



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería de Ingeniería Química

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TASA DE INOCULACIÓN CON REUTILIZACIÓN DE
LEVADURA EN LA ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANAL TIPO LAGER A ESCALA
LABORATORIO**

Juan Diego García Escalante

Asesorado por Inga. Hilda Piedad Palma Ramos

Guatemala, enero de 2023

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TASA DE INOCULACIÓN CON REUTILIZACIÓN DE
LEVADURA EN LA ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANAL TIPO LAGER A ESCALA
LABORATORIO**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA
POR

JUAN DIEGO GARCÍA ESCALANTE
ASESORADO POR INGA. HILDA PIEDAD PALMA RAMOS

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

GUATEMALA, ENERO DE 2023

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANA	Inga. Aurelia Anabela Cordova Estrada
VOCAL I	Ing. José Francisco Gómez Rivera
VOCAL II	Ing. Mario Renato Escobedo Martínez
VOCAL III	Ing. José Milton de León Bran
VOCAL IV	Br. Kevin Vladimir Armando Cruz Lorente
VOCAL V	Br. Fernando José Paz González
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANA	Inga. Aurelia Anabela Cordova Estrada
EXAMINADOR	Ing. Jorge Emilio Godínez Lemus
EXAMINADORA	Inga. Ana Rufina Herrera Soto
EXAMINADOR	Ing. Cesar Ariel Villela Rodas
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TASA DE INOCULACIÓN CON REUTILIZACIÓN DE LEVADURA EN LA ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANAL TIPO LAGER A ESCALA LABORATORIO

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 8 de abril de 2021.

A handwritten signature in black ink, enclosed within a circular scribble. The signature appears to read 'J.D.G.' followed by 'Escalante' and 'García'.

Juan Diego García Escalante

Guatemala 13 de julio de 2022

Ingeniero
WILLIAMS GUILLERMO ÁLVAREZ MEJÍA
DIRECTOR
Escuela Ingeniería Química
Presente.

Estimado Ingeniero Álvarez:

Le saludo cordialmente, deseándole éxitos en sus actividades. Por medio de la presente hago constar que he revisado y aprobado el Informe Final del trabajo de graduación titulado: **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TASA DE INOCULACIÓN CON REUTILIZACIÓN DE LEVADURA EN LA ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANAL TIPO LAGER A ESCALA LABORATORIO”**, elaborado por el estudiante de la carrera de Ingeniería Química, Juan Diego García Escalante, quien se identifica con el registro académico 2015-03751 y con el CUI 3025 03188 0103.

Agradeciendo la atención a la presente, me suscribo de usted,

Atentamente,



Hilda Piedad Palma Ramos
ASESORA

Ingeniera Química
Colegiado activo no. 453

INGA. HILDA PALMA DE MARTINI
COLEGIADO No. 453



Guatemala, 05 de octubre de 2022.
Ref. EIQ.TG-IF.026.2022.

Ingeniero
Williams Guillermo Álvarez Mejía
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Álvarez:

Como consta en el registro de evaluación, correlativo **086-2020**, le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

INFORME FINAL

Solicitado por el estudiante universitario: **Juan Diego García Escalante.**

Identificado con número de carné: **3025031880103.**

Identificado con registro académico: **201503751.**

Previo a optar al título de la carrera: **Ingeniería Química.**

En la modalidad: **Informe Final, Seminario de Investigación.**

Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TASA DE INOCULACIÓN CON REUTILIZACIÓN DE LEVADURA EN LA ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANAL TIPO LAGER A ESCALA LABORATORIO

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por:

Hilda Piedad Palma Ramos de Martini, profesional de la Ingeniería Química

Habiendo encontrado el referido trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"


Pablo Enrique Morales
profesional de la Ingeniería Química
COORDINADOR DE TERNAS
Tribunal de Revisión
Trabajo de Graduación



C.c.: archivo



LNG.DIRECTOR.0241.EIQ.2022

El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor, el visto bueno del Coordinador de Área y aprobación del área de lingüística del trabajo de graduación titulado: **EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TASA DE INOCULACIÓN CON REUTILIZACIÓN DE LEVADURA EN LA ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANAL TIPO LAGER A ESCALA LABORATORIO**, presentado por: **Juan Diego García Escalante**, procedo con el Aval del mismo, ya que cumple con los requisitos normados por la Facultad de Ingeniería.

“Id y Enseñad a Todos”


Ing. Williams G. Álvarez Mejía, M.U.I.E.
DIRECCIÓN
Escuela de Ingeniería Química



Guatemala, noviembre de 2022.



Decanato
Facultad de Ingeniería
24189101- 24189102
secretariadecanato@ingenieria.usac.edu.gt

LNG.DECANATO.OI.111.2023

La Decana de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al Trabajo de Graduación titulado: **EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TASA DE INOCULACIÓN CON REUTILIZACIÓN DE LEVADURA EN LA ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANAL TIPO LAGER A ESCALA LABORATORIO**, presentado por: **Juan Diego García Escalante**, después de haber culminado las revisiones previas bajo la responsabilidad de las instancias correspondientes, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE:

Inga. Aurelia Anabela Cordova Estrada

Decana



Guatemala, enero de 2023

AACE/gaoc

ACTO QUE DEDICO A:

Dios	Por darme fuerza en los momentos adversos.
Mi madre	Claudia Patricia Escalante, mi maestra, motor y admiración en la vida.
Mi padre	Juan Luis García, mi inspiración y apoyo.
Mi hermana	Juliettha García, mi ejemplo y amiga de toda la vida
Mi abuela	Claudia del Rosario Cruz, (q. e. p. d.), mi otra mamá y la persona siempre presente en mi vida.
Mi abuelo	Mario Escalante, (q. e. p. d.), ejemplo de vida.
Mi novia	Cecilia Monroy, por el apoyo incondicional y compartir felicidad conmigo.

AGRADECIMIENTOS A:

Mis padres	Por el apoyo incondicional ante cualquier circunstancia y guiarme por el buen camino.
Mi hermana	Por enseñarme tanto académica y profesionalmente.
Mi abuela	(q. e. p. d.), por todo el amor y apoyo que me brindó durante mi vida.
Mi abuelo	(q. e. p. d.), por proporcionarme transporte y consejos durante mi carrera.
Mi novia	Por siempre apoyarme, escucharme, ser auténtica y compartir tanta felicidad.
Mis amigos de la universidad	Por toda la ayuda y momentos compartidos.
Universidad de San Carlos de Guatemala	Por abrirme las puertas al estudio profesional.
Facultad de Ingeniería	Por enseñarme los conocimientos que la bella carrera de la ingeniería implica.

Compañeros de trabajo

A todo el equipo, por brindar apoyo y enseñarme conocimientos laborales y profesionales.

**El Príncipe Gris –
Cervecería Artesanal**

Por abrirme sus puertas y permitir que me desarrollara profesionalmente.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	V
LISTA DE SÍMBOLOS	VII
GLOSARIO	IX
RESUMEN	XI
OBJETIVOS.....	XIII
HIPÓTESIS.....	XV
INTRODUCCIÓN	XVII
1. ANTECEDENTES	1
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Historia de la levadura	5
2.2. Biología de la levadura	6
2.2.1. Metabolismo	6
2.3. Fermentación	6
2.3.1. Desarrollo de la fermentación	7
2.3.1.1. Etapa de adaptación (<i>lag</i>).....	7
2.3.1.2. Etapa exponencial	7
2.3.1.3. Etapa estacionaria	8
2.3.2. Sistemas de fermentación	8
2.3.3. Temperatura de fermentación.....	9
2.3.4. Gravedad específica.....	9
2.3.5. Fin de la fermentación	10
2.3.5.1. Atenuación.....	10
2.4. Propagación y manejo de la levadura	11

2.4.1.	Etapa de propagación	11
2.4.1.1.	Tasa de inoculación	11
2.4.1.2.	Propagación de levadura.....	12
2.4.1.3.	Propagación de levadura deshidratada.....	12
2.4.1.4.	Recolección de levadura	12
2.4.1.5.	Reutilización de levadura	13
2.4.1.6.	Viabilidad.....	13
3.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	15
3.1.	Variables	15
3.1.1.	Variables independientes	15
3.1.2.	Variables dependientes	16
3.2.	Delimitación del campo de estudio.....	16
3.3.	Recursos humanos disponibles	17
3.4.	Recursos materiales disponibles (equipo, cristalería y reactivos).....	17
3.5.	Técnica cualitativa y cuantitativa	19
3.5.1.	Procedimiento para propagación de levadura en laboratorio	20
3.5.2.	Procedimiento para el conteo de células con azul de metileno.....	20
3.5.3.	Determinación de densidad celular	21
3.5.4.	Determinación de viabilidad	21
3.5.5.	Determinación de volumen a inocular según tasa de inoculación buscada	22
3.5.6.	Procedimiento para inoculación de muestras.....	22
3.5.7.	Procedimiento para medición de pH	23

3.5.8.	Procedimiento para medición de gravedad específica.....	23
3.5.9.	Determinación de atenuación aparente	23
3.6.	Recolección, ordenado y procesamiento de la información.....	24
3.7.	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información	27
3.8.	Análisis estadístico	30
3.8.1.	Medidas de tendencia central	30
3.8.2.	Medidas de dispersión.....	30
3.8.3.	Análisis de varianza.....	31
3.8.3.1.	Tratamientos.....	31
3.8.3.2.	Repeticiones.....	31
3.8.4.	ANOVA	31
3.9.	Plan de análisis de resultados	33
3.9.1.	Métodos y modelos según tipo de variable.....	33
3.9.2.	Programas por utilizar para análisis de datos	33
3.9.2.1.	Microsoft Word 2019.....	33
3.9.2.2.	Microsoft Excel 2019	34
4.	RESULTADOS	35
5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	41
	CONCLUSIONES	45
	RECOMENDACIONES	47
	BIBLIOGRAFÍA.....	49
	APÉNDICES	51

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Gravedad específica en función del tiempo de fermentación.....	35
2.	Atenuación aparente en función del tiempo de fermentación.....	36
3.	Potencial de hidrógeno en función del tiempo de fermentación	37
4.	Densidad celular en suspensión en función del tiempo de fermentación	38
5.	Viabilidad en función del tiempo de fermentación	39

TABLAS

I.	Variables independientes e instrumentos de medición	15
II.	Variables dependientes e instrumentos de medición	16
III.	Formato para conteo de células en crema para inoculación de muestras.....	24
IV.	Formato de propiedades fisicoquímicas de mosto a 20 °C	25
V.	Formato de gravedad específica de muestras a 20 °C	25
VI.	Formato de pH de muestras a 20 °C.....	26
VII.	Formato de conteo de células totales en muestras	26
VIII.	Formato de conteo de células totales en muestras	27
IX.	Volumen de crema de levadura para inoculación para 5L de mosto....	27
X.	Atenuación aparente de muestras a 20 °C.....	28
XI.	Densidad celular y viabilidad de las muestras.....	29
XII.	Tabla ANOVA.....	32

XIII. Resumen de análisis de varianza para gravedad específica de
muestras40

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
A	Atenuación (%)
Y	Células contadas
DY	Células muertas
S	Cepa de levadura
py	Densidad celular (células//mL)
DF	Factor de dilución
SG	Gravedad específica (°P)
OG	Gravedad específica original (°P)
PR	Tasa de inoculación (células viables/ mL)
T	Temperatura (°C)
pH	Potencial de hidrógeno
Vi	Viabilidad (%)
Vc	Volumen de crema de levadura (mL)
V	Volumen de mosto (mL)

GLOSARIO

Atenuación aparente	Medida porcentual de qué tan completa ha sido la fermentación del mosto.
Grado plato	Escala de concentración porcentual en masa de extracto procedente de una maceración cervecera.
Gravedad específica	La gravedad específica es la razón de la densidad de una sustancia a la densidad del agua a 4 °C.
Gravedad final	Gravedad específica de la cerveza al final de la fermentación.
Gravedad original	Gravedad específica inicial del mosto previo a la inoculación.
Inoculación	Introducción de un microorganismo en un medio en el cual crecerá y se reproducirá.
Levadura lager	Levadura de fermentación baja perteneciente a la especie <i>Saccharomyces pastorianus</i> .
Mosto	Extracto líquido de la maceración de malta.

pH	Potencial de hidrógeno expresado como el logaritmo negativo de hidronio.
Tasa de inoculación	Concentración de células viables por inocular por unidad de volumen de medio de cultivo.
Viabilidad	Porcentaje de células vivas respecto a las células totales.
Vitalidad	Estado de salud cualitativo de una célula.

RESUMEN

En el presente trabajo de graduación se evaluó el efecto de la tasa de inoculación por reutilización de levadura para la fermentación de cerveza artesanal de tipo lager.

Para este estudio se realizaron variaciones en la tasa de inoculación de 5, 10, 15, 20 y 25 millones de células viables por mililitro, proviniendo todas las inoculaciones del mismo cultivo madre. Se mantuvo como constante la gravedad específica original del mosto y la temperatura de fermentación en un ambiente controlado. Se midió pH y gravedad específica diariamente hasta el final de la fermentación, de forma similar se realizaron conteos de células de la levadura durante la fermentación utilizando azul de metileno y un hemocitómetro.

Con los datos recolectados se determinó que la gravedad específica disminuyó mientras la atenuación aparente aumentó respecto al tiempo de fermentación, siendo las variaciones mayores a mayor tasa de inoculación hasta terminar la fermentación.

Por otra parte, se analizó gráficamente el pH de fermentación para cada tratamiento sin embargo no se observó una tendencia clara respecto al tiempo de fermentación. Finalmente, la densidad celular alcanzó un pico superior a mayor tasa de inoculación y la viabilidad celular fue mayor para la tasa de 15 millones de células por mililitro.

OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto de la tasa de inoculación de crema de levadura reutilizada para la elaboración de una cerveza artesanal tipo lager.

Específicos

1. Determinar la gravedad específica para cada tasa de inoculación respecto al tiempo de fermentación.
2. Calcular la atenuación aparente para cada tasa de inoculación respecto al tiempo de fermentación.
3. Analizar el pH de fermentación para la variación en la tasa de inoculación de las muestras.
4. Caracterizar la densidad celular en suspensión para cada tasa de inoculación respecto al tiempo de fermentación.
5. Valorar la viabilidad celular en suspensión respecto al tiempo de fermentación según la tasa de inoculación correspondiente.

HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo

La tasa de inoculación en la reutilización de levadura tipo lager para la elaboración de cerveza artesanal afecta el comportamiento de la gravedad específica durante la fermentación.

INTRODUCCIÓN

La cerveza artesanal es un producto que se encuentra en auge en el mercado guatemalteco, y para la elaboración de este producto es muy conservador el método de reutilización de levadura, esto principalmente por el riesgo que implica la reutilización de biomasa de levadura en la producción de cerveza a nivel artesanal. Algunas causas que han mantenido esta problemática son, la poca experimentación dentro de las industrias artesanales cerveceras guatemaltecas y la falta de personal capacitado para llevar a cabo dichas investigaciones.

Al observar esta problemática, se realizó la presente investigación, se exploró la técnica de reutilización de levadura a partir de un factor que ha sido estudiado internacionalmente, la tasa de inoculación. Dicha investigación se realizó en las instalaciones de la cervecería artesanal El Príncipe Gris, S.A. y aportó información valiosa para la utilización de las materias primas y de igual forma de algunos efluentes.

Diversos estudios se han hecho sobre la tasa de inoculación, pero, no hay información tan específica que permita una comparación directa en Guatemala en la industria cervecera a nivel artesanal. Esto se debe a poca exploración local y el limitado alcance que tienen estas empresas en tecnología que permita mayor cobertura de los análisis objetivos de las propiedades de una cerveza de calidad.

Para la experimentación se evaluaron 5 tasas de inoculación, iniciando desde 5 hasta 25 millones de células viables por mililitro en intervalos uniformes. Manteniendo como constantes otras variables que pueden afectar la

fermentación, tales como método de inoculación, cepa de levadura, temperatura de fermentación y gravedad específica original del mosto.

Por lo que este estudio busca evaluar el efecto de la tasa de inoculación con reutilización de levadura en la elaboración de cerveza artesanal tipo lager. En esta evaluación se realizarán mediciones fisicoquímicas de pH y gravedad específica. De igual forma, apoyándose de la microbiología, se realizarán conteos de células de levadura. Dichas mediciones permitirán el cálculo matemático de la atenuación aparente, densidad celular y viabilidad, con que se podrá analizar gráfica o estadísticamente estas variables.

1. ANTECEDENTES

A lo largo de la historia la cerveza ha sido una bebida muy estudiada durante cientos años, sin embargo, hasta el descubrimiento de la existencia de la levadura por parte de Louis Pasteur y la relevancia rol dentro de la fermentación fue que se dio lugar al estudio de este mundo microscópico. Diversos estudios han destacado en el tema de fermentaciones y la cantidad de inóculo relacionado a los efectos en la fermentación.

En el artículo “The Effect of Pitching Rate on Fermentation and Flavour Compounds in High Gravity Brewing”¹ presentado por, se expone el efecto de la tasa de inoculación en la fermentación y producción de componentes de sabor en mosto de alta gravedad con una levadura tipo lager. Las fermentaciones fueron llevadas a cabo en duplicado utilizando mosto de 16 % masa/volumen y levadura centrifugada en tasas de 10 a 100 millones de células viables/mL y fueron incubados a 10 °C para ser fermentados en frascos estériles. La fermentación fue monitoreada diariamente hasta alcanzar un total del 80 % de azúcares consumidos. El rendimiento de la fermentación fue evaluado mediante el contenido de azúcar y el crecimiento de levadura. Se determinó que a mayores tasas de inoculación la fermentación fue más rápida y con mayores conteos de levadura. La producción de esterres no se vio afectada con excepción del acetato de isoamilo el cual se redujo con el aumento de la tasa de inoculación.

¹ ERTEN, Huseyin; TANGULER Hasan; CAKIROZ, Hanife. *The effect of pitching rate on fermentation and flavour compounds in high gravity brewing*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/j.2050-0416.2007.tb00259.x>. Consulta: 16 de febrero de 2021.

Se presentó el artículo titulado “Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavor”², en este se estudiaron cinco tasas de inoculación a escala laboratorio para investigar el efecto fisiológico y calidad de la cerveza utilizando mosto estéril de 15°P aireado y cada tratamiento en duplicado. La viabilidad y densidad celular fue evaluada por citometría. Los resultados demostraron que la velocidad de fermentación aumentó significativamente y el crecimiento neto de levadura disminuyó con el aumento de la tasa de inoculación.

En el artículo “The effect of pitching rate on fermentation, maturation and flavour compounds of beer produced on an industrial scale”³. Esta investigación tuvo como fin determinar el efecto del número inicial de células en el mosto para el proceso de fermentación, maduración y contenido de compuestos volátiles en la cerveza de igual forma la viabilidad y vitalidad de la biomasa de levadura. Las experimentaciones fueron llevadas a cabo a escala industrial en tanques cilindro-cónicos de 3 800 hL, las tasas de inoculación fueron de 5,7 y 9 millones de células viables por mililitro. La experimentación demostró que la cantidad de inóculo tiene un impacto significativo en el transcurso de la fermentación y cambios metabólicos. Con el aumento de este inóculo inicial el contenido de ésteres y alcoholes superiores aumentó. Estos cambios afectan la calidad de la cerveza.

En el artículo titulado “Rehydration of Active Dry Brewing Yeast and its Effect on Cell Viability”⁴, publicado en el 2011, tuvo como objetivo el estudio del impacto de la rehidratación de levadura en condiciones de viabilidad de levadura. El

² VERBELEN, Robert. *Rehydration of active dry brewing yeast and its effect on cell viability*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19018524/#:~:text=The%20fermentation%20rate%20increased%20significantly,vitality%20of%20the%20yeast%20population>. Consulta: 16 de febrero de 2021.

³ KUCHARCZYK, Krzysztof; TUSZYŃSKI, Tadeusz. *The effect of pitching rate on fermentation, maturation and flavour compounds of beer produced on an industrial scale*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jib.242>. Consulta: 16 de febrero de 2021.

⁴ SMART, Katherine; FISCHBORN, Tobias. *The effect of pitching rate on fermentation, maturation and flavour compounds of beer produced on an industrial scale*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00482.x>. Consulta: 16 de febrero de 2021.

estudio se realizó con tres cepas de levadura seca activada de diferentes industrias de elaboración de cerveza. Cada cepa fue rehidratada utilizando una serie de parámetros que fueron monitoreados. La viabilidad y densidad celular fue determinada por medio de microscopía. La levadura seca activada demostró tener una menor viabilidad que las mismas cepas no secas, lo cual conlleva a alterar el rendimiento de la fermentación, además es importante que la viabilidad de la activación de levadura seca sea maximizada antes de ser inoculada en el tanque de fermentación y que factores como una rehidratación incompleta y temperatura de rehidratación pueden incurrir en una menor viabilidad.

Se elaboró un artículo titulado “Characteristics of High Cell Density Fermentations with Different Lager Yeast Strains”⁵, donde se expuso una caracterización con baja densidad de inóculo inicial y una caracterización con alta densidad de inóculo inicial, el crecimiento neto de levadura entre estos tratamientos fue similar, y con mayor inóculo inicial se observaron menores viabilidades y tiempos de fermentación.

Este experimento fue llevado en triplicado en mosto estéril de 15 °P. La viabilidad fue medida mediante un hemocitómetro. Estos resultados llevaron a establecer que sí existe una dependencia en el rendimiento de fermentación por parte de la cantidad de inóculo inicial, estas variaciones alteran la producción de sabores y por ende la calidad de la cerveza.

⁵ VERBELEN, Pieter; VAN MULDER, Sebastiaan; SAISON, Daan; VAN LAERE, Stijn; DELVAUX, Filip; DELVAUX, Freddy. *Characteristics of high cell density fermentations with different lager yeast strains*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301536732>. Consulta: 16 de febrero de 2021.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Historia de la levadura

La habilidad de levadura *Saccharomyces* para generar etanol en la producción de bebidas has sido utilizada durante milenios, ya que el consumo de bebidas alcohólicas ha sido una práctica común en todas las civilizaciones, b, el ser humano desconoció de la existencia de la levadura y mucho menos la función en la fermentación. En 1516 cuando en Bavaria se implementó la ley de pureza, haciendo ilegal elaborar cerveza con algo más que agua, cebada malteada y lúpulo, sin saber que la levadura está dentro de esos ingredientes.

En 1680 Anton van Leeuwenhoek fue el primero en observar en un microscopio, que la levadura estaba compuesta de pequeños elementos, sin darse cuenta de que estos elementos estaban vivos. Para el momento se creía que la fermentación era un proceso espontáneo.

En 1789 Antoine-Laurent Lavoisier describió que los azúcares se trasformaban químicamente en dióxido de carbono y etanol, pero sin relacionar a la levadura en este proceso. Fue hasta a mediados de los años 1800 que Louis Pasteur estableció que la levadura era un microorganismo vivo lo cual condujo a relacionar a la levadura con el proceso de fermentación. El aporte de Pasteur puede ser considerado uno de los mayores avances en la historia de la cerveza, porque al aportar a la causa de la fermentación permitió controlar mejor este proceso.

En el laboratorio Carlberg bajo la dirección de Emil Christian Hansen, se aisló la primera cepa lager de levadura la cual se nombró *Saccharomyces carlberggensis* o *Saccharomyces uvarum* (actualmente conocida como *S. pastorianus*).

2.2. Biología de la levadura

La levadura pertenece al reino fungi, siendo esta un organismo unicelular con un diámetro de 5 a 10 micrones. El género *Saccharomyces* involucra a 14 especies, pero, existen dos especies de levadura cervecera: *Saccharomyces cerevisiae* (levadura ale), y *Saccharomyces pastorianus* (levadura lager).

2.2.1. Metabolismo

El metabolismo es la suma de todos los procesos químicos que ocurren dentro de la célula. El metabolismo transformará los nutrientes y producirá subproductos, calor, crecimiento de la célula y proliferación.

Desde la inoculación en el mosto, las células utilizan reservas de glucógeno y oxígeno disponibles para revitalizar sus membranas celulares teniendo como efecto una permeabilidad óptima que les permita el transporte de azúcar y nutrientes. Las células absorben oxígeno y luego seleccionan azúcar y nutrientes del mosto. Inician con los azúcares según orden de simplicidad, siendo los más complejos metabolizados de último, esto ocurre en el siguiente orden: glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y luego maltotriosa.

2.3. Fermentación

En los siguientes incisos se describe el proceso de la fermentación.

2.3.1. Desarrollo de la fermentación

Una vez la levadura es inoculada consume el azúcar del mosto y lo transforma en nuevas células de levadura, etanol, dióxido de carbono y otros subproductos que aportan sabor. Usualmente la fermentación se divide en 3 etapas.

2.3.1.1. Etapa de adaptación (*lag*)

Mientras la levadura comienza a asimilar el ambiente luego de ser inoculada comienza la etapa de adaptación o *lag*. Esta etapa, que suele durar hasta 15 horas desde la inoculación, las células comienzan a metabolizar diferentes nutrientes para la propagación.

A pesar de que no se observe producción de dióxido de carbono, esta etapa es muy importante para generar nuevas células saludables. La tasa de inoculación también tiene un importante papel ya que una tasa muy alta puede reducir el tiempo de esta etapa y no disponer de levadura saludable para el final de la fermentación.

2.3.1.2. Etapa exponencial

Esta etapa inicia cuando los azúcares en la solución se procesan en dióxido de carbono por parte de la levadura. Durante esta etapa el conteo de células comienza a incrementar rápidamente, la levadura produce etanol y otros compuestos de sabor.

La levadura comienza a producir grandes cantidades de dióxido de carbono y forma una delgada espuma en la superficie de la cerveza mientras que los

azúcares comienzan a ser rápidamente consumidos y como consecuencia la gravedad específica comienza a disminuir.

2.3.1.3. Etapa estacionaria

En esta etapa la propagación de la levadura comienza a disminuir. La levadura metabolizó los azúcares fermentables y ya produjo la mayoría de sabor y aroma. En este momento se le denomina “verde” a la cerveza porque aún tiene compuestos que se asocian a una cerveza que no ha alcanzado un balance de sabores. La cerveza madura en esta etapa, el flóculo comienza a descender y una práctica común es disminuir la temperatura para favorecer el descenso del flóculo.

2.3.2. Sistemas de fermentación

Es posible fermentar en cualquier contenedor, desde contenedores plásticos de bajo volumen, hasta grandes fermentadores cilindro-cónicos de alta tecnología. Cada sistema de fermentación dará diferentes resultados, unos más marcados que otros dependiendo del caso.

A pequeña escala se suelen usar cubetas plásticas o contenedores de vidrio, estos últimos son preferibles porque permiten mantenerlos libres de contaminaciones de una manera más sencilla.

Históricamente los cerveceros han usado fermentadores de madera abiertos y fermentadores de cobre. Posteriormente migraron a fermentadores de acero inoxidable abiertos a la atmósfera, porque en estos era más fácil la limpieza y sanitización.

2.3.3. Temperatura de fermentación

La temperatura de fermentación adecuada dependerá del tipo de cepa de levadura, el tipo de cerveza y los sabores buscados. Usualmente las levaduras tipo ale fermentan a 20 °C y las levaduras tipo lager a 10 °C. De igual forma, no hay un parámetro estricto con respecto de a qué temperatura debe fermentar, dependerá de los factores mencionados. Las cepas ale se propagan más rápido a 32 °C mientras que las cepas lager a 27 °C, pero a estas temperaturas, aunque sea más rápido, se pueden crear sabores no deseados.

La temperatura afecta directamente el crecimiento de la levadura. A mayores temperaturas la levadura se reproduce en mayor cantidad.

2.3.4. Gravedad específica

La gravedad específica es la razón de la densidad de una sustancia a la densidad del agua a 4 °C, por esta razón esta es una medida adimensional, debido a que durante la fermentación la levadura es capaz de metabolizar los azúcares en etanol y dióxido de carbono, la gravedad específica disminuye durante el proceso y por lo tanto permite monitorear la fermentación.

Para la medición de densidad se utilizan diferentes escalas, en la industria de elaboración de vinos es muy usado los grados brix. Por otra parte, en la industria cervecera son más utilizados los grados plato, los cuales se definen como la cantidad de gramos de extracto seco de mosto original en 100 gramos de dicho mosto a 20 °C.

2.3.5. Fin de la fermentación

En el subtítulo 2.3.5.1., se describe y detalla el proceso del fin de la fermentación.

2.3.5.1. Atenuación

La atenuación o fermentabilidad es la medida de qué tan completa ha sido la fermentación del mosto por parte de la levadura, es usualmente expresada de forma porcentual. Para calcular la atenuación se monitorea la gravedad específica del mosto, con un hidrómetro o una herramienta capaz de medir densidad. Mientras más azúcares tiene el mosto mayor será la densidad de la solución y conforme la levadura consume estos azúcares la densidad irá disminuyendo.

Históricamente diferentes industrias han usado diversas escalas de medición, como los grados Plato para la industria cervecera o los grados Brix para la industria de elaboración de vino. Cualquier escala es aceptable mientras se mantenga consistencia en las mediciones antes y durante la fermentación.

Una vez la gravedad específica se mantiene constante durante tres días consecutivos, la fermentación prácticamente está completa.

La atenuación aparente se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Atenuación aparente} = \frac{\text{Gravedad original} - \text{Gravedad final}}{\text{Gravedad original} - \text{Gravedad del agua}} * 100$$

Esta atenuación es nombrada atenuación aparente porque el alcohol que es menos denso que el agua presenta ciertos efectos en las lecturas posteriores a la fermentación. Para obtener la verdadera atenuación sería necesario remover ese alcohol y sustituirlo con agua. Por las complicaciones que implica esto, es más utilizada la atenuación aparente.

Para una fermentación cervecera es poco común que se consuma la totalidad los azúcares, ya que el mosto es una mezcla compleja que contiene compuestos no fermentables. No todas las levaduras pueden fermentar la maltotriosa. El rango usual de atenuación es de 65 a 85 %. Por otra parte, los vinos suelen alcanzar una atenuación del 100 % porque presentan mayores cantidades de azúcares simples fermentables.

2.4. Propagación y manejo de la levadura

Para llevar a cabo la reutilización de levadura es necesario tener una propagación y manejo adecuado para evitar posibles contaminaciones que provoquen una mutación en la levadura.

2.4.1. Etapa de propagación

La etapa de propagación consiste en aumentar el número de células totales en el cultivo a partir de la tasa de inoculación inicial.

2.4.1.1. Tasa de inoculación

En términos de fermentación una de las mediciones más importantes es la tasa de inoculación. En general una baja tasa de inoculación afecta más al sabor,

mientras que una alta tasa afecta la salud de las futuras generaciones de levadura. De igual forma ambos extremos pueden afectar una fermentación ideal.

La levadura deshidratada suele contener de 7 a 20 mil millones de células por gramo, dependiendo de la cepa. Mientras que la reutilización de levadura dependerá y serán necesarias técnicas de hemocitometría para establecer la cantidad de células y células viables por mililitro.

2.4.1.2. Propagación de levadura

Durante la propagación de levadura los resultados pueden verse afectados por las condiciones sanitarias y la salud de la levadura. Para la propagación de levadura hay cuatro factores que influyen: los nutrientes, la temperatura, azúcares y el pH. Un rango adecuado de pH es entre 4 y 6. El azúcar inicial debe ser principalmente maltosa, y se deben mantener las condiciones sanitarias al máximo.

2.4.1.3. Propagación de levadura deshidratada

Rehidratar la levadura deshidratada antes de inocularla es un paso importante, con una temperatura y tiempo de propagación no adecuado más de la mitad de la levadura deshidratada morirá. Y si este paso no se realiza con la sanitización adecuada se pueden introducir bacterias que afecten la fermentación e inocuidad del producto.

2.4.1.4. Recolección de levadura

Existen dos lugares donde se puede recolectar, el fondo y la cima del fermentador. Toda la levadura eventualmente floculará e irá al fondo del

fermentador, con suficiente tiempo. La levadura de floculación temprana contiene más cantidad de células muertas y sedimento.

Las cepas de levadura tipo Ale usualmente son conocidas como levadura de fermentación alta. Durante la fermentación la superficie hidrofóbica de la levadura causa que esta flocule y se adhiera al dióxido de carbono y suba a la superficie de la cerveza. Antiguamente, los cerveceros recolectaban desde arriba y esto fue lo que permitió reutilizar la levadura durante cientos de años.

Por la tecnología actual de tanques cilindro cónicos, la recolección desde el fondo es la práctica más común. Esta es una levadura menos saludable, debido a que se mezcla con levadura muerta, sedimento y bacterias.

Cuando se recolecta levadura desde el fondo, es importante no utilizar la capa más profunda del tanque, porque esta tiene una gran cantidad de levadura no saludable que puede afectar a la propagación de futuras generaciones.

2.4.1.5. Reutilización de levadura

La reutilización de levadura es una práctica común, que requiere una buena recolección y un consistente conteo de levaduras. Cuando esta es llevada a cabo correctamente hasta cinco generaciones se pueden llegar a obtener a partir de una cepa madre para una fermentación de la misma calidad.

2.4.1.6. Viabilidad

La viabilidad se refiere a la cantidad de levadura que está viva en una población. Si toda la levadura está viva tendrá un 100 % de viabilidad. Para la reutilización de levadura se recomienda utilizar levadura con al menos un 90 %

de viabilidad. Este parámetro no indica que tan saludable está la levadura solamente la relación porcentual de levadura viva.

El método más aceptado para la medición de viabilidad es el conteo con azul de metileno, sin embargo, porcentajes menores al 90 % no presentan mediciones tan consistentes. Otros métodos que reducen errores son el uso de azul de metileno alcalino y violeta para una penetración del colorante más rápida en la célula.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Variables

En este apartado se describen las variables utilizadas en la evaluación del efecto de la tasa de inoculación con reutilización de levadura a escala laboratorio, se utilizó cinco tasas de inoculación en triplicado para gravedad específica y pH mientras que los conteos de levadura fueron en duplicado.

3.1.1. Variables independientes

Las variables independientes por tomar en cuenta para la investigación son descritas en la tabla I.

Tabla I. Variables independientes e instrumentos de medición

Parámetro	Símbolo matemático	Dimensional	Instrumento de medición	Constante	Variable
Temperatura	T	°C	Termómetro	X	
Cepa de levadura	S	Adimensional	--	X	
Volumen de mosto a inocular	V	mL	Probeta	X	
Tasa de inoculación	PR	Células viables/ mL	Hemocitómetro		X
Volumen de crema de levadura por agregar	Vc	mL	Micropipeta		X

Fuente: elaboración propia.

3.1.2. Variables dependientes

Las variables dependientes por tomar en cuenta para la investigación son descritas en la tabla II.

Tabla II. Variables dependientes e instrumentos de medición

Parámetro	Símbolo matemático	Dimensional	Instrumento de medición	Constante	Variable
pH	pH	Adimensional	Potenciómetro		X
Gravedad específica	SG	Adimensional	Hidrómetro		X
Atenuación	A	En porcentaje	..		X
Viabilidad	Vi	En porcentaje	Hemocitómetro		X
Densidad celular	py	Células/mL	Hemocitómetro		X

Fuente: elaboración propia.

3.2. Delimitación del campo de estudio

El mosto y la levadura para reutilización fueron proporcionados por la empresa El Príncipe Gris, S.A. Para la fermentación baja de este mosto se propagó la levadura en el laboratorio de control de calidad de dicha empresa y luego se inoculó. La fermentación se llevó a cabo en una refrigeradora con termostato fijado a una temperatura de 12 °C. Dicha refrigeradora tiene capacidad para 5 frascos de 10 L en los cuales se llevó a cabo las variaciones para la experimentación.

La medición de gravedad específica se llevó a cabo con el equipo del laboratorio de control de calidad por medio de un hidrómetro, se monitoreó la gravedad específica del mosto inicial y de la cerveza en fermentación cada 24 horas hasta que esta terminó, realizando tres repeticiones. De igual forma las

mediciones de pH se llevaron a cabo por potenciometría utilizando el equipo disponible en dicha empresa.

Para el control microbiológico de densidad celular y viabilidad se utilizó un hemocitómetro y azul de metileno para la cuantificación de células y células vivas llevado a cabo en el laboratorio de calidad de la empresa El Príncipe Gris, S.A.

3.3. Recursos humanos disponibles

- Investigador: Juan Diego García Escalante
- Asesora: Inga. Hilda Piedad Palma
- Consultor: Maestro cervecero Alejandro Castillo
- Personal operativo de planta de cervecería artesanal El Príncipe Gris, S.A.

3.4. Recursos materiales disponibles (equipo, cristalería y reactivos)

- Materia prima y reactivos
 - Mosto lupulado
 - Azul de metileno
 - Biomasa de levadura de fermentación baja
 - Agua desmineralizada
 - Alcohol etílico al 70 %
- Instrumentos de medición
 - Hemocitómetro
 - Hidrómetro
 - Potenciómetro

- Termómetro
- Micropipeta

- Equipo
 - Microscopio
 - Refrigeradora con termostato
 - Autoclave
 - Mechero
 - Agitador magnético
 - Espátulas de acero inoxidable

- Cristalería
 - *Beackers*
 - Probetas
 - Placas Petri
 - Erlenmeyer
 - Frascos de vidrio

- Materiales auxiliares
 - Lapiceros
 - Papel parafina
 - Papel aluminio
 - *Block* de notas
 - Botas industriales
 - Suministro de aire comprimido
 - Cofia

- Guantes

3.5. Técnica cualitativa y cuantitativa

Las técnicas cuantitativas para la evaluación del efecto de la tasa inoculación en la fermentación de una cerveza artesanal tipo lager se presentan a continuación:

- Para el análisis fisicoquímico se evaluarán los siguientes parámetros
 - Gravedad específica por medio de hidrómetro en el laboratorio de control de calidad de El Príncipe Gris, S. A.
 - pH por medio de potenciometría en el laboratorio de calidad de El Príncipe Gris, S.A.
 - Atenuación aparente a partir de las mediciones de gravedad específica y gravedad original de las muestras de mosto y cerveza durante la fermentación.
- Para el análisis y control microbiológico se evaluarán los siguientes parámetros.
 - Viabilidad por medio de conteo de levaduras utilizando azul de metileno en un hemocitómetro y microscopía. Llevado a cabo en el laboratorio de control de calidad de El Príncipe Gris, S.A.

- Densidad celular por medio de conteo de levaduras utilizando azul de metileno en un hemocitómetro y microscopía. Llevado a cabo en el laboratorio de control de calidad de El Príncipe Gris, S.A.

3.5.1. Procedimiento para propagación de levadura en laboratorio

- Recepción de muestra de biomasa de levadura tipo lager
- Recepción de mosto procesado
- Siembra en placas Petri con medio de agar y mosto
- Incubación a 25 °C durante 48 horas
- Selección de colonias e inoculación en 10mL de mosto de 8 °P, a 20 °C durante 24 horas con aireación y agitación.
- Inoculación de 10 mL utilizados en 100 mL de mosto 8 °P, a 20 °C durante 24 horas con aireación y agitación.
- Inoculación de 100 mL utilizados en 1 000 mL de mosto 12° P, a 20 °C durante 24 horas con aireación y agitación.
- Inoculación de 1 000 mL utilizados en 10 L de mosto 12 °P, a 18 °C durante 48 horas con aireación.
- Inoculación en muestras, con la tasa de inoculación como variable de control.

3.5.2. Procedimiento para el conteo de células con azul de metileno

- Realizar dilución de la muestra a evaluar con agua desmineralizada
- Mezclar 1 mL de muestra diluida con 1 mL de azul de metileno y homogenizar durante 2 minutos.
- Limpiar hemocitómetro.

- Colocar cubre objetos sobre el hemocitómetro.
- Con una micropipeta tomar muestra diluida y adicionar a los canales del hemocitómetro hasta cubrir este, sin colocar un exceso de muestra.
- Colocar con cuidado el hemocitómetro en el microscopio y ajustarlo en el aumento de 400X hasta observar la cuadrícula.
- Realizar conteo de células de levadura en toda la cuadrícula.
- Realizar conteo de levaduras muertas de levadura en toda la cuadrícula, estas se diferenciarán de las muertas por una coloración azul oscuro, ya que las células vivas tienen la capacidad de metabolizar el azul de metileno y no tornarse azul oscuro.

3.5.3. Determinación de densidad celular

Con los datos obtenidos del conteo de levaduras utilizar la siguiente ecuación para la densidad celular:

$$\rho_y = Y * DF * 10^4$$

Donde:

ρ_y : densidad celular de la muestra (células/mL)

Y: células totales contadas (células)

DF: factor de dilución de la muestra (mL de muestra diluida/mL de muestra).

3.5.4. Determinación de viabilidad

Con los datos obtenidos del conteo de levaduras utilizar la siguiente ecuación para el cálculo de viabilidad.

$$Vi = \frac{Y - DY}{Y}$$

Donde:

Vi: viabilidad en porcentaje

Y: células totales contadas (células)

DY: células muertas contadas (células muertas)

3.5.5. Determinación de volumen a inocular según tasa de inoculación buscada

Para el cálculo del volumen a agregar para la inoculación de cada muestra según la tasa de inoculación utilizar la siguiente ecuación.

$$Vc = PR * V * \frac{1}{\rho_y} * \frac{100}{Vi}$$

Donde:

Vc: volumen de crema de levadura a agregar para inoculación (mL)

PR: tasa de inoculación buscada (células viables/mL)

V: Volumen de mosto a inocular (mL)

ρ_y : densidad celular de la muestra (células/mL)

Vi: viabilidad en porcentaje

3.5.6. Procedimiento para inoculación de muestras

- Esterilización de recipientes para fermentación
- Determinación de densidad celular y viabilidad de crema madre para inoculación de muestras.
- Adición de 1 L de mosto aireado a recipientes de fermentación.

- Utilizar una micropipeta para adición de volumen de crema madre de levadura para inoculación basado en la tasa de inoculación buscada.
- Agitación y homogenización.
- Almacenamiento en refrigeradora.

3.5.7. Procedimiento para medición de pH

- Calibrar potenciómetro utilizando buffer de pH 4, 7 y 10
- Utilizar agua desmineralizada para limpieza de electrodo
- Acondicionar muestra a 20 °C
- Introducir electrodo en muestra y agitar levemente.
- Tomar lectura indicada en pantalla digital cuando esta muestre una medición estable.
- Registrar lectura.

3.5.8. Procedimiento para medición de gravedad específica

- Acondicionar muestra a 20 °C
- Colocar 400 mL de muestra en cilindro no graduado de vidrio
- Limpiar y secar el hidrómetro
- Introducir el hidrómetro en la muestra
- Observar el nivel de la lectura en la escala de gravedad específica.
- Registrar lectura

3.5.9. Determinación de atenuación aparente

Con los datos de gravedad específica utilizar la siguiente fórmula:

$$A = \frac{OG - SG}{OG} * 100$$

Donde:

A: atenuación aparente en porcentaje

OG: gravedad específica original de mosto (°P)

SG: gravedad específica de medición (°P)

3.6. Recolección, ordenado y procesamiento de la información

La parte experimental de la evaluación de la tasa de inoculación con reutilización de levadura consistió en 5 tratamientos con variación solamente en la tasa de inoculación, manteniendo constante la temperatura, gravedad original del mosto y volumen de mosto, siendo cada muestra de 5 L de mosto de 12 °P.

Se detalla a continuación los formatos de las tablas que permitirán registrar mediciones y llevar a cabo la investigación:

Tabla III. **Formato para conteo de células en crema para inoculación de muestras**

	Células totales	Células muertas	Factor de dilución (adimensional)
Repetición 1			
Repetición 2			
Media			
Desviación estándar			

Fuente: elaboración propia.

Tabla IV. **Formato de propiedades fisicoquímicas de mosto a 20 °C**

	Gravedad específica original (°P)	pH (adimensional)
Repetición 1		
Repetición 2		
Repetición 3		
Media		
Desviación estándar		

Fuente: elaboración propia.

Tabla V. **Formato de gravedad específica de muestras a 20 °C**

Día desde inoculación					
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1					
Repetición 2					
Repetición 3					
Media					
Desviación estándar					

Fuente: elaboración propia.

Tabla VI. **Formato de pH de muestras a 20 °C**

Día desde inoculación					
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1					
Repetición 2					
Repetición 3					
Media					
Desviación estándar					

Fuente: elaboración propia.

Tabla VII. **Formato de conteo de células totales en muestras**

Día desde inoculación					
Factor de dilución					
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1					
Repetición 2					
Media					
Desviación estándar					

Fuente: elaboración propia.

Tabla VIII. **Formato de conteo de células totales en muestras**

Día desde inoculación					
Factor de dilución					
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1					
Repetición 2					
Media					
Desviación estándar					

Fuente: elaboración propia.

3.7. Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información

A continuación, se detallan los formatos para el procesamiento de la información:

Tabla IX. **Volumen de crema de levadura para inoculación para 5L de mosto**

Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)	Células totales	Células muertas	Factor de dilución del conteo	Densidad (células/mL)	Viabilidad (en porcentaje)	Volumen por agregar (mL)
5						
10						
15						
20						
25						

Fuente: elaboración propia.

Tabla X. **Atenuación aparente de muestras a 20 °C**

Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)		
Días desde inoculación	Gravedad específica (°P)	Atenuación (en porcentaje)
0		
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		

Fuente: elaboración propia.

Tabla XI. **Densidad celular y viabilidad de las muestras**

Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)						
Días desde inoculación	Células muertas	Células totales	Aumento Hemocitómetro	Factor de dilución	Densidad celular (millones de células /mL)	Viabilidad (en porcentaje)
0						
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						

Fuente: elaboración propia.

3.8. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos cuantitativos se utilizará las medidas de tendencia central y las medidas de dispersión, para analizar la representatividad de los datos.

Para determinar qué hipótesis se acepta y cuál se rechaza, se utilizó la diferencia entre medias, mediante el análisis de varianza (ANOVA).

3.8.1. Medidas de tendencia central

Como medida de tendencia central se utilizará la media aritmética

$$\bar{X} = \frac{\sum_1^N X_1}{N}$$

Donde:

\bar{X} : Media aritmética

$\sum_1^N X_1$: Sumatoria de valores

N : número de repeticiones

3.8.2. Medidas de dispersión

Se utilizará la desviación estándar para establecer el grado de dispersión de los datos respecto de la media aritmética

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{X})}{N - 1}}$$

Donde:

σ : desviación estándar

X_i : valor de la muestra

\bar{X} : media aritmética

N : número de repeticiones

3.8.3. Análisis de varianza

La prueba de hipótesis se realizó por medio del análisis de varianza, a partir de la diferencia entre medias. Se asume que las varianzas son iguales de las k poblaciones y una significancia del 5 %. Se utiliza la tabla de ANOVA.

3.8.3.1. Tratamientos

- PR1: 5×10^6 células viables/mL
- PR1: 10×10^6 células viables/mL
- PR1: 15×10^6 células viables/mL
- PR1: 20×10^6 células viables/mL
- PR1: 25×10^6 células viables/mL

3.8.3.2. Repeticiones

Las mediciones experimentales serán llevadas en triplicado para las propiedades fisicoquímicas.

3.8.4. ANOVA

El análisis de varianza se lleva a cabo para determinar si existe una diferencia significativa entre las variaciones realizadas en la investigación.

Tabla XII. **Tabla ANOVA**

Fuentes	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F (prueba)	F crítica
Tratamientos	SST	k-1	MST	MST/MST	F (α, k-1, n-1)
Error	SSE	n-k	MSE		
Total	SStotal	n-1			

Fuente: WALPOE, Ronald. *Probabilidad y estadística para ingenieros*. p. 28.

- Diferencia de cuadrados

$$SST = \sum_{i=1}^k \frac{x_i}{n_1} - CM$$

- Corrección media

$$CM = \frac{1}{n} \left(\sum_i \sum_j x_{ij} \right)^2$$

- Varianza total

$$SStotal = \left(\sum_{i=1}^k \frac{x_i}{n_1} \right) - CM$$

- Diferencia dentro de cada tratamiento

$$SSE = SStotal - SST$$

- Corrección de media de tratamientos

$$MST = \frac{SST}{k - 1}$$

- Corrección de la media de errores

$$MSE = \frac{SSE}{n - k}$$

3.9. Plan de análisis de resultados

Para el análisis de resultados se establecen los métodos según cada variable en el subtítulo 3.9.1 y los programas por utilizar en el subtítulo 3.9.2.

3.9.1. Métodos y modelos según tipo de variable

Para los datos de gravedad específica se realizará un análisis de varianza para cada día fermentación entre los tratamientos dados. Para la atenuación aparente, pH, densidad celular y viabilidad se trabajará con valores promedio.

3.9.2. Programas por utilizar para análisis de datos

Para el análisis de datos se utilizó programas del paquete de Office, como lo son Microsoft Word 2019 y Microsoft Excel 2019.

3.9.2.1. Microsoft Word 2019

Programa utilizado para la redacción e interpretación de la investigación y sus respectivos resultados.

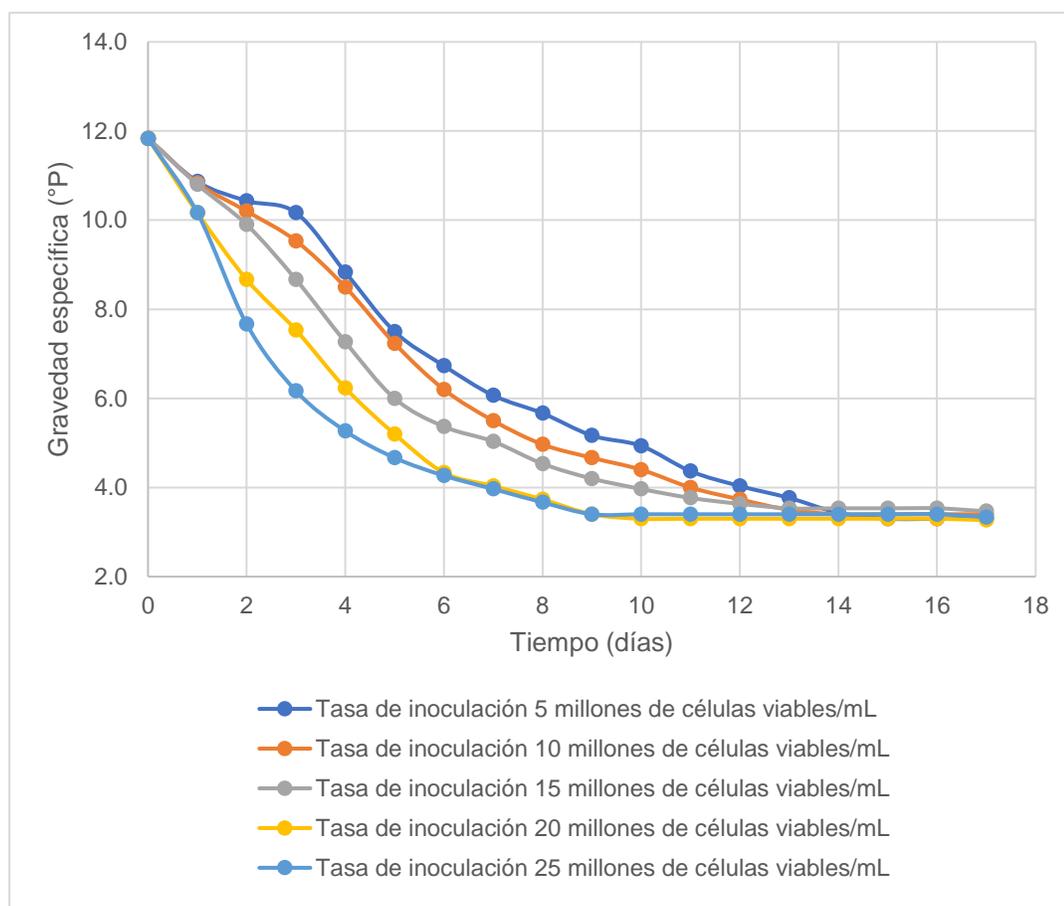
3.9.2.2. Microsoft Excel 2019

Hoja de cálculo utilizada para la determinación de variables y parámetros estadísticos de media, desviación estándar y análisis de varianza de un factor.

4. RESULTADOS

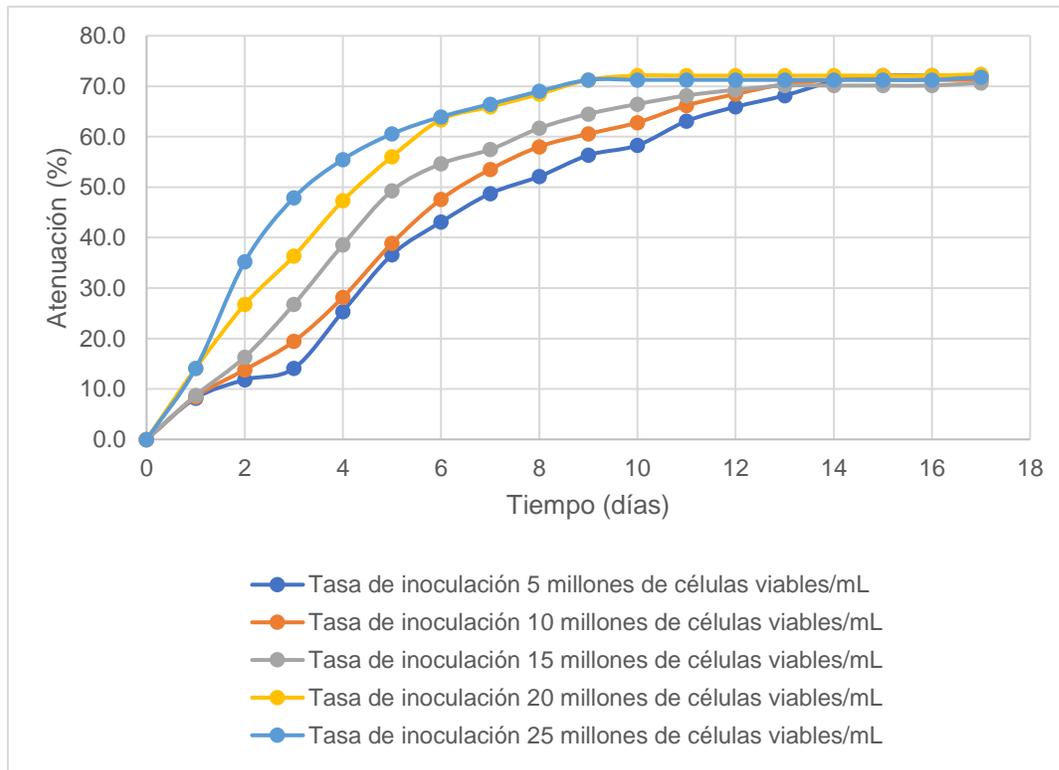
Los resultados obtenidos de las mediciones son presentados en esta sección. En donde las características de gravedad específica, atenuación aparente, potencial de hidrógeno, densidad celular y viabilidad son presentadas en función del tiempo de fermentación para cada tasa de inoculación evaluada.

Figura 1. **Gravedad específica en función del tiempo de fermentación**



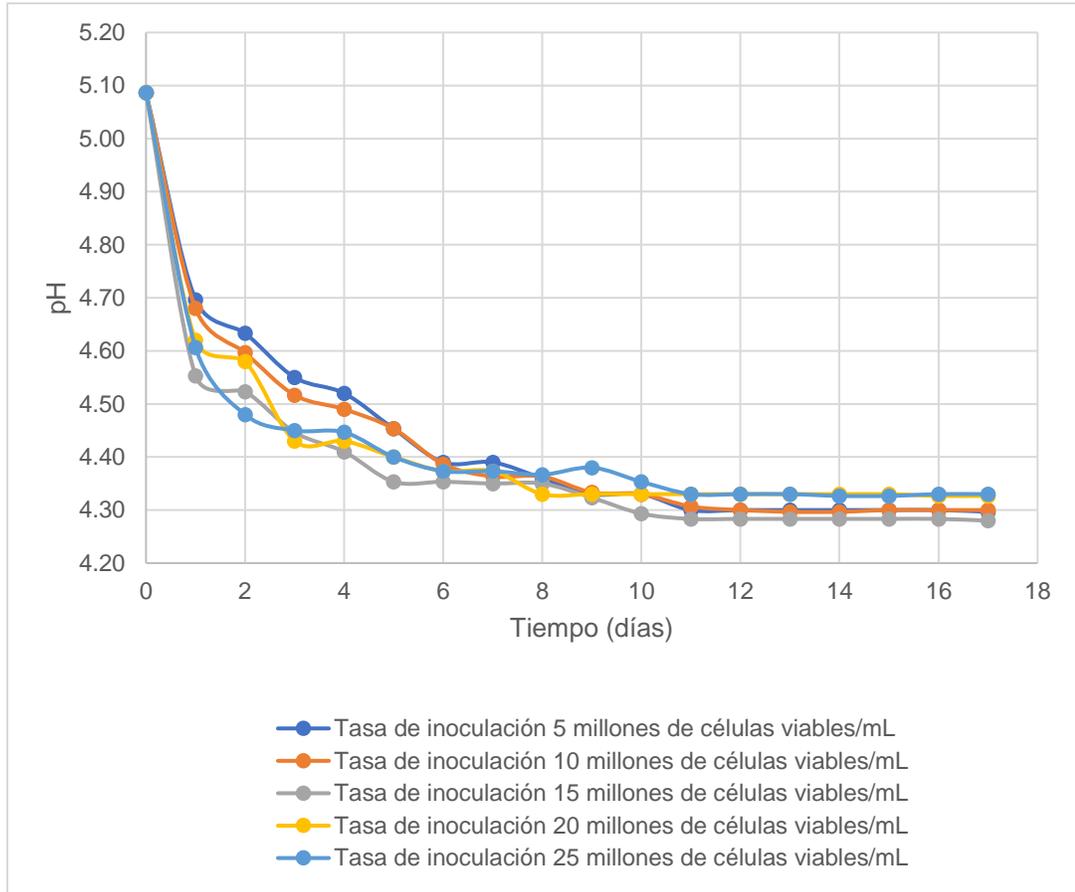
Fuente: elaboración propia.

Figura 2. **Atenuación aparente en función del tiempo de fermentación**



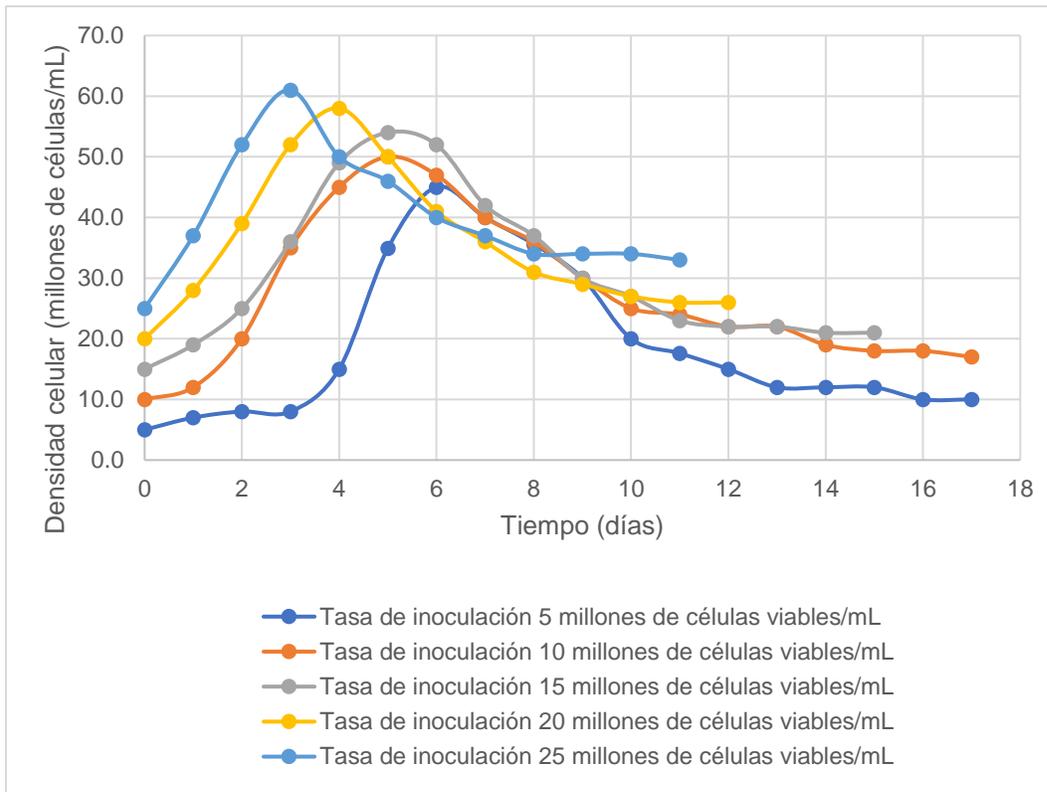
Fuente: elaboración propia.

Figura 3. **Potencial de hidrógeno en función del tiempo de fermentación**



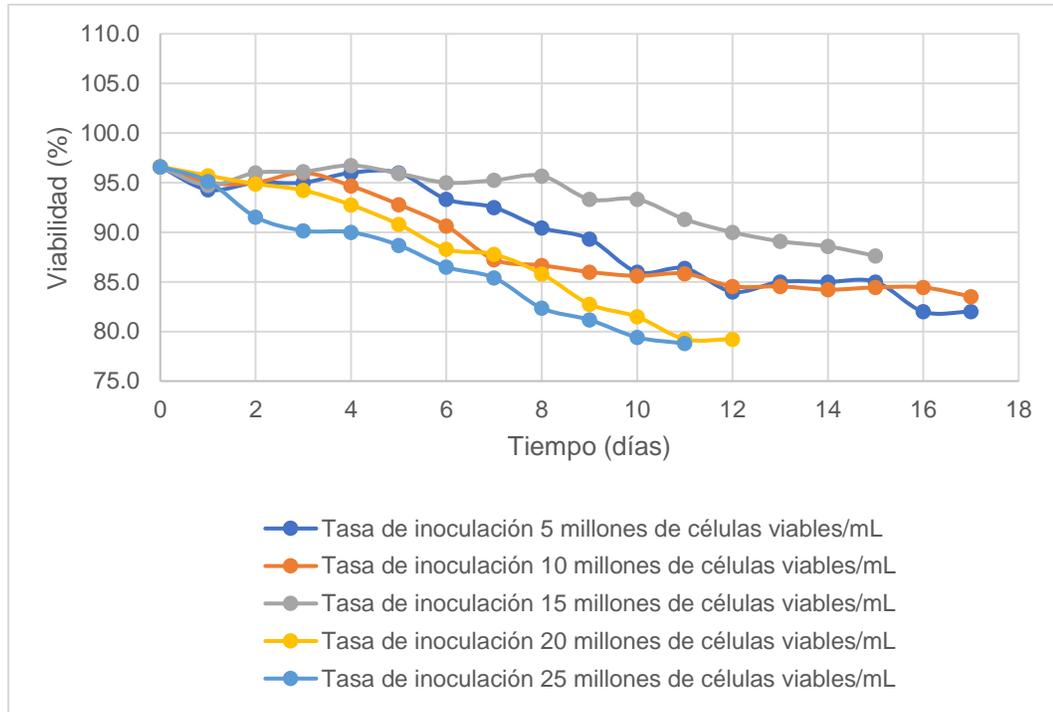
Fuente: elaboración propia.

Figura 4. **Densidad celular en suspensión en función del tiempo de fermentación**



Fuente: elaboración propia.

Figura 5. Viabilidad en función del tiempo de fermentación



Fuente: elaboración propia.

Tabla XIII. **Resumen de análisis de varianza para gravedad específica de muestras**

Días desde inoculación	F crítico	F calculado	Conclusión
1	3,5	60,3	Se acepta H1
2	3,5	687,1	Se acepta H1
3	3,5	2298,3	Se acepta H1
4	3,5	1451,6	Se acepta H1
5	3,5	1376,3	Se acepta H1
6	3,5	1361,0	Se acepta H1
7	3,5	944,8	Se acepta H1
8	3,5	643,8	Se acepta H1
9	3,5	1365,0	Se acepta H1
10	3,5	1058,8	Se acepta H1
11	3,5	431,3	Se acepta H1
12	3,5	125,5	Se acepta H1
13	3,5	68,8	Se acepta H1
14	3,5	15,8	Se acepta H1
15	3,5	21,0	Se acepta H1
16	3,5	41,5	Se acepta H1
17	3,5	9,7	Se acepta H1

Fuente: elaboración propia.

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Para el presente trabajo de investigación, se llevó a cabo la fermentación de 5 muestras de mosto de malta de cebada, variando la cantidad de inóculo inicial. Las tasas de inoculación evaluadas fueron de 5, 10, 15, 20 y 25 millones de levaduras por mililitro.

En la experimentación se mantuvieron constantes las propiedades de mosto original, cepa de levadura y temperatura de fermentación. Se evaluaron propiedades fisicoquímicas de cada muestra cada 24 horas hasta finalizar la fermentación de todas las muestras. Se evaluaron propiedades microbiológicas para cada muestra cada 24 horas hasta finalizar la fermentación de cada muestra.

Las mediciones fisicoquímicas fueron de gravedad específica, utilizando hidrometría y pH por medio de potenciometría, en donde se realizaron tres repeticiones a cada tasa de inoculación cada 24 horas. Mientras que las mediciones microbiológicas fueron llevadas a cabo haciendo uso de un hemocitómetro con azul de metileno para conteo de células totales y células muertas, donde se realizaron dos repeticiones para cada tasa de inoculación cada 24 horas.

Con los datos obtenidos se realizaron los cálculos correspondientes y se graficaron: la gravedad específica, atenuación aparente, potencial de hidrógeno, densidad celular en suspensión y viabilidad en función del tiempo de fermentación.

El comportamiento de la gravedad específica respecto del tiempo para cada tasa de inoculación estudiada se presenta en la figura 1, donde se observa que la fase de adaptación para todas las tasas de inoculación estudiadas duró entre 1 y 2 días, posteriormente se observan descensos en la gravedad específica cada vez mayores demostrando que se encontraban en la etapa exponencial y conforme fueron avanzando los días de fermentación se llegó a la etapa estacionaria donde la gravedad específica se mantuvo constante y prácticamente igual al final de la fermentación en todas las muestras.

En todas las variaciones de tasa de inoculación se observó el mismo comportamiento de gravedad específica respecto al tiempo de fermentación, conforme incrementaba el tiempo de fermentación la gravedad específica disminuía hasta llegar a una gravedad específica final constante, presentando un comportamiento asintótico. Además, se observó que, a mayor tasa de inoculación fue más corto el tiempo en que se llegaba a la gravedad específica final.

La atenuación aparente en función del tiempo de fermentación para cada tasa de inoculación se presentó en la figura 2. En esta gráfica se presenta un comportamiento en donde aumenta la atenuación conforme aumenta el tiempo de fermentación. Esto claramente reflejó que el porcentaje de los azúcares fermentables consumidos fue aumentando hasta que estos se agotaron y se llegó al comportamiento asintótico en todas las variaciones estudiadas.

Para la atenuación aparente los incrementos respecto al tiempo fueron mayores conforme fue mayor la tasa de inoculación, y todas las variaciones estudiadas llegaron a un nivel similar de atenuación aparente final.

El pH respecto al tiempo de fermentación se graficó en la figura 3. Se observó un descenso progresivo respecto al tiempo de fermentación, siendo los

descensos cada vez menores hasta llegar a un punto asintótico para todas las tasas de inoculación evaluadas. A pesar de la variación en la tasa de inoculación no se observó una tendencia o diferencia clara en la gráfica en el pH durante la fermentación.

La densidad celular en función del tiempo se presentó en la figura 4. En esta gráfica se pudo apreciar que la densidad celular en suspensión aumentó respecto al tiempo de fermentación hasta alcanzar un máximo, posterior a este punto máximo se observaron disminuciones, siendo estas cada vez menores, como consecuencia de la floculación de levadura,

Se observó que el punto máximo de densidad celular en suspensión fue mayor conforme aumentó la tasa de inoculación. Así mismo, el tiempo en el que se alcanzó la máxima densidad celular fue menor a mayor tasa de inoculación.

La viabilidad respecto al tiempo de fermentación se graficó en la figura 5. En donde se observó que las 2 mayores tasas de inoculación presentan una menor viabilidad durante la fermentación. Mientras que la tasa de 15 millones de células por mililitro presentó la mayor viabilidad durante la fermentación seguido por la de tasa de 5 y 10 millones de células por mililitro. En todas las tasas evaluadas la viabilidad en suspensión disminuyó conforme aumentó el tiempo de fermentación.

En el análisis de varianza para la gravedad específica se observó que para todos los días desde inoculación existió una diferencia significativa entre al menos dos tasas de inoculación. Se observó que el parámetro de conclusión estadístico fue muy cercano al límite de aceptación para la gravedad específica final, porque presentaron valores similares entre sí.

CONCLUSIONES

1. La gravedad específica disminuyó conforme el tiempo de fermentación fue mayor, mientras que, a mayor tasa de inoculación el tiempo en alcanzar la gravedad específica final fue menor, llegando todas las variaciones a valores finales similares.
2. La atenuación aparente aumentó conforme el tiempo de fermentación avanzó, siendo los aumentos de mayor magnitud con el incremento en las tasas de inoculación hasta alcanzar la atenuación final.
3. El pH de fermentación disminuyó conforme avanzó el tiempo de fermentación, mientras que entre las variaciones de tasa de inoculación no se observó una tendencia clara.
4. La densidad celular en suspensión aumentó hasta un máximo y luego disminuyó conforme mayor fue el tiempo de fermentación, siendo los picos superiores conforme aumentó la tasa de inoculación.
5. La viabilidad de las células en suspensión disminuyó conforme avanzó el tiempo de fermentación, la mayor viabilidad se obtuvo en la tasa de 15 millones de células por mililitro.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar más parámetros fisicoquímicos tales como esteroides y alcoholes superiores durante la fermentación.
2. Llevar a cabo el estudio a escala planta piloto, bajo condiciones que se asemejen aún más al proceso industrial.
3. Realizar una comparación del efecto de la tasa de inoculación para cepas de fermentación alta, *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Incorporar un análisis de vitalidad para la levadura durante la fermentación.

BIBLIOGRAFÍA

1. BRIGGS, Denis; BOULTON, Chris; BROOKES, Peter; STEVENS, Roger. *Brewing: Science and practice*. England: Woodhead Publishing Limited and CRC Press, LLC. 2004. 863 p.
2. ERTEN, Huseyin; TANGULER Hasan; CAKIROZ, Hanife. *The effect of pitching rate on fermentation and flavour compounds in high gravity brewing*. [en línea]. <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/j.2050-0416.2007.tb00259.x>>. [Consulta: 16 de febrero de 2021].
3. KUCHARCZYK, Krzysztof; TUSZYŃSKI, Tadeusz. *The effect of pitching rate on fermentation, maturation and flavour compounds of beer produced on an industrial scale*. [en línea]. <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jib.242>>. [Consulta: 16 de febrero de 2021].
4. SMART, Katherine; FISCHBORN, Tobias. *The effect of pitching rate on fermentation, maturation and flavour compounds of beer produced on an industrial scale*. [en línea]. <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00482.x>>. [Consulta: 16 de febrero de 2021].
5. STANBURY, Peter; WHITAKER, Allan; HALL, Stephen. *Principles of fermentation technology*. 2a ed. Reino Unido: Pergamon, 1995. 376 p.

6. VERBELEN, Pieter; VAN MULDER, Sebastiaan; SAISON, Daan; VAN LAERE, Stijn; DELVAUX, Filip; DELVAUX, Freddy. *Characteristics of high cell density fermentations with different lager yeast strains*. [en línea]. <<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301536732>>. [Consulta: 16 de febrero de 2021].
7. VERBELEN, Pieter. *Rehydration of active dry brewing yeast and its effect on cell viability*. [en línea]. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19018524/#:~:text=The%20fermentation%20rate%20increased%20significantly,vitality%20of%20the%20yeast%20population>>. [Consulta: 16 de febrero de 2021].
8. WALPOLE, Ronald. *Probabilidad y estadística para ingenieros*. 6a ed. México: Prentice-Hall Hispanoamericana, 1999. 752 p.
9. WHITE, Chris; ZAINASHEFF, Jamil. *Yeast the practical guide to beer fermentation*. U.S.A: Brewers Publications, 2010. 300 p.

APÉNDICES

Apéndice 1. **Conteo de levaduras de cultivo madre**

	Células totales	Células muertas	Factor de dilución (adimensional)
Repetición 1	57	2	200
Repetición 2	61	2	200
Media	59	2	200
Desviación estándar	2	0	0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 2. **Propiedades fisicoquímicas de mosto inicial**

	Gravedad específica original (°P)	pH (adimensional)
Repetición 1	11,8	5,11
Repetición 2	11,9	5,08
Repetición 3	11,8	5,07
Media	11,8	5,09
Desviación estándar	0,0	0,02

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 3. **Gravedad específica de muestras para el día 1 desde
inoculación (°P)**

Día desde inoculación	1				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	10,9	10,9	10,8	10,0	10,1
Repetición 2	10,8	10,8	10,8	10,2	10,2
Repetición 3	10,9	10,8	10,8	10,3	10,2
Media	10,9	10,8	10,8	10,2	10,2
Desviación estándar	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 4. **Gravedad específica de muestras para el día 2 desde
inoculación (°P)**

Día desde inoculación	2				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	10,4	10,2	9,9	8,5	7,6
Repetición 2	10,5	10,2	9,9	8,8	7,7
Repetición 3	10,4	10,2	9,9	8,7	7,7
Media	10,4	10,2	9,9	8,7	7,7
Desviación estándar	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 5. **Gravedad específica de muestras para el día 3 desde
inoculación (°P)**

Día desde inoculación	3				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	10,2	9,6	8,7	7,5	6,2
Repetición 2	10,1	9,5	8,7	7,6	6,2
Repetición 3	10,2	9,5	8,6	7,5	6,1
Media	10,2	9,5	8,7	7,5	6,2
Desviación estándar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 6. **Gravedad específica de muestras para el día 4 desde
inoculación (°P)**

Día desde inoculación	4				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	8,9	8,4	7,3	6,3	5,2
Repetición 2	8,8	8,5	7,2	6,2	5,3
Repetición 3	8,8	8,6	7,3	6,2	5,3
Media	8,8	8,5	7,3	6,2	5,3
Desviación estándar	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 7. **Gravedad específica de muestras para el día 5 desde inoculación (°P)**

Día desde inoculación	5				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	7,5	7,2	6	5,2	4,7
Repetición 2	7,5	7,2	6	5,1	4,6
Repetición 3	7,5	7,3	6	5,3	4,7
Media	7,5	7,2	6,0	5,2	4,7
Desviación estándar	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 8. **Gravedad específica de muestras para el día 6 desde inoculación (°P)**

Día desde inoculación	6				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	6,7	6,2	5,4	4,4	4,3
Repetición 2	6,7	6,2	5,3	4,3	4,2
Repetición 3	6,8	6,2	5,4	4,3	4,3
Media	6,7	6,2	5,4	4,3	4,3
Desviación estándar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 9. **Gravedad específica de muestras para el día 7 desde
inoculación (°P)**

Día desde inoculación	7				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	6,1	5,5	5	4	4
Repetición 2	6	5,5	5,1	4	4
Repetición 3	6,1	5,5	5	4,1	3,9
Media	6,1	5,5	5,0	4,0	4,0
Desviación estándar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 10. **Gravedad específica de muestras para el día 8 desde
inoculación (°P)**

Día desde inoculación	8				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	5,6	5	4,5	3,7	3,7
Repetición 2	5,7	5	4,6	3,8	3,7
Repetición 3	5,7	4,9	4,5	3,7	3,6
Media	5,7	5,0	4,5	3,7	3,7
Desviación estándar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 11. **Gravedad específica de muestras para el día 9 desde
inoculación (°P)**

Día desde inoculación	9				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	5,2	4,7	4,2	3,4	3,4
Repetición 2	5,1	4,6	4,2	3,4	3,4
Repetición 3	5,2	4,7	4,2	3,4	3,4
Media	5,2	4,7	4,2	3,4	3,4
Desviación estándar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 12. **Gravedad específica de muestras para el día 10 desde
inoculación (°P)**

Día desde inoculación	10				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	5	4,4	3,9	3,3	3,4
Repetición 2	4,9	4,4	4	3,3	3,4
Repetición 3	4,9	4,4	4	3,3	3,4
Media	4,9	4,4	4,0	3,3	3,4
Desviación estándar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 13. **Gravedad específica de muestras para el día 11 desde inoculación (°P)**

Día desde inoculación	11				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4,4	4	3,8	3,3	3,4
Repetición 2	4,3	4	3,7	3,3	3,4
Repetición 3	4,4	4	3,8	3,3	3,4
Media	4,4	4,0	3,8	3,3	3,4
Desviación estándar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 14. **Gravedad específica de muestras para el día 12 desde inoculación (°P)**

Día desde inoculación	12				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4	3,7	3,6	3,3	3,4
Repetición 2	4,1	3,7	3,7	3,3	3,4
Repetición 3	4	3,8	3,6	3,3	3,4
Media	4,0	3,7	3,6	3,3	3,4
Desviación estándar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 15. **Gravedad específica de muestras para el día 13 desde inoculación (°P)**

Día desde inoculación	13				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	3,8	3,5	3,5	3,3	3,4
Repetición 2	3,7	3,5	3,6	3,3	3,4
Repetición 3	3,8	3,5	3,5	3,3	3,4
Media	3,8	3,5	3,5	3,3	3,4
Desviación estándar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 16. **Gravedad específica de muestras para el día 14 desde inoculación (°P)**

Día desde inoculación	14				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	3,4	3,4	3,5	3,3	3,4
Repetición 2	3,4	3,4	3,6	3,3	3,4
Repetición 3	3,5	3,4	3,5	3,3	3,4
Media	3,4	3,4	3,5	3,3	3,4
Desviación estándar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 17. **Gravedad específica de muestras para el día 15 desde inoculación (°P)**

Día desde inoculación	15				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	3,3	3,4	3,5	3,3	3,4
Repetición 2	3,3	3,4	3,6	3,3	3,4
Repetición 3	3,3	3,4	3,5	3,3	3,4
Media	3,3	3,4	3,5	3,3	3,4
Desviación estándar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 18. **Gravedad específica de muestras para el día 16 desde inoculación (°P)**

Día desde inoculación	16				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	3,3	3,4	3,5	3,3	3,4
Repetición 2	3,3	3,4	3,6	3,3	3,4
Repetición 3	3,3	3,4	3,5	3,3	3,4
Media	3,3	3,4	3,5	3,3	3,4
Desviación estándar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 19. **Gravedad específica de muestras para el día 17 desde
inoculación (°P)**

Día desde inoculación	17				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	3,3	3,4	3,5	3,2	3,4
Repetición 2	3,3	3,4	3,4	3,3	3,3
Repetición 3	3,3	3,4	3,5	3,3	3,3
Media	3,3	3,4	3,5	3,3	3,3
Desviación estándar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 20. **pH de muestras para el día 1 desde inoculación**

Día desde inoculación	1				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4,67	4,66	4,52	4,6	4,59
Repetición 2	4,72	4,68	4,55	4,6	4,61
Repetición 3	4,70	4,7	4,59	4,66	4,62
Media	4,70	4,68	4,55	4,62	4,61
Desviación estándar	0,02	0,02	0,03	0,03	0,01

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 21. **pH de muestras para el día 2 desde inoculación**

Día desde inoculación	2				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4,67	4,62	4,53	4,54	4,48
Repetición 2	4,63	4,6	4,51	4,58	4,5
Repetición 3	4,6	4,57	4,53	4,62	4,46
Media	4,63	4,60	4,52	4,58	4,48
Desviación estándar	0,03	0,02	0,01	0,03	0,02

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 22. **pH de muestras para el día 3 desde inoculación**

Día desde inoculación	3				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4,55	4,49	4,42	4,43	4,47
Repetición 2	4,57	4,5	4,45	4,41	4,45
Repetición 3	4,53	4,56	4,47	4,45	4,43
Media	4,55	4,52	4,45	4,43	4,45
Desviación estándar	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 23. **pH de muestras para el día 4 desde inoculación**

Día desde inoculación	4				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4,5	4,47	4,38	4,43	4,43
Repetición 2	4,52	4,49	4,4	4,46	4,45
Repetición 3	4,54	4,51	4,45	4,4	4,46
Media	4,52	4,49	4,41	4,43	4,45
Desviación estándar	0,02	0,02	0,03	0,02	0,01

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 24. **pH de muestras para el día 5 desde inoculación**

Día desde inoculación	5				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4,48	4,49	4,35	4,4	4,44
Repetición 2	4,46	4,45	4,38	4,42	4,4
Repetición 3	4,42	4,42	4,33	4,38	4,36
Media	4,45	4,45	4,35	4,40	4,40
Desviación estándar	0,02	0,03	0,02	0,02	0,03

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 25. **pH de muestras para el día 6 desde inoculación**

Día desde inoculación	6				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4,41	4,4	4,37	4,39	4,39
Repetición 2	4,39	4,39	4,36	4,37	4,37
Repetición 3	4,37	4,37	4,33	4,36	4,36
Media	4,39	4,39	4,35	4,37	4,37
Desviación estándar	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 26. **pH de muestras para el día 7 desde inoculación**

Día desde inoculación	7				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4,41	4,36	4,37	4,39	4,39
Repetición 2	4,39	4,38	4,34	4,37	4,37
Repetición 3	4,37	4,35	4,34	4,36	4,36
Media	4,39	4,36	4,35	4,37	4,37
Desviación estándar	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 27. **pH de muestras para el día 8 desde inoculación**

Día desde inoculación	8				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4,38	4,38	4,37	4,35	4,38
Repetición 2	4,36	4,36	4,35	4,33	4,37
Repetición 3	4,34	4,35	4,33	4,31	4,35
Media	4,36	4,36	4,35	4,33	4,37
Desviación estándar	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 28. **pH de muestras para el día 9 desde inoculación**

Día desde inoculación	9				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4,35	4,37	4,34	4,35	4,39
Repetición 2	4,33	4,33	4,33	4,33	4,38
Repetición 3	4,31	4,3	4,3	4,31	4,37
Media	4,33	4,33	4,32	4,33	4,38
Desviación estándar	0,02	0,03	0,02	0,02	0,01

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 29. **pH de muestras para el día 10 desde inoculación**

Día desde inoculación	10				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4,35	4,35	4,31	4,35	4,37
Repetición 2	4,33	4,33	4,3	4,33	4,35
Repetición 3	4,31	4,31	4,27	4,31	4,34
Media	4,33	4,33	4,29	4,33	4,35
Desviación estándar	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 30. **pH de muestras para el día 11 desde inoculación**

Día desde inoculación	11				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4,31	4,32	4,3	4,35	4,35
Repetición 2	4,3	4,3	4,28	4,33	4,33
Repetición 3	4,29	4,3	4,27	4,31	4,31
Media	4,30	4,31	4,28	4,33	4,33
Desviación estándar	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 31. **pH de muestras para el día 12 desde inoculación**

Día desde inoculación	12				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4,31	4,31	4,3	4,35	4,35
Repetición 2	4,3	4,3	4,28	4,33	4,33
Repetición 3	4,29	4,29	4,27	4,31	4,31
Media	4,30	4,30	4,28	4,33	4,33
Desviación estándar	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 32. **pH de muestras para el día 13 desde inoculación**

Día desde inoculación	13				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4,31	4,3	4,3	4,35	4,35
Repetición 2	4,3	4,3	4,28	4,33	4,33
Repetición 3	4,29	4,29	4,27	4,31	4,31
Media	4,30	4,30	4,28	4,33	4,33
Desviación estándar	0,01	0,00	0,01	0,02	0,02

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 33. **pH de muestras para el día 14 desde inoculación**

Día desde inoculación	14				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4,31	4,31	4,3	4,35	4,35
Repetición 2	4,3	4,3	4,28	4,33	4,32
Repetición 3	4,29	4,28	4,27	4,31	4,31
Media	4,30	4,30	4,28	4,33	4,33
Desviación estándar	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 34. **pH de muestras para el día 15 desde inoculación**

Día desde inoculación	15				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4,31	4,31	4,3	4,35	4,35
Repetición 2	4,3	4,3	4,28	4,33	4,33
Repetición 3	4,29	4,29	4,27	4,31	4,3
Media	4,30	4,30	4,28	4,33	4,33
Desviación estándar	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 35. **pH de muestras para el día 16 desde inoculación**

Día desde inoculación	16				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4,31	4,31	4,3	4,35	4,35
Repetición 2	4,3	4,3	4,28	4,32	4,33
Repetición 3	4,29	4,29	4,27	4,31	4,31
Media	4,30	4,30	4,28	4,33	4,33
Desviación estándar	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 36. **pH de muestras para el día 17 desde inoculación**

Día desde inoculación	17				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	4,31	4,31	4,3	4,34	4,35
Repetición 2	4,3	4,3	4,28	4,33	4,33
Repetición 3	4,28	4,29	4,26	4,31	4,31
Media	4,30	4,30	4,28	4,33	4,33
Desviación estándar	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 37. **Conteo de células totales de muestras para el día 1 desde inoculación**

Día desde inoculación	1				
	Factor de dilución 20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	34	62	96	142	178
Repetición 2	36	58	94	138	192
Media	35	60	95	140	185
Desviación estándar	1	2	1	2	7

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 38. **Conteo de células totales de muestras para el día 2 desde inoculación**

Día desde inoculación	2				
	Factor de dilución 20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	43	95	122	192	265
Repetición 2	37	105	128	198	255
Media	40	100	125	195	260
Desviación estándar	3	5	3	3	5

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 39. **Conteo de células totales de muestras para el día 3 desde inoculación**

Día desde inoculación	3				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	33	183	186	267	295
Repetición 2	47	167	174	253	315
Media	40	175	180	260	305
Desviación estándar	7	8	6	7	10

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 40. **Conteo de células totales de muestras para el día 4 desde inoculación**

Día desde inoculación	4				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	83	216	236	280	263
Repetición 2	67	234	254	300	237
Media	75	225	245	290	250
Desviación estándar	8	9	9	10	13

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 41. **Conteo de células totales de muestras para el día 5 desde inoculación**

Día desde inoculación	5				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	184	262	279	262	218
Repetición 2	165	238	261	238	242
Media	175	250	270	250	230
Desviación estándar	10	12	9	12	12

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 42. **Conteo de células totales de muestras para el día 6 desde inoculación**

Día desde inoculación	6				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	235	225	249	195	210
Repetición 2	215	245	271	215	190
Media	225	235	260	205	200
Desviación estándar	10	10	11	10	10

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 43. **Conteo de células totales de muestras para el día 7 desde inoculación**

Día desde inoculación	7				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	192	208	219	188	176
Repetición 2	208	192	201	172	194
Media	200	200	210	180	185
Desviación estándar	8	8	9	8	9

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 44. **Conteo de células totales de muestras para el día 8 desde inoculación**

Día desde inoculación	8				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	187	170	176	147	179
Repetición 2	169	190	194	163	161
Media	178	180	185	155	170
Desviación estándar	9	10	9	8	9

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 45. **Conteo de células totales de muestras para el día 9 desde inoculación**

Día desde inoculación	9				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	141	160	158	137	162
Repetición 2	159	140	142	153	178
Media	150	150	150	145	170
Desviación estándar	9	10	8	8	8

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 46. **Conteo de células totales de muestras para el día 10 desde inoculación**

Día desde inoculación	10				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	107	119	128	128	177
Repetición 2	93	131	142	142	163
Media	100	125	135	135	170
Desviación estándar	7	6	7	7	7

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 47. **Conteo de células totales de muestras para el día 11 desde inoculación**

Día desde inoculación	11				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	80	128	122	136	172
Repetición 2	96	112	108	124	158
Media	88	120	115	130	165
Desviación estándar	8	8	7	6	7

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 48. **Conteo de células totales de muestras para el día 12 desde inoculación**

Día desde inoculación	12				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	82	103	103	123	N/A
Repetición 2	68	117	117	137	N/A
Media	75	110	110	130	N/A
Desviación estándar	7	7	7	7	N/A

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 49. **Conteo de células totales de muestras para el día 13 desde inoculación**

Día desde inoculación	13				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	51	119	116	N/A	N/A
Repetición 2	69	101	104	N/A	N/A
Media	60	110	110	N/A	N/A
Desviación estándar	9	9	6	N/A	N/A

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 50. **Conteo de células totales de muestras para el día 14 desde inoculación**

Día desde inoculación	14				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	67	88	100	N/A	N/A
Repetición 2	53	102	110	N/A	N/A
Media	60	95	105	N/A	N/A
Desviación estándar	7	7	5	N/A	N/A

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 51. **Conteo de células totales de muestras para el día 15 desde inoculación**

Día desde inoculación	15				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	56	95	110	N/A	N/A
Repetición 2	64	85	100	N/A	N/A
Media	60	90	105	N/A	N/A
Desviación estándar	4	5	5	N/A	N/A

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 52. **Conteo de células totales de muestras para el día 16 desde inoculación**

Día desde inoculación	16				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	55	85	N/A	N/A	N/A
Repetición 2	45	95	N/A	N/A	N/A
Media	50	90	N/A	N/A	N/A
Desviación estándar	5	5	N/A	N/A	N/A

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 53. **Conteo de células totales de muestras para el día 17 desde inoculación**

Día desde inoculación	17				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	46	90	N/A	N/A	N/A
Repetición 2	54	80	N/A	N/A	N/A
Media	50	85	N/A	N/A	N/A
Desviación estándar	4	5	N/A	N/A	N/A

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 54. **Conteo de células muertas de muestras para el día 1 desde inoculación**

Día desde inoculación	1				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	1	4	6	7	7
Repetición 2	3	2	4	5	11
Media	2	3	5	6	9
Desviación estándar	1	1	1	1	2

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 55. **Conteo de células muertas de muestras para el día 2 desde inoculación**

Día desde inoculación	2				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	3	4	4	8	25
Repetición 2	1	6	6	12	19
Media	2	5	5	10	22
Desviación estándar	1	1	1	2	3

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 56. **Conteo de células muertas de muestras para el día 3 desde inoculación**

Día desde inoculación	3				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	0	9	9	18	28
Repetición 2	4	5	5	12	32
Media	2	7	7	15	30
Desviación estándar	2	2	2	3	2

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 57. **Conteo de células muertas de muestras para el día 4 desde inoculación**

Día desde inoculación	4				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	5	10	5	18	28
Repetición 2	1	14	11	24	22
Media	3	12	8	21	25
Desviación estándar	2	2	3	3	3

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 58. **Conteo de células muertas de muestras para el día 5 desde inoculación**

Día desde inoculación	5				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	5	20	14	27	22
Repetición 2	9	16	8	19	30
Media	7	18	11	23	26
Desviación estándar	2	2	3	4	4

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 59. **Conteo de células muertas de muestras para el día 6 desde inoculación**

Día desde inoculación	6				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	17	20	11	20	30
Repetición 2	13	24	15	28	24
Media	15	22	13	24	27
Desviación estándar	2	2	2	4	3

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 60. **Conteo de células muertas de muestras para el día 7 desde inoculación**

Día desde inoculación	7				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	12	28	13	25	23
Repetición 2	18	23	7	19	31
Media	15	26	10	22	27
Desviación estándar	3	3	3	3	4

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 61. **Conteo de células muertas de muestras para el día 8 desde inoculación**

Día desde inoculación	8				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	21	21	4	19	34
Repetición 2	13	27	12	25	26
Media	17	24	8	22	30
Desviación estándar	4	3	4	3	4

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 62. **Conteo de células muertas de muestras para el día 9 desde inoculación**

Día desde inoculación	9				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	12	24	13	27	27
Repetición 2	20	18	7	23	37
Media	16	21	10	25	32
Desviación estándar	4	3	3	2	5

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 63. **Conteo de células muertas de muestras para el día 10 desde inoculación**

Día desde inoculación	10				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	18	14	5	21	39
Repetición 2	10	22	13	29	31
Media	14	18	9	25	35
Desviación estándar	4	4	4	4	4

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 64. **Conteo de células muertas de muestras para el día 11 desde inoculación**

Día desde inoculación	11				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	8	22	13	29	38
Repetición 2	16	12	7	25	32
Media	12	17	10	27	35
Desviación estándar	4	5	3	2	3

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 65. **Conteo de células muertas de muestras para el día 12 desde inoculación**

Día desde inoculación	12				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	15	12	8	24	N/A
Repetición 2	9	22	14	30	N/A
Media	12	17	11	27	N/A
Desviación estándar	3	5	3	3	N/A

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 66. **Conteo de células muertas de muestras para el día 13 desde inoculación**

Día desde inoculación	13				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	5	21	16	N/A	N/A
Repetición 2	13	13	8	N/A	N/A
Media	9	17	12	N/A	N/A
Desviación estándar	4	4	4	N/A	N/A

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 67. **Conteo de células muertas de muestras para el día 14 desde inoculación**

Día desde inoculación	14				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	12	12	9	N/A	N/A
Repetición 2	6	18	15	N/A	N/A
Media	9	15	12	N/A	N/A
Desviación estándar	3	3	3	N/A	N/A

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 68. **Conteo de células muertas de muestras para el día 15 desde inoculación**

Día desde inoculación	15				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	6	17	16	N/A	N/A
Repetición 2	12	11	10	N/A	N/A
Media	9	14	13	N/A	N/A
Desviación estándar	3	3	3	N/A	N/A

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 69. **Conteo de células muertas de muestras para el día 16 desde inoculación**

Día desde inoculación	16				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	12	11	N/A	N/A	N/A
Repetición 2	6	17	N/A	N/A	N/A
Media	9	14	N/A	N/A	N/A
Desviación estándar	3	3	N/A	N/A	N/A

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 70. **Conteo de células muertas de muestras para el día 17 desde inoculación**

Día desde inoculación	17				
Factor de dilución	20				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
Repetición 1	6	17	N/A	N/A	N/A
Repetición 2	12	11	N/A	N/A	N/A
Media	9	14	N/A	N/A	N/A
Desviación estándar	3	3	N/A	N/A	N/A

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 71. **Volumen de cultivo madre para inoculación de muestras de 5L de mosto**

Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)	Células totales	Células muertas	Factor de dilución del conteo	Densidad (millones de células/mL)	Viabilidad (porcentaje)	Volumen por agregar (mL)
5	59	2	200	118	96,6	219
10	59	2	200	118	96,6	439
15	59	2	200	118	96,6	658
20	59	2	200	118	96,6	877
25	59	2	200	118	96,6	1096

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 72. **Gravedad específica de muestras a 20 °C**

Días desde inoculación	Gravedad específica (°P)				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
0	11,8	11,8	11,8	11,8	11,8
1	10,9	10,8	10,8	10,2	10,2
2	10,4	10,2	9,9	8,7	7,7
3	10,2	9,5	8,7	7,5	6,2
4	8,8	8,5	7,3	6,2	5,3
5	7,5	7,2	6,0	5,2	4,7
6	6,7	6,2	5,4	4,3	4,3
7	6,1	5,5	5,0	4,0	4,0
8	5,7	5,0	4,5	3,7	3,7
9	5,2	4,7	4,2	3,4	3,4
10	4,9	4,4	4,0	3,3	3,4
11	4,4	4,0	3,8	3,3	3,4
12	4,0	3,7	3,6	3,3	3,4
13	3,8	3,5	3,5	3,3	3,4
14	3,4	3,4	3,5	3,3	3,4
15	3,3	3,4	3,5	3,3	3,4
16	3,3	3,4	3,5	3,3	3,4
17	3,3	3,4	3,5	3,3	3,3

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 73. **Atenuación aparente de muestras a 20 °C**

Días desde inoculación	Atenuación aparente (en porcentaje)				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
	5	10	15	20	25
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	8,2	8,5	8,7	14,1	14,1
2	11,8	13,8	16,3	26,8	35,2
3	14,1	19,4	26,8	36,3	47,9
4	25,4	28,2	38,6	47,3	55,5
5	36,6	38,9	49,3	56,1	60,6
6	43,1	47,6	54,6	63,4	63,9
7	48,7	53,5	57,5	65,9	66,5
8	52,1	58,0	61,7	68,5	69,0
9	56,3	60,6	64,5	71,3	71,3
10	58,3	62,8	66,5	72,1	71,3
11	63,1	66,2	68,2	72,1	71,3
12	65,9	68,5	69,3	72,1	71,3
13	68,2	70,4	70,1	72,1	71,3
14	71,0	71,3	70,1	72,1	71,3
15	72,1	71,3	70,1	72,1	71,3
16	72,1	71,3	70,1	72,1	71,3
17	72,1	71,3	70,7	72,4	71,8

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 74. pH de muestras a 20 °C

	pH				
	Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)				
Días desde inoculación	5	10	15	20	25
0	5,09	5,09	5,09	5,09	5,09
1	4,70	4,68	4,55	4,62	4,61
2	4,63	4,60	4,52	4,58	4,48
3	4,55	4,52	4,45	4,43	4,45
4	4,52	4,49	4,41	4,43	4,45
5	4,45	4,45	4,35	4,40	4,40
6	4,39	4,39	4,35	4,37	4,37
7	4,39	4,36	4,35	4,37	4,37
8	4,36	4,36	4,35	4,33	4,37
9	4,33	4,33	4,32	4,33	4,38
10	4,33	4,33	4,29	4,33	4,35
11	4,30	4,31	4,28	4,33	4,33
12	4,30	4,30	4,28	4,33	4,33
13	4,30	4,30	4,28	4,33	4,33
14	4,30	4,30	4,28	4,33	4,33
15	4,30	4,30	4,28	4,33	4,33
16	4,30	4,30	4,28	4,33	4,33
17	4,30	4,30	4,28	4,33	4,33

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 75. **Densidad celular y viabilidad de muestra con tasa de inoculación de 5 millones de células/mL**

Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)	5				
Días desde inoculación	Células totales	Células muertas	Factor de dilución	Densidad celular (millones de células /mL)	Viabilidad (porcentaje)
0	N/A	N/A	N/A	5,0	96,6
1	35	2	20	7,0	94,3
2	40	2	20	8,0	95,0
3	40	2	20	8,0	95,0
4	75	3	20	15,0	96,0
5	175	7	20	34,9	96,0
6	225	15	20	45,0	93,3
7	200	15	20	40,0	92,5
8	178	17	20	35,6	90,4
9	150	16	20	30,0	89,3
10	100	14	20	20,0	86,0
11	88	12	20	17,6	86,4
12	75	12	20	15,0	84,0
13	60	9	20	12,0	85,0
14	60	9	20	12,0	85,0
15	60	9	20	12,0	85,0
16	50	9	20	10,0	82,0
17	50	9	20	10,0	82,0

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 76. **Densidad celular y viabilidad de muestra con tasa de inoculación de 10 millones de células/mL**

Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)	10				
Días desde inoculación	Células totales	Células muertas	Factor de dilución	Densidad celular (millones de células /mL)	Viabilidad (porcentaje)
0	N/A	N/A	N/A	10,0	96,6
1	60	3	20	12,0	95,0
2	100	5	20	20,0	95,0
3	175	7	20	35,0	96,0
4	225	12	20	45,0	94,7
5	250	18	20	50,0	92,8
6	235	22	20	47,0	90,6
7	200	26	20	40,0	87,3
8	180	24	20	36,0	86,7
9	150	21	20	30,0	86,0
10	125	18	20	25,0	85,6
11	120	17	20	24,0	85,8
12	110	17	20	22,0	84,5
13	110	17	20	22,0	84,5
14	95	15	20	19,0	84,2
15	90	14	20	18,0	84,4
16	90	14	20	18,0	84,4
17	85	14	20	17,0	83,5

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 77. **Densidad celular y viabilidad de muestra con tasa de inoculación de 15 millones de células/mL**

Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)	15				
Días desde inoculación	Células totales	Células muertas	Factor de dilución	Densidad celular (millones de células /mL)	Viabilidad (porcentaje)
0	N/A	N/A	N/A	15,0	96,6
1	95	5	20	19,0	94,7
2	125	5	20	25,0	96,0
3	180	7	20	36,0	96,1
4	245	8	20	49,0	96,7
5	270	11	20	54,0	95,9
6	260	13	20	52,0	95,0
7	210	10	20	42,0	95,2
8	185	8	20	37,0	95,7
9	150	10	20	30,0	93,3
10	135	9	20	27,0	93,3
11	115	10	20	23,0	91,3
12	110	11	20	22,0	90,0
13	110	12	20	22,0	89,1
14	105	12	20	21,0	88,6
15	105	13	20	21,0	87,6

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 78. **Densidad celular y viabilidad de muestra con tasa de inoculación de 20 millones de células/mL**

Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)	20				
Días desde inoculación	Células totales	Células muertas	Factor de dilución	Densidad celular (millones de células /mL)	Viabilidad (porcentaje)
0	N/A	N/A	N/A	20,0	96,6
1	140	6	20	28,0	95,7
2	195	10	20	39,0	94,9
3	260	15	20	52,0	94,2
4	290	21	20	58,0	92,8
5	250	23	20	50,0	90,8
6	205	24	20	41,0	88,3
7	180	22	20	36,0	87,8
8	155	22	20	31,0	85,8
9	145	25	20	29,0	82,8
10	135	25	20	27,0	81,5
11	130	27	20	26,0	79,2
12	130	27	20	26,0	79,2

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 79. **Densidad celular y viabilidad de muestra con tasa de inoculación de 25 millones de células/mL**

Tasa de inoculación (millones de células viables/mL)	25				
Días desde inoculación	Células totales	Células muertas	Factor de dilución	Densidad celular (millones de células /mL)	Viabilidad (porcentaje)
0	N/A	N/A	N/A	25,0	96,6
1	185	9	20	37,0	95,1
2	260	22	20	52,0	91,5
3	305	30	20	61,0	90,2
4	250	25	20	50,0	90,0
5	230	26	20	46,0	88,7
6	200	27	20	40,0	86,5
7	185	27	20	37,0	85,4
8	170	30	20	34,0	82,4
9	170	32	20	34,0	81,2
10	170	35	20	34,0	79,4
11	165	35	20	33,0	78,8

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 80. **Resumen de análisis de varianza para gravedad específica de muestras**

Días desde inoculación	F crítico	F calculado	Conclusión
1	3,5	60,3	Se acepta H1
2	3,5	687,1	Se acepta H1
3	3,5	2298,3	Se acepta H1
4	3,5	1451,6	Se acepta H1
5	3,5	1376,3	Se acepta H1
6	3,5	1361,0	Se acepta H1
7	3,5	944,8	Se acepta H1
8	3,5	643,8	Se acepta H1
9	3,5	1365,0	Se acepta H1
10	3,5	1058,8	Se acepta H1
11	3,5	431,3	Se acepta H1
12	3,5	125,5	Se acepta H1
13	3,5	68,8	Se acepta H1
14	3,5	15,8	Se acepta H1
15	3,5	21,0	Se acepta H1
16	3,5	41,5	Se acepta H1
17	3,5	9,7	Se acepta H1

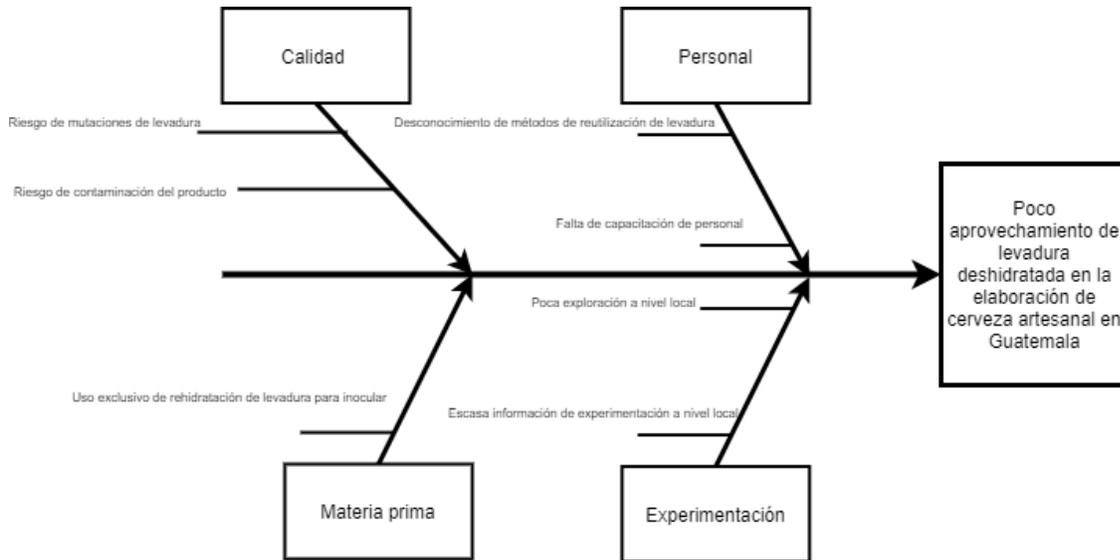
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 81. **Tabla de requisitos académicos**

Carrera	Área	Curso	Temática
Ingeniería química	Química	Química orgánica 2	Alcoholes
		Análisis cualitativo	Disociación de ácidos y bases
	Complementaria	Microbiología	Mohos y levaduras
		Estadística 2	Análisis de varianza de un factor
	Operaciones unitarias	Flujo de fluidos	Conceptos y principios fundamentales de fluido estática (gravedad específica)

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 82. Diagrama de Ishikawa



Fuente: elaboración propia, empleando draw.io