatación o segunda fermentación. Esta última depende si es una fabricación tradicional o artesanal (Hill, 2015).

2.5.1. Preparación del mosto

2.5.1.1. Maceración y cocción

La maceración es el proceso mediante el cual la molienda de malta, los adjuntos sólidos y el agua se mezclan. Se lleva a cabo a una temperatura adecuada para que las enzimas de la malta conviertan los diversos componentes de cereales en azúcares fermentables y se liberen aminoácidos (o compuestos nitrogenados) y otros nutrientes al medio. El medio donde se encuentran estos compuestos se le denomina mosto (Stewart et al., 2018).

Para realizarlo, los granos malteados, que aún tienen en su interior grandes cantidades de almidón, tienen que ser triturados. Es necesario exponer el almidón a las enzimas y moler los granos para obtener un polvo ligeramente molido, evitando que se obtengan trozos demasiado pequeños. En este proceso también se pueden añadir otros ingredientes como el lúpulo, especias, entre otras. En muchos casos, este proceso es determinado de acuerdo a los requerimientos del fabricante (Mosher & Trantham, 2017).

Cuadro 4. Composición final de azúcares fermentables en el mosto. Adaptado de Hill (2015) y Stewart (2016)

Sacárido	Fórmula condensada química	Porcentaje (% p / v)
Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	10 – 15
Fructosa	$C_6H_{12}O_6$	1 – 2
Sucrosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$	1 – 2
Maltosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$	50 – 60
Maltotriosa	$C_{18}H_{32}O_{16}$	15 – 20
Sacáridos superiores	$H_2O + (C_6H_{10}O_5)_n$	20 – 30

Durante esta fase, las semillas son rehidratadas y sometidas a cocción. El caldo es calentado a diferentes temperaturas en un intervalo de 60 a 70 °C (Briggs et al., 2004). Esto va a reactivar a las enzimas y, por consecuencia, se realiza la sacarificación. Este es un proceso en el cual las cadenas de almidón se hidroliza en pequeños fragmentos de carbohidratos como glucosa, maltosa, maltotriosa, etc. (Cuadro 4) (Mosher & Trantham, 2017).

Durante la maceración se extraen sustancias aromatizadas en el mosto. Algunos se destruirán o se perderán parcial o totalmente durante el hervor, mientras que otros precursores del sabor se convertirán en sustancias sabrosas y llegarán al fermentador sin cambios (Briggs et al., 2004).

2.5.2. Fermentación tradicional alcohólica

El objetivo de la fermentación de la cervecería es utilizar la capacidad de las células de levadura para convertir el azúcar en etanol y dióxido de carbono como los principales productos del metabolismo (Briggs et al., 2004). Como se menciona en la sección 2.4.4.1, existen dos tipos de cerveza, los cuales, son producto de dos tipos de fermentación. Cada tipo de fermentación dependerán del tipo de levadura: alta o baja. Cada una tiene condiciones fisicoquímicas distintas para el correcto funcionamiento. Por ejemplo, las de alta (ale) trabajan a una temperatura más elevada que las bajas (lager) (Bamforth, 2016).

Para trasladar el mosto al tanque, primero tendrá que ser enfriado por intercambiadores de calor en condiciones asépticas. Posteriormente, se inocularán las levaduras, pero el proceso de fermentación no iniciará instantáneamente, debido a que las levaduras requieren de un proceso de adaptación y multiplicación (Hill, 2015). La temperatura se fija (para lager de 8 – 15 °C y para ale de 16 – 25 °C) y se mantendrá igual durante, mínimo, siete días de fermentación para lager y entre 2 a 5 días para ale (Li et al., 2017).

El principal modo de fermentación empleado a nivel mundial es el lote. Aunque se han empleado varias técnicas de fermentación por lotes, los recipientes cilíndricos verticales son los más populares y, a lo largo de los años, se han instalado tanques de mayor capacidad. Sin embargo, los avances recientes se relacionan principalmente con la automatización y métodos mejorados para el monitoreo y control del proceso de fermentación (Stewart et al., 2018).

Finalmente es filtrada para eliminar los restos de levadura. El filtrado también puede ser usado como proceso de clarificación. Antes de que la cerveza sea embotellada, el líquido se carbonata para aumentar la concentración de CO₂. Se logra por medio de dos opciones: una segunda fermentación, muy común en cerveceras artesanales, o la aplicación de CO₂ a presión. También se somete a un proceso de pasteurización para aumentar la vida de anaquel del producto (Bamforth, 2016).

2.5.3. Métodos comunes para eliminar alcohol

La cerveza sin alcohol es un producto secundario de la industria cervecera y su producción está motivada por la tendencia mundial para un estilo de vida más saludable y la conciencia sobre los beneficios del consumo moderado de cerveza (Liguori et al., 2015). Por consiguiente, la industria se ha enfocado en encontrar medios para conseguirlo. Tecnológicamente, sí es posible producir cerveza con menos del 0.05 % v/v de alcohol (Montanari et al., 2009). La concentración de alcohol en la cerveza obtenida de los diferentes métodos se indica en la Cuadro 5

Cuadro 5. Cervezas sin alcohol obtenidas con diferentes tecnologías de producción. Recuperado de Montanari et al. (2009)

Métodos	Porcentaje de alcohol (% v/v)
Fermentación limitada y dilución	0.3 – 1.0
Levaduras no convencionales (<i>S. ludwigii</i>)	0.48
Rectificación al vacío	0.1
Evaporación	0.4
Ósmosis reversa	0.4
Diálisis	0.4

Dependiendo de las legislaciones de cada país, la definición de “bajo en alcohol” o “sin alcohol” puede variar. En Alemania, Suiza, Austria, Finlandia y Portugal, el contenido de etanol de la cerveza sin alcohol está restringido al 0.5 % v/v. En la legislación belga, "sin alcohol" se utiliza para una cerveza con menos del 0.5 % v/v de alcohol. Otros países, como Italia y Francia, consideran la cerveza como “libre de alcohol” si tiene menos del 1.2% v/v de alcohol. Mientras que en Dinamarca y los Países Bajos, el término "sin alcohol" se puede aplicar a la cerveza con menos del 0.1% v/v de alcohol (Montanari et al., 2009)

En la industria cervecera se tienen dos métodos (físicos y biológicos) por los que se puede eliminar el etanol de la bebida (Figura 6). Los físicos engloban dos procesos y son considerados como una eliminación suave de etanol: térmicos y membranas. La ventaja de éstos es que pueden eliminar el etanol de las cervezas a niveles muy bajos (Brányik et al., 2012). Por otro lado, los métodos biológicos se enfocan durante la fermentación. Se modifican las condiciones físicas para limitar a la levadura o, como nueva tendencia, el uso de levaduras no convencionales. En este apartado, también se incluyen las modificaciones genéticas (Liguori et al., 2018).

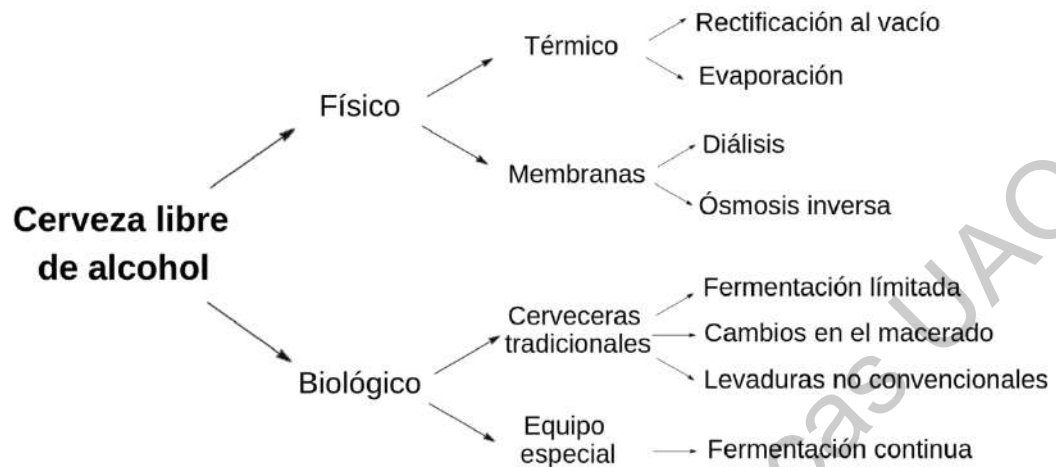


Figura 6. Esquema de los métodos más comunes para producir cerveza libre o baja en alcohol (Brányik et al., 2012)

2.5.3.1. Físicos

Los procesos físicos, durante la elaboración se realizan después de la fermentación. En comparación con las cervezas tradicionales, se sabe que hay pérdida de frescura, sabor y cuerpo. Hay dos procesos físicos más utilizados: térmicos y membranas (Montanari et al., 2009).

Los tratamientos térmicos son los más comunes, aunque a cierta temperatura dañan el sabor de la cerveza. Dentro de éstos, se puede usar la evaporación o la destilación a temperatura ambiente. No obstante, la temperatura utilizada en todos los procesos térmicos se utilizan temperaturas de 30 - 60 °C. Lo que significa que aún puede ocurrir una gran pérdida de sabor y vivacidad aunque dan mejores rendimientos al eliminar el alcohol (Brányik et al., 2012).

Los de membrana son muy utilizados en la elaboración de bebidas. Para eliminar el etanol, los tratamientos más comunes son diálisis, ósmosis inversa, destilación osmótica, pervaporación y destilación por membrana (Liguori et al., 2018). Son muy eficientes al descargar moléculas muy pequeñas como el etanol. Pueden ser operados automáticamente y de manera flexible, pero al mismo tiempo requieren importantes costos de capital y de funcionamiento (Brányik et al., 2012).

2.5.3.2. *Biológicos*

Los métodos más comunes para disminuir el contenido alcohólico se basan en la limitación durante la fermentación. También depende de los equipos y de la tecnología disponible (Liguori et al., 2018). Los procedimientos respectivos aplicados en la escala industrial son a menudo combinaciones de estrategias, que pertenecen a tecnologías que utilizan instalaciones de cervecería tradicionales (Brányik et al., 2012).

Una de estas técnicas se relaciona con la composición del mosto. Es posible usar métodos tecnológicos para disminuir la cantidad de azúcares fermentables (Liguori et al., 2018):

- El uso de membranas también es aplicable en este rubro, específicamente, las de nanofiltración para la retención moderada de moléculas pequeñas.
- Añadir agua para diluir el mosto, pero es ilegal en muchos países (Europa, Nueva Zelanda, Australia y Sudáfrica) a excepción de Estados Unidos.
- La aplicación de enzimas al mosto antes de añadir las levaduras puede disminuir hasta en un 0.7 % v/v de alcohol. La glucosa oxidasa es la más común, cambia la conformación de la glucosa en gluconolactona. De esta manera la levadura ya no puede metabolizarla

Recientemente, se ha buscado la manera de producir menos etanol por medio de levaduras no convencionales. Esto se puede lograr mediante estrategias como la selección de un género microbiano adecuado con propiedades específicas o la modificación intencional de la levadura de cerveza mediante mutación aleatoria o ingeniería genética (Brányik et al., 2012). Con esta técnica se puede obtener cerveza sin alcohol con una concentración de alcohol no inferior a 0.05 % v/v por volumen. La cepa que está teniendo atención es *Saccharomyces ludwigii*, esta levadura tiene la ventaja de ser fácil de manejar, al menos durante la fermentación y no requiere un monitoreo continuo (Varela & Varela, 2009).

Por otro lado, la modificación durante la fermentación es permitida. La actividad durante la fermentación puede ser suspendida (detenida), desactivada (enfriamiento rápido o pasteurización) o por la remoción de la levadura

(centrifugación o filtración). Para estos procesos se requiere que la concentración de azúcares fermentables sea bajo. Este método permite producir una cerveza de buena calidad con menos de 0.2 % v/v, pero requiere un control analítico preciso (Montanari et al., 2009).

2.5.3.3. Propiedades sensoriales

Los compuestos aromáticos así como los de sabor son diferentes entre una cerveza normal y una baja o sin alcohol. Debido a los tratamientos que son sometidos, sufren de desperfectos. Por ejemplo, aquellas producidas por los procesos de membrana suelen tener menos cuerpo y un perfil aromático bajo, mientras que las tratadas térmicamente pueden sufrir daños por calor, mientras que las cervezas obtenidas por métodos biológicos suelen tener un sabor dulce y puede ser considerado como desagradable (Bráyink et al., 2012).

2.6. Sistemas bioelectroquímicos

El concepto de Tecnología Electroquímica Microbiana o MET, por sus siglas en inglés (Microbial Electrochemical Technologies) es un área emergente para la investigación en la última década. El uso reciente de las aplicaciones de MET se informa en diversos dominios. Algunos sectores en los que ya se buscan aplicaciones son en bioenergía, remediación de desechos, captura de CO₂, bioelectrónica, recuperación de recursos, desalinización, etc. Aunque las aplicaciones en alimentos aún son limitadas (Venkata et al., 2019).

Los sistemas son de naturaleza híbrida y son interdisciplinarios con agregación cohesiva de varias áreas, por ejemplo, electroquímica, microbiología, ciencias materiales, bioquímica y entre otras (Venkata et al., 2019). Los sistemas microbianos electroquímicos no solo proporcionan un entorno único para comprender la electroquímica microbiana, en gran parte no explorada, sino que también ofrecen una plataforma flexible para el desarrollo de muchas funciones de ingeniería diferentes (Wang & Ren, 2013).

Estos sistemas utilizan el potencial desarrollado *in situ* por el metabolismo bacteriano para lograr el tratamiento o la producción de productos de valor agregado. Los microbios generalmente llevan a cabo sus actividades metabólicas

utilizando el sustrato disponible y generan el equivalente reductor (protones y electrones) que se mueven a través de una serie de componentes/portadores redox (FADH, NADH, FMN, etc.) (Venkata et al., 2014). Los conocimientos fundamentales sobre los mecanismos únicos de transferencia de electrones entre las células bacterianas y los electrodos, así como entre diferentes especies microbianas, son cruciales para un mayor desarrollo del sistema (Wang & Ren, 2013).

Los mejores ejemplos conocidos de éstos son las celdas energéticas microbianas. Dentro de este contexto de conversión bioelectroquímica, la electrosíntesis microbiana ha surgido recientemente como una opción alternativa para proporcionar poder reductor/oxidante para la producción bioquímica a través de la electricidad. La corriente eléctrica puede ser suministrada o extraída de microorganismos, con el objetivo de estimular y mantener la producción bioquímica. Un ejemplo de procesos reductores es la producción de acetato a partir de dióxido de carbono y de un proceso oxidativo es la conversión de glicerol en etanol (Rabay et al., 2011).

2.6.1. Electrofermentación

Las fermentaciones han desempeñado un papel fundamental en la producción, transformación y conservación de alimentos a lo largo de la historia humana. El uso de esta ha permitido facilitar el almacenamiento, aumentar la estabilidad y modificar sus propiedades organolépticas y texturales de los alimentos. Aunque, en los últimos años, la fermentación también se ha aplicado a escalas industriales para obtener otros metabolitos (Schievano et al., 2016).

Pero, las reacciones de fermentación suelen ser desequilibradas redox y tienen varias limitaciones termodinámicas durante el procesamiento industrial que limitan las productividades y los rendimientos generales (Schievano et al., 2016). Por lo tanto, se requiere que nuevos mecanismos disminuyan tales limitaciones termodinámicas de la fermentación microbiana convencional y que regulen las rutas metabólicas hacia productos específicos de base biológica (Shanthi-Sravan et al., 2018).

En este contexto, los sistemas bioelectroquímicos podrían utilizarse para modificar el potencial óxido reductor extracelular mediante el suministro de energía en forma de una corriente eléctrica mediante el uso de electrodos. Este proceso es conocido como fermentación electrostática o electrofermentación (Moscoviz et al., 2016). Además, mantiene el equilibrio óxido-reducción celular y puede optimizar la producción de productos microbianos, así como redirigir el metabolismo bacteriano (Das et al., 2017).

Con la introducción electrodos, los entornos pueden controlarse para obtener productos con mayor pureza, favorecer el crecimiento y la densidad de las células microbianas (Schievano et al., 2016). La electrofermentación ocurre en condiciones anaeróbicas para mantener el ATP por glucólisis, cuando no hay fosforilación oxidativa (Venkata et al., 2019).

Se sabe que esta tecnología surgió a principios del siglo XX. El primero en mencionarlo fue Potter (1911) en la publicación "Efectos eléctricos que acompañan a la descomposición de lo orgánico". En este artículo, discute una asociación entre la actividad metabólica con una corriente eléctrica. Posteriormente, en 1960, la NASA indagó en las celdas bioelectroquímicas para la generación de electricidad por medio de reacciones bioquímicas. Durante esta misma época se construyó la primera celda microbiana. Por lo que los sistemas bioelectroquímicos empezaron a ganar importancia y se diversificaron en diferentes sistemas como electroquímica microbiana, celdas solares microbianas, electrosíntesis microbiana, electrofermentación o fermentación electrostática (Venkata et al., 2019). A lo largo de este documento, electrofermentación y fermentación electrostática se tomarán como sinónimos.

3. JUSTIFICACIÓN

La cerveza es una de las bebidas más consumidas por la población. Cada año los individuos que buscan propuestas diferentes aumentan. También son más los clientes se inclinan hacia opciones más saludables. Debido a que, muchos de ellos evitan el riesgo de dependencia y abuso del alcohol, en adición a los efectos que tiene en el organismo a largo plazo. Aún así, desde antes de que esta tendencia emergiera, ya existía otro tipo de consumidores. Aquellos que no pueden tomar alcohol por fines médicos son un área del mercado que también puede cubrirse con esta proposición.

Para el mercado cervecero, la búsqueda de productos que satisfagan a éstos es un área de oportunidad. Se obtendrían beneficios cubriendo los intereses de un segmento adicional de consumidores, No significan solo un incentivo económico, sino que también alcanzaría menores impuestos a las ventas y aranceles aplicables en muchos países. Además, México es uno de los países con más exportaciones a nivel mundial, por lo que un avance en esta área significa una herramienta que ayude al mercado mexicano y mundial.

A pesar de que existen diversas tecnologías para la extracción o limitación para la generación de etanol, la calidad sensorial se ve comprometida. Por esto, la búsqueda de otras técnicas que permitan producir menores concentraciones de etanol en la cerveza es indispensable para seguir manteniendo las necesidades del mercado. Asimismo, que no solo sean menos invasivas en el perfil aromático, sino que también no representen un gasto elevado para las compañías dedicadas a este rubro.

Por consiguiente, el objetivo de este trabajo es la aplicación de la electrofermentación como una nueva técnica para el área de alimentos y bebidas. Aprovechando las capacidades de este, es posible disponer de nuevos productos y de desarrollar nuevos procedimientos en el área de bebidas bajas en contenido alcohólico, sin descartar la posibilidad de mantener las propiedades organolépticas del mismo.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la electrofermentación tanto en el contenido alcohólico, como en el perfil de aromas de una cerveza lager.

4.2. Objetivos específicos

- i. Estimar el efecto de diferentes voltajes (0, 15 y 30 V) y diferentes materiales de electrodo (acero inoxidable, titanio y grafito) sobre la producción de etanol en cerveza lager.
- ii. Determinar el consumo de azúcares fermentables y generación de biomasa en la producción de cerveza lager del tratamiento que conduzca a la menor generación de etanol.
- iii. Comparar los compuestos aromáticos característicos en la producción de cerveza lager del tratamiento que conduzca a la menor generación de etanol.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.1. Material biológico

Se usó la cepa de *S. pastorianus* SAFLAGER S-23 (Lesaffre, Francia). Se activó en caldo de cultivo YPS (Yeast Peptone Sucrose). Se incubó por 24 horas a 30 °C, 150 rpm y pH 5. Posteriormente, se propagó en medio sólido con extracto de levadura, peptona de caseína y dextrosa (YPD) a pH 5.0. Para la preservación la cepa, ésta se mantuvo en crioconservación (- 80 °C) con glicerol al 20 % v/v y 80 % v/v el inóculo de levadura en medio YPS, según la metodología descrita por Sherman (2002).

5.1.1.1. Medio YPS

Se usó el medio estándar YPS para activación de levaduras. Se elaboró con las concentraciones de ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 10 extracto de levadura, 20 peptona de caseína y 20 sacarosa en agua destilada. Se ajustó a un pH 5.

5.1.1.2. Medio Agar YPD

Se usó el medio estándar agar YPD (Yeast Peptone Dextrose) para activación de levaduras. Se elaboró con las concentraciones de ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 10 extracto de levadura, 20 peptona de caseína, 20 glucosa y 15 agar base en agua destilada. Se ajustó a un pH 5.

5.1.1.3. Pre-inóculo

Se preparó un pre-inóculo tomando una colonia de caja Petri con agar YPD y se cultivó en 100 mL de medio estándar YPS. Se incubó por 12 horas a 30 °C, 150 rpm y pH 5. Posteriormente, se midió la absorbancia con un espectrofotómetro (iMark™ Microplate reader, Estados Unidos), diluyendo el medio 1:10, a una longitud de onda de 595 nm, hasta alcanzar valores alrededor de 0.2.

5.1.1.4. Inóculo

Se determinó la curva de crecimiento de *S. pastorianus* SAFLAGER S-23 en peso seco. La levadura se propagó en 250 mL de medio YPS a pH 5.0 y una vez alcanzada una densidad celular de 1 g/L aproximadamente 150 rpm y 30 °C, las células fueron centrifugadas a 5000 g durante 15 min.

5.1.2. Materia prima

5.1.2.1. Cebada

Se usaron dos tipos de malta para realizar el mosto. La primera, es una malta tipo Pilsner, también conocida como Pilsen, Pilsener o Pils (Avangard, Alemania) y la segunda es un tipo Caramel 20L (Briess Malt & Ingredients, EE.UU.). Los dos pertenecen a la especie *H. distichum* (dos hileras).

5.1.2.2. Lúpulo

Al igual que la cebada, se usaron dos tipos de lúpulos: Tettnager y Perle (Maltosaa S.A. ,Qro). Ambos se adquirieron en la presentación de gránulos.

5.1.3. Maceración y cocción de mosto

La preparación del mosto se basó en una receta estándar para 1 L de cerveza lager. En la Cuadro 6 se muestran las porciones que se utilizaron como referencia. Las cantidades se adaptaron en relación a la cantidad de mosto que se necesitaron para los tratamientos.

Cuadro 6. Ingredientes para producir 1L de cerveza tipo lager

Tipo	Cantidad (g)
<i>Malta</i>	
Pilsner	200
Caramelo 20L	30
<i>Lúpulo</i>	
Tettnager	1.9
Perle	0.9

Para proceder con la elaboración del mosto, primero se trituran los granos de cebada, moliendo durante dos o tres segundos en una licuadora o procesadora, con el objetivo de destruir el grano para que se exponga el endospermo, mientras se deja la cascara intacta. Además de esto, la malta triturada se tamizó en una malla #30 (con apertura de 0.595 mm), eliminando la harina más fina. Esto evita que se obtenga un líquido turbio. Después se colocó en una bolsa de muselina o malla.

Se calentó agua destilada y se colocó la bolsa de muselina y se mantuvo entre 60 a 70 °C durante una hora. Se le fue agregando agua destilada para compensar la pérdida de vapor. La temperatura se mantuvo en el intervalo mencionado anteriormente para mantener la proporción entre el agua y la malta (por lo general es 3:1) durante este paso.

Cuadro 7. Incorporación de lúpulo al mosto durante la cocción para 1 L de cerveza

Tiempo (minutos)	Tipo	Cantidad (g)
30	Perle	0.9
45	Tettnager	1.3
85	Tettnager	0.6

Una vez completado este paso, se removió la bolsa y se escurrió para recuperar la mayor cantidad de líquido posible. Estas instrucciones se siguieron en condiciones asépticas para evitar contaminar el caldo. Posteriormente, se cubrió el recipiente y se siguió calentando. Una vez que llegó a hervor se añadió el lúpulo de acuerdo a los tiempos establecidos en el Cuadro 7, siendo el tiempo cero el inicio del hervor. Una vez cubiertos los 90 minutos de hervor, se procedió a enfriar el mosto con hielos a baño maría hasta que estuviera tibio; se coló el mosto con ayuda de una bolsa de muselina y un colador casero, previamente esterilizado con luz UV, para evitar precipitados. Se añadió agua destilada estéril hasta que se verificó que los grados Brix del mosto estuvieran en un rango de 7.5 – 8.0. Se guardó en refrigeración en un recipiente estéril.

5.2. Diseño experimental

5.2.1. Diseño del sistema de electrofermentación

El sistema de electrofermentación constó de un modelo modificado del reportado por Mathew et al. (2015). El cultivo por lote en el sistema de fermentación electrostático se realizó utilizando un electrodo. Cada electrodo varía en longitud

entre 9 a 11 cm, dependiendo del material, sin embargo el área sumergida fue igual para evitar ruido. El electrodos y el cable de cobre fueron conectados a través de una fuente de poder con voltaje en corriente continua modelo GPS-3030DD y un amperímetro (Mut-33, Truper, China). El electrodo estuvo suspendido de la tapa del recipiente y conectado a una fuente de voltaje como se muestra en la Figura 7.

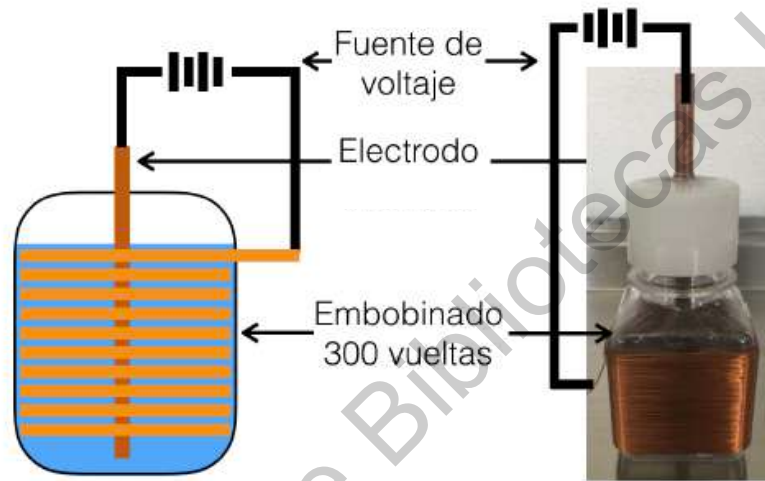


Figura 7. Diseño del sistema de electrofermentación (Gallegos Almanza, 2018)

5.2.2. Descripción de la unidad experimental

Se entiende como unidad experimental el sistema de electrofermentación en un recipiente de polipropileno de dimensiones 5.2 x 7.5 x 5 cm, con 100 mL de mosto, el inóculo de levadura SAFLAGER S-23 y un electrodo. El inóculo representó el 10 % del volumen del mosto. En el cuál se evaluaron los voltajes de 0, 15 y 30 voltios, usando como electrodos diferentes materiales: acero inoxidable (AI), gratifo (G) y titanio (T).

5.2.3. Tratamientos

Se realizó diseño experimental factorial de 3^2 con triplicado. Los parámetros que se evaluaron en la electrofermentación fueron el voltajes y el material del electrodo (Cuadro 8). En el primero, se evaluaron diferentes voltajes (0, 15 y 30 V) y, con respecto al segundo, se variará el material del electrodo para evaluar si tiene algún

efecto en la cantidad de etanol que se produzca (A1, G y T). En la Cuadro 8. muestra los factores y niveles que serán aplicados a la unidad experimental. Como control, se realizará una fermentación tradicional (FT) sin voltaje y sin electrodos, utilizando el mismo reactor. Cada tratamiento, así como cada control, se realizará por triplicado

Cuadro 8. Factores y niveles de diseño experimental 3^2

Factores	Niveles		
Electrodo (E)	A1	G	T
Voltaje (V)	0 V	15 V	30 V

5.3. Métodos analíticos

5.3.1. Espectrofotometría

5.3.1.1. Cuantificación de biomasa

Se realizó una curva de calibración relacionando la densidad óptica con el peso seco usando la metodología reportada por Catrilaf & Muñoz (2013). Primero se procedió a realizar mosto. La curva constó en recolectar muestras cada cierto tiempo (cada 8 h por 80 h incluyendo el tiempo cero). Cada muestra fue de 12 mL de mosto con inóculo de *S. pastorianus*, cada una contenida en tubos falcon de 15 mL y exponiéndose a las mismas condiciones de fermentación. Cada punto de la curva se realizó por triplicado. Las muestras se guardaron en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior evaluación.

Las muestras se descongelaron y se agitaron vigorosamente en vortex para desprender la biomasa que se queda en el fondo. Posteriormente, se separaron 2 mL y se diluyó 1:10 para medir en el espectrofotómetro en microplaca de 96 pozos a OD_{600} . Los 10 mL restantes se usaron para la obtención del peso seco. Se centrifugó la mezcla y se eliminó el sobrenadante; la pastilla celular se lavó con PBS salino (al menos tres veces). Los recipientes de aluminio se colocaron en horno hasta que tuvieron peso constante, posterior a esto, se resuspendió la pastilla celular con 300 μL de agua destilada y se vertieron en los recipientes. Se colocaron en el horno a

60 °C hasta que el peso del recipiente fuera constante; las muestras se guardaron en un desecador para evitar que recuperaran humedad. Por último, se pesaron (restando el peso correspondiente al recipiente) y el resultado final se multiplico por 100 para registrar el peso como $g \cdot L^{-1}$. La concentración de biomasa fue calculada usando la curva estándar y se expresó en gramos de biomasa por litro. Para realizar el análisis de los parámetros cinéticos, se comparará la tasa de crecimiento específica (Specific Growth Rate o SGR) (Ec. 1), así como el tiempo de duplicación celular (Ec. 2). Donde B_i y B_f , corresponde a la biomasa inicial y final, respectivamente, t es el tiempo de fermentación, t_d es el tiempo de duplicación.

$$SGR = \frac{(\ln B_f - \ln B_i)}{t} \quad (\text{Ec. 1})$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{SGR} \quad (\text{Ec. 2})$$

5.3.1.2. Cuantificación de azúcares reductores

El mosto fermentado fue centrifugado a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se cuantificó para azúcares reductores (AR) por medio de método de ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). La concentración de azucares reductores fue calculada usando curvas estándar y se expresó en gramos de azúcares reductores por litro. La energía de mantenimiento (Q_s) se calculó con la siguiente ecuación (Ec. 3)

$$Q_s = \frac{S_f - S_i}{B_f - B_i} * SGR \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde, Q_s es la velocidad de mantenimiento celular, S_i y S_f es la concentración de sustrato inicial y final, mientras que B_i y B_f es la concentración de biomasa inicial y final.

5.3.1.3. Cuantificación de etanol

El mosto fermentado se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente se llevó a cabo una extracción líquido-líquido del etanol con un solvente (tributil fosfato o TBP). La cantidad de etanol en el TPB se cuantificó por medio de oxidación con una solución ácida de dicromato, de acuerdo con el método reportado por Seo, et al. (2009). La concentración de etanol fue calculada usando curvas estándar y se expresó en gramos de etanol por litro. La velocidad de formación de producto se calculó con la siguiente ecuación (Ec. 4).

$$q_{EtOH} = \frac{P_f - P_i}{B_f - B_i} * SRG \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde, q_{EtOH} es la velocidad de generación de producto, P_i y P_f es la concentración de producto inicial y final, mientras que B_i y B_f es la concentración de biomasa inicial y final, respectivamente.

5.3.2. Cromatografía de gases

5.3.2.1. Preservación de las muestras

Las muestras tomadas de los tratamientos fueron congeladas para su posterior evaluación a -20°C. Previamente al análisis cromatográfico, las muestras se descongelaron a 4 °C.

5.3.2.2. Preparación y corrida de la muestra

Se utilizó una técnica de microextracción en fase sólida (SPME) acoplada a cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS). El GC-MS se realizó en un GC HP 7890A serie II (Agilent Technologies, Inc., Wilmington, DE, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas (HP 5975C, Agilent Technologies, Inc.). Se usó una fibra recubierta con divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS 50/30 μm , Supelco, Bellefonte, PA, EE. UU.). El gas portador utilizado fue helio de alta pureza (99.999%) con un caudal de columna de 1.9 ml / min. La columna capilar utilizada fue un HP-5 (50 m x 0.32 mm de diámetro, espesor de película de 0.52 μm , Agilent Technologies, Inc.). Se hizo uso de un muestreador automático MPS2 (Multipurposesampler; Gerstel, Linthicum, MD, EE. UU.) para proporcionar una alimentación automática de muestras. La inyección de la muestra,

así como la lectura de los datos fueron obtenidos de acuerdo a la metodología descrita por Vázquez Landaverde & Qian (2007).

5.4. Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizan por triplicado y fueron reportadas como la media de los ensayos, de acuerdo a la prueba de Tukey para el primer objetivo y Dunnett para el segundo. La comparación de medias ($p < 0.05$ como el nivel mínimo significativo) se realizará mediante el software JMP Versión 14 (Instituto SAS, EE.UU)

Dirección General de Bibliotecas UAG

6. RESULTADOS

6.1. Evaluación del sistema de electrofermentación

Se realizó la fermentación utilizando un reactor modificado, de acuerdo a lo reportado por Mathew *et al.*, (2014). La diferencia radica en el embobinado, los autores lo utilizan en el electrodo, mientras que en este proyecto el embobinado se encuentra en el exterior del reactor.

Se hizo la evaluación de tres voltajes y tres materiales de electrodo diferentes, así como el efecto que tienen cuando éstos interaccionan. Los reactores se conectaron en serie a través de los electrodos y el embobinado de cable de cobre (Figura 8a), con la ayuda de caimanes, a una fuente de poder (modelo GPS-3030DD) usando corriente directa como se muestra en la Figura 8b. Todos los tratamientos se mantuvieron durante 60 h y se tomó muestra cada 12 h.

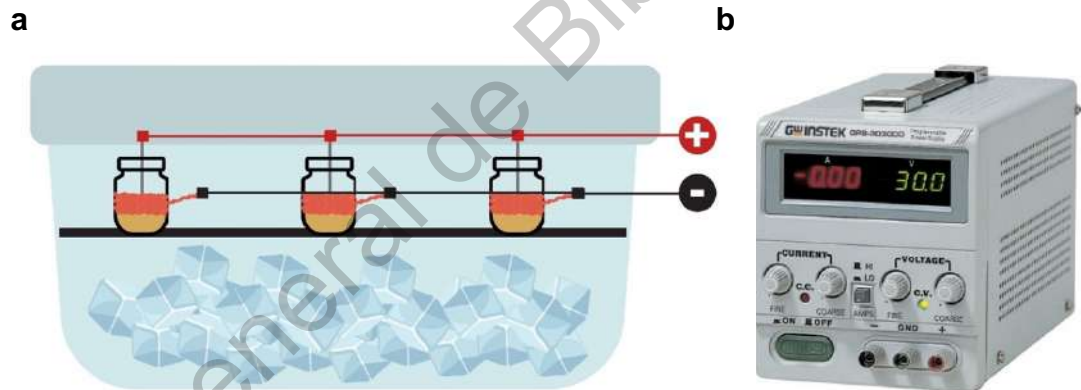


Figura 8. a) Esquematización de la conexión de los reactores embobinados dentro de un contenedor para mantener temperatura constante entre 16 ± 2 °C. b) Fuente de poder de corriente directa (modelo GPS-3030DD)

Para evaluar el sistema, se cuantificó tanto la producción de alcohol como la generación de biomasa para comparar el comportamiento de la levadura a las condiciones ya mencionadas. En la Figura 9, se esquematizan los resultados en términos de rendimientos (Ec. 3 y Ec. 4) de la fermentación con respecto a las 60 h de tanto de alcohol, como biomasa.

El factor con mayor efecto en el sistema es el material del electrodo, resultó ser altamente significativo ($\alpha = 0.05$) en el 90 % de todos los análisis realizados, tanto en los resultados de biomasa, como de alcohol (Anexo 10.1.). La interacción de ambos factores también resultó tener un efecto en el 70 % de los análisis. Por otro lado, a las 48 h tanto los factores individuales, como la interacción de éstos son significativos, fenómeno que ocurre en ambos resultados y que no se repitió en otro punto de la fermentación.

Se observó un aumento en el rendimiento de etanol correspondiente AI (Figura 9a) a las 24 h y 48 h. A las 24 h, los valores más altos fueron 0.908 y 0.904 g alcohol · g sustrato⁻¹ empleando los voltajes de 30 y 15 V, respectivamente. Mientras que a las 48 h se registraron valores de 0.640 y 0.398 g alcohol · g sustrato⁻¹ que corresponden a los mismos tratamientos de 30 y 15 V, habiendo una disminución de 30 y 56 %, respectivamente. Ambos tratamientos fueron diferentes significativamente del tratamiento que no recibió voltaje.

El rendimiento más alto de T (Figura 9b) correspondió a las 12 h con la unidad sin voltaje con 0.531 g alcohol · g sustrato⁻¹. El rendimiento cae abruptamente a las 36 h, no obstante se recupera a las 60 h hasta obtener los 0.342 g alcohol · g sustrato⁻¹, un 35 % menor del valor máximo. Por el contrario, los rendimientos de 15 y 30 V aumentaron gradualmente y no presentaron diferencias significativas con el tratamiento sin voltaje, con excepción de la 12 h.

En cuanto a los electrodos de grafito (G), fueron los tratamientos con los menores rendimientos (Figura 9c) comparado con los dos electrodos anteriores. El tratamiento de 30 V a las 12 h presentó el rendimiento más alto con 0.233 g alcohol · g sustrato⁻¹. Posterior a las 12 h, el rendimiento de etanol aumentó de manera constante y lenta hasta conseguir un rendimiento 4 veces más pequeño que el valor máximo obtenido con este electrodo. A lo largo de la fermentación, los tratamientos con los electrodos de grafito no presentan diferencias significativas entre los voltajes aplicados.

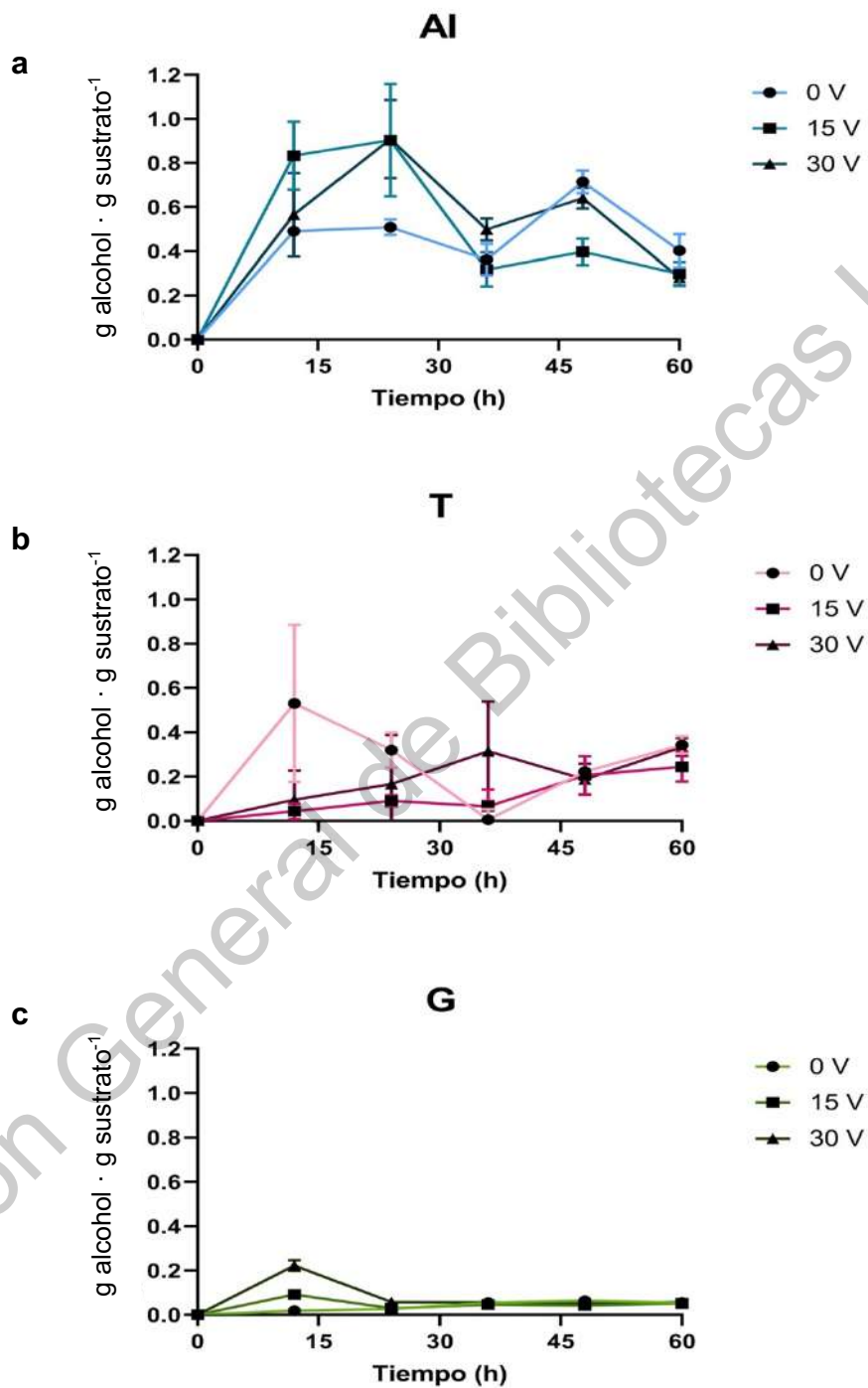


Figura 9. Rendimientos de alcohol usando *S. pastorianus* en mosto para cerveza tipo lager aplicando 0, 15 y 30 V con el uso de acero inoxidable (a), titanio (b) y grafito (c) como electrodos

En la Cuadro 9, se muestran los parámetros de crecimiento. Se evaluaron cuatro: tasa de crecimiento (TC), tiempo de duplicación (T_D), velocidad de consumo de energía (Q_s) y velocidad de formación de producto (q_{ETOH}).

Cuadro 9. Comparación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en un sistema de fermentación electrostática aplicando diferentes voltajes utilizando acero inoxidable, titanio y grafito como electrodos

Tratamiento		T_C^a (h^{-1})	T_D^b (h)	Q_s^c ($gS \cdot gB^{-1} \cdot h^{-1}$)	q_{ETOH}^d ($gS \cdot gB^{-1} \cdot h^{-1}$)
Al^e	0 V	0.0160	43.637	0.2660	0.0950
		± 0.001	± 1.379	± 0.017	± 0.002
	15 V	0.0160	42.683	0.3430	0.0950
		± 0.001	± 1.382	± 0.015	± 0.004
	30 V	0.0150	45.345	0.2430	0.0730
		± 0.001	± 2.998	± 0.017	± 0.004
T^f	0 V	0.0180	39.656	0.5750	0.1820
		± 0.001	± 3.137	± 0.050	± 0.100
	15 V	0.0180	39.045	0.5760	0.1740
		± 0.003	± 8.192	± 0.043	± 0.025
	30 V	0.0190	37.724	0.5320	0.2280
		± 0.003	± 5.472	± 0.041	± 0.085
G^g	0 V	0.0340	20.133	0.6250	0.0670
		± 0.001	± 0.460	± 0.122	± 0.033
	15 V	0.0350	19.919	0.5870	0.0830
		± 0.004	± 1.963	± 0.054	± 0.023
	30 V	0.0330	21.429	0.6340	0.0750
		± 0.003	± 1.828	± 0.129	± 0.017
FT^h	0.0210	33.886	0.3750	0.1290	
	± 0.002	± 4.235	± 0.039	± 0.011	

^a T_C : tasa de crecimiento; ^b T_D : tiempo de duplicación; ^c Q_S : velocidad de consumo de energía; ^d Q_P : velocidad de formación de producto; ^e Al: acero inoxidable; ^f T: titanio; ^g G: grafito; ^h FT: fermentación tradicional.

Los resultados se reportan como la media \pm la desviación estándar ($n=3$).

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa por la prueba Tukey ($\alpha < 0.05$).

De este cuadro se deduce que la tasa de crecimiento de G es mayor un 65% a FT y duplica en valor a los tratamientos con Al. El tiempo de duplicación también disminuye un 40% en relación a FT; tanto Al como T exceden el tiempo de duplicación de FT. G y T tienen un alto nivel de mantenimiento, como se observa en la columna referente a Q_S , oscilan entre 0.5 a 0.63 g de sustrato \cdot g⁻¹ de biomasa \cdot h⁻¹, es decir, 56 % mayor a FT; por otra parte, en Al el mantenimiento decrece un 25 %. Por último, Al y G tienen menor velocidad en generar producto con una disminución de un 9 y 40 % en relación con FT, respectivamente, mientras que T tienen un aumento del 50 %.

El análisis estadístico muestra que los tratamientos sometidos a los electrodos de grafito tuvieron diferencias significativas con los otros electrodos (Al y T), tanto en los rendimientos como en los parámetros cinéticos. Los tres tratamientos (0, 15 y 30 V) se compararon con una fermentación tradicional (FT) como control. Se analizó tanto el consumo de azúcares reductores, generación de biomasa y producción alcohol durante el mismo tiempo de fermentación. Para el análisis de estos tratamientos se realizó un análisis de medias por Dunnet ($\alpha=0.05$).

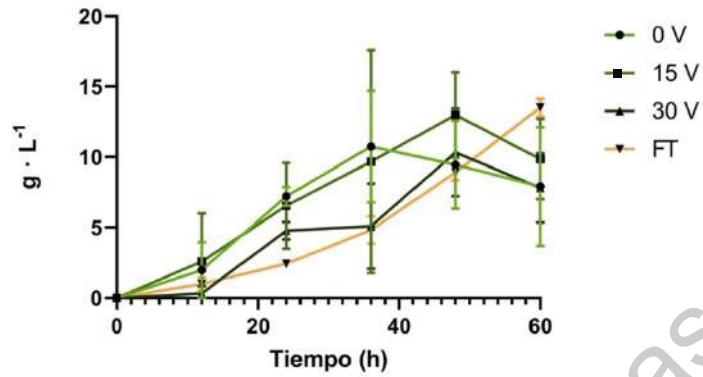
La Figura 10 muestra los resultados de los análisis descritos anteriormente. Todas las unidades experimentales y el control (FT) aumentan la concentración de alcohol (10a) con respecto al tiempo. Las concentraciones máximas se obtienen en diferentes puntos del tiempo. Los valores máximos de cada tratamiento fueron 13.5, 10.7, 13 y 10.3 g \cdot L⁻¹ para el control (FT), 0, 15 y 30 V, respectivamente. Sin embargo, éstos se presentan en distintos tiempos durante la fermentación: 0 V llega a este punto a las 36 h, 15 y 30 V a las 48 h y el control (FT) a las 60 h. No obstante,

en la hora 60 existe una disminución de los tratamientos 0, 15 y 30 V en un 42, 27 y 42 %, respectivamente, tomando como referencia el control (FT). De acuerdo con el análisis estadístico (Anexo 10.3.1), el voltaje no fue un factor que tuviera un efecto en la producción de este producto y ninguno de los tratamientos presentó diferencias significativas con FT a lo largo de la fermentación.

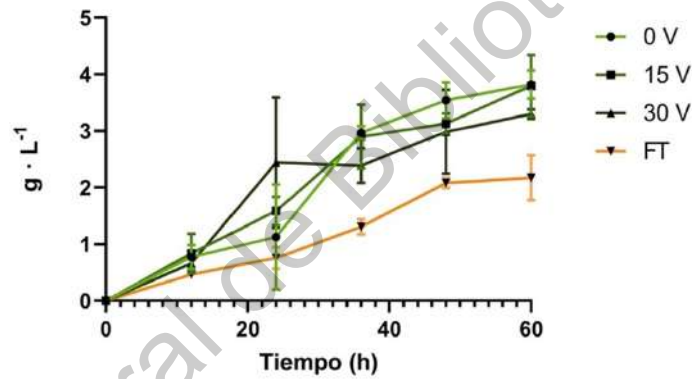
Al contrario que la producción de alcohol, el voltaje sí mostró un efecto significativo en la generación de biomasa (10b) y en el comportamiento del consumo de los azúcares reductores (10c). Para la generación de biomasa, el efecto del voltaje fue significativo a partir de las 36 h (Anexo 10.3.2). Se registró un aumento en la masa celular en un 75.5, 74.4 y 52 % a las 60 h de 0, 15 y 30 V respectivamente, tomando como referencia el control (FT). Además, esto coincide con la Tabla 1, donde el tiempo de duplicación es menor en todos los tratamientos con aplicación de voltaje en un 40 %, aproximadamente, con respecto a la forma tradicional de fermentación. Asimismo, el voltaje tuvo un efecto significativo en el consumo de azúcares reductores desde las primeras 12 h (Anexo 10.3.3).

El consumo fue mucho más rápido en los tratamientos con voltaje a comparación de FT, dado que los azúcares reductores se agotaron a las 60, 36 y 48 h correspondiente a 0, 15 y 30 V en el mismo orden. El control (FT), por otra parte, aún tenía una concentración hasta $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de azúcares fermentables en el medio a las 60 h. Utilizando un voltaje de 15 V el consumo es hasta 2.5 veces más rápido, mientras que 30 V es el doble. Coincidiendo con lo anterior, el Cuadro 9 ratifica que la velocidad de consumo de éstos es hasta dos veces mayor con la estimulación con voltaje que el control (FT).

a



b



c

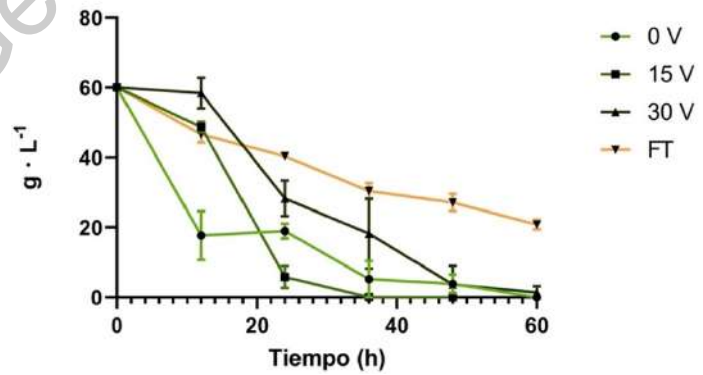


Figura 10. Dinámicas de a) generación de alcohol, b) generación de biomasa y c) consumo de azúcares reductores de los tratamientos del electrodo de grafito y una fermentación tradicional (FT) de una cerveza lager bajo el efecto de un sistema electrostático durante 60 h

6.2. Identificación de compuestos aromáticos por cromatografía de gases

Los tratamientos seleccionados para ser analizados por HS-SPME GC-MS fueron 15 y 30 V, así como de la fermentación tradicional (FT) a las 60 h con el objetivo de conocer el perfil aromático. Se lograron identificar 63 compuestos volátiles en los tres tratamientos, de los cuales comparten el 85 % entre ellos. Los compuestos se categorizaron de acuerdo a su grupo funcional (ésteres, alcoholes, ácidos) y del origen de éstos, como es el caso de los terpenos del lúpulo.

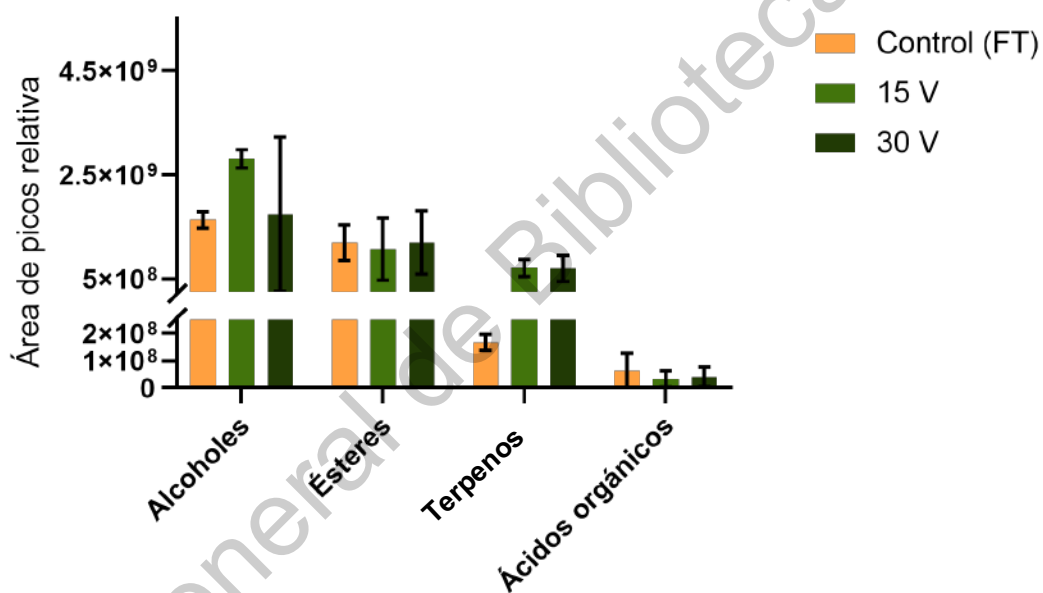


Figura 11. Suma de áreas de picos relativa de diferentes componentes volátiles de la cerveza tipo lager realizada de forma tradicional (FT), a 15 y 30 V a las 60 h

En la Figura 11 se observa la suma de áreas de los picos registrados en el cromatograma perteneciente a las categorías mencionadas anteriormente. Los ésteres, también conocidos como ésteres alifáticos, son compuestos que tienen una gran influencia en el aroma en la cerveza. Éstos tienen valores muy similares y no muestran diferencias significativas entre los tres tratamientos. Al contrario, en los alcoholes se observa que 30 y 15 V presentaron mayor área a comparación de FT,

presentando un aumento de 71 y 99 %, respectivamente. Los terpenos presentan diferencias de medición de FT y con los tratamientos sometidos a electrostática, la concentración de éstos en 15 y 30 V son cuatro veces mayor que el control. Por último, la concentración de ácidos orgánicos resultaron ser casi el doble en el Control (FT) a comparación de los tratamientos.

Asimismo, se identificaron compuestos volátiles específicos relacionados estrechamente con las cervezas lager, reconocidos por los ensayos publicados por distintos autores (Pires et al., 2014; DaSilva et al., 2015; Liguori et al., 2015; Richter et al., 2017; Giannetti et al., 2019). En la Figura 12 muestra la lista de los componentes presentes como un mapa de calor donde a mayor concentración, mayor es la coloración.

En la mayoría de los volátiles detectados, la concentración es mayor en los tratamientos (15 y 30 V) con respecto a FT, no obstante, solo el decanoato de etilo tiene un comportamiento contrario, puesto que los tratamientos tienen una concentración, aproximadamente, 35 % menor a comparación del control. También es importante mencionar que el hexanoato de etilo resulto ser inexistente en el control, mientras que la concentración de los otros no presentan diferencias significativas entre ellas. Por último, la concentración de etanol no presentó diferencias significativas entre ellos, corroborando los resultados de la cuantificación por dicromato de sodio.

Se identificaron dos alcoholes superiores en los tratamientos y el control: alcohol isoamílico y feniletanol. Éstos se encontraban un 86 y 50 % en mayor concentración en los tratamientos de 15 y 30 V, respectivamente, que en el control (FT), referente al alcohol isoamílico, y feniletanol tenía una concentración hasta casi cuatro veces más en los tratamientos con voltaje que en la fermentación tradicional.

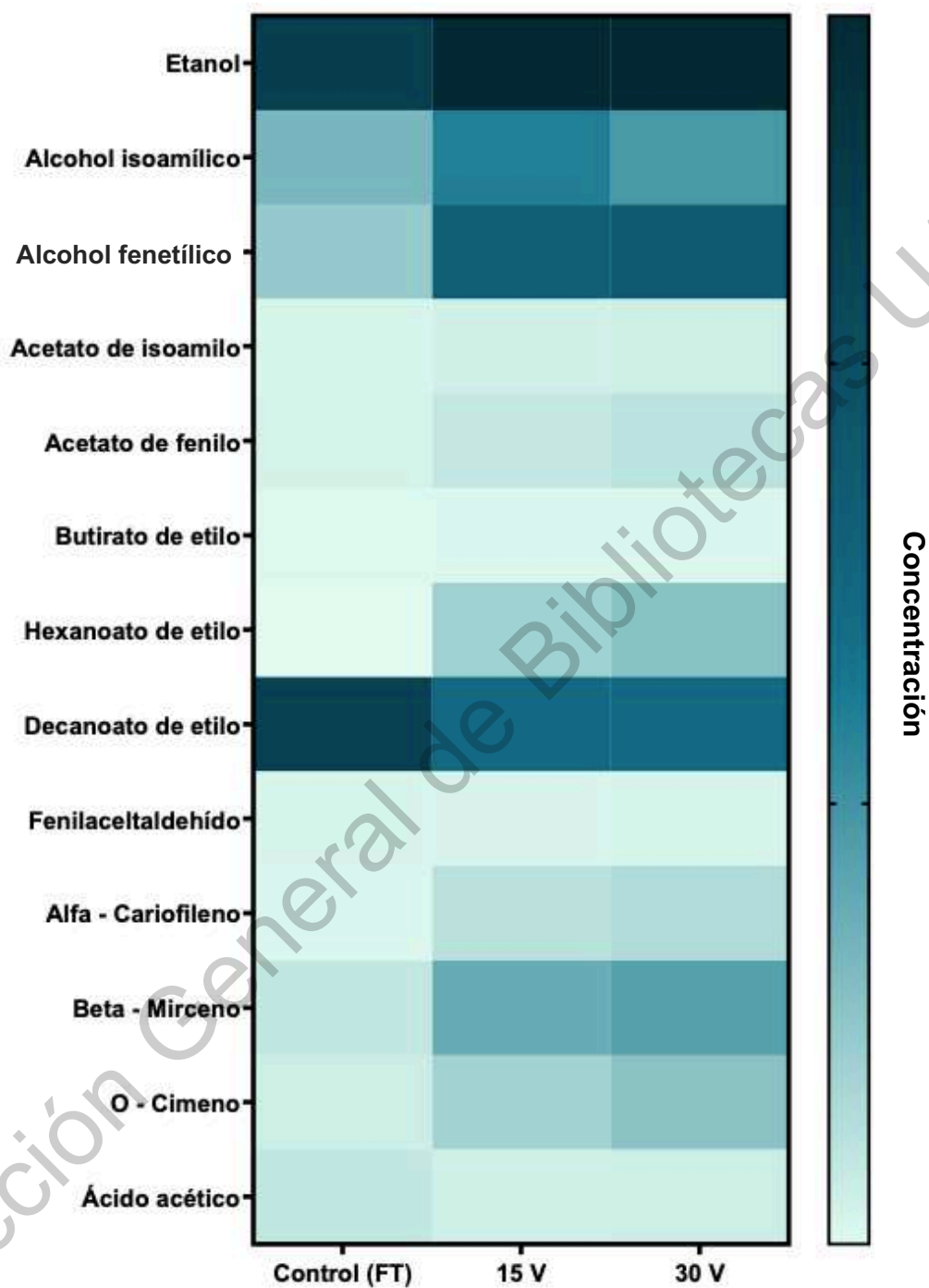


Figura 12. Mapa de calor de los compuestos aromáticos presentes en la cerveza tipo lager formados durante la fermentación tradicional y los tratamientos utilizando un sistema de fermentación electrostática con un electrodo de grafito a 15 y 30 V a las 60 h

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Mathew et al., (2015) reportó un aumento de 20 % en el rendimiento de bioetanol usando glucosa como fuente de energía. A diferencia de Mathew et al., los resultados obtenidos muestran que los electrodos de grafito, a comparación de los otros materiales, fueron los que menor rendimiento tuvieron a 15 V. Por el contrario, Gallegos Almanza (2018) evaluó distintas configuraciones de sistemas electrostáticos y diferentes voltajes (0, 15 y 30 V) para la obtención del bioetanol sin reportar diferencias significativas. En este trabajo se encontró un efecto significativo de los materiales de los electrodos así como de los voltajes aplicados.

El material del electrodo más utilizado para las MET es el grafito, debido a que es un material accesible y versátil. También se tienen en consideración los metales como acero inoxidable, níquel, cobre, plata, oro y titanio (Kundi & Dutta, 2018). Por ejemplo, Masoudi et al., (2020) utilizan una malla de acero inoxidable con un barniz de grafito a base de acrílico para obtener un electrodo con mayor eficacia y a bajo costo; este cambio no presentó toxicidad hacia los microorganismos y elevó su eficacia. Añadido a esto, Qu et al., (2002) reportaron que el efecto de los electrodos de acero inoxidable aumentaba la producción y la calidad de biogas durante la fermentación de material lignocelulósico. Además, se observó un aumento en la degradación de la lignocelulosa en un 20 %, aproximadamente.

7.1. Efecto del potencial eléctrico sobre la fermentación

Zetina & Zetina (2004) definen el potencial eléctrico como la fuerza de atracción o repulsión de una magnitud que depende de la carga eléctrica almacenada entre un cuerpo electrizado con respecto a otro, siendo la unidad de medida el voltio (V). Existen dos tipos de potencial eléctrico: positivo y negativo (Figura 11). Cuando un cuerpo electrizado se conecta a la tierra y existe una transferencia de electrones de la tierra al cuerpo, se tiene un potencial eléctrico positivo. Por el contrario, si la transferencia de electrones se da del cuerpo a la tierra, posee un potencial eléctrico negativo.

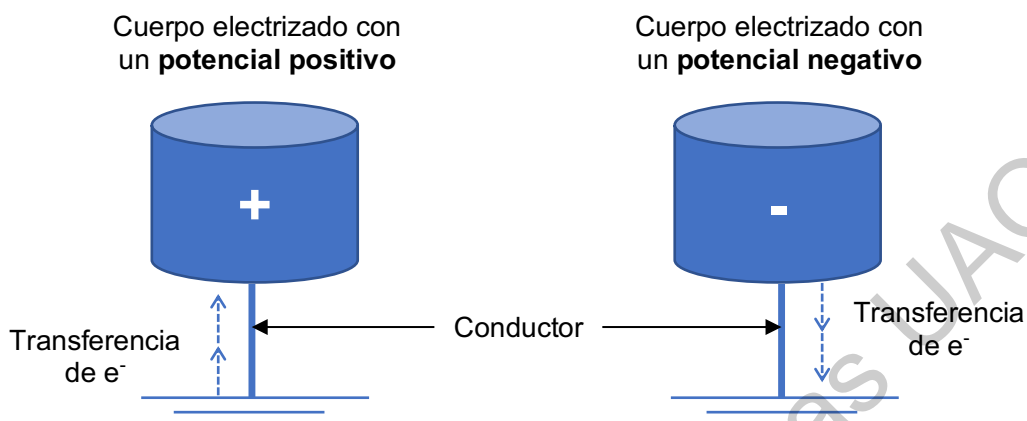


Figura 13. Tipos de potencial eléctrico

En ensayos publicados por Shin et al., (2002) mencionan la importancia del efecto del potencial eléctrico en este tipo de sistemas. En estos estudios pudieron observar que un potencial eléctrico negativo de -0.75 a -10 V aumentaba la producción de etanol en *S. cerevisiae*. Resaltan que un potencial eléctrico muy elevado podría tener consecuencias en la levadura. Uno de ellos es acelerar el potencial óxido reducción, lo que puede ocasionar que haya una baja de reciclamiento de los cofactores, causando que actividades metabólicas se vean limitadas. Como se observó en los resultados, tanto el rendimiento de AI, T y G aumenta significativamente durante las primeras horas, infiriendo que el aumento acelerado de la generación de etanol se debe al metabolismo acelerado durante las primeras horas de la fermentación. Por otro lado, los autores mencionan que la sola presencia de un potencial eléctrico puede disminuir bioquímicamente la concentración de ciertos metabolitos causando cambios en el flujo metabólico.

7.2. Efecto de la conductividad eléctrica de los electrodos sobre la fermentación

Una razón de que el electrodo sea un factor con alta relevancia puede deberse al tipo de material, estos materiales tienen distintas constantes de conductividad eléctrica, que esta representada por la letra griega σ . Ésta es la capacidad de un material para dejar pasar corriente eléctrica a través de él, donde la corriente

eléctrica se define como un movimiento ordenado de cargas libres, es decir, electrones. Asimismo, la conductividad eléctrica es inversamente proporcional a la resistividad (Ec. 5).

$$\sigma = 1/\rho \quad (\text{Ec. 5})$$

donde la ρ corresponde a la resistividad y σ a la conductividad eléctrica. Esta cualidad física se mide en Siemens por metro (S/m o, también puede representarse como $\Omega^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$) (Taherian, 2019). En el caso de los materiales elegidos para esta actividad experimental tienen conductividades eléctricas (σ) de estos valores 1.45×10^6 , 2.4×10^6 y de 2 a 3×10^5 S/m corresponden al acero inoxidable, titanio y grafito, respectivamente de acuerdo con datos obtenidos de ASM International Handbook Committee (2007). Por consiguiente, el acero inoxidable y el titanio tienen una mayor conductividad eléctrica a comparación del grafito (Taherian, 2019). Los electrones pasarán con mayor facilidad en acero inoxidable y titanio, lo que coincide con los resultados obtenidos, los rendimientos de etanol fueron mayores con el uso de estos materiales como electrodos y el caso contrario con grafito. No obstante, esta propiedad física es afectada por distintos factores, como la temperatura, densidad del material, porosidad, entre otras.

7.3. Efecto del campo magnético sobre la fermentación

El reactor de electrofermentación utilizado en este trabajo, se basa en el fundamento de una bobina (Figura 14). Una bobina, también conocida como inductor o choque, tiene como objetivo almacenar y liberar energía en forma de campo magnético (Martín Castillo, s.f.). Su unidad de medida es el Henrio (H) en el SI, pero es usual que se utilice en mH o μH . Pueden encontrarse distintos tipos de inductores, para el caso del reactor utilizado es un inductor solenoide como en el mostrado en la Figura 14. Este tipo de inductor también puede usarse en conjunto con un núcleo, es decir un material sólido al centro de la espiral. Éstos normalmente son materiales ferromagnéticos debido a que aumentan la inductancia y cabe recalcar que hay otros materiales que pueden ser menos sensibles a los campos magnéticos .

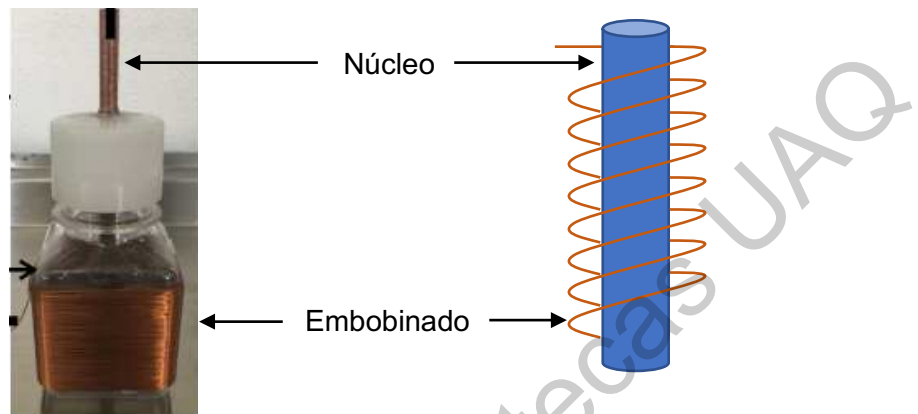


Figura 14. Esquema de un inductor tipo solenoide comparado con el reactor de electrofermentación

La generación de un campo magnético pudiera estar causando que aquellos tratamientos que no están conectados a corriente directa puedan estar directamente influenciados. Esta propiedad es ampliamente explorada, como lo menciona Konopacka et al., (2019), como una aplicación de gran relevancia para aumentar la productividad de bioetanol en levaduras como *S. cerevisiae*. Estos mismos autores probaron que sí hay un aumento significativo en tanto en la producción de etanol como en la proliferación celular. Asimismo, Bubanja et al., (2019) también comprobaron un efecto significativo en otros mecanismos bioquímicos como la respiración celular y el consumo de azúcares.

7.4. Comportamiento del metabolismo celular en un sistema de electrofermentación

El comportamiento del metabolismo celular es aún motivo de investigación entre los pioneros de la rama. De acuerdo con Mozcoviz et al., (2016), hay dos posibles comportamientos que pueden experimentar los electrones disponibles: transferencia directa o a través de mediadores redox. Prasad et al., (2007), así como otros autores, han comprobado que particularmente las levaduras hacen una

transferecia directa por medio de la pared celular. La explicación se basa en la presencia de enzimas en la membrana celular.

En el caso específico de *S. cerevisiae*, Rawson et al., (2012) se refirió a una familia de proteínas en la pared celular denominados proteínas trans de transporte de electrones de membrana plasmática (tPMET), los cuales pueden estar altamente asociados con la recepción de los electrónes para dirigirlos hacia los citocromos localizados en la mitocondria, sin embargo estos mecanismos aún no están claros. Además, la presencia especies electroactivas que pueden estar presentes en el medio o que pudieran ser secretados por la levadura (Babanova et al., 2011) son de gran ayuda para mantener la cadena de transporte de electrones. En el caso particular de la cerveza, se ha encontrado una molécula proveniente de la malta que sí tiene la capacidad de actuar como un mediador redox conocido como riboflavina o vitamina B12, corroborado por Szollosi, et al. (2016).

De cualquier modo, se observaron cambios metabólicos con la aplicación de voltaje. Estos cambios provocan descompensaciones en el sistema de óxido reducción, el cual es usado por la gran mayoría de los procesos internos y son llevados a cabo por enzimas manteniendo un intercambio de electrones, muy parecidos a los fenómenos físicos ya comentados. La producción de bioetanol es una vía metabólica esencial para las levaduras, mantiene el reciclamiento de los cofactores en la ausencia de oxígeno, el cual es importante, puesto que permite que la glucólisis siga funcionando correctamente (Walker & Stewart, 2016). El efecto que el voltaje tiene sobre la fermentación se puede observar en los parámetros cinéticos, tanto en el perfil de volátiles, las concentraciones de algunos compuestos provenientes de la fermentación parecen diferir a comparación con respecto a la fermentación tradicional.

La cerveza es reconocida como una bebida que obtiene una gama extensa de aromas y sabores a lo largo del proceso de elaboración, aún así la mayoría de los compuestos aromáticos provienen del metabolismo. Los alcoholes superiores, ésteres, ácidos orgánicos, componentes sulfurados y aldehídos son algunos elementos que conforma tanto el aroma como cuerpo de una cerveza y son producto

de la fermentación (Alves, et al., 2020). Por un lado, los alcoholes superiores son los compuestos organolépticos más abundantes de en la cerveza lager y es el producto de la digestión de los aminoácidos presentes en el mosto. Asimismo, los ésteres solo se encuentran en trazas, pero son los volátiles de mayor importancia y son producto entre la reacción de los alcoholes superiores y acetil CoA. (Pires et al., 2014). Los ésteres se encuentran en bajas concentraciones debido a que tienen un umbral de detección muy bajo, es decir, el olfato es capaz de detectar el olor con una mínima concentración de producto. Ahora bien, el aumento de la concentración de éstos compuestos puede ser contraproducente, si se sobreproducen pueden generar un sabor amargo por el exceso de éstos en lugar de un sabor afrutado (Pires, et al., 2014). Cabe resaltar que no se identificaron compuestos relacionados con el sabor y aromas desagradables como el diacetilo, en ningun tratamiento y el control.

8. CONCLUSIONES

Se comprobó que la conductividad del material utilizado como electrodo en un sistema de fermentación electrostática moduló la tasa de crecimiento, el tiempo de duplicación, el consumo de azúcares reductores y el contenido de compuestos volátiles de *S. pastorianus* en una cerveza lager.

Se observó que la intensidad del voltaje (15 y 30 V) en un sistema de fermentación electrostático no tuvo efecto sobre los parámetros cinéticos de la levadura en una cerveza lager

Se necesitan estudios que relacionen el transporte de electrones de la levadura, la regulación de genes, así como entender las propiedades físicas involucradas en el sistema de fermentación electrostática para explicar los mecanismos de reacción involucrados en la modulación del metabolismo.

Por último, debido a los cambios registrados en el perfil aromático de los tratamientos se sugiere una evaluación sensorial para conocer las preferencias del consumidor en una cerveza producida mediante un sistema de fermentación electrostático.

9. REFERENCIAS

- Alves, V., Gonçalves, J., Figueira, J. A., Ornelas, L. P., Branco, R. N., Câmara, J. S., & Pereira, J. A. M. 2020. *Beer volatile fingerprinting at different brewing steps*. Food Chemistry.
- Ángeles, A. & Zuñiga, E. 2018. *La cerveza artesanal mexicana, con todo para crecer*. Recuperado el 13 de enero de 2019 de: <https://www.forbes.com.mx/cerveza-artesanal-mexicana-con-todo-para-crecer/>
- ASM International & Davis, J. R. (2007) *ASM handbook 2 Properties and selection: nonferrous alloys and special-purpose materials*. Materials Park, Ohio, EEUU.
- Babanova, S., Hubenova, Y., & Mitov, M. (2011). *Influence of artificial mediators on yeast-based fuel cell performance*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 112(4), 379–387.
- Bamforth, C. 2016. *Brewing Materials and Processes*. San Diego, CA: Elsevier.
- Basso, R.F., Alcarde, A.R. & Portugal, C.B. 2016. *Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations?* Food Research International. 86:112-120.
- Behre, K. 1999. *The history of beer additives in Europe - A review*. Vegetation History and Archeobotany 8:35-48.
- Bettenhausen, H. M., Barr, L., Broeckling, C. D., Chaparro, J. M., Holbrook, C., Sedin, D. & Heuberger, A. L. 2018. *Influence of malt source on beer chemistry, flavor, and flavor stability*. Food Research International 113:487–504.
- Brányik, T., Silva, D. P., Baszczynski, M., Lehnert, R. & Almeida e Silva, J. B. 2012. *A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production*. Journal of Food Engineering 108:493–506
- Brewers Association. *Beer styles*. Recuperado el 1 de febrero de 2019 de: <https://www.brewersassociation.org/educational-publications/beer-styles/>
- Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brooks, P. A. & Rogers, S. 2004. *Brewing: Science and Practice*. Boca Raton, FL: Woodhead Publishing Limited and CRC Press.

- Bubanja, I. N., Lončarević, B., Lješević, M., Beškoski, V., Gojgić-Cvijović, G., Velikić, Z., & Stanisavljev, D. 2019. *The influence of low-frequency magnetic field regions on the Saccharomyces cerevisiae respiration and growth*. Chemical Engineering and Processing - Process Intensification. 143, 1-7.
- Capece, A., R. Romaniello, G. Siesto, and P. Romano. 2018. *Conventional and Non-Conventional Yeasts in Beer Production*. Fermentation 4:38.
- Catrilaf, G. & Muñoz, M. 2013. *Estimación de parámetros cinéticos de Saccharomyces cerevisiae en sistema de fermentación Batch bajo distintas condiciones de crecimiento*. Ingeniería en Biotecnología, Área de procesos agroindustriales. 25 - 36
- Cerveceros de México. 2017. *La cerveza mexicana es líder en exportaciones a Estados Unidos*. Recuperado el 2 de febrero de 2019 de <https://cervecerosdemexico.com/2017/04/27/la-cerveza-mexicana-es-lider-en-exportaciones-a-estados-unidos/>
- Cerveceros de México. 2018. *¿Cómo se clasifican los estilos de cerveza?*. Recuperado el 2 de febrero de 2019 de <https://cervecerosdemexico.com/2018/06/18/como-se-clasifican-los-estilos-de-cerveza/>
- Damerow, P. 2012. *Sumerian Beer: The Origins of Brewing Technology in Ancient Mesopotamia*. Cuneiform Digital Library Journal 2:1-20
- Das, A., Patel, K. & Shivram, R. 2017. *Electro Fermentation: A Novel Approach in Fermentation Technology - A Review*. International Journal of Advance Engineering and Research Development. 4(9): 358-360
- FAO. *Barley, Malt and Beer*. Recuperado 23 de enero de 2019 de: www.fao.org/fileadmin/user_upload/.../AH3_BarleyMaltBeer.pdf
- FAO. 1994. *Definition and classification of commodities*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado el 24 de enero de 2019 de: <http://www.fao.org/waicent/faoinfo/economic/faodef/fdef15e.htm#15.4>
- Ferrera, I. M. & Guido L. F. 2018. *Impact of Wort Amino Acids on Beer Flavour: A Review*. Fermentation. 4, 2 – 23.

- Gallegos Almanza, I. A. 2018. *Sistema de electrofermentación para la producción de bioetanol*. Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.
- González, S.S.; Barrio, E. & Querol, A. 2008. *Molecular characterization of new natural hybrids of Saccharomyces cerevisiae and S. kudriavzevii in brewing*. Applied and Environmental Microbiology. 74:2314–2320.
- Harrison, M., & J. Albanese. 2017. Beer/Brewing. En: Lederberg, J. *Encyclopedia of Microbiology*. 2a ed. San Diego, CA: Academic Press.
- Hieronimus, S. 2012. *For the love of hops: a practical guide to aroma, bitterness and the culture of hops*. Boulder, CO: Brewers Publications.
- Hills, A. 2015. *Brewing Microbiology - Managing Microbes Ensuring Quality and Valorising Waste*. Kidlington, OX: Woodhead Publishing.
- INEGI. 2016. *Estadísticas a propósito de la actividad de la cerveza*. Ciudad de México. Recuperado el 30 de enero de 2019 de: <http://cervecerosdemexico.com/wp-content/uploads/2017/08/estadisticas-a-proposito-de-la-elaboracion-de-la-cerveza.pdf>.
- Kiransree, N., Sridhar, M. and Venkateswar Rao, L. 2000. *Characterization of thermotolerant, ethanol tolerant fermentative Saccharomyces cerevisiae for ethanol production*. Bioprocess Engineering. 22(3):0243–0246.
- Konopacka, A., Rakoczy, R., & Konopacki, M. 2018. *The effect of rotating magnetic field on bioethanol production by yeast strain modified by ferrimagnetic nanoparticles*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials. 473, 176 – 183.
- Krebs, G., Müller, M., Becker, T., & Gastl, M. 2018. *Characterization of the macromolecular and sensory profile of non-alcoholic beers produced with various methods*. Food Research International. 116, 508 – 517.
- Kundi, P.P. & Dutta, K. 2018. *Progress and Recent Trends in Microbial Fuel Cells*. Elsevier, EE.UU.
- Li, Q., L. Wang & C, Liu. 2017. Beers. En: A. Padey, M. Sanromán, G. Du, C. Socol & C. Dussap. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Amsterdam AE: Elsevier.

- Liguori, L., De Francesco, G., Russo, P., Perretti, G., Albanese, D., & Di Matteo, M. 2015. *Production and characterization of alcohol-free beer by membrane process*. Food and Bioproducts Processing. 94:158–168.
- Liguori, L., Russo, P., Albanese, D. & Di Mateo, M. 2018. Production of Low-Alcohol Beverages: Current Status and Perspectives. En: Grumezescu, A. M. & Holban, A. M. *Food Processing for Increased Quality and Consumption*. Londres, NW: Academic Press.
- Liu, S. Q. 2015. Impact of yeast and bacteria on beer appearance and flavour. En: Hill, A. *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Kidlington, OX: Woodhead Publishing.
- Mallet, J. 2013. *Malt: a practical guide from field to brewhouse*. Boulder, CO: Brewers Publications.
- Martín Castillo, J. C. Componentes pasivos en Electrónica. Editex. Madrid, España.
- Masoudi, M., Rahimnejad, M., & Mashkour, M. 2020. *Fabrication of anode electrode by a novel acrylic based graphite paint on stainless steel mesh and investigating biofilm effect on electrochemical behavior of anode in a single chamber microbial fuel cell*. Electrochimica Acta, 344, 136168.
- Mathew, A. S., Wang, J., Luo, J., y Yau, S. T. 2015. *Enhanced ethanol production via electrostatically accelerated fermentation of glucose using Saccharomyces cerevisiae*. Scientific Reports, 11:866–878.
- Mecozzi, M. 2005. *Estimation of total carbohydrate amount in environmental samples by the phenol-sulphuric acid method assisted by multivariate calibration*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 79(1–2):84-90.
- Mi-Park, S., In-Sang, B., Won-Park, D. & Hyun-Park, D. 2005. *Electrochemical Reduction of Xylose to Xylitol by Whole Cells or Crude Enzyme of Candida peltata*. Journal of Microbiology, 43(5), 451-455.
- Miller, G. L. 1959. *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Analytical Chemistry. 31(3):426–428.

- Moscoviz, R., Toledo-Alarcón, J., Trably, E. & Bernet, N. 2016. *Electro-Fermentation: How to Drive Fermentation Using Electrochemical Systems*. Trends in Biotechnology, 34(11), 856–865.
- Mosher, M., & K. Trantham. 2017. *Brewing Science: A Multidisciplinary Approach*. Cham, ZH: Springer.
- Muñoz, M. & Catrilaf, G. 2013. *Estimación de parámetros cinéticos de Saccharomyces cerevisiae en sistema de fermentación Batch bajo distintas condiciones de crecimiento*. Universidad Tecnológica de Chile. Santiago.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-199-SCFI-2017, Bebidas alcohólicas-Denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
- Oladokun, O., A. Tarrega, S. James, K. Smart, J. Hort, & D. Cook. 2016. *The impact of hop bitter acid and polyphenol profiles on the perceived bitterness of beer*. Food Chemistry 205:212-220.
- OMS. 2006. *Recomendaciones*. Recuperado el 26 de febrero de 2019 de: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/es/
- Palmer, J. J. 2017. *How to brew*. 4a ed. Boulder, CO: Brewers Publications.
- Palmer, J. J. & Kaminski, C. 2013. *Water: a comprehensive guide for brewers*. Boulder, CO: Brewers Publications.
- Perruchini, E., C. Glatz, M. Hald, J. Casana, & J. Toney. 2018. *Revealing invisible brews: A new approach to the chemical identification of ancient beer*. Journal of Archaeological Science 100:176-190.
- Pires, E., J. Teixeira, T. Brányik, & A. Vicente. 2014. *Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast*. Applied Microbiology and Biotechnology 98:1937-1949.
- Pistelli, L., B. Ferri, P. Cioni, M. Koziara, M. Agacka, & U. Skomra. 2018. *Aroma profile and bitter acid characterization of hop cones (Humulus lupulus L.) of five healthy and infected Polish cultivars*. Industrial Crops and Products 124:653-662.

- Potter, M. C. 1911. *Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 84(571), 260–276.
- Prasad, D., Arun, S., Murugesan, M., Padmanaban, S., Satyanarayanan, R. S., Berchmans, S., & Yegnaraman, V. 2007. *Direct electron transfer with yeast cells and construction of a mediatorless microbial fuel cell*. Biosensors and Bioelectronics, 22(11), 2604–2610.
- Procopio, S., F. Qian, & T. Becker. 2011. *Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation*. European Food Research and Technology 233:721-729.
- Qu, G., Qiu, W., Liu, Y., Zhong, D., & Ning, P. 2014. *Electropolar effects on anaerobic fermentation of lignocellulosic materials in novel single-electrode cells*. Bioresource Technology, 159, 88 – 94.
- Rabaey, K., Girguis, P. & Nielsen, L. K. 2011. *Metabolic and practical considerations on microbial electrosynthesis*. Current Opinion in Biotechnology, 22(3), 371–377.
- Rawson, F. J., Gross, A. J., Garrett, D. J., Downard, A. J., & Baronian, K. H. R. 2012. *Mediated electrochemical detection of electron transfer from the outer surface of the cell wall of Saccharomyces cerevisiae*. Electrochemistry Communications, 15(1), 85–87
- Reineccius, G. 2005. *Flavor chemistry and technology*. 2a ed. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group.
- Riu-Aumatell, M., Miró, P., Serra-Cayueta, A., Buxaderas, S., & López-Tamames, E. 2014. *Assessment of the aroma profiles of low-alcohol beers using HS-SPME–GC-MS*. Food Research International, 57:196–202.
- Rosentrater, K. A. & Evers, A. D. 2018. Malting, brewing, fermentation, and distilling. En: *Kent's Technology of Cereals: An Introduction for Students of Food Science and Agriculture*. 5a ed. Cambridge, MA: Elsevier.
- Sánchez, C. 1995. *Louis Pasteur: una vida, una ciencia, un siglo*. Biométida 15:155-162.

- Schievano, A., Pepé Sciarria, T., Vanbroekhoven, K., De Wever, H., Puig, S., Andersen, S. J. & Pant, D. 2016. *Electro-Fermentation – Merging Electrochemistry with Fermentation in Industrial Applications*. Trends in Biotechnology, 34(11), 866–878.
- Seo, H.-B., Kim, H.-J., Lee, O.-K., Ha, J.-H., Lee, H.-Y., & Jung, K.-H. 2008. Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production process. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(2), 285–292.
- Shanthi Sravan, J., Butti, S. K., Sarkar, O., Vamshi Krishna, K. & Venkata Mohan, S. 2018. *Electrofermentation of food waste – Regulating acidogenesis towards enhanced volatile fatty acids production*. *Chemical Engineering Journal*, 334, 1709–1718.
- Sherman, F. 2002. *Getting started with yeast*. *Methods in Enzymology*. 350:3-41.
- Shewry, P., and S. Ullrich. 2014. *Barley*. 2a ed. Saint Paul, MN: AACC International.
- Shin, J. Zeikus, M. Jain, H. 2002. *Electrically enhanced ethanol fermentation by Clostridium thermocellum and Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, (476 – 481).
- Szollosi, A., Nguyen, Q. D., Kovacs, A. G., Fogarasi, A.-L., Kun, S., & Hegyesnevecseri, B. 2016. Production of low or non-alcoholic beer in microbial fuel cell. *Food and Bioproducts Processing*, 98, 196–200.
- Statista. 2017. *Beer production worldwide from 2008 to 2017, by region (in billion hectoliters)*. Recuperado el 10 de febrero de 2019 de: <https://www.statista.com/statistics/270270/worldwide-beer-production-by-region/>
- Statista. 2018a. *The Countries Drinking the Most Beer*. Recuperado el 10 de febrero de 2019 de: <https://www.statista.com/chart/12510/the-countries-drinking-the-most-beer/>
- Statista. 2018b. *Sales of the leading beer companies worldwide in 2018 (in billion U.S. dollars)*. Recuperado el 9 de febrero de 2019 de:

<https://www.statista.com/statistics/257670/sales-of-the-leading-beer-companies-worldwide/>

- Stewart, G. 2016. *Saccharomyces species in the Production of Beer*. Beverages 2:34-52.
- Stewart, G., I. Russell, & A. Anstruther. 2018. *Handbook of brewing*. 3a ed. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group.
- Taherian, R. 2019. The Theory of Electrical Conductivity. *Electrical Conductivity in Polymer-Based Composites: Experiments, Modelling and Applications*. Reino Unido, Elsevier.
- Tian, J. 2010. *Determination of several flavours in beer with headspace sampling-gas chromatography*. Food Chemistry, 123(4), 1318–1321.
- Unger, R. W. 2007. *Beer in the Middle Ages and the Renaissance*. Filadelfia, PA: University of Pennsylvania Press
- Varela, J. & Varela, C. 2019. *Microbiological strategies to produce beer and wine with reduced ethanol concentration*. Food biotechnology 56:88–96.
- Vazquez-Landaverde, P. A. & Qian, M. C. 2007. *Antioxidant impacts on volatile formation in high-pressure-processed milk*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55 (22): 9183-9188.
- Venkata M. S., Velvizhi, G., Vamshi Krishna, K., & Lenin Babu, M. 2014. *Microbial catalyzed electrochemical systems: A bio-factory with multi-facet applications*. Bioresource Technology, 165, 355–364.
- Venkata, M. S., Varjani, S. & Pandey, A. 2019. *Microbial Electrochemical Technology*. Kidlington, OX: Elsevier
- Verbelen, P., S. Saerens, S. Van Mulders, F. Delvaux, & F. Delvaux. 2009. *The role of oxygen in yeast metabolism during high cell density brewery fermentations*. Applied Microbiology and Biotechnology 82:1143-1156.
- Walker, G., & G. Stewart. 2016. *Saccharomyces cerevisiae in the Production of Fermented Beverages*. Beverages 2:30-42.

- Wang, H., & Ren, Z. J. 2013. *A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology*. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1796–1807.
- White C. & Zainasheff, J. 2010. *Yeast: A practical guide to yeast fermentation*. Boulder, CO: Brewers Publications.
- Wise Guy Report. 2019. *Non-alcoholic beer market 2019 global key players, trends, share, industry size, segmentation, opportunities, forecast to 2023*. Recuperado el 21 de febrero de 2019 de:
<https://www.marketwatch.com/press-release/non-alcoholic-beer-market-2019-global-key-players-trends-share-industry-size-segmentation-opportunities-forecast-to-2023-2019-01-22>
- Zetina, A. M. & Zetina, A. C. 2004 *Electrónica básica*. Limusa, Ciudad de México.

10. ANEXOS

10.1. Análisis de varianza del modelo factorial 3²

10.1.1. Etanol

Tiempo	Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P	
12 h	<i>Elect</i>	2	0.9924	0.4962	18.3630	1.63e-04	***
	<i>Volt</i>	2	0.0339	0.0269	0.6270	0.5497	
	<i>Elect:Volt</i>	4	0.5773	0.1443	5.3410	0.0091	**
	<i>Residuales</i>	13	0.3513	0.0270			
24 h	<i>Elect</i>	2	1.9784	0.9892	61.2220	2.42e-07	***
	<i>Volt</i>	2	0.0111	0.0056	0.3450	0.7145	
	<i>Elect:Volt</i>	4	0.2708	0.0677	4.1900	0.0214	*
	<i>Residuales</i>	13	0.2100	0.0162			
36 h	<i>Elect</i>	2	0.5441	0.5441	0.2721	2.68e-06	***
	<i>Volt</i>	2	0.1143	0.1143	0.0572	0.0078	**
	<i>Elect:Volt</i>	4	0.0764	0.0764	0.0191	0.1117	
	<i>Residuales</i>	16	0.1370	0.1370	0.0086		
48 h	<i>Elect</i>	2	1.1597	0.5799	300.3100	3.18e-12	***
	<i>Volt</i>	2	0.0589	0.0295	15.2600	3.04e-04	***
	<i>Elect:Volt</i>	4	0.0885	0.0221	11.4600	2.45e-04	***
	<i>Residuales</i>	14	0.0270	0.0019			
60 h	<i>Elect</i>	2	0.3936	0.1968	107.9920	1.24e-09	***
	<i>Volt</i>	2	0.0181	0.0090	4.9570	0.0223	*
	<i>Elect:Volt</i>	4	0.0204	0.0051	2.8000	0.0642	
	<i>Residuales</i>	15	0.0273	0.0018			

Códigos de significancia: 0 (***), 0.001 (**), 0.01 (*), 0.05 (.), 0.1 (.) 1

10.1.2. Biomasa

Tiempo	Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P	
12 h	<i>Elect</i>	2	0.0003	0.0002	0.7700	0.4778	
	<i>Volt</i>	2	0.0014	0.0007	3.0990	0.0769	
	<i>Elect*Volt</i>	4	0.0052	0.0013	5.8420	0.0056	**
	<i>Residuales</i>	14	0.0031	0.0002			
24 h	<i>Elect</i>	2	0.0161	0.0081	70.1110	1.09e-07	***
	<i>Volt</i>	2	0.0025	0.0013	10.8300	0.0017	**
	<i>Elect*Volt</i>	4	0.0038	0.0009	8.2120	0.0016	**
	<i>Residuales</i>	13	0.0015	0.0001			
36 h	<i>Elect</i>	2	0.0047	0.0023	63.0980	4.90e-08	***
	<i>Volt</i>	2	0.0005	0.0003	7.0280	0.0070	**
	<i>Elect*Volt</i>	4	0.0001	0.0000	0.8870	0.4953	
	<i>Residuales</i>	15	0.0006	0.0000			
48 h	<i>Elect</i>	2	0.0094	0.0047	80.3300	4.53e-09	***
	<i>Volt</i>	2	0.0024	0.0012	20.4300	3.93e-05	***
	<i>Elect*Volt</i>	4	0.0043	0.0011	18.4000	7.84e-06	***
	<i>Residuales</i>	16	0.0009	0.0001			
60 h	<i>Elect</i>	2	0.0042	0.0021	125.4840	2.90e-11	***
	<i>Volt</i>	2	0.0000	0.0000	1.4360	0.2638	
	<i>Elect*Volt</i>	4	0.0004	0.0001	5.5890	0.0042	**
	<i>Residuales</i>	18	0.0003	0.0000			

Códigos de significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 '.' 1

10.2 Rendimientos de producción de *S. pastorianus* de todos los tratamientos del modelo factorial 3²

10.2.1. Etanol

Tratamientos		Y _s (g etanol · g sustrato ⁻¹)									
Electrodo	Voltaje	12 h		24 h		36 h		48 h		60 h	
Ai	0 V	0.490 ± 0.019	abc	0.509 ± 0.036	ab	0.362 ± 0.071	ab	0.714 ± 0.051	a	0.403 ± 0.075	a
	15 V	0.834 ± 0.154	a	0.904 ± 0.255	a	0.319 ± 0.078	abc	0.398 ± 0.060	b	0.297 ± 0.055	ab
	30 V	0.566 ± 0.189	abc	0.908 ± 0.177	a	0.498 ± 0.051	a	0.640 ± 0.047	a	0.280 ± 0.034	ab
T	0 V	0.531 ± 0.356	ab	0.320 ± 0.079	bc	0.005 ± 0.047	e	0.223 ± 0.004	c	0.342 ± 0.040	ab
	15 V	0.043 ± 0.036	bc	0.090 ± 0.025	bc	0.065 ± 0.077	bode	0.206 ± 0.087	cd	0.244 ± 0.067	b
	30 V	0.095 ± 0.132	bc	0.166 ± 0.221	bc	0.315 ± 0.225	abcd	0.187 ± 0.070	cde	0.334 ± 0.040	ab
G	0 V	0.019 ± 0.005	c	0.019 ± 0.005	c	0.054 ± 0.002	cde	0.063 ± 0.006	de	0.054 ± 0.004	c
	15 V	0.091 ± 0.012	bc	0.091 ± 0.012	c	0.046 ± 0.009	de	0.043 ± 0.002	e	0.052 ± 0.07	c
	30 V	0.223 ± 0.025	bc	0.223 ± 0.025	bc	0.057 ± 0.007	cde	0.052 ± 0.013	e	0.058 ± 0.001	c

Ai: acero inoxidable; T: titanio; G: grafito

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0.05$).

10.2.1. Biomasa

Tratamientos		Y_s (g biomasa · g sustrato ⁻¹)									
Electrodo	Voltaje	12 h		24 h		36 h		48 h		60 h	
Ai	0 V	0.007 ± 0.001	b	0.050 ± 0.009	cd	0.037 ± 0.001	bcd	0.087 ± 0.011	a	0.056 ± 0.003	ab
	15 V	0.066 ± 0.013	a	0.092 ± 0.014	ab	0.031 ± 0.005	cd	0.040 ± 0.004	cd	0.044 ± 0.003	c
	30 V	0.024 ± 0.023	b	0.107 ± 0.015	a	0.048 ± 0.014	abc	0.106 ± 0.010	a	0.047 ± 0.002	b
T	0 V	0.047 ± 0.028	a	0.019 ± 0.003	de	0.018 ± 0.005	d	0.024 ± 0.006	d	0.025 ± 0.004	d
	15 V	0.013 ± 0.001	b	0.008 ± 0.004	e	0.018 ± 0.002	d	0.031 ± 0.005	d	0.030 ± 0.006	d
	30 V	0.004 ± 0.003	b	0.016 ± 0.006	de	0.021 ± 0.000	d	0.022 ± 0.005	d	0.025 ± 0.003	d
G	0 V	0.018 ± 0.005	b	0.040 ± 0.003	cde	0.054 ± 0.002	ab	0.063 ± 0.006	b	0.054 ± 0.004	ab
	15 V	0.029 ± 0.009	b	0.028 ± 0.004	cde	0.046 ± 0.009	abc	0.043 ± 0.002	bcd	0.052 ± 0.007	ab
	30 V	0.018 ± 0.006	b	0.062 ± 0.025	bc	0.060 ± 0.008	a	0.055 ± 0.014	bc	0.061 ± 0.002	a

Al: acero inoxidable; T: titanio; G: grafito

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0.05$).

10.3. Análisis de varianza de la comparación de tratamientos del electrodo de grafito con la fermentación tradicional.

10.3.1. Generación de etanol

Tiempo	Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
12 h	Voltaje	3	9.06	3.02	0.75	0.55
	Residuales	8	32.31	4.04		
24 h	Voltaje	3	41.26	12.75	5.40	0.03 *
	Residuales	8	20.36	2.55		
36 h	Voltaje	3	84.62	28.21	1.28	0.35
	Residuales	8	176.76	22.09		
48 h	Voltaje	3	29.66	9.89	1.36	0.32
	Residuales	8	58.04	7.26		
60 h	Voltaje	3	63.99	21.33	2.64	0.12
	Residuales	8	64.72	8.09		

Códigos de significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

10.3.2. Generación de biomasa

Tiempo	Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
12 h	Voltaje	3	0.237	0.079	1.701	0.244
	Residuales	8	0.372	0.047		
24 h	Voltaje	3	4.720	1.573	2.745	0.113
	Residuales	8	4.585	0.573		
36 h	Voltaje	3	5.314	1.771	15.920	0.001 ***
	Residuales	8	0.890	0.111		
48 h	Voltaje	3	3.394	1.131	6.593	0.015 *
	Residuales	8	1.373	0.172		
60 h	Voltaje	3	5.321	1.774	13.490	0.002 **
	Residuales	8	1.052	0.132		

Códigos de significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

10.3.3. Consumo de azúcares reductores

Tiempo	Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
12 h	Voltaje	3	2772.0	924.2	49.3	1.67E-05
	Residuales	8	150.0	18.7		
24 h	Voltaje	3	1919.2	639.7	61.9	7.05E-06
	Residuales	8	82.7	10.3		
36 h	Voltaje	3	1882.6	627.5	17.0	7.86E-04
	Residuales	8	295.4	36.9		
48 h	Voltaje	3	2855.5	951.8	48.7	1.75E-05
	Residuales	8	156.2	19.5		
60 h	Voltaje	3	2496.6	832.2	19.2	5.21E-04
	Residuales	8	347.6	43.5		

Códigos de significancia: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1