



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“Obtención de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* mejoradas  
para su uso en cerveza tipo Ale”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Presenta:**

IIA Claudia Alexandra Pérez Macedo

**Dirigida por:**

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Diciembre, 2017



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

**“Obtención de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* mejoradas para su uso en cerveza tipo Ale”**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Presenta:**

IIA Claudia Alexandra Pérez Macedo

**Dirigida por:**

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez


Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez  
Presidente


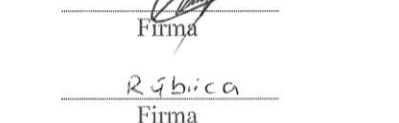
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Secretario

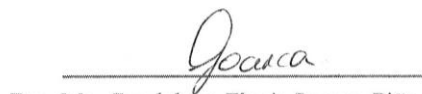
Dr. Eduardo Castaño Tostado  
Vocal

Dra. Rosalía Reynoso Camacho  
Suplente

Dr. Ángel Roberto Martínez Campos  
Suplente

  
M.S.P. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad

  
Firma  
  
Firma  
  
Firma  
  
Firma  
Rúbrica  
Firma

  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Diciembre 2017

## RESUMEN

En los últimos ocho años, en México, la importación de cerveza artesanal creció un 80% lo que muestra el interés del consumidor local por cervezas de especialidad, como podrían ser las artesanales mexicanas. En nuestro país no se desarrollan levaduras especializadas que puedan utilizar los productores artesanales de cerveza de la región para elaborar esta bebida; lo anterior requiere la búsqueda de alternativas que permitan disminuir la importación de insumos para satisfacer el nicho de mercado mexicano de cervezas artesanales. Estas bebidas pueden desarrollarse a través del uso de levaduras mejoradas, por lo que el objetivo de este trabajo fue aislar levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* que generen mayores concentraciones de etanol o CO<sub>2</sub>. En este trabajo se aislaron tres cepas de levaduras a partir de tres cervezas artesanales mexicanas, estas cepas fueron mutagenizadas por radiación UV y las células modificadas fueron evaluadas en su producción de CO<sub>2</sub> y biomasa; otras cepas se seleccionaron para la sobreproducción de isoamil alcohol e isoamil acetato utilizando 5,5,5-trifluoro-DL-Leucina (TFL); las cepas modificadas se utilizaron para hacer microfermentaciones y producir cerveza. Las cervezas producidas por las cepas seleccionadas fueron sometidas a evaluación sensorial por un panel de consumidores habituales de esta bebida enfocándose en atributos de sabor y aroma para analizar estos datos mediante las técnicas de Análisis de Componentes Principales y Mapeo de Preferencias. En conclusión, los sistemas de selección funcionaron ya que se obtuvieron dos mutantes con características mejoradas de producción de CO<sub>2</sub> y biomasa respecto a las cepas control.

**PALABRAS CLAVE:** *Saccharomyces cerevisiae*, cerveza, Ale, cepa de levadura, mutagénesis, evaluación sensorial, Análisis de Componentes Principales, Mapeo de Preferencias.

## SUMMARY

In the past eight years, imports of beer grew 80% which means that Mexican consumers are interested in specialty beers that could be Mexican craft beers. In Mexico, special brewing yeast are not produced and for instance, there is need for searching alternatives to reduce the import of ingredients and to satisfy the flavored beers Mexican market niche; these drinks can be obtained by biotechnological processes using yeast as a model. The aim of this work was to obtain *Saccharomyces cerevisiae* yeasts which can generate higher concentrations of ethanol or carbon dioxide so that these yeast mutants are used to produce an ale beer. Three yeast strains were isolated from three Mexican craft beers. Yeast were grown in YPD medium and mutagenesis was induced by UV radiation. The mutant yeast was evaluated in its carbon dioxide and biomass production. Other yeast were selected using 5,5,5-Trifluoro-DL-Leucine (TFL) so that these overproduced isoamyl alcohol and isoamyl acetate. The strains were inoculated in microfermentations and large scale fermentations. Sensory evaluation was carried out by a panel of regular beer consumers in order to evaluate flavor and aroma attributes. Sensory data were studied using Principal Component Analysis and Preference Mapping technique.

**KEYWORDS:** *Saccharomyces cerevisiae*, beer, Ale, yeast strain, mutagenesis, sensory evaluation, Principal Component Analysis, Preference Mapping

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Romero por ser mi mentor de este proyecto. Gracias por toda su asesoría y apoyo incondicional durante este tiempo, su confianza puesta en mí, gran sentido del humor y por su paciencia.

A Frida, Alfredo y Kelvin por sus enseñanzas de vida, consejos y apoyo desde que tengo memoria para alcanzar todas y cada una de mis metas.

A mis amistades de la vida que están al pendiente de mí, mis avances en el proyecto, sus atenciones brindadas, risas, afecto y entusiasmo en tiempos de adversidad y de ser perseverante.

A CONACyT y CONCYTEQ por las becas otorgadas tanto para este programa de Maestría así como para la participación en el Congreso de Biotecnología al que asistí.

A mi Comité por sus valiosas aportaciones a la realización de esta tesis y apoyo incondicional para lo que sea que yo necesitara.

A mis profesores por brindar su conocimiento, experiencias y tips para el desarrollo profesional que viene, por exigir siempre más a pesar de los regaños, jajaja.

A la UAQ y la UAEMex por el préstamo de sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo. Al personal administrativo e intendencia por su amabilidad y ayuda con quienes diariamente conviví y compartían sonrisas.

Al panel entrenado de BJCP quienes mostraron siempre su interés en contribuir a esta tesis.

A Humberto Cadena por su apoyo para la elaboración de la cerveza en lotes grandes.

A mis compañeros de maestría, de quienes aprendí desde que los conocí y que hicieron ameno este viaje.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>4</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>TABLA DE CONTENIDO</b> .....	<b>6</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>9</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>12</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>16</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>18</b>
2.1 <b>PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA</b> .....	19
2.1.1    Malteado .....	20
2.1.2    Maceración .....	22
2.1.3    Filtración del mosto.....	23
2.1.4    Ebullición del mosto.....	23
2.1.5    Enfriamiento y clarificación del mosto .....	24
2.1.6    Fermentación .....	24
2.1.7    Maduración.....	24
2.1.8    Acondicionamiento de la cerveza.....	25
2.1.9    Carbonatación.....	25
2.1.10    Filtración de la cerveza .....	26
2.1.11    Pasteurización .....	27
2.2 <b>INGREDIENTES</b> .....	27
2.2.1    Agua .....	28
2.2.2    Fuente de carbohidratos (cebada malteada).....	28
2.2.3    Lúpulo ( <i>Humulus lupulus</i> ) .....	29
2.2.4    Levadura.....	30
2.3 <b>ESTILOS DE CERVEZA</b> .....	41
2.3.1    Ales.....	41
2.3.2    Lagers .....	41

2.4	MODIFICACIONES GENÉTICAS .....	42
2.4.1	Mutagénesis.....	42
2.4.2	Revisión de mejoras obtenidas por mutagénesis .....	43
2.4.3	Producción de isoamil acetato .....	44
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>45</b>
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>46</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	47
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	47
<b>6.</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>48</b>
6.1.1	Cepas .....	48
6.1.2	Medios de cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	48
6.1.3	Aislamiento de levaduras presentes en cervezas artesanales.....	48
6.1.4	Identificación microscópica y conteo de las levaduras crecidas en el medio .....	49
6.1.5	Cultivo de las cepas en YPD .....	49
6.1.6	Ciclo de mutaciones con radiación UV .....	49
6.1.7	Evaluación en la producción de CO <sub>2</sub> y biomasa de las primeras cepas mutantes .....	49
6.1.8	Selección de las levaduras sobreproductoras de compuestos aromáticos.....	50
6.1.9	Microfermentaciones.....	50
6.1.10	Panel entrenado .....	52
6.1.11	Elaboración de la cerveza.....	52
6.1.12	Análisis de la fermentación.....	53
6.1.13	Envasado y acondicionamiento.....	53
6.1.14	Producto terminado .....	54
6.1.15	Evaluación sensorial de cerveza.....	54
6.2	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS DE LA FERMENTACIÓN A GRAN ESCALA	55
6.3	DIAGRAMA DE FLUJO .....	56
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>57</b>
7.1	AISLAMIENTO DE LEVADURAS PRESENTES EN CERVEZAS ARTESANALES .....	57

7.2	DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA DE LAS LEVADURAS CRECIDAS EN EL MEDIO .....	58
7.2.1	Levaduras de cerveza X.....	58
7.2.2	Levaduras de cerveza Y.....	59
7.2.3	Levaduras de cerveza Z.....	60
7.3	CICLO DE MUTACIONES CON RADIACIÓN UV .....	61
7.3.1	Curva de supervivencia .....	64
7.4	EVALUACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE CO <sub>2</sub> Y BIOMASA DE LAS CEPAS MUTANTES.....	68
7.4.1	Cepas de cerveza X: Primera fase de mutagénesis.....	68
7.4.2	Cepas de cerveza Y: Primera fase de mutagénesis.....	70
7.4.3	Cepas de cerveza Z: Primera fase de mutagénesis .....	73
7.4.4	Cepas de cerveza Y: Segunda fase de mutagénesis.....	75
7.4.5	Cepa de cerveza Z: Segunda fase de mutagénesis.....	80
7.5	SELECCIÓN DE CEPAS RESISTENTES A TFL.....	83
7.5.1	Cepa de cerveza Y: 21(130) .....	83
7.5.2	Cepa de cerveza Z: 30(130).....	86
7.6	MICROFERMENTACIONES.....	88
7.6.1	Evaluación sensorial con panel entrenado.....	90
7.7	MACROFERMENTACIONES .....	91
7.7.1	Análisis de pH durante la fermentación .....	93
7.7.2	Análisis de azúcares reductores durante la fermentación .....	93
7.7.3	Contenido de nitrógeno libre durante la fermentación .....	95
7.8	MEDICIÓN DE COLOR Y ESPUMA EN EL PRODUCTO TERMINADO .....	97
7.9	EVALUACIÓN SENSORIAL CON CONSUMIDORES .....	103
7.9.1	PCA correspondiente a mujeres .....	103
7.9.2	PCA correspondiente a hombres .....	105
7.9.3	Análisis de resultados de PCA .....	107
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>109</b>
<b>9.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>110</b>
<b>10.</b>	<b>APÉNDICE.....</b>	<b>119</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1 Composición química de los conos de lúpulo (Almaguer <i>et al.</i> , 2014).....	30
Tabla 2-2 Mutágenos frecuentemente utilizados en mutagénesis de levaduras (Steensels <i>et al.</i> , 2014) .....	42
Tabla 2-3 Estudios que reportan mejoras obtenidas por mutagénesis en levaduras.....	43
Tabla 7-1 Cinco cervezas propuestas para el aislamiento de cepas.....	57
Tabla 7-2 Aislamiento de cepas desde tres cervezas queretanas.....	57
Tabla 7-3 Aislamiento de cepas desde tres cervezas queretanas.....	58
Tabla 7-4 Treinta mutantes obtenidas con luz UV .....	62
Tabla 7-5 Valores de p para las mutantes de X comparadas con el control para la variable de respuesta “absorbancia” .....	68
Tabla 7-6 Valores de p para las mutantes de X comparadas con el control para la variable de respuesta “CO <sub>2</sub> producido” .....	70
Tabla 7-7 Valores de p para las mutantes de Y comparadas con el control para la variable de respuesta “absorbancia” .....	71
Tabla 7-8 Valores de p para las mutantes de Y comparadas con el control para la variable de respuesta “CO <sub>2</sub> producido” .....	72
Tabla 7-9 Valores de p para las mutantes de Z comparadas con el control para la variable de respuesta “absorbancia” .....	73
Tabla 7-10 Valores de p para las mutantes de Z comparadas con el control para la variable de respuesta “CO <sub>2</sub> producido” .....	74

Tabla 7-11 Valores de p para la mutante de Y comparada con el control para la variable de respuesta “absorbancia” .....	77
Tabla 7-12 Valores de p para la mutante de Y comparada con el control para la variable de respuesta “CO <sub>2</sub> producido” .....	78
Tabla 7-13 Valores de p para las mutantes de Y comparadas con el control para la variable de respuesta “absorbancia” .....	79
Tabla 7-14 Valores de p para las mutantes de Y comparadas con el control para la variable de respuesta “CO <sub>2</sub> producido” .....	80
Tabla 7-15 Valores de p para las mutantes de Z comparadas con el control para la variable de respuesta “absorbancia” .....	82
Tabla 7-16 Valores de p para las mutantes de Z comparadas con el control para la variable de respuesta “CO <sub>2</sub> producido” .....	82
Tabla 7-17 Valores de p para las mutantes de Y comparadas con el control para la variable de respuesta “absorbancia” .....	84
Tabla 7-18 Valores de p para las mutantes de Y comparadas con el control para la variable de respuesta “CO <sub>2</sub> producido” .....	85
Tabla 7-19 Valores de p para las mutantes de Z comparadas con el control para la variable de respuesta “absorbancia” .....	87
Tabla 7-20 Valores de p para las mutantes de Z comparadas con el control para la variable de respuesta “CO <sub>2</sub> producido” .....	87
Tabla 7-21 Características de las cepas mutantes analizadas .....	88
Tabla 7-22 Características de las cepas que se seleccionaron para las microfermentaciones .....	89

Tabla 7-23 Características de las cepas seleccionadas tras la evaluación sensorial.....	91
Tabla 7-24 Valores de p para las mutantes de Y comparadas con el control para la variable de respuesta “absorbancia”.....	98
Tabla 7-25 Valores de p para las mutantes de Z comparadas con el control para la variable de respuesta “absorbancia”.....	99
Tabla 7-26 Valores de p para las mutantes de Y comparadas con el control para la variable de respuesta “espuma”.....	101
Tabla 7-27 Valores de p para las mutantes de Z comparadas con el control para la variable de respuesta “espuma”.....	102

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1 Ventas globales de bebidas desde 2011 a 2016 (Statista, 2016) .....	18
Figura 2-2 Países que más consumen cerveza per cápita al año (L/año) (Payne, 2014).....	19
Figura 2-3 Etapas del proceso de elaboración de la cerveza (Harrison, 2009).....	20
Figura 2-4 Metabolismo de la levadura y producción de sabor (Parker, 2012).....	32
Figura 6-1 Diagrama de flujo del proyecto.....	56
Figura 7-1 Levaduras aisladas de cerveza X, observadas con microscopio óptico con aumento de 40x.....	59
Figura 7-2 Levaduras aisladas de cerveza Y, observadas con microscopio óptico con aumento de 40x.....	60
Figura 7-3 Levaduras aisladas de cerveza Z, observadas con microscopio óptico con aumento de 40x.....	61
Figura 7-4 Estación de mutaciones con exposición de luz UV de 254 nm.....	62
Figura 7-5 Levaduras de cerveza X expuestas a luz UV: (A) sin exposición, (B) 30'', (C) 1', (D) 1'30'', (E) 2', (F) 2'20'', (G) 2'40'', (H) 3' e (I) 3'20''. .....	64
Figura 7-6 Curva de supervivencia de las cepas X expuestas al ciclo de mutaciones.....	65
Figura 7-7 Levaduras de cerveza Y expuestas a luz UV: (A) sin exposición, (B) 30'', (C) 1', (D) 1'30'', (E) 2', (F) 2'20'', (G) 2'40'', (H) 3' e (I) 3'20''. .....	66
Figura 7-8 Curva de supervivencia de las cepas Y expuestas al ciclo de mutaciones.....	66
Figura 7-9 Levaduras de cerveza Z expuestas a luz UV: (A) sin exposición, (B) 30'', (C) 1', (D) 1'30'', (E) 2', (F) 2'20'', (G) 2'40'', (H) 3' e (I) 3'20''. .....	67
Figura 7-10 Curva de supervivencia de las cepas Z expuestas al ciclo de mutaciones .....	67

Figura 7-11 Comparación de medias de “absorbancia” de las 14 cepas mutantes versus la cepa control X .....	68
Figura 7-12 Comparación de medias de “CO <sub>2</sub> producido” de las 14 cepas mutantes <i>versus</i> la cepa control X .....	69
Figura 7-13 Comparación de medias de “absorbancia” de las 8 cepas mutantes versus la cepa control Y.....	71
Figura 7-14 Comparación de medias de “CO <sub>2</sub> producido” de las 8 cepas mutantes versus la cepa control Y .....	72
Figura 7-15 Comparación de medias de “absorbancia” de las 8 cepas mutantes versus la cepa control Z.....	73
Figura 7-16 Comparación de medias de “CO <sub>2</sub> producido” de las 8 cepas mutantes versus la cepa control Z.....	74
Figura 7-17 Mutantes de las cepas #16 (arriba) y #21 (abajo) seleccionadas en la fase 1 que fueron sometidas a una segunda mutación a tiempos de exposición de 1’ (izquierda) y 1’30’’ (derecha).....	76
Figura 7-18 Comparación de medias de “absorbancia” de la cepa número #16(1) versus la cepa control Y .....	77
Figura 7-19 Comparación de medias de “CO <sub>2</sub> producido” de la cepa #16(1) versus la cepa control Y.....	78
Figura 7-20 Comparación de medias de “absorbancia” de las cepas mutantes de #21 versus la cepa control Y.....	79
Figura 7-21 Comparación de medias de “CO <sub>2</sub> producido” de la cepas mutantes de #21 versus la cepa control Y.....	80

Figura 7-22 Mutantes de la cepa #30 seleccionada en la fase 1 que fueron sometidas a una segunda mutación a tiempos de exposición de 1'(izquierda) y 1'30'' (derecha). .....	81
Figura 7-23 Comparación de medias de “absorbancia” de la cepa mutante de #30 versus la cepa control Z.....	82
Figura 7-24 Comparación de medias de “CO <sub>2</sub> producido” de la cepa mutante de #30 versus la cepa control Z.....	82
Figura 7-25 Prueba de mutagénesis realizada con mutante de cepa Y a diferentes concentraciones del análogo de leucina: 0.86, 0.43 y 0.21 mM (de izquierda a derecha) ..	83
Figura 7-26 Comparación de medias de “absorbancia” de las cepas mutantes de #21 versus la cepa control Y.....	84
Figura 7-27 Comparación de medias de “CO <sub>2</sub> producido” de las cepas mutantes de #21 versus la cepa control Y.....	85
Figura 7-28 Comparación de medias de “absorbancia” de las cepas mutantes de #30 versus la cepa control Z.....	87
Figura 7-29 Comparación de medias de “CO <sub>2</sub> producido” de las cepas mutantes de #30 versus la cepa control Z.....	87
Figura 7-30 Fermentaciones en tubos Falcon dentro de la incubadora.....	90
Figura 7-31 Fermentaciones en recipientes de plástico de 5 L dentro de la incubadora.....	92
Figura 7-32 Valores de pH reportados para las 4 cepas durante la fermentación de cerveza .....	93
Figura 7-33 Contenido de azúcares reductores de las 4 cepas durante la fermentación de cerveza .....	94
Figura 7-34 Perfil de FAN de las 4 cepas durante la fermentación de cerveza.....	96

Figura 7-35 Comparación de medias de “absorbancia” de la cepa mutante de 21(21) versus la cepa control Y.....	98
Figura 7-36 Comparación de medias de “absorbancia” de la cepa mutante de 30(130) versus la cepa control Z.....	99
Figura 7-37 Comparación de medias de “espuma” producida por la cepa mutante de 21(21) comparada con la cepa control Y .....	101
Figura 7-38 Comparación de medias de “espuma” producida por cepa mutante de 30(130) comparada con la cepa control Z .....	102
Figura 7-39 Gráfica circular del atributo “Aceptabilidad General” .....	103
Figura 7-40 Gráfico de cargas factoriales con 3 Componentes Principales.....	104
Figura 7-41 Gráfica circular del atributo “Aceptabilidad General” .....	105
Figura 7-42 Gráfico de cargas factoriales con 3 Componentes Principales.....	106
Figura 10-1 Formato de consentimiento informado solicitado por el Comité de Bioética	120
Figura 10-2 Formato para prueba sensorial con escala JAR .....	121
Figura 10-3 Laboratorio de Evaluación Sensorial en el Parque Tecnológico de la UAQ.	122

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos ocho años en México, el consumo de cervezas de especialidad ha crecido en un 80% y se estima que éste continúe a la alza. Si bien el consumidor mexicano consume cervezas importadas, estas bebidas alcohólicas podrían ser reemplazadas por cervezas artesanales nacionales. Asimismo, a nivel mundial, la producción y uso de lúpulos aromáticos han crecido pues los consumidores jóvenes buscan ingerir cervezas con sabores intensos y afrutados más que cervezas amargas.

Además, los microproductores de cerveza locales hoy en día enfrentan el reto del acceso a los insumos (malta, levaduras o lúpulos), ya que éstos son importados de Europa. Por esta razón se requiere el desarrollo de materias primas en la región para poder abaratar costos. De los tres ingredientes de la cerveza antes mencionados, la levadura es el personaje principal en la elaboración de esta bebida ya que durante la fermentación ésta sintetiza compuestos de aroma y de sabor (ésteres, alcoholes superiores, cetonas, ácidos orgánicos, compuestos de azufre y aldehídos) los cuales determinarán la calidad final de la cerveza.

A través de la técnica de mutagénesis al azar es posible obtener cepas que le otorguen características específicas la cerveza y que son deseables tanto como para el productor como los consumidores (mayor producción de etanol, incremento de aromas y sabores específicos, menor producción de diacetilo, comportamiento específico de floculación, etc.).

El objetivo de esta investigación fue obtener una cerveza tipo Ale con sabores afrutados a bajo costo utilizando una levadura *Saccharomyces cerevisiae* modificada por mutagénesis. Lo anterior permite disminuir la importación de insumos como es el caso de la levadura.

En 2015, Trujillo aisló levaduras mutagenizadas de cervezas artesanales y obtuvo una cepa vigorosa y eficiente en la producción de biomasa y CO<sub>2</sub>, con cualidades positivas de sabor amargo y sabor alcohólico que fueron mostradas por medio de una evaluación sensorial. También, en el mosto fermentado, se mostró la presencia de ésteres por medio de un análisis cualitativo a través de cromatografía en capa fina.



En esta investigación se utilizó como base la metodología descrita por Trujillo (2015) y se realizaron ajustes tomando en cuenta las recomendaciones planteadas por ellos. Se aislaron tres cepas de levaduras a partir de tres cervezas artesanales mexicanas, entre ellas las cepas de la cerveza Misterium que tuvo resultados satisfactorios en la investigación pasada (Trujillo, 2015). Las cepas aisladas se hicieron crecer en medio YPD y fueron mutagenizadas por radiación UV. Las levaduras mutantes se inocularon sobre placas de YPD en agar y se hizo una primera selección de las cepas más vigorosas por su crecimiento colonial, posteriormente estas cepas se evaluaron por su producción de CO<sub>2</sub> y por último se incubaron en presencia de 5,5,5-trifluor-DL-leucina (TFL) para seleccionar a las mejores productoras de isoamil acetato como molécula indicadora de producción de compuestos volátiles. Estas cepas se usaron en la elaboración cerveza por microfermentación. Con el fin de evaluar la influencia de la cepa de levadura en la producción de sabores, se analizó la fermentación. Las cervezas fueron sometidas a evaluación sensorial por un panel de consumidores habituales de esta bebida con un enfoque en los atributos de sabor y aroma para analizar estos datos mediante las técnicas de Análisis de Componentes Principales y Mapeo de Preferencias.

## 2. ANTECEDENTES

La cerveza es una de las bebidas alcohólicas no destiladas más populares del mundo, además de ser uno de los productos biotecnológicos más antiguos en historia de la humanidad (Izydorczyk y Edney, 2003; Zarnkow, 2014). La cerveza ocupa el quinto lugar (compartido con los jugos) como la bebida más consumida a nivel mundial (Statista, 2016) (ver Figura 2-1):

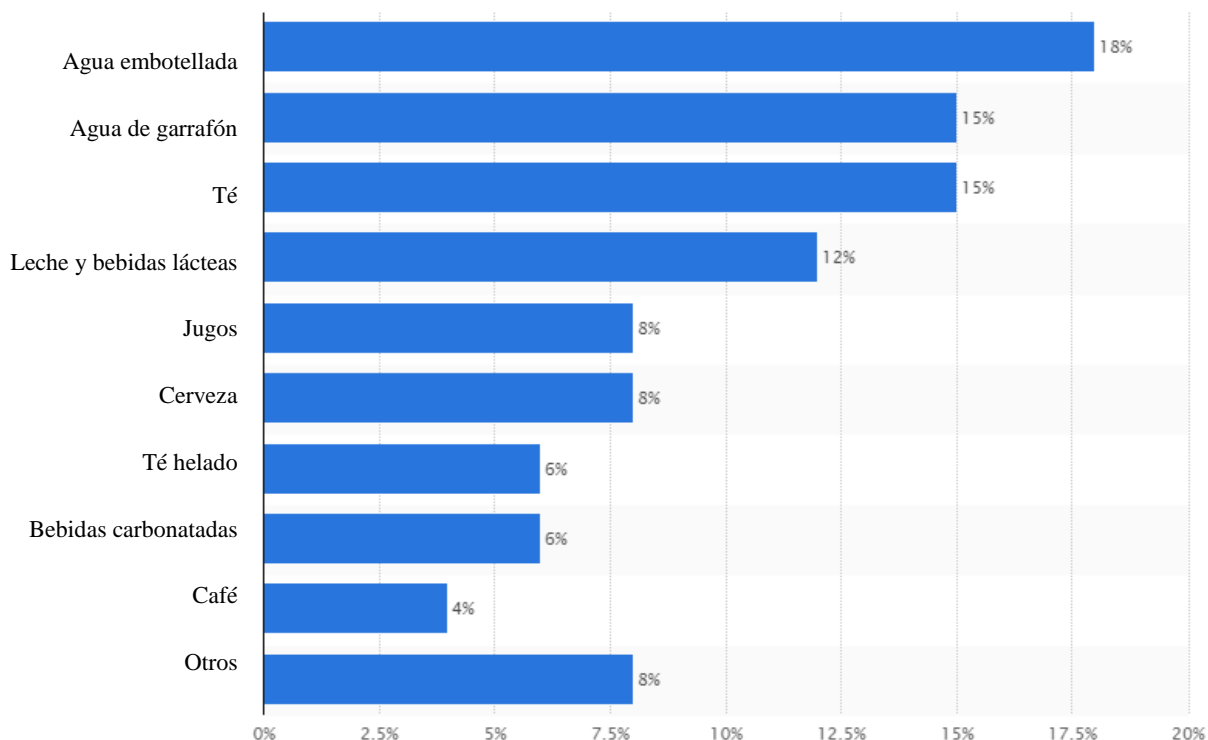


Figura 2-1 Ventas globales de bebidas desde 2011 a 2016 (Statista, 2016)

Con respecto al consumo de cerveza global *per cápita* por año, la República Checa se encuentra en primer lugar a nivel mundial; sus habitantes consumen 143 litros por año (Payne, 2014). Después de la República Checa, los habitantes que más consumen cerveza son los alemanes, austriacos, estonios y polacos (ver Figura 2-2). México es el lugar 31 en la lista de los países de mayor consumo per cápita de cerveza con 60 litros por año (Secretaría de Economía, 2015).

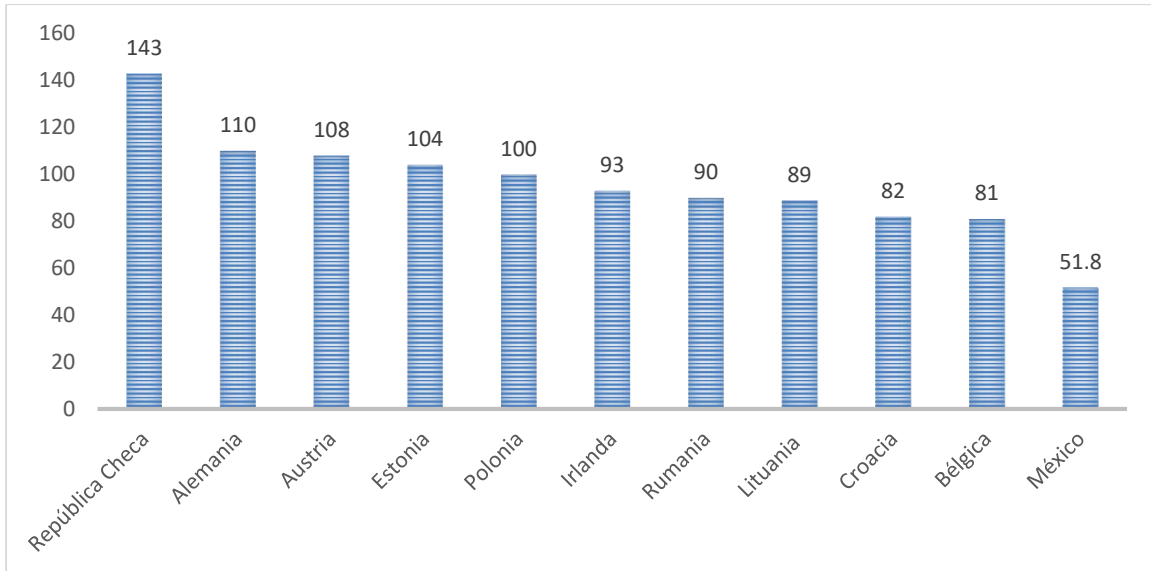


Figura 2-2 Países que más consumen cerveza per cápita al año (L/año) (Payne, 2014)

En México, las ventas totales de cerveza cada año alcanzan los veinte mil millones de dólares; el valor de las ventas ha aumentado alrededor del 5% anual debido principalmente al aumento de las exportaciones. México se ha convertido en el segundo mayor exportador de cerveza del mundo, después de Holanda, y es el sexto mayor productor y consumidor de cerveza a nivel mundial. En México se elaboran más de 8.6 mil millones de litros de cerveza al año (Burton, 2015).

## 2.1 Proceso de elaboración de la cerveza

A continuación se muestra el diagrama general de las etapas para la producción de cerveza (Figura 2-3):

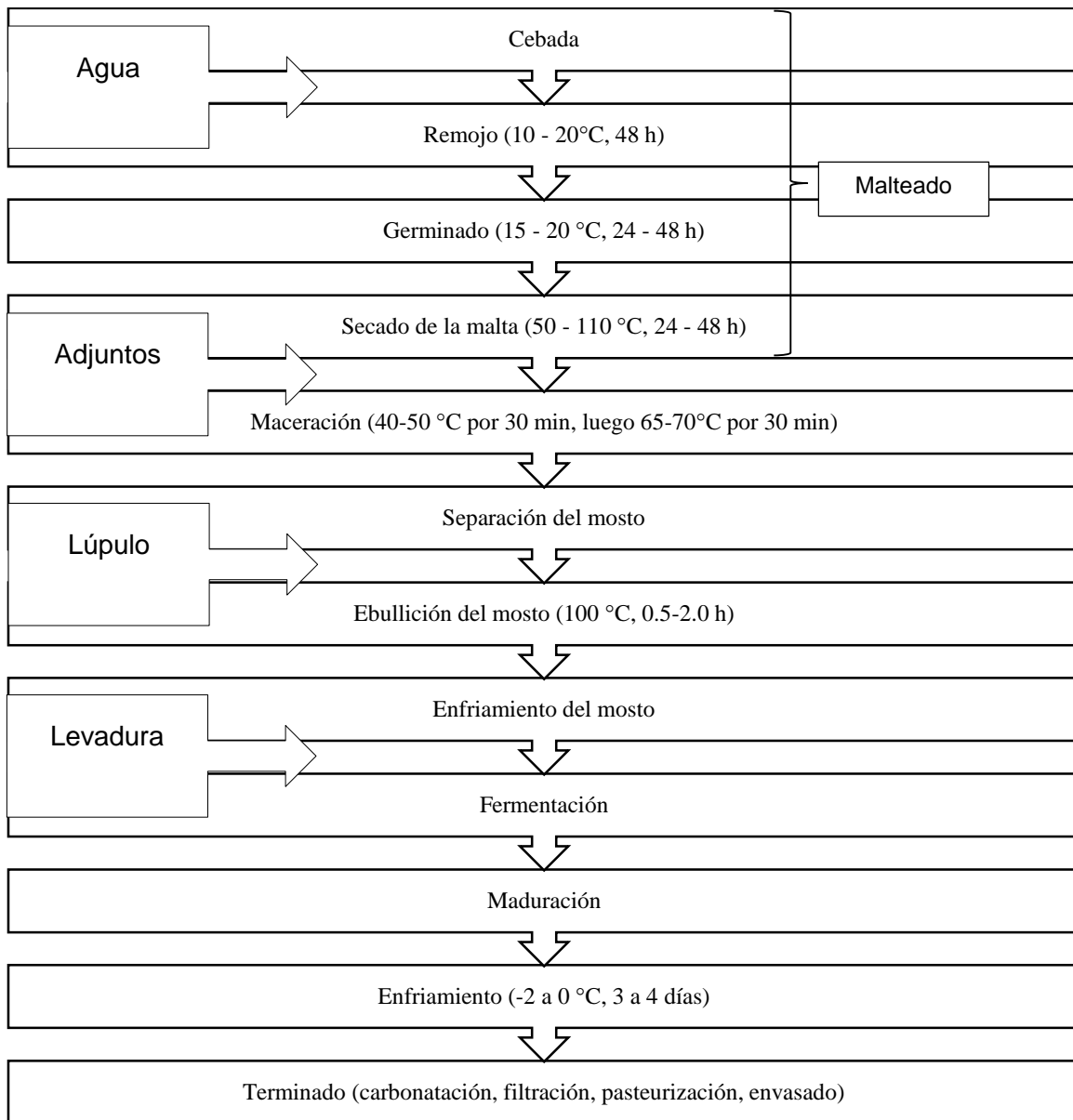


Figura 2-3 Etapas del proceso de elaboración de la cerveza (Harrison, 2009)

### 2.1.1 Malteado

Durante esta etapa, se prepara la cebada para la elaboración de cerveza por medio de una germinación controlada de la cebada en aire húmedo (MacLeod, 2004). En el malteado se pretende activar enzimas que van a hidrolizar proteínas y almidón durante la etapa de germinación y maceración. Estas enzimas permiten modificar la estructura del grano de

cebada debido a que se degrada la pared celular y se solubiliza la proteína con mínimo rompimiento del almidón (MacLeod, 2004; Stewart, 2013).

La etapa del malteado consiste en tres fases:

1. Remojo. En esta fase los granos de cebada se mojan y embeben el agua. El embrión y el endospermo se hidratan. Para iniciar la germinación, la cebada requiere humedad de 40%, lo cual se logra en uno o dos días según la temperatura del agua que generalmente se usa entre 40 a 45 °C. Para lo anterior, es indispensable airear para que el grano no se ahogue. El grano flotante se elimina y el remojo se detiene cuando las raíces empiezan a aparecer en el grano (Kent y Evers, 1994).
2. Germinación. En esta fase las enzimas endoglucanasas, pentosanasas, endoproteasas y amilasas se liberan de la capa de aleurona y lentamente degradan la estructura celular del endospermo, liberando los granos de almidón. La germinación debe ser rápida, vigorosa y uniforme. La humedad ambiental debe ser de 92% y es necesario mover el grano del fondo a la superficie de los contenedores, periódicamente para oxigenarlo; generalmente se usan volteadores en esta actividad. Si es necesario, se riega también. En esta etapa la humedad sube a 45% en cuatro días. Del lado extremo opuesto al de las raicillas sale la plúmula en la germinación; cuando esta ha alcanzado el largo del grano se ha obtenido la “malta verde” y es el momento de detener la germinación (Kent y Evers, 1994).
3. Secado. Para detener el crecimiento de la plántula y conservar la actividad enzimática, la germinación se interrumpe mediante el secado. Con esta fase se reduce la humedad del grano de 45 % hasta 4 o 5 % en unas 24 horas, mediante un proceso de dos pasos para evitar la inactivación de enzimas. El primer paso se lleva a cabo a temperaturas de 55 a 60 °C, hasta llegar a 12% de humedad; en el segundo paso, se utilizan temperaturas entre 65 y 75 °C para alcanzar 4 o 5% de humedad (Kent y Evers, 1994).

Posterior al secado y tostado, se hace una limpieza del grano para eliminar raicillas, plúmulas y fragmentos. Finalmente, la malta se somete a una maduración, que consiste en almacenarla a temperatura ambiente durante cuatro a seis semanas, para asegurar que no

continúen las reacciones en el interior de grano, lo cual reduciría la calidad de la malta al utilizarla (MacLeod, 2004).

### 2.1.2 Maceración

La malta contiene carbohidratos, compuestos de celulosa insoluble, hemicelulosa soluble, dextrinas, almidón y azúcares. El almidón que representa el 50 a 60% del peso de la malta, está compuesto de amilosas que se degradan durante la maceración a maltosa y maltotriosa, y amilopectinas que se descomponen en moléculas de glucosa (Verhagen, 2010).

La reacción más importante durante la maceración es la conversión de almidón a azúcares fermentables de bajo peso molecular y dextrinas no fermentables de alto peso molecular (Verhagen, 2010). En esta etapa las enzimas que hidrolizan los azúcares son  $\alpha$ -amilasa y  $\beta$ -amilasa; como resultado se forma una mezcla de azúcares, péptidos y aminoácidos (Harrison, 2009).

Durante el proceso de maceración se mezcla malta con agua en una olla o marmita, para incrementar la actividad de las  $\alpha$ -amilasas, la temperatura de la mezcla se mantiene entre 40 y 50 °C por una a dos horas. Posteriormente, la temperatura de la mezcla se aumenta a 65–70 °C para aumentar la actividad de las enzimas  $\beta$ -amilasas. Después de unas horas, el proceso se habrá completado y la temperatura finalmente se incrementa hasta 75 °C para inactivar las enzimas (Harrison, 2009).

En esta etapa pueden agregarse adjuntos obtenidos a partir de otros cereales como fuente alternativa de almidón. Adjuntos comunes incluyen arroz no malteado, maíz, trigo, sorgo y jarabes de glucosa, por ejemplo. El uso de adjuntos resulta en un estilo de cerveza diferente a las cervezas que incluyen malta en granos. Los adjuntos “diluyen” los sabores y colores provenientes de la malta y por ende, las cervezas con adjuntos tienden a ser de color pálido y sabor ligero en comparación con las cervezas elaboradas con malta (Parker, 2012).

En cuanto a la regulación del uso de adjuntos en cerveza, por ejemplo, Alemania está regida por la Ley de Pureza Bávara; otros países como Estados Unidos y Brasil exageran a menudo el uso de adjuntos. En Estados Unidos cervecerías comerciales pueden utilizar

hasta un 34% (p/p) de cereales no malteados del peso total del grano para moler (Pires y Brányik, 2015).

### 2.1.3 Filtración del mosto

Después de la maceración, se filtra el mosto el cual debe contener de 12 a 14% (p/p) de azúcares; este se llama mosto dulce (Verhagen, 2010). Este mosto contiene compuestos solubles como azúcares fermentables y oligosacáridos no fermentativos (Harrison, 2009). Cuando se elaboran cervezas artesanales se utilizan bolsas de tela en las cuales se colocan ingredientes como la malta en grano; de esta manera es posible separar el remanente de la malta de una sola vez.

### 2.1.4 Ebullición del mosto

El mosto filtrado se hace ebullicir de una a dos horas con el lúpulo que se le adiciona en esta etapa. La ebullición se realiza con los siguientes fines (Harrison, 2009; Verhagen, 2010):

- Esterilizar el mosto y darle estabilidad microbiológica
- Las proteínas y compuestos fenólicos de la malta forman complejos insolubles y precipitan. Esto incrementa la estabilidad coloidal del producto final.
- Inactivar enzimas si es que hubieran sobrevivido al calentamiento en la maceración
- Promueve la extracción de aceites esenciales y resinas del lúpulo. Durante la ebullición del mosto se logra la conversión (isomerización) de los  $\alpha$ -ácidos a  $\alpha$ -iso-ácidos (principales compuestos que le dan el amargor a la cerveza) (Verhagen, 2010). Sin embargo, al agregar el lúpulo al inicio de la ebullición, el aroma de los ácidos esenciales se volatiliza (Parker, 2012). Para dar el sabor y aroma característico del lúpulo, se adiciona al mosto diez minutos antes de que termine la ebullición. Alternativamente, se agrega lúpulo después de la fermentación directamente para lograr el sabor típico de cerveza inglesa tipo Ale. Otra opción para conservar el sabor y aroma del lúpulo es agregar extractos o aceite de lúpulo a la cerveza ya madurada.

- El mosto se torna de color más oscuro por la formación de melanoidinas como resultado de las reacciones de los azúcares con aminoácidos, oxidación de polifenoles y caramelización de azúcares.
- Remover compuestos volátiles indeseables (compuestos azufrados, aldehídos, hidrocarburos).
- Evaporar el agua y concentrar el mosto.

#### 2.1.5 Enfriamiento y clarificación del mosto

El mosto se filtra para retirar sólidos, proteínas precipitadas, lúpulo, granos, etc. Posteriormente se enfría y se transfiere a un tanque de fermentación (Verhagen, 2010).

#### 2.1.6 Fermentación

Para inducir la fermentación, se inocula el mosto con la levadura específica para la cerveza que se desea obtener. La velocidad de fermentación dependerá de la temperatura de la fermentación. Para elaborar cerveza tipo Ale, se utiliza levadura de alta fermentación, este microorganismo fermenta de 16-22 °C durante cinco a seis días. Por el contrario, para la cerveza tipo Lager se utiliza levadura de baja fermentación, en este caso esta se incubaba a temperaturas de 6-16 °C durante dos a tres semanas para fermentar el mosto (Parker, 2012).

Durante la fase de fermentación, la levadura convierte los azúcares fermentables en el mosto (glucosa, maltosa y maltotriosa) en alcohol, dióxido de carbono y aproximadamente 600 compuestos que imparten sabor; estos compuestos son ésteres, aldehídos y alcoholes. Después de la fermentación se obtiene una cerveza “inmadura” la cual no está lista para su consumo y contiene compuestos también indeseables que durante el período de maduración se harán menos intensos y otros desaparecerán (Verhagen, 2010; Parker, 2012).

#### 2.1.7 Maduración

Durante la fase de maduración, la cerveza desarrolla su sabor, color y cuerpo característicos. En la elaboración tradicional de cerveza, la etapa de maduración de la bebida se lleva a cabo mientras se almacena ésta a temperatura de 0–2 °C durante varias semanas.



Las cervezas tipo Lager se hacen madurar por un periodo de tiempo mayor que las cervezas tipo Ale (Harrison, 2009).

Los compuestos diacetilo (sabor a mantequilla) y 2-3, pentanediona (aroma a toffee, mantequilla) son cetonas y metabolitos resultantes de la fermentación del mosto; estos dos compuestos son indeseables en cervezas lager mientras que en cervezas estilo English Ale se buscan producir. Estas cetonas son supervisadas durante la fase de maduración, de manera que cuando se hayan disminuido a una concentración aceptable, la cerveza estará lista para su filtración y envasado (Parker, 2012; Liu, 2015).

#### 2.1.8 Acondicionamiento de la cerveza

Con el fin de lograr la estabilización de la cerveza se puede aplicar un tratamiento de acondicionamiento el cual consiste en colocar la cerveza a temperaturas de -2 a 0 °C mínimo durante tres días. En esta etapa se precipitarán algunas levaduras presentes, proteínas, y sólidos (Harrison, 2009).

Con respecto a las etapas subsecuentes, la cerveza puede pasar o no por otros procedimientos dependiendo del tipo de cerveza que el productor desee obtener (Harrison, 2009).

#### 2.1.9 Carbonatación

El dióxido de carbono es un componente de gran importancia en la cerveza el cual le imparte brillo, “sensación en la boca” y nitidez que está asociada a sus propiedades de gas ácido. La concentración de CO<sub>2</sub> en la cerveza para la venta se controla cuidadosamente para asegurar que los consumidores puedan beber un producto consistente. Las cervezas que carecen de dióxido de carbono, en particular las cervezas lager, son opacas y sin vida, se dice que son planas. El dióxido de carbono es el gas producido de forma natural en la fermentación primaria y fermentación secundaria y es aquel que se añade a la cerveza a través de la carbonatación (Briggs *et al.*, 2004).

Después de la fermentación secundaria, todos los procesos deben ser diseñados para mantener dióxido de carbono disuelto en la cerveza; por lo tanto la cerveza se debe mantener

fría y bajo la presión adecuada de dióxido de carbono para evitar la liberación de gas (Briggs *et al.*, 2004).

El nivel final de CO<sub>2</sub> es ajustado a 0.45–0.52% en botellas, latas o barriles de cerveza. Un método alternativo a la carbonatación es adicionar levadura fresca a la cerveza con el fin de que ocurra una segunda fermentación, no obstante, esta técnica presenta dificultad en el control de CO<sub>2</sub> de lote a lote. Posterior a la carbonatación, se puede pasteurizar la cerveza si el productor así lo desea con el fin de inactivar los microorganismos presentes (Miller, 1988; Harrison, 2009).

#### 2.1.10 Filtración de la cerveza

El objetivo de la filtración es eliminar la turbidez que pueda estar presente en la cerveza procedente de material proteico o la levadura que permanece en suspensión y también para remover microorganismos deterioradores, estabilizando así la cerveza (Zarnkow, 2014).

La clarificación artificial se lleva a cabo por filtración o centrifugación. A continuación se muestran tres procesos, se puede elegir uno o combinar con otro(s) (Wunderlich y Bach, 2009):

1. Las partículas gruesas se van hacia el fondo de la bebida por medio de sedimentación o la fuerza centrífuga durante la centrifugación.
2. El efecto de tamizado retiene todas las partículas más grandes que el tamaño de poro del filtro. Las partículas del sedimento y coloides más grandes así como microorganismos deterioradores permanecen en la cerveza dependiendo del tamaño del poro.
3. Las partículas y sustancias disueltas también pueden ser eliminados por adsorción, método que se basa en la afinidad de las sustancias para filtrar material.

El grado de filtración y la intensidad de estabilización dependen de la vida de anaquel que se desee obtener en la cerveza. La filtración Kieselguhr (tierra de diatomea) por sí sola puede ser suficiente para una vida útil de dos meses. La estabilización a través de

PVPP (polivinilpirrolidona) y gel de sílice resulta en una vida de anaquel de seis meses. Además, fuera de Alemania, las proteínas pueden ser hidrolizadas con el uso de papaína (Wunderlich y Bach, 2009).

Las levaduras, bacterias y coloides se eliminan casi por completo de la cerveza en función de la placa de filtración seleccionada. Las placas de filtración pueden ser de fibras de celulosa de diferentes tipos de madera, tierra de diatomeas, perlita, fibras sintéticas y resinas que aumentan la estabilidad de los filtros. La PVPP elimina los polifenoles; esta se añade entre la placa de filtración y la tierra de diatomeas. El gel de sílica elimina proteínas y se aplica antes de la filtración (Wunderlich y Bach, 2009).

Recientemente, los filtros de membrana se han desarrollado debido a que la tierra de diatomea se está agotando y el manejo de sus residuos se ha vuelto más costoso. Las membranas consisten en poliéster, nylon, etc. y la filtración se basa en el tamizado en superficies de membrana; los filtros se pueden utilizar para filtración estéril siempre y cuando se elijan tamaños de poro definidos (Wunderlich y Bach, 2009; Zarnkow, 2014).

#### 2.1.11 Pasteurización

Con el objetivo de alargar la vida de anaquel de la cerveza enlatada o embotellada, se somete ésta a una pasteurización, la cual se lleva a cabo a 62 °C durante veinte minutos. Sin embargo, el tratamiento térmico impacta negativamente en las características organolépticas de la cerveza. Otra alternativa es pasteurizar de 71 a 75 °C por 15-30 segundos antes de envasar la bebida. También se puede pasteurizar “en frío” utilizando membranas de filtración (Harrison, 2009).

Si la cerveza no se pasteuriza, debe mantenerse en refrigeración para mantener la calidad y la vida de anaquel será de un mes aproximadamente. En caso de que la cerveza se pasteurice, la bebida mantendrá sus características organolépticas hasta por tres meses (Harrison, 2009).

## 2.2 Ingredientes

Como ya se ha comentado anteriormente, los ingredientes principales para elaborar cerveza son agua, una fuente de almidón (generalmente cebada malteada), lúpulo y levadura. A continuación se explicará a detalle cada uno de ellos y su aporte al sabor y aroma de la cerveza:

### 2.2.1 Agua

El agua es el ingrediente principal de la cerveza; representa el 92-95% de la cerveza. El agua debe ser potable, libre de patógenos y previo a su uso debe someterse a análisis químicos y microbianos (Parker, 2012).

El contenido de minerales en el agua normalmente se ajusta dependiendo del tipo de cerveza que se elaborará, esto debido a que los minerales pueden aportar sabor a la cerveza (Verhagen, 2010). Por ejemplo, los sulfatos aumentan la dureza y sequedad de la cerveza, aunque también potencian el aroma a lúpulo. Además, altas concentraciones de hierro y manganeso pueden cambiar el color y el sabor de la cerveza. También, los iones de zinc favorecen el crecimiento de la levadura y la fermentación aunque son obstaculizados en presencia de nitritos (Pires y Brányik, 2015).

### 2.2.2 Fuente de carbohidratos (cebada malteada)

La fuente de carbohidratos en la cerveza proveerá el material fermentable y es la clave para determinar el sabor de una cerveza. El 90% de las cervezas se hacen con cebada (*Hordeum vulgare*) malteada. Se puede utilizar también trigo o sorgo (Stewart, 2013). Por cada litro de cerveza se utilizan 160 g de cebada malteada.

Para elaborar cerveza la cebada se hace germinar parcialmente, después se seca y, a veces, también se tuesta. La cebada es el principal ingrediente cuantitativo y funcional del mosto de la cerveza ya que durante la germinación de la cebada se producen y activan enzimas que transformarán los almidones en azúcares utilizables por la levadura en la fermentación posterior. Por otra parte, durante el malteado se modifica el endospermo y se liberan aminoácidos, azúcares, lípidos, compuestos azufrados y fenoles los cuales son los precursores de los compuestos de sabor en la cerveza (Parker, 2012).

Durante la etapa del secado y tostado de la cebada se obtendrán varios tipos de malta los cuales generarán diferentes características de color y sabor en la cerveza (Parker, 2012).

### 2.2.3 Lúpulo (*Humulus lupulus*)

Como se mencionó anteriormente, el lúpulo es otro ingrediente primordial en la producción de cerveza debido a su aporte de aroma, sabor amargo y estabilidad de la espuma de la bebida alcohólica. Se utiliza comúnmente de 0.5 a 2.0 g de lúpulo por litro de cerveza, dependiendo de la variedad, su contenido de ácidos amargos y el estilo de la cerveza (Verhagen, 2010).

El lúpulo es una planta trepadora tipo enredadera que se cosecha en zonas frías. *Humulus lupulus* es miembro de la familia Cannabinaceae. Se utiliza únicamente la planta femenina debido a que desarrolla la flor y que contiene las resinas que imparten el amargor característico a la cerveza (Almaguer *et al.*, 2014).

El lúpulo crece en zonas templadas (entre latitud 35 y 55). Actualmente los principales productores de lúpulo son Alemania, Estado Unidos, República Checa y China. El lúpulo es una planta perenne con plantas masculinas y femeninas, de la cual solo la planta femenina tiene uso en la industria cervecera. El crecimiento de lúpulo ocurre los meses de Abril y Agosto en el hemisferio norte y entre Octubre y Febrero en el hemisferio sur (Verhagen, 2010).

Existen diversas variedades de lúpulo, cuya clasificación depende de su composición de  $\alpha$ -ácidos. Estas variedades se encuentran disponibles comercialmente; las variedades están clasificadas en grupos dependiendo de su uso en la cervecería. Según su uso, el lúpulo se clasifica en tres grupos (Meier, 2017):

- ✓ Lúpulo de ligero aroma
- ✓ Lúpulo aromático
- ✓ Lúpulo amargo o de alto contenido de  $\alpha$ -ácidos

Los compuestos más importantes del lúpulo son las resinas y los aceites esenciales (Tabla 2-1), éstos se encuentran dentro de los conos de las flores de la planta femenina, en las glándulas de lupulina (Verhagen, 2010). Las resinas representan del 15-30% de los conos secos. Los aceites esenciales representan el 0.5 – 3.0% de los conos. Otros compuestos aromáticos presentes e importantes en el lúpulo son los polifenoles que representan el 4% de los conos (Almaguer *et al.*, 2014).

Tabla 2-1 Composición química de los conos de lúpulo (Almaguer *et al.*, 2014)

<b>Constituyente</b>	<b>Cantidad (%)</b>
Resinas totales	15 - 30
Aceites esenciales	0.5 – 3.0
Proteínas	15
Monosacáridos	2
Polifenoles (taninos)	4
Pectinas	2
Aminoácidos	0.1
Ceras y esteroides	Trazas - 25
Cenizas	8
Humedad	10
Celulosa, etc.	43

#### 2.2.4 Levadura

Es el microorganismo responsable de la fermentación en la cerveza. La levadura fermenta los azúcares fermentables (glucosa, maltosa y maltotriosa) a alcohol, dióxido de carbono y cerca de seiscientos compuestos de sabor en cuatro o cinco días (Parker, 2012).

El carácter final de la cerveza dependerá en especial de la composición del mosto y de la cepa de levadura utilizada (Parker, 2012).

Los productores de cerveza dividen a las levaduras en dos grupos:

1. Levadura Ale (*Saccharomyces cerevisiae*), fermenta a temperaturas 6-16 °C, flota en la parte superior del tanque. Necesita aproximadamente una semana para fermentar y otra semana para madurar.
2. Levadura Lager (*Saccharomyces pastorianus*), fermenta a temperaturas de 16-22 °C, fermenta en el fondo del tanque. La obtención de la cerveza es lenta (requiere dos semanas para fermentar y dos semanas o más para madurar) (Verhagen, 2010; Parker, 2012).

De los aproximadamente mil compuestos de sabor de la cerveza que se mencionaron anteriormente, la levadura producirá cerca de seiscientos, por lo que es la fuente más importante de compuestos que imparten sabor a la cerveza. Los productos de aroma y sabor del metabolismo de la levadura incluyen alcoholes superiores, ésteres, dióxido de carbono, acetaldehído, ácidos orgánicos y compuestos azufrados (Parker, 2012). En la Figura 2-4 se muestra un esquema de los compuestos de sabor producidos por la levadura durante la fermentación:

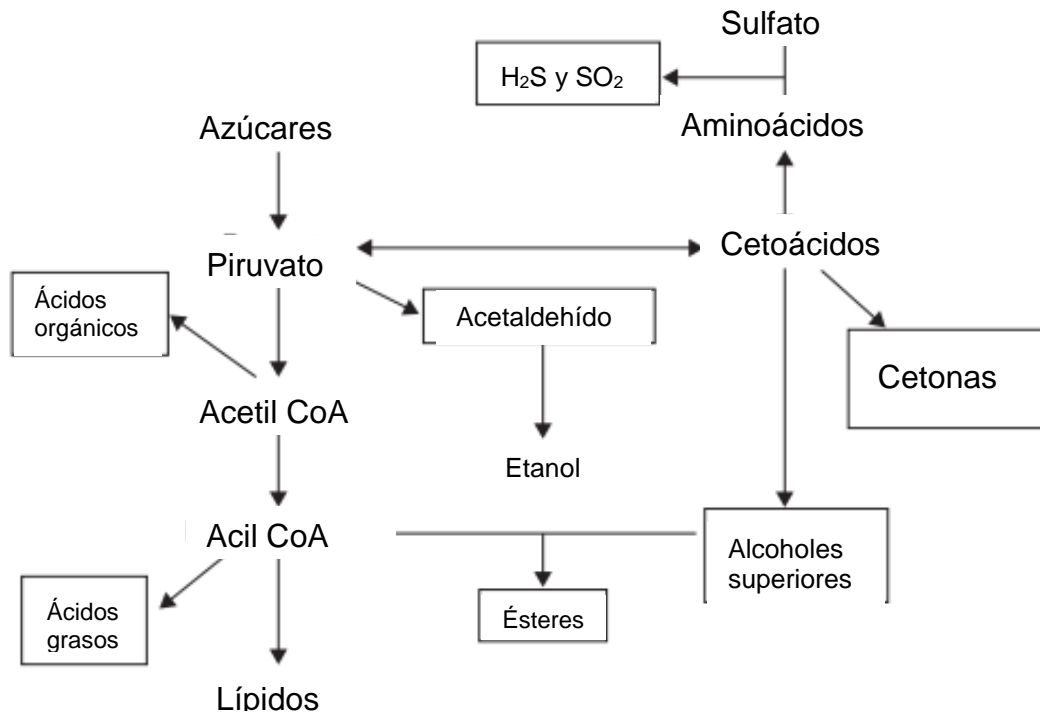


Figura 2-4 Metabolismo de la levadura y producción de sabor (Parker, 2012)

#### 2.2.4.1 Formación de compuestos volátiles durante la fermentación de la cerveza

##### 2.2.4.1.1 Alcoholes superiores

Los alcoholes superiores son una parte importante de los subproductos formados durante la fermentación del mosto ya que aportan al sabor final de la cerveza. Por el contrario, el etanol, siendo el producto mayoritario de la fermentación, tiene un impacto pequeño en el sabor final de la cerveza. Los alcoholes superiores de mayor importancia en el aroma de la cerveza son: propanol (aroma a solvente), isobutanol (aroma alcohólico), isoamil alcohol (aroma afrutado, dulce) y el 2-fenil etanol (aroma a rosas, floral) (Saerens *et al.*, 2008b).

La síntesis de alcoholes superiores involucra la descarboxilación de  $\alpha$ -cetoácidos para formar aldehídos, seguida de la reducción de los aldehídos para producir los correspondientes alcoholes. Los  $\alpha$ -cetoácidos se forman a través de dos rutas principales: la ruta catabólica de Ehrlich donde ocurre degradación de aminoácidos a alcoholes y la ruta anabólica que involucra la síntesis *de novo* de aminoácidos de cadena ramificada a partir de glucosa



(Saerens *et al.*, 2008b). La ruta de Ehrlich es predominante hasta el momento que no existen más aminoácidos en el medio de fermentación (Inoue y Kashihara, 1995).

El consumo de aminoácidos por la levadura se realiza para el crecimiento celular durante la etapa inicial de la fermentación, produciéndose varios compuestos volátiles como alcoholes superiores y aldehídos (Inoue y Kashihara, 1995). Al agotarse los aminoácidos, la formación de alcoholes superiores se puede lograr a través de la biosíntesis de aminoácidos, la cual ocurre a partir del metabolismo de los azúcares fermentables. Por ende, la concentración final de alcoholes superiores es determinada por la eficiencia de consumo de sus correspondientes aminoácidos y la utilización de los azúcares fermentables (Shen *et al.*, 2004). Al final del crecimiento celular, la producción de alcoholes superiores concluye y la concentración de algunos de estos compuestos decrece. Dado lo anterior, el crecimiento celular es mejor indicador del sabor de la cerveza que el consumo de azúcares fermentables del medio de fermentación (Inoue y Kashihara, 1995).

#### 2.2.4.1.2 Ésteres

Aunque los ésteres están presentes en cantidades traza en la cerveza, estos compuestos tienen gran impacto en su perfil de sabor. Los ésteres activos más importantes que aportan sabor a la cerveza son: etil acetato (aroma a solvente), isoamil acetato (aroma a plátano), etil hexanoato (aroma a manzana dulce), etil octanoato (aroma a manzana ácida) y 2-fenil etil acetato (aroma a rosas) (Saerens *et al.*, 2008b). De los compuestos anteriores, el isoamil acetato es considerado el mayor contribuidor al sabor afrutado de la cerveza, debido a que se encuentra en concentraciones por encima del límite de detección por humanos (Dufour *et al.*, 2003).

Los ésteres se pueden dividir en dos grupos: ésteres de acetato y etil ésteres de cadena mediana de ácidos grasos (MCFA son sus siglas en inglés) (Pires y Brányik, 2015):

- Ésteres de acetato: Se sintetizan a partir de acetato con etanol o un alcohol superior. Los ácidos orgánicos reaccionan con una coenzima A para formar una molécula de acil-CoA. La molécula de acil-CoA es altamente energética y en presencia de oxígeno puede ser  $\beta$ -

oxidada en unidades más pequeñas (acetil-CoA) en la mitocondria. La gran mayoría de acetil-CoA producido por las células de levadura proviene de la descarboxilación oxidativa del piruvato. Durante la respiración, el acetil-CoA emigra a las mitocondrias para entrar al ciclo de Krebs y producir niveles altos de ATP. A lo largo de la fermentación, el acetil-CoA se esterifica enzimáticamente con un alcohol superior para formar los ésteres de acetato (Pires y Brányik, 2015).

- Ésteres de etilo de cadena mediana de ácidos grasos (MCFA): El etanol forma el radical alcohol y la parte del ácido es un MCFA.

A partir de la formación de ésteres de acetato, las cadenas más largas de acil-CoA se condensan enzimáticamente con etanol para formar ésteres de etilo MCFA (Pires y Brányik, 2015).

Aunque el perfil de ésteres depende de la cepa de la levadura, la regulación de estos compuestos por medio de factores ambientales muestra una tendencia consistente para varias cepas. Por ejemplo, se puede incrementar los niveles de ésteres de acetato a través de mostos de alta gravedad específica; por el contrario, se ha observado que los niveles de ésteres decrecen a mayor oxigenación del mosto y también cuando existen niveles altos de ácidos grasos insaturados (Saerens *et al.*, 2008b).

#### 2.2.4.1.3 Ácidos

Los ácidos pueden ser ácidos orgánicos (ácidos volátiles o no volátiles) o inorgánicos (ácido fosfórico). Algunos ácidos volátiles son ácido acético, butírico, caproico, caprílico, cáprico y láurico; ácidos no volátiles incluyen ácido málico, cítrico, pirúvico, succínico,  $\alpha$ -cetoglutárico y láctico. La mayoría de los ácidos se originan a partir del mosto y otros provienen de la autólisis y metabolismo de la levadura; estos metabolitos se originan durante la fermentación y maduración de la cerveza (Liu, 2015).

#### 2.2.4.1.4 Aldehídos

Se generan cuando los alcoholes se oxidan o provienen de ácidos grasos y lípidos presentes en la malta; los aldehídos contribuyen de manera importante al sabor de la cerveza

(Verhagen, 2010). Algunos aldehídos importantes son acetaldehído, hexanal, furfural, 2-metilpropanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, 3-metiltiopropional, etc. Es importante mencionar que no todos estos compuestos los sintetiza la levadura (Liu, 2015).

Los aldehídos se obtienen durante la fermentación del mosto; la levadura reduce los aldehídos en el mosto a sus correspondientes alcoholes. También se generan aldehídos químicamente mientras se madura la cerveza. (Liu, 2015)

#### 2.2.4.1.5 Cetonas

Las cetonas son producto del metabolismo de aminoácidos (Parker, 2012). Algunas de las cetonas presentes en la cerveza son diacetilo, 2,3-pentanediona, 2-nonanona,  $\beta$ -damascenona y  $\beta$ -ionona. Estos compuestos son indeseables en cervezas tipo Lager aunque deseables en pequeñas cantidades en cerveza tipo Ale (Liu, 2015).

La producción de los compuestos diacetilo y 2,3-pentanediona se puede regular a partir de la composición del mosto, método de fermentación y modificación genética de la levadura. Asimismo, para disminuir la concentración de estos compuestos en el producto final, se puede restringir el ingreso de oxígeno y adicionar algunos aminoácidos ramificados como la valina (Liu, 2015).

#### 2.2.4.1.6 Compuestos volátiles de azufre

La levadura también produce compuestos azufrados durante la fermentación. Algunos compuestos son metanetiol, etanetiol, sulfuro de dimetilo, metional, etc. Estos serán deseables en baja cantidad (por ejemplo en cervezas inglesas tipo Ale); si hay alta concentración de estos, la cerveza será indeseable, dado que los aromas característicos de estos compuestos son olor a huevo, col, cebolla, ajo, etc. (Parker, 2012; Liu, 2015)

#### 2.2.4.2 Factores que influyen en la producción de compuestos volátiles en cerveza

Los factores que afectan la producción de compuestos volátiles se pueden clasificar en dos categorías:

- ✓ Composición del medio de fermentación

## ✓ Condiciones de fermentación

### 2.2.4.2.1 Composición del medio de fermentación

#### 2.2.4.2.1.1 Gravedad específica del mosto

La gravedad específica refleja la cantidad de azúcares fermentables presentes en el mosto. Generalmente se utiliza la unidad °P (grados plato), que se define como la cantidad de sólidos en 100 gramos de mosto (densidad del mosto o cerveza en términos del porcentaje de extracto por peso) (Pires y Brányik, 2015).

El uso de mostos de alta gravedad puede aumentar la capacidad de la cervecería hasta en un 20-30% sin ninguna inversión significativa en equipos y, además mejora la turbidez y la suavidad de la cerveza (Pires y Brányik, 2015). Por otro lado, el uso de mostos de alta gravedad específica (HG) puede desencadenar en una cerveza con sabor desequilibrado; uno de los problemas más comunes es el exceso en la producción de ésteres de acetato obteniendo variaciones en los sabores afrutados así como aroma a solvente (Peddie, 1990).

Saerens *et al.* (2008b) han realizado investigaciones con cepas para cerveza tipo Ale y Lager aumentando la gravedad específica del mosto. Se observó que aunque todos los alcoholes superiores se incrementaron, después de realizar la dilución para alcanzar el contenido de etanol estándar (5,1% v/v), sólo las fermentaciones llevadas a cabo por la cepa tipo Ale quedaron con niveles altos y desequilibrados de alcoholes superiores. Al mismo tiempo, todos los ésteres de acetato fueron sobreproducidos por las dos cepas tipo Lager y tipo Ale (Saerens *et al.*, 2008b).

#### 2.2.4.2.1.2 Perfil de azúcar

El tipo de azúcares presentes en el mosto puede influir en el perfil aromático de la cerveza final, por ejemplo, los mostos ricos en glucosa y fructosa (rápidamente asimilables), generan cervezas con contenidos más altos de ésteres que aquellos ricos en maltosa (Pires y Brányik, 2015). Mostos con alto contenido en glucosa resultan en una mayor producción de

isoamil acetato y etil acetato y una mayor actividad de la enzima alcohol acetiltransferasa (AAT) (Yoshioka y Hashimoto, 1984).

Las fermentaciones de mostos de 21 y 24 °P enriquecidos con jarabe de maltosa realizados por Piddocke *et al.* (2009), produjeron menos ésteres de acetato en comparación con las fermentaciones llevadas a cabo con mostos de jarabe enriquecidos con glucosa. Se cree que durante la fermentación de la maltosa, existe una inhibición de la actividad enzimática de alcohol acetiltransferasa por los ácidos grasos insaturados acumulados en la membrana celular, algo que no ocurre durante la fermentación de la glucosa (Pires y Brányik, 2015).

En cuanto a la formación de alcoholes superiores, no se han encontrado diferencias considerables entre la fermentación de mostos altos en glucosa o mostos altos en maltosa (Verstrepen *et al.*, 2003).

#### 2.2.4.2.1.3 Nitrógeno amino libre en el mosto (Free amino nitrogen – FAN)

Aunque una amplia gama de compuestos de nitrógeno se disuelven en el mosto, la levadura de cerveza sólo puede asimilar las moléculas más pequeñas, llamadas FAN. Los compuestos FAN influyen en el aroma de la cerveza; la absorción de aminoácidos se requiere para formar alcoholes superiores a través de la ruta de Ehrlich. Además, el tipo y la cantidad de aminoácidos a ser degradados llevarán a la levadura a diferentes respuestas y, en consecuencia, a un perfil de aroma final de la cerveza (Pires y Brányik, 2015).

Se ha observado que el tratamiento del mosto con proteasas aumenta la cantidad final de FAN y, en última instancia, aumenta la producción de alcoholes superiores y ésteres por la levadura para elaborar cerveza, ya sea en mostos normales o de alta gravedad específica (Pires y Brányik, 2015). Además, la adición de aminoácidos de cadena ramificada como valina, leucina e isoleucina al mosto de fermentación, aumenta la formación de sus respectivos alcoholes superiores isobutanol, alcohol isoamílico, y alcohol amílico (Procopio *et al.*, 2013). Recientemente, Procopio *et al.* (2013) demostraron el aumento de alcoholes

superiores en cerveza tipo Ale al agregar al mosto los aminoácidos leucina, isoleucina, valina, histidina, glutamina y prolina.

Existen algunas cervecerías comerciales que continuamente buscan métodos alternativos para disminuir los costos de producción. El uso de granos sin maltear como adjuntos es una estrategia, sin embargo, éstos son pobres en FAN y no contribuyen a la actividad enzimática durante la maceración. Por lo tanto, mientras más grande sea la proporción de granos añadidos sin maltear en la receta, el mosto será más pobre en FAN. La levadura tratará de compensar esta falta de FAN por medio de la vía anabólica de aminoácidos a partir de los hidratos de carbono, lo que resulta inevitablemente en una mayor formación de alcoholes superiores, aunque de manera anormal (Pires y Brányik, 2015).

En general, los requerimientos de FAN para un mosto de 12 °P están en el rango de 140 – 150 mg/L mientras que los mostos con más de 18°P requieren FAN de 280 mg/L (Lei *et al.*, 2012).

#### 2.2.4.2.1.4 Oxigenación del mosto

La aeración u oxigenación del mosto es un factor de control en la producción de ésteres durante la fermentación de cerveza (Verstrepen *et al.*, 2003). La adición de oxígeno al medio favorece el crecimiento celular, incrementando la producción de alcoholes superiores. Por el contrario, la formación de ésteres volátiles es suprimida por la disolución excesiva de oxígeno en el medio de fermentación. Se ha demostrado que el efecto negativo es debido a la supresión de expresión genética de la enzima alcohol acetil transferasa (AAT) (Dufour *et al.*, 2003; Verstrepen *et al.*, 2003).

Sin embargo, cuando el contenido de oxígeno en el mosto es extremadamente bajo, la concentración de ésteres decrece debido al pobre crecimiento de la levadura. Por lo tanto, existe un nivel óptimo de oxígeno para la producción de ésteres (Verstrepen *et al.*, 2003). Calderbank y Hammond (1994) encontraron que para ciertas condiciones de fermentación, una concentración de 0.75 mg/L de oxígeno disuelto en el mosto resultó en una fermentación incompleta y con un crecimiento de la levadura retardado. En contraste, una concentración

de 5.4 mg/L de oxígeno disuelto produjo la máxima cantidad de isoamil acetato. A concentraciones de oxígeno disuelto mayores a 5.4 mg/L, se observó una disminución en la formación de ésteres.

#### 2.2.4.2.1.5 Contenido de lípidos

Al aumentar la cantidad de lípidos en el mosto, decrece la producción de ésteres. Se ha observado que los ácidos grasos insaturados (AGI) libres (por ejemplo, ácido oleico y linolénico) son los que afectan la síntesis de ésteres de acetato (Pires y Brányik, 2015). Los ácidos grasos insaturados esterificados (triglicéridos o fosfolípidos) y los ácidos grasos saturados no tienen ningún efecto sobre los ésteres (Dufour *et al.*, 2003; Saerens *et al.*, 2008a).

Entre los factores implicados para explicar la reducción de ésteres en presencia de ácidos grasos insaturados están la modificación de la permeabilidad de la membrana celular y la reducción del acetyl CoA disponible para la síntesis de ésteres (Dufour *et al.*, 2003). Estudios más recientes demuestran que los AGI reprimen directamente el gen de transcripción para la producción de la enzima alcohol acetiltransferasa (AAT) (Verstrepen *et al.*, 2003). De hecho, la represión de la expresión del gen ATF1 (gen codificador de la enzima AAT) al adicionar diferentes AGI (18:1, 18:2, 18:3), es similar a la causada por la oxigenación del mosto (Dufour *et al.*, 2003).

#### 2.2.4.2.1.6 Zinc

El zinc es un nutriente mineral importante para la levadura debido a que tiene funciones catalíticas y estructurales. Cuando se adiciona zinc al medio de fermentación, la producción de ésteres se incrementa ya que promueve la formación de alcoholes superiores. Se ha mostrado que el zinc estimula el rompimiento de los  $\alpha$ -cetoácidos en sus correspondientes alcoholes superiores (Dufour *et al.*, 2003).

#### 2.2.4.2.2 Condiciones de fermentación

##### 2.2.4.2.2.1 Agitación

La agitación estimula el crecimiento de la levadura debido a que incrementa el acceso de los nutrientes y disminuye la sobresaturación del CO<sub>2</sub> en el medio de fermentación. Debido a que se estimula el crecimiento de la levadura, también aumenta la síntesis de alcoholes superiores. Lo anterior no se observa en el caso de los ésteres (Dufour *et al.*, 2003).

#### 2.2.4.2.2.2 Temperatura de fermentación

Un control preciso de la temperatura es un parámetro crítico para lograr el éxito de fermentación de la cerveza. Landaud *et al.* (2001) mostraron que la temperatura aumenta la velocidad de fermentación, la productividad y concentración final de alcoholes superiores independientemente de la presión aplicada (1.5 a 1.8 bar).

Además, Saerens *et al.*, (2008b) obtuvieron mayores niveles de propanol, isobutanol, alcohol isoamílico, y fenil etanol cuando se aumentó la temperatura de fermentación utilizando dos cepas de levadura diferentes. Estos autores demostraron que a pesar de que las temperaturas más altas promueven la expresión de los genes BAT1 y BAT2 (codifican transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada) o BAP2 (codifica permeasas de aminoácidos de cadena ramificada, es decir, interviene en el consumo de Leu, Ile y Val), solamente BAT1 puede ser correlacionado con la concentración final de alcoholes superiores, en particular propanol (Saerens *et al.*, 2008b).

Debido a que la formación de alcoholes superiores depende de la temperatura (Landaud *et al.*, 2001), los cambios de temperatura pueden causar cambios en la disponibilidad de alcoholes superiores, los cuales son necesarios para la formación de ésteres. De hecho, un cambio en la temperatura de 10 a 12 °C puede aumentar la producción de ésteres hasta en un 75% (Pires y Brányik, 2015).

#### 2.2.4.2.2.3 Presión del fermentador

Con el aumento de la demanda del mercado, las cervecerías están cambiando continuamente los tamaños de reactores para la producción de cerveza. Los fermentadores largos (de hasta 12.000 hl) generan una presión hidrostática masiva que aumenta la concentración de CO<sub>2</sub> disuelto en la cerveza y, en consecuencia, un decremento en la



formación de alcoholes y ésteres (Shen *et al.*, 2004; Pires y Brányik, 2015). Los fermentadores a presión también aumentan la cantidad de CO<sub>2</sub> disuelto, reduciendo considerablemente la producción de ésteres y alcoholes superiores (Verstrepen *et al.*, 2003). Lo anterior sucede debido a que el CO<sub>2</sub> disuelto inhibe la descarboxilación del piruvato (precursor del acetil CoA) y disminuye el pH en el interior celular (Dufour *et al.*, 2003).

Además, se ha observado que las altas concentraciones de CO<sub>2</sub> en el mosto suprimen el crecimiento de la levadura. Esto se debe a que el acetil CoA es también un intermediario para la síntesis de ácidos grasos necesarios para la proliferación celular (Dufour *et al.*, 2003).

## 2.3 Estilos de cerveza

### 2.3.1 Ales

Son cervezas elaboradas con levaduras de alta fermentación a temperatura de bodega; estas cervezas tienen cuerpo con matices de frutas o especias y notas de lúpulo. Existen numerosas variedades de Ales entre las que se encuentran las amargas (bitter), suaves (mild), pálidas (Pale Ales), etc. (Beer Store, 2016). Las cervezas tipo Ale a menudo son más oscuras que las Lagers, que van desde el color dorado a ámbar rojizo. Las cervezas tipo Ale se distinguen por su sabor afrutado, acidez y agradable sensación de amargor (Beer Store, 2016). Algunos estilos de cerveza tipo Ale son English Pale Ale, India Pale Ale, Brown Ale, Sweet Stout / Cream Stout, entre otros.

### 2.3.2 Lagers

La palabra “lager” proviene de la palabra en alemán lagern que significa “almacenar” y se refiere al método de almacenamiento de la cerveza por varias semanas cerca de temperatura de refrigeración. Las cervezas lager son las cervezas más populares en el mundo y su sabor puede variar desde dulces hasta amargas, pálidas u oscuras, alta carbonatación y sabor a lúpulo desde nivel medio hasta alto (Beer Store, 2016). Algunas cervezas lager son Heller Bock, Pilsner, Münchner Dunkels, entre otras.

## 2.4 Modificaciones genéticas

Hoy en día los consumidores y productores de cerveza muestran resistencia a utilizar organismos genéticamente modificados para la producción de alimentos; dado lo anterior, investigadores se han dado a la tarea de obtener levaduras que no son genéticamente modificadas. Una estrategia es la mutación al azar: se irradia una población de células para incrementar su diversidad genética, posteriormente se cruzan las levaduras a fin de obtener mejores cepas. Este procedimiento se repite tantas veces hasta que las células muestran una mejora sustancial (Steensels *et al.*, 2012). A continuación se explica a detalle la técnica de mutagénesis:

### 2.4.1 Mutagénesis

Debido a que las mutaciones espontáneas ocurren lentamente, las levaduras son tratadas con mutágenos para incrementar la frecuencia de mutantes. Dos mutágenos comunes de levaduras son etil metanosulfonato (EMS) y luz ultravioleta (UV) (Tabla 2-2). La mutagénesis puede incrementar la frecuencia de mutación hasta cien veces por gen sin matar las células y sin una frecuencia significativa de dobles mutantes (Winston, 2008).

La ventaja de la mutagénesis es que no requiere información previa para los genes y cepas seleccionados; las mutaciones genómicas son inducidas de manera aleatoria a altas frecuencias y el producto de la mutagénesis no se considera un organismo genéticamente modificado (OGM) puesto que este término es sinónimo de transgénico para los consumidores (Piddocke y Olson, 2009).

Tabla 2-2 Mutágenos frecuentemente utilizados en mutagénesis de levaduras (Steensels *et al.*, 2014)

<b>Método</b>	<b>Mutágeno</b>	<b>Modo de acción</b>	<b>Alteración genética</b>
<b>Físico</b>	Luz UV	Cruzamiento mitótico, dímeros de pirimidina, bases hidroxiladas,	Sustituciones de pares de bases, transversiones

		entrecruzamiento de cadenas de DNA, mutaciones reversa	
	Radiación ionizante	Uno o dos rompimientos de DNA; desaminación y bases deshidroxiladas	Mutaciones puntuales
<b>Químico</b>	EMS	Alquilación	Transiciones GC-AT

#### 2.4.2 Revisión de mejoras obtenidas por mutagénesis

En 2015, Trujillo aplicó la técnica de mutaciones al azar con luz UV en *Saccharomyces cerevisiae* aisladas a partir de cervezas artesanales; obtuvieron una cepa vigorosa Y eficiente en la producción de biomasa y CO<sub>2</sub> y con cualidades positivas de sabor amargo y sabor alcohólico que fueron mostradas por medio de una evaluación sensorial. Además, en el mosto fermentado, se mostró la presencia de ésteres a partir de un análisis cualitativo por cromatografía en capa fina.

En otros estudios también se ha utilizado la mutación al azar para mejorar levaduras. Se han obtenido cepas de levadura de cerveza con fenotipos deseados, por ejemplo, mutantes de levadura lager con un mejor rendimiento de la fermentación en condiciones de alta gravedad específica (Blieck *et al.*, 2007), una levadura sobreproductora de compuestos aromáticos (Lee *et al.*, 1995) y una cepa tolerante al etanol (Stanley *et al.*, 2010) (Tabla 2-3).

Tabla 2-3 Estudios que reportan mejoras obtenidas por mutagénesis en levaduras

<b>Fenotipo mejorado</b>	<b>Especie</b>	<b>Mutágeno</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Referencia</b>
Fermentación bajo condiciones de alta gravedad específica	<i>S. pastorianus</i>	UV	Cerveza	Blieck <i>et al.</i> , 2007

Tolerancia al etanol	<i>S. cerevisiae</i>	EMS	Etanol	Dinh <i>et al.</i> , 2008
	<i>S. cerevisiae</i>	EMS	Etanol	Stanley <i>et al.</i> , 2010
Termotolerancia	<i>S. cerevisiae</i>	UV y EMS	Etanol	Balakumar <i>et al.</i> , 2010
Sobreproducción de compuestos volátiles	<i>S. pastorianus</i>	EMS	Cerveza	Lee <i>et al.</i> , 1995
	<i>S. cerevisiae</i>	UV	Cerveza	Trujillo, 2015

### 2.4.3 Producción de isoamil acetato

El isoamil acetato es un éster formado a partir de isoamil alcohol y ácido acético; este éster tiene un olor similar al de plátano y pera. En la levadura, el isoamil acetato se produce de isoamil alcohol y acetyl CoA por la acción de la enzima alcohol acetiltransferasa. El isoamil alcohol se forma a partir del  $\alpha$ -cetoisocaproato por su descarboxilación y reducción. El  $\alpha$ -cetoisocaproato se sintetiza de glucosa pero la desaminación de L-leucina también es una ruta alternativa de formación. La L-leucina causa una inhibición de la enzima  $\alpha$ -isopropilmalato sintasa ( $\alpha$ -IPM sintasa) que está acompañada por un decremento en la síntesis de la síntesis de isoamil alcohol (Lee *et al.*, 1995; Strejc *et al.*, 2013).

Las mutantes sobrevivientes a la inhibición de la  $\alpha$ -IPM sintasa por la L-leucina pueden ser aisladas utilizando un medio selectivo que contiene un análogo de L-leucina 5,5,5-trifluoro-DL-leucina (TFL). TFL inhibe de la misma manera a la  $\alpha$ -IPM sintasa como la L-leucina pero no es utilizada por la levadura (Lee *et al.*, 1995; Strejc *et al.*, 2013).

### 3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos ocho años la importación de cerveza creció 80% (142.3 millones de litros en 2007 a 256.7 millones de litros en 2015) (Villamil, 2016), lo que demuestra el interés del consumidor mexicano por cervezas de especialidad que podrían ser artesanales mexicanas. Con lo anterior, la participación de las cervezas artesanales en el consumo nacional creció de 0.2% a casi 3.0% entre 2007 y 2015 (Villamil, 2016).

Las cervezas artesanales son más complejas en su elaboración que las comerciales y por lo tanto, son una opción deseada para aquellos consumidores de cerveza que buscan un producto premium y una experiencia a través de su tipo, lo cual deriva a una gran variedad de sabores (Pruneda, 2016). En el estudio realizado por Gómez-Corona *et al.* (2016) se concluye que los consumidores mexicanos de cerveza artesanal buscan autenticidad única y construir una identidad.

Además, los microproductores de cerveza locales hoy en día enfrentan el reto del acceso a los insumos (malta, levaduras o lúpulos), ya que éstos son importados de Alemania, Francia o Estados Unidos y dependen del precio del dólar (Estrella, 2016). Por esta razón se requiere el desarrollo de materias primas en la región para poder abaratar costos (Tarango, 2013).

Por lo anterior se propuso utilizar la técnica de mutagénesis al azar en la levadura para obtener cepas mejoradas. La levadura es el personaje principal en la elaboración de cerveza y es capaz de sintetizar hasta mil compuestos de aroma y sabor durante la fase de fermentación. Estos compuestos son ésteres, alcoholes superiores, cetonas, ácidos orgánicos, compuestos de azufre y aldehídos, los cuales determinarán la calidad final de la cerveza (Lodolo *et al.*, 2008; Pires *et al.*, 2014).

#### **4. HIPÓTESIS**

La exposición a radiación UV de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* generará mutaciones al azar que podrán resultar en el aislamiento de cepas mejoradas de acuerdo con los sistemas de selección para la producción de cerveza tipo Ale.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Obtener cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con características mejoradas de crecimiento o producción de CO<sub>2</sub> que representen una mejora en la producción de cerveza tipo Ale.

### 5.2 Objetivos Específicos

- ✓ Aislar cepas de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de tres cervezas de especialidad a fin de estudiar las diferencias morfológicas y producción de CO<sub>2</sub> y biomasa existentes entre ellas.
- ✓ Realizar mutagénesis al azar de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* por radiación UV.
- ✓ Seleccionar las cepas modificadas con características deseables (mayor producción de biomasa o mayor producción de CO<sub>2</sub>).
- ✓ Evaluar el efecto del uso de las cepas mutagenizadas sobre el tiempo de producción y las características organolépticas para la producción de la cerveza tipo Ale.
- ✓ Realizar una evaluación sensorial del producto terminado para determinar sus características más importantes respecto al sabor y aroma.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1.1 Cepas

Se utilizaron levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de cervezas artesanales mexicanas (Huapango, Bernalina y Hércules). Estas cervezas se compraron en el bar Beerbox de la calle Pasteur, localizado en la ciudad de Querétaro.

### 6.1.2 Medios de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

#### 6.1.2.1 YPD

Para hacer crecer *Saccharomyces cerevisiae* se prepararon dos medios de cultivo, medio YPD en caldo y agar utilizando glucosa (2% p/v), extracto de levadura (1% p/v), peptona (2% p/v) y agar (1.5% p/v) (Difco).

#### 6.1.2.2 YNB

Para la selección de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* sobreproductoras de isoamil acetato se preparó agar YNB que contenía glucosa (2% p/v), base nitrogenada de levadura (0.67% p/v), agar (1.5% p/v) de marca Difco y TFL en concentraciones de 0.21, 0.43 y 0.86 mM (De Araújo-Vicente *et al.*, 2006; Strejc *et al.*, 2013).

### 6.1.3 Aislamiento de levaduras presentes en cervezas artesanales

El aislamiento de levaduras se realizó a partir de cervezas que se encuentran en el mercado nacional y que cuentan con levaduras vivas en la botella. Las cervezas a utilizar para la recuperación y aislamiento de levaduras fueron: Huapango, Bernalina y Hércules.

Las muestras de levadura se obtuvieron preparando 250 ml de medio YPD, con 2.5 gramos de extracto de levadura, 5 gramos de dextrosa y 5 gramos de peptona. El medio preparado se repartió en tubos de fondo cónico de 50 ml y estos se esterilizaron en autoclave.

Para la inoculación de las levaduras en el medio se destaparon las cervezas en una zona aséptica, el volumen de la cerveza fue reducido hasta un 80% por decantación sin revolver el sedimento, posteriormente se resuspendieron las levaduras, se tomaron 700 µl de



las muestras y se añadieron a los tubos con medio YPD estéril, para ser incubados a 30°C de 24 a 36 h a 100 rpm en la incubadora (Trujillo, 2015).

#### 6.1.4 Identificación microscópica y conteo de las levaduras crecidas en el medio

La identificación en el microscopio se realizó haciendo dilución 1/100 de cultivo fresco de levadura utilizando un hemotocitómetro Neubauer Hausser Scientific y microscopio Leica Zeiss.

#### 6.1.5 Cultivo de las cepas en YPD

Se tomó una muestra de las levaduras y se inoculó en tubos de 50 ml con YPD. Los tubos se incubaron por 16 a 24 h a 30 °C a 100 rpm.

#### 6.1.6 Ciclo de mutaciones con radiación UV

Se realizó un precultivo de levaduras silvestres (Hércules, Bernalina y Huapango) en medio líquido y se dejó crecer por 12 h. Se hizo dilución 1/100 de esta alícuota en solución amortiguadora de fosfatos estéril 100 mM, pH 7.2, con glucosa (1%) y cloruro de sodio (0.9%). Se realizó conteo en el hemotocitómetro y se ajustó la dilución hasta obtener  $2 \times 10^6$  células/ml sobre una caja de Petri. Se ensambló la estación de mutaciones y posteriormente se expusieron las placas a luz UV con una longitud de onda de 254 nm (lámpara de UV UVG-54 entela de 254 nm) durante los siguientes tiempos 0, 30'', 1', 1'30'', 2', 2'20'', 2'40'', 3' y 3'20'' irradiando con la lámpara a una distancia de 30 centímetros sobre la caja de Petri. Se inoculó con 100 µl de cada exposición de células a radiación UV sobre placas de YPD en agar originando una curva de muerte celular buscando una sobrevivencia entre 5 y 1%. Se incubaron las placas a 30 °C en la oscuridad por 5 días hasta que las colonias fueran visibles (Trujillo, 2015). Se contaron las colonias sobrevivientes por placa para construir la curva de muerte celular.

#### 6.1.7 Evaluación en la producción de CO<sub>2</sub> y biomasa de las primeras cepas mutantes

La cantidad de CO<sub>2</sub> producido se analizó por la técnica del tubo invertido. Se utilizaron tubos de 50 ml de plástico con un tubo de vidrio invertido (7 cm de largo x 1.1 cm de diámetro). Cada tubo de 50 ml se llenó con 35 ml de medio YPD líquido, a continuación

se introdujo el tubo de vidrio boca abajo, se colocó la tapa a medio cerrar y se esterilizó en autoclave. Una vez frío el medio, se inoculó con las cepas a ser evaluadas y se incubaron a 30 °C durante 12 horas y 100 rpm (Trujillo, 2015).

Para la evaluación del crecimiento celular, se determinó la biomasa del cultivo a través de absorbancia. Se agitó y pipeteó el medio fermentado después de 12 horas en tubos Eppendorf de 1.6 ml y se realizaron las lecturas con el espectrofotómetro UV-vis (Perkin Elmer Lambda 40) a 600 nm utilizando agua destilada como blanco (Trujillo, 2015).

#### 6.1.8 Selección de las levaduras sobreproductoras de compuestos aromáticos

Se eligieron las levaduras con mejor desempeño en cuanto a producción de CO<sub>2</sub> y biomasa para hacer una segunda selección utilizando el análogo de leucina 5,5,5-trifluoro-DL-Leucina (TFL) de Sigma-Aldrich. Para esto se preparó medio YNB sólido en cajas Petri con TFL a concentraciones de 0.21 y 0.43 mM (De Araújo-Vicente *et al.*, 2006; Strejc *et al.*, 2013).

Se hizo la mutagénesis aleatoria (como se describió en la sección 6.1.6) a las cepas de mejor desempeño en el tiempo en que se obtuvo entre un 5 y 1% de supervivencia. Después de la mutación, las placas recién sembradas se colocaron en la incubadora a 30 °C por 5 días; posteriormente las colonias mutantes se resembraron en agar YPD. Finalmente, estas levaduras se evaluaron nuevamente en cuanto a su producción de biomasa y CO<sub>2</sub> como se planteó previamente en la sección 6.1.7.

#### 6.1.9 Microfermentaciones

Cuatro cepas mutantes (21-130, 21-20, 30-130 y 30-43) y las dos cepas control (Ber y Hua) se utilizaron para hacer cerveza en tubos Falcon de 50 ml y a partir de éstas seleccionar dos cepas que pasarían posteriormente a la fase de evaluación sensorial con consumidores y el análisis de compuestos aromáticos. Estas levaduras fueron cultivadas previamente en YPD, centrifugadas (10000 x g por 8 min) y se almacenaron en solución salina (1% glucosa y 0.9% NaCl).

Para la elaboración de la cerveza se utilizó el kit de cerveza “Sol Arena Pale Ale”, comercializado por Brewmasters. El kit contenía los siguientes ingredientes:

- 2.7 kg de extracto de malta seco
- 1.0 kg de malta Vienna molida
- 170 g de maltodextrina
- 28 g de lúpulo Chinook (lúpulo amargo)
- 28 g de lúpulo Cascade (lúpulo aromático)
- 200 g de dextrosa

Con el fin de evaluar la fermentación y perfil de ésteres en cerveza tipo Ale se tomó la gravedad específica inicial como el segundo factor de control. El mosto tuvo dos niveles de gravedad específica inicial: 15 °P y 18 °P, niveles bajo y alto. Estos valores fueron fijados de acuerdo a lo reportado por la literatura en algunos experimentos (Saerens *et al.*, 2008b; Puligundla *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012).

Se sanitizó el material con solución de cloro al 0.1%: tubos de fondo cónico y mangueras; también el material de vidrio. Se utilizó un vaso de precipitado en el cual se colocaron 480 ml de agua destilada; el agua se llevó a 76 °C. Se preparó una bolsa para grano hecha a partir de tela de manta estéril y se colocaron dentro 50 gramos de malta Viena. Se mantuvo la bolsa en agitación dentro del mosto a la temperatura de 76 °C por 30 min y posteriormente se elevó la temperatura a 85 °C por otros 30 min. Posteriormente, se retiró la bolsa para grano escurriéndola lo mejor posible dentro del vaso de precipitado. Mientras ebullicía el mosto, se incorporó el extracto de malta seco (120 g). Después, se introdujo la bolsa preparada con lúpulo Chinook (0.66 g) en el mosto y se dejó hervir por 15 min. A los 10 min de ebullición, se agregó otra bolsita con lúpulo Chinook (0.66 g). Al minuto 11, se agregaron 7.9 g de maltodextrina para clarificar el mosto. Al minuto 12 de ebullición, se introdujo la bolsa de tela con lúpulo Cascade (0.66 g) y se retiró del fuego al minuto 15. En este momento se colocó otra bolsita de lúpulo Cascade (0.66 g). Una vez transcurrido el tiempo de maceración, se retiraron las bolsas de lúpulo exprimiéndolas por completo. Se mezcló el preparado de azúcares con 390 ml de agua estéril fría. El mosto se llevó a 21-24 °C utilizando

hielo. Cuando la temperatura se encontraba en el rango deseado, se tomó una muestra y se registró el valor de gravedad específica y pH iniciales. Después, se aireó el mosto agitando vigorosamente.

Antes de inocular el mosto, las levaduras se encontraban almacenadas en solución salina; estas se lavaron con agua destilada estéril antes de colocarlas en el mosto. El mosto se inoculó con  $1 \times 10^7$  células/ml por tratamiento (Lake, 2008) y se vació en tubos de microfermentación de 50 ml, cada uno con su trampa de agua. La fermentación se llevó a cabo a 18 °C durante 5 días y la maduración por 7 días a 4 °C.

#### 6.1.10 Panel entrenado

Debido a que se tenían 12 diferentes cervezas (4 cepas y 2 gravedades específicas) se optó por reducir las cepas a analizar con la ayuda de un panel entrenado de 3 personas miembros activos de Beer Judge Certification Program (BJCP).

Se le sirvió a cada juez las 12 muestras de cerveza de 20 ml cada una, servida a 4 °C en vasos de plástico de color ámbar identificadas con un código de tres dígitos en orden aleatorio en base a lo reportado por Meilgaard *et al.* (2006). Se utilizaron galletas habaneras sin sal y agua natural al tiempo como limpiador de paladar. Se les solicitó desarrollar una lista de atributos para cada muestra y seleccionar los 4 mejores tratamientos evaluando aroma, sabor, cuerpo y aceptabilidad general.

#### 6.1.11 Elaboración de la cerveza

Dos cepas mutantes (21-130 y 30-43) y las dos cepas control (Ber y Hua) se utilizaron para elaborar cerveza tipo Ale a gran escala. Estas levaduras fueron cultivadas previamente en YPD, centrifugadas (10000 x g por 8 minutos) y se almacenaron en solución salina (1% glucosa y 0.9% NaCl).

Se sanitizó el material con solución de cloro al 0.1%. Se utilizó una olla de acero inoxidable en la cual se colocaron 8.2 L de agua de garrafón Ciel; el agua se llevó a 76 °C. Se preparó una bolsa para grano hecha a partir de tela de manta estéril y se colocaron dentro 680 g de malta Viena. Se mantuvo la bolsa en agitación dentro del mosto a la temperatura de

76 °C por 30 min y posteriormente se elevó la temperatura a 85 °C por otros 30 min. Posteriormente, se retiró la bolsa para grano escurriéndola lo mejor posible dentro de la olla. Mientras ebullición el mosto, se incorporó el extracto de malta seco (1.85 kg). A partir de este momento, la ebullición duro una hora: se introdujo la bolsa preparada con lúpulo Chinook (9.9 g) en el mosto y se dejó hervir por 60 min. A los 40 min de ebullición, se agregó otra bolsita con lúpulo Chinook (9.9 g). Al minuto 45, se agregaron 119 g de maltodextrina para clarificar el mosto. Al minuto 50 de ebullición, se introdujo la bolsa de tela con lúpulo Cascade (9.9 g) y se apagó el fuego al minuto 60. En este momento se colocó otra bolsita de lúpulo Cascade (9.9 g). Una vez transcurrido el tiempo de maceración, se retiraron las bolsas de lúpulo exprimiéndolas por completo. Se mezcló el preparado de azúcares con 6.8 L de agua de garrafón Ciel. El mosto se llevó a 21-24 °C utilizando hielo. Cuando la temperatura se encontraba en el rango deseado, se tomó una muestra y se registró el valor de gravedad específica y pH iniciales. Después, se aireó el mosto agitando vigorosamente.

Antes de inocular el mosto, las levaduras se encontraban almacenadas en solución salina; estas se lavaron con agua destilada estéril antes de colocarlas en el mosto. El mosto se inoculó con  $1 \times 10^7$  células/ml por tratamiento a 22 °C (Lake, 2008) y se vació en recipientes de plástico de 5 L, cada uno con su trampa de agua.

La fermentación se llevó a cabo a 23 °C durante 7 días. Al día 7 se hizo el trasvase de la cerveza a otro fermentador evitando arrastrar los sedimentos y se dejó madurar por otros 7 días a 4 °C.

#### 6.1.12 Análisis de la fermentación

La fermentación del mosto se supervisó diariamente retirando muestras cada 8 horas y congelándolas. Se analizaron 3 parámetros durante la fermentación del mosto: pH (AOAC International, 2000), contenido de nitrógeno libre (AOAC International, 2000) y cantidad de azúcares reductores utilizando glucosa como estándar (Miller, 1959).

#### 6.1.13 Envasado y acondicionamiento

Antes de carbonatar la cerveza, se sanitizaron las botellas y corcholatas en solución con sanitizador Brewsan. Cuatro mililitros de dextrosa (8 g/ml) se agregaron a cada botella. Las botellas se taparon e incubaron a 21 °C por 5 días y posteriormente se almacenaron a 4 °C para su análisis.

#### 6.1.14 Producto terminado

##### 6.1.14.1 Medición de la estabilidad de la espuma

Cincuenta mililitros de cerveza se sirvieron en un vaso de vidrio, el vaso se selló con parafilm. Cada vaso se agitó vigorosamente hacia arriba y hacia abajo diez veces al mismo tiempo y se tomó el tiempo para contar 15 min. Una vez pasados los 15 min se evaluó la espuma visualmente y se midió con una regla la altura de la espuma desde la base del vaso. Se utilizó una cerveza comercial como el control positivo (Hiralal *et al.*, 2014).

##### 6.1.14.2 Color de la cerveza

El color de la cerveza se midió con espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 430 nm (método 976.08) (AOAC International, 2000) utilizando agua destilada como blanco.

#### 6.1.15 Evaluación sensorial de cerveza

Se realizó un panel de evaluación sensorial con 30 consumidores frecuentes de cerveza que consumían cerveza al menos 4 veces por mes con el objetivo de evaluar cada cerveza individual según las características sensoriales que le imparten los compuestos volátiles. El lugar de reunión fue el laboratorio de Evaluación Sensorial en el Parque Biotecnológico de la UAQ, donde cada panelista tenía un cubículo para hacer la degustación. Se utilizó la luz roja para enmascarar el color de la bebida. Se le sirvió a cada consumidor 4 muestras de cerveza de 20 ml cada una, a 4 °C en vasos de plástico pequeños, identificando cada muestra con un código de tres dígitos en orden aleatorio en base a lo reportado por Meilgaard *et al.* (2006). Se utilizaron galletas habaneras sin sal y agua de garrafón al tiempo como limpiador de paladar. Los parámetros a evaluar por cada consumidor fueron: aroma a frutas, aroma a malta tostada, sabor a frutas, sabor amargo, sabor a malta tostada, sabor

especiado y aceptabilidad general. Estas características fueron calificadas de acuerdo a una escala hedónica del 1 al 5 donde 1 es la clasificación como el nivel más bajo y la calificación de 5 es el nivel más alto del producto.

## 6.2 Análisis estadístico de los datos obtenidos de la fermentación a gran escala

Se realizó un diseño unifactorial (cepa de levadura) completamente aleatorizado sin repeticiones genuinas. Cada medición se hizo por duplicado.

La significancia estadística se determinó por el análisis de varianza (ANOVA) en mediciones repetidas en el tiempo. Las diferencias entre los tratamientos se determinaron por comparación de las medias utilizando la prueba de Tuckey (software JMP versión 11.0.0). El nivel de significancia estadística es  $\alpha=0.05$ .

El análisis de calificaciones dadas para los atributos de sabor y aroma de las cervezas otorgadas por los consumidores se evaluaron con la técnica de Análisis de Componentes Principales (PCA) y Preference Mapping.

### 6.3 Diagrama de flujo

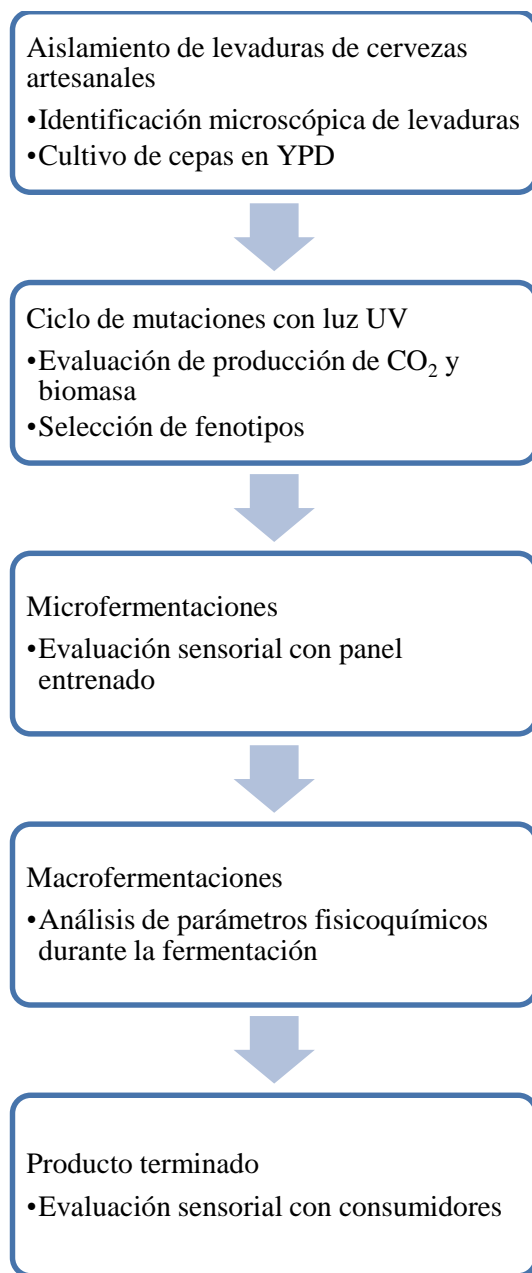


Figura 6-1 Diagrama de flujo del proyecto



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Aislamiento de levaduras presentes en cervezas artesanales

Para aislar las levaduras se adquirieron cinco cervezas artesanales regionales, al inicio del proyecto se propusieron cinco marcas tipo Ale que presentaban sedimento al fondo de la botella, lo que indica que estas no fueron clarificadas. En la Tabla 7-1 se muestran las características de estas cinco bebidas:

Tabla 7-1 Cinco cervezas propuestas para el aislamiento de cepas

<b>Cerveza artesanal</b>	<b>Marca</b>	<b>Estilo de cerveza</b>	<b>Dónde se elabora</b>
Bull Doll	Chela Libre	Imperial IPA	Celaya, Gto.
Bernalina	MiQro Cervecería	American Pale Ale	Corregidora, Qro.
Huapango	MiQro Cervecería	American Blonde/Golden Ale	Corregidora, Qro.
Spinning Jenny	Hércules	English Pale Ale	Querétaro, Qro.
Fundadores	Espiga Local Brewing	Imperial Black IPA	Querétaro, Qro.

Dado que las levaduras de las marcas Bull Doll y Fundadores no fue posible aislarlas en medio YPD, se trabajó con las tres restantes (Tabla 7-2).

Tabla 7-2 Aislamiento de cepas desde tres cervezas queretanas

<b>Cerveza artesanal</b>	<b>Marca</b>	<b>Estilo de cerveza</b>	<b>Dónde se elabora</b>
Spinning Jenny	Hércules	English Pale Ale	Querétaro, Qro.
Bernalina	MiQro Cervecería	American Pale Ale	Corregidora, Qro.

Huapango	MiQro Cervecería	American Blonde/Golden Ale	Corregidora, Qro.
----------	---------------------	-------------------------------	-------------------

Las tres cepas iniciales fueron almacenadas en glicerol al 30% y congeladas a -20°C, para su mantenimiento.

En la Tabla 7-3 se muestra el nombre original de la cepa y el nombre experimental que se les asigno durante los experimentos de mutación y posteriores a fin de disminuir posibles efectos de preferencia debida al nombre comercial.

Tabla 7-3 Aislamiento de cepas desde tres cervezas queretanas

<b>Nombre de cerveza artesanal</b>	<b>Nuevo nombre</b>
Spinning Jenny	X
Bernalina	Y
Huapango	Z

## 7.2 Descripción microscópica de las levaduras crecidas en el medio

### 7.2.1 Levaduras de cerveza X

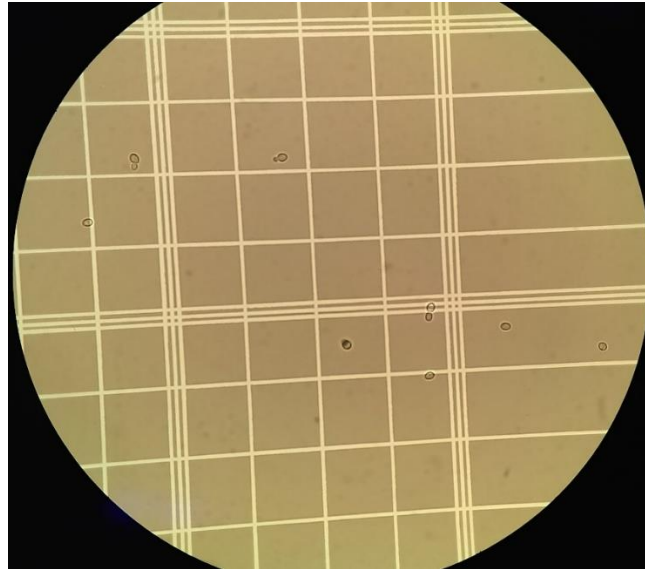


Figura 7-1 Levaduras aisladas de cerveza X, observadas con microscopio óptico con aumento de 40x

Las levaduras X provenientes de la cerveza Hércules, presentan la típica morfología de las levaduras con células de forma ovalada, lisas y de tamaño variable, en este caso se describen como levaduras pequeñas, esféricas y ovaladas (Figura 7-1).

#### 7.2.2 Levaduras de cerveza Y

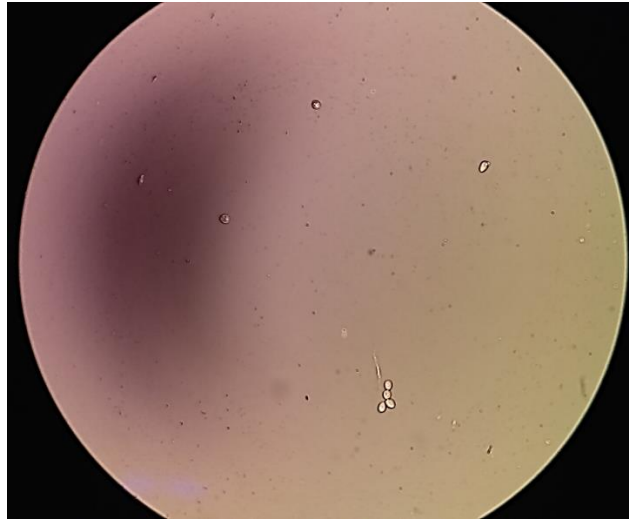


Figura 7-2 Levaduras aisladas de cerveza Y, observadas con microscopio óptico con aumento de 40x

Se apreciaron levaduras pequeñas (mismo tamaño que X) y ovaladas en su mayoría agrupadas en conglomerados (Figura 7-2).

### 7.2.3 Levaduras de cerveza Z

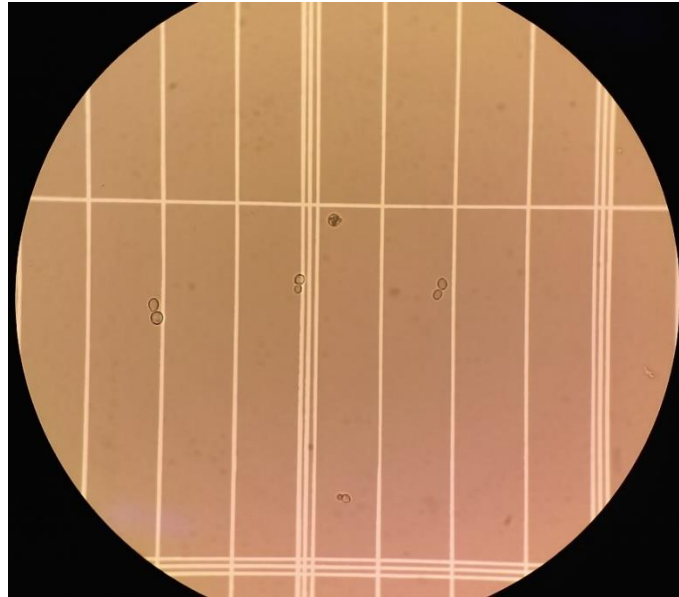


Figura 7-3 Levaduras aisladas de cerveza Z, observadas con microscopio óptico con aumento de 40x

Respecto a las levaduras aisladas de cerveza Z, se caracterizan por tener mayor tamaño que X y Y y por su forma circular bien definida (Figura 7-3).

### 7.3 Ciclo de mutaciones con radiación UV

Se montó la estación de mutaciones como la que se muestra en la Figura 7-4: la lámpara UV se colocó en posición horizontal a 30 cm de la caja de Petri. También se utilizó una protección de acrílico transparente contra luz UV y equipo de protección especial (bata, guantes y careta) contra radiación UV.

El objetivo del experimento fue lograr una supervivencia de las levaduras en un límite menor a 5% en donde el 99% de las células presentan una sola mutación de acuerdo con la literatura (Bos *et al.*, 1992) después de ser expuestas a la luz UV, se realizó el cultivo y se observó la morfología de las cepas, si se presentaba algún cambio en coloración, tamaño o deformidad de las colonias, las cepas fueron aisladas para evaluarlas contra las originales.

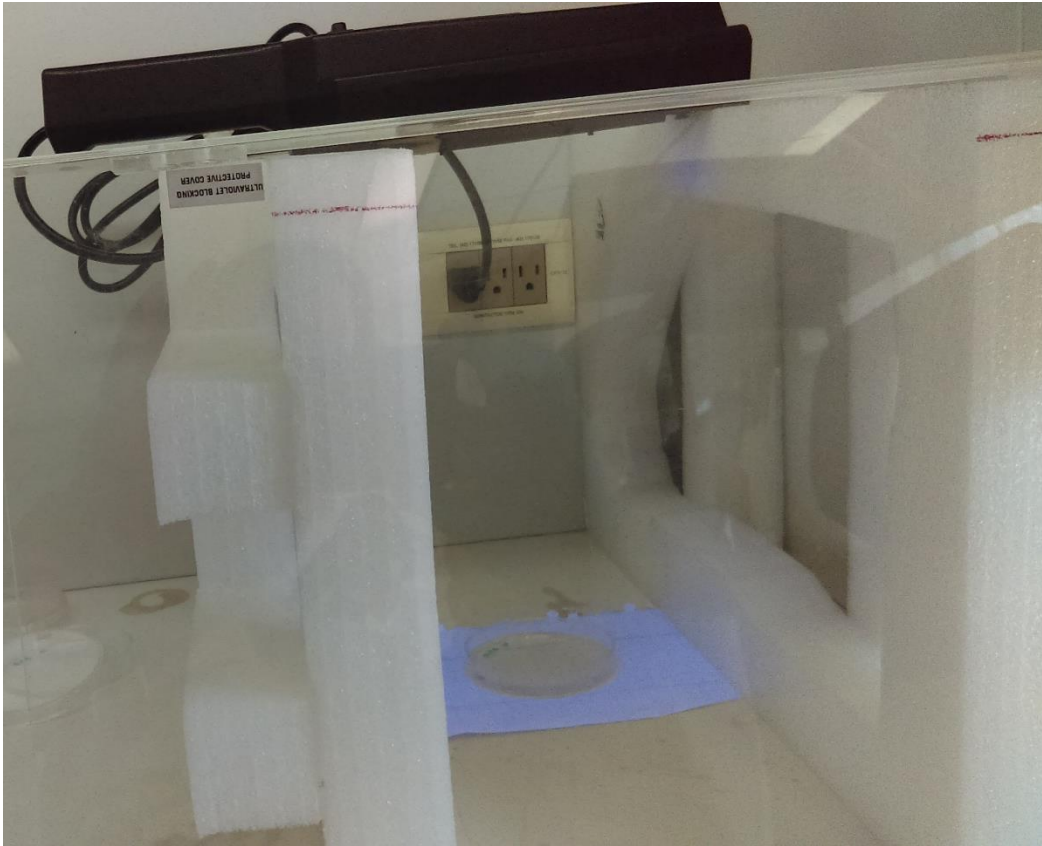


Figura 7-4 Estación de mutaciones con exposición de luz UV de 254 nm

Aunque todas las cepas de levadura fueron expuestas al mismo tratamiento de mutagénesis, estos cambios en las cepas son completamente aleatorios y no existe reproducibilidad de las mutaciones producidas; por esta razón fue necesario volver a repetir los ciclos de mutaciones con estas tres cepas con el fin de encontrar colonias que se destacaran por sus cambios en morfología fácilmente distinguibles. Los resultados de estos ciclos de mutaciones fueron positivos: se obtuvieron 30 mutantes en total a partir de las 3 cepas originales. Todas estas se aislaron en agar YPD: 14 provenientes de la cerveza X, 8 cepas de Y y 8 cepas de Z (Tabla 7-4).

Tabla 7-4 Treinta mutantes obtenidas con luz UV

<b>Nombre de mutante</b>	<b>Cepa de origen</b>	<b>Tiempo de exposición a luz UV</b>
1	X	1'30''
2	X	2'00''
3	X	2'20''
4	X	2'40''
5	X	3'00''
6	X	3'20''
7	X	1'00''
8	X	1'30''
9	X	2'00''
10	X	1'30''
11	X	2'00''
12	X	2'20''
13	X	2'40''
14	X	3'00''
15	Y	30''
16	Y	1'00''
17	Y	2'00''
18	Y	2'20''
19	Y	1'00''
20	Y	1'30''
21	Y	1'00''
22	Y	1'30''
23	Z	30''
24	Z	1'00''
25	Z	1'30''
26	Z	2'00''
27	Z	3'00''
28	Z	2'20''
29	Z	1'00''
30	Z	1'00''

Las treinta mutantes escogidas fueron seleccionadas por su mayor tamaño sobre las demás en la placa, pues no se observaron cambios en coloración o deformaciones.

### 7.3.1 Curva de supervivencia

#### 7.3.1.1 Cepas de cerveza X

En la Figura 7-5 se muestran las placas con las levaduras mutantes sobrevivientes para la cepa X para cada tiempo de exposición a luz UV. A partir de estas placas fue posible construir las curvas de supervivencia para cada cepa, como se muestra en la Figura 7-6.

Las colonias mutantes que crecieron se caracterizaron por su variación en tamaño. Se reportaron sobrevivientes hasta el minuto 2'20'' de luz UV que corresponde a un 2% de sobrevivientes. Esta cepa logró sobrevivir hasta mayores tiempos de exposición (2'20'') al compararse contra las otras dos cepas Y y Z (1'30'' y 1', respectivamente).

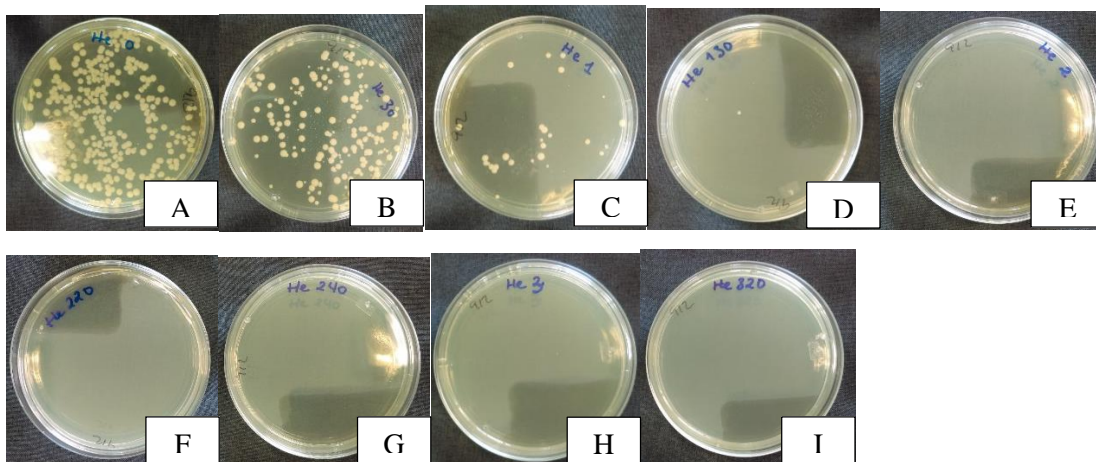


Figura 7-5 Levaduras de cerveza X expuestas a luz UV: (A) sin exposición, (B) 30'', (C) 1', (D) 1'30'', (E) 2', (F) 2'20'', (G) 2'40'', (H) 3' e (I) 3'20''.



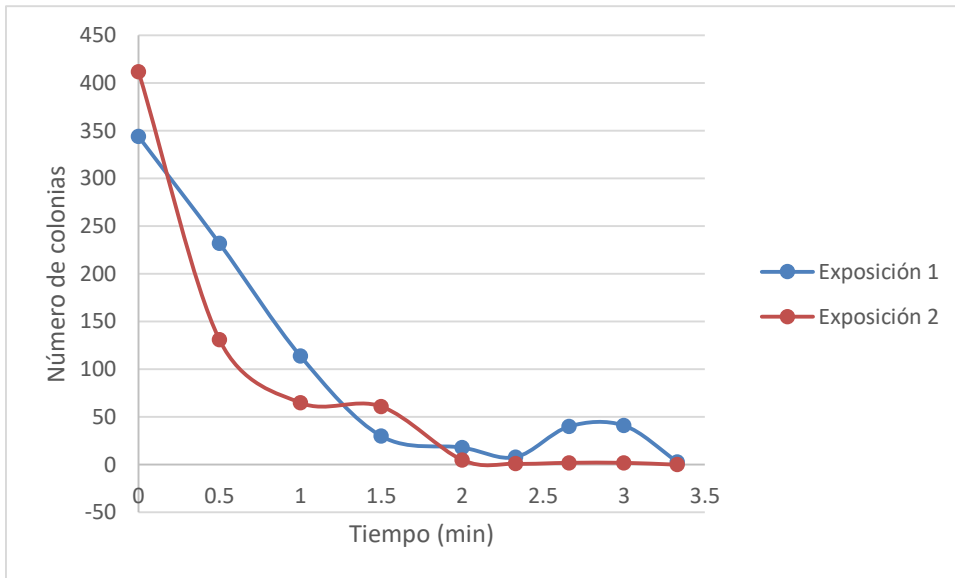


Figura 7-6 Curva de supervivencia de las cepas X expuestas al ciclo de mutaciones

### 7.3.1.2 Cepas de cerveza Y

En la Figura 7-7 se presentan las cajas de Petri con las colonias mutantes de la cepa Y y en la Figura 7-8 se aprecian las curvas de supervivencia para esta cepa las cuales fueron muy similares entre ellas.

Las colonias mutantes sobrevivientes eran medianas en su mayoría. Hasta el tiempo 1'30'' de radiación se observaron colonias que representaron un 0.85% de sobrevivientes. También es importante destacar que esta cepa es la única comparable con los resultados obtenidos por Trujillo en 2015 al reportar dos cepas mutantes (Ticolote y Delirium) sobrevivientes también hasta 1'30''.

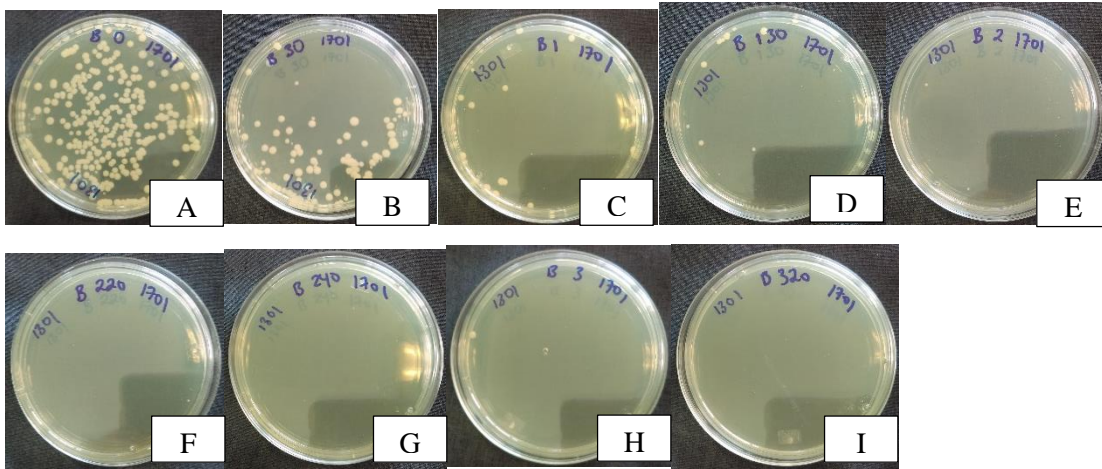


Figura 7-7 Levaduras de cerveza Y expuestas a luz UV: (A) sin exposición, (B) 30'', (C) 1', (D) 1'30'', (E) 2', (F) 2'20'', (G) 2'40'', (H) 3' e (I) 3'20''.

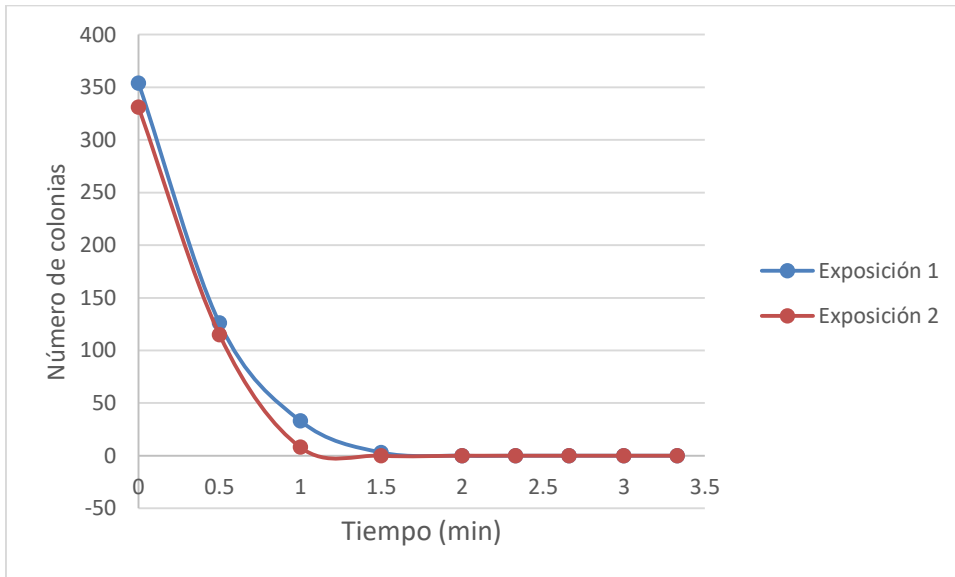


Figura 7-8 Curva de supervivencia de las cepas Y expuestas al ciclo de mutaciones

### 7.3.1.3 Cepas de cerveza Z

La Figura 7-9 muestra las cepas sobrevivientes de la cepa Z en cada tiempo de exposición a luz UV. Como se observa en las placas, predominaron las colonias de tamaño mediano.

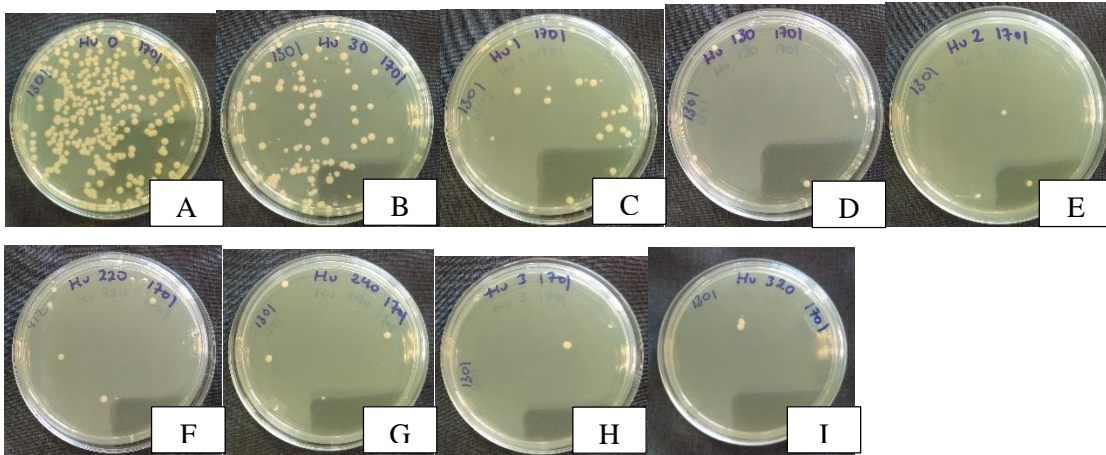


Figura 7-9 Levaduras de cerveza Z expuestas a luz UV: (A) sin exposición, (B) 30'', (C) 1', (D) 1'30'', (E) 2', (F) 2'20'', (G) 2'40'', (H) 3' e (I) 3'20''.

Es importante destacar que esta cepa fue la más sensible a la mutación de las tres cepas pues se obtuvieron sobrevivientes hasta el minuto 1 que equivale al 3% de supervivencia (Figura 7-10).

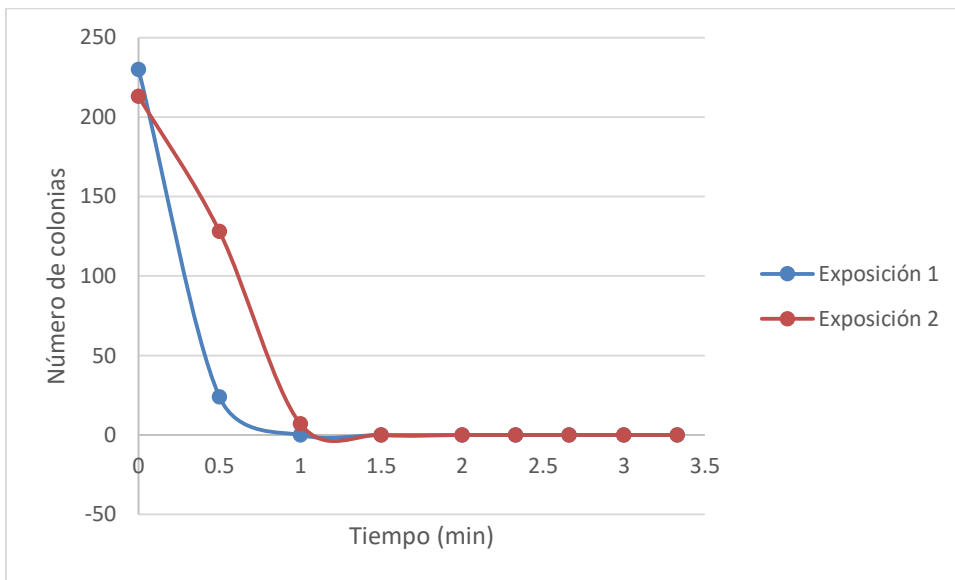


Figura 7-10 Curva de supervivencia de las cepas Z expuestas al ciclo de mutaciones

Finalmente, todas las levaduras mutagenizadas (las treinta) fueron almacenadas en glicerol al 30% y congeladas a -20 °C para su conservación.

#### 7.4 Evaluación en la producción de CO<sub>2</sub> y biomasa de las cepas mutantes

Para el análisis de biomasa y CO<sub>2</sub> producido, la unidad experimental fue la cepa mutante; se realizaron tres repeticiones genuinas de estas dos variables de respuesta. Con los resultados obtenidos de absorbancia y cantidad de CO<sub>2</sub> producido de cada levadura (mutante y control), se hizo la prueba de Dunnett de las 30 cepas mutantes obtenidas contra sus correspondientes cepas silvestres control.

##### 7.4.1 Cepas de cerveza X: Primera fase de mutagénesis

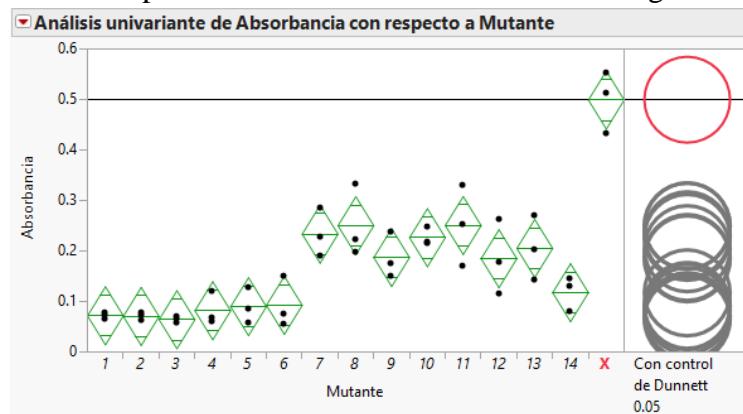


Figura 7-11 Comparación de medias de “absorbancia” de las 14 cepas mutantes versus la cepa control X

Tabla 7-5 Valores de p para las mutantes de X comparadas con el control para la variable de respuesta “absorbancia”

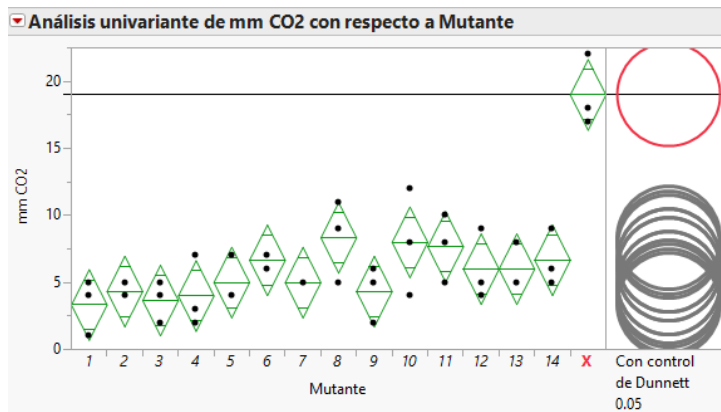
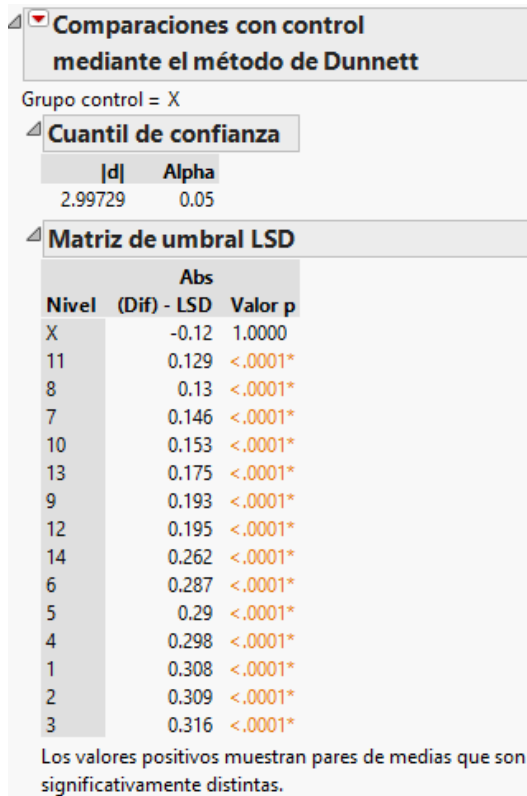


Figura 7-12 Comparación de medias de “CO<sub>2</sub> producido<sup>1</sup>” de las 14 cepas mutantes *versus* la cepa control X

<sup>1</sup> Medido en mm

Tabla 7-6 Valores de p para las mutantes de X comparadas con el control para la variable de respuesta “CO<sub>2</sub> producido”

Comparaciones con control  
mediante el método de Dunnett

Grupo control = X

Cuantil de confianza

d	Alpha
2.99729	0.05

Matriz de umbral LSD

Nivel	Abs	
	(Dif) - LSD	Valor p
X	-5.46	1.0000
8	5.207	<.0001*
10	5.54	<.0001*
11	5.873	<.0001*
6	6.873	<.0001*
14	6.873	<.0001*
12	7.54	<.0001*
13	7.54	<.0001*
5	8.54	<.0001*
7	8.54	<.0001*
2	9.207	<.0001*
9	9.207	<.0001*
4	9.54	<.0001*
3	9.873	<.0001*
1	10.21	<.0001*

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Hay diferencia estadística significativa para las cepas mutantes lo que indica que estas son diferentes a la cepa control (Tabla 7-5 y Tabla 7-6). En la Figura 7-11 y Figura 7-12 se puede observar que ninguna cepa mutante proveniente de la cerveza X es mejor que el control en cuanto a la producción de biomasa ni con respecto a su producción de CO<sub>2</sub>.

De acuerdo con esta prueba, se descartó utilizar las mutantes de la cepa X para pasar a la siguiente fase.

#### 7.4.2 Cepas de cerveza Y: Primera fase de mutagénesis

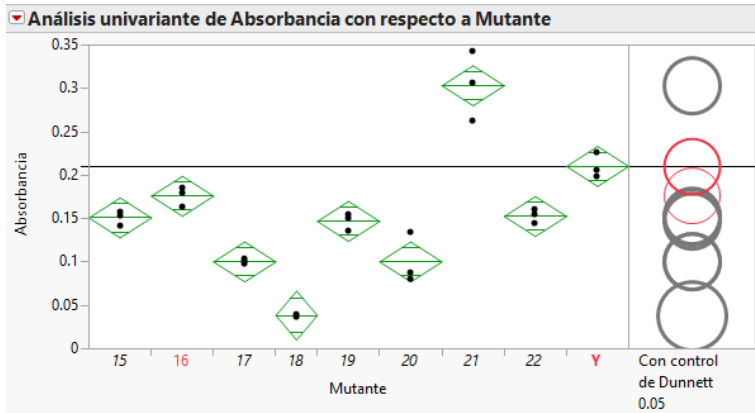


Figura 7-13 Comparación de medias de “absorbancia” de las 8 cepas mutantes versus la cepa control Y

Tabla 7-7 Valores de p para las mutantes de Y comparadas con el control para la variable de respuesta “absorbancia”

**Comparaciones con control mediante el método de Dunnett**

Grupo control = Y

**Cuantil de confianza**

d	Alpha
2.95941	0.05

**Matriz de umbral LSD**

Nivel	Abs	
	(Dif) - LSD	Valor p
21	0.047	<.0001*
Y	-0.05	1.0000
16	-0.01	0.1954
22	0.012	0.0103*
15	0.014	0.0082*
19	0.018	0.0048*
17	0.064	<.0001*
20	0.064	<.0001*
18	0.121	<.0001*

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Con respecto a la absorbancia de las mutantes contra el control, la cepa #16 no tiene significancia estadística (se puede utilizar igual que el control Y); el resto de las cepas presentaron significancia estadística (Tabla 7-7). En la Figura 7-13 es posible observar que

la producción de biomasa de la mutante #21 sobresale cuando se le compara con la otras mutantes y el control Y.

Lo anterior se explica ya que las múltiples mutaciones inducidas dieron como resultado una mejora eficiente de los caracteres de levadura controlados por múltiples genes (Pang *et al.*, 2010), tales como la producción de CO<sub>2</sub> de las cepas #16 y #21.

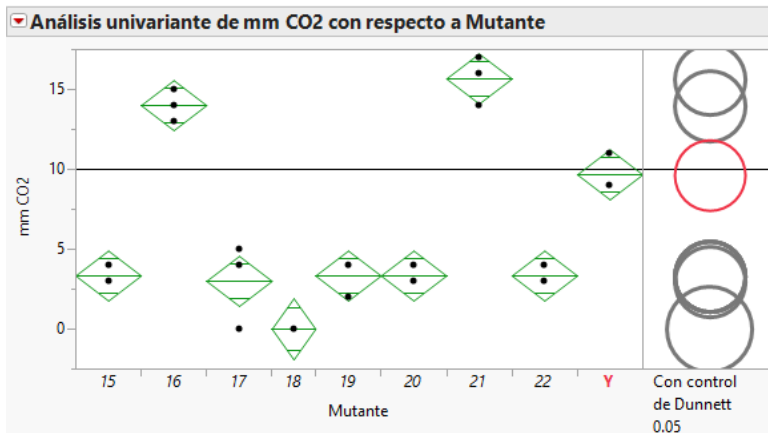


Figura 7-14 Comparación de medias de “CO<sub>2</sub> producido” de las 8 cepas mutantes versus la cepa control Y

Tabla 7-8 Valores de p para las mutantes de Y comparadas con el control para la variable de respuesta “CO<sub>2</sub> producido”

**Comparaciones con control mediante el método de Dunnett**

Grupo control = Y

**Cuantil de confianza**

d	Alpha
2.95941	0.05

**Matriz de umbral LSD**

Nivel	(Dif) - LSD	Abs Valor p
21	2.899	0.0002*
16	1.232	0.0045*
Y	-3.1	1.0000
15	3.232	<.0001*
19	3.232	<.0001*
20	3.232	<.0001*
22	3.232	<.0001*
17	3.566	<.0001*
18	6.2	<.0001*

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.



En cuanto a la producción de CO<sub>2</sub> en la Tabla 7-8 se reporta la significancia estadística de todas las cepas mutantes obtenidas. En la Figura 7-14 se aprecia que las mutantes #16 y #21 tienen mayores resultados que las otras cepas y que la levadura silvestre Y; por lo anterior estas dos cepas se eligieron para la siguiente fase (segunda mutación).

### 7.4.3 Cepas de cerveza Z: Primera fase de mutagénesis

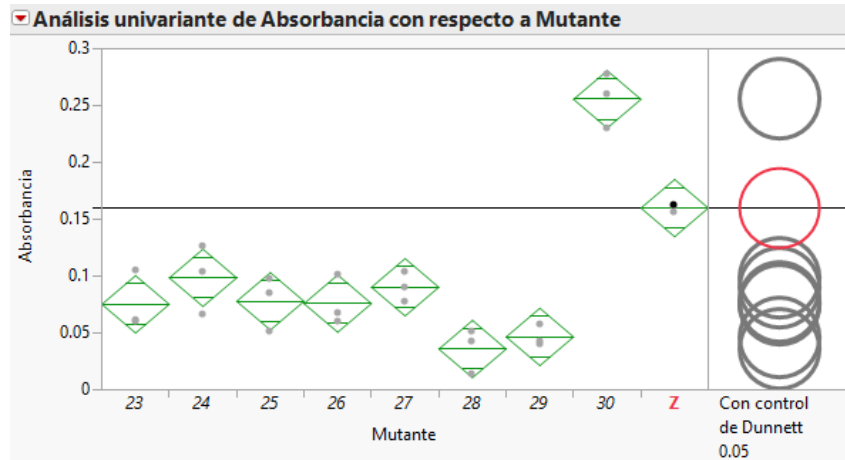


Figura 7-15 Comparación de medias de “absorbancia” de las 8 cepas mutantes versus la cepa control Z

Tabla 7-9 Valores de p para las mutantes de Z comparadas con el control para la variable de respuesta “absorbancia”

**Comparaciones con control mediante el método de Dunnett**

Grupo control = Z

**Cuantil de confianza**

d	Alpha
2.93514	0.05

**Matriz de umbral LSD**

Nivel	Abs	
	(Dif) - LSD	Valor p
30	0.046	0.0002*
Z	-0.05	1.0000
24	0.012	0.0123*
27	0.02	0.0043*
25	0.032	0.0009*
26	0.034	0.0007*
23	0.035	0.0006*
29	0.064	<.0001*
28	0.074	<.0001*

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

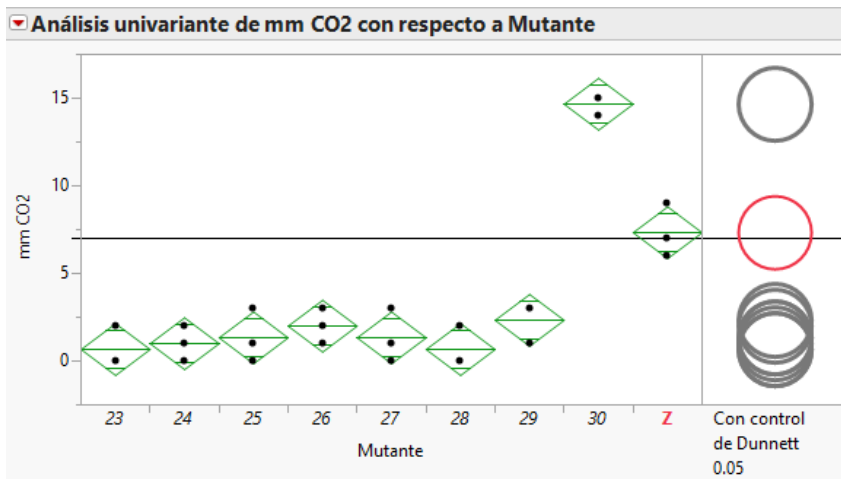


Figura 7-16 Comparación de medias de “CO<sub>2</sub> producido” de las 8 cepas mutantes versus la cepa control Z

Tabla 7-10 Valores de p para las mutantes de Z comparadas con el control para la variable de respuesta “CO<sub>2</sub> producido”

**Comparaciones con control mediante el método de Dunnett**

Grupo control = Z

**Cuantil de confianza**

d	Alpha
2.93514	0.05

**Matriz de umbral LSD**

Nivel	Abs	
	(Dif) - LSD	Valor p
30	4.416	<.0001*
Z	-2.92	1.0000
29	2.083	0.0006*
26	2.416	0.0003*
25	3.083	<.0001*
27	3.083	<.0001*
24	3.416	<.0001*
23	3.75	<.0001*
28	3.75	<.0001*

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

La prueba de Dunnett para la producción de biomasa y de CO<sub>2</sub> (Tabla 7-9 y 7-10) indica significancia estadística de todas las cepas mutantes comparada con el control. Además, se observa en ambas figuras que la mutante #30 superó en absorbancia y producción de CO<sub>2</sub> a la cepa control Z (Figura 7-15 y Figura 7-16). Debido a los resultados favorables de esta cepa, se eligió la mutante #30 para una segunda fase de mutación.

Las cepas mutantes presentaron resultados positivos para la alteración de la velocidad de crecimiento y producción de CO<sub>2</sub> que puede atribuirse a un metabolismo acelerado bajo las condiciones de cultivo con respecto a las cepas originales, debido a que todas las levaduras partieron de una alícuota de densidad óptica similar, fermentando durante el mismo período de tiempo. Los genes responsables del crecimiento son constitutivos en gran parte, de manera que después del tratamiento de mutagénesis diferentes genes se modificaron para provocar el aceleramiento en el metabolismo de las levaduras.

#### 7.4.4 Cepas de cerveza Y: Segunda fase de mutagénesis

Como se mencionó previamente, las cepas que se seleccionaron en la primera fase fueron #16, #21 y #30. De acuerdo a las curvas de supervivencia de las cepas Y y Z (cepas origen)

se repitieron los tiempos de exposición 1' y 1'30'' (Figura 7-17) de luz UV pues es en estos en los cuales el 99% de las células tienen una sola mutación.

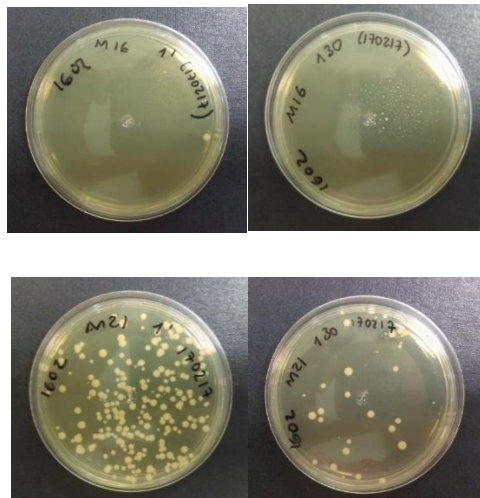


Figura 7-17 Mutantes de las cepas #16 (arriba) y #21 (abajo) seleccionadas en la fase 1 que fueron sometidas a una segunda mutación a tiempos de exposición de 1' (izquierda) y 1'30'' (derecha).

Como se observa en la Figura 7-17, solo creció mutante de la cepa #16 a 1'. Para el caso de la cepa #21 sí se obtuvieron sobrevivientes mutantes después de incidir luz UV a 1' y 1'30''.

Se hizo la prueba de Dunnett y se reporta significancia estadística en la cepa mutante (16(1)) comparada con el control Y (Tabla 7-11 y Tabla 7-12). Como se puede ver en las Figuras 7-18 y 7-19 el valor de absorbancia y de mm de CO<sub>2</sub> fue menor para la cepa seleccionada a la que se les incidió otra mutagénesis, razón por la cual esta nueva cepa no fue seleccionada.

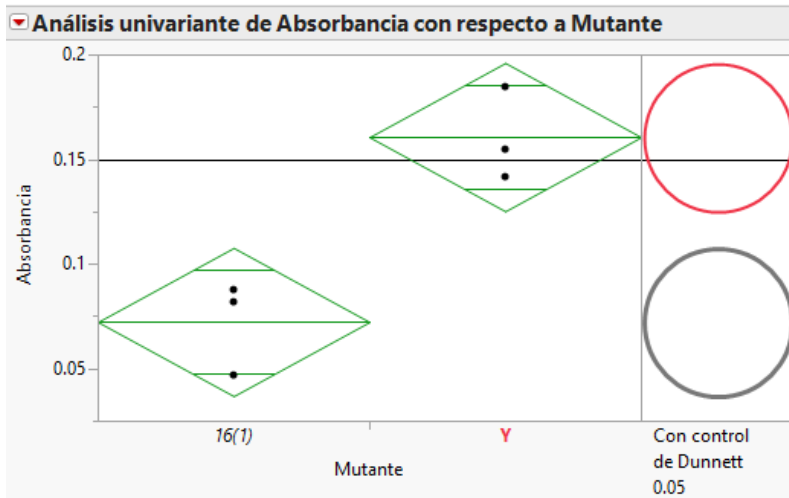


Figura 7-18 Comparación de medias de “absorbancia” de la cepa número #16(1) versus la cepa control Y

Tabla 7-11 Valores de p para la mutante de Y comparada con el control para la variable de respuesta “absorbancia”

**Comparaciones con control mediante el método de Dunnett**

Grupo control = Y

**Cuantil de confianza**

d	Alpha
2.77629	0.05

**Matriz de umbral LSD**

Nivel	(Dif) - LSD	Abs	Valor p
Y	-0.05	1.0000	
16(1)	0.038	0.0081*	

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

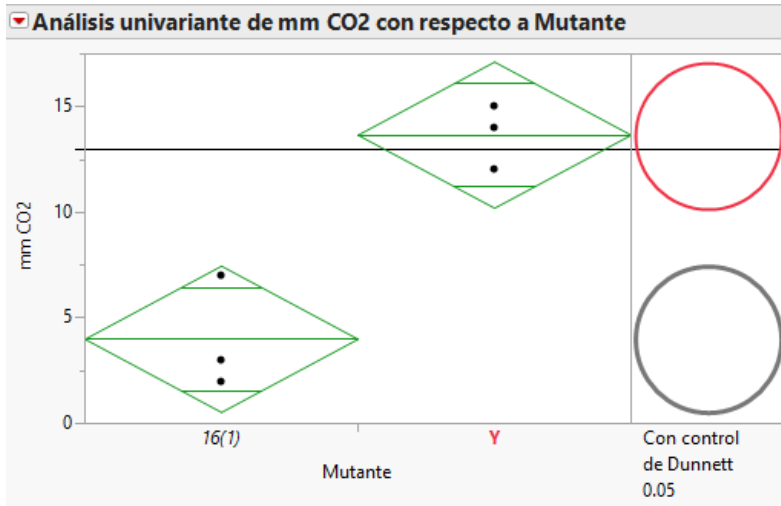


Figura 7-19 Comparación de medias de “CO<sub>2</sub> producido” de la cepa #16(1) versus la cepa control Y

Tabla 7-12 Valores de p para la mutante de Y comparada con el control para la variable de respuesta “CO<sub>2</sub> producido”

Comparaciones con control mediante el método de Dunnett

Grupo control = Y

Cuantil de confianza

d	Alpha
2.77629	0.05

Matriz de umbral LSD

Nivel	(Dif) - LSD	Abs	Valor p
Y	-4.9	1.0000	
16(1)	4.77	0.0054*	

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Para el caso de la cepas mutantes de 21, tanto la cepa reincidida a 1' como 1'30'' de luz UV resultaron con significancia estadística para los valores de absorbancia y de producción de CO<sub>2</sub> con respecto a su control Y. La cepa 21(1) tuvo menor rendimiento en la producción de biomasa (Figura 7-20) y ligeramente más producción de CO<sub>2</sub> (Figura 7-21), razón por la que no fue seleccionada para la etapa posterior.

Por su parte, la cepa 21(130), sometida a 1'30'' de luz UV, presentó mejores valores de absorbancia (Figura 7-20) y de mm de CO<sub>2</sub> (Figura 7-21); esta cepa sí se seleccionó para la prueba con el análogo de Leucina descrita en la sección 7.1.8.

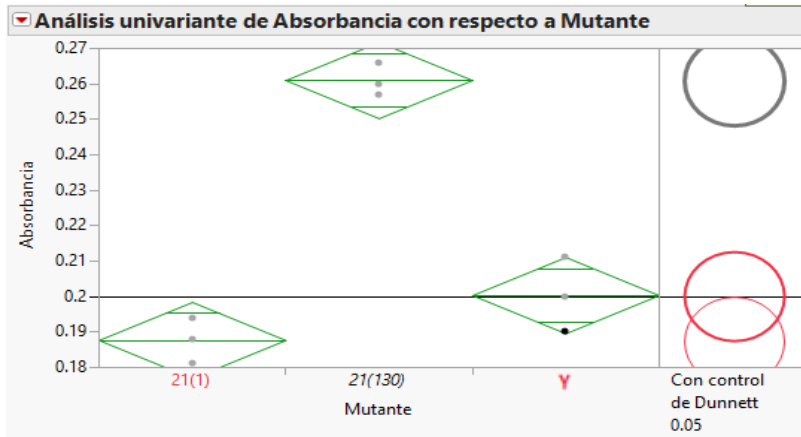


Figura 7-20 Comparación de medias de “absorbancia” de las cepas mutantes de #21 versus la cepa control Y

Tabla 7-13 Valores de p para las mutantes de Y comparadas con el control para la variable de respuesta “absorbancia”

**Comparaciones con control mediante el método de Dunnett**

Grupo control = Y

**Cuantil de confianza**

d	Alpha
2.86282	0.05

**Matriz de umbral LSD**

Nivel	Abs	
	(Dif) - LSD	Valor p
21(130)	0.043	0.0001*
Y	-0.02	1.0000
21(1)	-0.01	0.1476

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

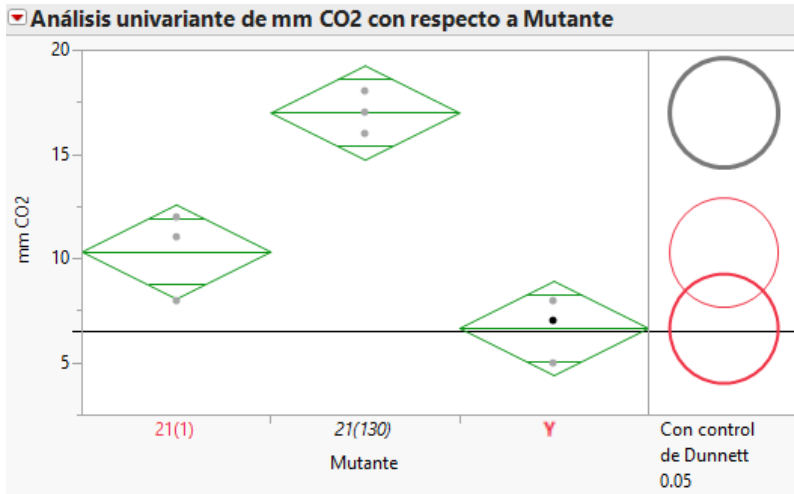


Figura 7-21 Comparación de medias de “CO<sub>2</sub> producido” de la cepas mutantes de #21 versus la cepa control Y

Tabla 7-14 Valores de p para las mutantes de Y comparadas con el control para la variable de respuesta “CO<sub>2</sub> producido”

**Comparaciones con control mediante el método de Dunnett**

Grupo control = Y

**Cuantil de confianza**

d	Alpha
2.86282	0.05

**Matriz de umbral LSD**

Nivel	(Dif) - LSD	Abs	Valor p
21(130)	6.597	0.0004*	
21(1)	-0.07	0.0536	
Y	-3.74	1.0000	

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

#### 7.4.5 Cepa de cerveza Z: Segunda fase de mutagénesis



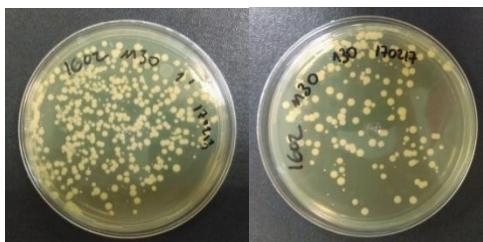


Figura 7-22 Mutantes de la cepa #30 seleccionada en la fase 1 que fueron sometidas a una segunda mutación a tiempos de exposición de 1' (izquierda) y 1'30'' (derecha).

Como se observa en la Figura 7-22, las mutantes de la cepa #30 sí crecieron después de la mutagénesis de 1' y 1'30'' con luz UV.

Con la prueba de Dunnett, la cepa #30 reincidida a 1' mostró significancia estadística para las medias de absorbancia solamente (Tabla 7-15 y Tabla 7-16). En la Figura 7-23 se aprecia menos producción de biomasa con respecto al control Z y en la Figura 7-27 se observa que la producción de gas CO<sub>2</sub> es la misma que la cepa control. En base a este análisis, se descartó el uso de esta cepa para siguientes etapas.

La cepa 30(130) presentó significancia estadística en las medias de absorbancia y mm de CO<sub>2</sub> evaluadas (Tabla 7-15 y Tabla 7-16). La producción de biomasa (Figura 7-23) y de dióxido de carbono (Figura 7-24) resultó mejor que la cepa Z, razón por la que se seleccionó esta mutante para pruebas posteriores.

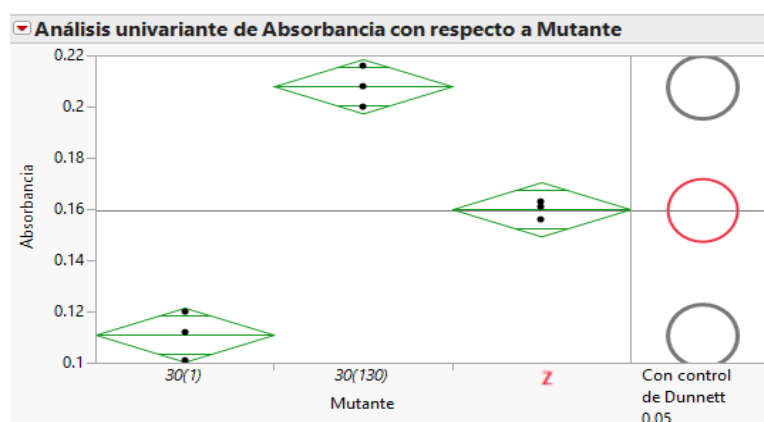


Figura 7-23 Comparación de medias de “absorbancia” de la cepa mutante de #30 versus la cepa control Z

Tabla 7-15 Valores de p para las mutantes de Z comparadas con el control para la variable de respuesta “absorbancia”

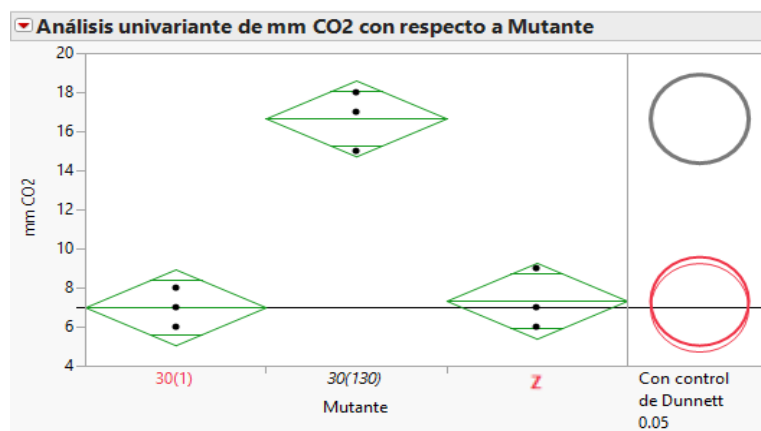


Figura 7-24 Comparación de medias de “CO<sub>2</sub> producido” de la cepa mutante de #30 versus la cepa control Z

Tabla 7-16 Valores de p para las mutantes de Z comparadas con el control para la variable de respuesta “CO<sub>2</sub> producido”

Comparaciones con control mediante el método de Dunnett

Grupo control = Z

Cuantil de confianza

d	Alpha
2.86282	0.05

Matriz de umbral LSD

Nivel	(Dif) - LSD	Abs	Valor p
30(130)	6.121	0.0003*	
Z	-3.21	1.0000	
30(1)	-2.88	0.9384	

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

## 7.5 Selección de cepas resistentes a TFL

Se preparó YNB en cajas Petri a tres concentraciones de TFL (0.21, 0.43 y 0.86 mM) de acuerdo por lo reportado por De Araújo-Vicente *et al.* en 2006 y Strejc *et al.* en 2013.

Se hizo una prueba utilizando la cepa mutante 21(130) y se sembró a las tres distintas concentraciones (Figura 7-25); se puede ver que la cepa creció a concentración de 0.21 y 0.43 mM de TFL, por lo que se prepararon más placas a estas concentraciones descartando 0.86 mM.



Figura 7-25 Prueba de mutagénesis realizada con mutante de cepa Y a diferentes concentraciones del análogo de leucina: 0.86, 0.43 y 0.21 mM (de izquierda a derecha)

### 7.5.1 Cepa de cerveza Y: 21(130)

La cepa 21(130) se sometió a mutagénesis con luz UV por 1'30'' y se sembró en dos placas, una a 0.21 mM y la otra a 0.43 mM de TFL. Las colonias sobrevivientes de las placas se aislaron en medio sólido y se les realizó la evaluación de producción de biomasa y CO<sub>2</sub> como se describió previamente en la sección 8.1.7 de la metodología. Las cepas mutantes obtenidas se renombraron de acuerdo a las concentraciones de TFL utilizadas, por ejemplo, 21(21) que hace alusión a la cepa mutante origen #21 sembrada en medio TFL de concentración 0.21 mM.

Al comparar las medias de absorbancia de las cepas 21(21) y 21(43) contra el control Y, se encontró significancia estadística para la cepa 21(43) solamente (Tabla 7-17). En la Figura 7-26 se observa que el rendimiento de la cepa 21(21) fue el mismo que el de la cepa silvestre mientras que la cepa 21(43) resultó en menor producción de biomasa que la cepa Y.

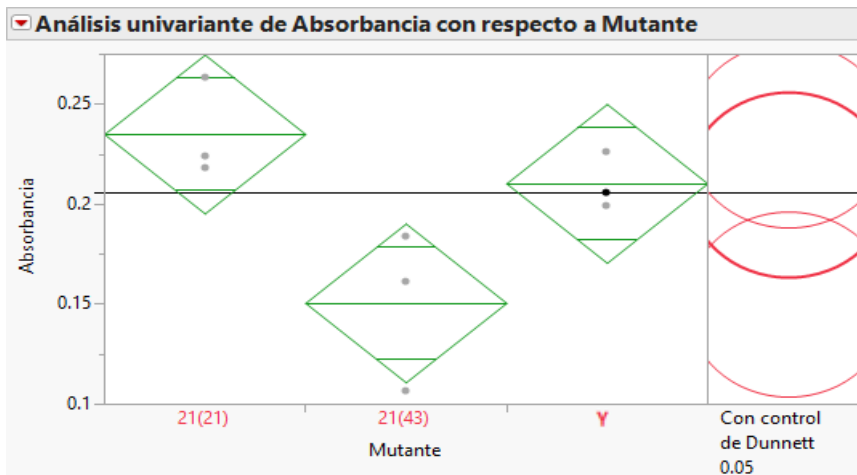


Figura 7-26 Comparación de medias de “absorbancia” de las cepas mutantes de #21 versus la cepa control Y

Tabla 7-17 Valores de p para las mutantes de Y comparadas con el control para la variable de respuesta “absorbancia”

Comparaciones con control mediante el método de Dunnett

Grupo control = Y

Cuantil de confianza

d	Alpha
2.86282	0.05

Matriz de umbral LSD

Nivel	(Dif)	Abs - LSD	Valor p
21(21)		-0.04	0.4960
Y		-0.07	1.0000
21(43)		-0.01	0.0698

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Analizando la producción de gas CO<sub>2</sub> por las mutantes 21(21) y 21(43) se reporta significancia estadística para ambas cepas (Tabla 7-18). La levadura 21(21) mostró resultados favorables de producción de CO<sub>2</sub> con respecto al control Y; por el contrario la cepa 21(43) produjo menos gas que la cepa silvestre (Figura 7-27).

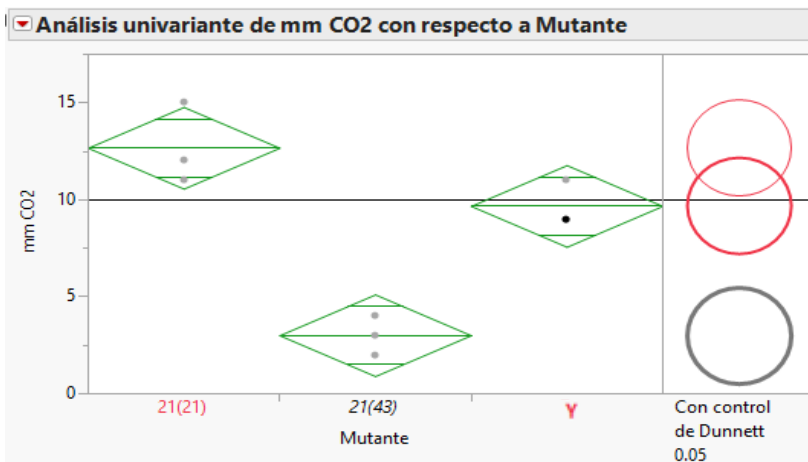


Figura 7-27 Comparación de medias de “CO<sub>2</sub> producido” de las cepas mutantes de #21 versus la cepa control Y

Tabla 7-18 Valores de p para las mutantes de Y comparadas con el control para la variable de respuesta “CO<sub>2</sub> producido”

**Comparaciones con control mediante el método de Dunnett**

Grupo control = Y

**Cuantil de confianza**

d	Alpha
2.86282	0.05

**Matriz de umbral LSD**

Nivel	(Dif)	Abs - LSD	Valor p
21(21)		-0.48	0.0839
Y		-3.48	1.0000
21(43)		3.182	0.0028*

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

### 7.5.2 Cepa de cerveza Z: 30(130)

A la cepa seleccionada 30(130) también se le reincidió luz UV por 1'30''. Los resultados de la evaluación de las dos cepas resistentes a TFL (30(21) y 30(43)) son los siguientes:

Todas las cepas mutantes obtenidas, tanto 30(21) como 30(43), presentaron significancia estadística al ser comparadas con el control Z en cuanto a las variables de respuesta absorbancia y mm de CO<sub>2</sub> (Tabla 7-19 y Tabla 7-20).

La cepa 30(21) mostró menores valores de absorbancia y producción de CO<sub>2</sub> con respecto a la cepa control (Figura 7-28 y 7-29); por el contrario las medias de levadura 30(43) de ambas variables de respuesta fueron superiores a la cepa Z.

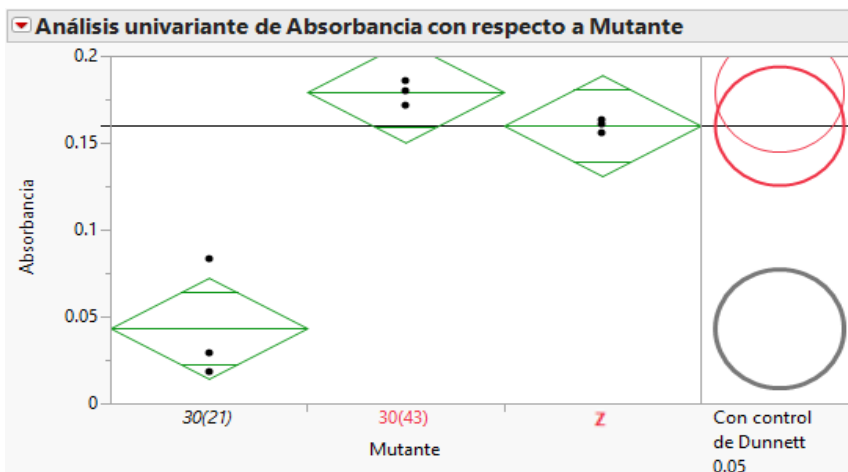


Figura 7-28 Comparación de medias de “absorbancia” de las cepas mutantes de #30 versus la cepa control Z

Tabla 7-19 Valores de p para las mutantes de Z comparadas con el control para la variable de respuesta “absorbancia”

**Comparaciones con control mediante el método de Dunnett**

Grupo control = Z

**Cuantil de confianza**

d	Alpha
2.86282	0.05

**Matriz de umbral LSD**

Nivel	(Dif) - LSD	Abs Valor p
30(43)	-0.01	0.1317
Z	-0.03	1.0000
30(21)	0.071	<.0001*

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

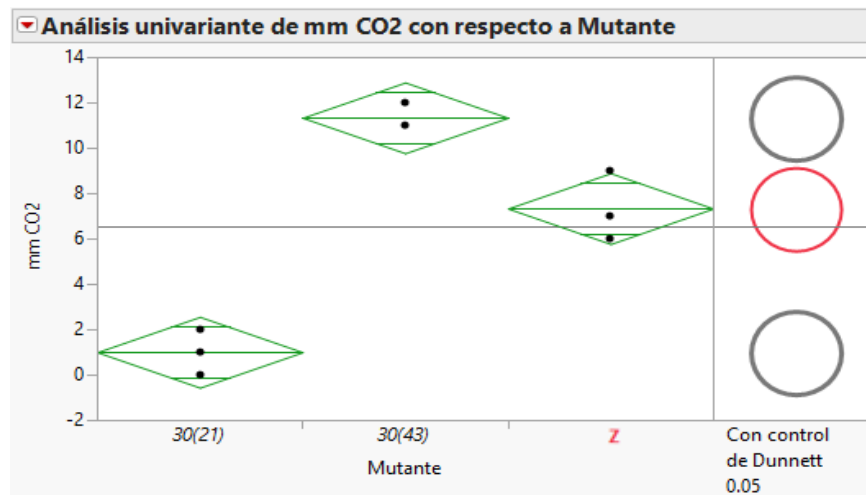


Figura 7-29 Comparación de medias de “CO<sub>2</sub> producido” de las cepas mutantes de #30 versus la cepa control Z

Tabla 7-20 Valores de p para las mutantes de Z comparadas con el control para la variable de respuesta “CO<sub>2</sub> producido”

Comparaciones con control mediante el método de Dunnett		
Grupo control = Z		
Cuantil de confianza		
d	Alpha	
2.86282	0.05	
Matriz de umbral LSD		
	Abs	
Nivel	(Dif) - LSD	Valor p
30(43)	1.416	0.0079*
Z	-2.58	1.0000
30(21)	3.749	0.0008*
Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.		

Las cepas 21(43) y 30(21) fueron descartadas para siguientes análisis.

El resumen de productividad de las cepas mutantes con características favorables de producción de biomasa y de gas dióxido de carbono con respecto a sus controles se describe en la Tabla 7-21.

Tabla 7-21 Características de las cepas mutantes analizadas

Cepa	Promedio de absorbancia	Producción de biomasa con respecto al control	Promedio de mm de CO <sub>2</sub>	Producción de CO <sub>2</sub> con respecto al control
21(130)	0.235	24.09%	17.0	75.86%
21(21)	0.261	11.73%	12.7	31.03%
Y	0.200		9.7	
30(130)	0.208	30.00%	16.7	127.27%
30(43)	0.179	12.08%	11.3	54.55%
Z	0.160		7.3	

## 7.6 Microfermentaciones

Después de la fase de selección de cepas por medio de la evaluación de producción de biomasa, CO<sub>2</sub> y resistencia al análogo de leucina (TFL), se utilizaron estas cepas para



elaborar cerveza a pequeña escala y someter las muestras a evaluación sensorial con panel entrenado. A partir de los resultados previos se seleccionaron 6 cepas (Tabla 7-22).

Tabla 7-22 Características de las cepas que se seleccionaron para las microfermentaciones

Nombre de cepa	Característica
21(130)	Mayor crecimiento y mayor producción de CO <sub>2</sub> que la cepa control
21(21)	Mismo crecimiento y mayor producción de CO <sub>2</sub> que la cepa control
Y	Cepa control
30(130)	Mayor crecimiento y mayor producción de CO <sub>2</sub> que la cepa control
30(43)	Mayor crecimiento y mayor producción de CO <sub>2</sub> que la cepa control
Z	Cepa control

Durante la elaboración de la cerveza a pequeña escala se enumeran algunos datos considerados:

- El control de la temperatura durante el proceso de elaboración de la cerveza fue determinante; la primera vez que se preparó el mosto, se usó la estufa, sin embargo, el agua se evaporó quedándose el mosto con una consistencia chiclosa y espesa. En un segundo intento por preparar los tratamientos, se utilizó un plato caliente (fue posible mantener la temperatura en un valor) y se acertó el tiempo de ebullición del mosto que establecía el kit de cerveza de 18 L de rendimiento (de una hora a 15 minutos).
- Se prepararon los tratamientos con dos gravedades específicas como se había planteado en la sección 6.1.9: gravedades iniciales de 15 y 17 °P.
- Se inoculó el mosto con las cepas almacenadas en solución salina.

- Los tubos Falcon donde se colocaron los distintos tratamientos tenían un orificio en la parte del centro de la tapa por donde se colocó una manguera de silicón para la salida del CO<sub>2</sub> durante la fermentación (Figura 7-30).
- La cerveza en los diferentes tratamientos no se carbonató para evitar enmascarar los sabores indeseables que pudieran haberse formado. Se enfrió a 4 °C y así se le sirvió al panel entrenado para su análisis.



Figura 7-30 Fermentaciones en tubos Falcon dentro de la incubadora

#### 7.6.1 Evaluación sensorial con panel entrenado

Como se mencionó en la metodología, para mantener las cepas vivas antes de inocularlas al mosto, éstas se mantuvieron en solución salina y así se inocularon. Esto repercutió en el sabor de los tratamientos preparados pues los evaluadores reportaron salinidad en todas las muestras catadas.

Se les solicitó a los evaluadores seleccionar las muestras que presentaran las mejores características de una cerveza artesanal en cuanto a sabor, aroma y cuerpo. Ellos eligieron las siguientes muestras:

- Cepa 21(21) – gravedad específica de 17 °P

- Cepa 30(130) – gravedades específicas de 15 y 17 °P
- Cepa control Y – gravedades específicas de 15 y 17 °P
- Cepa control Z – gravedad específica de 17 °P

Todos los tratamientos fueron evaluados y los evaluadores les asignaron descriptores a cada muestra. En la Tabla 7-23 se muestran los descriptores de las 4 cepas seleccionadas por el panel evaluador:

Tabla 7-23 Características de las cepas seleccionadas tras la evaluación sensorial

Nombre de cepa	Característica
Y	Sabor a cereza, miel, pan, sabor a clavo, ligero aroma dulce.
21(21)	Presencia de fenoles, sabor a pera, plátano, mango, durazno.
Z	Sabor y aroma a pan, durazno, ligera presencia de alcohol.
30(130)	Ligero amargor, aroma fenólico, sabor a pan y frutas maduras, sabor especiado (clavo).

Se observó que el factor gravedad específica no fue importante por lo que se decidió preparar los lotes a gran escala con una sola densidad, es decir, solo tomar en cuenta el factor “cepa”.

## 7.7 Macrofermentaciones



Figura 7-31 Fermentaciones en recipientes de plástico de 5 L dentro de la incubadora

La unidad experimental fue cada lote de cerveza que correspondía que se inoculó con diferente cepa. No hubo repeticiones genuinas debido a la falta de recursos durante el proyecto.

Como ya se mencionó anteriormente, el factor cepa fue el único que se modificó al preparar los tratamientos a evaluar a gran escala. Es importante destacar que:

- La gravedad específica inicial de los mostos a inocular fue de 14 °P.
- La temperatura de fermentación fue de 23 °C.
- Las cepas vivas fueron ajustadas a una misma concentración y se almacenaron en solución salina durante unas horas antes de ser inoculadas, sin embargo, se enjuagaron con agua destilada estéril para no aportar “sal” al producto terminado.

### 7.7.1 Análisis de pH durante la fermentación

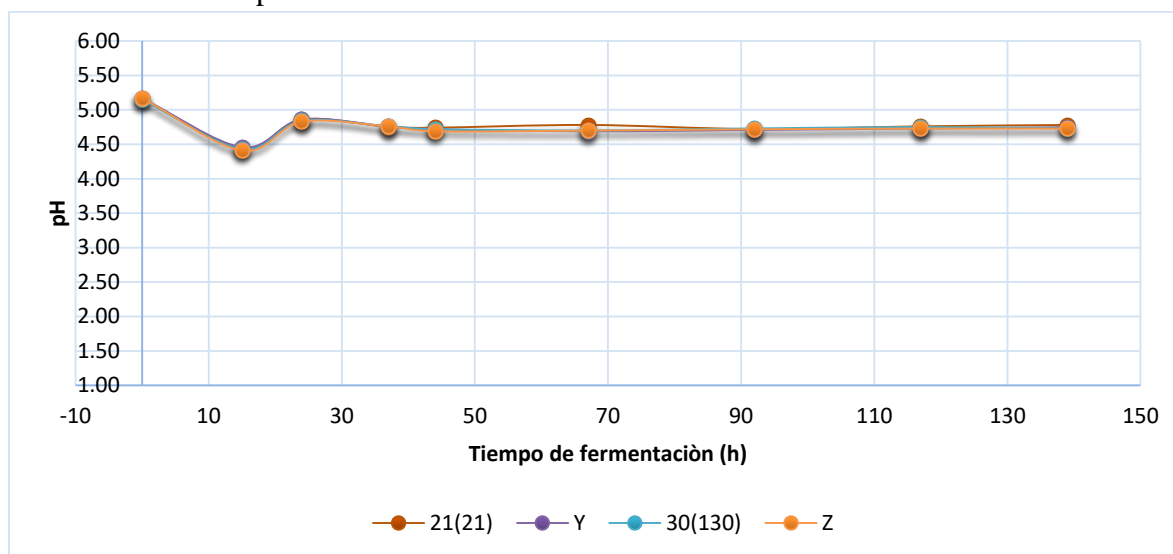


Figura 7-32 Valores de pH reportados para las 4 cepas durante la fermentación de cerveza

Los valores de pH se comportaron de manera muy similar durante la fermentación para las cuatro cepas utilizadas (Figura 7-32). Recién preparado el mosto, el pH medido fue de 5.15 y 90 horas después, era de aproximadamente 4.7 para todos los tratamientos.

La disminución de pH de las primeras 15 horas de la fermentación sucedió como resultado del consumo de carbohidratos así como la producción de dióxido de carbono. El pH reportado para el mosto inicial de cervezas tipo Ale es de 5.1 y después de la fermentación entre 4.2 y 4.4, de acuerdo con Layfield y Sheppard en 2015. El valor de pH inicial de este proyecto coincide con el citado en la literatura y en el caso del pH final, este se encuentra 0.3 por encima de lo que citan estos investigadores. La diferencia entre pH final e inicial es de 0.37 puntos. Además, Layfield y Sheppard reportan que la levadura es capaz de tolerar un descenso hasta de 1.5-2.0 puntos de pH, por lo que se considera que no se afectó el funcionamiento de las cepas.

### 7.7.2 Análisis de azúcares reductores durante la fermentación

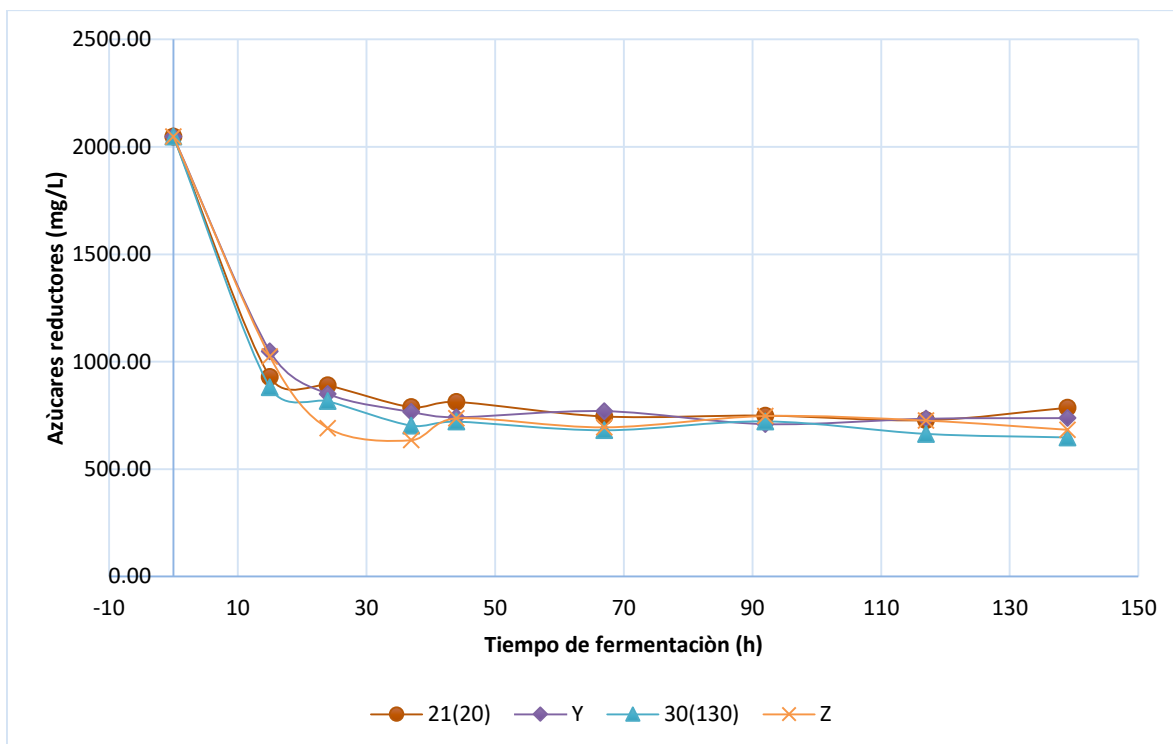


Figura 7-33 Contenido de azúcares reductores de las 4 cepas durante la fermentación de cerveza

Se observó un patrón similar de consumo de azúcares para las 4 cepas evaluadas. El contenido de azúcares reductores inicial de los cuatro mostos fue de 2120 mg/L. Después de la fermentación, los valores de azúcares reductores para las muestras de las 4 cepas estuvieron en el rango de 647 y 785 mg/L (Figura 7-33). El contenido máximo de azúcares reductores se encontró en la muestra con la cepa 21(21) (785 mg/L) mientras que el mínimo se presentó en la cerveza con la mutante 30(130).

En la Figura 7-33 se observa que existe una disminución significativa de los azúcares reductores (glucosa) en las primeras 15 horas de la fermentación para las cuatro cepas, lo cual indica que se había consumido aproximadamente el 56% de la glucosa disponible en este tiempo. Lo anterior se explica porque el consumo de glucosa por la levadura, es energéticamente más fácil debido a que este atraviesa fácilmente la membrana celular sin la necesidad de permeasas y además dentro de la célula no se necesitan enzimas (glucosidasas)

para que comience la glucólisis. Por el contrario, cuando se consume maltosa y maltotriosa, es necesario el uso de enzimas para ingresar al interior celular y es necesario el uso de glucosidasas para ser convertida en glucosa y comenzar su consumo. Las enzimas para el consumo de disacáridos se suprimen cuando hay una concentración alta de glucosa en el medio de fermentación (>1% p/v) y sólo es hasta que se consume el 40-50% de la glucosa que termina la represión de la glucosa y pueden ser consumidos estos carbohidratos por la levadura (Lewis y Bamforth, 2006).

Al comparar los resultados obtenidos con otros trabajos se encontró que otros grupos de investigación o no reportaron el azúcar estándar que utilizaron con la técnica de DNS o se usó otro azúcar como maltosa, por ejemplo. Hiralal *et al.* en 2014 reportaron un contenido final de azúcares reductores (~800 mg/L) para una cepa no mutante tipo Ale después de haber pasado 120 horas de fermentación estudiando tratamientos con distintos factores: temperatura de fermentación, pH de fermentación y el uso de cofactores como Leucina. No se menciona el estándar para la curva de calibración.

### 7.7.3 Contenido de nitrógeno libre durante la fermentación

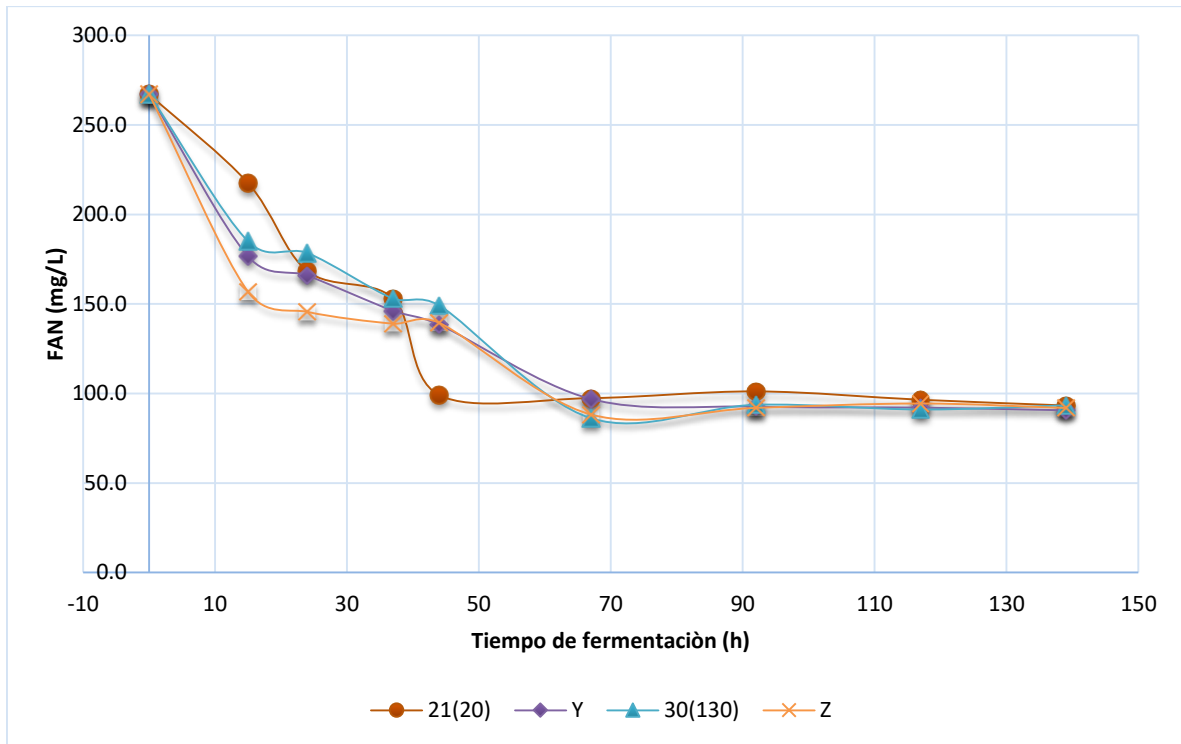


Figura 7-34 Perfil de FAN de las 4 cepas durante la fermentación de cerveza

En la Figura 7-34 se observan distintos comportamientos del consumo de FAN para las cuatro cepas tratadas. A pesar de esto, el contenido de FAN inicial en el mosto comenzó en el mismo punto para las 4 cepas (267 mg/L) y culminó con la fermentación en el día 7 también el mismo punto (90-93 mg/L). No obstante, la cepa Z consumió más nitrógeno amino libre que las otras tres cepas en las primeras 15 horas de fermentación y después de la hora 37 siguió el mismo patrón que las levaduras 30(130) y Y. Este comportamiento de mayor consumo de nutrientes de la cepa Z concuerda y se observó en la Figura 7-33 de azúcares reductores después de la hora 15 y hasta la hora 37.

Por el contrario la cepa que se adaptó menos al medio fue la mutante 21(21) pues su consumo de FAN fue lento en las primeras 15 horas. También es importante hacer notar que el valor de FAN de la cepa 21(21) en la hora 44 se explica como un error en la medición por parte del investigador, ya que este punto modifica el perfil del metabolismo del microorganismo, y se le atribuye al muestreo del mosto.



Para las 4 cepas, el consumo de FAN terminó en la hora 67 de la fermentación (Figura 7-34), aproximadamente, pues es a partir de este momento cuando se aprecia una línea recta continua en el contenido de estos compuestos. Lewis y Bamforth en 2006 explican que el consumo de FAN termina durante la fermentación cuando la proliferación celular concluye y se acumulan productos del microorganismo o se agota el consumo de nutrientes (carbohidratos o aminoácidos disponibles). El contenido de azúcares reductores también se mantuvo estable después de 67 horas de fermentación de acuerdo con la Figura 7-33.

Saerens *et al.* en 2008 realizaron un estudio con una cepa industrial Ale variando temperatura de fermentación y gravedades específicas. En cuanto al consumo de FAN de esta cepa específicamente a 24°C y 14°P (condiciones similares a las de este proyecto: 23°C y 13°P) el contenido inicial de FAN fue de 320 mg/L y culminó después de 144 horas en 50 mg/L. Se observa en su gráfico un descenso en el contenido de FAN hasta la hora 60 a partir del cual se mantiene estable el valor de 60 mg/L y que corresponde al 4 °P en el mosto. Este comportamiento es distinto al de las levaduras de este proyecto pues ellas consumieron menos nitrógeno amino libre y en la hora 60 el contenido de FAN era de aproximadamente 100 mg/L para las 4 cepas evaluadas. Para poder realizar la comparación más profunda se necesitaría evaluar la densidad celular en el mosto por períodos para poder especular sobre el estado fisiológico de las cepas de este proyecto.

## 7.8 Medición de color y espuma en el producto terminado

La apariencia de la cerveza es un factor importante de la calidad de la bebida y es por eso que se realizaron mediciones de color y estabilidad de la espuma. Se hizo la comparación de color y espuma de la cerveza comercial a partir de donde se extrajeron las levaduras contra las cervezas elaboradas para este proyecto utilizando tanto las cepas mutantes (21(21) y 30(130)) como sus controles Y y Z.

Debido a que los tratamientos se prepararon con los mismos ingredientes, los perfiles de color resultaron similares en todas las muestras. Se encontró significancia estadística para todas las cepas comparadas: 21(21), 30(130) y las cepas silvestres Y y Z (Tabla 7-24 y Tabla 7-25).

Los valores de absorbancia registrados por las cervezas artesanales para esta investigación fueron mayores que las cervezas comerciales control (Figura 7-35 y Figura 7-36). La diferencia significativa entre el color de las muestras comerciales comparadas con nuestras muestras preparadas se explica debido a los ingredientes utilizados (se desconocen las condiciones de operación de las cervezas control) y porque nuestros tratamientos no tuvieron una clarificación ni adición de estabilizadores, solamente trasvase como se indicó en la metodología. El color y turbidez de la cerveza se atribuye a las materias primas utilizadas y las condiciones del proceso de elaboración de la bebida. Durante la ebullición del mosto, ocurren reacciones de pardeamiento no enzimático (reacciones de Maillard) entre aminoácidos libres presentes en el medio y azúcares reductores (como glucosa o maltosa). La formación de melanoidinas por estas reacciones incrementa el color del mosto y por ende el color final de la cerveza (Lewis y Bamforth, 2006).

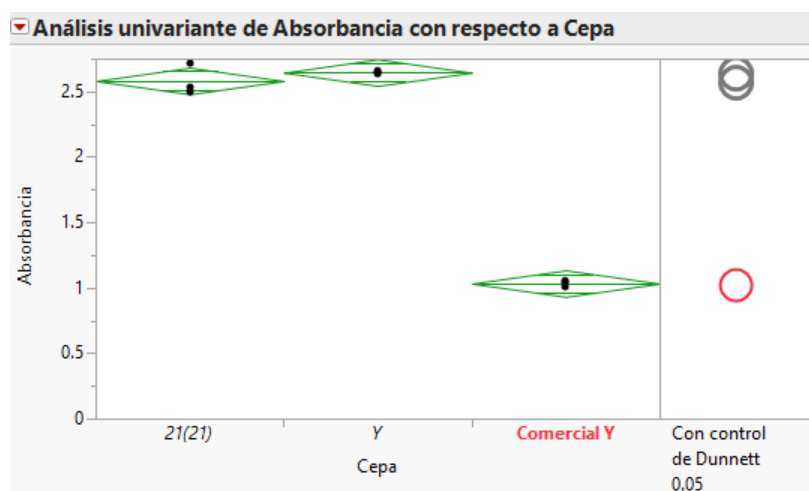


Figura 7-35 Comparación de medias de “absorbancia” de la cepa mutante de 21(21) versus la cepa control Y

Tabla 7-24 Valores de p para las mutantes de Y comparadas con el control para la variable de respuesta “absorbancia”

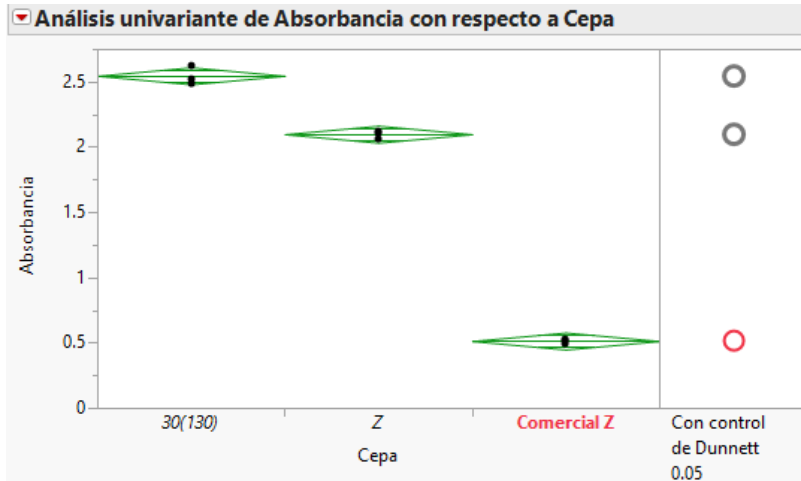


Figura 7-36 Comparación de medias de “absorbancia” de la cepa mutante de 30(130) versus la cepa control Z

Tabla 7-25 Valores de p para las mutantes de Z comparadas con el control para la variable de respuesta “absorbancia”

Cuantil de confianza	
d	Alpha
2.86282	0.05

Nivel	Abs	
	(Dif) - LSD	Valor p
30(130)	-0.19	1.0000
Comercial Z	-0.19	1.0000
Z	0.042	0.0227*

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Con respecto a la espuma presente en la cerveza, ésta depende de las materias primas utilizadas en el proceso, primordialmente malta, adjuntos y lúpulo. La formación de burbujas es producto de interacciones hidrofóbicas entre cadenas laterales de los  $\alpha$ -isoácidos y polipéptidos anfipáticos (Lewis y Bamforth, 2006). Particularmente en este proyecto como ya se planteó anteriormente, los ingredientes utilizados para los tratamientos fueron los mismos, el único factor cambiante fue la cepa inoculada y se observa en las Figuras 7-37 y 7-38 que la cepa fue determinante en la formación de espuma pues tenía distintas características de carbonatación cada una de ellas.

Se realizó la prueba de Dunnett para las medias de espuma en cm de las cervezas con cepas mutantes, silvestres y las cervezas control (Tabla 7-26 y Tabla 7-27). Todas las cepas presentan significancia estadística.

Como se observa en la Figura 7-37, la espuma de la cerveza con las cepas 21(21) y Y quedaron por debajo de la que se registró para la cerveza artesanal comercial Y; la espuma de la cepa mutante 21(21) fue menos estable aún.

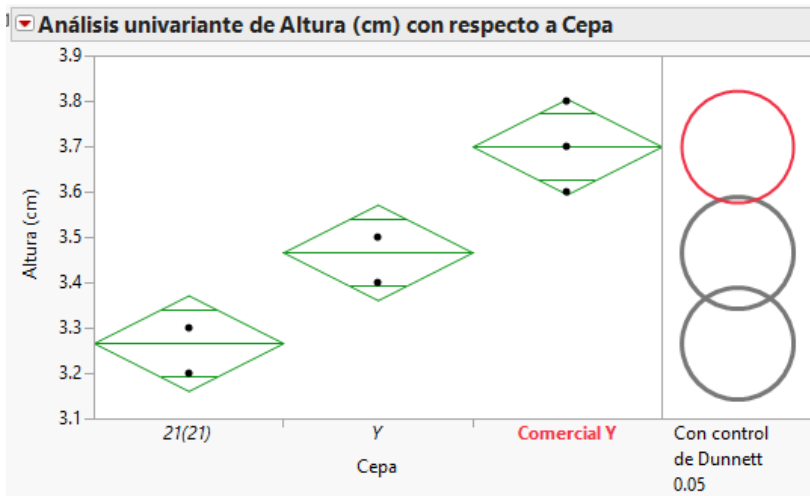


Figura 7-37 Comparación de medias de “espuma”<sup>2</sup> producida por la cepa mutante de 21(21) comparada con la cepa control Y

Tabla 7-26 Valores de p para las mutantes de Y comparadas con el control para la variable de respuesta “espuma”

**Comparaciones con control mediante el método de Dunnett**

Grupo control = Comercial Y

**Cuantil de confianza**

d	Alpha
2.86282	0.05

**Matriz de umbral LSD**

Nivel	Abs	
	(Dif) - LSD	Valor p
Y	1.444	<.0001*
21(21)	1.38	<.0001*
Comercial Y	-0.17	1.0000

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

<sup>2</sup> Medida en cm

La cerveza con la cepa 30(130), que presentó mejor carbonatación que la cepa control Z en los experimentos previos, reporta la misma altura de espuma que la cerveza comercial y mayores valores que la cepa silvestre Z (Figura 7-38).

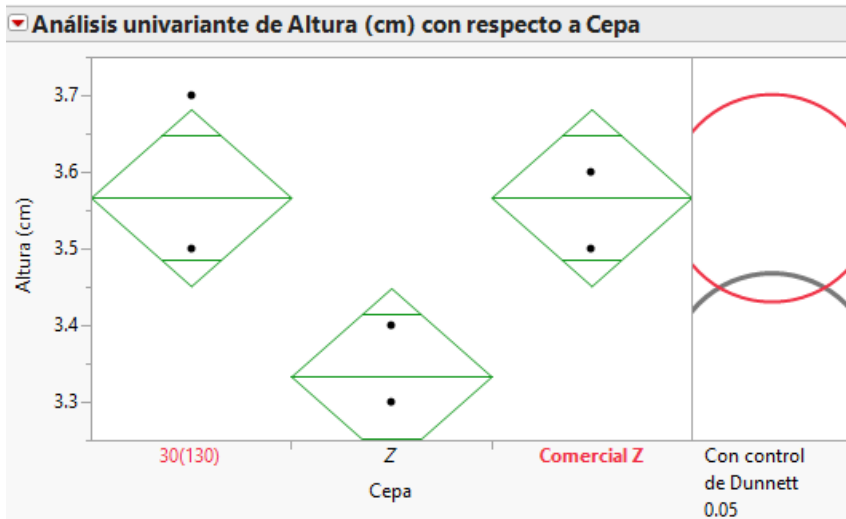


Figura 7-38 Comparación de medias de “espuma” producida por cepa mutante de 30(130) comparada con la cepa control Z

Tabla 7-27 Valores de p para las mutantes de Z comparadas con el control para la variable de respuesta “espuma”

**Comparaciones con control mediante el método de Dunnett**

Grupo control = Comercial Z

**Cuantil de confianza**

d	Alpha
2.86282	0.05

**Matriz de umbral LSD**

Nivel	Abs	
	(Dif) - LSD	Valor p
30(130)	1.925	<.0001*
Z	1.477	<.0001*
Comercial Z	-0.11	1.0000

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

## 7.9 Evaluación sensorial con consumidores

El Comité de Bioética aprobó la aplicación y formatos de la evaluación sensorial de los tratamientos de cerveza con 30 consumidores (ver Apéndice).

De los 30 panelistas participantes, el 37% correspondió a mujeres y el 63% a hombres. Debido a que Gómez-Corona *et al.* (2016) encontraron que el sexo es un factor sociodemográfico que influye en el consumo de cerveza y bebidas alcohólicas en general, se hizo el Análisis de Componentes Principales (PCA) por sexo. Además, se realizó el análisis de 3 Componentes Principales para recuperar el mayor porcentaje de varianza de los datos.

### 7.9.1 PCA correspondiente a mujeres

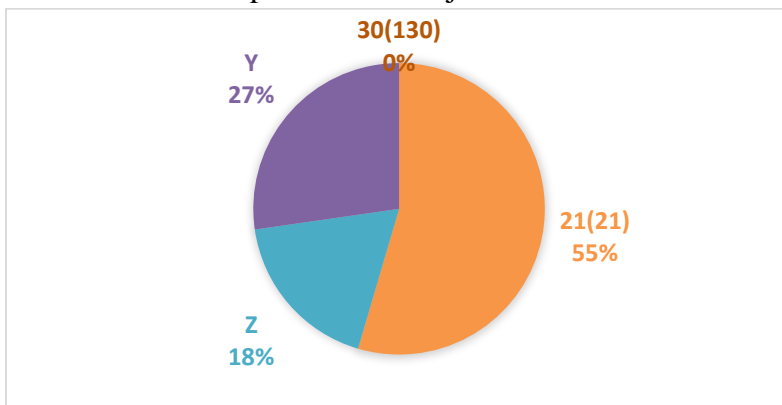


Figura 7-39 Gráfica circular del atributo "Aceptabilidad General"

El 55% de las mujeres encuestadas (11 mujeres) opinó que la mejor muestra era la cerveza con la cepa mutante 21(21) (Figura 7-39).

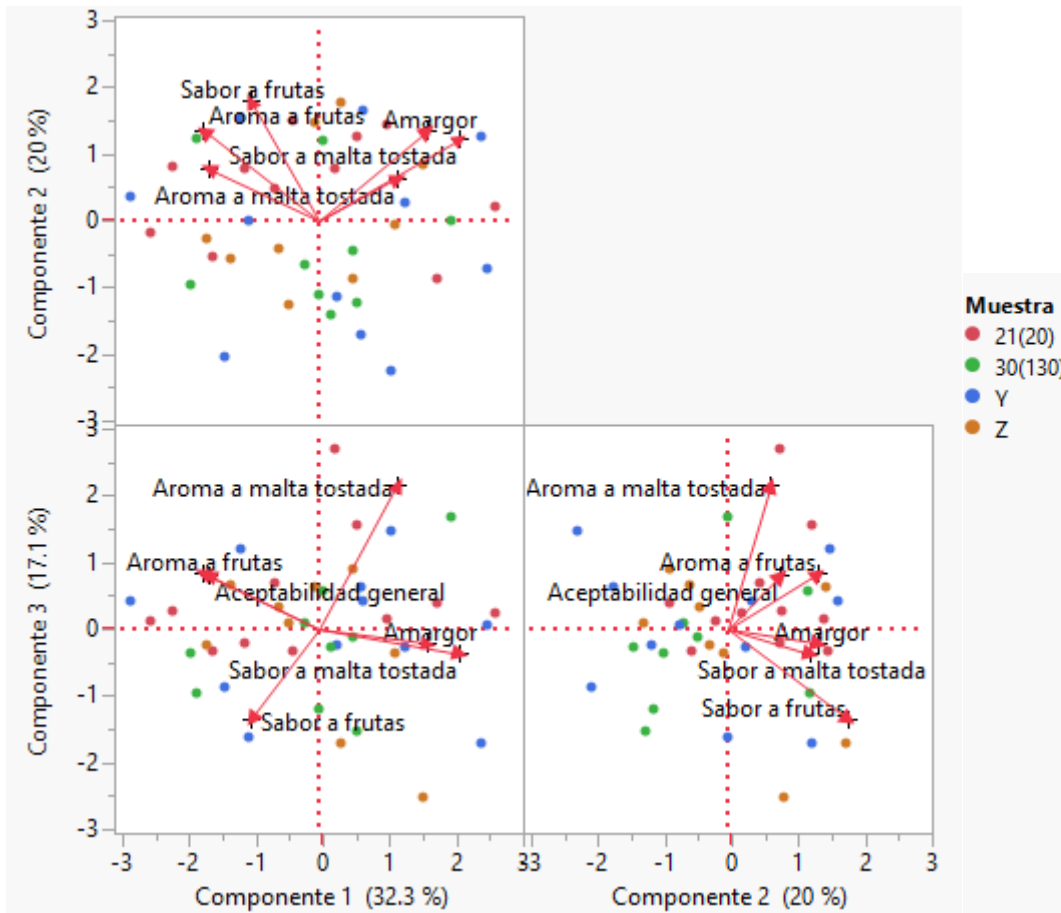


Figura 7-40 Gráfico de cargas factoriales con 3 Componentes Principales

La Figura 7-40 muestra las cargas de factoriales donde se encuentran el PC1, PC2 y PC3. Se observa que el PC1 recupera el 32.3% de la varianza, el PC2 recupera un 20% de ésta y el PC3 un 17.1% (69.4% en total).

El PC1 posee dos polos y se podría llamar “nivel de agrado por las consumidoras mexicanas”, donde del lado derecho están las características de una cerveza más intensa con sabores a café y mayor amargor mientras que del lado izquierdo se encuentran los atributos de cervezas de percepción dulce y frutal que significan agrado entre las panelistas. Por su parte, el PC2 tiene un solo polo; del lado positivo se encuentran los atributos sensoriales perceptibles en la cerveza por las mujeres encuestadas. Asimismo, el PC3 tiene dos polos y divide a las



muestras con características aromáticas o sensoriales en boca, del lado superior están los aromas percibidos y del lado inferior los sabores catados (Figura 7-40).

### 7.9.2 PCA correspondiente a hombres

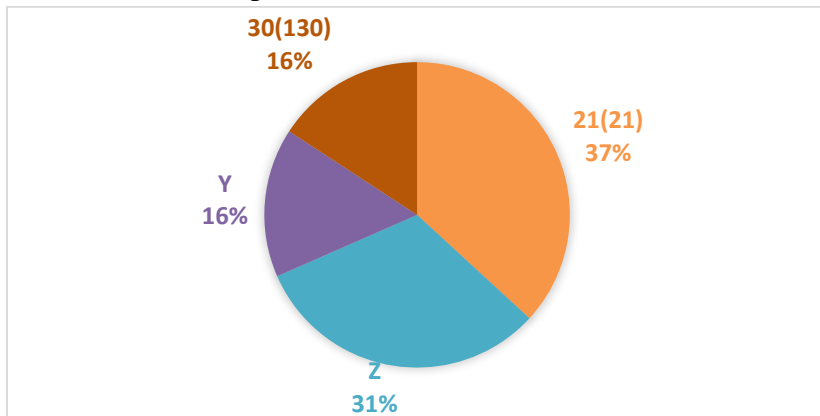


Figura 7-41 Gráfica circular del atributo “Aceptabilidad General”

El 37% de los hombres participantes (19 hombres) opinó que la mejor muestra era la cerveza con la cepa 21(21) (Figura 7-41).

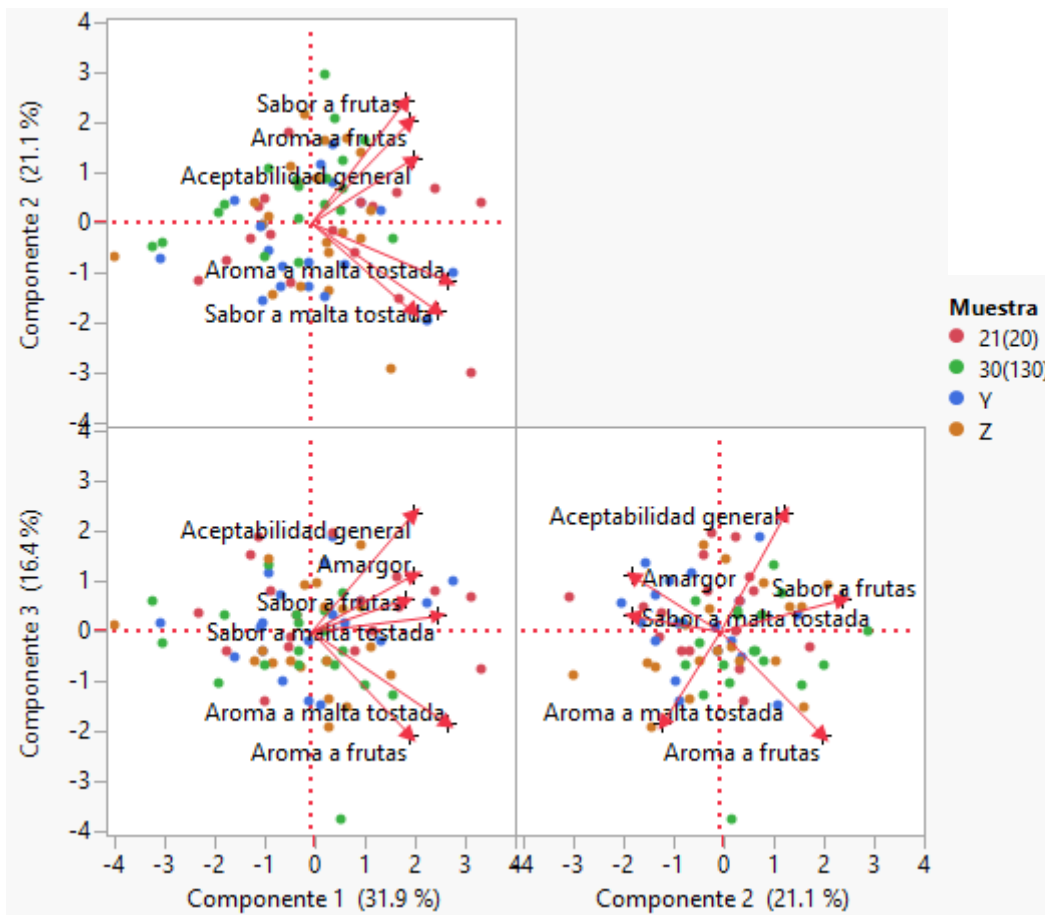


Figura 7-42 Gráfico de cargas factoriales con 3 Componentes Principales

La Figura 7-42 muestra las cargas de factoriales donde se encuentran el PC1, PC2 y PC3. Se observa que el PC1 recupera el 31.9% de la varianza, el PC2 recupera un 21.1% de ésta y el PC3 un 16.4% (69.4% en total).

El PCA resultó diferente para los hombres participantes. El PC1 solo tiene un polo, del lado positivo están los atributos de sabor y aroma perceptibles en las muestras por los hombres encuestados. Por otra parte, el PC2 posee dos polos y divide a las cervezas de características de aroma y sabor frutales con aquellas de sensación amarga y a malta tostada. Por último, el PC3 se podría llamar “nivel de agrado de los consumidores mexicanos”. Este componente describe cómo las muestras fueron percibidas por los hombres, si con mayor sabor o de aroma

intenso: del lado superior se encuentran los sabores y aceptabilidad general y en el lado inferior se aprecian los aromas a malta tostada y frutas.

### 7.9.3 Análisis de resultados de PCA

La alta dispersión de las muestras en el centro de las Figuras 7-40 y 7-42 se puede explicar por varios factores. En primer lugar, al reclutar a los consumidores se les preguntó una frecuencia de consumo pero se desconoce si ellos muestran preferencia por cervezas comerciales más que por artesanales. Otro factor importante que considerar es la exposición previa que hayan tenido los panelistas hacia cervezas artesanales. Gómez-Corona *et al.* (2017a) explican que la representación mental está influenciada directamente por el conocimiento previo y familiaridad de las personas con un producto: la representación mental de cerveceros expertos es más compleja que aquella de novatos.

También, en las gráficas de PCA se observaron diferentes comportamientos en hombres al compararse con mujeres respecto a las cervezas evaluadas. El PC1 de las mujeres (Figura 7-40) determina el nivel de agrado de las participantes hacia las muestras catadas mientras que el PC1 de los hombres (Figura 7-42) relacionó las muestras proporcionadas con los descriptores dados. Posteriormente, los PC2 y PC3 explicaron la manera en que los hombres y las mujeres panelistas percibieron las cervezas: las mujeres clasificaron las muestras en cervezas aromáticas de cervezas con mayor sensación de sabor en boca (PC3). Por su parte los hombres formaron el grupo de cervezas frutales o cervezas intensas (PC2) y también diferenciaron un segundo grupo que incluyó cervezas en las que se percibe más el sabor amargo, a malta tostada y frutas que les agradó más y otro bloque de cervezas donde los aromas son superiores pero que les agradó menos (PC3).

La diferencia en patrones se explica ya que los hombres consumen más cerveza que las mujeres y están más familiarizados con las cervezas artesanales; los hombres han desarrollado mayor representación mental de las cervezas artesanales que las mujeres porque las consumen más que ellas (Gómez-Corona *et al.*, 2017b). También, Mejholm y Martens en 2006 encontraron que cervezas de especialidad tipo Ale de sabores son más aceptadas por hombres que por mujeres quienes prefieren una cerveza lager.

Por otra parte el hecho de que el PC1 corresponda al nivel de agrado en mujeres concuerda con lo encontrado por Gómez-Corona *et al.* (2017b) quienes explican que las mujeres hacen una clasificación de las cervezas basada en un origen afectivo mientras que los hombres se enfocan en la experiencia previa del producto, la decisión parte de un origen cognitivo y de conocimiento.

## 8. CONCLUSIONES

- La técnica de mutagénesis aleatoria con exposición de luz UV de 1'30'' sobre las levaduras silvestres permitió obtener 4 cepas mutantes (21(130), 21(21), 30(130) y 30(43)) con características mejoradas de producción de biomasa y de CO<sub>2</sub>. Dos de estas cepas (30(130) y 21(21)) se aislaron del medio suplementado con 0.21 mM de TFL.
- Los sistemas de selección de cepas funcionaron ya que se obtuvieron dos mutantes con características mejoradas de producción de CO<sub>2</sub> y biomasa respecto a sus cepas control. La cepa 21(21) impartió características frutales en la cerveza; tuvo un 43% de preferencia por los participantes de la evaluación sensorial y produjo misma biomasa y 31% más de CO<sub>2</sub> que la cepa control. La cerveza de la cepa 30(130) aunque fue elegida como la mejor por el 10% de los consumidores pudiera ser dirigida al segmento de mercado que gusta del amargor en la bebida. La cepa se caracterizó por producir 30% más de biomasa y 127% más de CO<sub>2</sub> que la cepa control.
- No se observaron diferencias significativas durante la fermentación del mosto al comparar las cepas mutantes con las levaduras silvestres.

## 9. REFERENCIAS

- Almaguer, C., Schönberger, C., Gastl, M., Arendt, E. K., y Becker, T. (2014). *Humulus lupulus*—a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(4), 289-314.
- AOAC International. (2000). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17th edition. Gaithersburg, MD, USA, Association of Analytical Communities.
- Balakumar, S., Arasaratnam, V., y Balasubramaniam, K. (2001). Isolation and improvement of a thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(7), 739-746.
- Beer Store. (2016). Beer Types and Styles. Mayo 21, 2016, de Beer Store Sitio web: <http://www.thebeerstore.ca/beer-101/beer-types>
- Blieck, L., Toye, G., Dumortier, F., Verstrepen, K. J., Delvaux, F. R., Thevelein, J. M., y Van Dijck, P. (2007). Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 815-824.
- Bos, C. J., Debets, A. J. M., Nachtegaal, H., Slakhorst, S. M., & Swart, K. (1992). Isolation of auxotrophic mutants of *Aspergillus niger* by filtration enrichment and lytic enzymes. *Current Genetics*, 21(2), 117-120.
- Briggs, D.E, Brookes, P. A., Stevens, R. y Boulton, C.A. (2004). *Brewing: Science and Practice*. Florida, Estados Unidos: Elsevier.
- Burton, T. (2015). The geography of Mexico's beer industry. Mayo 28, 2016, de Geo-Mexico Sitio web: <http://geo-mexico.com/?p=2390>
- Calderbank, J., y Hammond, J. (1994). Influence of higher alcohol availability on ester formation by yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 52(2), 84-90.

- Charry-Parra, G., DeJesus-Echevarria, M., & Perez, F. J. (2011). Beer volatile analysis: optimization of HS/SPME coupled to GC/MS/FID. *Journal of Food Science*, 76(2), 205-211.
- De Araújo Vicente, M., Fietto, L. G., de Miranda Castro, I., Dos Santos, A. N. G., Coutrim, M. X., & Brandao, R. L. (2006). Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of “cachaça” the Brazilian sugarcane spirit. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1), 51-59.
- Dinh, T. N., Nagahisa, K., Hirasawa, T., Furusawa, C., y Shimizu, H. (2008). Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* cells to high ethanol concentration and changes in fatty acid composition of membrane and cell size. *PLoS One*, 3(7), e2623.
- Dufour, J., Malcorps, P., y Silcock, P. (2003). Control of ester synthesis during brewery fermentation. En: K. Smart (Ed.), *Brewing Yeast Fermentation Performance*, (p 213-233). Oxford, Reino Unido: Blackwell Science.
- Estrella, V. (2016). Dólar incide en costos de la cerveza artesanal: ACIQ. Noviembre 9, 2017, de El Economista Sitio web: <https://www.eleconomista.com.mx/estados/Dolar-incide-en-costos-de-la-cerveza-artesanal-ACIQ-20161011-0029.html>
- Gabrielyan, G. (2014). *Essays in Hop Price Formation and the Brewing Industry*. Washington State University, 1-114. 2015, Agosto, De ProQuest LLC Base de datos.
- Gómez-Corona, C., Escalona-Buendía, H. B., Chollet, S., y Valentin, D. (2017a). The building blocks of drinking experience across men and women: a case study with craft and industrial beers. *Appetite*, 116, 345-356.
- Gómez-Corona, C., Escalona-Buendía, H. B., García, M., Chollet, S., y Valentín, D. (2016). Craft vs. industrial: Habits, attitudes and motivations towards beer consumption in Mexico. *Appetite*, 96, 358-367.





- Lake, J. (2008). Detection of Malt Inducing Premature Yeast Flocculation: Mechanisms and Composition. Dalhousie University, 1-194. 2017, Agosto, De ProQuest LLC Base de datos.
- Landaud, S., Latrille, E., y Corrieu, G. (2001). Top pressure and temperature control the fusel alcohol/ester ratio through yeast growth in beer fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 107(2), 107-117.
- Layfield, J. y Sheppard, J. (2015). What brewers should know about viability, vitality, and overall brewing fitness: A mini-review. *MBAA TQ*, 52(3), 132-140.
- Lee, S., Villa, K., y Patino, H. (1995). Yeast strain development for enhanced production of desirable alcohols/esters in beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 53(4), 153-156.
- Lei, H., Zhao, H., Yu, Z., y Zhao, M. (2012). Effects of wort gravity and nitrogen level on fermentation performance of brewer's yeast and the formation of flavor volatiles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(6), 1562-1574.
- Lewis, M. y Bamforth, C. (2006). *Essays in Brewing Science*. Springer Science & Business Media.
- Liu, S. Q. (2015). Impact of yeast and bacteria on beer appearance and flavour. En: A. E. Hill (Ed.), *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*, (p 357-374). Cambridge, Reino Unido: Elsevier.
- Lodolo, E. J., Kock, J. L., Axcell, B. C., y Brooks, M. (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae*—the main character in beer brewing. *FEMS yeast research*, 8(7), 1018-1036.
- MacLeod, L. (2004). Barley: Malting. En: C.W. Wrigley, H. Corke, K. Seetharaman y J. Faubion (Eds.), *Encyclopedia of Food Grains*, (p 68–76). Oxford, Reino Unido: Elsevier.

- Meier, H. (2017). The Barth Report: Hops 2016/2017. Septiembre 30, 2017, de Barth-Haas Group Sitio web: <http://www.barthhaasgroup.com/en/news-and-reports/the-barth-report-hops>
- Meilgaard, M. C., Carr, B. T., y Civille, G. V. (2006). Sensory Evaluation Techniques. Florida, Estados Unidos: CRC Press.
- Mejlholm, O., y Martens, M. (2006). Beer identity in Denmark. Food Quality and Preference, 17, 108-115.
- Miller, D. (1988). The Complete Handbook of Home Brewing. Estados Unidos: Storey Publishing.
- Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 31(3), 426-428.
- Pai, T., Sawant, S. Ghatak, A., Chaturvedi, P., Gupte, A. y Desai, N. (2015). Characterization of Indian beers: Chemical composition and antioxidant potential. Journal of Food Science and Technology, 52(3), 1414-1423.
- Pang, Z. W., Liang, J. J., Qin, X. J., Wang, J. R., Feng, J. X., y Huang, R. B. (2010). Multiple induced mutagenesis for improvement of ethanol production by *Kluyveromyces marxianus*. Biotechnology Letters, 32(12), 1847-1851.
- Parker, D. (2012). Beer: production, sensory characteristics and sensory analysis. En: J. Piggott (Ed.), Alcoholic Beverages, (p. 133–158). Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing.
- Payne, S. (2014). Top 10 Heaviest Beer-drinking Countries: Czech Republic and Germany Sink Most Pints. Mayo 28, 2016, de International Business Times Sitio web: <http://www.ibtimes.co.uk/top-10-heaviest-beer-drinking-countries-czech-republic-germany-sink-most-pints-1475764>

- Peddie, H. A. (1990). Ester formation in brewery fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, 96(5), 327-331.
- Piddocke, M. y Olsson, L. (2009). Beer brewing, *Applications of Metabolic Engineering*. En: M.C. Flickinger (Ed.), *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, (p 10-55). Nueva York, Estados Unidos: John Wiley & Sons.
- Piddocke, M., Kreis, S., Heldt-Hansen, H. P., Nielsen, K. F., y Olsson, L. (2009). Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(3), 453-464.
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., y Vicente, A. A. (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(5), 1937-1949.
- Pires, E., y Brányik, T. (2015). *Biochemistry of Beer Fermentation*. Praga, República Checa: Springer.
- Procopio, S., Krause, D., Hofmann, T., y Becker, T. (2013). Significant amino acids in aroma compound profiling during yeast fermentation analyzed by PLS regression. *LWT-Food Science and Technology*, 51(2), 423-432.
- Pruneda, A. (2016). ¿Por qué el consumo de cerveza es tan importante en México?. Mayo 21, 2016, de Forbes México Sitio web: <http://www.forbes.com.mx/forbes-life/consumo-cerveza-mexico/>
- Puligundla, P., Smogrovicova, D., Obulam, V. S. R., y Ko, S. (2011). Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(9), 1133-1144.

- Saerens, S. M. G., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., y Delvaux, F. R. (2008a). Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2), 454-461.
- Saerens, S. M. G., Verbelen, P. J., Vanbeneden, N., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2008b). Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(6), 1039-1051.
- Secretaría de Economía. (2015). Industria de la Cerveza en México. Mayo 28, 2015, de Secretaría de Economía Sitio web: <http://www.gob.mx/se/articulos/industria-de-la-cerveza-en-mexico>
- Shen, H. Y., De Schrijver, S., Moonjai, N., Verstrepen, K. J., Delvaux, F., y Delvaux, F. R. (2004). Effects of CO<sub>2</sub> on the formation of flavour volatiles during fermentation with immobilised brewer's yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(5), 636-643.
- Stanley, D., Fraser, S., Chambers, P. J., Rogers, P., y Stanley, G. A. (2010). Generation and characterization of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(2), 139-149.
- Statista. (2016). Global beverage sales share from 2011 to 2016, by beverage type. Septiembre 28, 2017, de Statista Sitio web: <http://www.statista.com/statistics/232773/forecast-for-global-beverage-sales-by-beverage-type/>
- Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Nicolino, M. P., Aslankoohi, E., Christiaens, J. F. y Saels, V. (2012). Selecting and generating superior yeasts for the brewing industry. *Cerevisia*, 37(2), 63-67.

- Stewart, G. (2012). Biochemistry of Foods. En: N. A. M. Eskin and F. Shahidi (Eds.), Biochemistry of Brewing, (p 291–318). Londres, Reino Unido: Elsevier.
- Strejc, J., Siříšťová, L., Karabín, M., Almeida e Silva, J. B., y Brányik, T. (2013). Production of alcohol-free beer with elevated amounts of flavouring compounds using lager yeast mutants. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(3), 149-155.
- Tarango, Y. (2013). Emprendedores y cerveza artesanal. Noviembre 9, 2017, de Vértigo Político Sitio web: <http://www.vertigopolitico.com/articulo/22106/Emprendedores-y-cerveza-artesanal>
- The American Society of Brewing Chemists, ASBC Methods of Analysis, 2009 Edition, Beer – 29: Lower Boiling Volatiles in Beer or Ale. ASBC 2009, CD-ROM, ISBN 976-1-881696-17-9.
- Trujillo, A., S.J. (2015). Selección de cepas de levadura para reducir insumos en la elaboración de cerveza. Repositorio Institucional UAQ, 1-55. 2016, Mayo 9, De Repositorio Institucional Base de datos.
- Vega, M. (2015). Kit de Elaboración de Cerveza: Sol y Arena Pale Ale. Mayo 22, 2016, de Brewmasters Sitio web: <http://brewmasters.com.mx/shop/acapulco-pale-ale/>
- Verhagen, L. (2010). Beer Flavor. En: J. Reedijk (Ed.), Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering (p 967–997). Leiden, Países Bajos: Elsevier.
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., y Delvaux, F. R. (2003). Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(2), 110-118.
- Villamil, V. (2016). Aumenta la sed por cerveza extranjera en México. Mayo 21, 2016, de El Financiero Sitio web: <http://www.elfinanciero.com.mx/economia/aumenta-la-sed-por-cerveza-extranjera-en-mexico.html>

- Winston, F. (2008). Current Protocols in Molecular Biology. En: F.M. Ausubel (Ed.), EMS and UV Mutagenesis in Yeast, (p 1-5). Nueva York, Estados Unidos: John Wiley & Sons.
- Wunderlich, S. y Back, W. (2009). Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria. En Beer in Health and Disease Prevention (3–16). Freising-Weihenstephan, Alemania: Academic Press.
- Yeo, H. Q., y Liu, S. Q. (2014). An overview of selected specialty beers: developments, challenges and prospects. International Journal of Food Science & Technology, 49(7), 1607-1618.
- Yoshioka, K., y Hashimoto, N. (1984). Ester formation by brewers' yeast during sugar fermentation. Agricultural and Biological Chemistry, 48(2), 333-340.
- Yu, Z., Zhao, M., Li, H., Zhao, H., Zhang, Q., Wan, C., y Li, H. (2012). A comparative study on physiological activities of lager and ale brewing yeasts under different gravity conditions. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 17(4), 818-826.
- Zarnkow, M. (2014). Beer. En: C. A. Batt y M. Tortorello (Eds.), Encyclopedia of Food Microbiology, (p 209–215). Londres, Reino Unido: Elsevier.

## 10. APÉNDICE



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**MAESTRIA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**  
**FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Este formato de consentimiento informado se dirige a las personas invitadas a participar como panelista no entrenado (consumidor) en el análisis sensorial de cuatro formulaciones de cerveza artesanal como parte del proyecto de investigación "Oblención de cepas mejoradas de *Saccharomyces cerevisiae* para su uso en cerveza tipo Ale".

**Nombre del director del proyecto:** Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez

**Nombre del investigador:** Claudia Alexandra Pérez Macedo

### **Introducción**

En esta investigación desarrollada por la estudiante de Maestría en Ciencia y Tecnología de alimentos del PROPAC, se busca evaluar la aceptabilidad de cervezas artesanales elaboradas con distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Se le hace la invitación a formar parte de esta investigación actuando como panelista del análisis sensorial.

### **Propósito**

Oblener cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con características mejoradas de crecimiento, producción de CO<sub>2</sub> o sobreproducción de compuestos volátiles que representen una mejor alternativa para la producción de cerveza tipo Ale. Además, realizar una evaluación sensorial del producto terminado para determinar sus características más importantes respecto al sabor y aroma.

### **Selección de participantes**

Los invitados a participar en esta evaluación serán 30 personas, sin exclusión de género, en un rango de edad entre 18 y 70 años, consumidores de

cerveza al menos cuatro veces por mes. Los ingredientes que se utilizaron para las formulaciones de la cerveza artesanal a evaluar se muestran en el Cuadro 1:

**Cuadro 1. Ingredientes utilizados en las formulaciones de cerveza**

Agua estéril
Extracto de malta seco
Malta molida
Lúpulo
Levaduras comerciales

**Participación voluntaria**

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria.

**Protocolo**

Se requiere calificar las cuatro formulaciones en cuanto a sabor, aroma y aceptabilidad general por lo que se le presentarán ante el panelista 4 muestras de cerveza artesanal, a las cuales debe asignar una calificación de acuerdo a una escala hedónica del 1 al 5 donde 1 es la clasificación como el nivel más bajo y la calificación de 5 es el nivel más alto del producto.

**Riesgos**

Las cervezas se elaboraron siguiendo las Buenas Prácticas de Manufactura en el laboratorio de Bioquímica de Alimentos del Edificio 3 de Universidad Autónoma de Querétaro. Se almacenaron las cervezas en refrigeración antes de ser presentadas a los consumidores.

**Confidencialidad**

La información de los panelistas de esta investigación no se compartirá con personas ajenas a la misma y la información obtenida será presentada sin revelar el nombre del panelista.

Figura 10-1 Formato de consentimiento informado solicitado por el Comité de Bioética



**PRUEBA SENSORIAL DE CERVEZA ARTESANAL**

Sexo:  M  F Edad: \_\_\_\_\_

**Muestra:** \_\_\_\_\_

Por favor indica tu opinión acerca de la siguiente característica de la muestra:

- Califica el producto en cuanto al **aroma a frutas**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mucho más de lo que esperaba	Más de lo que esperaba	Justo como lo esperaba	Menos de lo que esperaba	Mucho menos de lo que esperaba
- Califica el producto en cuanto al **aroma a malta tostada**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mucho más de lo que esperaba	Más de lo que esperaba	Justo como lo esperaba	Menos de lo que esperaba	Mucho menos de lo que esperaba
- En el **amargor** del producto califica el nivel de agrado

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mucho más de lo que esperaba	Más de lo que esperaba	Justo como lo esperaba	Menos de lo que esperaba	Mucho menos de lo que esperaba
- Califica el producto en cuanto al **sabor a frutas**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mucho más de lo que esperaba	Más de lo que esperaba	Justo como lo esperaba	Menos de lo que esperaba	Mucho menos de lo que esperaba
- Califica el producto en cuanto al **sabor a malta tostada**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mucho más de lo que esperaba	Más de lo que esperaba	Justo como lo esperaba	Menos de lo que esperaba	Mucho menos de lo que esperaba

Figura 10-2 Formato para prueba sensorial con escala JAR



Figura 10-3 Laboratorio de Evaluación Sensorial en el Parque Tecnológico de la UAQ