

Uso de complemento nutricional Nutriyeast para levaduras, durante la producción de cerveza artesanal rubia dorada pampeana.

Tarabelli, Mauricio Javier

TESIS DE GRADO: LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO.FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Mendoza, 29 de Agosto del 2023

USO DE COMPLEMENTO NUTRICIONAL NUTRIYEAST PARA LEVADURAS, DURANTE LA PRODUCCIÓN DE CERVEZA ARTESANAL RUBIA DORADA PAMPEANA.

Directora

Dra. Adriana Giménez
agimenez@fca.uncu.edu.ar

Codirectora

Lic. Analía Marcela Bernardi
abernardi@fca.uncu.edu.ar

Asesora estadística

Dra. Cecilia M. Fusari
cfusari@fca.uncu.edu.ar

Tesista

Mauricio Javier Tarabelli
mauriciotarabelli@gmail.com

Comisión evaluadora

Presidente: Lic. Brom. Laura Sánchez

Vocales: Lic. Brom. Marcela Santana

Lic. Brom. Sandra Rodríguez

Suplente: Dra. Lic. Brom. Daniela Locatelli

RESUMEN

Se propone evaluar el rendimiento de un suplemento nutricional para levaduras llamado Nutriyeast, formulado por una empresa de origen mendocino, destinado a la producción de cervezas artesanales, y con vistas a ser comercializado en un futuro.

Los complejos nutricionales se encuadran, al igual que las levaduras, como coadyuvantes de tecnología y se reglamentan en el CAA. Debemos tener en cuenta que la falta de divulgación de información acerca de estos complementos nutricionales en el área de elaboración de cerveza, motivó a la realización de dicho estudio. Existe un desconocimiento de la existencia de complementos nutricionales para ser utilizados en la producción de cervezas artesanales, hasta el momento, la mayor parte de la información respecto a este tema es de vasto conocimiento en la rama de la enología.

El objetivo del presente trabajo fue elaborar cerveza dorada pampeana, con y sin agregado del suplemento nutricional. Se evaluó la regularidad fermentativa, y se compararon las cinéticas de fermentación mediante la realización para cada grupo de 3 ensayos: medición de variables físico químicas de control (grados Brix, densidad, pH, y determinación de azúcares residuales), recuento de levaduras totales y viables en cámara de Neubauer y el desarrollo de una curva de fermentación en base a la pérdida de peso.

Los resultados obtenidos en función del análisis estadístico demostraron que no existen diferencias significativas en ambos grupos en lo referido a variables físico químicas de control durante la fermentación.

En cuanto recuento de levaduras totales, el suplemento no parece incrementar de forma significativa el número de células. En el caso del recuento de levaduras viables se detectó una diferencia del 2% a favor del grupo "Con suplemento", pero este aumento no es significativo desde el punto de vista estadístico y puede deberse a causas que escapan del alcance de esta tesis.

En lo que respecta al desarrollo de la curva de fermentación en base a la pérdida de peso, se determinó que el modelo que mejor describió el comportamiento de las variables en estudio y el que mejor se ajustó a los datos fue el polinómico de segundo grado. Al comparar las pérdidas de peso en los días 3 y 14 para ambos grupos los resultados arrojaron que la pérdida de peso del grupo "Con suplemento" fue mayor, aunque este resultado no fue considerado significativo debido a la lejanía de los días comparados dentro de las fases de crecimiento de las levaduras.

En conclusión, no hay evidencia suficiente para afirmar que el complemento nutricional Nutriyeast mejora la cinética de fermentación de un primer ciclo fermentativo en la elaboración de cerveza artesanal rubia dorada pampeana bajo los términos de la presente tesis.

PALABRAS CLAVE

Cerveza artesanal, cinética de fermentación, nutrientes para levadura

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá Doris y a mi papá Carlos por darme la vida y los valores de la misma. Inculcarme el respeto, el amor por la familia, y la cultura del estudio y el trabajo.

A mis hermanos David, Germán, y Leandro por estar y bancarme siempre que los necesité.

A mi novia Melisa que siempre me escuchó y ayudó con paciencia cuando todo parecía ponerse oscuro.

A toda mi familia por el apoyo incondicional y acompañarme en este duro camino.

A mis amigos de la vida y de la facultad, porque sin ellos esta etapa no hubiese sido lo mismo.

A todas las personas que componen la Facultad de Ciencias Agrarias y en especial a Adriana Giménez , Marcela Bernardi , Cecilia Fusari y Luciano Palumbo por guiarme en este trabajo.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a la memoria de mi papá Carlos Dante Tarabelli, quien me enseñó que con esfuerzo siempre se pueden lograr los objetivos, y que la unión de la familia es lo primero.

Gracias viejo.

ÍNDICE

1) INTRODUCCIÓN.....	1
1.1) Historia de la cerveza.....	1
1.2) Llegada a la Argentina.....	2
1.3) Consumo.....	2
1.4) Importancia del ensayo.....	3
2) MARCO TEÓRICO.....	5
2.1) Cerveza.....	5
2.1.1) Generalidades.....	5
2.1.2) Cerveza artesanal.....	6
2.2) Cerveza Dorada pampeana.....	6
2.2.1) Materias primas.....	7
2.3) Levadura de cerveza <i>Sacharomyces cereviciae</i>	9
2.4) Fermentación alcohólica por <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	12
2.4.1) Glucólisis (vía de Embden-Meyerhof).....	12
2.4.2) Fermentación alcohólica.....	12
2.4.3) Fermentación gliceropirúvica.....	14
2.4.4) Respiración.....	15
2.4.5) Efecto Pasteur vs efecto Crabtree.....	15
2.4.6) Productos secundarios de la fermentación.....	15
2.5) Fases de crecimiento de las levaduras-cinética de fermentación.....	17
2.6) Controles y seguimiento de la cinética de fermentación.....	18
2.7) Factores que afectan el crecimiento, desarrollo de las levaduras y la marcha de la fermentación.....	19
2.8) Nutrientes para fermentos biológicos.....	20
2.9) La importancia de la nutrición de las levaduras para el éxito de la fermentación-Usos de suplementos como activadores de la fermentación.....	24
3) OBJETIVOS.....	26
3.1) Objetivo general.....	26
3.2) Objetivos particulares.....	26
3.3) Hipótesis.....	26
4) MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
4.1) Descripción del ensayo.....	27
4.2) Algoritmo literal de la elaboración de las micro fermentaciones.....	28

4.3) Diagrama de flujo de elaboración de las micro fermentaciones.....	35
4.4) Etapas del proceso de muestreo.....	36
4.5) Metodología de la experimentación	38
4.5.1) Ensayo 1: Determinación y evaluación de las variables físico químicas.....	38
4.5.2) Ensayo 2: Recuento de levaduras de cerveza totales y viables	45
4.5.3) Ensayo 3: Desarrollo de curva de fermentación por pérdida de peso	51
5) RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
5.1) Ensayo 1: Determinación y evaluación de las variables físico químicas.....	52
5.1.1) Determinación de grados Brix	52
5.1.2) Determinación de pH.....	53
5.1.3) Determinación de la densidad	54
5.1.4) Análisis de azúcares reductores residuales	55
5.2) Ensayo 2: Recuento de levaduras de cerveza totales y viables	56
5.3) Ensayo 3: Desarrollo de curva de fermentación por pérdida de peso	59
5.3.1) Comparación entre ambos grupos para el día 3 de fermentación	60
5.3.2) Comparación entre ambos grupos para el día 14 de fermentación	60
5.3.3) Análisis de la relación y ajustamiento del modelo	60
5.3.4) Ajustamiento del modelo a los datos	60
5.3.5) Relaciones curvilíneas: Polinómica de segundo grado.....	60
5.4) Recomendaciones y futuros ensayos	61
6) CONCLUSIÓN.....	63
7) BIBLIOGRAFÍA	64
8) ANEXO	67
8.1) Tablas, y planteo de pruebas de hipótesis del ensayo 1: Determinación y evaluación de las variables físico químicas de control.....	67
8.1.1) Determinación de grados Brix	67
8.1.2) Determinación de pH.....	69
8.1.3) Determinación de densidad	71
8.1.4) Determinación de azúcares reductores residuales	73
8.2) Tablas, y planteo de pruebas de hipótesis del ensayo 2: Recuento de levaduras de cerveza totales y viables.....	75
8.3) Tablas, y planteo de pruebas de hipótesis del ensayo 3: Desarrollo de curva de fermentación por pérdida de peso	78
8.3.1) Comparación entre grupo “Sin suplemento” y “Con suplemento” mediante medidas estadísticas de resumen	78

8.3.2) Comparación entre grupo “Sin suplemento” y “Con suplemento” en el día 3 y 14 de fermentación	78
8.3.3) Análisis de la relación y ajustamiento del modelo	81
8.3.4) Ajustamiento del modelo a los datos	82
8.3.5) Relaciones curvilíneas: Polinómica de segundo grado	85
8.4) Tablas y figuras complementarias	89
8.4.1) Gráficos de líneas del ensayo 1: Determinación y evaluación de las variables físico químicas	89
8.4.2) Tablas de campo del ensayo 2: Recuento de células de levadura totales y viables	93
8.4.3) Tablas de campo para el ensayo 3: Desarrollo de curva de fermentación por pérdida de peso	94

1) INTRODUCCIÓN

1.1) Historia de la cerveza

La cerveza es la bebida alcohólica más consumida del mundo, y una de las bebidas más consumidas en general, si tenemos en cuenta a todas las bebidas (alcohólicas y no alcohólicas que existen) (García Ortiz, Gil Muela, & García, 2003).

Esta bebida a base de malta, agua, lúpulo y levadura ha cautivado el paladar de la humanidad durante miles de años.

Los orígenes de la cerveza son cercanos al inicio de la civilización; las primeras plantas cultivadas fueron el trigo y la cebada. Algunos afirman que la cerveza es, incluso, anterior al pan pues se han hallado restos fósiles de levadura de cerveza en vasijas de arcilla datadas miles de años antes de que se tenga registro de la existencia del pan.

En Mesopotamia se encontró la mención más antigua sobre la cerveza, en donde hace alusión de una bebida alcohólica obtenida por fermentación de granos que se denominan "sikaru", plasmada en unas tablas de arcilla escritas en sumerio y cuya antigüedad se remonta a 4000 a.C. En éstas, se cuenta una forma de elaboración de la cerveza: "se cuece pan, se deshace en migas, se prepara una mezcla en agua y se consigue una bebida que transforma a la gente en alegre, extrovertida y feliz" (Velasco, 2015).

La cerveza tuvo su aparición en la historia escrita en tablas de arcilla sumerias que datan del año 1800 a.C. El vocablo cerveza era uno de los más frecuentes en dichas tablas de los antiguos sumerios. No sólo se les pagaba parte del salario con cerveza a los obreros egipcios que construyeron las pirámides, sino que ya abundaban recetas para su elaboración diseminadas en murales y tumbas. En esa época, la cerveza era más turbia, tenía menor contenido alcohólico, casi no tenía gas y se bebía a temperatura ambiente. También se creía que tenía propiedades curativas ya que se utilizaban en rituales y festividades religiosas (Grandinetti, 2017).

En Egipto la denominaron "zythum" y era esencial en la dieta cotidiana. Mientras que el vino era para las clases altas, la cerveza era para el pueblo. En época de los faraones, sus fábricas producían hasta 4 millones de litros por año, tanto, que los graneros estaban prácticamente destinados a la cebada para su elaboración y la utilizaban como moneda de cambio. Los egipcios fueron los primeros en mercantilizar la cerveza.

Como buenos comerciantes, dado que el precio este cereal era elevado, utilizaban una variedad del trigo: la espelta. Además descubrieron la malta, le agregaron azafrán, miel, jengibre y comino para darle sabor y color.

Los griegos heredaron las técnicas de fabricación de cerveza de los elaboradores de Egipto, y a su vez traspasaron este conocimiento a los romanos, que la llamaron "cerevisia", en honor de la diosa Ceres de la agricultura (Argentina, 2019).

Luego de la conquista de Egipto, el imperio romano se encargó de diseminar la bebida alcohólica por toda Europa. Durante la peste negra, la cerveza de bajo contenido alcohólico era la única fuente de agua potable, pues al ser hervida durante la cocción, eliminaba casi todos los microorganismos de la peste bubónica. Durante varios siglos los monjes tuvieron el monopolio de la elaboración cervecera (Grandinetti, 2017).

En los monasterios la producción a gran escala fue en el Siglo X. Los monjes, vinculados a la agricultura, perfeccionaron sus recetas con los escritos de los egipcios, estudiando el proceso y mejorándolo. Empezaron a usar el lúpulo, marcando el fin de cervezas turbias y dulces (Argentina, 2019).

La cerveza propiamente dicha, aparece en el siglo XIII en Europa, teniendo en cuenta que el concepto conlleva el amargor del lúpulo. Parece ser que la introdujeron los celtas y más tarde los germanos (Velasco, 2015).

1.2) Llegada a la Argentina

En los primeros tiempos de la República, la cerveza se importaba por mar en toneles y era un producto para consumo exclusivo de las poblaciones sajona y germana, no era accesible como lo es, hoy en día.

La cerveza, hasta fines del siglo XIX era casi un artículo de lujo, pero entre 1891 y 1913 aumentó su consumo más de ocho veces, de 13 a 109 millones de litros. Además, pasó de venderse por vaso en los bares a comercializarse embotellada.

La primera fábrica nacional de cerveza sobre la cual se tienen documentos se creó en 1738, por el inglés Thomas Stuart en el barrio de Retiro, donde se construyó el edificio para elaborar la bebida. "La Zervezería" de hecho, fue el nombre elegido para la fábrica.

Fueron muchas las pequeñas cervecías instaladas desde fines del siglo XVIII y comienzos del XIX, pero la más antigua en funcionamiento es la fundada por el inmigrante alsaciano Emil Bieckert, quien en 1880 inauguró su fábrica de cerveza, para lo cual trajo técnicos de su Alsacia natal.

Las instalaciones de Bieckert fueron impresionantes para la época, y la empresa fue todo un éxito, a pesar de los problemas que tenía para abastecerse de materia prima, como cebada y lúpulo. Poco tiempo después otro alemán llamado Otto Bemberg fundó la cervecía y maltería Quilmes, más precisamente en 1888.

Su proyecto comenzó en la localidad de Quilmes, donde la calidad del agua y la cercanía con la estación de trenes la hacía un lugar propicio para fundar el negocio que, en honor a la ciudad, bautizó con el mismo nombre. Bemberg elaboró una cerveza tipo lager de cuerpo liviano acorde al paladar germano, y luego de dos años de prueba y error, en 1890 la lanzó al mercado (Cucinare, 2019).

1.3) Consumo

La cerveza es una de las bebidas alcohólicas más antiguas de la humanidad, resultante de la fermentación de levaduras del mosto de malta, aromatizado con lúpulo. El sector de la cerveza artesanal ha tenido un gran auge en la última década. (Ibarzabal, 2020)

Actualmente el mercado de la cerveza levantó el listón, y poco a poco las microcervecías que, al principio eran una excentricidad, fueron ganando cuotas de mercado. Hoy, debido a un público joven que demanda cervezas artesanales de calidad (producto que es más ligero y con menos graduación alcohólica que el vino), hay más de 4.000 micro cervecías y el negocio crece a razón de un 20% anual, cifra que es la envidia de cualquier emprendedor (Cucinare, 2019).

"En la Argentina el consumo de variedades artesanales de cervezas representa el 1,8% del total. Como punto comparativo a nivel internacional, en los Estados Unidos ese índice llega al 14%, por lo que se considera que puede existir un crecimiento exponencial del mercado nacional".

"A pesar de que el número parezca mínimo frente al consumo de cerveza en Argentina, en los últimos cinco años, la bebida alcohólica artesanal comenzó a ganar lugar en las mesas y reuniones de los consumidores. Según la Cámara Argentina de Productores de Cerveza Artesanal, el rubro creció alrededor del 40%, con más de 1.500 productores en todo el país". (Limura, 2022)

Las diferencias entre la cerveza industrial y la artesanal se encuentran en las proporciones, en el tratamiento de la materia prima y en el proceso de elaboración. Las

cervezas artesanales no utilizan ningún aditivo artificial, el proceso de elaboración es manual desde el molido de las maltas hasta el embotellamiento (Ibarzabal, 2020).

El consumo de cerveza se ha incrementado en el país debido al abandono de la tradición de consumirla sólo en la temporada estival.

La cerveza representa actualmente el 60% del total de las bebidas alcohólicas consumidas en el país.

Según datos de la Cámara de la Industria Cervecera Argentina, en los últimos veinte años se consumió en promedio 41 litros de cerveza por habitante y por año. En 2019, Argentina ocupó la 44^o posición en el ranking de consumo de cerveza en el mundo, una lista que encabeza por amplia diferencia la República Checa (Cabrini y Fillat, 2021).

En la Figura 1 se muestra la evolución del consumo interno y del consumo per cápita de la cerveza de malta en la República Argentina en las últimas dos décadas.

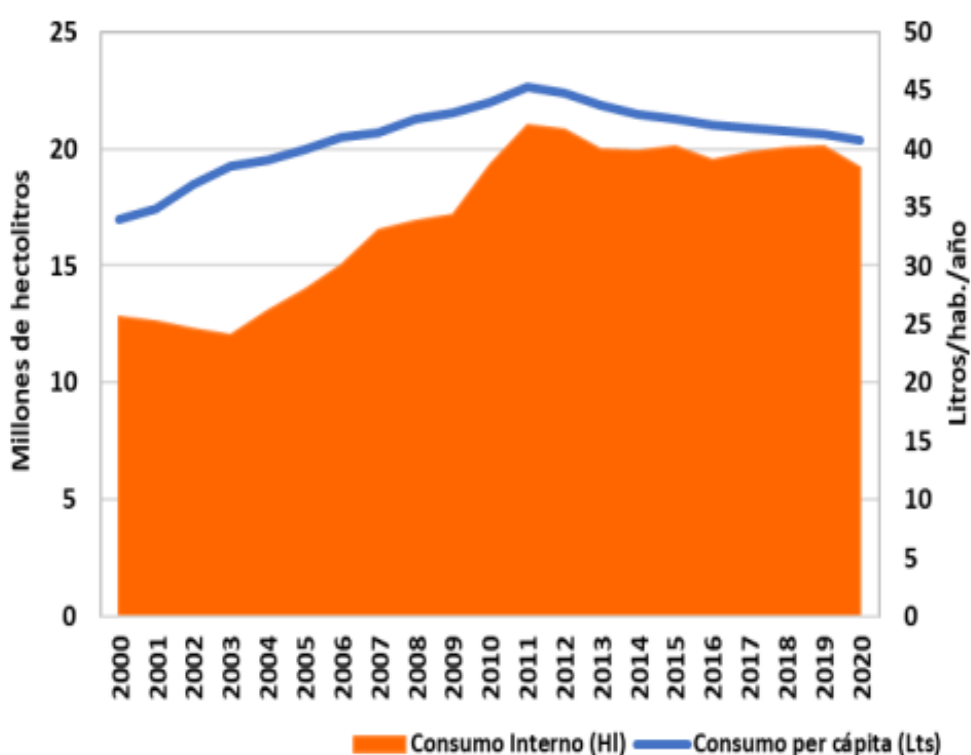


Figura 1: Evolución del consumo interno y del consumo per cápita de cerveza de malta, en Argentina, periodo 2000-2020 (Cabrini y Fillat, 2021).

1.4) Importancia del ensayo

Así como en toda bebida alcohólica, en cervecería la levadura de cerveza representa el motor del proceso de fabricación. Es la responsable de la evolución del líquido azucarado proveniente de la malta (mosto) en cerveza. Esta transformación la lleva a cabo mediante el complejo fenómeno bioquímico denominado fermentación alcohólica (González, 2017).

El Código Alimentario Argentino en el artículo 1255 la define como: Con la designación de Levadura, se entiende el producto constituido a base de hongos microscópicos (*Sacromicetas*) (Código Alimentario Argentino, 2022).

Las levadura de cerveza es definida taxonómicamente como un hongo unicelular de la clase de los Ascomicetos (nombrada de esa manera por la presencia de esporas haploides contenidas en sacos llamados ascos) (Ribereau-Gayon et al., 2003).

Las levaduras, como todo microorganismo, dependen de diferentes factores que propician o inhiben su desarrollo. Éstos determinan que una población pueda colonizar con éxito un determinado medio (mosto) o que sucumban y sean desplazadas por otro tipo de organismo. Dichos factores pueden ser inherentes a la propia levadura, como la tolerancia al alcohol y a altas concentraciones de azúcar, o relacionados con las características del medio, como su pH, la disponibilidad de agua, y de nutrientes.

Uno de los problemas más frecuentes en la industria de la cervecería artesanal son las paradas en la etapa de fermentación.

Una de las posibles causas que pueden provocar una detención en la marcha de la fermentación, es la carencia de nutrientes por parte de la levadura, ya que las mismas cumplen con sus funciones biológicas de forma óptima si se desarrollan en un entorno ideal de nutrientes imprescindibles y en cantidades suficientes (González, 2017).

Las levaduras tienen requerimientos nutricionales que van desde macronutrientes como carbono y nitrógeno, hasta elementos minerales, factores de crecimiento y factores de supervivencia.

Una parte de los requerimientos son provistos por el mismo sustrato (en este caso el mosto) que van a fermentar, pero en algunos casos al no ser suficientes, es recomendable el agregado de suplementos nutricionales (nutrientes para fermentos biológicos). (Ribereau-Gayon et al., 2003).

Los “Nutrientes para fermentos biológicos” están legislados bajo la RESOLUCIÓN GMC Nº 084/93 que se ha incorporado en el Código Alimentario Argentino en el capítulo XVI y los define como: Sustancias que nutren a los fermentos biológicos de modo que mantengan su desempeño durante el proceso de fermentación (Código Alimentario Argentino, 2022).

A lo largo del proceso de investigación para la presente tesis, se encontró un número limitado de fuentes disponibles para la temática abordada, dificultando el proceso de investigación, por lo que se considera que existe una falta de divulgación de información, sobre este tipo de complementos nutricionales en el área de elaboración de cerveza artesanal. Hasta el momento solo se cuenta con vasta información pero en el área enológica.

En enología los usos de tales suplementos se extienden desde productos orgánicos como extractos de levadura hidrolizada, hasta inorgánicos como las sales de amonio, como así también las combinaciones entre ambos tipos de suplementos (Ribereau-Gayon et al., 2003).

Ante el panorama antes expuesto, se pretende evaluar el rendimiento de un producto comercial llamado Nutriyeast, un polvo de extracto de levadura compuesto por una combinación de nitrógeno de origen orgánico, magnesio, hierro, zinc, vitamina B1, niacina, fosfatos amónicos, y aminoácidos esenciales. El mismo se presenta como insumo, para estabilizar o mejorar el desempeño de las levaduras de cerveza en la fase de fermentación en la elaboración de cerveza artesanal, evitando entre otras cosas paradas de fermentación.

2) MARCO TEÓRICO

2.1) Cerveza

2.1.1) Generalidades

Se entiende por cerveza, la bebida resultante de fermentar, mediante levadura cervecera, el mosto de cebada malteada o de extracto de malta, sometido previamente a un proceso de cocción, adicionado de lúpulo. Una parte de la cebada malteada o de extracto de malta podrá ser reemplazada por adjuntos cerveceros.

Se entiende por adjuntos cerveceros a las materias primas que sustituyan parcialmente a la malta, o al extracto de malta en la elaboración de cerveza. Su empleo no podrá ser en su conjunto superior al 45% en relación al extracto primitivo. Se consideran adjuntos cerveceros a la cebada cervecera y a los cereales, malteados o no, aptos para el consumo humano.

También se consideran adjuntos cerveceros los almidones y azúcares de origen vegetal (Código Alimentario Argentino, 2022).

El Código Alimentario Argentino clasifica a las cervezas además de por color y graduación alcohólica, en base a su extracto primitivo u original, que son las sustancias disueltas del mosto que dio origen a la cerveza y se expresa en porcentaje (%) en peso.

Respecto a las características sensoriales, reglamenta:

- Aroma y sabor: Son los característicos y propios de la cerveza y de la malta líquida sin aromas y sabores extraños de acuerdo a su denominación de venta.
- Aspecto: La cerveza debe presentar aspecto característico, siendo éste límpido o turbio, con o sin presencia de sedimentos, propios de la cerveza.
- Características, físico-químicas: La cerveza debe responder a los parámetros determinantes de su clasificación respecto al extracto primitivo, grado alcohólico y color.

Según el Artículo 1081-(Resolución Conjunta RESFC-2018-16-APN-SRYGS#MSYDS N°16/2018) En la elaboración de las cervezas, se autorizan y se prohíben determinadas prácticas según se expresa a continuación:

Prácticas permitidas:

- El agua potable a utilizar podrá ser modificada únicamente en su pH y dureza previamente a su utilización.
- El tratamiento con sustancias tales como: tierra de infusorios, carbón activado, taninos, albúmina, gelatina, bentonita, alginatos, gel de sílice y caseína.
- La filtración con materias inocuas tales como papel, pasta de papel, celulosa, telas de algodón o fibras sintéticas, tierra de infusorios, perlita, carbón activado.
- La adición de extracto de lúpulo a los mostos.
- La carbonatación con anhídrido carbónico que responda a las exigencias del Artículo 1066 del presente Código.
- Uso de Aditivos permitidos.
- El refuerzo de la coloración de las cervezas con colorante caramelo obtenido exclusivamente con azúcar refinado o dextrosa y con extractos de malta tostados.

Prácticas no permitidas:

- Agregar cualquier tipo de alcohol, cualquiera sea su procedencia.
- Usar saponinas u otras sustancias espumígenas no autorizadas expresamente.
- Sustituir el lúpulo o sus derivados por otros principios amargos.
- Adicionar agua fuera de las fábricas o plantas embotelladoras habilitadas.
- Utilizar edulcorantes artificiales.
- Utilizar estabilizantes químicos no autorizados expresamente.
- Efectuar la estabilización/conservación biológica por medio de procesos químicos (Código Alimentario Argentino, 2022).

2.1.2) Cerveza artesanal

Entiende por cerveza de Elaboración Artesanal aquella que:

- No utilice en su producción aditivos alimentarios
- Posea únicamente ingredientes naturales
- Que la elaboración sea de manera manual o semiautomática
- Que en el caso que se le agregue jugos o extractos de frutas, éstos sean previamente pasteurizados.

En éstas cervezas no se le aplicará el parámetro de turbidez establecido en el artículo 1082 inciso b) y se permite la carbonatación artificial (Código Alimentario Argentino, 2022).

A nivel internacional, se toma como base la clasificación sistematizada por la Beer Judge Certification Program (BJCP), quien a la vez certifica la actividad de los jueces entrenados. La categorización más general de estilos de cerveza es definida por tipo de levadura. Los cerveceros estadounidenses y la mayoría de los demás cerveceros artesanales del mundo llaman a las cervezas Ales si usan levadura de fermentación alta (Ale) y Lagers si usan levadura de fermentación baja (Lager) (Strong e Inglaterra, 2021).

2.2) Cerveza Dorada pampeana

La historia indica que en los inicios del movimiento cervecero artesanal, los cerveceros caseros argentinos estaban muy limitados por las materias primas. No existía disponibilidad de extracto de malta, solo podían usar malta Pilsen, lúpulo Cascade y levadura seca, comúnmente Nottingham, Windsor o Safale. Con estos ingredientes, desarrollaron una versión específica de la Blond Ale, denominada Dorada Pampeana. Según la BJCP está clasificada en la categoría 18 de la mencionada guía como cerveza americana pálida (Strong e Inglaterra, 2021).

Es un estilo argentino de cerveza rubia de alta fermentación (estilo ale). El estilo está adaptado a las posibilidades de la pampa Argentina. Generalmente se usa sólo malta pálida, lúpulo patagónico Cascade en la mayoría de los casos, y levaduras ale secas americanas. Posee un cuerpo liviano y un sutil amargor que balancea el dulzor de las maltas.

Es el estilo por el que la mayoría de los cerveceros artesanales argentinos comienzan (Koroluk, 2015).

A continuación se indican sus descriptores sensoriales:

- Aroma: dulce, maltoso, ligero a moderado. Es aceptable frutal bajo a moderado. Debe tener aroma a lúpulo bajo a medio. Sin diacetilo (aroma a manteca).
- Aspecto: color amarillo claro a dorado profundo. Claro a brillante. Espuma baja a medio con buena retención.
- Sabor: dulzor maltoso inicial suave. Típicamente ausentes los sabores a caramelo. Sabor a lúpulo ligero a moderado (normalmente Cascade), pero no debería ser agresivo. Amargor bajo a moderado, pero el balance tiende a la malta. Medio seco o algo dulce final. Sin diacetilo.
- Sensación en boca: cuerpo mediano, ligero. Carbonatación media a alta. Sensación suave sin amargor áspero o astringencia.

Ingredientes: normalmente sólo malta pálida o Pilsen, aunque puede incluir porcentajes bajos de malta caramelizada. Comúnmente lúpulo Cascade. Levadura americana limpia, británica ligeramente afrutada o Kölsch, envasada en frío.

Parámetros fisicoquímicos:

- Densidad inicial : 1.042 – 1.054 / Densidad final : 1.009 – 1.013
- Grados IBU: 15-22
- % Alcohol v/v: 4,3 -5,5
- Color por S.R.M: 3-5

Su impresión en general indica una cerveza fácilmente bebible, accesible, con un balance orientado hacia la malta (Strong e Inglaterra, 2021).

2.2.1) Materias primas

Agua: El agua empleada en la elaboración de cerveza debe ser apta para el consumo humano (Código Alimentario Argentino, 2022).

Es un componente básico en el proceso de producción de cerveza. El agua de forma natural, contiene una cierta cantidad de sales que influyen de forma definitiva en la calidad final de la cerveza. Su dureza es uno de los parámetros fundamentales. Las cervezas ligeras necesitan un agua con bajo contenido en sales carbonatada (Madrid, del Castillo & Vicente, 2001).

Las aguas se categorizan en blandas, moderadamente duras, duras y muy duras. La OMS (Organización Mundial de la Salud) toma como referente para esta clasificación los rangos de concentración de carbonato de calcio medidos en mg/l, como se muestra en la tabla 1 (González, 2017).

Tabla 1: Rangos de categorización de aguas según contenido de carbonato de calcio (González, 2017).

Carbonato de calcio (mg/l)	Categoría
0-60	Blanda
61-120	Moderadamente Dura
121-180	Dura
180 o más	Muy dura

Para elaborar una cerveza pale ale, como lo es la dorada pampeana se recomienda el uso de aguas blandas con un nivel bajo de carbonatos.

Una práctica recomendada, es la acidificación con ácido fosfórico de grado alimenticio del agua usada en la fase de lavado, cuyo objetivo es optimizar el funcionamiento de las enzimas alfa amilasas del grano de cebada, ya que a valores de 5,5 su actividad es óptima. Además si el pH del agua es más elevado que el valor antes mencionado, se favorece el exceso de arrastre de taninos del mosto, haciendo que obtengamos un producto final desagradable por exceso de astringencia en boca.

Es imprescindible que el agua sea libre de cloro tanto para no interferir con la actividad celular de las levaduras, como para evitar la generación de cloraminas, las cuales no son peligrosas para la salud en estos niveles, pero si le confieren características desagradables al agua sensorialmente. Es necesario que no pase mucho tiempo desde la obtención del agua hasta su uso en el proceso, ya que la ausencia de cloro, puede dar lugar a la proliferación microbiológica ante posibles contaminaciones (González, 2017).

Malta pilsen

La llamada malta base es la cebada germinada (malta verde) y secada con horneado a temperaturas bajas y corta duración. Esto se hace con la finalidad de proteger la integridad de las enzimas amilolíticas y conservar el máximo poder diastásico (indicador de su capacidad enzimática para convertir el almidón en azúcares fermentables). Es una malta sin tostar, solo secada hasta un contenido de humedad del 3 %. Es la más clara de todas las que se utilizan para la elaboración de cerveza, pudiendo ser empleada en la mayoría de las recetas. Algunas de las maltas base más conocidas son Lager, Pilsen y Pale Ale (González, 2017).

La malta base utilizada para la cerveza dorada pampeana es la tipo Pilsen (Strong e Inglaterra, 2021).

Lúpulo

Según el contenido de alfa ácidos los lúpulos pueden clasificarse en dos grandes grupos: aromáticos (4-7% de alfa ácidos) y amargos (más de 7% de alfa ácidos) (Madrid, del Castillo & Vicente, 2001).

El primer grupo comprende aquellos que poseen un menor poder amargo pero son abundantes en aceites esenciales, por lo que se les utiliza para dar a la cerveza diferentes aromas (González, 2017).

Dentro del grupo de los aromáticos, el utilizado para elaborar cerveza dorada pampeana es el Cascade (Strong e Inglaterra, 2021).

De las variadas formas de comercialización la más habitual entre los elaboradores artesanales, es en pellets, por su ventaja en el fácil manejo. Es susceptible a la oxidación por lo que se puede encontrar envasado al vacío o con atmósferas de CO₂ (Madrid, del Castillo & Vicente, 2001).

Su compresión especial reduce la oxidación de la lupulina y eleva el rendimiento hasta en un 15% respecto a otras formas preservadas y permite una dosificación más precisa (González, 2017).

Levadura de cerveza

Su nombre científico es *Saccharomyces Cerevisiae*. Son definidas taxonómicamente como un hongo unicelular de la clase de los ascomicetos, cuyo régimen nutricional es heterótrofo (Ribereau-Gayon et al., 2003).

Es la responsable de la transformación del líquido azucarado proveniente de la malta (mosto) en cerveza. Esta transformación la lleva a cabo mediante el complejo fenómeno bioquímico denominado fermentación alcohólica (González, 2017).

En la fermentación las levaduras al crecer y multiplicarse en el mosto, toman los azúcares del mismo transformándolos en alcohol y anhídrido carbónico como productos principales (Burgeois y Larpent, 1995).

Además de estos productos principales también generan como producto de su metabolismo toda una gama de otros importantísimos compuestos que otorgan sus características de sabor y aroma a la cerveza.

Las cepas de levadura cervecera son principalmente de dos tipos:

Fermentación baja: cae al fondo luego de la fermentación. Se utilizan para elaborar cervezas rubias tipo Lager. Su temperatura ideal de trabajo se encuentra entre 6 a 15°C.

Fermentación alta: sube a la superficie al final de la fermentación transportada por el dióxido de carbono generado durante la misma. Se utilizan en la fabricación de cervezas ligeras (tipo Ale). Su temperatura ideal de trabajo se encuentra entre 15 a 22°C (González, 2017).

2.3) Levadura de cerveza *Sacharomyces cerevisiae*

Las levaduras han sido utilizadas, desde la antigüedad, en la elaboración de cervezas, pan y vino, pero los fundamentos científicos de su cultivo y uso en grandes cantidades fueron descubiertos mucho después (Suárez, Garrido, & Rodríguez, 2016).

Antoine Van Leewenhoek en 1680 llevó a cabo las primeras observaciones de levaduras a partir de un mosto de cerveza, sin establecer relación alguna entre esos corpúsculos y la fermentación. Charles Cagnard de La Tour en 1837 demostró que era un organismo vivo, capaz de multiplicarse y cuya actividad vital se encontraba en el origen de la fermentación de los líquidos dulces. Esto sería luego afirmado por Schawann y Meyen en 1838, aunque finalmente fue Luis Pasteur quien en sus dos famosas obras, Estudios sobre el vino (1866) y Estudios sobre la cerveza (1876) acreditó definitivamente la tesis vitalista de la fermentación alcohólica (Ribereau-Gayon et al., 2003).

Saccharomyces Cerevisiae, es una levadura que constituye el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad; su nombre deriva del vocablo *Saccharo* (azúcar), *myces* (hongo) y *cerevisiae* (cerveza). Es una levadura heterótrofa, que obtiene la energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa (Suárez, Garrido, & Rodríguez, 2016).

El Código Alimentario Argentino en el artículo 1255 la define como: “Con la designación de Levadura, se entiende el producto constituido a base de hongos microscópicos (*Sacaromicetas*). Pueden tener diferentes orígenes: obtenerse de la fabricación de cerveza, vino, sidra, etc., u obtenerse especialmente en establecimientos destinados a ese fin, donde se cultiva en mostos especiales. Puede presentarse en varias formas: prensada, seca, para panificación, etc.” (Código Alimentario Argentino, 2022).

Las células de *Saccharomyces* y de otros ascomicetos unicelulares pertenecen al grupo de las células eucariotas, son normalmente esféricas, ovales o cilíndricas con un tamaño mucho mayor que las células bacterianas pudiendo distinguirse microscópicamente de los procariontes gracias a su mayor tamaño y a la presencia obvia de estructuras intracelulares (Madigan et al., 2009).

Ribereau-Gayón (2003) afirma que es el más simple de los organismos eucariotas, su célula porta un citoplasma que contiene organelas, un núcleo verdadero recubierto por una membrana que encierra cromosomas, y que además posee dos envolturas celulares, la pared y la membrana plasmática que juegan un rol fundamental en la fermentación y los constituyentes del producto de la misma.

El 60% aproximadamente de la pared de la célula está conformado por glucanos, y un 40% por manoproteínas. Su estructura en las levaduras determina una impermeabilidad hacia las macromoléculas y una porosidad hacia las micromoléculas. Además en su

composición encontramos también quitina y muchas enzimas asociadas a la pared como invertasa o β -fructoruranosidasa, que cataliza la hidrólisis de la sacarosa, en glucosa y fructosa.

En cuanto a lo que refiere a la membrana plasmática en su composición, organización y función, podemos decir que es una barrera altamente selectiva que controla los intercambios entre la célula viva y su medio exterior, siendo una organela esencial para la vida de la levadura. Está principalmente constituida por un 40% de lípidos, esencialmente fosfolípidos y esteroides, moléculas que poseen una parte hidrófila y una hidrófoba, y un 50% de proteínas (extrínsecas e intrínsecas). Glucanos y mananos solo se presentan en escasa cantidad.

Las proteínas más importantes de la membrana son la ATPasa que cataliza la hidrólisis del ATP (adenosin trifosfato) que provee la energía necesaria para el transporte activo de soluciones, otras involucradas en el transporte de azúcares y aminoácidos que conforman el sistema de permeasa no específico de los aminoácidos (GAP) y algunas enzimas implicadas en la síntesis de glucanos y de la quitina de las paredes.

La fluidez de las membranas está a la vez, controlada por la composición en ácidos grasos y esteroides, siendo el principal esteroide de membrana el ergosterol. La síntesis de ácidos grasos insaturados necesita la aireación del mosto al comienzo de la fermentación alcohólica. Además el tenor de ergosterol en la membrana de la célula y la tasa de instauración de los fosfolípidos de membrana favorece la penetración de glucosa en la célula.

Las funciones de la membrana plasmáticas consisten en: constituir una barrera hidrófoba estable entre el citoplasma y el entorno de la célula, controlar los intercambios entre la célula y el medio, la génesis enzimática del glucano y la quitina de la pared celular, y la función de reacción ante estímulos externos como las hormonas sexuales o cambios en la concentración de nutrientes externos gracias a receptores proteicos de membrana (Ribereau-Gayon et al., 2003).

Como la fermentación alcohólica es producida en el citoplasma de la levadura, el etanol y el CO_2 generado deben ser transportados fuera de la célula. Esto ocurre por difusión simple gracias a un gradiente de concentración positivo. Los esteroides de membrana tienen una gran influencia en la evacuación de estos compuestos, ya que una membrana con buena fluidez es aquella que posee gran cantidad de esteroides y la que mejor evacúa dichos componentes.

Para fomentar la síntesis de esteroides de membrana, al comienzo de la fermentación alcohólica se recomienda una leve oxigenación, ya que el oxígeno molecular se requiere como aceptor de hidrógeno en la primera etapa de la biosíntesis de colesterol (Kunkee et al., 2013).

La célula de la levadura cervecera se multiplica por medio de reproducción asexual, su división celular normalmente se produce por un fenómeno llamado gemación o brotación. En el proceso de gemación, la nueva célula se forma como una pequeña excrescencia de la célula progenitora, luego esta yema va engrosándose gradualmente y se acaba separando de la célula progenitora como se observa en la figura 2 (Madigan et al., 2009).

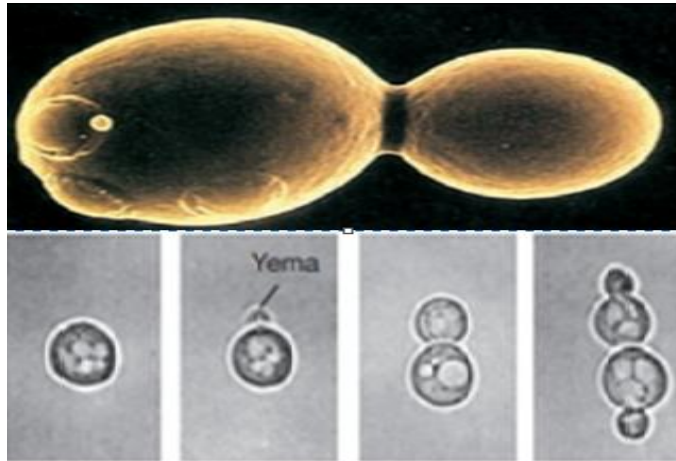


Figura 2: División celular de la levadura de cerveza por gemación (Madigan et al., 2009).

La levadura seca activa (LSA), se destaca como la opción más popular dentro de la amplia gama de levaduras disponibles en el mercado. La LSA se comercializa como un producto que contiene un 5% de humedad, deshidratada mediante diversos procesos. Su vida útil, envasada al vacío, es de 3 años. No requiere refrigeración para su mantenimiento ni rehidratación para su uso. (Lezcano, 2010).

La levadura tiene una función clave en la liberación de los compuestos de aroma, sabor y sensación en boca del producto terminado. Durante la fermentación se liberan distintos componentes, y la cepa de levadura y las condiciones de fermentación que escoge el productor afectan en gran medida el perfil final de la cerveza.

Muchos productores de todo el mundo escogen la levadura seca para cerveza porque es una manera confiable de lograr fermentaciones consistentes entre los distintos lotes. La levadura seca activa es una levadura lista para inocular directamente al mosto y es muy fácil de utilizar. La población correcta de levadura se logra simplemente inoculando un peso conocido de levadura seca siguiendo las indicaciones del fabricante.

La performance de la fermentación también permite predecir mejor los resultados, un factor que es esencial en la planificación de la producción (Centro Integral de bebidas artesanales, 2022).

*Existen numerosas levaduras comerciales utilizadas en la industria cervecera, una de ellas es *Sacharomyces Cerevisiae* Safale US-05. Se trata de una levadura ale americana que produce cervezas bien equilibradas con bajo contenido de diacetilo y un paladar final muy limpio. Forma una espuma firme y presenta muy buena capacidad para permanecer en suspensión durante la fermentación. Es muy versátil ya que se adapta a las necesidades del cervecero, dado que se puede aplicar mediante rehidratación previa, o se puede espolvorear directamente sobre la superficie del mosto, a la temperatura de fermentación indicada. Su aplicación debe hacerse en forma progresiva asegurándose de que cubra toda la superficie del mosto disponible para evitar grumos. Su dosificación es de 0,1 g/L de mosto. Contiene un % en peso seco de 94.0 – 96.5, y un número de células viables iniciales mayor a 6×10^9 Cel /g.*

El producto tiene una vida útil de 36 meses, recomendándose su almacenamiento en destino final en un lugar fresco ($< 10^{\circ}\text{C}$) y seco. Soporta ser transportado y almacenado a temperatura ambiente por períodos de tiempo no mayores a 3 meses sin afectar su desempeño. Los sobres, una vez abiertos deben sellarse y almacenarse a 4°C y usarse dentro de los 7 días posteriores a la apertura (Fermentis, 2018).

2.4) Fermentación alcohólica por *Saccharomyces Cerevisiae*

La cerveza, se elabora mediante fermentación alcohólica de granos. A diferencia del vino, requiere un procesamiento de los mismos para ser convertidos en azúcar y así la levadura los pueda transformar en alcohol. Esta es una característica que la diferencia marcadamente del vino, el cual no precisa tratamiento previo del jugo para ser fermentado (González, 2017).

Ese procesamiento se da durante la germinación en donde se producen los procesos de síntesis de enzimas amilolíticas, proteolíticas y la degradación de la estructura del endospermo del grano. Las proteínas se descomponen en aminoácidos, las paredes de las células de almidón en betaglucanos de bajo peso molecular y parte del almidón (sólo 8 a 10%) en azúcares más simples. Se producen α y β amilasas que actuarán posteriormente en la maceración, sacarificando los almidones solubles y proteasas que degradarán las moléculas proteicas complejas en proteínas de constitución más simple y aminoácidos (Madrid, del Castillo & Vicente, 2001).

Las levaduras por ser organismos quimioheterótrofos, obtienen la energía por degradación de la materia orgánica. Esa energía se transforma en calor y trabajo que la célula por medio de un transportador como el ADP utiliza para transporte, movimiento y síntesis. *Saccharomyces Cerevisiae* oxida los azúcares por medio de tres vías diferentes en función de las condiciones de aerobiosis: fermentación alcohólica, fermentación glicéropirúvica, y respiración. Todos estos procesos tienen su inicio común en la glucólisis (Hidalgo Togados, 2011).

2.4.1) Glucólisis (vía de Embden-Meyerhof)

Es el proceso de transformación intracelular de la glucosa (o fructosa) en piruvato. Teniendo en cuenta que la concentración de azúcares en el exterior de la célula es muy grande, los mismos entran a la célula por difusión facilitada por medio de una proteína transportadora sin gastos de energía (Hidalgo Togados, 2011).

Es un proceso anaeróbico que se puede dividir en dos etapas principales, que comprende una serie de reacciones enzimáticas. En la etapa I no se libera energía, pero a partir de hexosas se producen dos moléculas de un intermediario clave, la dihidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído-3-fosfato (Madigan et al., 2009,).

Luego toda la dihidroxiacetona fosfato se convierte en gliceraldehído -3- fosfato. Al final de la etapa I se han consumido 2 moléculas de ATP.

En la etapa II ocurre un proceso redox, la energía se conserva en forma de ATP, y se forman dos moléculas de piruvato a partir del gliceraldehído-3-fosfato (Madigan et al., 2009).

La etapa 2 genera 4 moléculas de ATP.

Como balance neto por cada molécula de hexosa se generan: 2 moléculas de piruvato, 2 moléculas de ATP (se generan 4, pero 2 moléculas se consumen para fosforilar las hexosas) ,1 molécula de NADH (cofactor enzimático Nicotamida adenina dinucleótido en fase reducida) (Hidalgo Togados, 2011).

El ciclo de la glucólisis se muestra en la figura 3.

2.4.2) Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es la transformación anaeróbica de los azúcares en etanol y dióxido de carbono (productos principales de la fermentación alcohólica), llevado a cabo por las levaduras, según la siguiente reacción:



Simultáneamente se llevan a cabo una serie de procesos, bioquímicos, químicos y físico químicos.

Cuatro grupos enzimáticos intervienen en la fermentación alcohólica: fosforilasas, oxidorreductasas, carboxilasas, y un cuarto grupo que cataliza reacciones de mutación, isomerización, enolización, etc.

A su vez las enzimas para ejercer su actividad necesita de cofactores, que pueden ser: nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), tiamina pirofosfato (TPP), ión magnesio (Mg^{+2}), adenosina difosfato (ADP) y adenosina trifosfato (ATP), y por último la coenzima A, formada por adenosina difosfato, ácido pantoténico y tioetilamina. La coenzima A tiene sus propiedades en base al grupo tiol (SH), y su combinación con los ácidos presentes forma las acetil coenzima A. (Hidalgo Togores, 2011).

Las levaduras tienen un régimen de respiración anaerobio facultativo, es decir pueden respirar los azúcares o fermentarlos. En condiciones anóxicas las levaduras cambian a un metabolismo fermentativo que origina menor cantidad de biomasa celular, pero cantidades notables de alcohol y CO_2 (Madigan et al., 2009).

El poder reductor del NADH producido en la glicólisis, debe ser transferido a un receptor de electrones para regenerar el NAD^+ . El acetaldehído, es el que sirve de aceptor final de electrones (Ribereau-Gayon et al., 2003).

Es decir, lo que ocurre es la descarboxilación del piruvato por medio de la piruvato decarboxilasa con TPP Y Mg^{+2} como cofactores y origina el acetaldehído, con formación y desprendimiento de CO_2 . Luego el acetaldehído es reducido a alcohol etílico (etanol) por la alcohol deshidrogenasa en una reacción donde se recicla el NADH a NAD^+ , restableciéndose el equilibrio rédox de la célula (Hidalgo Togores, 2011).

El ciclo fermentativo se resume en la figura 3.

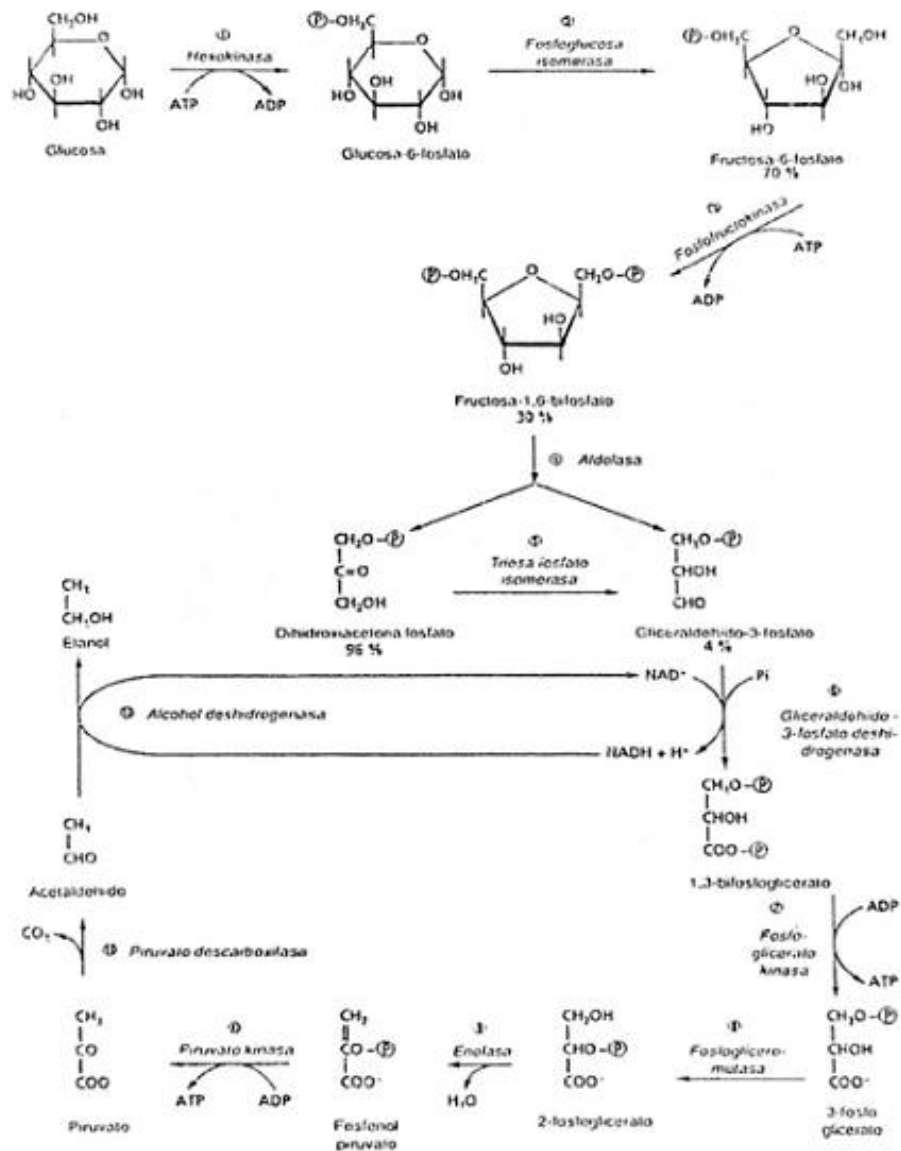


Figura 3: Vía de la glucólisis y de la fermentación alcohólica (Ribereau-Gayon et al., 2003).

2.4.3) Fermentación gliceropirúvica

En un mosto, cierto número de moléculas de hexosas (aproximadamente un 8%) es degradado por esta vía, que conduce a cantidades equivalentes de glicerol, CO₂ y acetaldehído (Hidalgo Togados, 2011)

Al principio de la inoculación, las levaduras en el mosto se desarrollan en un ambiente con presencia de oxígeno, y la piruvato descarboxilasa y la alcohol deshidrogenasa están en muy pequeña cantidad. En consecuencia la acumulación de etanol es limitada. La reoxidación del NADH no puede hacerse con dependencia del acetaldehído, y en su defecto se hace dependiendo de la dihidroxiacetona fosfato (Ribereau-Gayon et al., 2003).

Como consecuencia se forman otros compuestos además del etanol, como glicerina, piruvato, succinato, diacetilo, y otros ácidos orgánicos. La glicerina le confiere a la bebida fermentada un carácter de suavidad (Kunkee et al., 2013).

2.4.4) Respiración

En condiciones de oxígeno presente el ácido pirúvico que proviene de la glicólisis sufre una descarboxilación oxidativa en presencia de la coenzima A y de NAD⁺, generando dióxido de carbono, NADH, y acetil-CoA. Esta reacción es catalizada por el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa y se lleva a cabo en el interior de las mitocondrias. La acetil-CoA es luego completamente oxidada en CO₂, por las reacciones del ciclo de Krebs. (Ribereau-Gayon et al., 2003).

La respiración proporciona biomasa, CO₂, y mucha más energía por molécula de glucosa que la fermentación (Madigan et al., 2009).

El rendimiento en obtención de moléculas de ATP en condiciones aeróbicas es de 36-38 moléculas de ATP por molécula de glucosa oxidada (Kunkee et al., 2013).

2.4.5) Efecto Pasteur vs efecto Crabtree

La fermentación de la glucosa es óptima en condiciones anaerobias y es inhibida por O₂ porque la respiración proporciona mucha más energía por molécula de glucosa que la fermentación. En la fermentación de bebidas alcohólicas se produce el efecto Pasteur (Madigan et al., 2009).

La aireación produce: más biomasa, menos alcohol, y menor consumo de azúcar (Kunkee et al., 2013).

Cuando la concentración de azúcar es elevada (mayor a 9g/L), *Saccharomyces Cerevisiae* sólo metaboliza los azúcares por vía fermentativa. Incluso en presencia de oxígeno, la respiración es imposible. Este fenómeno fue descubierto por Herbert Crabtree en 1929, y se denomina, efecto Crabtree (Ribereau-Gayon et al., 2003).

2.4.6) Productos secundarios de la fermentación

Ácido láctico

El piruvato funciona como aceptor de los hidrógenos del NADH, reduciéndose a ácido láctico, por medio del lactato deshidrogenasa. Se forman 2 isómeros del ácido láctico del cual predomina el ácido D (-) láctico. Este compuesto siempre y cuando sea contenido en baja cantidad, le confiere un carácter deseable a la bebida fermentada (Boto y Fidalgo, 2015).

Ácido acético

Anteriormente era atribuido a alteraciones bacterianas, aunque actualmente se sabe que levaduras del tipo no *Saccharomyces* también lo sintetizan, y que además es un compuesto que, aunque en baja cantidad (100-300 ppm), siempre se forma en las fermentaciones por parte de *Saccharomyces Cerevisiae* (Hidalgo Togados, 2011).

Su mecanismo de formación por parte de la levadura de cerveza puede provenir de la oxidación del acetaldehído por la alcohol deshidrogenasa, o por hidrólisis de la acetil coenzima A, aunque aún no ha sido totalmente precisada (Ribereau-Gayon et al., 2003).

Cantidades por encima del límite hacen que esta sustancia pase a ser organolépticamente desagradables. Los factores que conducen a cantidades anormales de ácido acético son: mostos con elevada riqueza en azúcares, pH muy bajos (menores a 3,1), o muy altos (mayores a 4), y temperatura muy elevadas de proceso (Hidalgo Togados, 2011).

Ácido succínico

Aunque no sea un producto buscado, ya que tiene un carácter amargo, duro y astringente, no conlleva especial importancia porque se sintetiza en cantidades muy escasas (Kunkee et al., 2013).

En condiciones de anaerobiosis, el ciclo de Krebs, no puede ser completo. La cadena de reacciones se interrumpe a nivel del succinato, el cual se acumula. Se estima que el ácido succínico se forma por vía reductiva del ciclo de Krebs en anaerobiosis, el mismo mecanismo que se observa en bacterias (Ribereau-Gayon et al., 2003).

Acetoína, diacetilo, y 2,3-butanodiol

Los tres compuestos son formados por la levadura a partir del ácido pirúvico.

Por condensación de una molécula de piruvato, una molécula de acetaldehído activo y pirofosfato de tiamina se forma el ácido α -acetoláctico.

El diacetilo proviene de la descarboxilación no oxidativa del ácido α -acetoláctico. La acetoína resulta de la descarboxilación no oxidativa del mismo ácido, o de la reducción del diacetilo. El 2,3- butanodiol se forma por reducción de la acetoína.

La acetoína y sobre todo el diacetilo son compuestos aromáticos que evocan el aroma de la manteca, aunque más allá de una determinada concentración, intervienen negativamente en el aroma (Ribereau-Gayon et al., 2003).

En algunas ocasiones, cuando se utiliza tiamina como activador de la fermentación, es común observar estos productos secundarios, ya que la tiamina es uno de sus precursores (Hidalgo Togoies, 2011).

Ácido citramálico y ácido dimetil glicérico

Se forman por condensación del ácido acético (bajo la forma de acetyl CoA) y ácido pirúvico. La incidencia de estos compuestos en el perfil de la bebida es negativa (Ribereau-Gayon et al., 2003).

Alcoholes superiores

Los alcoholes superiores (también llamados aceites de fusel), son compuestos que contienen uno o más grupos oxhidrilo (-OH) y que contienen tres o más átomos de carbono en su molécula. Se forman principalmente como productos secundarios de la descomposición de los aminoácidos del medio, en una serie de reacciones en la cual: primero el aminoácido sufre una desaminación y se obtiene ácido α -cetónico, luego ese compuesto se descarboxila para dar aldehído que finalmente por reducción forma el alcohol secundario (Boto y Fidalgo, 2015).

Se sabe que la producción de alcoholes superiores, depende de la especie y cepa de levadura.

Existen numerosos alcoholes secundarios producto del catabolismo de los diferentes aminoácidos presentes en el medio, aunque los más importantes son: el alcohol isoamílico (olor a banana), hexanol (notas herbáceas), feniletanol (aroma a rosas), metionol (olor a repollos cocidos), n-butanol, n-propanol, y tirosol (Ribereau-Gayon et al., 2003).

Otros alcoholes secundarios importantes son el 4-vinilguayacol (olor a clavo de olor, ahumado) o el 4-etilfenol (olor a establo, sudor de caballo), típico de la fermentación del género de levaduras *Brettanomyces*. Se cree que estos alcoholes, en conjunto con otros derivados, son los responsables de la llamada "resaca del sabor". Sin embargo, en bajas concentraciones otorgan aromas deseables en la mayoría de las bebidas alcohólicas (González, 2017).

Hasta concentraciones de 300 mg/L se busca o se tolera la presencia de dichos alcoholes ya que le otorga a la bebida características de complejidad. Concentraciones mayores a 400 mg/L la bebida se torna maloliente (Boto y Fidalgo, 2015).

Los parámetros que aumentan la concentración de alcoholes superiores son conocidos entre los elaboradores: pH elevado, temperaturas de fermentación elevadas, una

aireación excesiva en los primeros días de la fermentación, y carencias del medio en nitrógeno aminado y en amonio (Ribereau-Gayon et al., 2003).

Ésteres

Se forman gracias a la actividad esterasa de la levadura. En primer lugar tenemos los acetatos de alcoholes superiores cuyo origen es el catabolismo de los aminoácidos, entre ellos tenemos al acetato de isoamilo (aroma a banana o plátano), y el acetato de feniletilo (aroma a rosas). Por otro lado tenemos ésteres que se forman por condensación de acetil coenzima A: hexanoato (aroma a manzana verde), decanoato de etilo (aroma a jabón) (Ribereau-Gayon et al., 2003).

De los ésteres que podemos encontrar presentes en la cerveza destacan el acetato de etilo (olor a solvente de pinturas) y el acetato de isoamilo (habitual en muchas cervezas de trigo, aromas a plátano). Su presencia en altas concentraciones puede ser deseable para algunos estilos de cerveza pero no para otros. Los ésteres, al igual que los alcoholes secundarios, aparecen como resultado de fermentaciones a temperaturas altas (sobre 18 °C), por lo que son más frecuentes en las cervezas tipo ale. Por otro lado las lagers, que fermentan a temperaturas más bajas (10 °C), no contienen ésteres suficientes para ser percibidos. Por lógica se puede decir que las cervezas americanas (como la ale) tienden a expresar en menor grado los aromas provenientes de la fermentación (aromas secundarios) y a resaltar los derivados de la malta y los lúpulos (aromas primarios).

De todos los productos secundarios de fermentación, dos grupos resaltan por su interés en la evaluación sensorial: los alcoholes secundarios y los ésteres (González, 2017).

2.5) Fases de crecimiento de las levaduras-cinética de fermentación

Las levaduras, al igual que los demás microorganismos, pasan por cuatro fases de crecimiento:

- **Fase de latencia:** Cuando una población es inoculada en medio fresco, el crecimiento usualmente no comienza de inmediato sino después de un tiempo llamado de latencia, que puede ser corto o largo dependiendo de las condiciones. Representa un periodo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición, además, se producen las enzimas necesarias para que ellos puedan crecer en un nuevo medio ambiente. En esta fase no hay incremento en el número de células, pero hay gran actividad metabólica, aumento en el tamaño individual de las células, en el contenido proteico, ADN y peso seco de las células. Si tomamos un inóculo de un cultivo viejo (fase estacionaria) y se inocula en un medio con las mismas condiciones en el que se inocularía un cultivo en fase exponencial, generalmente se presenta nuevamente una nueva fase de latencia. Esto se debe a que las células generalmente agotan una serie de coenzimas esenciales u otros constituyentes celulares y se requiere cierto tiempo para su resíntesis (Tortora, Funke, & Case, 2007).

- **Fase exponencial o fase logarítmica:** Es el período de la curva de crecimiento en el cual el microorganismo crece exponencialmente, es decir que cada vez que pasa un tiempo de generación la población se duplica. Bajo condiciones apropiadas la velocidad de crecimiento es máxima. Las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio de cultivo, etc.) afectan a la velocidad de crecimiento exponencial (Tortora, Funke, & Case, 2007)

En esta fase la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase los microorganismos consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio.

Si un cultivo que está creciendo en fase exponencial es inoculado al mismo medio de cultivo bajo las mismas condiciones de crecimiento, no se observa fase de latencia y el crecimiento exponencial sigue a la misma velocidad (Ward, 1991).

- Fase estacionaria: en un sistema de cultivo cerrado, monofásico o en batch, el crecimiento exponencial no se puede prolongar de modo indefinido. Lo que generalmente sucede es que un nutriente esencial del medio de cultivo se agota y llega a ser un factor limitante del crecimiento o se acumulan en el medio algunos productos de desecho hasta niveles inhibitorios que hacen cesar el crecimiento exponencial. Frecuentemente ocurren ambas cosas y, al producirse esto, la población alcanza la fase estacionaria. En la fase estacionaria no hay aumento ni descenso neto en el número de células. Aunque no suele haber crecimiento en la fase estacionaria, muchas funciones celulares continúan, incluyendo el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos. En algunos casos, puede ocurrir un lento crecimiento durante la fase estacionaria; algunas células de la población crecen, pero otras mueren y los dos procesos se equilibran de modo que no hay aumento ni disminución en el número de células. Este fenómeno se llama crecimiento críptico (Madigan et al., 2009).

- Fase de muerte: Si la incubación continúa después de que una población microbiana alcanza la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero va a comenzar una disminución progresiva en el número de células viables y cuando esto ocurre se dice que la población ha entrado en fase de muerte (Tortora, Funke, & Case, 2007).

En algunos casos la muerte se acompaña de una lisis celular real (Madigan et al., 2009).

La figura 4 resume en un gráfico las 4 fases de crecimiento celular.

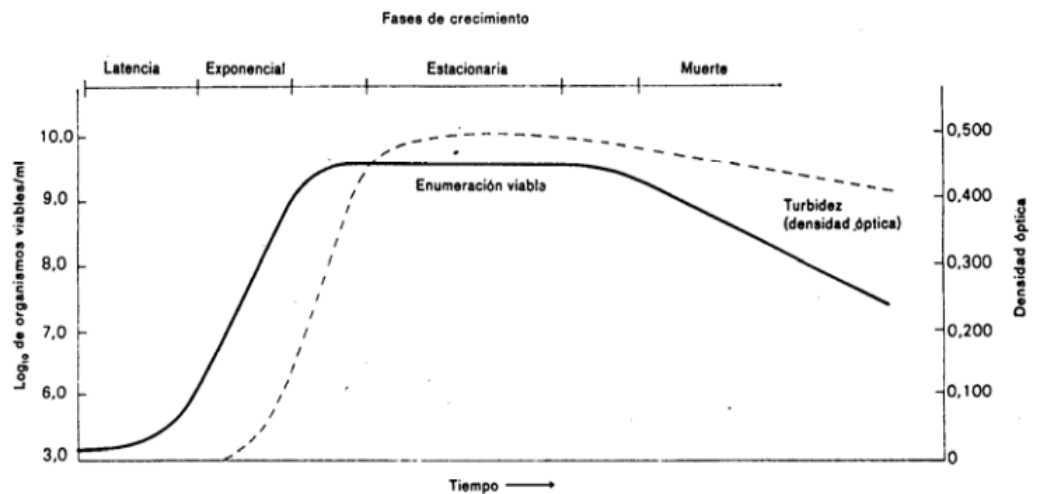


Figura 4: Fases de crecimiento de los microorganismos con respecto al tiempo (Tortora, Funke, & Case, 2007).

2.6) Controles y seguimiento de la cinética de fermentación

Vigilar la marcha de la fermentación en el fermentador permite seguir las transformaciones, prever su evolución e intervenir a tiempo en caso de ser necesario.

Una de las maneras más simples de control consiste en recurrir a la medición de la densidad (que además nos permite estimar el grado probable de alcohol). En el proceso, la desaparición del azúcar y la aparición del etanol ocasiona una reducción de la densidad.

Un control indispensable consiste en el seguimiento de la temperatura. Se debe evitar bajo cualquier concepto los cambios bruscos en la misma para no inhibir el desarrollo de las levaduras.

Otros procedimientos de control son el seguimiento del pH, medición del volumen de CO₂ liberado, pérdida de peso, entre otras (Ribereau-Gayon et al., 2003).

El análisis cinético de las vinificaciones por pérdida de peso de CO₂ es un control diario que permite monitorear la evolución de las vinificaciones en estudios sobre cepajes de levaduras vínicas (Ciklic et al., 2017).

2.7) Factores que afectan el crecimiento, desarrollo de las levaduras y la marcha de la fermentación

Las levaduras, como todo microorganismo, dependen de diferentes factores que propician o inhiben su desarrollo. Éstos determinan que una población pueda colonizar con éxito un determinado medio (mosto) o que sucumban y sean desplazadas por otro tipo de organismo. Dichos factores pueden ser inherentes a la propia levadura, como la tolerancia al alcohol y a altas concentraciones de azúcar, o relacionados con las características del medio, como disponibilidad de agua, de nutrientes, etc. A continuación se detallan algunos de ellos:

- **Tolerancia a la temperatura:** En general, las levaduras son capaces de mostrar actividad en un rango de temperaturas bastante amplio, el cual puede ir de 0 a 50 °C. Sin embargo, su temperatura óptima para la fermentación alcohólica se ubica en el intervalo de 15 a 25 °C (González, 2017).

Con menos de 10°C la fermentación no empieza, y si supera los 35°C, se detiene (Ward, 1991).

La temperatura actúa sobre la cinética de la fermentación, el rendimiento de alcohol es inferior a temperaturas elevadas por un mayor arrastre por el dióxido de carbono. La formación de alcoholes superiores y ésteres es máxima alrededor de 20 °C y disminuye luego progresivamente.

El efecto inhibitorio de las altas temperaturas es mayor cuanto más temprano ocurre la elevación de la temperatura durante el proceso fermentativo (por ello en el inicio debe ser de alrededor de 20°C). Una temperatura inicial demasiado baja limita el crecimiento y conduce a poblaciones de levaduras insuficientes. Además si la fermentación transcurre a temperaturas moderadas las levaduras reaccionan mal a variaciones bruscas de temperaturas (choques térmicos) (Ribereau-Gayon et al., 2003).

- **Tolerancia osmótica:** Son capaces de soportar concentraciones de azúcar tan altas como 40 %, pero a valores más altos que esto, sólo un reducido grupo de levaduras, las llamadas osmófilas, pueden sobrevivir (González, 2017).

- **Tolerancia al alcohol y otros productos de la fermentación:** Esta es quizás la característica más resaltante y útil de las levaduras, en especial de aquellas del género *Saccharomyces*. El alcohol (etanol) es un producto de desecho, y como tal, inhibe el desarrollo de la población en la medida que se acumula en el mosto. No obstante, la levadura de la cerveza y del vino puede mostrar actividad hasta concentraciones entre 10 y 12 % de alcohol. Algunas cepas seleccionadas pueden exhibir una tolerancia hasta 14 %, mientras unas pocas variedades realmente excepcionales pueden llegar a soportar 18 % (González, 2017).

El etanol producido disminuye la asimilación nitrogenada y paraliza la levadura, ya que actúa modificando los sistemas de transporte activo a través de la membrana de la célula (Henschke y Jiraneck, 1992).

Otras sustancias secundarias que se forman en la fermentación paralelamente al etanol, tienen efecto inhibitorio sobre la misma. Hablamos de los ácidos caproico, caprílico y decanoico. Su modo de acción consiste en alterar la permeabilidad de membrana impidiendo los intercambios entre la célula y el medio (Ribereau-Gayon et al., 2003).

- Potencial de hidrógeno o pH: una acidez elevada no parece favorecer la fermentación, pero un pH elevado puede tornar grave una interrupción de la fermentación, por ataque de otros microorganismos como las bacterias (Ribereau-Gayon et al., 2003).

Si la actividad de las levaduras cesa antes del agotamiento de los azúcares, las bacterias como las del género *Leuconostoc*, pueden atacar el medio y generar ácido acético con un aumento desmedido de la acidez volátil. Además podemos mencionar otros géneros como *Lactobacillus*, *Pediococcus* y la levadura *Brettanomyces*.

Este parámetro influye positivamente cuando está en el rango 3,5 a 5,5. Al ser ácido-tolerantes, las levaduras pueden desarrollarse perfectamente en valores de pH bajos, lo que no pueden hacer otros microorganismos, en especial las bacterias.

Ello les otorga una ventaja competitiva ante la acción protectora antiséptica que ejerce el pH sobre el medio (González, 2017).

- Requerimiento de oxígeno: Hasta hace algunos años se pensaba que las levaduras eran microorganismos anaerobios estrictos, es decir, solo podían vivir en ambientes con ausencia total de oxígeno. Modernamente son descritas como microorganismos tremendamente adaptativos que pueden respirar o fermentar según las condiciones ambientales. En presencia de oxígeno (aerobiosis) las levaduras realizan una degradación completa del azúcar (respiración), teniendo como productos agua y CO₂. Cuando la disponibilidad de oxígeno está restringida (anaerobiosis), efectúan una respiración incompleta o fermentación, dando como productos etanol y CO₂. En una población de levaduras el metabolismo respiratorio es característico de las fases tempranas del proceso, en las cuales la actividad celular está dirigida principalmente a la reproducción y la creación de biomasa. Predomina entonces la reproducción asexual por gemación, más rápida y efectiva para estas condiciones. El metabolismo fermentador, por otro lado, predomina en las fases media y tardía del proceso, cuando el CO₂ producido ha desplazado casi completamente el oxígeno que estaba disuelto en el medio, incrementándose la producción de alcohol. La reproducción se efectúa entonces sexualmente a través de la formación de esporas (ascosporas).

Según otros autores, la respiración solo puede darse cuando las concentraciones de glucosa son bajas, en el llamado “efecto Pasteur”, sin embargo cuando la concentración de azúcares es elevada, *Sacharomyces cerevisiae* solo metaboliza azúcares por vía fermentativa, esto se denomina “contraefecto Pasteur” y se manifiesta a partir de los 9 g/L. Aun así una aireación primaria en el mosto mejora la síntesis de esteroides de membrana y la evacuación de etanol de la célula (González, 2017).

La anaerobiosis estricta no asegura una actividad satisfactoria de la levadura. La aireación moderada en los primeros días de la fermentación se traduce en una mejor función de los esteroides de membrana, mejorando su permeabilidad y en consecuencia la penetración de glúcidos y demanda de alimentos nitrogenados (Ribereau-Gayon et al., 2003).

- Requerimiento de nutrientes: la actividad de las levaduras puede verse afectada por carencias nutricionales en el medio como por ejemplo constituyentes nitrogenados, sustancias lipídicas, sustancias minerales y factores de crecimiento (Ribereau-Gayon et al., 2003).

2.8) Nutrientes para fermentos biológicos

Como se mencionó con anterioridad, la falta de divulgación de información sobre estos suplementos en la industria cervecera es uno de los motivos para el desarrollo del presente estudio. Es por ello, que los antecedentes que se presentarán, en mayor medida hacen referencia a su uso, pero en el sector enológico, ya que teniendo en cuenta que aunque los mostos son diferentes, el proceso de la fermentación se lleva a cabo de la misma manera.

El género *Saccharomyces* posee una preferencia especial por los medios muy ricos en azúcares y puede fermentar muchos de ellos. Particularmente, la obtención de alcohol es posible a partir de glucosa, fructosa, sacarosa (glucosa + fructosa) y maltosa (glucosa + glucosa). Sin embargo, otros azúcares como las pentosas (azúcares de cinco átomos de carbono), la lactosa (glucosa + galactosa) y las dextrinas (fragmentos de almidón) no son fermentables y por lo tanto no producen alcohol. Sin embargo, es común que algunos de ellos sean agregados al mosto con fines diferentes.

El nitrógeno es por lo demás uno de los elementos más importantes en el desarrollo de las levaduras. La levadura no puede asimilarlo cuando proviene de los nitritos, pero sí de las sales de amonio y, en último término, de los aminoácidos. Cuando el nitrógeno es deficitario o está ausente en el medio, la levadura consume sus propios aminoácidos para obtenerlo, fenómeno conocido como autólisis. Esta autodestrucción libera sulfuro de hidrógeno (H_2S), el cual puede ser percibido como un olor a huevos podridos. Con el fin de prevenir este perjuicio suele adicionarse a los mostos de vinos y cervezas sales de amonio (fosfato de amonio) en proporción de 20,0 g/L para evitar el eventual off-flavor del sulfuro.

Por otro lado, la tiamina o vitamina B1 es un factor de crecimiento indispensable para las levaduras. En los mostos de cerveza abundan muchísimas de las vitaminas necesarias para el proceso de fermentación, pero no así la tiamina, la cual se encuentra la mayoría de las veces en concentraciones críticas. Durante la fase correspondiente a la multiplicación celular la levadura consume gran parte de ella y, según algunos autores, su adición en proporción de 0,6 g/L suele prevenir cualquier carencia eventual (González, 2017).

Entre los factores de supervivencia podemos nombrar a los esteroides, ergosteroides y otros ácidos grasos de cadena larga, cuya función principal es asegurar la permeabilidad de las membranas para garantizar intercambios de la célula con el medio exterior (Ribereau-Gayon et al., 2003).

Las enzimas implicadas en el proceso de fermentación, para ejercer su actividad necesitan de un cofactor, que puede ser un ion metálico, un grupo prostético o una coenzima. Dentro de los más importantes tenemos Mg^{+2} , Zn, TPP, NAD, ADP-ATP, CoA, entre otros (Hidalgo Togados, 2011).

Los microorganismos quimioorganótrofos (heterótrofos) como las levaduras, es decir, de aquellos microorganismos que utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía, necesitan tipos diferentes de nutrientes y no todos se necesitan en la misma cantidad. Algunos, llamados macronutrientes, se requieren en grandes cantidades, mientras que otros, llamados micronutrientes, se necesitan en menores cantidades, y a veces sólo como trazas.

Aunque las células constan fundamentalmente de C, H, O, N, P y S, los microorganismos son capaces de metabolizar de algún modo al menos 50 elementos. El carbono y el nitrógeno son considerados los macronutrientes más importantes.

Una célula típica contiene aproximadamente 50% de carbono, y alrededor del 12% de su peso seco es nitrógeno (Madigan et al., 2009).

Con respecto al carbono, la levadura encuentra en el mosto, la glucosa y la fructosa que le sirven como fuente de carbono y energía. La relación de los tenores de estos azúcares y la velocidad de la fermentación consiste en un aumento de la velocidad hasta valores de 15-20 g/L, para luego estabilizarse alrededor de los 200g/L, y por encima de tales valores, finalmente disminuir, por un descenso de la población máxima de células (Boto y Fidalgo, 2015).

Con respecto a la provisión de nitrógeno, el catión amonio (NH_4), es particularmente asimilable y puede satisfacer la síntesis de aminoácidos. Los polipéptidos y proteínas no participan del crecimiento de *Saccharomyces*, ya que no tienen la propiedad de hidrolizarlos. Sin embargo la adición de aminoácidos al medio presenta un efecto estimulante.

Existen tres mecanismos para la utilización de aminoácidos por la levadura:

1. Integración directa, sin modificaciones en las proteínas
2. Descomposición de grupo aminado, utilizado en la síntesis de los diferentes constituyentes nitrogenados, donde la cadena carbonada es excretada.
3. Son utilizados como fuente de carbono en las reacciones del metabolismo, donde simultáneamente la levadura recupera el nitrógeno amoniacal correspondiente (Henskche y Jiranek, 1992).

Aunque las mezclas de sales de amonio y aminoácidos poseen una eficacia máxima en lo que refiere a crecimiento de la masa celular como en mejoramiento de la velocidad de fermentación, en la práctica enológica se hace uso mayormente a sales de amonio solamente. Durante largo tiempo el fosfato di amónico (DAP) ha sido la forma de empleo exclusiva de las sales de amonio.

Como aspecto negativo, se debe señalar que los aportes excesivos de estas sales, en el área enológica marcan una modificación en los caracteres organolépticos, por menor formación de alcoholes secundarios y ésteres.

Se sugiere que el momento de la adición de estas sales de amonio en el mosto, debe hacerse antes de iniciarse la fermentación, teniendo en cuenta que la célula lo asimila mejor en su fase de crecimiento exponencial y cuando el medio aún no tiene gran cantidad de etanol formado.

A modo de síntesis, podemos decir que la adición de sales de amonio en mostos de uva naturalmente pobres en nitrógeno mejora la marcha de la fermentación, provocando efectos en el crecimiento de las levaduras y la velocidad de transformación de los azúcares (Ribereau-Gayon et al., 2003).

Elementos minerales

La levadura seca contiene de 5 a 10% de materias minerales.

Hay otros elementos minerales que aparecen como trazas, y a los cuales se los denomina oligoelementos, como por ejemplo el Zn. No todos los oligoelementos son indispensables, pero en dosis muy bajas son constituyentes esenciales de los sistemas enzimáticos (Ribereau-Gayon et al., 2003).

Factores de crecimiento

Los ya mencionados factores de crecimiento son compuestos orgánicos que se necesitan en muy pequeñas cantidades. Los mismos incluyen vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas. Aunque la mayor parte de los microorganismos son capaces de sintetizar estos compuestos, algunos requieren uno o más factores preformados agregados en el medio. Las vitaminas son los factores de crecimiento que se necesitan más frecuentemente. Muchas vitaminas funcionan siendo constituyentes esenciales de las coenzimas (Madigan et al., 2009).

Actúan a baja concentración, en la multiplicación y la actividad celular. Son indispensables para la célula y su carencia perturba el metabolismo. Algunos microorganismos pueden sintetizarlos, otros por el contrario deben encontrarlos en su alimentación.

El mosto es relativamente rico en factores de crecimiento, como para asegurar el desarrollo de la levadura y la fermentación alcohólica, sin embargo, los tenores naturales no corresponden necesariamente a la dosis óptima que la célula necesita (Ribereau-Gayon et al., 2003).

2 Algunos factores de crecimiento importantes y sus funciones, se resumen en la tabla

Tabla 2: Factores de crecimiento y funciones principales en la célula (Madigan et al., 2009).

Factor de crecimiento	Función
Biotina(vitamina B7-B8)	Biosíntesis de ácidos grasos, β -descarboxilaciones, fijación de CO ₂
Niacina(vitamina B3)	Precursor del NAD ⁺ ;transferencia de electrones en reacciones redox
Ácido pantoténico (vitamina B5)	Precursor de la coenzima A, activación del acetilo y derivados acilados
Tiamina (vitaminaB1)	A-descarboxilaciones, transcetolasa
Cobalamina (vitamina B12)	Reducción y trasferencia de grupos monocarbonados;síntesis de desoxirribosa
Ácido fólico (vitamina B9)	Metabolismo de compuestos de un carbono; transferencia de grupos metilo

Entre otros factores de crecimiento también podemos nombrar la piridoxina, mesoinositol, colina, quinonas, rivo flavina y el ácido lipoico (Madigan et al., 2009).

La carencia de ácido pantoténico ocasiona una acumulación de ácido acético por la levadura. La posible explicación recae a que las causas de formaciones de ácido acético anómalas tienen como causas esenciales algunas carencias lipídicas en el mosto, ya que el ácido pantoténico es el que interviene en la formación de la acetil-coenzima A, base de la síntesis de los ácidos grasos y de los lípidos.

En lo que concierne a cinética fermentativa, el aporte de biotina y sobre todo de tiamina se ha revelado eficaz en numerosas experiencias. Un agregado de 0,5 mg/L de tiamina puede aumentar la población viable en un 30%, con una fermentación más rápida de los azúcares (Ribereau-Gayon et al., 2003).

Factores de supervivencia

El esteroles más importante es el ergosterol. El mismo es indispensable para las levaduras en anaerobiosis estricta, ya que, en esas condiciones, la célula no tiene la posibilidad de sintetizarlos. Su presencia es necesaria para asegurar la permeabilidad de las membranas (Ribereau-Gayon et al., 2003).

2.9) La importancia de la nutrición de las levaduras para el éxito de la fermentación-Usos de suplementos como activadores de la fermentación

Los suplementos empleados en enología a menudo se relacionan con una mejor utilización por parte de la levadura, del nitrógeno del mosto.

Extractos de levadura hidrolizada, rica en nitrógeno asimilable, en factores de crecimiento y en sales minerales, han sido propuestos a menudo para acelerar las fermentaciones. Son utilizadas en dosis que pueden llegar hasta los 4 g/L.

Entre las fórmulas de activadores propuestas, una mezcla empleada a dosis de 200 mg/L facilita la fermentación de medios pobres en vitaminas. Comprende 100 g de fosfato di amónico, 250 mg de tiamina, 250 mg de pantotenato de calcio, y 2 mg de biotina (Ribereau-Gayon et al., 2003).

El empleo de corteza de levadura se utiliza como activador ante la inhibición presentada por los productos secundarios de la fermentación, los ácidos caproico, caprílico y cáprico. Estas cortezas actúan levantando la fermentación, fijando esos ácidos grasos tóxicos, restableciendo la permeabilidad de las membranas celulares.

Se muestra una cierta superioridad de los hidrolizados celulares frente a las sales de amonio, con relación a la activación de la fermentación. Si bien la población total de células aumenta poco, la cantidad de células viables sí se ve favorecida gracias al efecto de los factores de supervivencia aportados, característica que no existe en el caso de la adición de sales de amonio por sí sola. El aporte de las cortezas celulares en el 5^{to} día que sigue al inicio de la fermentación, es decir luego de la fase de crecimiento, tiene un efecto más importante todavía (Lafon-Lafourcade y otros, 1984).

La adecuada nutrición de la levadura es un factor esencial para poder llevar a cabo una óptima fermentación alcohólica y prevenir las paradas fermentativas. Por lo tanto se necesita una amplia gama de nutrientes capaces de proporcionar específicamente lo que la levadura necesita en cada momento.

Sin la nutrición apropiada en cada etapa concreta del ciclo de crecimiento de la levadura, ésta puede sufrir estrés y producir características no deseadas en el vino. Otros de los peligros de una pobre nutrición son fermentaciones lentas o paradas fermentativas.

Las levaduras del vino necesitan mucha energía para multiplicarse. Transforman el azúcar del mosto en alcohol y dióxido de carbono, por lo que su energía debe de reintegrarse para que la fermentación no pierda fuerza. El mayor riesgo de una nutrición inadecuada es que la actividad de la levadura pare completamente. Por lo tanto los nutrientes tienen que ser reemplazados cuando se agotan para poder así mantener la actividad fermentativa.

Existen actualmente en el mercado productos destinados a evitar fermentaciones lentas y paradas de fermentación en el área enológica, como por ejemplo toda la gama de suplementos nutricionales de la firma Enartis (cuyos nombres comerciales pueden encontrarse como Nutriferm Special, Nutriferm Energy, Nutriferm No Stop, etc.).

La mayoría de los suplementos nutricionales que se comercializan son preparaciones a base de autolisado de levadura, sometido a una separación física y concentración de aminoácidos libres.

Su función consiste en complementar el perfil de aminoácidos del mosto y suplementar precursores aromáticos usados por las levaduras en las primeras fases de la fermentación para generar compuestos aromáticamente activos. También proporciona factores de supervivencia (esteroles y ácidos grasos insaturados de cadena larga) que ayudan a la viabilidad de la levadura y al éxito de la fermentación.

El proceso de producción de estos suplementos elimina los subproductos de la levadura responsables del amargor y sequedad. Por tanto, muchos de ellos tienen el efecto de potenciar el dulzor.

Otras presentaciones en cambio constan de aminoácidos, vitaminas, factores de supervivencia y sales minerales, presentes naturalmente en las células de la levadura. Se recomiendan para la preparación del pie de cuba y durante la inoculación de la levadura. Entre sus efectos más evidentes, se encuentran la reducción de la fase de latencia, la prevención de la formación de sulfuro de hidrógeno y ácido acético además de una mayor producción de glicerol y polisacáridos (ENARTIS SEPSA S.A.U, 2022).

Otros suplementos muy utilizados son los llamados “*No stop*” y consisten en una preparación a base de corteza de levadura seleccionada por su alto contenido en ácidos grasos insaturados de cadena larga, esteroides, micronutrientes y vitaminas esenciales. Estos elementos son indispensables para levaduras con riesgo de fermentaciones lentas o paradas de fermentación. Estos complementos ejercen las siguientes ventajas:

- Previene paradas fermentativas y garantiza los finales de fermentación en condiciones de estrés.
- Ayuda a reiniciar las fermentaciones lentas y las paradas de fermentación.
- Reduce la producción de ácidos grasos de cadena corta, lo que limita sus efectos negativos para la levadura y el aroma del vino.
- Previene desviaciones metabólicas que conducen a la producción de sulfuro de hidrógeno y aumento de la acidez volátil.
- Brinda apoyo a la levadura y adsorbe sustancias tóxicas

Otras formulaciones especiales están diseñadas para prevenir las paradas de fermentación y las fermentaciones lentas. Estas aportan nutrientes vitales para la levadura, como nitrógeno, aminoácidos, esteroides, tiaminas y ácidos grasos de cadena larga. Su formulación es la adecuada para estimular el metabolismo de la levadura asegurando aromas intensos, limpieza y prevención de la formación de compuestos no deseados (ENARTIS SEPSA S.A.U, 2022).

3) OBJETIVOS

3.1) Objetivo general

- Comparar la regularidad fermentativa en la elaboración de cerveza artesanal rubia dorada pampeana con el agregado de complemento nutricional (“Con suplemento”) y sin el agregado del complemento nutricional Nutriyeast (“Sin suplemento”).

3.2) Objetivos particulares

- Realizar la medición de variables físico químicas de control en una fermentación que no contiene el agregado de complemento nutricional (Grupo “Sin suplemento”), y en otra que contiene el agregado de complemento nutricional Nutriyeast (Grupo “Con suplemento”).
- Realizar el recuento de levaduras en la fermentación del grupo “Sin suplemento” y en la fermentación del grupo “Con suplemento”.
- Realizar la curva de fermentación en base a la pérdida de peso, en la fermentación del grupo “Sin suplemento” y en la fermentación del grupo “Con suplemento”.
- Comparar los resultados obtenidos en la fermentación del grupo “Sin suplemento” versus la fermentación del grupo “Con suplemento”.

3.3) Hipótesis

El uso del complemento nutricional para levaduras, mejora la cinética de fermentación en la elaboración de cerveza dorada pampeana.

4) MATERIALES Y MÉTODOS

4.1) Descripción del ensayo

Materias primas (para elaborar cerveza dorada pampeana):

Agua: se utilizó agua de red potable apta para consumo, declarada por medio de un filtro PSA (por sus siglas en inglés *Pressure Swing Adsorption*), cuyos medios activos filtrantes están compuestos de carbón activado granular (C.A.G), impregnado en plata. KDF® (aleación de cobre y zinc de alta pureza) y zeolitas naturales. La recolección de agua se realizó en 3 bidones de polietileno de 5 L cada uno. Según la relación de empaste de obtención de mosto se calcula que cada 1 kg de cebada malteada son necesarios 3 L de agua. De esa manera se calculó que la cantidad de agua necesaria fue de 10 L para la fase de maceración, y de 5 L para la fase de lavado del mosto.

Se realizó la corrección del pH del agua de lavado ajustando el pH a 5,5 con ácido fosfórico de grado alimenticio de 85% de pureza.

Cebada malteada (malta): se utilizó 5,5 kg de una malta base pre molida tipo Pilsen pálida. Esos kilogramos se calcularon teniendo en cuenta la relación de empaste malta/agua mencionada anteriormente para finalmente obtener los 10 litros de mosto que se desean. La malta se mantuvo envasada al vacío en bolsas de polipropileno, conservada dentro de la planta, en un lugar fresco, seco y al abrigo de la luz, hasta el momento de su uso.

Lúpulo: se utilizó 0,3 g/L de lúpulo cascade en pellets. El lúpulo se mantuvo envasado al vacío en bolsas de polipropileno y almacenado en refrigeración hasta el momento de su uso, para preservar sus características.

Levadura: se utilizó 1,15 g/L de levadura de cerveza seca activa *Saccharomyces Cerevisiae* tipo Safale US-05 del laboratorio francés Fermentis (el total del sobre). El producto, viene sellado al vacío en un envase multilaminado y atmósfera protectora, que solo debe ser abierto al momento de su uso. Su conservación previa al uso debe hacerse en un ambiente frío y seco. Esta levadura no necesita de previa activación en pie de cuba, por lo cual se agregó directamente a la totalidad del mosto, antes de comenzar con la fase de fermentación.

Clarificante Irish Moss: se utilizaron 0,15 g/L de carragenato en polvo que fueron calculados según la receta, con el fin de clarificar la cerveza, precipitando principalmente proteínas en suspensión. Este coadyuvante de tecnología se conservó envasado al vacío en una bolsa de polipropileno en un sitio fresco y seco hasta el momento de su uso.

Suplemento nutricional para levadura: Este nutriente para fermentos biológicos está compuesto por una base de levaduras de cerveza inactivas hidrolizadas enzimáticamente en sus diferentes y múltiples aminoácidos esenciales para las levaduras, una combinación de minerales como nitrógeno de origen orgánico, magnesio, hierro, zinc (cofactor enzimático de la fermentación), vitamina B1, niacina, fosfatos amónicos. Además tiene otros componentes vitamínicos, como tiamina (en 0,5 mg /L o ppm, lo cual aumenta un 30% la población celular), biotina, y pantotenato de calcio.

El nombre comercial es "Nutriyeast". La cantidad agregada fue de 0,6g/ L, y solo se adicionó al grupo "Con suplemento" conformado por 5 litros de mosto.

Las materias primas utilizadas se observan en la figura 5.



Figura 5: Materias primas utilizadas en la elaboración de las micro fermentaciones.

4.2) Algoritmo literal de la elaboración de las micro fermentaciones

Fase 1: Elaboración del mosto

- **Recepción de materia prima:** Se partió de materias primas de adecuada calidad, que presenten un estado higiénico sanitario apropiado, que su estado de conservación sea el óptimo y que tenga adecuadas características sensoriales.
- **Maceración:** Se colocó en la olla de doble fondo de acero inoxidable que fue usada como macerador, el agua de clorada, y se elevó la temperatura de la misma hasta 73°C controlando con un termómetro de alcohol. Se situó la malla filtrante dentro de la olla y se sujetó de las orillas con los broches. Se vertió con cuidado la malta dentro de la olla y se aseguró con la espumadera que el agua moje la totalidad de los granos. En ese momento cuando el cereal hace contacto con el líquido la temperatura descendió aproximadamente 10 grados Celsius, de modo que se dejó la temperatura en $65 \pm 2^\circ\text{C}$, cuidando que la misma no descienda por debajo de los 60°C. La etapa continuó durante 90 minutos.

En la figura 6 se observa la fase de maceración y control de la temperatura.



Figura 6: Fase de maceración y control de su temperatura fuente

- **Filtración y remontaje:** El macerado, se filtró por medio de la malla filtrante. El remontaje se logró evacuando parte del líquido por el grifo de purga inferior vertiéndolo por la parte superior usando como intermediario una espumadera para no romper el lecho formado. Se hizo pasar el mosto 2 o 3 veces por el lecho filtrante, para obtener un líquido claro con la menor cantidad de partículas sólidas de restos vegetales y para producir la máxima solubilización de los azúcares en el mosto.
- **Lavado:** Se colocó el agua en base a la cantidad de mosto final que queremos obtener en una olla de menor volumen, se llevó la temperatura a 75°C. Y se procedió a la acidificación de la misma con ácido fosfórico a razón de 0,15 ml/L de agua. Inmediatamente se vertió el agua de lavado con cuidado sobre la parte superior de la olla con doble fondo en donde se estaba realizando la maceración, usando como intermediario una espumadera con el fin de no romper el lecho formado en el mosto. El proceso de acidificación del agua y su correspondiente control de pH se observan en la figura 7.



Figura 7: Acidificación del agua de lavado y control del descenso de pH de la misma

- **Cocción y lupulado:** Se realizó en la misma olla de acero inoxidable de doble fondo, en la cual primero se retiró con cuidado la malla filtrante con el bagazo ya agotado, fue exprimido a modo de aumentar el rendimiento de líquido. El doble fondo de la olla funciona como un filtro en donde la mayor parte de la borra decanta permitiendo que el mosto que conseguimos luego de la cocción sea más claro. Al mosto filtrado de la etapa anterior se lo sometió a calentamiento aumentando la temperatura hasta los 98°C durante 60 minutos, para esterilizarlo e inactivar las enzimas alfa amilasas. En esta etapa se adicionó el lúpulo dividiéndolo en tres fracciones: al inicio de la fase para espumar, a los 30 minutos para darle amargor y al final de la cocción para aportar aroma. El proceso de cocción se realizó con la olla destapada para eliminar los productos volátiles indeseables. A los 55 minutos se efectuó un remolino en el centro del líquido (*whirpool*), y se agrega el clarificante *Irish moss* para favorecer la decantación de partículas sólidas. La presente etapa del proceso se ilustra en la figura 8.



Figura 8: Fase de cocción y lupulado

Fase 2: Sembrado de levaduras y producción de las micro fermentaciones

- **Llenado del tanque fermentador:** terminado el proceso de cocción se drenó la olla con el grifo de purga inferior y se llenó el tanque fermentador de polietileno descartando la última parte, correspondiente a la borra del mosto. Inmediatamente se tapó para evitar el contacto con el exterior. La presente fase se muestra en la figura 9.



Figura 9: Llenado del tanque fermentador

- **Refrigeración del mosto:** inmediatamente se realizó un enfriamiento rápido del mosto hasta 22°C por medio de un baño maría inverso, sumergiendo parcialmente el tanque fermentador en agua fría contenida en una bacha, con el fin de adecuarlo para adicionar las levaduras en la siguiente etapa. La temperatura se tomó en esta fase con ayuda de un termómetro electrónico con sensor externo para evitar contaminaciones, como se ilustra en la figura 10.



Figura 10: Control de la temperatura en la fase de refrigeración del mosto.

- **Sembrado de levaduras:** una vez obtenida la temperatura requerida, se destapó el fermentador y se descargó el contenido del sobre de levaduras secas activas

Sacharomyces Cereviciae tipo Safale US-05. Luego se tapó el tanque nuevamente y se agitó el fermentador por 5 minutos con el fin de que el mezclado con el mosto sea total y uniforme. Posteriormente se dejó en reposo el fermentador unos 15 minutos para que las levaduras se activen. La presente etapa se muestra en la figura 11.



Figura 11: Sembrado de levaduras secas activas *Sacharomyces Cereviciae* tipo Safale US-05

- **Fraccionamiento 1:** las botellas de pet, fueron previamente lavadas y desinfectadas con alcohol de 70°, y aforadas a 250 ml por medio de un matraz. Luego se llenaron 20 botellas identificadas con la etiqueta “Sin suplemento” hasta la marca correspondiente a los 250 ml con ayuda del grifo inferior del fermentador. Se taparon las botellas formando tapones con algodón de alta resistencia, que funcionan a modo de airlocks o trampas de aire, dejando salir el CO₂ del interior y evitando la entrada del O₂ del ambiente. Esta fase se ilustra en la figura 12.



Figura 12: Fraccionamiento del mosto en botellas de plástico P.E.T

- **Agregado del suplemento:** se destapó levemente con cuidado el tanque fermentador y se descargó el contenido del sobre de complemento nutricional Nutriyeast en el mosto restante, se tapó herméticamente el tanque y se agitó durante 5 minutos para que el mezclado con el mosto sea total y uniforme. La etapa se ilustra en la figura 13.



Figura 13: Agregado de suplemento nutricional Nutriyeast

- **Fraccionamiento 2:** se llenaron 20 botellas identificadas con la etiqueta “Con suplemento” hasta la marca correspondiente a los 250 ml con ayuda del grifo inferior del fermentador. Se taparon las botellas formando tapones con el algodón de alta resistencia.

- **Fermentación:** se dio inicio a las micro fermentaciones en ambos grupos y se les dio seguimiento durante 16 días, en donde respondiendo al plan de muestreo se les evaluó el pH, la densidad, grados Brix, azúcares reductores, crecimiento celular y la cinética de fermentación mediante una curva de pérdida de peso.

Las micro fermentaciones finalizadas y clasificadas en sus respectivos grupos se muestran en la figura 14.



Figura 14: Micro fermentaciones terminadas y separadas en sus respectivos grupos

4.3) Diagrama de flujo de elaboración de las micro fermentaciones

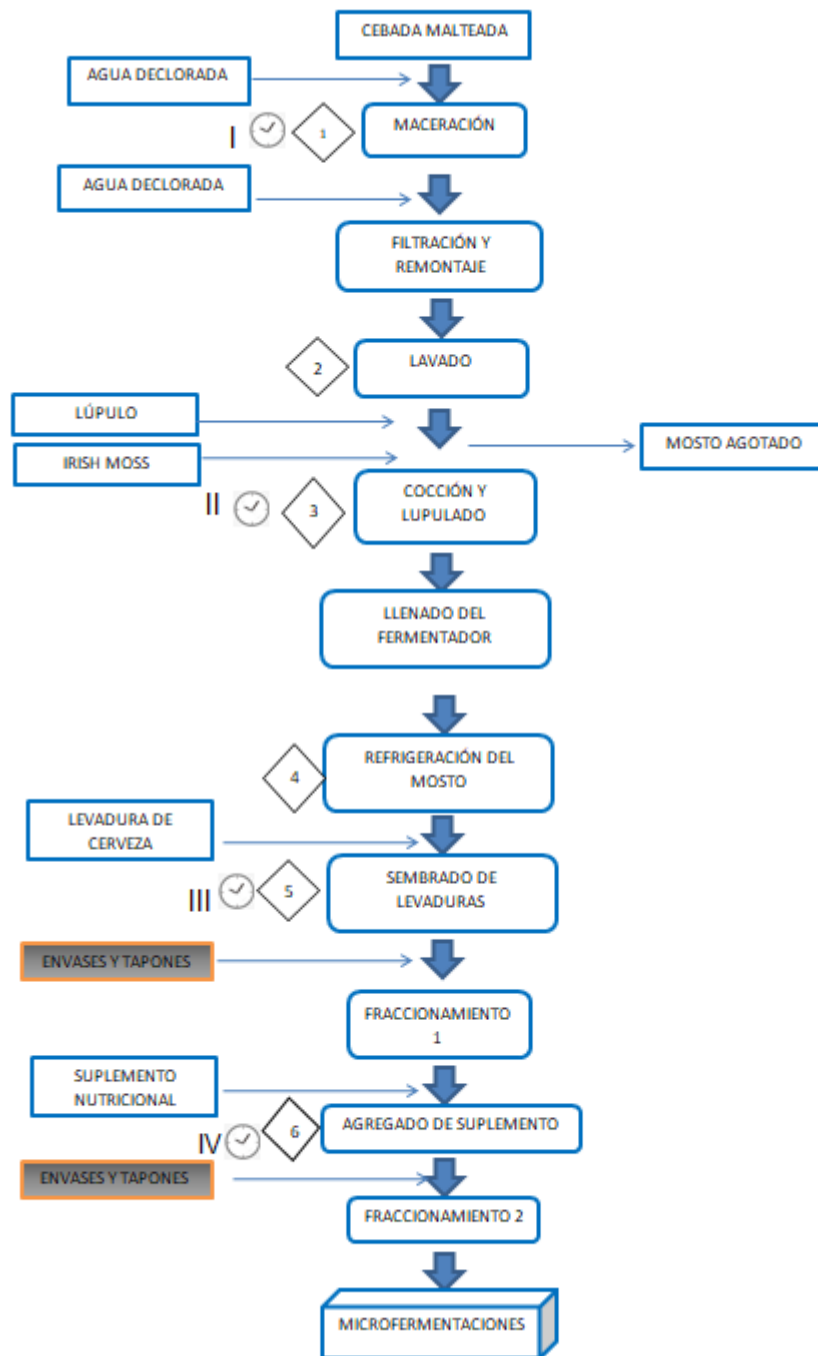


Figura 15: Diagrama de flujo de proceso de las micro fermentaciones

Diccionario control

1. Se controla que la temperatura del agua se mantenga en $65 \pm 2^\circ\text{C}$ (esencial que no descienda por debajo de 60°C).
2. Se controla que la temperatura del agua sea de 75°C y su pH descienda a 5,5
3. Se eleva y mantiene la temperatura a 98°C para inactivar enzimas y pasteurizar el mosto
4. Se controla que la temperatura descienda hasta los 22°C
5. Se controla que el mezclado sea total

6. Se controla que el mezclado sea total

Diccionario reloj

I. Tiempo en periodo de maceración : 90 minutos

II. Tiempo en periodo de cocción :60 minutos

III. Tiempo de homogenización de las levaduras: 5 minutos

 Tiempo de reposo posterior del fermentador: 15 minutos

IV. Tiempo de homogenización del suplemento nutricional : 5 minutos

Micro fermentaciones:

Se evaluaron las fermentaciones alcohólicas de muestras obtenidas a partir de 10 L de mosto elaborado con 5,5 kg de malta Pilsen, 15L de agua deionada, 11,5 g de levadura *Sacharomyces cerevisiae* US05, 3 g lúpulo Cascade, con y sin el agregado de 3 g de complemento nutricional Nutriyeast.

4.4) Etapas del proceso de muestreo

La evaluación del rendimiento se efectuará en un batch de cerveza artesanal de la variedad Argentina dorada pampeana, elegida por tener amplia difusión entre los elaboradores nacionales. La evaluación constará en separar el volumen obtenido en dos grupos: "Sin suplemento" y "Con suplemento" (adicionado con el complemento en estudio). Luego se desarrollará sobre ambos grupos 3 ensayos: determinación de variables físico químicas (grados Brix, pH, densidad, azúcares residuales), recuento de levaduras *Sacharomyces cerevisiae* y determinación del % de sobrevivencia de las mismas, y por último determinación de una curva de fermentación por pérdida de peso.

Planificación de la toma de muestra: se partió de un volumen total de 10 L de mosto, que fueron colocadas en botellas de 500 ml aforadas a 250 ml cada una, estas conformaron una totalidad de 40 botellas. Se separaron 5 L de mosto (20 botellas) y se les agregó el complejo nutricional Nutriyeast, estos conformaron el grupo "Con suplemento", identificadas con una "TT" en la etiqueta y numeradas del número 1 al número 20.

Los 5 L restantes se dividieron en 20 botellas iguales que conformaron el grupo "Sin suplemento", identificadas con una "T" en la etiqueta y numeradas del número 1 al número 20.

Cada uno de estos grupos de 20 botellas conformó las 2 poblaciones en estudio.

En la figura 16 se muestran ambos grupos de micro fermentaciones en el día 2 de fermentación, en donde comienza a notarse la formación de espuma en la superficie de las mismas.



Figura 16: Micro fermentaciones en el día 2 de fermentación, clasificadas en los grupos “Con suplemento” y “Sin suplemento”.

Al tratarse de poblaciones homogéneas, por medio de la técnica de muestreo llamada M.A.S (Muestreo aleatorio simple) y utilizando un software de números aleatorios (Excel), mediante la fórmula =ALEATORIA.ENTRE (min; máx.), se sortearon 3 unidades de muestra de cada grupo (n=6). De modo que se obtuvo 3 botellas “sin inóculo” y 3 “con inóculo”, a las cuales se les tomó alícuotas que conformaron nuestras unidades de análisis que fueron usadas para medir la variable N° de células /mL. Este es un sorteo sin reposición, ya que esas 6 unidades no pudieron volver a salir sorteadas. Después, por medio de otro M.A.S se volvió a sortear del total restante de botellas de cada grupo, 3 unidades de muestra (n=6) para obtener 3 botellas del grupo “Sin suplemento”, y 3 “Con suplemento”, las cuales se usaron mediante el tomado de alícuotas (unidades de análisis) para medir las variables densidad, grados Brix, pH, y azúcares reductores residuales. En ambos casos se efectuó una medición de variables con 3 repeticiones.

El resto de la población (n=28) se utilizó para medir la variable peso en g, en el ensayo 3, que consistió en realizar una cinética de fermentación por pérdida de peso. Cabe destacar que en la práctica ocurrió la pérdida de una unidad de muestra de cada grupo debido a un accidente en la toma de datos, por lo cual se redujo el tamaño de muestra a n =26. Es decir se efectuaron 13 repeticiones para cada grupo, o lo que es lo mismo n=13 para cada grupo.

Las etapas del proceso de muestreo se esquematizan en la figura 17.

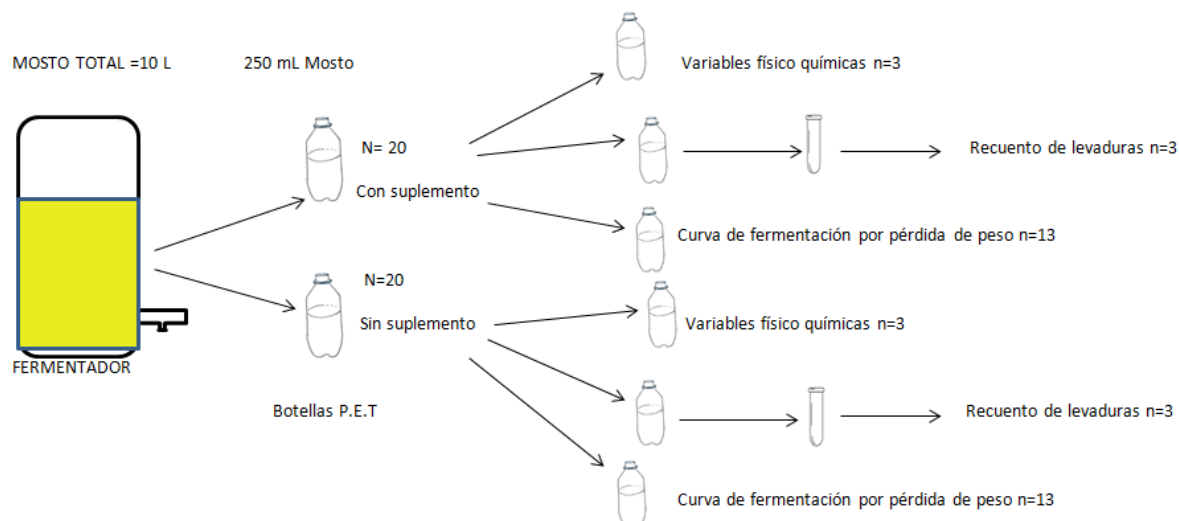


Figura 17: Etapas del muestreo

4.5) Metodología de la experimentación

4.5.1) Ensayo 1: Determinación y evaluación de las variables físico químicas

Instrumental:

- Peachímetro digital “Eco tester pH 2”: rango 0,0 a 14.0 pH; exactitud 0,1 pH; precisión $\pm 0,1$ pH
- Refractómetro portátil de mano “Atago N1” : Rango de medición 0...140 ° / 0...32 % Bx
- Densímetro: para densidades mayores a 1. Triple Escala. Rango de medición 1000-1100
- Probeta sin graduación de 250 ml
- Vaso de precipitado de 250 ml
- Erlenmeyer de 250 ml
- Bureta acodada de 50 ml
- Mechero de alcohol
- Mechero de Bunsen

Se efectuó un ensayo por triplicado para cada grupo en donde se determinaron valores de pH, grados Brix y densidad al inicio de la fermentación, y luego los días 4, 5, 9,10 y 15 de haber comenzado la misma .Finalmente en el día 16 se realizó la determinación de azúcares reductores por el método de Fehling Causse Bonnans, en donde se verificó el nivel de azúcares residuales asegurando que la fermentación haya llegado a su fin.

Para estandarizar las condiciones ambientales en este ensayo se trabajó con la mayor hermeticidad posible en la sala de fermentación de la Cátedra de Bromatología de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNCuyo, en donde se registró diariamente la temperatura ambiental mediante un termómetro de alcohol y se comprobó su estabilidad en un rango de $19 \pm 2^{\circ}\text{C}$.Además para asegurar la esterilidad con el fin de no contaminar las muestras, se trabajó en un contexto controlado, utilizando desinfectantes en aerosol para el ambiente, alcohol de 70° para superficies y material de laboratorio, la manipulación de las botellas se hizo en cercanía a la llama de un mechero de alcohol .

Las botellas sorteadas fueron las identificadas como:

Grupo "Sin suplemento": botella N° 3, botella N° 11, botella N°19

Grupo "Con suplemento": botella N° 4, botella N° 8, botella N°16

4.5.1.1) Determinación de grados Brix (°Bx)

Para su determinación en este ensayo se utilizó un refractómetro de mano. En el presente ensayo el instrumento se utilizó además para determinar la densidad de una sustancia, ya que se puede averiguar la cantidad de soluto en una disolución a partir de su índice de refracción. Es importante hacer notar que en fases previas a la obtención de las microfermentaciones, se hizo difícil tomar el dato de la densidad mediante densímetro porque era un volumen grande el que había que tomar del batch, por lo cual se decidió obtener la densidad por medio de los valores de grados Brix arrojados por el refractómetro. Esto es factible de hacer porque al inicio, los °Bx solo reflejan la medición de sólidos solubles presentes en el mosto aunque comenzadas a transcurrir las fermentaciones ya no es posible tomar el valor de grados Brix para convertirlo en valor de densidad al haber producción de alcohol y otras sustancias, los datos obtenidos ya no corresponden solamente al valor de sólidos solubles sino a una mezcla azúcar/etanol en solución.

Para efectuar la conversión de los datos obtenidos en fases prefermentativas de grados Brix a g/L se utilizó el cálculo que se muestra a continuación (Kaminski, 2003).

$$\text{g/ L sol.solubles} = (^\circ\text{Bx tomados al mosto} \times 4) + 1000$$

Una vez obtenido el resultado en grado Bx (es decir, el porcentaje en masa de sacarosa), pudimos obtener fácilmente el grado alcohólico probable del mosto mediante la aplicación de la fórmula que se muestra a continuación (válida en el intervalo de 15 a 25 grados Brix) (*Manual De Instrucciones PCE-Oe*, 2015).

$$\% \text{ vol} = (0,6757 \times ^\circ\text{Bx}) - 2,0839$$

Se consultó la tabla de conversión del instrumento (tabla 3), para corroborar los valores de alcohol potencial y densidad calculados (*Manual De Instrucciones PCE-Oe*, 2015).

Tabla 3: Tabla de conversión del refractómetro de mano (*Manual De Instrucciones PCE-Oe, 2015*).

Sacarosa % (m/m)	Índice de refracción a 20 °C	Masa volúmica a 20 °C	Azúcar en g/l	Azúcar en g/kg	Grado alcohólico % vol a 20 °C
15.0	1.35567	1.0599	136.0	128.3	8,08
15.1	1.35583	1.0603	137.1	129.3	8,15
15.2	1.35599	1.0608	138.2	130.3	8,21
15.3	1.35615	1.0612	139.3	131.3	8,27
15.4	1.35631	1.0616	140.4	132.3	8,34
15.5	1.35648	1.0621	141.5	133.2	8,41
15.6	1.35664	1.0625	142.6	134.2	8,47
15.7	1.35680	1.0629	143.7	135.2	8,54
15.8	1.35696	1.0633	144.8	136.2	8,60
15.9	1.35712	1.0638	145.9	137.2	8,67
16.0	1.35728	1.0642	147.0	138.1	8,73
16.1	1.35744	1.0646	148.1	139.1	8,80
16.2	1.35760	1.0651	149.2	140.1	8,86
16.3	1.35776	1.0655	150.3	141.1	8,93
16.4	1.35793	1.0660	151.5	142.1	9,00
16.5	1.35809	1.0664	152.6	143.1	9,06
16.6	1.35825	1.0668	153.7	144.1	9,13
16.7	1.35842	1.0672	154.8	145.0	9,20
16.8	1.35858	1.0677	155.9	146.0	9,26
16.9	1.35874	1.0681	157.0	147.0	9,33
17.0	1.35890	1.0685	158.1	148.0	9,39
17.1	1.35907	1.0690	159.3	149.0	9,46
17.2	1.35923	1.0694	160.4	150.0	9,53
17.3	1.35939	1.0699	161.5	151.0	9,59
17.4	1.35955	1.0703	162.6	151.9	9,66
17.5	1.35972	1.0707	163.7	152.9	9,73
17.6	1.35988	1.0711	164.8	153.9	9,79
17.7	1.36004	1.0716	165.9	154.8	9,86
17.8	1.36020	1.0720	167.0	155.8	9,92
17.9	1.36036	1.0724	168.1	156.8	9,99

El refractómetro de mano utilizado para la toma de °Bx y la lectura de valores se muestran en la figura 18.

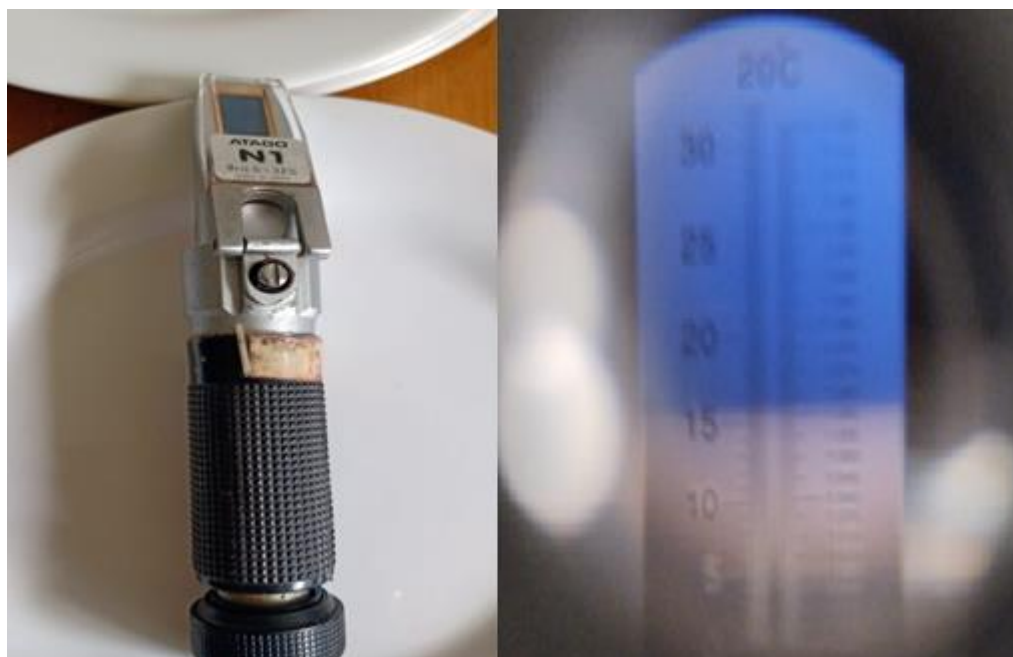


Figura 18: Refractómetro de mano y lectura tomada con el instrumento en el mosto después del hervido.

4.5.1.2) **Determinación de pH**

En el presente trabajo el pH fue controlado desde la fase prefermentativa llamada maceración, luego al final de la cocción y después en los días 4, 5, 9, 10 y 15 de haber comenzado la fermentación.

Se deben controlar los niveles de pH del macerado porque afectan a la actividad de las enzimas en general, y dentro de ellas, a las amilasas en concreto. Estas son las principales responsables de la maceración, es decir, la transformación de los almidones de la malta en azúcares fermentables, los cuáles durante la fermentación nos permitirán obtener alcohol y CO₂.

Además, mantener el nivel de pH cerca de 5.5 también será ideal para la extracción y transformación del lúpulo durante la cocción, la precipitación de proteínas, la clarificación del mosto e incluso el proceso de fermentación.

El CAA en su Artículo 1082 establece que los valores de pH deberán estar comprendidos entre 4 y 5 para las cervezas comerciales.

El procedimiento de medición se ilustra en la figura 19.

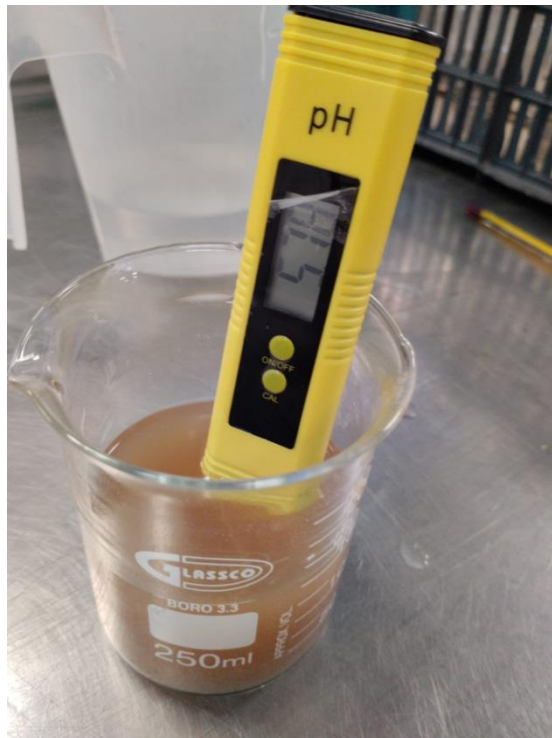


Figura 19: Determinación de pH con peachímetro digital

4.5.1.3) **Determinación de densidad**

La determinación de la densidad se efectuó mediante un densímetro baumé

Se midió la variación de gravedad específica de un mosto antes de comenzar la fermentación y después de terminada la misma. Esto permitió estimar el contenido en alcohol obtenido durante el proceso de elaboración de la cerveza artesanal.

La densidad inicial se tomó luego del hervido del mosto y una vez que el mismo se enfrió a 20 grados Celsius. Se continuó midiendo en los días 4, 5, 9, 10 y 15 de haber comenzado la fermentación.

La determinación efectuada se muestra en la figura 20.



Figura 20: Uso de densímetro en la medición de la evolución del descenso de densidad en el mosto

4.5.1.4) Determinación de azúcares reductores residuales

Materiales:

- Pipeta doble aforo de 15 ml
- Vaso de precipitado de 50 ml
- Erlenmeyer de 250 ml
- Mechero de Bunsen
- Tela de amianto
- Bureta acodada de 50 ml

Reactivos:

- Reactivo de Fehling Causse Bonnans (FCB)
- Azul de metileno al 1 %
- Agua destilada

En el día 16 desde el inicio de la fermentación se realizó la determinación de azúcares reductores residuales mediante el método de Fehling Causse Bonnans (ver figura 21). Con estos valores además se comprobó si las fermentaciones llegaron realmente a su fin

La técnica se basa en que a temperatura de ebullición, los azúcares reductores, es decir aquellos que tienen una función aldehídica y cetónica como las pentosas y hexosas en medio alcalino, reducen las soluciones cúpricas.

Las botellas que se analizaron fueron las mismas que se sortearon en el muestreo y usadas para los análisis de °Bx, pH y densidad, es un ensayo por triplicado que se efectúa tanto en el grupo "Sin suplemento" como en el grupo "Con suplemento".

En un Erlenmeyer de 250 ml se colocó 15 ml de reactivo Fehling Cause Bonnans midiéndolo con la pipeta de doble aforo, y se agregó 50 ml de agua destilada. Se calentó hasta ebullición sobre la tela de amianto en mechero de Bunsen. Se dispuso la bureta acodada sobre el Erlenmeyer previamente cargada y enrasada con el mosto (cabe aclarar que no se defecó la muestra porque el mosto de cerveza no contiene pigmentos antociánicos de carácter reductor). Cuando el reactivo FCB llegó a hervor se abrió el robinete de la bureta agregando mosto a razón de 3 gotas por segundo.

Cuando la solución llegó a una coloración celeste pálido-verdosa, se agregó 2 gotas de Azul de metileno y se dejó difundir el colorante en el analito de análisis (ver figura 22).

Se continuó agregando el mosto a razón de 1 gota cada 2 o 3 segundos, hasta desaparición del color azul y aparición del punto final, una mancha amarilla-anaranjada que se extiende y persiste al menos 30 segundos (ver figura 23).

Con los valores del gasto de mosto que se lee en la bureta se calculó el valor de azúcares residuales en gramos/l según el siguiente cálculo (se utilizó la fórmula reducida):

$$\text{Azúcares reductores g/l} = 0,041 \times 1000/\text{ml} \times 11/10 \times 1/d$$

En su forma reducida la fórmula queda de la siguiente manera:

$$\text{Azúcares reductores g/l} = 45,1/\text{ml} \times 1/d$$

0,041: gramos de azúcar invertido que se necesitan para reducir los 15 ml de licor de FCB (los ml de muestra que se gasten en la titulación también reducen 15 ml del reactivo FCB, por lo tanto poseen igual cantidad de azúcar).

ml: ml de mosto gastados

d: Dilución del defecado (para nuestro caso en particular el valor de la dilución es $d=1$ ya que al tratarse de un mosto claro filtrado, no se hace defecado del mismo y el valor de su extracto se toma hasta 30 g/l, lo que se corresponde con una dilución de 1/1)

11/10: Factor que compensa la dilución producida por el acetato de plomo usado en el defecado (en nuestro caso particular, no es tenido en cuenta, ya que no se realizó defecado del mosto).



Figura 21: Determinación de azúcares reductores residuales por método Fehling Cause Bonnans



Figura 22: Coloración celeste momento del agregado del indicador de la titulación

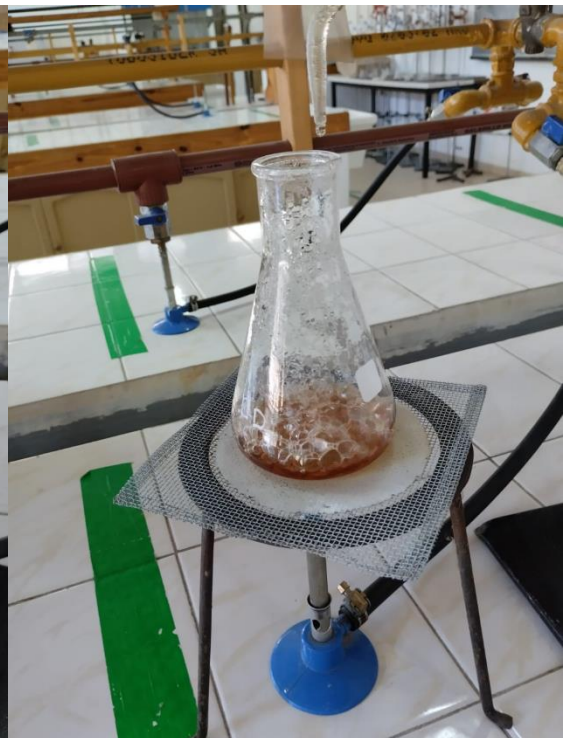


Figura 23: Punto final de la titulación

4.5.2) Ensayo 2: Recuento de levaduras de cerveza totales y viables

Materiales:

- Envase estéril de análisis
- Pipetas de libre escurrimiento
- Propipeta de goma
- Cámaras de Neubauer (capacidad de 0,0025 mm² de área y de 0,100 mm de profundidad).
- Micropipeta automática Gilson Pipetman de 1000 µL
- Tips para pipeta automática
- Tubos de ensayo de 16 mm x 150 mm
- Mechero de Bunsen
- Tubos de plástico para centrifuga tipo Eppendorf de 1,5 ml
- Mechero de Bunsen de gas natural
- Agitador Vortex analógico
- Microscopio óptico

Reactivos:

- Solución A: Solución de agua destilada con azul de metileno, 0,1 g/500 ml.
- Solución B: KH₂PO₄, solución de agua destilada, 13,6 g/500 ml.
- Solución C: Na₂HPO₄ x 12 H₂O solución de agua destilada, 2,4 g/100 ml
- Solución D: 498,75 ml de solución B + 1.25 ml de solución C.
- Solución E: Mezcle los 500 ml de solución D con 500 ml de solución A para obtener una solución de azul de metileno final tamponada, con un pH aproximado de 4,6.

Este análisis se basó en la resolución OIV/OENO 206/2010. Revisión de la resolución OENO 8/95 para el Análisis microbiológico del vino y del mosto para detección, diferenciación y recuento de microorganismos.

Recuento de células de levadura - tinción de células de levadura con azul de metileno para determinación de viabilidad

El ensayo 2 se realizó en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo. El mismo se realizó bajo condiciones de asepsia microbiológica.

El recuento se realizó en cámara de Neubauer con microscopio óptico, en campo luminoso.

Teniendo en cuenta la técnica que dicta la resolución, se contaron células de manera aleatoria. Se eligió una de las 2 cámaras que posee el portaobjetos para hacer el conteo.

Una cámara de recuento está formada por 9 cuadrados grandes, cada uno de ellos con una superficie de 1 mm².

El recuento se puede realizar tanto en el cuadrado grande central como en los de las esquinas, dependiendo del tamaño de las células en estudio. En este ensayo para visualizar levaduras de cerveza se realizó el recuento en el cuadrado central.

La cámara de recuento y el cubreobjetos fueron limpiados con agua desmineralizada, desinfectadas con etanol y secados antes de su uso con un papel suave.

Se estableció un método para evitar contar dos veces el mismo cuadrado. Las células que tocaban o quedaban sobre las líneas de limitación inferior o de la izquierda no se contaron. Sólo se contaron las que quedaron sobre las líneas de limitación superior o de la derecha. Las células de levadura en germinación se contaron como una célula si el brote era inferior a la mitad de la célula madre. Si, el brote era igual o superior a la mitad de la célula madre, se contaban ambas células. Si se usó una dilución, el cálculo tenía que quedar afectado por el factor de dilución.

Expresión de los resultados para el recuento total: la población de la muestra es expresada como células/ml

$$T = C \times 400 \times 10 \times 1000 \times \text{factor de dilución}$$

C=promedio de células que se contó en un cuadrado pequeño (suma de levaduras/25)

400= número al que debemos multiplicar para obtener el N° de cel. en el reticulado

10= número para convertir a mm³

1000= número para convertir a cm³ (ml)

La tinción con azul de metileno es un método diferencial para observar un contraste entre células vivas y células muertas. La actividad reductora de las células vivas puede metabolizar el colorante y no son teñidas por el mismo, en cambio las células muertas no pueden hacerlo, y el mismo difunde a través de su membrana celular teñiéndose de azul. La viabilidad se calculó a partir del cociente entre el número de células viables y el número total de células.

Expresión de los resultados para determinación de porcentaje de células viables: Siendo T el número total de células y C el número de células azules, el porcentaje de células viables será:

$$[(T - C)/T] \times 100$$

(Organización internacional de la viña y el vino, 2010).

T=Número total del conteo de células vivas (no teñidas) y muertas (teñidas de azul)

C=Número del conteo de células muertas (teñidas de azul)

100= factor para convertir el resultado a valor porcentual

Para cada grupo se determinó tanto el recuento de células de levaduras como el porcentaje de células vivas y muertas mediante la técnica de tinción con azul de metileno. Los recuentos se efectuaron al inicio de la fermentación, en el día 5 de haber comenzado la misma (en donde se presume según estudios previos que la actividad metabólica de la levadura es máxima), y en el día 10 cuando comienza el declive de la fermentación.

Para evaluar dicho conteo celular en la fase inicial de la fermentación, se tomó una alícuota de 20 ml de mosto correspondiente solamente al grupo "Sin suplemento", ya que asumiendo que el mezclado del mosto con las levaduras secas fue lo más homogéneo

posible, en el momento de siembra de levaduras, ambos grupos cuentan con un número muy similar de levaduras presentes.

A esa alícuota se le efectuó en el día 1 una observación directa entre portaobjetos y cubreobjetos para observar morfología celular (ver figura 24).

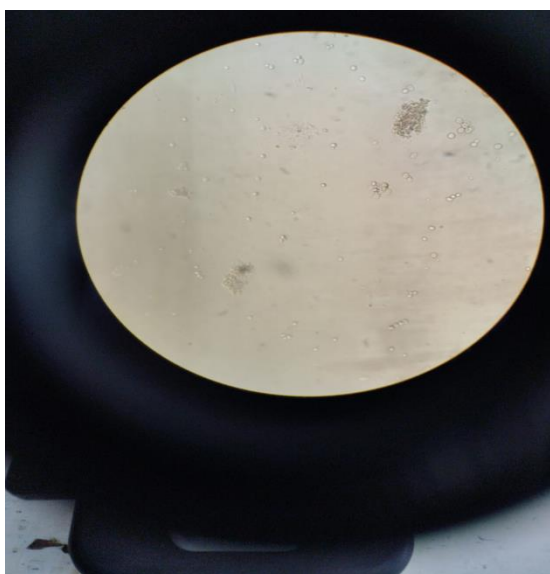


Figura 24: Observación entre porta y cubre en el día 1 de fermentación.

Para los días 5to y 10mo se efectuó el muestreo antes mencionado

Las botellas sorteadas fueron las identificadas como:

Grupo "Sin suplemento": botella N°4, botella N°13, botella N°9

Grupo "Con suplemento": botella N°5, botella N°9, botella N°18

Preparación de la muestra: se numeraron 6 tubos de ensayo con números idénticos a las botellas que salieron sorteadas en el muestreo. Se identificaron previamente las 6 cámaras de Neubauer (ver figura 26), con sus respectivos cubreobjetos (se utilizó 1 cámara por cada tubo de ensayo que contenía una muestra). Luego, usando pipetas estériles de libre escurrimiento, se midió 10 ml de mosto a observar de cada botella y se transfirieron a los tubos de ensayo. Para asegurar la homogeneidad en las muestras se colocaron los tubos tapados en un vortex y se agitaron a 1200 RPM.

Posteriormente se extrajo del tubo mediante una micropipeta automática 500 μ l de ese mosto y 500 μ l de Azul de metileno, se colocó en un tubo de plástico para centrifuga tipo Eppendorf de 1,5 ml y se mezcló uniformemente por inversión esperando luego un minuto para permitir que el colorante difunda en la membrana celular de las levaduras. Se realizó una dilución 1:2. Esta dilución se tuvo en cuenta con posterioridad en el cálculo de resultados. El procedimiento efectuado se muestra en la figura 25.

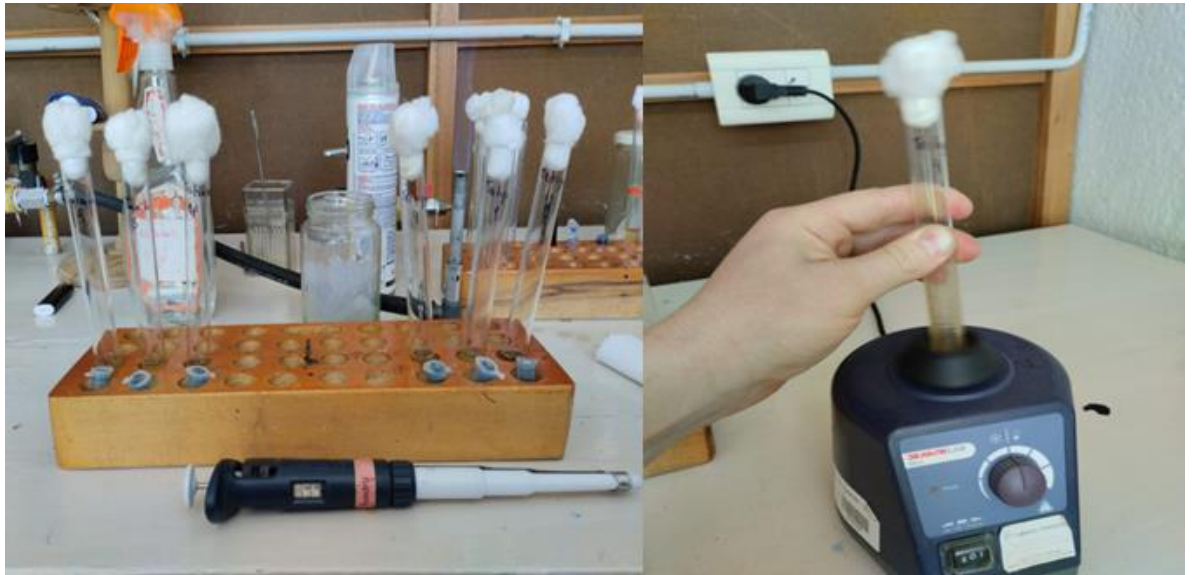


Figura 25: Muestras bajo estudio identificadas, micropipeta automática, y vortex o agitador.



Figura 26: Cámara de Neubauer utilizada para los recuentos de levaduras

Inmediatamente para cada una de las muestras, se tomó una alícuota de esa mezcla con micropipeta automática y se colocó 2 gotas a cada lado del portaobjetos (una gota por cada cámara de recuento) se colocó el cubreobjetos, y se observó en el microscopio óptico con un aumento total de 400x (ver figura 27 y 29).



Figura 27: Carga de la cámara de Neubauer en el recuento celular con tinción de azul de metileno.

Con el objetivo 10x del microscopio se localizó la zona de recuento (el cuadrado grande central). Para focalizar el cuadrado mediano y contar las células en los cuadrados pequeños se cambió al objetivo 40x. De los 25 cuadrados medianos, se eligió 5 cuadrados. Recordando que cada uno de ellos está dividido en 16 campos pequeños, se realizó el recuento en 5 campos pequeños, por lo cual se analizaron 25 campos en total. Los 5 cuadrados medianos elegidos fueron aquellos que componen las esquinas (superior derecho e izquierdo, e inferior derecho e izquierdo), y el central.

En el presente trabajo el criterio para el conteo que se siguió consistió en contar las células que se encontraron dentro del área de cada cuadrado pequeño y aquellas que están tocando los lados superior y derecho de dicho cuadrado. Los cuadrados pequeños fueron elegidos imitando una letra "L", es decir cuatro cuadrados consecutivos de izquierda a derecha, y el adyacente hacia abajo. Las zonas de recuento y el sentido usado para el conteo se esquematizan en la figura 28. En la figura 29 se observa el reticulado al verlo con objetivo 40x y la diferencia en la tinción entre células vivas y muertas.

El criterio antes descrito, fue respetado para cada una de las muestras que forman los grupos "Sin suplemento", y "Con suplemento".

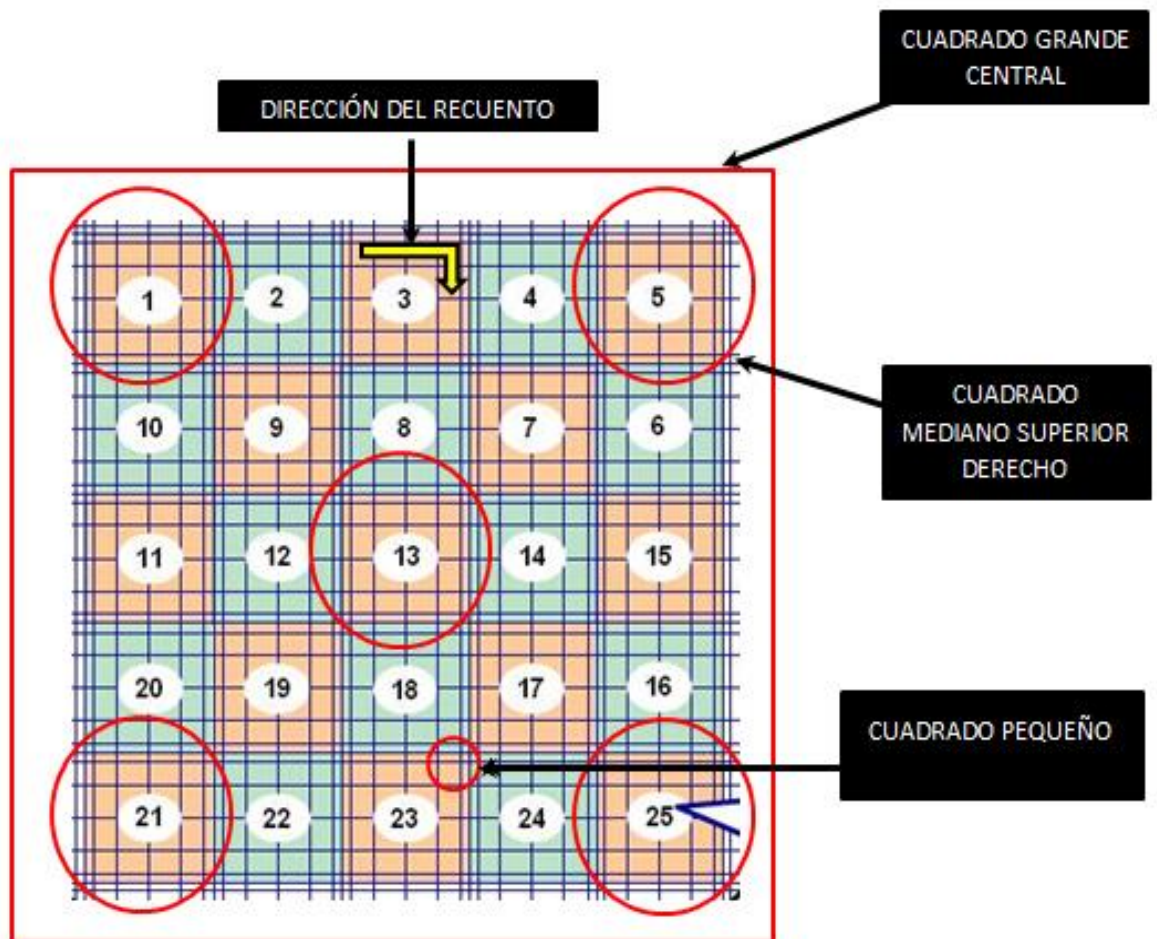


Figura 28: Esquema de visualización de cuadrados grande, mediano y pequeño en la cámara de Neubauer y sentido usado para el conteo (Adaptación de Bikandi & San Millan, s.f).

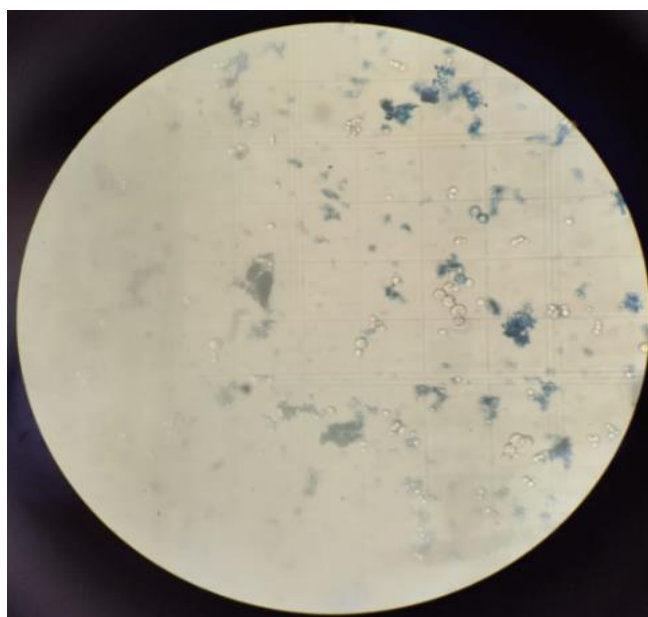


Figura 29: Observación del reticulado de la cámara de Neubauer, para el recuento en cámara con la técnica de tinción con Azul de metileno.

4.5.3) Ensayo 3: Desarrollo de curva de fermentación por pérdida de peso

Materiales:

- Balanza granataria electrónica de dos decimales Marca Ohaus modelo Traveler: 300+-0,01 g
- Botellas de 500 ml de capacidad de polietileno tereftalato.

Para estandarizar las condiciones ambientales en este ensayo se trabajó con la mayor hermeticidad posible en la sala de fermentación de la Cátedra de Bromatología de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNCuyo, en donde se registró diariamente la temperatura ambiental mediante un termómetro de alcohol y se comprobó su estabilidad en un rango de $19 \pm 2^{\circ}\text{C}$. La balanza se colocó en una mesa nivelada para no inferir en el peso de las muestras.

Para tarar el peso del envase, se pesaron vacías, las botellas que contendrían posteriormente los 250 ml de mosto. Se tomó el peso de 10 envases vacíos, sorteando los mismos por un muestreo aleatorio simple con un software de números aleatorios, y a todos esos valores se les hizo un promedio, considerando ese valor medio como la tara del envase.

Se registró la pérdida de peso en el mosto, dada por la conversión de sólidos solubles del mismo por la levadura, en alcohol y CO_2 , entre otros compuestos (ver figura 30).

Para la evaluación del peso diario se planificó la toma de peso desde el día 0, hasta el día 14 dando por finalizado el registro.

La toma de los datos se hizo aproximadamente en un horario semejante todos los días en la mañana, y para llevar tales registros se utilizó una tabla de campo, con la que luego se volcaron los datos a una planilla del programa informático Excel.

Durante los 14 días que duró el ensayo los tapones no podían ser de ninguna manera removidos de la boca de la botella.



Figura 30: Determinación del peso en balanza granataria electrónica.

5) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1) Ensayo 1: Determinación y evaluación de las variables físico químicas

Para todas las variables medidas (densidad, pH, grados Brix y azúcares residuales) se realizó un análisis exploratorio mediante la determinación de las medidas de resumen estadísticas más importantes a observar en las muestras, esto permitió comparar rápidamente algunos aspectos y poder discernir si había alguna diferencia en los grupos “Con suplemento” y “Sin suplemento”.

La observación de una gráfica de densidad de puntos sirvió de apoyo para visualizar el comportamiento de ambos grupos. Luego de este análisis exploratorio previo, se hizo foco en las varianzas muestrales y se sometieron las muestras a una prueba de F mediante un software estadístico para ver si se cumple la homocedasticidad de varianzas, es decir si las varianzas de ambas muestras fueron iguales, o por el contrario fueron desiguales. Una vez terminada con dicha prueba de F, se realizó una prueba de T de Student para comparación de medias, y basándonos en el resultado de la prueba F se decidió si se hace teniendo en cuenta varianzas iguales o desiguales.

Recordando que para las determinaciones de densidad, grados Brix, pH y azúcares reductores residuales las botellas sorteadas fueron las identificadas como:

Grupo “Sin suplemento”: botella N° 3, botella N° 11, botella °N19

Grupo “Con suplemento”: botella N° 4, botella N° 8, botella N°16

A continuación, se exponen los resultados de las mediciones de las variables fisicoquímicas:

5.1.1) Determinación de grados Brix

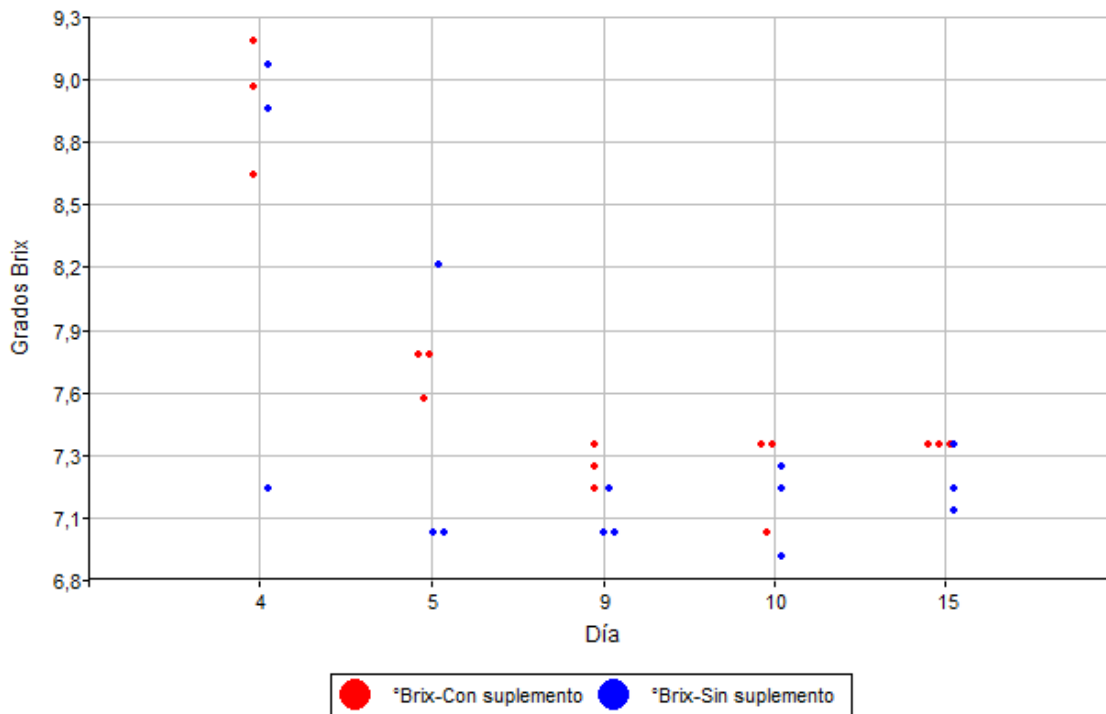


Figura 31: Gráfico de densidad de puntos para valores de grados Brix para ambos grupos, con respecto al tiempo de fermentación en días.

Examinando la tabla 4 (Anexo-punto 8.1.1), notamos que el comportamiento en líneas generales parece similar para ambos grupos. La salida de Infostat (tabla 5-Anexo-punto 8.1.1) para las medidas estadísticas arroja que la media del grupo "Con suplemento" es superior a la media del grupo "Sin suplemento", pero con las varianzas ocurrió justo lo contrario. Los coeficientes de variación fueron para ambos grupos categorizados como "baja variabilidad", pero su valor fue mayor para el grupo "Sin suplemento". Los valores máximos y mínimos registrados fueron muy similares. Analizando el gráfico de densidad de puntos (figura 31), podemos notar que, si bien en el cuarto día de fermentación hubo una unidad muestreada del grupo "Sin suplemento" que estaba alejada del resto de los valores, luego ese comportamiento se fue emparejando con el resto de las unidades muestrales de ambos grupos, notando que los valores fueron disminuyendo a un ritmo regular, conforme fueron pasando los días de fermentación.

Por lo tanto se acepta el supuesto de que los valores promedios de grados Brix en ambos grupos son iguales.

5.1.2) Determinación de pH

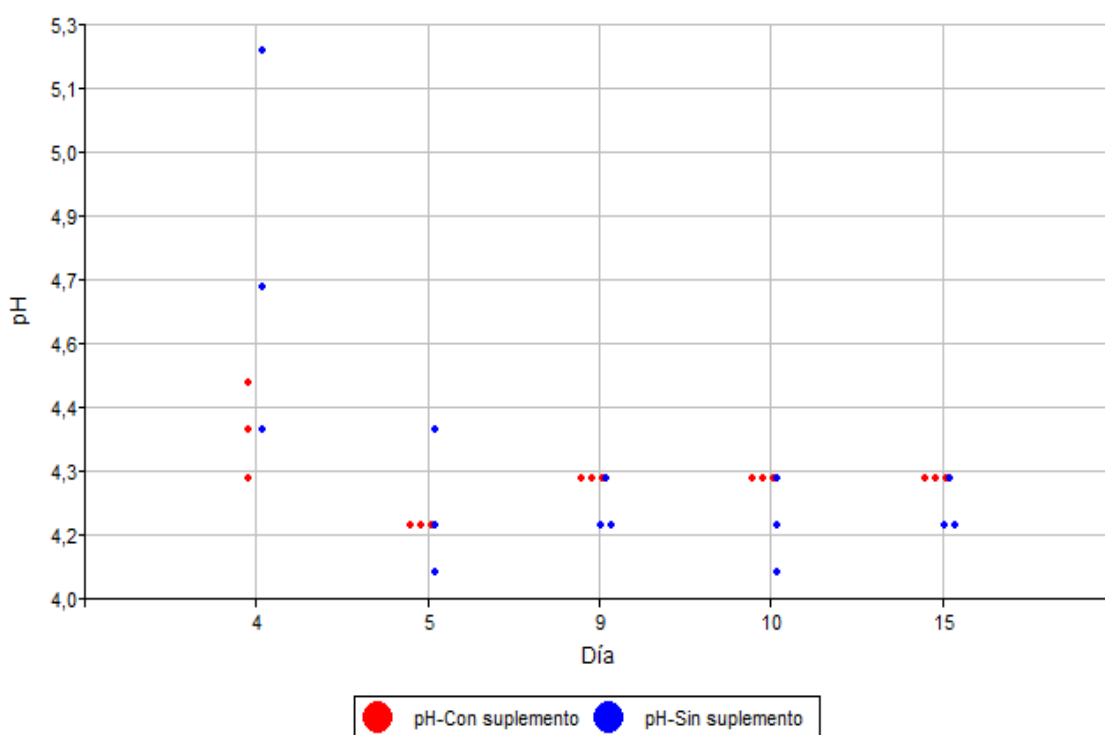


Figura 32: Gráfico de densidad de puntos para valores de pH para ambos grupos, con respecto al tiempo de fermentación en días.

Se analizan los anteriores resultados y se observa en la tabla 8 (Anexo-punto 8.1.2) que salvo un valor que se encuentra por encima de $\text{pH}=5$, el resto presenta valores que fluctúan entre 5 y 4 para ambos grupos. Las medidas estadísticas muestrales (tabla 9-Anexo-punto 8.1.2) arrojan que el valor máximo del grupo "Sin suplemento" es la única observación que supera el valor de 5, mientras que el valor máximo del grupo "Con suplemento" fue de 4,5. Las medias, son muy similares, aunque no sucede lo mismo con la variabilidad de los datos, ya que los mismos arrojan valores mayores en error estándar y varianza en la muestra "Sin suplemento". Esto se vuelve a repetir para los coeficientes de variación, en donde ambos exhiben baja variabilidad pero la del grupo "Sin suplemento" vuelve a ser mayor. Es por ello que para asegurar el supuesto de la homocedasticidad de varianzas se someten ambas muestras a la prueba de F, que se detallará en breve (Anexo-punto 8.1.2).

Observando la gráfica de densidad de puntos (figura 32) se nota que si bien en el día 4 de iniciada la fermentación hubieron 2 unidades muestreadas del grupo “Sin suplemento” que arrojaron valores un poco más alejados del resto (valores de 5,2 y 4,7 unidades de pH respectivamente), ese comportamiento luego se fue normalizando al resto de las unidades, descendiendo a un ritmo regular con respecto a la medida tomada durante los primeros días, para luego tomar valores cercanos al rango 4,1 a 4,3, manteniéndose relativamente constantes al paso del tiempo.

Por lo tanto se acepta el supuesto de que los valores promedios de pH en ambos grupos son iguales.

5.1.3) Determinación de la densidad

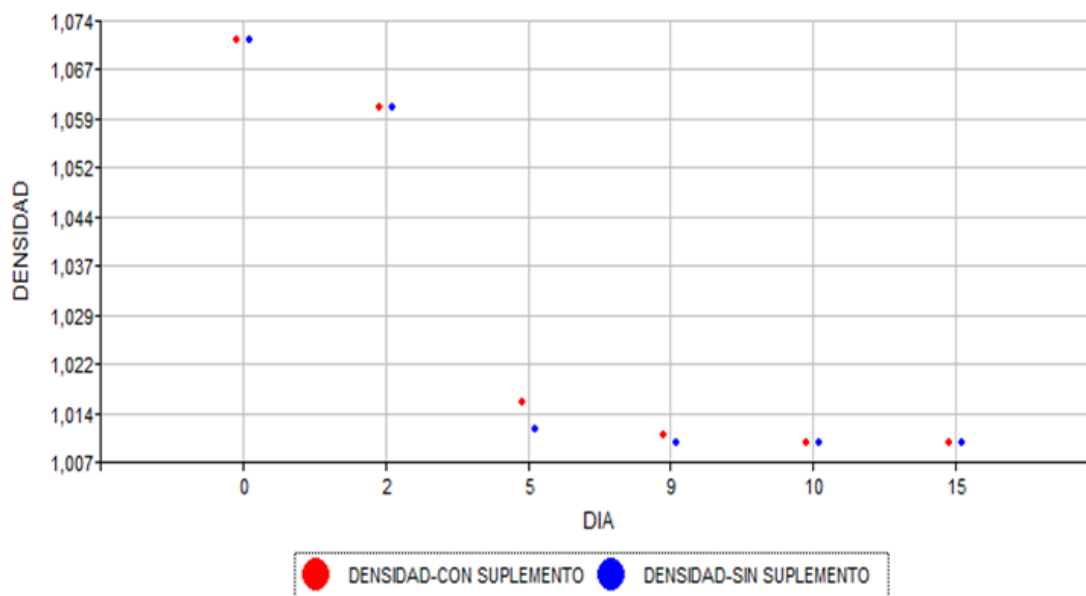


Figura 33: Gráfico de densidad de puntos para valores de densidad (g/L) para ambos grupos, con respecto al tiempo de fermentación en días.

Al analizar los resultados se observa en la tabla 12 (Anexo-punto 8.1.3) cierta igualdad en ambos grupos, aunque no se puede precisar si estadísticamente existe alguna diferencia significativa. Las medidas estadísticas muestrales (tabla 13-Anexo-punto 8.1.3) afirman dicha teoría, ya que las medias, fueron idénticas y la desviación estándar también. La variabilidad relativa que acusa el coeficiente de variación se considera baja y similar en ambos grupos. Las varianzas arrojan un valor muy similar para ambas muestras, pero para asegurar el supuesto de la homocedasticidad de varianzas se someten ambas muestras a la prueba de F.

En la gráfica de densidad de puntos (figura 33) se observa que ambos grupos muestran un comportamiento similar, inversamente proporcional, es decir conforme fue pasando el tiempo de fermentación, fueron disminuyendo sus valores medidos de densidad de manera equivalente. Lo que indicaría que la fermentación en ambos grupos se realizó sin problemas.

Es decir no se obtuvo evidencia a un nivel de significancia del 5% de que los valores promedios de densidad en ambos grupos fuera diferente.

5.1.4) Análisis de azúcares reductores residuales

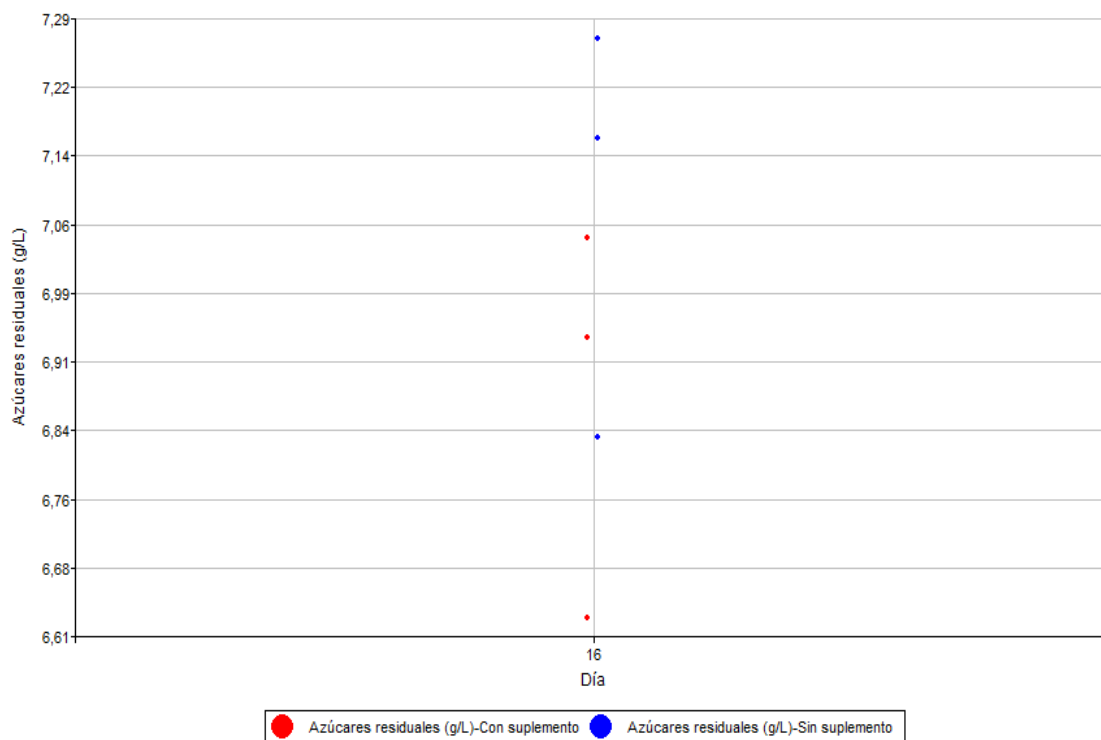


Figura 34: Gráfico de densidad de puntos para valores de azúcares residuales en g/L para ambos grupos, en el día 16 de fermentación.

Para observar que ocurrió respecto a la variable azúcares residuales y analizar si los grupos se comportan de manera diferente en lo que respecta al metabolismo de los azúcares y si ambos llegaron de la misma manera al final de la fermentación, observamos primero la tabla 16 (Anexo-punto 8.1.4) en la cual podemos visualizar en líneas generales valores con bastante similitud. Luego de someter los valores al análisis estadístico se observa en las medidas de resumen (tabla 17-Anexo-punto 8.1.4) que el grupo “Sin suplemento” tiene un valor promedio superior, pero en lo respectivo a medidas de dispersión, los valores son muy similares, y en el caso de la varianza ambos grupos arrojan el mismo valor. Los coeficientes de variación arrojan una variabilidad baja pero superior para el grupo “Sin suplemento”.

Analizando el gráfico de densidad de puntos (figura 34), se verifica que dos unidades muestrales medidas del grupo “Sin suplemento” llegaron al final de la fermentación, con los valores más altos registrados de azúcares residuales.

Luego de efectuar la prueba de F y de T (Anexo-punto 8.1.4), se demuestra que ambos grupos llegaron al final de la fermentación con valores promedios de azúcares residuales equivalentes.

Comparando el ensayo 1 de la presente tesis con otros trabajos previos encontramos que según Gibson (2012), algunos suplementos nutricionales pueden ocasionar desvíos en la fermentación, causados por ciertos factores dentro de su fórmula al interactuar con los mostos y cepas de levaduras dando efectos no deseados e imprevistos. Esto no coincide con lo obtenido para el ensayo 1.

Como puede observarse en los resultados obtenidos anteriormente para el presente trabajo y bajo los términos del mismo, en cada variable fisicoquímica determinada, no se hallaron diferencias significativas estadísticamente en lo que respecta al grupo “Sin suplemento” y “Con suplemento”, lo que indica que la fermentación transcurrió con una regularidad normal en ambos grupos y no se registraron desvíos en la misma causados potencialmente por el complemento nutricional.

Resultados similares fueron reportados por Vallejo (2023), aunque cabe aclarar que su estudio se basó en 10 días de control de variables físico químicas a diferencia de los 15 días con los que contó el presente ensayo.

5.2) Ensayo 2: Recuento de levaduras de cerveza totales y viables

Para este ensayo se efectúa primeramente un análisis exploratorio en ambos grupos mediante la determinación de las medidas de resumen estadístico más importantes, para poder observar si hay alguna diferencia notable entre los grupos “Sin suplemento” y “Con suplemento” en lo que respecta a la multiplicación celular. Se analizan los gráficos de línea en donde se observa el crecimiento de la masa celular en el día 0, día 5 y día 10 de comenzada la fermentación.

Se observan además los gráficos de barras superpuestas para identificar el porcentaje de células vivas y muertas en cada grupo en los diferentes conteos diferenciales realizados en los días antes mencionados.

Luego de ese análisis previo, se someten ambas muestras a la prueba de F para demostrar si se cumple la homocedasticidad de varianzas. Una vez terminado con dicha prueba de F, hacemos una prueba de T de Student para comparación de medias basándonos en los resultados que nos arrojó la prueba de F.

A continuación, se exponen los resultados de los recuentos de levaduras y su porcentaje de sobrevivencia mediante el método de tinción con azul de metileno.

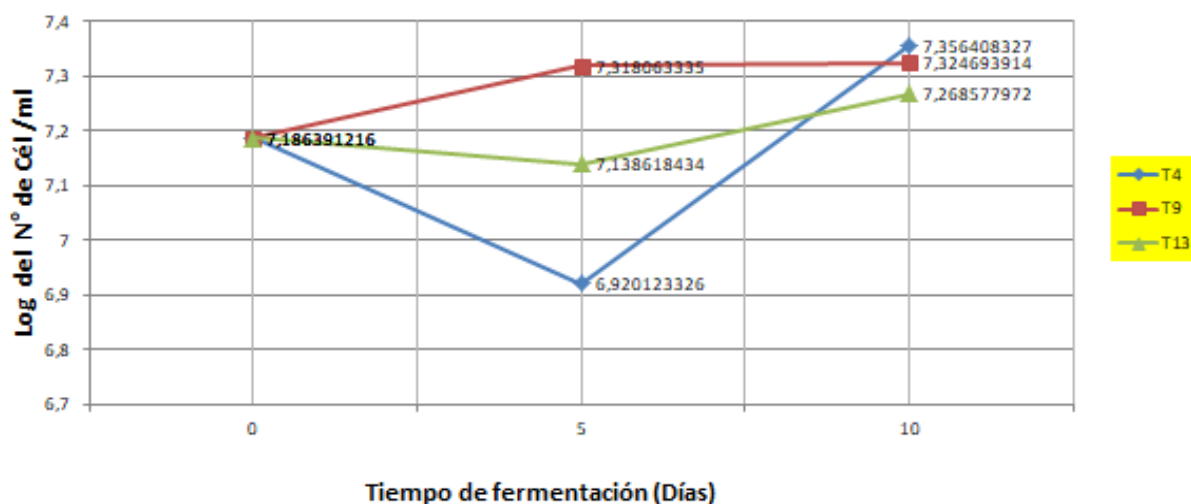


Figura 35: Gráfico de líneas para la variable Log del número de células / ml para las unidades de muestra pertenecientes al grupo “Sin suplemento” en el día 0, 5, y 10 desde el inicio de la fermentación.

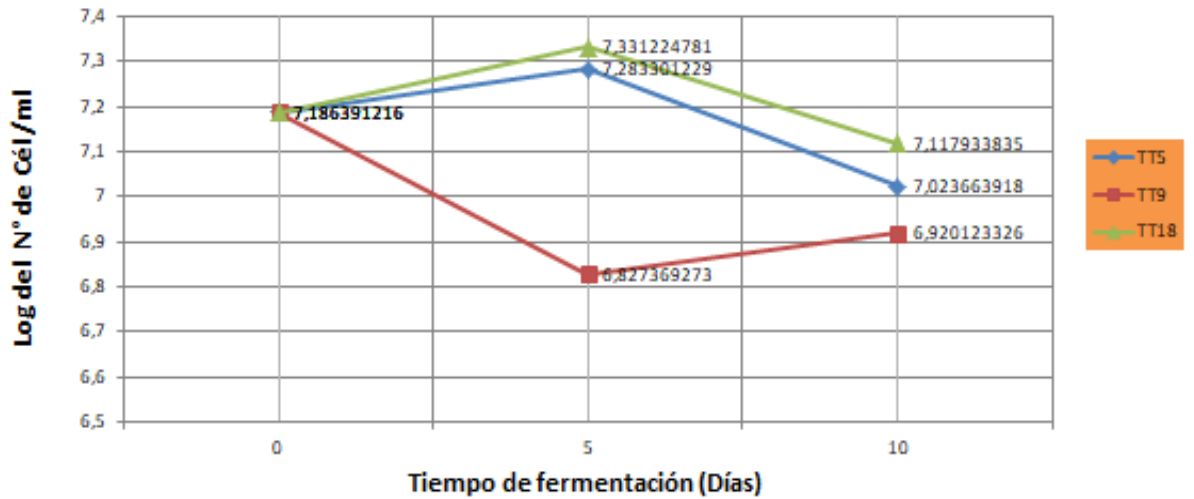


Figura 36: Gráfico de líneas para la variable Log del número de células / ml para las unidades de muestra pertenecientes al grupo “Con suplemento” en el día 0, 5, y 10 desde el inicio de la fermentación.

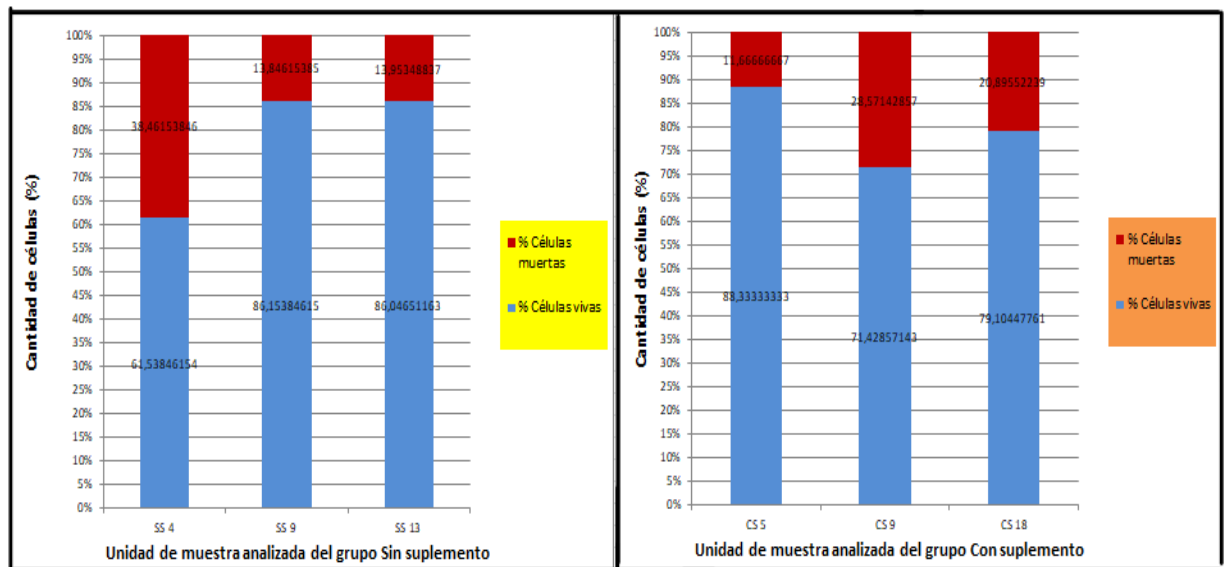


Figura 37: Gráfico de barras superpuestas para la variable % de sobrevivencia medida en ambos grupos en el 5to día de fermentación.

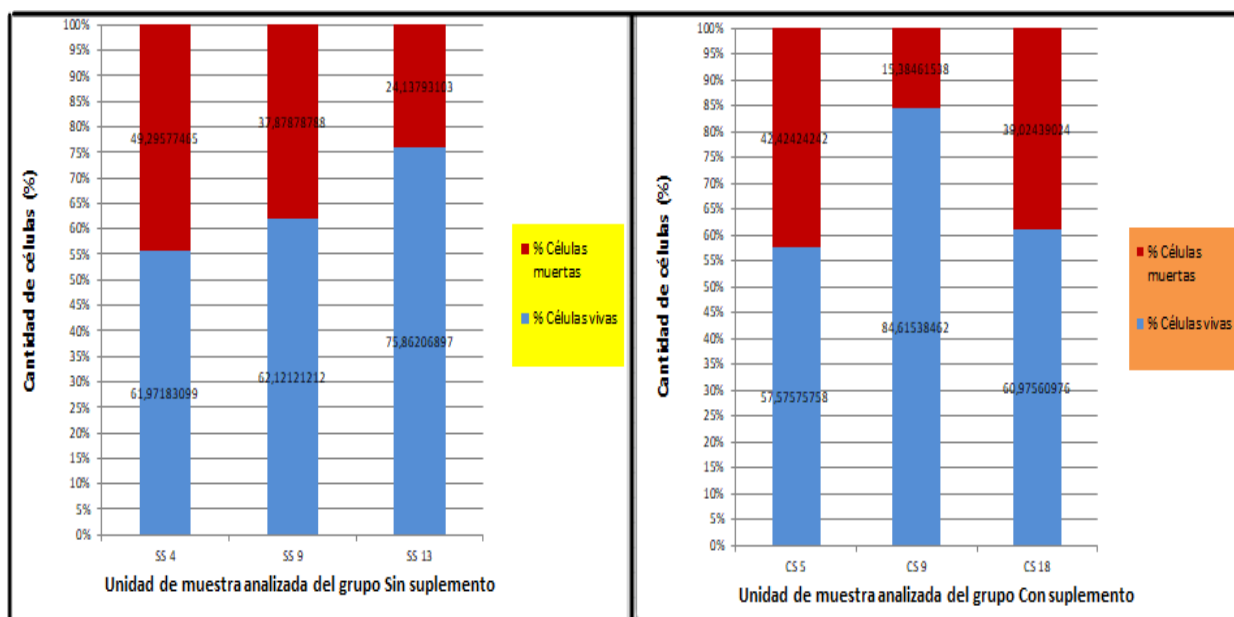


Figura 38: Gráfico de barras superpuestas para la variable % de sobrevivencia medida en ambos grupos en el 10mo día de fermentación.

El análisis de las tablas 20 y 21 (Anexo-punto 8.2) al estar en notación científica resulta complejo, por lo cual, para este ensayo, revisamos primeramente la salida de las medidas estadísticas (tabla 22-Anexo-punto 8.2). La media del grupo “Sin suplemento” fue mayor a la del grupo “Con suplemento”, y además tiene el mayor valor máximo. Presenta también mayor varianza el grupo “Sin suplemento”, se evaluará posteriormente si esa diferencia es significativa o no.

Con respecto a la lectura de los gráficos de línea (figura 35 y 36) cabe destacar que el recuento en el día 0 de fermentación, sólo se lleva a cabo en el grupo “Sin suplemento”, pero se tomó el mismo valor para el grupo “Con suplemento” porque se supone que en el momento inicial, el mezclado de las levaduras con el mosto es homogéneo y la multiplicación celular aún no se manifiesta, por ende el número en el inicio es el mismo. Dentro del grupo “Sin suplemento” en día 5 de fermentación, la unidad de muestra número 4 y 13 presentaron un marcado descenso a valores por debajo de los registrados en el día 0 con excepción de la unidad de muestra número 9 que tuvo un ascenso de aproximadamente 5×10^6 de células.

Por su parte en el día 10, la unidad muestral número 9 presenta un ligero aumento, mientras que en la unidad muestral 13 y sobre todo en la 4 se nota un marcado aumento en el recuento ($1,4 \times 10^7$ de células/ml aproximadamente).

En el grupo “Con suplemento” en el 5to día de fermentación con respecto al inicio, presentaron las unidades muestrales N° 5 y N° 18 un ascenso en el número de levaduras de 4 y 6×10^6 células/ml respectivamente, mientras que la unidad de muestra número 9 presentó un descenso de 8×10^6 de células. Observando el día 10 de fermentación y comparándolo con el día 5, se observa que la unidad de muestra número 5 y 18 presentaron un descenso en sus conteos de 8×10^6 cel. /ml, mientras que la unidad de muestra número 9 presentó un incremento de $1,6 \times 10^6$. Si comparamos las unidades del grupo “Con suplemento” podemos notar que inclusive los valores de conteo para el día 10 son más bajos que los del día inicial. Esto no es así para el grupo “Sin suplemento” en donde los valores de conteo para el día 10 son en todos los casos superiores a los del día inicial.

Con respecto a los gráficos de barras apiladas se compara en el día 5 de fermentación a ambos grupos y se observa que el valor promedio del porcentaje de sobrevivencia del grupo “Con suplemento” es de 79,62 % y el del grupo “Sin suplemento” es de 77,91%, es decir un 1,71% mayor (figura 37). Analizando de igual manera ambos grupos

pero para el día 10 de fermentación se obtiene un promedio de porcentaje de sobrevivencia de 67,72 % para el grupo “Con suplemento” y un valor promedio de 66,65% para el grupo “Sin suplemento”, es decir un 1,07% mayor (figura 38). Si cotejamos los valores arrojados por ambos grupos en el día 5 y en el día 10 de fermentación, se nota un marcado descenso entre un 11 y un 12%.

En términos del ensayo podemos decir que el promedio de los recuentos del grupo “Sin suplemento” expresados en N° de células/ml es igual al promedio de los recuentos del grupo “Con suplemento” para un nivel de significancia del 5%.

Con respecto al porcentaje de sobrevivencia hay una diferencia a favor del grupo “Con suplemento”, y que se alcanza un pico de proliferación celular en el 5to día en ambos grupos.

Comparando el ensayo 2 de la presente tesis con trabajos anteriores hallamos que en el estudio de Gibson (2012), se indica que los beneficios del uso de extracto de levadura incluyen, entre otros, un mayor crecimiento celular y una mayor viabilidad. Su justificación radica en que estos suplementos aseguran el suministro de macronutrientes como el carbono y el nitrógeno, minerales como el Zn que ejercen un efecto protector frente al etanol, el ácido linoleico y la prolina que le dan resistencia al estrés celular, y factores de supervivencia como los esteroides que le dan mayor fluidez a la membrana plasmática.

Esto coincide parcialmente con los resultados del ensayo 2 de la presente tesis, en donde solo se registraron diferencias a favor del grupo “Con suplemento” en el conteo de células viables.

Por otro lado Ribereau-Gayon et. al (2003), indica que el crecimiento celular es máximo desde el día 2 hasta el día 5 desde el inicio de la fermentación llegando hasta valores de 10^8 Cel/ml., lo que concuerda en parte con el ensayo 2, en donde se observa que aunque los conteos de células totales en ambos grupos no mostraron diferencias, los valores de porcentaje de sobrevivencia mostraron una diferencia del 2% a favor del grupo con suplemento con un pico de multiplicación al 5to día desde el inicio de la fermentación,. Hay que aclarar no obstante que desde el punto de vista estadístico este porcentaje no es significativo bajo los términos del ensayo.

En el trabajo de Bell y Henskche (2005) se expresa que la aplicación de suplementos nutricionales que aporten nitrógeno prontamente asimilable, en mostos pobres en nitrógeno, provoca efectos positivos en el crecimiento de las levaduras y la velocidad de fermentación. Además la contribución del ergosterol agregado por el suplemento aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática. Todo esto conduce a un mayor ingreso de azúcares, que se corresponde con mayor desprendimiento de CO_2 .

En el presente ensayo la determinación de nitrógeno prontamente asimilable no se efectuó, por lo cual, no se sabe el tenor de nitrógeno que tenía el mosto inicial antes del agregado del suplemento. Si el mosto tiene nitrógeno asimilable en cantidades suficientes, es probable que no sea necesaria la suplementación, por ende el incremento del ingreso de azúcares antes mencionado no se va a producir y entonces no se verá reflejado un crecimiento de biomasa celular importante. Esto puede llegar a explicar por qué el aumento del 2% de células viables registrado para el grupo “Con suplemento” no es estadísticamente significativo y puede deberse a otras causas que escapan del alcance del estudio.

5.3) Ensayo 3: Desarrollo de curva de fermentación por pérdida de peso

Para el último ensayo se determina que el análisis se hará a través de una descripción numérica de los datos obtenidos como resultado de medir las pérdidas de peso con respecto a los días transcurridos de fermentación (tabla 25 y 26-Anexo-punto 8.3.1).

Luego, se realiza una comparación entre el grupo “Sin suplemento” y “Con suplemento” en los días 3 y 14 desde el inicio de la fermentación. Esta comparación primeramente se basa en realizar una prueba de F para homogeneidad de varianzas, para

visualizar si se trabaja con varianzas iguales o desiguales (tabla 27 y 29-Anexo-punto 8.3.2). Una vez realizada dicha prueba se hace una prueba T para saber si existe alguna diferencia significativa en las medias de ambos grupos medidas en el día 3 y 14 de fermentación (tabla 28 y 30-Anexo-punto 8.3.2).

Por otro lado se determina si existe asociación entre la variable Pérdida de peso (medida en gramos) y el tiempo de fermentación (medido en días) y el grado de asociación presente a través del Coeficiente de relación de Pearson (r). Una vez determinado si existe o no asociación, se establece si existe una relación funcional entre las dos variables en estudio, para lo cual previamente nos apoyamos en el análisis exploratorio analizando medidas de resumen de las variables por separado, los gráficos de dispersión, valor de r, etc. Seguido a esto se busca qué modelo de función es el que mejor se ajusta a los datos obtenidos del ensayo. Los resultados de lo antes mencionado se demuestran a continuación.

El análisis numérico arroja las medidas de resumen siguientes: en cuanto a las medidas de posicionamiento de tendencia central, tanto la media como la mediana fueron mayores en el grupo "Sin suplemento".

En lo que refiere a medidas de dispersión, existe una mayor variabilidad nuevamente en el grupo "Sin suplemento", ya que en lo que consta a medidas absolutas, tanto su amplitud, como su varianza y desviación típica son mayores. Y en lo referido a una medida relativa ambos grupos presentan una alta variabilidad (entre 20 y 30 %), pero siendo de nuevo mayor la del grupo "Sin suplemento".

5.3.1) Comparación entre ambos grupos para el día 3 de fermentación

El valor promedio de la pérdida de peso del grupo "Con suplemento" es mayor al valor promedio de la pérdida de peso del grupo "Sin suplemento" en el día 3 de fermentación.

5.3.2) Comparación entre ambos grupos para el día 14 de fermentación

En términos del ensayo se comprueba que el valor promedio de la pérdida de peso del grupo "Con suplemento" es mayor al valor promedio de la pérdida de peso del grupo "Sin suplemento" en el día 14 de fermentación,

5.3.3) Análisis de la relación y ajustamiento del modelo

Los resultados indican que existe una fuerte correlación lineal positiva entre las variables tiempo de fermentación y pérdida de peso.

5.3.4) Ajustamiento del modelo a los datos

Se define a la variable Tiempo de fermentación (días), como la variable independiente y a la variable Pérdida de peso (g) como la variable dependiente o respuesta. Se observa que hay una fuerte relación funcional entre ambas variables.

Luego del análisis estadístico efectuado (Anexo-punto 8.3.4), se proponen el modelo lineal y el modelo polinómico de segundo grado como los más adecuados y se procede a una comparación entre ambos para determinar cuál es el que mejor se ajusta a los datos.

5.3.5) Relaciones curvilíneas: Polinómica de segundo grado

Por todas las ventajas exhibidas luego del análisis estadístico efectuado, podemos afirmar que el modelo más adecuado para describir el comportamiento entre las variables estudiadas y el que mejor se ajusta a los datos es el modelo polinómico de segundo grado.

Comparando el estudio de la presente tesis con trabajos anteriores encontramos que en el ensayo 3 se demostró que la pérdida de peso medida tanto en el día 3 como el día 14 desde el inicio de la fermentación fue mayor en el grupo "Con suplemento", lo que concuerda en parte con el resultado del estudio de Kerr y Schulz (2016), en donde se

expuso que las microfermentaciones que mayor pérdida de peso exhibían eran las adicionadas con Vegemite (un complemento nutricional similar al ensayado en la presente tesis). Cabe aclarar las diferencias entre ambos ensayos ya que dichos autores probaron tal suplemento nutricional en un total de 8 días de fermentación, y en microfermentaciones con concentraciones crecientes de suplemento.

En el estudio de Kerr y Schulz (2016) se destaca además que la mayor pérdida de CO₂ se da entre el día 2 y 4 de fermentación, esto coincide con la fase de crecimiento exponencial. Este es el momento de crecimiento máximo y el periodo ideal en el cual se pueden comparar las velocidades de fermentación.

Esto no coincide con el presente ensayo en donde, lejos de tomar para la comparación días cercanos y en una fase crítica como la exponencial, se tomaron dos puntos muy alejados y en diferentes fases de crecimiento celular (día 3 y 14), lo cual no deja visualizar de adecuada manera el comportamiento de ambos grupos ya que entre esos días ocurren diferentes fenómenos como muerte celular, volatilizaciones, etc.

Por lo dicho anteriormente y en función del análisis estadístico efectuado (Anexo-punto 8.3) se expone que el ensayo 3 no es tomado como significativo bajo los términos del mismo.



Figura 46: Fermentación a los 2, 5 y 14 días.

5.4) Recomendaciones y futuros ensayos

El actual trabajo se pensó para un estilo de cerveza en particular y un ciclo único de fermentación en un medio de cultivo rico, como es el mosto de malta Pilsen y en células que corresponden a una primera generación de levaduras secas activas.

Por lo tanto la tesis plantea distintos objetivos para futuras líneas de investigación:

- Efectuar las mismas comparaciones pero en ciclos sucesivos de fermentación desarrollando consecutivos aislamientos y sembrados de levaduras que se encuentren sedimentadas (repiques).
- Evaluar los requerimientos nutricionales de células de levadura de cerveza en estados estacionarios.
- Aumentar el número de repeticiones y los volúmenes de mosto a ensayar.
- Ensayar otros tipos de mostos cerveceros, y valorar su composición nutricional inicial para saber sus posibles requerimientos, especialmente el tenor de nitrógeno asimilable.
- Evaluar la cinética de fermentación para ambos grupos en las primeras 48 a 72 hs, que se corresponde con la fase de crecimiento exponencial en donde la velocidad de fermentación es máxima.

- Evaluar la cinética de fermentación para ambos grupos con algún modelo que describa mejor el fenómeno biológico de crecimiento celular como el modelo de Gompertz.

6) CONCLUSIÓN

A partir de la experimentación realizada en el presente trabajo se concluye:

- Los resultados de la medición de las variables físico químicas de seguimiento de la fermentación fueron similares tanto en el grupo "Con suplemento" como en el grupo "Sin suplemento". En este aspecto se considera que ambos grupos cursaron la fermentación con la misma regularidad.
- En lo que concierne al recuento de células de levadura de cerveza totales, los resultados exhiben que el promedio de los conteos celulares para el grupo "Sin suplemento", es igual al promedio de los conteos celulares del grupo "Con suplemento". Bajo los términos del ensayo, el suplemento no parece incrementar de forma significativa el número de células de levadura totales.
- En lo referido al recuento de células de levaduras viables o determinación del porcentaje de sobrevivencia, se observa una diferencia del 2% a favor del grupo "Con suplemento" al compararlo con el grupo "Sin suplemento", con un pico de multiplicación en el 5to día. No obstante se considera que esta diferencia no es significativa estadísticamente como para atribuirla a los efectos otorgados potencialmente por el suplemento nutricional, pudiendo deberse a otras causas que escapan del alcance de la presente tesis.
- En lo que respecta a la determinación de la curva de fermentación por pérdida de peso, se encontró que el modelo que mejor describía el comportamiento de las dos variables asociadas "pérdida de peso" y "tiempo", fue la función polinómica de segundo grado, ya que fue la que mejor se ajustó a los datos. Al comparar los días 3 y 14 de fermentación para ambos grupos, se halló que la pérdida de peso fue mayor en el grupo "Con suplemento", aunque este resultado no fue considerado significativo debido a la lejanía de los días comparados dentro de las fases de crecimiento de las levaduras.

Por lo antes expuesto se concluye que el suplemento nutricional no modifica la cinética de fermentación, y que la regularidad fermentativa es igual en ambos grupos en estudio bajo las condiciones planteadas en la presente tesis.

7) BIBLIOGRAFÍA

1) Argentina, M. d. (2019). Historia de la cerveza. Recuperado el 4 de Octubre de 2022, disponible en: www.cultura.gob.ar:

https://www.cultura.gob.ar/cronologia-de-la-cerveza_7973/

2) Bell, S. J., & Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian journal of grape and wine research*, 11(3), 242-295. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028>

3) Bikandi, J., & San Millan, R. (s.f.). *Recursos de microbiología*. Recuperado el 28 de Marzo de 2023, disponible en: www.Mikrostestak.org:

http://insilico.ehu.es/camara_contaje/neubauer_improved.php

4) Boto Ordóñez, M., & Fidalgo, J. A. B. (2015). Bases para la elaboración y evaluación del vino y la cerveza. Universidad de León, Área de Publicaciones.

5) Bourgeois, C.M y Larpent, J.P. (1995). *Microbiología alimentaria*. Editorial Acribia. Zaragoza. España.

6) Cabrini, S. M., y Fillat, F. (2021). Indicadores económicos e informes técnicos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Recuperado el 18 de Febrero de 2023, disponible en: www.Argentina.gob.ar:

https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_pergamino_estructura_de_la_cadena_de_cebada_en_argentina.pdf

7) Centro Integral de bebidas artesanales. (2022). Recuperado el 20 de Noviembre de 2022, disponible en: www.cibart.com.ar:

<https://cibart.com.ar/novedades/levadura-seca-para-cerveza>

8) Ciklic, I. F., Cuello, R. A., Flores, K. J., Mercado, L. A., & Combina, M. (2017). Construcción de levaduras de vino con bajo contenido de etanol mediante delección parcial del gen PDC2 de *Saccharomyces Cerevisiae*. *AMB Express*, 6.

9) Cocinista. (2022). Nutrientes para levadura. Recuperado el 4 de Octubre de 2022, disponible en: www.cocinista.es:

<https://www.cocinista.es/web/es/enciclopedia-cocinista/maltas-y-lupulos/nutrientes-para-levadura>

10) Código Alimentario Argentino. (2022). Capítulo XIII: Bebidas fermentadas. Recuperado el 18 de Febrero de 2023, disponible en: www.Argentina.gob.ar:

https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat_caa_capitulo_xiii.pdf

11) Código Alimentario Argentino. (2022). Capítulo XVI: Correctivos y coadyuvantes. Recuperado el 18 de Febrero de 2023, disponible en: www.Argentina.gob.ar:

https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat_caa_capitulo_xvi_-_correctivos_y_coadyuvantes.pdf

12) Kamisnki, C. (2003). Refractómetro. Recuperado el 15 de Junio del 2023, disponible en:

www.cervezadeargentina.com.ar: <http://www.cervezadeargentina.com.ar/articulos/refractometro.html>

13) Cucinare. (2019). Breve historia de la cerveza en la Argentina. Recuperado el 4 de Octubre de 2022, disponible en: www.cucinare.tv:

<https://www.cucinare.tv/2019/10/28/breve-historia-de-la-cerveza-en-la-argentina/>

14) ENARTIS SEPSA S.A.U. (2022). La importancia de la nutrición de las levaduras para el éxito de la fermentación. Recuperado el 21 de Noviembre de 2022, disponible en: www.enartis.com:

<https://www.enartis.com/es/la-importancia-de-la-nutricion-de-las-levaduras-para-el-exito-de-la-fermentacion>

15) Fermentis. (2018). Ficha técnica levadura SafAle™ US-05. Recuperado el 7 de Diciembre de 2022, disponible en: www.fermentis.com:

<https://bsgcraftbrewing.com/wp-content/uploads/2021/11/SPEC-Fermentis-SafAle-US-05>

16) Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S. y Ribéreau-Gayon, P. (1984). Evolución de levaduras y bacterias ácido lácticas durante la fermentación y conservación de los vinos de Burdeos. *Microbiología ambiental y aplicada*, 48(5), 1034-1038.

17) García Ortiz, F., Gil Muela, M., & García, P. P. (2003). *Bebidas*. Parainfo.

18) Gayon, P. R., Dubourdieu, D., Donéche, B., & Lonvaud, A. (2003). *Tratado de enología 1: Microbiología del vino. Vinificaciones (Vol. 1)*. Hemisferio Sur.

19) Gibson, B.R (2011). 125th Anniversary Review: Improving Higher Gravity Brewery Fermentation Through Wort Enrichment and Supplementation. *Brewing Institute Magazine*, 117 (3), 268-284. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00472>

20) González, M. (2017). *Principios de elaboración de las cervezas artesanales*. Lulu Enterprises. – Lulu Press Inc.

21) Grandinetti, M. M. (2017). "El mercado de cerveza artesanal en Argentina". Trabajo de investigación final. Universidad Argentina de la Empresa, Buenos Aires.

22) Hidalgo Tógores, J. (2011). *Tratado de Enología. Vol. I*. España: Ediciones Mundi-Prensa.

23) Ibarzabal, A. (2020). *Cervezas artesanales: estudio comparativo de IBUs obtenidos por cálculo de tablas y los cuantificados por espectrofotometría*. (Tesina de grado de licenciatura). Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias, Mendoza.

24) Jaramillo, P. (2012). *Cervezas artesanales, un mercado que emerge bien*. Gestión.

25) Jiraneck, V., Langridge, P. y Henschke, PA (1995). Utilización de aminoácidos y amonio por levaduras enológicas *Saccharomyces cerevisiae* a partir de un medio químicamente definido. *Diario Americano de Enología y Viticultura*, 46 (1), 75-83.

26) Kerr, E.D y Schulz, B.L (2016). Vegemite Beer: yeast extract spreads as nutrient supplements to promote fermentation. *Peer J*, 4, e2271. <https://doi.org/10.7717/peerj.2271>

27) Koroluk, C. A. (2015). *Cerveza dorada pampeana*. Recuperado el 4 de Marzo de 2021, disponible en: www.cervezadeargentina.com.ar:

<http://www.cervezadeargentina.com.ar/recetas/doradapampeana.htm,2015>

28) Kunkee, R. E., Bisson, L. F., Boulton, R. B., Singleton, V. L. (2013). *Principles and Practices of Winemaking*. Netherlands: Springer US.

29) Lezcano, E. (2010). *Levaduras: cadenas alimentarias*. Recuperado el 4 de Abril de 2022, disponible en: www.alimentosargentinos.gob.ar:

https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/contenido/revista/ediciones/53/productos/r5_3_07_Levaduras.pdf

30) Limura, K. (2022). Cerveza artesanal, una bebida cada vez más elegida por los argentinos. BAE Negocios. Recuperado el 4 de Diciembre de 2022 disponible en: www.baenegocios.com:

<https://www.baenegocios.com/negocios/Cerveza-artesanal-una-bebida-cada-vez-mas-elegida-por-los-argentinos-20220726-0058.html>

31) Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2009). Brock: Biología de los microorganismos (Duodécima edición ed.). Pearson educación S.A.

32) Madrid, A., del Castillo, I. C., & Vicente, J. M. (2001). Nuevo manual de industrias alimentarias. Mundiprensa.

33) Manual de instrucciones PCE-Oe. (2015). PCE Ibérica. Recuperado el 8 de Febrero de 2023, disponible en: www.pce-iberica.es:

<https://www.pce-iberica.es/manuales/manual-pce-oe.pdf>.

33) Organización internacional de la viña y el vino. (2010). RESOLUCIÓN OIV/OENO 206/2010: ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE VINOS Y MOSTOS - REVISIÓN DE LA RESOLUCIÓN OENO. Análisis microbiológico del vino y del mosto: Detección, diferenciación y recuento de microorganismos.

34) Strong, G., e Inglaterra, K. (2021). Beer judge certification program: 2021 Style guidelines. BJCP, Inc.

35) Suárez, C., Garrido, A., & Rodríguez, C. (2016). Levadura *Saccharomyces Cerevisiae* y la producción de alcohol. ICIDCA.

36) Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). Introducción a la microbiología. Novena Edición. Editorial Médica Panamericana.

37) Vallejo Orozco, Y. A. (2023). Evaluación fisicoquímica y cinética de producción de biomasa de dos tipos de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* en la fermentación alcohólica de una bebida a base de mandarina (*Citrus reticulata*) y cidra (*Sechium edule*). Tesis de Licenciatura. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

38) Velasco, D. (2015). "Hábitos de consumo sobre la cerveza". Trabajo final. Universidad de Valladolid, Valladolid, España.

39) Ward, O.P. (1991). Biotecnología de la fermentación: principios, procesos y productos. Zaragoza, España. Acribia.

8) ANEXO

8.1) Tablas, y planteo de pruebas de hipótesis del ensayo 1: Determinación y evaluación de las variables físico químicas de control

8.1.1) Determinación de grados Brix

Tabla 4: Mediciones de grados Brix en ambos grupos con respecto al tiempo en días

°Bx						
DÍA	GRUPO SIN SUPLEMENTO			GRUPO CON SUPLEMENTO		
	Muestra 3	Muestra 11	Muestra 19	Muestra 4	Muestra 8	Muestra 16
4	9,1	7,2	8,9	9,2	8,6	9,0
5	8,2	7,0	7,0	7,8	7,6	7,8
9	7,0	7,2	7,0	7,2	7,4	7,3
10	7,3	6,9	7,2	7,4	7,0	7,4
15	7,4	7,1	7,2	7,4	7,4	7,2

Tabla 5: Salida de Infostat de medidas resumen para ambos grupos, respecto a la variable grados Brix.

Grupo	Resumen	°Brix
Con suplemento	n	15,00
Con suplemento	Media	7,73
Con suplemento	D.E.	0,67
Con suplemento	Var (n-1)	0,44
Con suplemento	E.E.	0,17
Con suplemento	CV	8,62
Con suplemento	Mín	7,00
Con suplemento	Máx	9,20
Con suplemento	Mediana	7,40
Sin suplemento	n	15,00
Sin suplemento	Media	7,45
Sin suplemento	D.E.	0,70
Sin suplemento	Var (n-1)	0,49
Sin suplemento	E.E.	0,18
Sin suplemento	CV	9,43
Sin suplemento	Mín	6,90
Sin suplemento	Máx	9,10
Sin suplemento	Mediana	7,20

Aunque los valores de las varianzas muestrales fueron similares se someten ambas muestras a la prueba de F (tabla 6) para probar la homocedasticidad de las varianzas

Planteo de hipótesis en prueba de F para grados Brix

Se comprueba el supuesto de la homogeneidad en las varianzas mediante la Prueba de F para ambas muestras

Hc: "La varianza del grupo "Con suplemento" es diferente a la varianza del grupo "Sin suplemento"

Ho: Var "Con suplemento" = Var "Sin suplemento"

H1: Var "Con suplemento" \neq Var "Sin suplemento"

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Tabla 6: Prueba de F para evaluar varianzas de ambas muestras con respecto a la variable grados Brix.

	<i>Sin suplemento</i>	<i>Con suplemento</i>
Media	7,328571429	7,621428571
Varianza	0,305274725	0,298736264
Observaciones	14	14
Grados de libertad	13	13
F	1,02188707	
P(F<=f) una cola	0,484728716	
Valor crítico para F (una cola)	2,576927084	

Como el p valor > que α , aceptamos la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas para un nivel de significancia del 5%. Esto habilita a efectuar la prueba de T para varianzas muestrales iguales para evaluar la igualdad de medias.

Planteo de hipótesis en prueba de T para grados Brix

Prueba de T para dos muestras con varianzas iguales

μ_1 : Muestra “Con suplemento” μ_2 : Muestra “Sin suplemento”

Ho: “El valor promedio de los valores de grados Brix del grupo “Con suplemento” es diferente al valor promedio de los valores de grados Brix del grupo “Sin suplemento”.

Ho: $\mu_1 = \mu_2$

H1: $\mu_1 \neq \mu_2$

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Tabla 7: Prueba de T para comparación de medias de ambos grupos con respecto a la variable grados Brix.

Variable: °Brix - Clasific:Grupo - prueba:Bilateral

	Grupo 1	Grupo 2
	Con suplemento	Sin suplemento
n	15	15
Media	7,73	7,45
Varianza	0,44	0,49
Media (1) -Media (2)	0,28	
LI (95)	-0,23	
LS (95)	0,79	
pHomVar	0,8469	
T	1,12	
gl	28	
p-valor	0,2719	

El resultado arroja que el p valor > α para un nivel de significancia del 5%, por lo tanto se acepta la hipótesis nula que indica que la media 1 es igual a la media de 2 .Es decir no se

obtuvo evidencia a un nivel de significancia del 5% de que los valores promedios de grados Brix en ambos grupos fuera diferente

8.1.2) Determinación de pH

Tabla 8: Mediciones de pH en ambos grupos con respecto al tiempo en días

pH						
DÍA	GRUPO SIN SUPLEMENTO			GRUPO CON SUPLEMENTO		
	Muestra 3	Muestra 11	Muestra 19	Muestra 4	Muestra 8	Muestra 16
4	5,2	4,7	4,4	4,4	4,5	4,3
5	4,4	4,2	4,1	4,2	4,2	4,2
9	4,3	4,2	4,2	4,3	4,3	4,3
10	4,3	4,2	4,1	4,3	4,3	4,3
15	4,3	4,2	4,2	4,3	4,3	4,3

Tabla 9: Salida de Infostat de medidas resumen para ambos grupos, respecto a la variable pH.

Grupo	Resumen	pH
Con suplemento	n	15,00
Con suplemento	Media	4,30
Con suplemento	D.E.	0,08
Con suplemento	Var(n-1)	0,01
Con suplemento	E.E.	0,02
Con suplemento	CV	1,76
Con suplemento	Mín	4,20
Con suplemento	Máx	4,50
Con suplemento	Mediana	4,30
Sin suplemento	n	15,00
Sin suplemento	Media	4,33
Sin suplemento	D.E.	0,28
Sin suplemento	Var(n-1)	0,08
Sin suplemento	E.E.	0,07
Sin suplemento	CV	6,51
Sin suplemento	Mín	4,10
Sin suplemento	Máx	5,20
Sin suplemento	Mediana	4,20

Luego de efectuar una prueba de F (tabla 10) se afirma que las varianzas efectivamente son diferentes a un nivel de significancia del 5%, por lo cual esto nos habilita finalmente a realizar una prueba de T para comparar las medias de ambas muestras independientes con varianzas desiguales (tabla 11).

Planteo de hipótesis en prueba de F para pH

Se comprueba el supuesto de la homogeneidad en las varianzas mediante la Prueba de F para ambas muestras

Hc: “La varianza del grupo “Sin suplemento” es mayor a la varianza del grupo “Con suplemento”

Ho: Var “Con suplemento”= Var “Sin suplemento”

H1: Var “Con suplemento” ≠ Var “Sin suplemento”

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Tabla 10: Prueba de F para evaluar varianzas de ambas muestras con respecto a la variable pH.

	<i>Sin suplemento</i>	<i>Con suplemento</i>
Media	4,271428571	4,292857143
Varianza	0,023736264	0,00532967
Observaciones	14	14
Grados de libertad	13	13
F	4,453608247	
P(F<=f) una cola	0,005633225	
Valor crítico para F (una cola)	2,576927084	

Como el p valor $< \alpha$ se rechaza la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas para un nivel de significancia del 5%. Esto nos indica que la prueba de T para las medias debe hacerse bajo la condición de que las varianzas en ambas muestras no son iguales.

Planteo de hipótesis en prueba de T para pH

Prueba de T para dos muestras con varianzas desiguales

μ_1 : Muestra “Con suplemento” μ_2 : Muestra “Sin suplemento”

Ho: “El valor promedio de los valores de pH del grupo “Con suplemento” es diferente al valor promedio de los valores de pH del grupo “Sin suplemento”.

Ho: $\mu_1 = \mu_2$

H1: $\mu_1 \neq \mu_2$

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Tabla 11: Prueba de T para comparación de medias de ambos grupos con respecto a la variable pH.

```
Variable:pH - Clasific:Grupo - prueba:Bilateral
```

	Grupo 1	Grupo 2
	Con suplemento	Sin suplemento
n	15	15
Media	4,30	4,33
Varianza	0,01	0,08
Media (1) -Media (2)	-0,03	
LI (95)	-0,19	
LS (95)	0,13	
pHomVar	<0,0001	
T	-0,44	
gl	16	
p-valor	0,6643	

La prueba de T bilateral arroja un p valor $> \alpha$, siendo el nivel de significancia $\alpha = 0,05$.

Esto quiere decir que se acepta la hipótesis nula que indica que la media 1 es igual a la media de 2 .Es decir no se obtiene evidencia a un nivel de significancia del 5% de que los valores promedios de pH en ambos grupos es diferente

8.1.3) Determinación de densidad

Tabla 12: Mediciones de la densidad con respecto al tiempo en días .Los resultados se muestran en g/l

MEDICIONES DE DENSIDAD		
DIA DE FERMENTACIÓN	ρ MUESTRAS SIN SUPLEMENTO	ρ MUESTRAS CON SUPLEMENTO
0	1,071	1,071
2	1,061	1,061
5	1,012	1,016
9	1,010	1,011
10	1,010	1,010
15	1,010	1,010

Tabla 13: Salida de Infostat de medidas resumen para ambos grupos, respecto a la variable Densidad.

GRUPO	Resumen	DENSIDAD
CON SUPLEMENTO	n	6,00
CON SUPLEMENTO	Media	1,03
CON SUPLEMENTO	D.E.	0,03
CON SUPLEMENTO	Var (n-1)	8,0E-04
CON SUPLEMENTO	CV	2,75
CON SUPLEMENTO	Mín	1,01
CON SUPLEMENTO	Máx	1,07
CON SUPLEMENTO	Mediana	1,01
SIN SUPLEMENTO	n	6,00
SIN SUPLEMENTO	Media	1,03
SIN SUPLEMENTO	D.E.	0,03
SIN SUPLEMENTO	Var (n-1)	8,3E-04
SIN SUPLEMENTO	CV	2,80
SIN SUPLEMENTO	Mín	1,01
SIN SUPLEMENTO	Máx	1,07
SIN SUPLEMENTO	Mediana	1,01

Planteo de hipótesis en prueba de F para densidad

Comprobamos el supuesto de la homogeneidad en las varianzas mediante la Prueba de F para ambas muestras

Hc: “La varianza del grupo “Sin suplemento” es mayor a la varianza del grupo con suplemento “

Ho: Ho: Var “Con suplemento” = Var “Sin suplemento”

H1: Var “Con suplemento” ≠ Var “Sin suplemento

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Tabla 14: Prueba de F para evaluar varianzas de ambas muestras con respecto a la variable densidad.

	<i>Sin suplemento</i>	<i>Con suplemento</i>
Media	1,0206	1,0216
Varianza	0,0005108	0,0004913
Observaciones	5	5
Grados de libertad	4	4
F	1,039690617	
P(F<=f) una cola	0,48540749	
Valor crítico para F (un	6,388232909	

Al efectuar una prueba de F (tabla 14) se puede afirmar que las varianzas efectivamente son iguales a un nivel de significancia del 5%, por lo cual esto habilita finalmente a realizar una prueba de T (tabla 15) para comparar las medias de ambas muestras independientes con varianzas iguales.

Planteo de hipótesis en prueba de T para densidad

Prueba de T para dos muestras con varianzas iguales

μ_1 : Muestra “Con suplemento” μ_2 : Muestra “Sin suplemento”

Ho: “El valor promedio de la densidad del grupo “Con suplemento” es diferente al valor promedio de la densidad del grupo “Sin suplemento”.

Ho: $\mu_1 = \mu_2$

H1: $\mu_1 \neq \mu_2$

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Tabla 15: Prueba de T para comparación de medias de ambos grupos con respecto a la variable densidad.

Variable:DENSIDAD - Clasific:GRUPO - prueba:Bilateral

	Grupo 1	Grupo 2
	CON SUPLEMENTO	SIN SUPLEMENTO
n	6	6
Media	1,03	1,03
Varianza	8,0E-04	8,3E-04
Media (1) -Media (2)	8,3E-04	
LI (95)	-0,04	
LS (95)	0,04	
pHomVar	0,9665	
T	0,05	
gl	10	
p-valor	0,9607	

La prueba de T bilateral arroja un p valor $> \alpha$, siendo el nivel de significancia $\alpha = 0,05$.

Esto quiere decir que se acepta la hipótesis nula que indica que la media 1 es igual a la media de 2, para un nivel de significancia de un 5%.

8.1.4) Determinación de azúcares reductores residuales

Tabla 16: Azúcares residuales obtenidos en ambas muestras en el día 16 de fermentación expresados en g/l

AZÚCARES RESIDUALES		
SIN SUPLEMENTO	MUESTRA N°3	7,27
	MUESTRA N°11	6,83
	MUESTRA N°19	7,16
CON SUPLEMENTO	MUESTRA N°4	6,63
	MUESTRA N°8	7,05
	MUESTRA N°16	6,94

Tabla 17: Salida de Infostat de medidas resumen para ambos grupos, respecto a la variable Azúcares residuales expresados en gramos por litro.

Grupo	Resumen	Azúcares residuales (g/L)
Con suplemento	n	3,00
Con suplemento	Media	6,87
Con suplemento	D.E.	0,22
Con suplemento	Var (n-1)	0,05
Con suplemento	E.E.	0,13
Con suplemento	CV	3,17
Con suplemento	Mín	6,63
Con suplemento	Máx	7,05
Con suplemento	Mediana	6,94
Sin suplemento	n	3,00
Sin suplemento	Media	7,09
Sin suplemento	D.E.	0,23
Sin suplemento	Var (n-1)	0,05
Sin suplemento	E.E.	0,13
Sin suplemento	CV	3,23
Sin suplemento	Mín	6,83
Sin suplemento	Máx	7,27
Sin suplemento	Mediana	7,16

Planteo de hipótesis en prueba de F para azúcares residuales

Comprobamos el supuesto de la homogeneidad en las varianzas mediante la Prueba de F para ambas muestras

Hc: "La varianza del grupo "Con suplemento" es diferente a la varianza del grupo "Sin suplemento"

Ho: Var "Con suplemento" = Var "Sin suplemento"

H1: Var "Con suplemento" \neq Var "Sin suplemento"

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se someten las muestras a la prueba de F para comprobar la homocedasticidad de varianzas (tabla 18). Se comprueba que las varianzas son iguales al aceptar la hipótesis nula a un nivel de significancia del 5%.

Tabla 18: Prueba de F para evaluar varianzas de ambas muestras con respecto a la variable azúcares residuales

	<i>Sin suplemento</i>	<i>Con suplemento</i>
Media	6,995	6,995
Varianza	0,05445	0,00605
Observaciones	2	2
Grados de libertad	1	1
F	9	
P(F<=f) una cola	5	0,20483276
Valor crítico para F (una cola)	8	161,447638

Como el p valor > que α , aceptamos la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas para un nivel de significancia del 5%. Esto nos permitió a efectuar la prueba de T para varianzas muestrales iguales para evaluar la igualdad de medias entre las dos muestras.

Planteo de hipótesis en prueba de T para azúcares residuales

Prueba de T para dos muestras con varianzas iguales

μ_1 : Media del grupo "Con suplemento" μ_2 : Media del grupo "Sin suplemento"

Ho: "El valor promedio de los azúcares residuales del grupo "Con suplemento" es diferente al valor promedio de los azúcares residuales del grupo "Sin suplemento".

Ho: $\mu_1 = \mu_2$

H1: $\mu_1 \neq \mu_2$

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Tabla 19: Prueba de T para comparación de medias de ambos grupos con respecto a la variable azúcares residuales.

Variable:Azúcares residuales (g/L) - Clasific:Grupo - prueba:Bilateral

	Grupo 1 Con suplemento	Grupo 2 Sin suplemento
n	3	3
Media	6,87	7,09
Varianza	0,05	0,05
Media (1)-Media (2)	-0,21	
LI (95)	-0,72	
LS (95)	0,29	
pHomVar	0,9499	
T	-1,17	
gl	4	
p-valor	0,3072	

Se efectúa la prueba de T (tabla 19) para muestras con varianzas iguales que indica que el promedio de los valores de azúcares residuales del grupo “Con suplemento” es igual al promedio de los valores de azúcares residuales del grupo “Sin suplemento”, para un nivel de significancia del 5%. Es decir, ambos grupos llegaron al final de la fermentación con valores promedios de azúcares residuales equivalentes.

8.2) Tablas, y planteo de pruebas de hipótesis del ensayo 2: Recuento de levaduras de cerveza totales y viables

Tabla 20: Resultados del recuento de levaduras en unidades de muestra sorteados del grupo “Sin suplemento” expresados en N° Cel. /ml.

GRUPO SIN SUPLEMENTO	DÍAS DE FERMENTACIÓN		
N° DE UNIDAD MUESTRAL	0	5	10
T4	1,54E+07	8,32E+06	2,27E+07
T9	1,54E+07	2,08E+07	2,11E+07
T13	1,54E+07	1,38E+07	1,86E+07

Tabla 21: Resultados del recuento de levaduras en unidades de muestra sorteados del grupo “Con suplemento” expresados en N° Cel. /ml.

GRUPO CON SUPLEMENTO	DÍAS DE FERMENTACIÓN		
N° DE UNIDAD MUESTRAL	0	5	10
TT5	1,54E+07	1,92E+07	1,06E+07
TT9	1,54E+07	6,72E+06	8,32E+06
TT18	1,54E+07	2,14E+07	1,31E+07

Tabla 22: Salida de Excel de medidas resumen para ambos grupos, respecto a la variable Número de células de levadura / ml

Sin suplemento	
n	9
Media	1,79E+07
Error típico	2,14E+06
Mediana	1,70E+07
Desviación estándar	6,06E+06
Coefficiente de variación	3,38E+01
Varianza de la muestra	3,67E+13
Rango	1,97E+07
Mínimo	8,32E+06
Máximo	2,80E+07
Con suplemento	
n	9
Media	1,38E+07
Error típico	1,81E+06
Mediana	1,43E+07
Coefficiente de variación	3,71E+01
Desviación estándar	5,11E+06
Varianza de la muestra	2,61E+13
Rango	1,47E+07
Mínimo	6,72E+06
Máximo	2,14E+07

Planteo de hipótesis en prueba de F para recuento de levaduras totales

Comprobamos el supuesto de la homogeneidad en las varianzas mediante la Prueba de F para ambas muestras

Hc: “La varianza del grupo “Con suplemento” es diferente a la varianza del grupo “Sin suplemento”

Ho: Var “Con suplemento” = Var “Sin suplemento”

H1: Var “Con suplemento” \neq Var “Sin suplemento”

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se realiza una prueba de F para determinar la homocedasticidad de varianzas de ambas muestras (tabla 23). Al comparar el valor de probabilidad P con α , notamos que éste es mayor al nivel de significancia, por lo tanto se acepta la hipótesis nula que indica la igualdad de varianzas para un nivel de significancia del 5%.

Tabla 23: Prueba de F para evaluar varianzas de ambas muestras con respecto a la variable número de células por ml

	Sin suplemento	Con suplemento
Media	17635555,56	13948888,89
Varianza	3,28109E+13	2,31609E+13
Observaciones	9	9
Grados de libertad	8	8
F	1,416648836	
P(F<=f) una cola	0,316934993	
Valor crítico para F (una cola)	3,438101233	

Esto habilita a efectuar la prueba de T (tabla 24) para varianzas muestrales iguales para evaluar la igualdad de medias entre las dos muestras.

Planteo de hipótesis en prueba de T para recuento de levaduras totales

Prueba de T para dos muestras con varianzas iguales

μ_1 : Media del grupo “Con suplemento” μ_2 : Media del grupo “Sin suplemento”

Ho: “El valor promedio del recuento de levaduras del grupo “Con suplemento” es diferente al valor promedio del recuento del grupo “sin suplemento”.

Ho: $\mu_1 = \mu_2$

H1: $\mu_1 \neq \mu_2$

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Tabla 24: Prueba de T para comparación de medias de ambos grupos con respecto a la variable recuento de levaduras.

	Con suplemento	Sin suplemento
Media	13948888,89	17635555,56
Varianza	2,31609E+13	3,28109E+13
Observaciones	9	9
Varianza agrupada	2,79859E+13	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	-1,478327083	
P(T<=t) una cola	0,079368054	
Valor crítico de t (una cola)	1,745883676	
P(T<=t) dos colas	0,158736108	
Valor crítico de t (dos colas)	2,119905299	

La decisión tomada luego de comprobar que el p valor $> \alpha$ en esta prueba bilateral es de aceptar la hipótesis nula de igualdad de medias para un nivel de significancia del 5%.

8.3) Tablas, y planteo de pruebas de hipótesis del ensayo 3: Desarrollo de curva de fermentación por pérdida de peso

8.3.1) Comparación entre grupo “Sin suplemento” y “Con suplemento” mediante medidas estadísticas de resumen

Tabla 25: Salida de Infostat de medidas resumen para el grupo “Sin suplemento”, respecto a la variable Pérdida de peso expresado en gramos.

Resumen	Pérdida de peso (g)
n	117,00
Media	14,18
D.E.	3,34
Var (n-1)	11,16
CV	23,57
Mín	6,43
Máx	19,23
Mediana	15,26

Tabla 26: Salida de Infostat de medidas resumen para el grupo “Con suplemento”, respecto a la variable Pérdida de peso expresado en gramos.

Resumen	Pérdida de peso (g)
n	117,00
Media	12,93
D.E.	2,79
Var (n-1)	7,76
CV	21,54
Mín	6,65
Máx	16,80
Mediana	13,85

8.3.2) Comparación entre grupo “Sin suplemento” y “Con suplemento” en el día 3 y 14 de fermentación

Planteo de hipótesis en prueba de F para pérdida de peso en el día 3 de fermentación

Comprobamos el supuesto de la homogeneidad en las varianzas mediante la Prueba de F para ambas muestras

Hc: “La varianza del grupo “Con suplemento” es diferente a la varianza del grupo “Sin suplemento” en el tercer día de fermentación”

Ho: Var “Con suplemento” = Var “Sin suplemento”

H1: Var “Con suplemento” \neq Var “Sin suplemento”

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Tabla 27: Prueba de F para evaluar varianzas de ambas muestras con respecto a la variable Pérdida de peso en el 3er día de fermentación.

	<i>Sin suplemento</i>	<i>Con suplemento</i>
Media	10,7375	10,17833333
Varianza	0,084893182	0,065524242
Observaciones	12	12
Grados de libertad	11	11
F	1,295599593	
P(F<=f) una cola	0,337516268	
Valor crítico para F (una cola)	2,81793047	

Como el P valor > α aceptamos la hipótesis nula que indica la igualdad de varianzas en ambos grupos

Planteo de hipótesis en prueba de T para pérdida de peso en el día 3 de fermentación

Prueba de T para dos muestras con varianzas iguales

μ_1 : Media del grupo "Con suplemento" μ_2 : Media del grupo "Sin suplemento"

Ho: "El valor promedio de la pérdida de peso del grupo "Con suplemento" es mayor al valor promedio de la pérdida de peso del grupo "Sin suplemento" en el tercer día de fermentación".

Ho: $\mu_1 - \mu_2 = 0$

H1: $\mu_1 - \mu_2 > 0$

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Tabla 28: Prueba de T para comparación de medias de ambos grupos con respecto a la variable pérdida de peso en el 3er día de fermentación.

	<i>Sin suplemento</i>	<i>Con suplemento</i>
Media	10,65384615	10,16230769
Varianza	0,168792308	0,063402564
Observaciones	13	13
Varianza agrupada	0,116097436	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	24	
Estadístico t	3,67792501	
P(T<=t) una cola	0,000591914	
Valor crítico de t (una cola)	1,71088208	
P(T<=t) dos colas	0,001183828	
Valor crítico de t (dos colas)	2,063898562	

Como el P valor $< \alpha$ se rechaza la hipótesis nula que indica que las medias de ambos grupos son iguales en el tercer día de fermentación. Por ende en términos del ensayo el valor promedio de la pérdida de peso del grupo "Con suplemento" es mayor al valor promedio de la pérdida de peso del grupo "Sin suplemento", para un nivel de significancia del 5%.

Planteo de hipótesis en prueba de F para pérdida de peso en el día 14 de fermentación

Comprobamos el supuesto de la homogeneidad en las varianzas mediante la Prueba de F para ambas muestras

Hc: "La varianza del grupo "Con suplemento" es diferente a la varianza del grupo "Sin suplemento" en el día 14 de fermentación"

Ho: Var "Con suplemento" = Var "Sin suplemento"

H1: Var "Con suplemento" \neq Var "Sin suplemento"

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Tabla 29: Prueba de F para evaluar varianzas de ambas muestras con respecto a la variable Pérdida de peso en el día 14 de fermentación

	<i>Sin suplemento</i>	<i>Con suplemento</i>
Media	18,28	16,46166667
Varianza	0,281381818	0,038669697
Observaciones	12	12
Grados de libertad	11	11
F	7,276545725	
P(F<=f) una cola	0,001329971	
Valor crítico para F (una cola)	2,81793047	

Como p valor $< \alpha$ rechazo hipótesis nula que indica homogeneidad de varianzas. Es decir las varianzas de ambos grupos son diferentes.

Planteo de hipótesis en prueba de T para pérdida de peso en el día 14 de fermentación

Prueba de T para dos muestras con varianzas desiguales

μ_1 : Media del grupo "Con suplemento" μ_2 : Media del grupo "Sin suplemento"

Ho: "El valor promedio de la pérdida de peso del grupo "Con suplemento" es mayor al valor promedio de la pérdida de peso del grupo "Sin suplemento" en el día 14 de fermentación".

Ho: $\mu_1 = \mu_2$

H1: $\mu_1 - \mu_2 > 0$

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Tabla 30: Prueba de T para comparación de medias de ambos grupos con respecto a la variable pérdida de peso en día 14 de fermentación.

	<i>Sin suplemento</i>	<i>Con suplemento</i>
Media	18,28	16,46166667
Varianza	0,281381818	0,038669697
Observaciones	12	12
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	11,13407595	
P(T<=t) una cola	1,21554E-08	
Valor crítico de t (una cola)	1,761310136	
P(T<=t) dos colas	2,43107E-08	
Valor crítico de t (dos colas)	2,144786688	

Como $p \text{ valor} < \alpha$ se rechaza hipótesis nula que indica igualdad de medias. En términos del ensayo se comprueba que el valor promedio de la pérdida de peso del grupo “Con suplemento” es mayor al valor promedio de la pérdida de peso del grupo “Sin suplemento” en el día 14 de fermentación, para un nivel de significancia del 5%.

8.3.3) Análisis de la relación y ajustamiento del modelo

Para un análisis descriptivo utilizamos el software estadístico Infostat para comprobar si hay relación entre las variables tiempo de fermentación (medida en días) y pérdida de peso (medida en gramos) por medio de la obtención del coeficiente de correlación muestral de Pearson (r) (tabla 31).

Seguidamente se utiliza un gráfico de dispersión para obtener una idea primaria de cómo están asociadas esas dos variables (figura 39).

El coeficiente de correlación muestral de Pearson es igual a 95, es decir existe una fuerte correlación lineal positiva entre las variables tiempo de fermentación y pérdida de peso.

Tabla 31: Salida de Infostat para el análisis de la relación entre las variables tiempo de fermentación (Días) y pérdida de peso (g).

	<i>Perdida de peso días</i>	
<i>Perdida de peso</i>	1,00	0,00
<i>días</i>	0,95	1,00

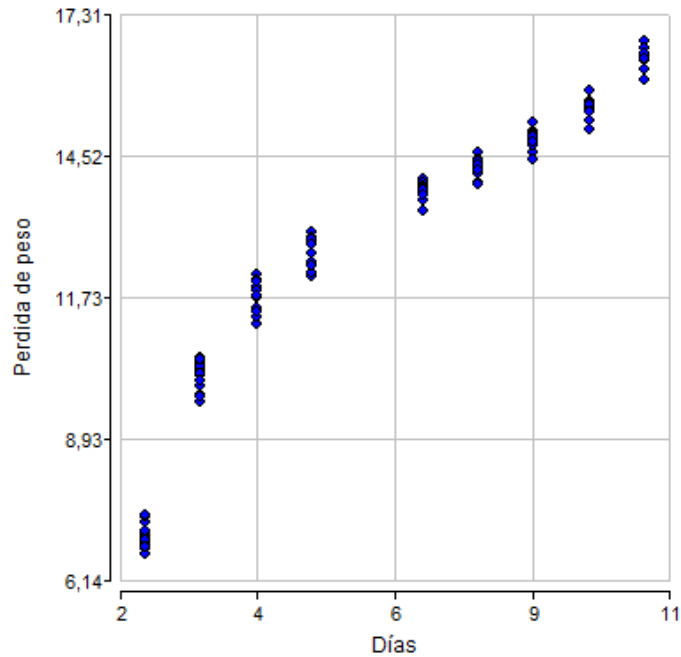


Figura 39: Diagrama de dispersión para la variable pérdida de peso (g), con respecto a la variable tiempo de fermentación (Días).

8.3.4) Ajustamiento del modelo a los datos

Para obtener la relación funcional entre las dos variables estudiadas, se define primero a quien tomamos como variable independiente o regresora y a quien como variable dependiente o respuesta. Para el presente ensayo se define a la variable Tiempo de fermentación (días), como la variable independiente y a la variable Pérdida de peso (g) como la variable dependiente o respuesta.

Para obtener una ecuación que permita predecir respuestas, se busca cual es el modelo más apropiado, ajustando finalmente el modelo a los datos obtenidos en el ensayo.

Para lo mencionado con anterioridad lo primero que se debe hacer es calcular los estimadores de los parámetros poblacionales. La estimación se hace mediante el método estadístico de los mínimos cuadrados, y las estimaciones se ponen a prueba mediante pruebas de hipótesis.

Para los coeficientes se usa una prueba de T de Student bilateral, y para el modelo se utiliza una prueba de F.

Mediante el programa estadístico Infostat se obtienen los valores de las pruebas para los modelos lineales, exponencial, potencial y polinómico de segundo grado (tabla 32 y 33), obteniendo a su vez los gráficos de ajustamiento (figura 40 y 43), gráficos Q-Q plot (figura 41 y 44), y los gráficos de los residuos estudentizados, para comprobar también que se cumplan los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia (figura 42 y 45).

A continuación, los resultados del análisis

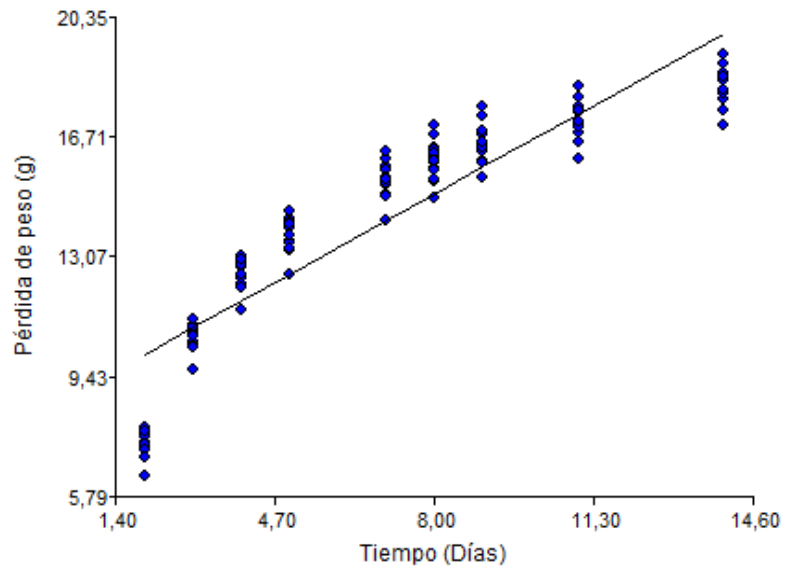


Figura 40: Gráfico de ajustamiento del modelo lineal a los datos obtenidos

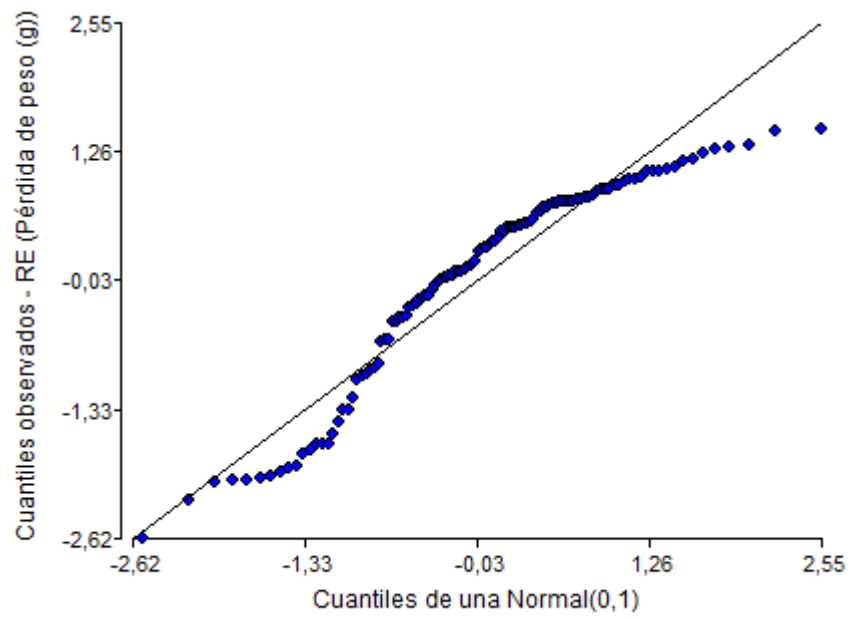


Figura 41: Gráfica Q-Q plot para el ajustamiento del modelo lineal a los datos obtenidos

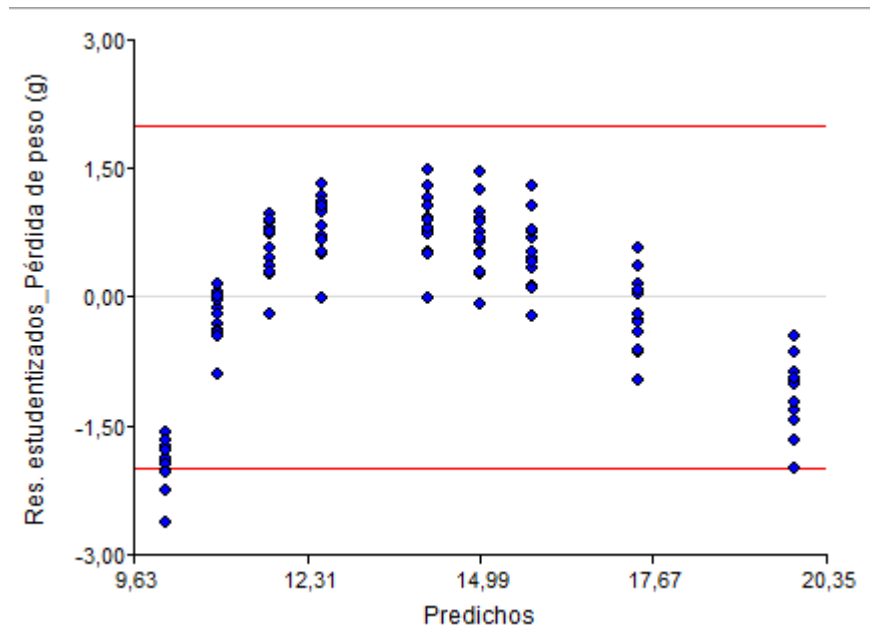


Figura 42: Gráfica de los residuos estudentizados con respecto a los predichos, para el ajustamiento de un modelo lineal a los datos obtenidos

Regresión simple lineal:

Prueba de hipótesis para los coeficientes:

Ho: $\beta_1 = 0$

H1: $\beta_1 \neq 0$

Ho: $\beta_0 = 0$

H1: $\beta_0 \neq 0$

$\alpha = 0,05$

Prueba de hipótesis para el modelo

Ho: $\beta_1 = 0$

H1: $\beta_1 \neq 0$

$\alpha = 0,05$

Tabla 32: Resultado del análisis numérico para el modelo lineal

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
Pérdida de peso (g)	117	0,82	0,82	2,12	418,97	427,25

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
const	8,50	0,28	7,94	9,06	30,21	<0,0001		
Tiempo (Días)	0,81	0,04	0,74	0,88	22,85	<0,0001	522,31	1,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1061,31	1	1061,31	522,31	<0,0001
Tiempo (Días)	1061,31	1	1061,31	522,31	<0,0001
Error	233,67	115	2,03		
Total	1294,99	116			

8.3.5) Relaciones curvilíneas: Polinómica de segundo grado

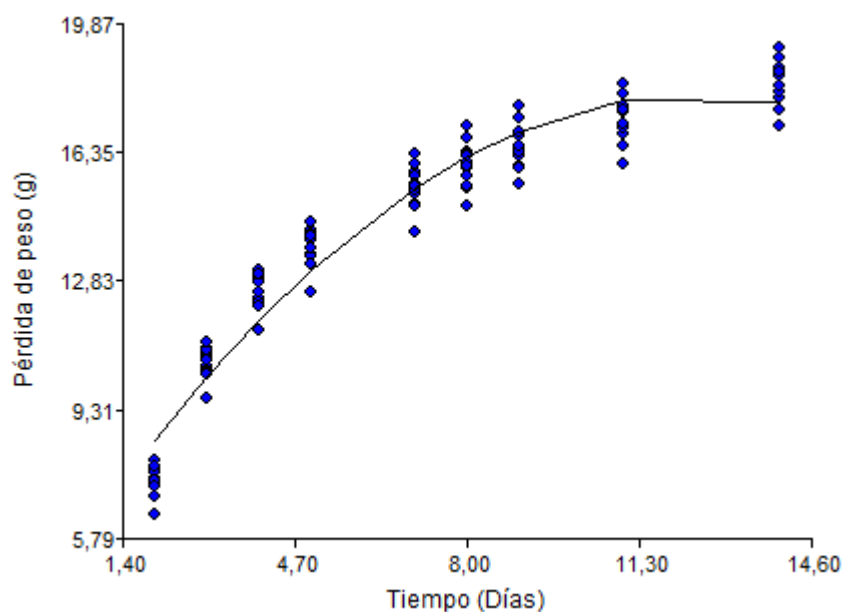


Figura 43: Gráfico de ajustamiento del modelo polinómico de segundo grado a los datos obtenidos

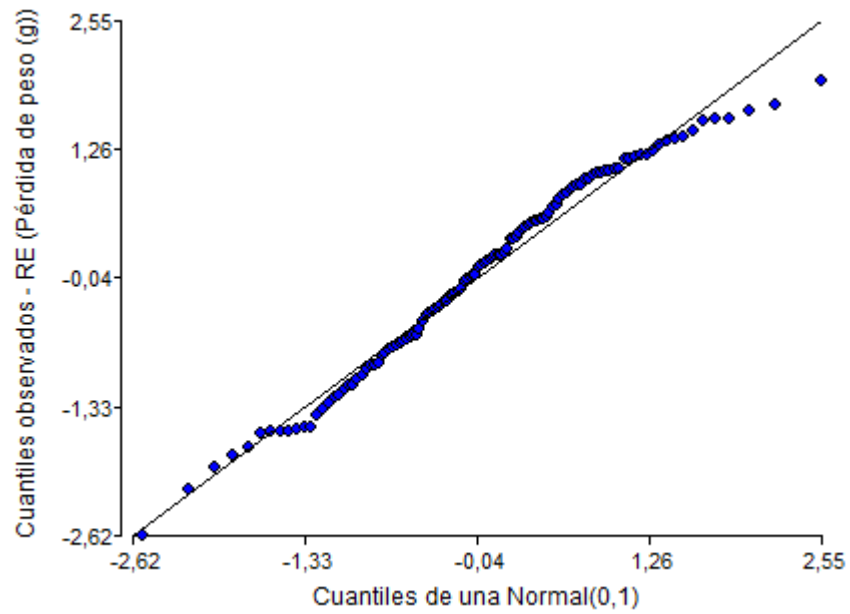


Figura 44: Gráfica Q-Q plot para el ajustamiento del modelo polinómico de segundo grado a los datos obtenidos

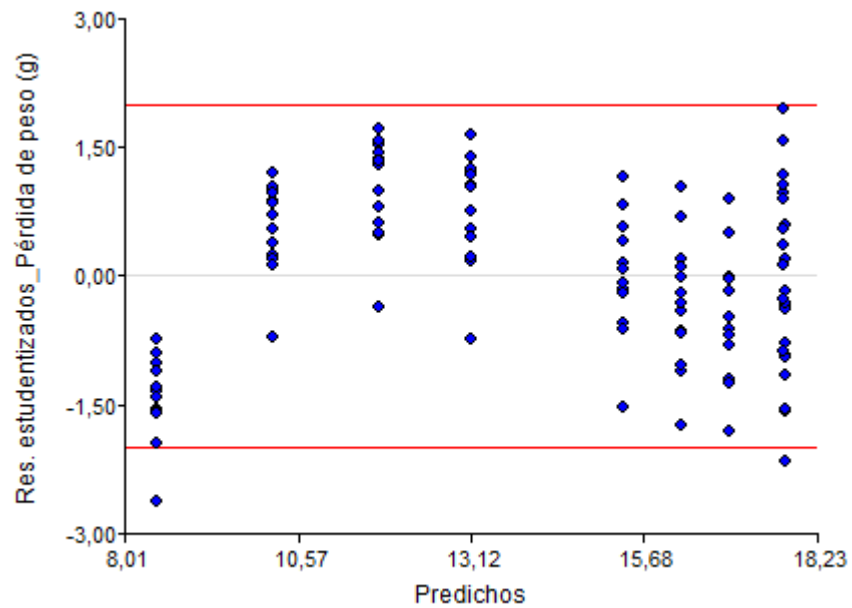


Figura 45: Gráfica de los residuos estudentizados con respecto a los predichos, para el ajustamiento de un modelo polinómico de segundo grado a los datos obtenidos

Prueba de hipótesis para los coeficientes:

Ho: $\beta_1 = 0$

H1: $\beta_1 \neq 0$

Ho: $\beta_0 = 0$

H1: $\beta_0 \neq 0$

Ho: $\beta_2 = 0$

H1: $\beta_2 \neq 0$

$\alpha = 0,05$

Prueba de hipótesis para el modelo

Ho: $\beta_1 = 0$

H1: $\beta_1 \neq 0$

Ho: $\beta_2 = 0$

H1: $\beta_2 \neq 0$

$\alpha = 0,05$

Tabla 33: Resultado del análisis numérico para el modelo polinómico de 2do grado

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
Pérdida de peso (g)	117	0,94	0,94	0,67	283,42	294,47

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
const	4,50	0,30	3,91	5,08	15,21	<0,0001		
Tiempo (Días)	2,16	0,09	1,99	2,33	24,90	<0,0001	621,23	19,21
Tiempo (Días) ²	-0,09	0,01	-0,10	-0,08	-15,98	<0,0001	256,38	19,21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1222,87	2	611,43	966,52	<0,0001
Tiempo (Días)	1061,31	1	1061,31	1677,66	<0,0001
Tiempo (Días) ²	161,56	1	161,56	255,38	<0,0001
Error	72,12	114	0,63		
Total	1294,99	116			

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1222,87	2	611,43	966,52	<0,0001
Tiempo (Días)	1222,87	2	611,43	966,52	<0,0001
Error	72,12	114	0,63		
Total	1294,99	116			

Luego de evaluar cada una de las salidas del software y de analizar los diferentes gráficos se muestra un cuadro resumen con los valores arrojados para los diferentes modelos (tabla 34).

Tabla 34: Cuadro resumen de los modelos ajustados, sus valores de coeficientes y sus interpretaciones del gráfico de residuos.

Modelo	Coeficientes			R ²	Prueba de hipótesis				Residuos
	β_0	β_1	β_2		β_0	β_1	β_2	Modelo	
Líneal	8,5	0,81		0,82	Sign.	Sign.		Sign.	Cumple normalidad y homocedasticidad
Exponencial	2,18	0,06		0,73	Sign.	Sign.		Sign.	Cumple normalidad y homocedasticidad
Potencial	1,84	0,44		0,91	Sign.	Sign.		Sign.	Cumple normalidad y homocedasticidad
Polinómico de 2do grado	4,5	2,16	-0,1	0,94	Sign.	Sign.	Sign.	Sign.	Cumple normalidad y homocedasticidad

Para elegir el modelo más adecuado para describir la relación entre variables, se parte de la base de evaluar las pruebas de hipótesis ejercidas para cada uno de los coeficientes y modelos, y se demuestra que los mismos fueran significativos, es decir, comprobar que tuviesen un valor distinto de cero. Luego analizamos los gráficos para observar si se cumple el supuesto de normalidad y homocedasticidad y se determina que el modelo polinómico de segundo grado es:

El que tiene los residuos estandarizados que mejor ajustan a la recta en el gráfico Q-Q Plot, ya que dichos valores no están alejados de la recta cuyo origen es 0, a diferencia de los demás modelos que guardan mayor lejanía a la recta.

El que posee en el gráfico de los residuos estudentizados vs predichos, los valores , con una buena dispersión, y con casi todos sus valores dentro de los límites que marcan las dos desviaciones típicas a partir de la media .

Además posee el gráfico de ajuste con la mejor disposición de valores a la línea curva de la función

Nos basamos además en el valor del Coeficiente de determinación (R^2), cuyo valor más alto corresponde al polinómico de segundo grado con $R^2= 0,94$. Esto quiere decir que el 94% de la variabilidad de los datos, están explicados por el modelo polinómico de segundo grado.

El siguiente cuadro (tabla 35) resume la comparación entre el modelo lineal y el modelo polinómico de segundo grado que ajustamos a los datos, con las respectivas fórmulas que nos permite predecir valores mediante el hallazgo de la relación funcional entre ambas.

Tabla 35: Cuadro resumen comparativo del modelo lineal vs el modelo elegido para ajustar a los datos, con sus respectivas fórmulas.

Modelo	eficientes			R^2	Prueba de hipótesis				Residuos	Fórmula del modelo
	β_0	β_1	β_2		β_0	β_1	β_2	Modelo		
Lineal	8,5	0,81		0,82	Sign.	Sign.		Sign.	Cumple normalidad y homocedasticidad	$Y_i = 8,5 + 0,81 * X_i$
Polinómico de 2do grado	4,5	2,16	-0,1	0,94	Sign.	Sign.		Sign.	Cumple normalidad y homocedasticidad	$Y_i = 4,5 + 2,16 * X_i + (-0,09) * X_i^2$

Una vez definido que el modelo polinómico de segundo grado es el adecuado para explicar el comportamiento de la relación funcional entre estas dos variables, y sabiendo que el coeficiente β_1 simboliza la pendiente de la función o ritmo de cambio, ponemos a prueba el modelo estableciendo, cuál de los dos grupos en estudio (“Sin suplemento”, y “Con suplemento”), es el que tiene mayor pendiente.

Tabla 36: Recorte del análisis numérico para el modelo polinómico de segundo grado para el grupo “Con suplemento”

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor
const	4,35	0,31	3,75	4,96	14,27	<0,0001
Tiempo en días	2,01	0,11	1,79	2,22	18,44	<0,0001
Tiempo en días ²	-0,09	0,01	-0,10	-0,07	-10,62	<0,0001

Comparando los valores de β_1 , es decir de la pendiente, se observa que tuvo un mayor ritmo de cambio o pendiente el grupo “Sin suplemento” (2,16) que el grupo “Con suplemento” (2,01) (tabla 36).

8.4) Tablas y figuras complementarias

8.4.1) Gráficos de líneas del ensayo 1: Determinación y evaluación de las variables físico químicas

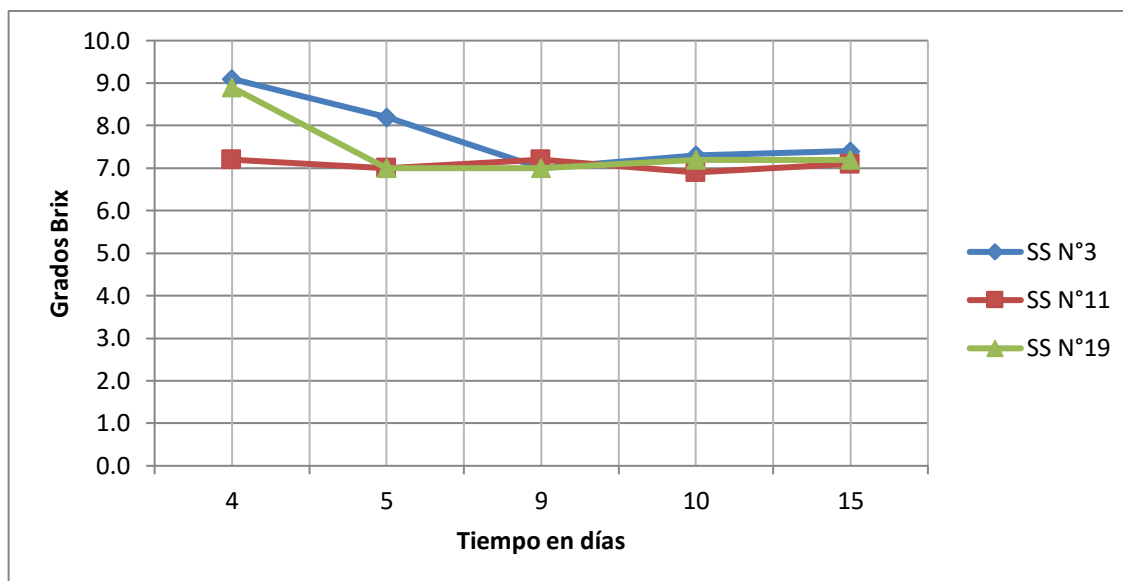


Figura 47: Gráfico de líneas para valores de °Bx del grupo “Sin suplemento” con respecto al tiempo en días

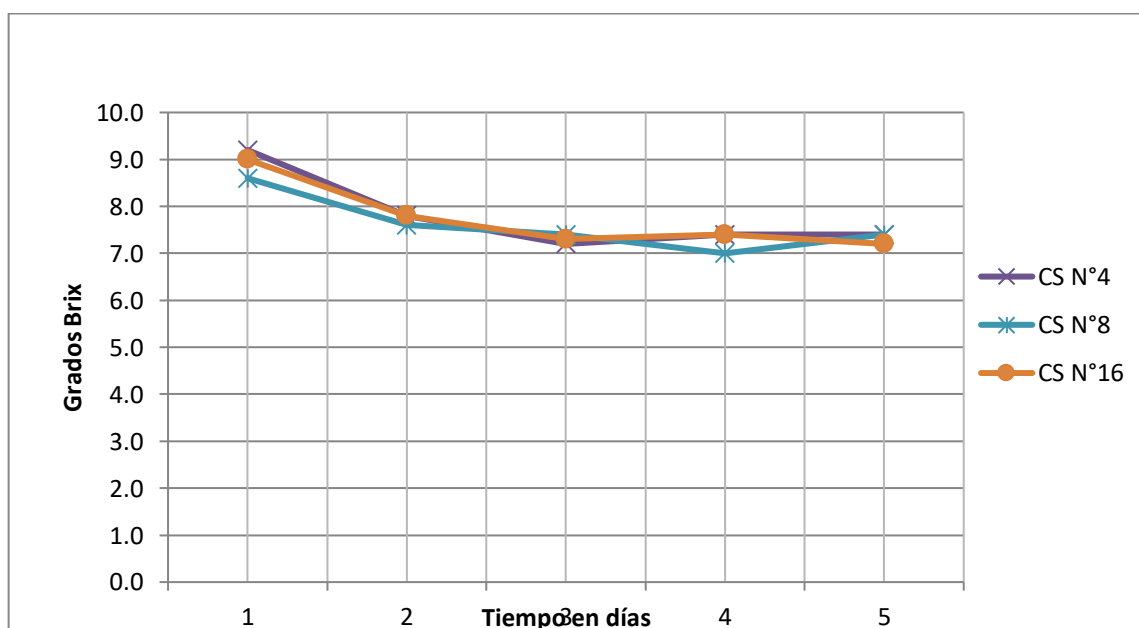


Figura 48: Gráfico de líneas para valores de °Bx del grupo “Con suplemento” con respecto al tiempo en días

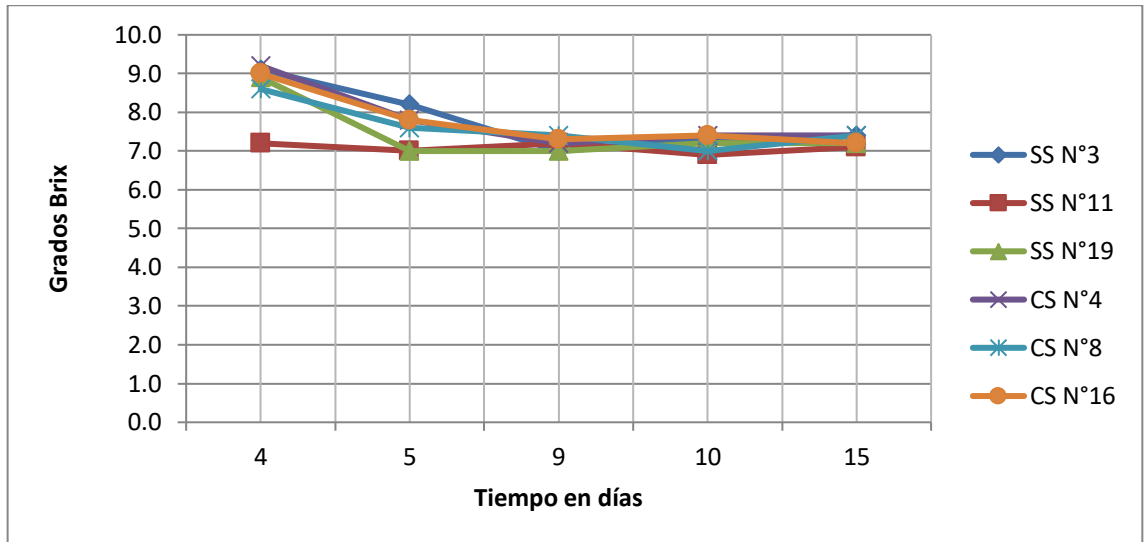


Figura 49: Grafico de líneas de valores de °Bx de ambos grupos con respecto al tiempo en días

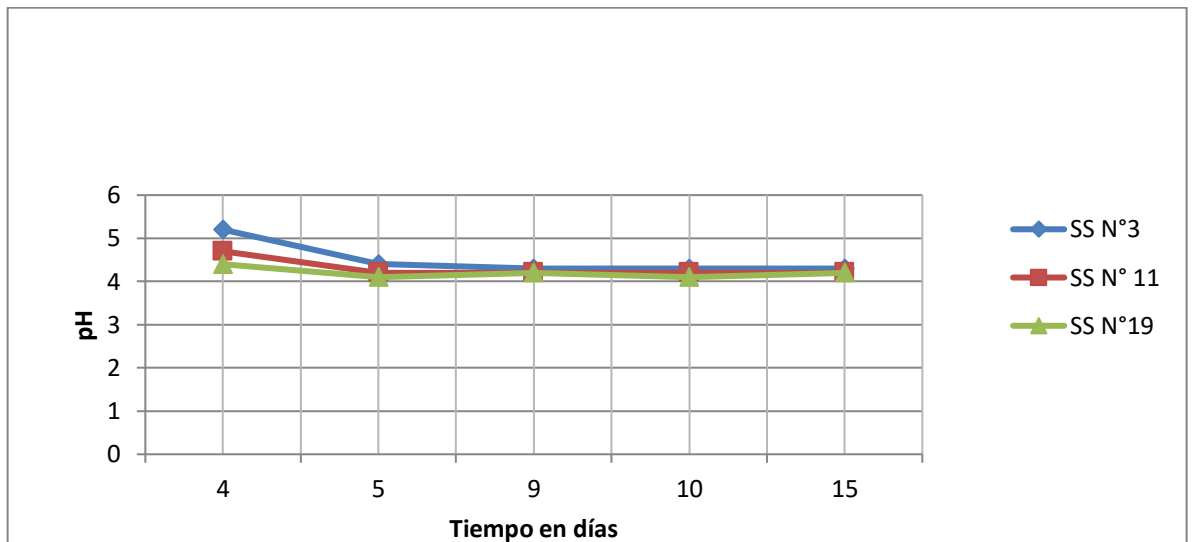


Figura 50: Gráfico de líneas para valores de pH del grupo "Sin suplemento" con respecto al tiempo en días

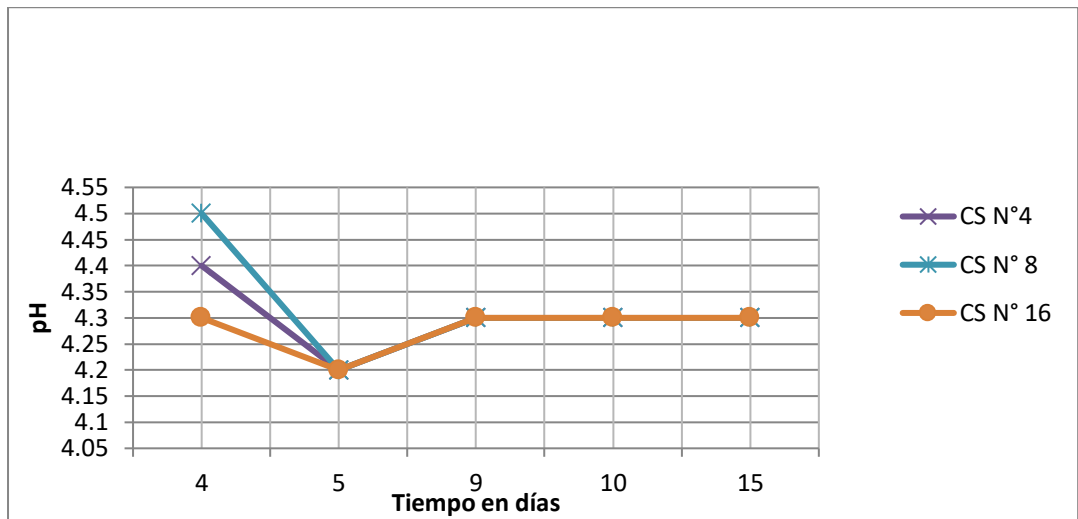


Figura 51: Gráfico de líneas para valores de pH del grupo “Con suplemento” con respecto al tiempo en días

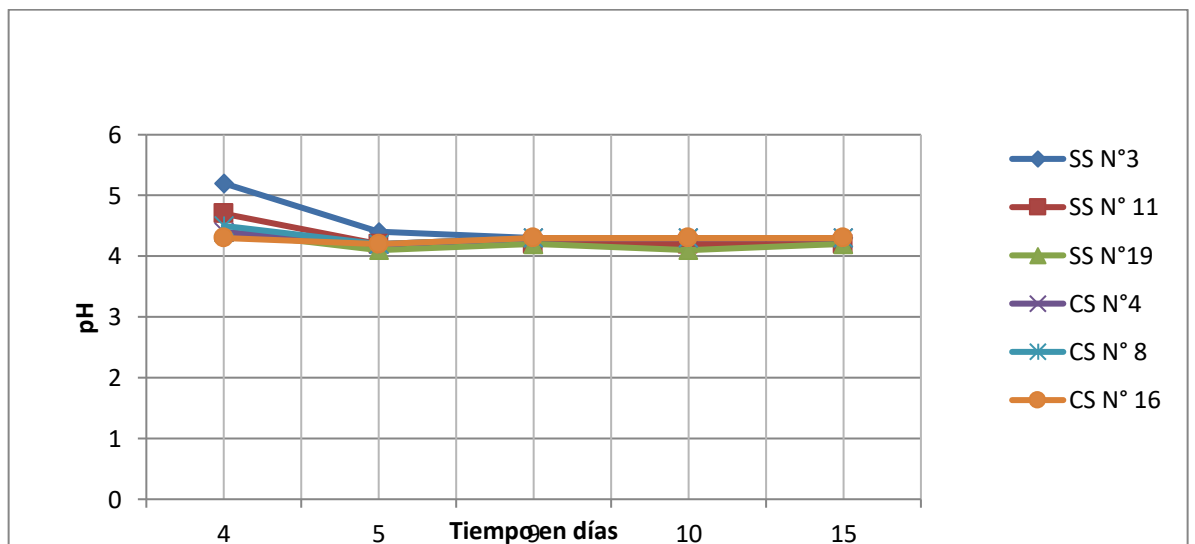


Figura 52: Gráfico de líneas para valores de pH en ambos grupos con respecto al tiempo en días.

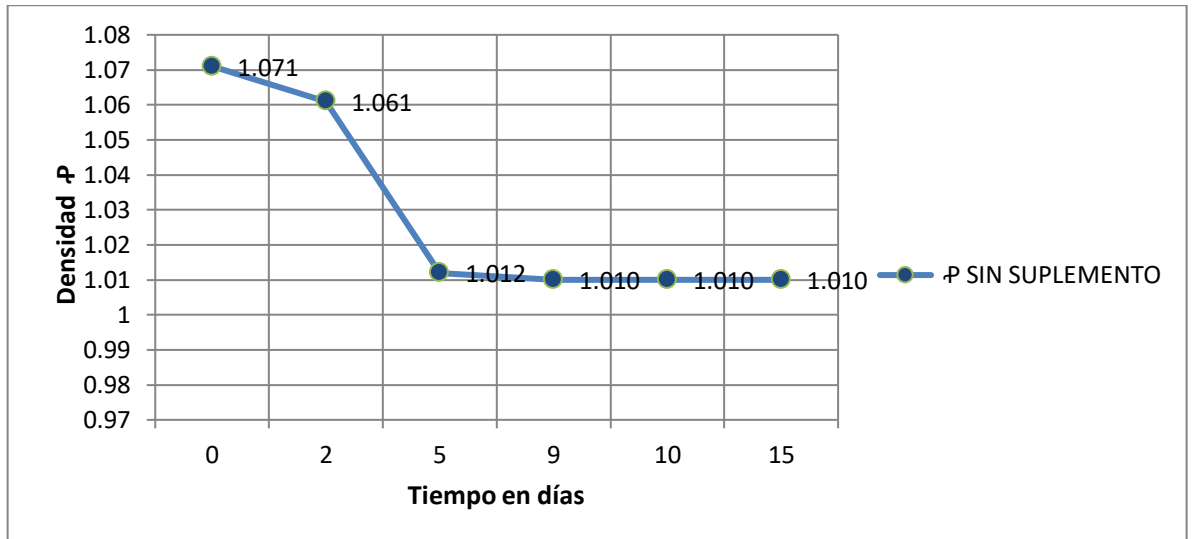


Figura 53: Gráfico de líneas para valores de densidad del grupo “Sin suplemento” según tiempo de fermentación en días

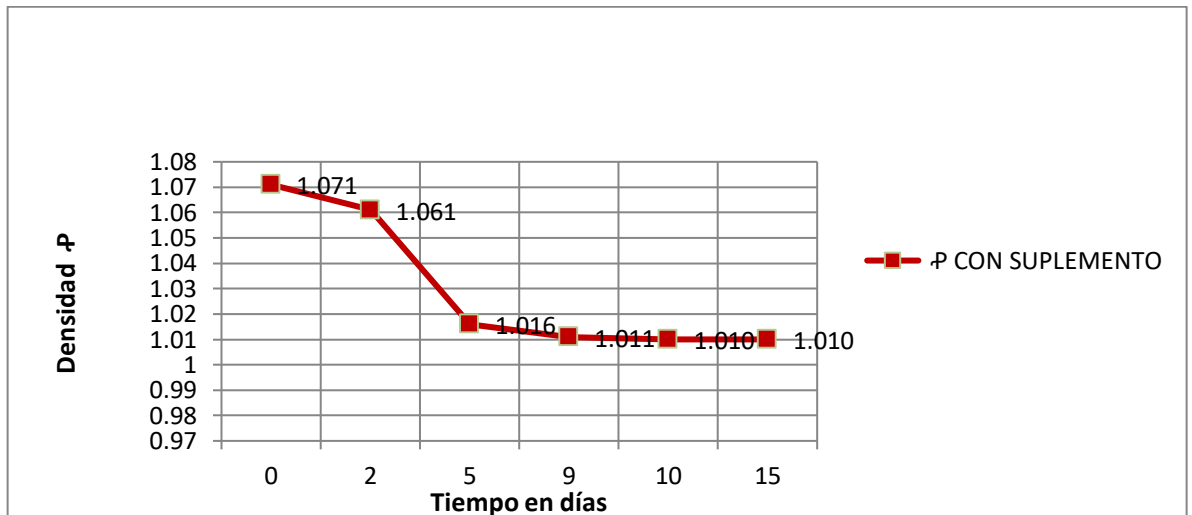


Figura 54: Gráfico de líneas para valores de densidad del grupo “Con suplemento” según tiempo de fermentación en días

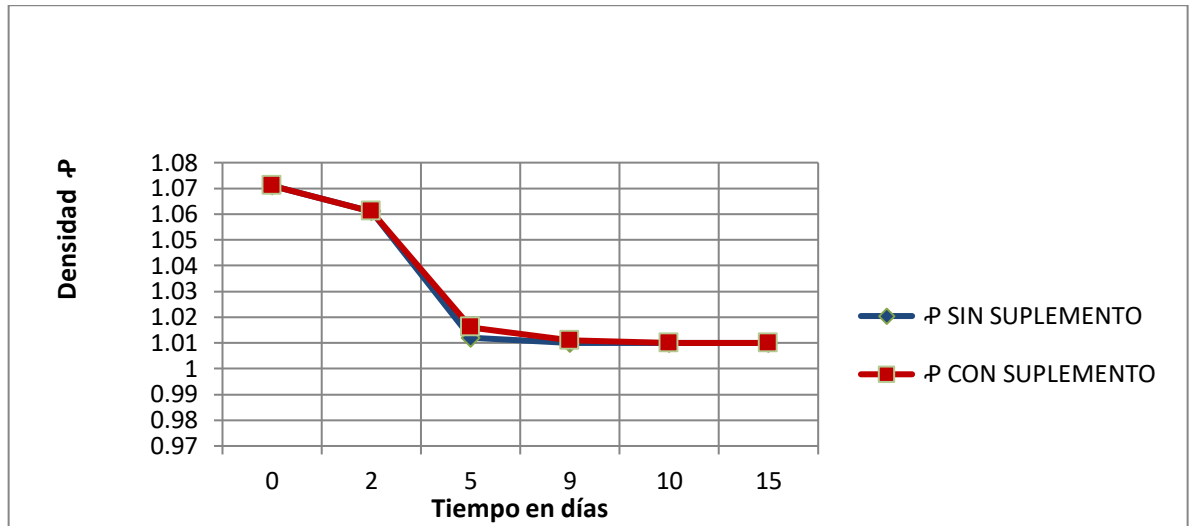


Figura 55: Gráfico de líneas para valores de densidad para ambos grupos según tiempo de fermentación en días

8.4.2) Tablas de campo del ensayo 2: Recuento de células de levadura totales y viables

Tabla 37: Cuadro de campo para conteo de levaduras totales y viables en cámara de Neubauer

CONTEO EN CAMARA NEUBAUER CON TINCION AZUL DE METILENO		
SIN SUPL/CON SUPL		
	N° INCOLORA (VIVAS)	N° AZULES (MUERTAS)
N° DE BOTELLA :		
TOTAL CÉLULAS		
% VIVAS		
% MUERTAS		
Cél/ ml		

Tabla 38: Cuadro organizativo para recuento de células totales en ambos grupos para el día 0, 5, y 10 de fermentación.

Grupo	Células/ml	Día	Unidad Muestreada
Sin suplemento	1,54E+07	0	4
Sin suplemento	1,54E+07	0	9
Sin suplemento	1,54E+07	0	13
Sin suplemento	8,32E+06	5	4
Sin suplemento	2,80E+07	5	9
Sin suplemento	1,38E+07	5	13
Sin suplemento	2,27E+07	10	4
Sin suplemento	2,11E+07	10	9
Sin suplemento	1,86E+07	10	13
Con suplemento	1,54E+07	0	5
Con suplemento	1,54E+07	0	9
Con suplemento	1,54E+07	0	18
Con suplemento	1,92E+07	5	5
Con suplemento	6,72E+06	5	9
Con suplemento	2,14E+07	5	18
Con suplemento	1,06E+07	10	5
Con suplemento	8,32E+06	10	9
Con suplemento	1,31E+07	10	18

8.4.3) Tablas de campo para el ensayo 3: Desarrollo de curva de fermentación por pérdida de peso

Tabla 39: Tabla de campo para registro de pesos diarios en el grupo "Sin suplemento"

SIN SUPL.	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8	DÍA 9	DÍA 10	DÍA 11	DÍA 12	DÍA 13	DÍA 14
	5/9/2022	6/9/2022	7/9/2022	8/9/2022	9/9/2022	10/9/2022	11/9/2022	12/9/2022	13/9/2022	14/9/2022	15/9/2022	16/9/2022	17/9/2022	18/9/2022	19/9/2022
T1	247,04	247,14	240,61	237,39	235,57	234,49		232,87	232,17	231,55		230,98			229,98
T2	258,46	258,45	251,21	247,96	246,07	244,89		243,57	243,10	242,49		241,93			240,93
T3	248,55	248,52	241,84	238,71	236,52	234,78		233,61	233,14	232,12		231,33			230,34
T4	259,09	259,14	252,31	249,20	247,45	239,60		238,26	237,73	237,21		231,75			230,75
T5	264,62	242,70	236,57	232,93	231,16	229,45		228,74	228,36	227,45		226,69			225,66
T6	264,61	264,65	257,34	254,21	252,36	251,11		249,35	248,54	247,82		246,98			245,97
T7	266,06	266,08	258,64	255,30	253,28	251,98		250,24	249,67	249,15		248,56			247,58
T8	264,46	264,47	257,00	253,57	251,63	250,48		249,24	248,73	248,18		247,60			246,62
T9	239,24	239,24	232,82	229,89	228,40	221,76		220,97	220,58	219,21		214,04			213,03
T10	267,84	267,71	260,16	256,84	254,87	253,61		251,82	251,07	250,52		249,91			248,89
T11	267,23	267,13	259,82	256,52	254,11	252,07		250,63	249,87	248,61		247,94			246,95
T12	267,32	267,08	259,71	256,44	254,43	253,20		251,62	251,01	250,43		249,86			248,89
T13	239,92	239,91	233,83	231,04	229,52	223,20		222,20	221,72	221,20		214,97			213,95
T14	260,29	259,86	252,38	249,27	247,47	246,34		244,97	244,38	243,85		243,24			242,28
T15	261,80	261,74	254,55	251,45	249,67	248,53		246,86	246,09	245,43		244,78			243,79
T16	263,80	263,66	256,43	252,84	250,69	249,36		247,51	246,74	246,17		245,57			244,57
T17	272,01	271,92	264,78	261,37	259,47	258,28		256,51	255,78	255,11		254,48			253,46
T18	266,94	266,60	259,17	255,79	253,94	252,87		251,50	250,96	250,39		249,79			248,78
T19	262,09	261,89	254,75	251,41	248,46	247,14		245,97	245,54	245,12		244,42			243,41
T20	261,29	261,21	254,33	250,99	249,13	247,98		246,41	245,88	245,35		244,75			243,76

Tabla 40: Tabla de campo para registro de pesos diarios en el grupo “Con suplemento”

CON SUPL.	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8	DÍA 9	DÍA 10	DÍA 11	DÍA 12	DÍA 13	DÍA 14
	5/9/2022	6/9/2022	7/9/2022	8/9/2022	9/9/2022	10/9/2022	11/9/2022	12/9/2022	13/9/2022	14/9/2022	15/9/2022	16/9/2022	17/9/2022	18/9/2022	19/9/2022
TT1	265,09	265,25	258,29	255,12	253,37	252,48		251,32	250,86	250,29		249,70			248,68
TT2	267,32	267,26	260,32	257,14	255,46	254,56		253,24	252,74	252,15		251,53			250,52
TT3	266,96	267,04	260,08	256,68	255,02	254,17		253,04	252,54	251,97		251,36			250,32
TT4	268,51	268,70	261,79	258,56	255,99	255,52		254,70	254,30	253,64		252,90			251,85
TT5	271,53	271,59	264,07	261,04	259,39	252,44		251,57	251,15	250,64		244,88			243,88
TT6	266,07	266,03	258,68	255,54	253,89	253,07		252,07	251,64	251,11		250,51			249,53
TT7	266,39	266,37	259,10	255,97	254,30	253,47		252,46	251,99	251,43		250,85			249,86
TT8	280,86	280,83	273,46	270,14	267,04	265,48		264,67	264,27	263,62		262,97			261,91
TT9	273,51	273,65	266,14	263,20	261,62	254,59		253,68	253,22	252,70		247,16			246,15
TT10	262,90	262,76	255,50	252,53	250,98	250,12		249,05	248,59	248,03		247,43			246,42
TT11	264,40	264,29	256,96	253,89	252,36	251,52		250,51	250,06	249,47		248,88			247,90
TT12	259,64	259,42	252,54	249,65	248,14	247,22		245,98	245,45	244,87		244,25			243,22
TT13	258,41	258,46	251,63	248,75	247,20	246,28		244,98	244,42	243,83		243,21			242,19
TT14	253,75	253,60	246,80	243,93	242,40	241,52		240,30	239,80	239,31		238,72			237,73
TT15	267,07	267,15	259,94	256,85	255,19	254,31		253,21	252,74	252,16		251,54			250,52
TT16	263,49	263,26	256,27	253,20	250,74	249,48		248,68	248,29	247,55		246,83			245,78
TT17	259,29	259,24	252,64	249,51	247,85	246,95		245,66	245,14	244,56		243,91			242,87
TT18	263,61	263,62	256,73	253,62	251,97	245,68		244,70	244,27	243,70		237,36			236,35
TT19	271,94	271,98	264,87	261,55	259,79	258,89		257,73	257,24	256,64		256,01			254,99
TT20	263,61	263,65	256,80	253,53	251,86	251,00		249,87	249,39	248,83		248,21			247,19