



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

DESARROLLO DE COLORANTES NATURALES A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN DE
EXTRACTOS DE MALTA ESPECIALES

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO

FRANCISCO IGNACIO DÍAZ BARAHONA

PROFESOR GUÍA:

JOSÉ CRISTIAN SALGADO HERRERA

MIEMBRO DE COMISIÓN:

MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

FERNANDO JAVIER REYES BADILLA

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la empresa Maltexco S.A.

SANTIAGO DE CHILE

2016

DESARROLLO DE COLORANTES NATURALES A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN DE EXTRACTOS DE MALTA ESPECIALES

Los colorantes son un tipo de aditivos utilizados en la industria alimenticia para cambiar el color, avivar el color natural o recuperar el color de un producto. Los colorantes pueden ser de origen artificial o natural, siendo este último el tipo de colorante más aceptado en los últimos años.

Con la idea de generar nuevos productos relacionados con su área productiva, la empresa Maltexco S.A. busca generar un colorante natural a base de extracto de malta especial para ser comercializado. Un estudio previo reveló que era posible realizar colorantes naturales a partir de los extractos de malta especiales. Sin embargo, éstos afectaban el sabor y aroma de los alimentos de manera significativa, por lo cual se propuso realizar una fermentación como una alternativa para mejorar los resultados obtenidos, debido a que, en la industria cervecera, la fermentación ayuda en la eliminación de sabores y aromas indeseados en la cerveza.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es estudiar las condiciones necesarias para desarrollar colorantes naturales a partir de la fermentación de extractos de malta especiales. Para ello, fue necesario determinar las condiciones para realizar la fermentación de los extractos de malta especiales, estandarizar los resultados de la fermentación de los mismos, obtener distintos colorantes a partir de la fermentación con distintos microorganismos y determinar el mejor microorganismo para producir los colorantes.

El trabajo de laboratorio, realizado en el Laboratorio de Desarrollo y en el Laboratorio de Calidad de la empresa Maltexco en su planta Talagante, se inició con la elaboración de distintos extractos de malta especiales fermentados a partir de malta caramelo y malta tostada, dos tipos distintos de maltas especiales. El proceso para fermentar los extractos de malta incluyó una etapa de dilución del extracto concentrado, una etapa de hervido para esterilizar la muestra, la etapa de fermentación estudiada y una etapa final de concentración. La fermentación fue realizada principalmente con levaduras cerveceras tipo Ale y Lager, aunque también se utilizó la levadura vinícola PDM y bacterias lácticas. Entre los microorganismos mencionados, la levadura tipo Lager demostró ser la más efectiva para realizar la fermentación de los extractos de malta especiales usando la concentración final de la muestra fermentada y la atenuación aparente posterior a la fermentación como parámetros.

Finalmente, el mejor colorante desarrollado se logró mediante la fermentación con levadura tipo Lager y la bacteria láctica *Lactobacillus delbrueckii* en conjunto, que alcanzaron una atenuación aparente de 29,35%. Por tanto, se recomienda realizar pruebas de la fermentación con estas especies, con tal de obtener las condiciones óptimas de fermentación para estos microorganismos.

“La ecuación del movimiento no es más que la ecuación del reposo vista por un observador acelerado”

Nicanor Parra

“Trata de dejar este mundo en mejores condiciones de cómo lo encontraste”

Robert Baden-Powell

“Quedamos los que puedan sonreír”

“Al final de este viaje en la vida” - Silvio Rodríguez

A mi madre Lorena y mi padre Jorge

Una de las mayores motivaciones para lograr esta meta, era el saber que les haría felices que yo terminara esta parte del camino.

Esta es mi forma de agradecer por la vida que me han dado.

Agradecimientos

A mi profesor guía Cristian Salgado, por darme la oportunidad de trabajar en esta memoria que apareció en el momento perfecto. De no haber tenido esta oportunidad, tal vez nunca hubiera encontrado una forma de terminar mi carrera. Además, agradezco su deseo de formar comunidad con todos los memoristas que, aunque a ratos era algo tedioso (hay que decirlo), al final hizo de esta experiencia aún más grata de lo que pudo ser y ahora solo me queda lo más bonito de cada uno.

A mi profesor co-guía Fernando Reyes, por darme la oportunidad de conocer Maltexco y ofrecerme esta memoria. Junto con Rodrigo Sánchez y Camila Rodríguez, fueron quienes con sus aportes, sugerencias, comentarios y críticas (a veces directa y despiadada), dieron forma a esta memoria y la hicieron mejor de lo que la hubiera hecho sin sus conocimientos y experiencia.

A mi madre Lorena y mi padre Jorge, quienes no solo han estado conmigo en cada momento desde mi nacimiento (e incluso antes), sino también tuvieron que aguantarme en los meses de mayor presión, estrés y frustración. Por ser capaces de estar conmigo, aunque yo mismo pensara que no lo merecía en esos momentos. Los quiero demasiado y espero retribuirles todo lo que me han dado hasta ahora.

A mi hermana Natalia, quien, aunque al principio de mi vida solo éramos capaces de pelear por el control de la televisión, ahora veo lo parecidos que somos y el cariño que nos tenemos. Aunque no sea mi mayor confidente, siempre es agradable tener un tiempo para conversar entre nosotros. Siempre he sentido tu cercanía y apoyo.

A los mejores: Nacho, Gabriel, Grone, Pipe, Carlos, Figue y Meri. Por ser los incondicionales. Con quienes he tomado las mejores y peores decisiones. Con quienes he vivido los mejores y peores momentos de mi vida. Aunque se los he dicho muchas veces, jamás me cansaré de decir lo importantes que han sido en mi vida y lo afortunado que me siento de haberlos conocido. Conocerlos a todos fue realmente encontrar una aguja en un pajar.

A mis compañeros de generación en IQBT y amigos en el departamento, en especial a Ignacio (Nacho), Paula (Pau), Constanza (Coni), Fabián (Fabi), Carlos (Oso), Sebastián (Xino), José (Jose), Cristian (Criss), Maximiliano (Max), Ricardo (Richi), Roberto (Fordo), Carlos (Carlitos), con quienes pasé momentos increíbles en estos años, y aunque pudiera nombrar a muchas más, a todos con los que haya tenido alguna conversación mientras almorzábamos en la cocina o alguna tarde en la salita del DIQBT.

A todas las personas que han estado, están y/o seguirán estando en mi vida. Aunque no alcanzo a incluir los nombres de todos, siento que cada persona que ha estado junto a mi es importante. Puede que yo no sea la persona más extrovertida ni efusiva, pero por lo mismo, todas las personas que han estado en mi vida han hecho algo lo suficientemente grande para que yo nunca las olvide y desee darles las gracias por estar ahí, en el momento exacto.

Tabla de Contenido

| | | |
|----------|--|----|
| 1. | Introducción..... | 1 |
| 1.1. | Motivación..... | 1 |
| 1.2. | La Empresa Maltexco S.A..... | 1 |
| 1.3. | Colorantes | 2 |
| 1.3.1. | Colorantes artificiales..... | 2 |
| 1.3.2. | Colorantes naturales | 2 |
| 1.3.3. | Colorantes en la industria cervecera..... | 3 |
| 2. | Antecedentes..... | 5 |
| 2.1. | La malta | 5 |
| 2.2. | Proceso de malteo | 5 |
| 2.3. | Maltas especiales | 6 |
| 2.4. | El extracto de malta especial..... | 7 |
| 2.5. | Proceso de extractos..... | 7 |
| 2.6. | Reacción de Maillard y la generación de color..... | 8 |
| 2.7. | Reacción de caramelización..... | 9 |
| 2.8. | Fermentación | 11 |
| 2.8.1. | Fermentación alcohólica..... | 11 |
| 2.8.2. | Fermentación láctica..... | 12 |
| 2.9. | Colorantes a partir de extractos de malta especiales..... | 13 |
| 3. | Objetivos..... | 14 |
| 3.1. | Objetivo general..... | 14 |
| 3.2. | Objetivos específicos | 14 |
| 4. | Metodología..... | 15 |
| 4.1. | Establecimiento de las condiciones de fermentación..... | 16 |
| 4.2. | Estandarización de los resultados de la fermentación..... | 17 |
| 4.2.1. | Herramientas de medición para el estudio de colorantes | 19 |
| 4.2.1.1. | Medición de color | 19 |
| 4.2.1.2. | Medición de concentración..... | 20 |
| 4.2.2. | Análisis sensorial..... | 21 |
| 4.2.2.1. | El sabor de los alimentos | 22 |
| 4.2.2.2. | El olor de los alimentos | 23 |

| | | |
|------|---|----|
| 4.3. | Obtención de colorantes..... | 23 |
| 4.4. | Determinación del mejor microorganismo | 25 |
| 5. | Resultados y Discusión..... | 27 |
| 5.1. | Primera experiencia: Malta tostada..... | 27 |
| 5.2. | Segunda experiencia: Malta caramelo | 29 |
| 5.3. | Tercera experiencia: Comparación entre distintos Microorganismos | 33 |
| 5.4. | Cuarta Experiencia: Bacterias Lácticas | 37 |
| 6. | Conclusiones y recomendaciones | 41 |
| 6.1. | Condiciones de fermentación para los extractos de malta especiales..... | 41 |
| 6.2. | Estandarización de resultados de la fermentación de extractos de malta especiales | 41 |
| 6.3. | Los colorantes obtenidos a partir de extractos de malta especiales | 42 |
| 6.4. | El mejor microorganismo para fermentar extractos de malta especiales..... | 43 |
| 7. | Bibliografía..... | 44 |
| | Anexos..... | 47 |
| A. | Tablas de datos..... | 47 |
| 1. | Primera experiencia: Malta tostada | 47 |
| 2. | Segunda experiencia: Malta caramelo..... | 48 |
| 3. | Tercera experiencia: Comparación entre distintos microorganismos | 49 |
| 4. | Cuarta experiencia: Bacterias lácticas..... | 50 |
| B. | Resultados del análisis estadístico para la tercera experiencia | 51 |
| 1. | Test de Varianza..... | 51 |
| 2. | Test T de Student..... | 55 |
| C. | Resultados del análisis estadístico para la cuarta experiencia | 61 |
| 1. | Test de Varianza..... | 61 |
| 2. | Test T de Student..... | 63 |
| D. | Proceso Cervezero | 65 |

Índice de Tablas

| | |
|--|-----------|
| <i>Tabla 1 Especies fermentadoras utilizados.....</i> | <i>19</i> |
| <i>Tabla 2 Atenuación aparente promedio obtenida para malta tostada.....</i> | <i>27</i> |
| <i>Tabla 3 Atenuación aparente promedio obtenida para malta caramelo.....</i> | <i>30</i> |
| <i>Tabla 4 Atenuación aparente promedio obtenida con levadura Ale.....</i> | <i>32</i> |
| <i>Tabla 5 Atenuación aparente promedio obtenida con levadura Lager.....</i> | <i>32</i> |
| <i>Tabla 6 Diferencia entre los valores obtenidos de atenuación aparente para distintas levaduras en extractos de malta caramelo.....</i> | <i>33</i> |
| <i>Tabla 7 Resultados del análisis de varianza.....</i> | <i>35</i> |
| <i>Tabla 8 Resultados del análisis T de Student.....</i> | <i>35</i> |
| <i>Tabla 9 Resultados del estudio estadístico para las fermentaciones alcohólicas y lácticas combinadas.....</i> | <i>39</i> |
| <i>Tabla 10 Resultados obtenidos durante la fermentación de muestras de extracto de malta tostada con distintas levaduras y a distintas concentraciones iniciales.....</i> | <i>47</i> |
| <i>Tabla 11 Resultados obtenidos durante la fermentación de muestras de extracto de malta caramelo con distintas levaduras y a distintas concentraciones iniciales.....</i> | <i>48</i> |
| <i>Tabla 12 Resultados obtenidos durante la fermentación de muestras de extracto de malta caramelo con distintos microorganismos.....</i> | <i>49</i> |
| <i>Tabla 13 Resultados obtenidos durante la fermentación de muestras de extracto de malta caramelo con distintas combinaciones utilizando bacterias lácticas cerveceras.....</i> | <i>50</i> |
| <i>Tabla 14 Resultados del test de varianza para la atenuación aparente entre levadura tipo Lager y tipo Ale.....</i> | <i>51</i> |
| <i>Tabla 15 Resultados del test de varianza para la concentración final entre levadura tipo Lager y tipo Ale.....</i> | <i>52</i> |
| <i>Tabla 16 Resultados del test de varianza para la atenuación aparente entre levadura tipo Lager y el consorcio láctico.....</i> | <i>53</i> |
| <i>Tabla 17 Resultados del test de varianza para la concentración final entre levadura tipo Lager y el consorcio láctico.....</i> | <i>53</i> |
| <i>Tabla 18 Resultados del test de varianza para la atenuación aparente entre levadura tipo Ale y el consorcio láctico.....</i> | <i>54</i> |
| <i>Tabla 19 Resultados del test de varianza para la concentración final entre levadura tipo Ale y el consorcio láctico.....</i> | <i>54</i> |
| <i>Tabla 20 Resultados del test T de Student para la atenuación aparente entre levadura tipo Lager y tipo Ale.....</i> | <i>55</i> |
| <i>Tabla 21 Resultados del test T de Student para la concentración final entre levadura tipo Lager y tipo Ale.....</i> | <i>56</i> |
| <i>Tabla 22 Resultados del test T de Student para la atenuación aparente entre levadura tipo Lager y el consorcio láctico.....</i> | <i>57</i> |
| <i>Tabla 23 Resultados del test T de Student para la concentración final entre levadura tipo Lager y el consorcio láctico.....</i> | <i>58</i> |

| | |
|--|----|
| <i>Tabla 24 Resultados del test T de Student para la atenuación aparente entre levadura tipo Ale y el consorcio láctico.</i> | 59 |
| <i>Tabla 25 Resultados del test T de Student para la concentración final entre levadura tipo Ale y el consorcio láctico.</i> | 60 |
| <i>Tabla 26 Resultados del test de varianza para la atenuación aparente entre la fermentación con bacteria Lactobacillus brevis y Lactobacillus delbrueckii con levadura tipo Lager</i> | 61 |
| <i>Tabla 27 Resultados del test de varianza para la concentración final entre la fermentación con bacteria Lactobacillus brevis y Lactobacillus delbrueckii con levadura tipo Lager</i> | 62 |
| <i>Tabla 28 Resultados del test T de Student para la atenuación aparente entre la fermentación con bacteria Lactobacillus brevis y Lactobacillus delbrueckii con levadura tipo Lager</i> | 63 |
| <i>Tabla 29 Resultados del test T de Student para la concentración final entre la fermentación con bacteria Lactobacillus brevis y Lactobacillus delbrueckii con levadura tipo Lager</i> | 64 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| <i>Figura 1 Diagrama de bloques del proceso de malteo.</i> | 5 |
| <i>Figura 2 Diagrama de bloque de la producción de maltas base y maltas especiales.</i> | 6 |
| <i>Figura 3 Diagrama de bloques del proceso del extracto de malta.</i> | 7 |
| <i>Figura 4 Esquema reducido de la reacción de Maillard para la generación de color.</i> | 9 |
| <i>Figura 5 Compuestos sintetizables en una reacción de caramelización.</i> | 10 |
| <i>Figura 6 Esquema de la metodología propuesta.</i> | 15 |
| <i>Figura 7 Proceso de fermentación para extractos de malta especiales.</i> | 16 |
| <i>Figura 8 Espectrofotómetro PekinElmer [Fuente: Elaboración propia].</i> | 20 |
| <i>Figura 9 Refractómetros HANNA [Fuente: Elaboración propia].</i> | 21 |
| <i>Figura 10 Rotavapor Buchi [Fuente: Elaboración propia].</i> | 25 |
| <i>Figura 11 Extracto de malta tostada fermentado utilizado como colorante en agua.</i> | 28 |
| <i>Figura 12 Absorbancia del colorante desarrollado con extracto de malta tostada.</i> | 29 |
| <i>Figura 13 Extracto de malta caramelo fermentado utilizado como colorante en agua.</i> | 30 |
| <i>Figura 14 Absorbancia del colorante desarrollado con extracto de malta caramelo.</i> | 31 |
| <i>Figura 15 Atenuación aparente en función del microorganismo utilizado.</i> | 33 |
| <i>Figura 16 Concentración final en función del microorganismo utilizado.</i> | 35 |
| <i>Figura 17 Extractos de malta especiales fermentados por distintos microorganismos siendo utilizados como colorantes.</i> | 36 |
| <i>Figura 18 Atenuación aparente dada la combinación de microorganismos utilizados.</i> | 37 |
| <i>Figura 19 Concentración final dada la combinación de microorganismos utilizados.</i> | 38 |
| <i>Figura 20 Absorbancia del colorante desarrollado con extracto de malta caramelo fermentado con levadura tipo Lager y bacteria Lactobacillus delbrueckii.</i> | 40 |
| <i>Figura 21 Extracto de malta caramelo fermentado con levadura cervecera y bacteria láctica utilizado como colorante en agua.</i> | 40 |
| <i>Figura 22 Diagrama de bloques del proceso de producción de Cerveza</i> | 65 |

1. Introducción

1.1. Motivación

Como una manera de mejorar la productividad de su empresa, Maltexco S.A. ha comenzado a impulsar una serie de proyectos con el objetivo de generar nuevos productos para comercializar. Uno de sus proyectos busca la creación de colorantes naturales a partir de extractos de malta especiales (éste último es uno de los productos producidos por la misma empresa Maltexco), los cuales podrían ser utilizados en la industria cervecera.

El presente trabajo se centró en el desarrollo de los colorantes a partir de extractos de malta especiales, los cuales tuvieron una etapa de fermentación en su proceso de producción con el fin de mejorar sus propiedades, como el color, aroma y sabor, de manera de generar un colorante eficiente y competitivo en el mercado.

Un estudio realizado en la empresa ha demostrado la viabilidad de generar colorantes naturales a partir de extractos de maltas especiales [1] . Sin embargo, los resultados obtenidos no han sido del todo satisfactorios, dada las propiedades organolépticas de las muestras, las cuales presentan características de sabor y aroma que alteran fuertemente las características de la cerveza donde son utilizadas.

Este proyecto se ve atractivo debido a la creciente desconfianza en los colorantes artificiales, dándole a la empresa una oportunidad de ampliar y aprovechar sus líneas de producción e introducir al mercado colorantes naturales en base a extractos de maltas especiales.

1.2. La Empresa Maltexco S.A.

Fundada 1896, Maltexco S.A. (en sus inicios llamada Malterías Unidas S.A.) ha sido una empresa líder en el mercado agroindustrial en el área de alimentos y cervecería, siendo un proveedor confiable de malta y cebada a la industria.

Con plantas en la zona centro y sur del país, Maltexco se dedica a la producción de cebada malteada, extracto de malta, maltas especiales, harinas y otros derivados. La cebada malteada o simplemente malta, es la materia prima base de la cerveza. Por otro lado, el extracto de malta, debido a su sabor, color y aroma, es utilizado con el fin de mejorar las propiedades organolépticas, valor nutricional, textura y vida útil de algunos alimentos [2] .

El presente tema de memoria se llevó a cabo en la planta Talagante de la empresa Maltexco, en el Área de Desarrollo. Esta área ha impulsado una serie de proyectos que buscan generar nuevos productos a base de los productos que ya son producidos en la empresa, como es el caso de los colorantes a partir de extractos de malta especiales, o usando nueva materia prima y utilizando las líneas productivas disponibles en las 4 plantas de la empresa, como son el proceso de malteo o el proceso de extractos. Ambos procesos serán explicados más adelante (Ver 2.2 y 2.5 respectivamente).

1.3. Colorantes

Los colorantes son un tipo de aditivo utilizado en diversas industrias. En el rubro alimenticio, siendo utilizados para entregar y/o estabilizar el color de los alimentos elaborados, de manera de volverlos aceptables para el consumidor final. En general, los colorantes son utilizados para entregar un color nuevo, realzar el color natural o devolverle el color a un producto después de ser procesado.

Los colorantes se pueden clasificar en 2 categorías: los *colorantes artificiales* y los *colorantes naturales*. Aunque los colorantes artificiales habían tenido una preponderancia en el mercado alimenticio, esta tendencia ha ido cambiando en los últimos años, aumentando la producción de los colorantes naturales [3] .

1.3.1. Colorantes artificiales

Los colorantes artificiales son fabricados a partir de la adición de compuestos químicos en diversos procesos y han sido utilizados principalmente a su bajo costo económico, además de su gran versatilidad, dado que a partir de los tres colores primarios (Amarillo, rojo y azul) se pueden obtener una gran gama de colores.

En los últimos años, la utilización de estos colorantes ha sufrido una fuerte baja, debido a que estudios han demostrado que el consumo de productos con este tipo de colorantes conlleva daños a la salud, por ejemplo, pueden generar hiperactividad y falta de atención en niños [4] .

Debido a las normativas dentro de la industria alimenticia, la utilización de colorantes está regulada y cada país tiene a cargo alguna institución que autoriza y fiscaliza la utilización de los colorantes, como la FDA (Food and Drug Administration) en Estados Unidos y el Comité Científico para la Alimentación Humana de la UE en Europa.

En Chile, el uso de colorantes está regulado por el Ministerio de Salud, quien mediante el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) establece “las condiciones sanitarias a que debe ceñirse la producción, importación, elaboración, envase, almacenamiento, distribución y venta de alimentos para uso humano, con el objeto de proteger la salud y nutrición de la población y garantizar el suministro de alimentos sanos e inocuos” [5] . Algunos de los colorantes artificiales utilizados en la industria alimenticia son los siguientes:

- Tartrazina (E-102) (Tonos amarillos)
- Amarillo anaranjado (E-110) (Tonos amarillos ocaso)
- Carmoisina (E-122) (Tonos frambuesa)
- Amaranto (E-123) (Tonos rojizos)

1.3.2. Colorantes naturales

Aunque cumplen las mismas funciones que un colorante artificial, los colorantes naturales, suelen tener varias diferencias observables en su aplicación. Por un lado, los colorantes naturales suelen carecer de colores vivos, en comparación a los artificiales, además de otorgar otras propiedades al producto en el que son utilizados, tales como sabores, aromas y un aspecto

visual diferente. Estas características limitan el uso de estos colorantes cuando el objetivo solo es el cambio de color.

La obtención de estos colorantes es más compleja y costosa que la elaboración de los colorantes artificiales. Sin embargo, su origen natural los vuelve más confiables para un público cada vez más exigente respecto al origen de los alimentos que consumen.

Debido a su origen natural, la FDA considera los colorantes naturales como colorantes exentos de certificación [6] . Algunos de los colorantes naturales utilizados en la industria alimenticia son los siguientes:

- Las astaxantina, que entrega tonos entre el naranja y el rojo, proveniente de pescados y mariscos
- Las antocianinas, que entrega colores como el rojo, púrpuras y azules y proviene de uvas y algunas flores.
- Clorofila, que entrega tonos verdes y es de origen vegetal.
- Beta caroteno, que entrega tonos naranjos y se obtiene principalmente en la zanahoria.

1.3.3. Colorantes en la industria cervecera

Un tipo de colorante es el *colorante caramelo*, el cual es utilizado en la industria alimenticia para generar tonos amarillos, marrones y cafés. Debido a la gama de colores que proporciona, es aplicado principalmente en la elaboración de bebidas, productos de repostería y en la fabricación de cervezas. Este colorante se obtiene a partir del calentamiento de azúcares, en presencia de diversos compuestos, dándole el estatus de un colorante artificial. Los cuatro tipos de colorante caramelo existentes son:

- Caramelo cáustico (E150a): Obtenido a través del calentamiento de azúcares, es empleado en la coloración de licores y bebidas alcohólicas como el whisky o el ron. También es aplicado en galletas integrales y tostadas, otorgándoles una tonalidad oscura y dorada [7] .
- Caramelo cáustico de sulfito (E150b): Obtenido a través del calentamiento de azúcares con presencia de compuestos de sulfito, se utiliza en la coloración de licores como el coñac, el jerez, el brandi y la crema de whisky. También es aplicado en algunos vinagres [8] .
- Caramelo amónico (E150c): Producido por el calentamiento de azúcares con presencia de compuestos de amonio, se aplica en la industria cervecera. También es utilizado en bebidas energéticas, productos a base de cereales, salsas y en repostería [9] .
- Caramelo sulfito de amoniaco (E150d): Desarrollado por el calentamiento de azúcares con presencia de compuesto de sulfito amónico, se emplea en refrescos de cola, bebidas carbonatadas, gaseosas, sodas, tónicas, salsas, vinagre, cremas balsámicas, mostazas, mayonesa, galletas, barquillos, cereales, caramelos y pasteles [10] .

El colorante caramelo está certificado por la FDA como un producto seguro, sin embargo, algunas empresas ya han reducido su utilización y también hay investigaciones para generar colorantes sustitutos de origen natural.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimenticia (EFSA) ha reevaluado la seguridad de los cuatro tipos de colorantes caramelo comercializados (E150), determinando que, aunque estos colorantes y la mayoría de sus componentes no generan motivos de preocupación, algunos compuestos en menor cantidad podrían ser de interés y se debiera determinar sus niveles de concentración máximos [11] .

2. Antecedentes

2.1. La malta

La malta corresponde al resultado de un proceso en que la cebada es parcialmente germinada y detenida en su proceso de deshidratación. Este proceso se le conoce como malteo. Los granos de malta poseen un bajo contenido de humedad (del 2 al 5% *p/p*) y elevado poder diastático (poder enzimático otorgado principalmente por las enzimas α -amilasa y β -amilasa).

La malta es la principal fuente de almidón en el proceso cervecero, el cual es hidrolizado enzimáticamente en la etapa de maceración (Etapa en el proceso cervecero y de extractos) y fermentado por las levaduras produciendo etanol. El detalle del proceso cervecero se encuentra en el Anexo D.

Existen cinco tipos de malta denominadas base y son las Maltas Pilsen, Pale Ale, Vienna, Múnich y Belgian Munich, diferenciadas principalmente por el rendimiento de azúcares extraíbles como resultado de la degradación del almidón y por su coloración [12]. Maltexco se especializa en la producción de Malta Pilsen.

2.2. Proceso de malteo

El proceso de elaboración de la malta o malteo para una malta base consta de tres etapas principales que son remojo, germinación y secado [13], como se muestra en la Figura 1.



Figura 1 Diagrama de bloques del proceso de malteo.

Antes de iniciar el proceso de malteo, la cebada es limpiada y clasificada, con el objetivo de eliminar cualquier impureza en la materia prima, como granos dañados, hojas, ramas, etc.

En la etapa de remojo la cebada es rehidratada para activar al embrión en el interior del grano. De esta forma comienza la respiración celular y con ello el grano se prepara para la germinación. Durante esta etapa el grano adquiere una humedad final entre 42 y 45% [14]. Maltexco realiza esta etapa en tinas de aproximadamente 60 [m^3] y deja remojando los granos de cebada por aproximadamente 48 horas. Una vez que el grano alcanza su humedad final, ésta es controlada junto con la temperatura en la etapa de germinación, de manera de mantener homogéneo el desarrollo de la cebada.

Durante la germinación la humedad se mantiene cercana a un 40% y la temperatura en torno a los 15 [$^{\circ}C$], homogeneizando reiteradamente los lechos donde se dispersan los granos de cebada [14]. En esta etapa comienza la degradación de sus reservas nutritivas sintetizando enzimas las cuales hidrolizan el almidón y las paredes celulares del endospermo, proceso denominado desagregación. En la empresa Maltexco, la germinación se realiza durante 5 días aproximadamente.

Finalmente, en el secado se detiene la desagregación y se conserva la actividad enzimática del grano. Maltas con alto poder diastático son producidas a bajas temperaturas y tiempos prolongados de secado, caso contrario para maltas más oscuras con menor poder enzimático [14]. En Maltexco este proceso se realiza en hornos donde se inyecta aire a una temperatura máxima de 80 [°C]. Terminada esta etapa la malta es tratada para retirar y desechar las raicillas del grano producidas durante su germinación.

La malta producida en este proceso puede ser enviada directamente a envasado, puede pasar a un molino para producir harina de malta o llevada a una etapa de tostación para producir maltas especiales.

2.3. Maltas especiales

Las maltas especiales aportan un color, sabor y aroma que las maltas base no pueden entregar. Poseen una baja o nula actividad enzimática, por lo que son usadas en conjunto con las maltas base en la elaboración de cerveza.

Las maltas especiales se fabrican a partir de la misma cebada que las maltas bases e incluso se producen a partir de un proceso similar, sin embargo, su producción termina de manera distinta o se modifica ligeramente [15].

Las *maltas caramelo* y *maltas tostadas* son dos tipos de maltas especiales con diferentes procesos de producción. Las maltas tostadas se producen por la adición de una etapa de tostación de la malta base (después de la etapa de secado), mientras que una malta caramelo, después de la etapa de germinación (malta verde), es llevada directamente a una etapa de tostación donde se produce un caramelizado del almidón y luego un oscurecimiento por tostación. En la Figura 2 se muestra el proceso de fabricación de las maltas especiales junto a la malta base.



Figura 2 Diagrama de bloque de la producción de maltas base y maltas especiales.

Existe una gran variedad de maltas caramelo, las que se diferencian principalmente en su color. Los colores oscilan desde un rojo pálido hasta tonos pardos muy oscuros, prácticamente negros. Las diferencias de color conllevan también cambios en su perfil organoléptico. Las maltas caramelo de colores rojo pálido poseen un sabor predominantemente dulce, mientras que las maltas más oscuras son de sabores más amargos. Las diferencias dependen del nivel de caramelización alcanzado. Los niveles de caramelización se explican más adelante (Ver 2.7).

Por otro lado, Maltexco también produce cebada tostada y cebada tostada perlada. Ambos productos entran en la categoría de cebadas especiales y se producen en los mismos equipos que el resto de las maltas. La diferencia entre las maltas tostadas y las cebadas tostadas es que, una vez que la cebada es limpiada previa al proceso de remojo, ésta es enviada directamente a la etapa de tostación. Para obtener cebada perlada, la cebada pasa por un proceso de perlado, que consiste en la extracción de la cascarilla a partir de una pulidora. Estos productos son utilizados para fortalecer el sabor de otras cervezas [16] .

2.4. El extracto de malta especial

El extracto de malta es un producto desarrollado por la empresa Maltexco para ser utilizado principalmente por la industria alimenticia como un suplemento, siendo capaz de mejorar las propiedades organolépticas, el valor nutricional y la textura en distintas preparaciones [2] .

No obstante, el extracto de malta puede ser utilizado en la producción de cerveza casera. En este caso, el extracto de malta debe ser disuelto en agua para reducir su concentración para luego ser hervido. Este formato permite evitar las etapas de molienda, maceración y filtrado del proceso cervecero.

2.5. Proceso de extractos

El proceso de extracto de malta consiste en la deshidratación del mosto obtenido en la hidrólisis enzimática, de manera de obtener un concentrado. Este proceso puede ser utilizado tanto con maltas base como maltas especiales. En este último, se producen extractos de malta oscuros.

El proceso de extracto de malta para una malta especial se resume en la Figura 3 y se describe a continuación [17] .



Figura 3 Diagrama de bloques del proceso del extracto de malta.

El proceso parte con la elección de la materia prima, que puede ser malta especial o cebada tostada en su versión perlada o no perlada, es decir sin o con su cascarilla respectivamente. Una vez seleccionada, ésta pasa por un proceso de molienda seca, donde se busca reducir el tamaño de partícula hasta cumplir los estándares de granulometría necesarios en el proceso (Tamaño menor a 2,5 [mm]).

Una vez reducido el tamaño de la malta, ésta continúa con un proceso de maceración, donde ocurren las reacciones que dan origen a la hidrólisis enzimática del almidón. En esta etapa ocurre la Reacción de Maillard, mecanismo que da origen a la generación de color en el caso de las maltas base. Este mecanismo será explicado más adelante (Ver 2.6). En el caso de las maltas especiales, las reacciones predominantes dependen del tipo de malta especial utilizada. Para las maltas caramelo y maltas tostadas, la reacción predominante es la Reacción de caramelización, la cual será explicada más adelante (Ver 2.7).

El producto, llamado *macerado*, pasa a un proceso de filtrado mediante un filtro prensa con el objetivo de separar los sólidos presentes del fluido macerado. Del filtro prensa se separa una torta compuesta principalmente de las partículas sólidas provenientes de la cascara de la semilla y otras insolubles, denominada *bagazo*.

Después de la filtración se obtiene el producto líquido de interés, denominado *mosto*. Este se caracteriza por tener una concentración de 22 a 23 [°Bx]. Los grados Brix ([°Bx]) son una unidad de concentración utilizada en la industria cervecera que será explicado en detalle más adelante (Ver 2.10.2). El mosto pasa a un proceso de hervido y decantado, con el objetivo de pasteurizar, esterilizar y provocar la sedimentación de proteínas que son posteriormente separadas del mosto.

Una vez separadas las proteínas del mosto, el producto obtenido tiene una concentración que varía entre los 15 a 20 [°Bx]. Finalmente, el mosto es concentrado mediante evaporadores que separan el agua contenida en el mismo hasta que se alcanzan alguna de las siguientes condiciones: Obtener la densidad requerida y especificada de 1380 $\left[\frac{g}{cm}\right]$ o hasta alcanzar los 80 [°Bx]. Según estas condiciones, el producto puede pasar a un nuevo secador, permitiendo la salida de producto tanto líquido, como en polvo.

2.6. Reacción de Maillard y la generación de color

Reportada en 1912 por Louis-Camille Maillard, la reacción de Maillard consiste en una compleja serie de reacciones químicas que lideran la formación de sabor, olor y color, por tanto, es de vital importancia en la industria alimenticia [18] . La reacción de Maillard también es denominada como la reacción de oscurecimiento no enzimático.

Este mecanismo inicia cuando un grupo carbonilo, proveniente de azúcares presentes en las maltas, reacciona con un grupo amino de aminoácidos libres o los disponibles en las proteínas, para formar, en su primera etapa, una glucosilamina N-sustituida y luego, tras sucesivas condensaciones, un Compuesto de Amadori y agua. En esta primera etapa no se producen compuestos coloreados [18] .

La segunda etapa está influenciada por el medio, pero principalmente se produce una deshidratación y fragmentación del azúcar. En medio ácido se produce una Base de Schiff cíclica, este compuesto es inestable por lo que se libera el grupo amino. A altas temperaturas se produce una fragmentación del azúcar. Los aminoácidos se degradan por la vía de la Reacción de Strecker, especialmente a altas temperaturas formando aldehídos generados por descarboxilación

oxidativa de los aminoácidos (producción de CO_2). Al final de esta etapa aparecen compuestos que ofrecen color, denominados *melanoidinas*.

En la tercera etapa ocurre una síntesis de compuestos heterocíclicos con nitrógeno con lo que principalmente se obtiene el pardeamiento final del producto [19]. La Figura 4 muestra una representación reducida de la Reacción de Maillard, centrada en la generación de color.

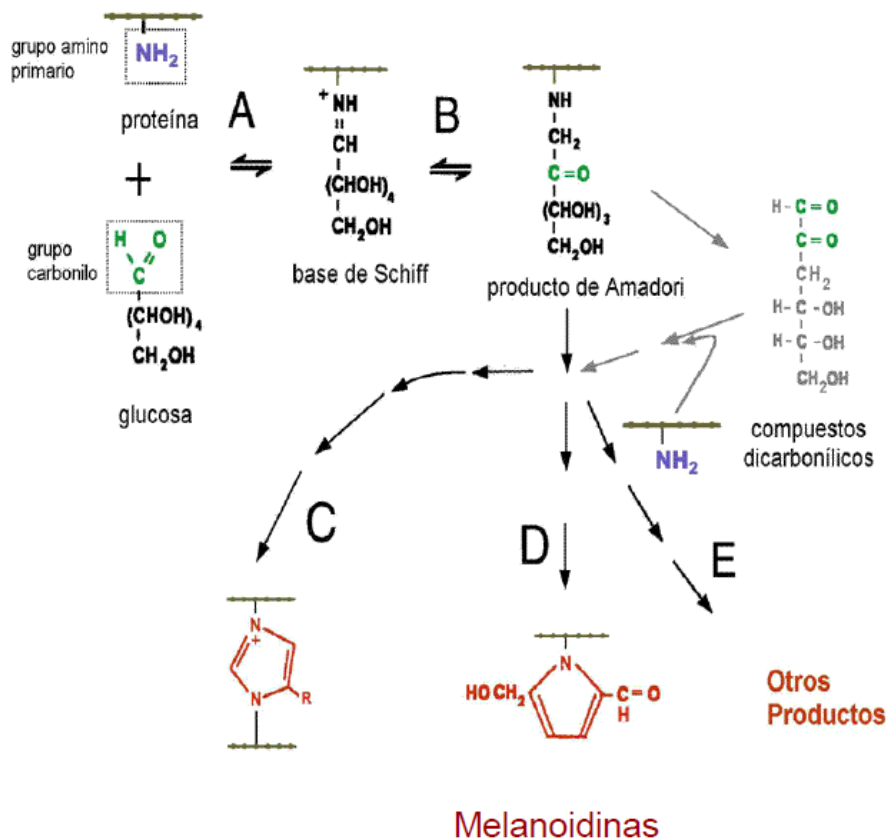


Figura 4 Esquema reducido de la reacción de Maillard para la generación de color.

Esquema de las reacciones que se producen en la reacción de Maillard [20], destacando: Formación de la base de Schiff (A), reordenamiento de Amadori (B), formación de compuestos derivados (C, D, E).

2.7. Reacción de caramelización

Conocida también como *pirolisis*, la reacción de caramelización consiste en la oxidación de azúcares a alta temperatura. Al igual que la reacción de Maillard, la reacción de caramelización es una reacción de oscurecimiento, sin embargo, esta reacción es experimentada por azúcares en ausencia de aminas [21].

El caramelo es el resultado de calentamiento (más de $150 [^{\circ}C]$) de azúcares comestibles y tiene cuatro clasificaciones según su proceso de obtención. A medida que el proceso avanza se van originando compuestos volátiles que otorgan el olor a caramelo y colores marrones.

Cuando los azúcares, ya sea en cristales o en jarabe, son sometidos a temperaturas superiores a su punto de fusión, se inician una serie de reacciones de manera simultánea. Las principales reacciones son la hidrólisis, la deshidratación y la dimerización de los productos resultantes.

Producto de la desestabilización térmica de los azúcares, aparecen dos grupos diferentes de compuestos. Los primeros son compuestos de baja masa molar formados por deshidratación y ciclación. Entre ellos se encuentran furanos y piranosas, muchos de ellos volátiles y responsables del sabor y olor típicos del caramelo. Representan entre el 5 y el 10% de los compuestos formados durante la caramelización [21]. Los otros compuestos son polímeros de azúcares de tipo muy variado y complejo, en su mayoría povidexosas y oligosacáridos de glucosa. Forman el 90 al 95% del total de compuestos formados.

La Figura 5 muestra los diversos compuestos que se sintetizan durante la caramelización según el nivel de temperatura. A medida que se aumenta la temperatura, se van sintetizando distintos compuestos, que van desde la isosacarosana, de sabor amargo, hasta la caramelina o humina, de sabor desagradable [21].

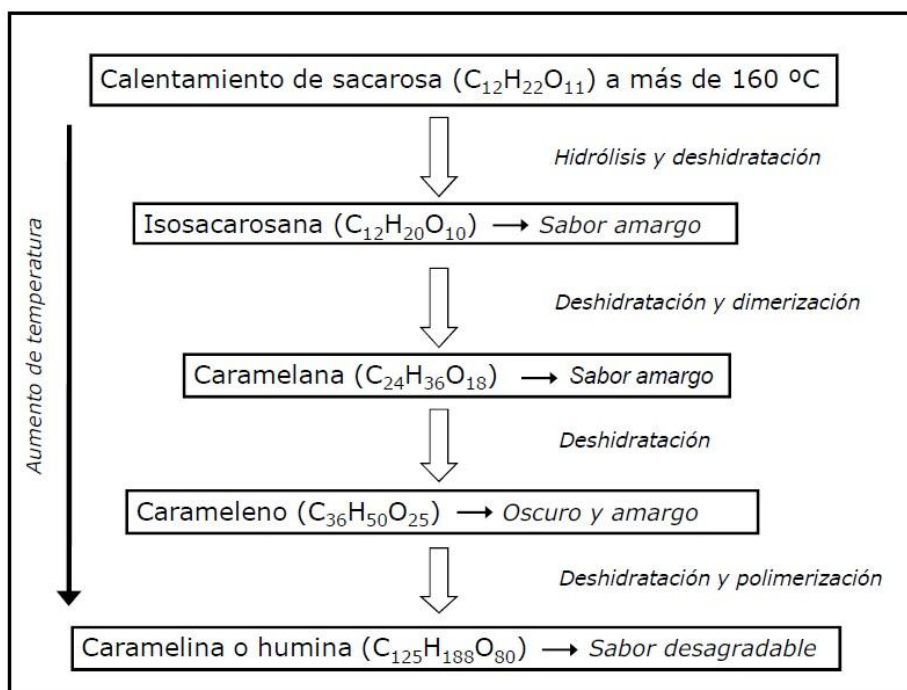


Figura 5 Compuestos sintetizables en una reacción de caramelización.

Compuestos sintetizables en una reacción de caramelización a medida que aumenta la temperatura [22].

2.8. Fermentación

La fermentación es un proceso catabólico, es decir, se rompe una molécula compleja en moléculas más simples [23] . En particular, la fermentación es un proceso biológico mediante el cual un microorganismo obtiene energía para su desarrollo a partir de una fuente de carbono.

En los seres vivos, la fermentación es un proceso que no necesita oxígeno, por lo que es considerada anaeróbica y es propia de levaduras y bacterias. Sin embargo, algunas fermentaciones se producen en el tejido muscular de los animales o los humanos cuando el aporte de oxígeno a sus células no es suficiente para el metabolismo y la contracción muscular. Desde un punto de vista energético, la fermentación es menos eficiente que la respiración celular aeróbica, puesto que la primera genera 2 moléculas de ATP (trifosfato de adenosina) a partir de una molécula de glucosa, mientras que la segunda genera 38 moléculas de ATP [24] .

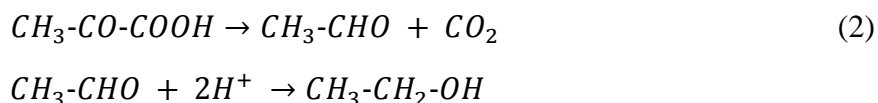
La fermentación fue utilizada por el ser humano inicialmente en la industria alimenticia, siendo usada en la producción de vino, cerveza, yogurt, queso entre otras. El proceso comienza con la transformación de la glucosa en piruvato (ácido pirúvico), proceso denominado *glucólisis*, como se muestra en la Ecuación 1. Posteriormente, el piruvato puede seguir siendo metabolizado con el objetivo de generar energía en forma de la molécula de ATP siguiendo una de las tres rutas catabólicas distintas posibles [24] . La primera ruta es la respiración aeróbica, es decir en presencia de oxígeno. Las otras dos rutas son en ausencia de oxígeno y se conocen como la *fermentación alcohólica* y *fermentación láctica*, que se detallan a continuación.



Ecuación 1 Reacción global de la glucólisis

2.8.1. Fermentación alcohólica

Esta ruta metabólica es llevada a cabo por tejidos vegetales, algunos invertebrados, protistas y microorganismos, tales como las levaduras cerveceras (*Saccharomyces*) [24] . La fermentación alcohólica se caracteriza por la transformación en ausencia de oxígeno de hidratos de carbono o azúcares en etanol, dióxido de carbono, entre otros y energía (ATP) para la célula [25] . En este proceso, el piruvato producido en la glucólisis se oxida para producir un acetaldehído y como producto residual genera alcohol etílico y dióxido de carbono. La reacción resumida de la fermentación alcohólica se muestra en la Ecuación 2.



Ecuación 2 Reacción de fermentación alcohólica.

Una de las variables más importantes para estudiar una fermentación es la densidad del extracto de malta. La transformación de la glucosa en etanol cambia el valor inicial de la densidad, reduciendo su valor a medida que se produce la fermentación.

En la industria cervecera se acostumbra utilizar el término atenuación aparente (AtAp%), el cual indica el porcentaje de azúcares consumidos por la levadura [26]. La atenuación aparente se calcula como la resta entre la densidad inicial (DI) de la muestra y su densidad posterior a la fermentación (DF) dividido por la densidad inicial menos 1, como se muestra en la Ecuación 3:

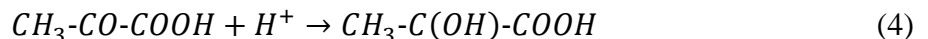
$$\text{Atenuación Aparente} [\%] = 100 * \frac{(DI-DF)}{(DI-1)} \quad (3)$$

Ecuación 3 Fórmula de la atenuación aparente en [%]

En la industria cervecera, las cervezas se pueden clasificar en dos grandes categorías, según el tipo de levadura utilizada en su fermentación. El primer tipo son las cervezas Ale, fermentadas con levadura del tipo *Saccharomyces cerevisiae*, y se denominan levaduras de fermentación alta, debido a que las levaduras trabajan en la parte superior del mosto que están fermentando. Las levaduras Ale se caracterizan por trabajar entre los 18 [°C] y los 25 [°C]. Además, la fermentación tarda entre una a dos semanas. El segundo tipo son las cervezas Lager, fermentadas con levaduras del tipo *Saccharomyces pastorianus*, y se denominan levaduras de fermentación baja, debido a que las levaduras trabajan en la parte inferior del mosto que están fermentando. Las levaduras Lager se caracterizan por trabajar en un rango de temperatura más bajo que las levaduras Ale, entre los 7 [°C] y los 12 [°C]. Por otro lado, también se diferencian por tener un mayor tiempo de fermentación, entre tres semanas a un mes [27].

2.8.2. Fermentación láctica

La fermentación láctica es una ruta metabólica donde el piruvato se reduce para producir lactato (anión del ácido láctico), como se muestra en la Ecuación 4. Este proceso es realizado por bacterias (Bacterias lácticas), hongos, muchos tejidos animales y vegetales [25].



Ecuación 4 Reacción de fermentación láctica.

Este tipo de fermentación es responsable de la elaboración de productos lácteos acidificados ya que el ácido láctico tiene excelentes propiedades conservantes para los alimentos. Esta fermentación es llevada a cabo por levaduras lácticas del tipo *Lachancea* y por bacterias lácticas del tipo *Lactobacillus*.

Antes que se utilizaran las levaduras Ale o Lager en la fermentación de la cebada (más bien no se tenía el conocimiento de los microorganismos involucrados en la fermentación), las cervezas se fabricaban mediante una fermentación natural, produciendo las denominadas

cervezas “salvajes”, las cuales fermentaban de manera natural con los microorganismos presentes en el mosto. Algunas de las especies más comunes eran los microorganismos del tipo *Brettanomyces*, *Pediococcus*, *Acetobacter* y *Lactobacillus*, estas últimas, de fermentación láctica, todavía son utilizadas en procesos de producción de cerveza en países como Alemania y Bélgica, obteniendo nuevos sabores y aromas en las cervezas [28] .

2.9. Colorantes a partir de extractos de malta especiales

Un estudio realizado en la empresa Maltexco ha determinado que los extractos de malta especiales pueden ser utilizados como colorante natural, sin embargo, los colores obtenidos no son competitivos con ningún colorante caramelo presente en el mercado. El mismo estudio plantea la modificación del proceso de producción de los extractos de malta especiales incluyendo una etapa de fermentación posterior al hervido y decantado [1] . Durante esta experiencia, uno de los parámetros que mejor reflejó el rendimiento de los colorantes fue la *absorbancia*, que es una medida que refleja cómo se atenúa la radiación lumínica cuando atraviesa un elemento.

Además, un ensayo a escala laboratorio ha demostrado que la fermentación puede generar un cambio efectivo en el colorante, reduciendo levemente la viveza de su color y alterando otras características del colorante, como su aroma y propiedades organolépticas, compatibles con la fabricación de cerveza [29] .

Aunque las condiciones del ensayo no estuvieron reguladas, se observa como el tipo de levaduras es clave en la fermentación, por sobre a otros parámetros de operación, como la temperatura dentro del fermentador. Finalmente, se destaca que las pruebas realizadas en la empresa fueron realizadas con maltas tostadas y cebada tostada perlada.

3. Objetivos

3.1. *Objetivo general*

Estudiar las condiciones necesarias para desarrollar colorantes naturales a partir de la fermentación de extractos de malta especiales.

3.2. *Objetivos específicos*

1. Establecer las condiciones de fermentación para extractos de malta especiales.
2. Estandarizar los resultados de la fermentación de extractos de malta especiales.
3. Obtener distintos colorantes a partir de extractos de malta especiales fermentados con distintos microorganismos.
4. Determinar el mejor microorganismo para producir colorantes a partir de extractos de malta especiales fermentados.

4. Metodología

Para lograr todos los objetivos planteados, se diseñó la siguiente metodología general, la cual consta de 4 etapas principales. Las etapas de la metodología se muestran a continuación en la Figura 6.

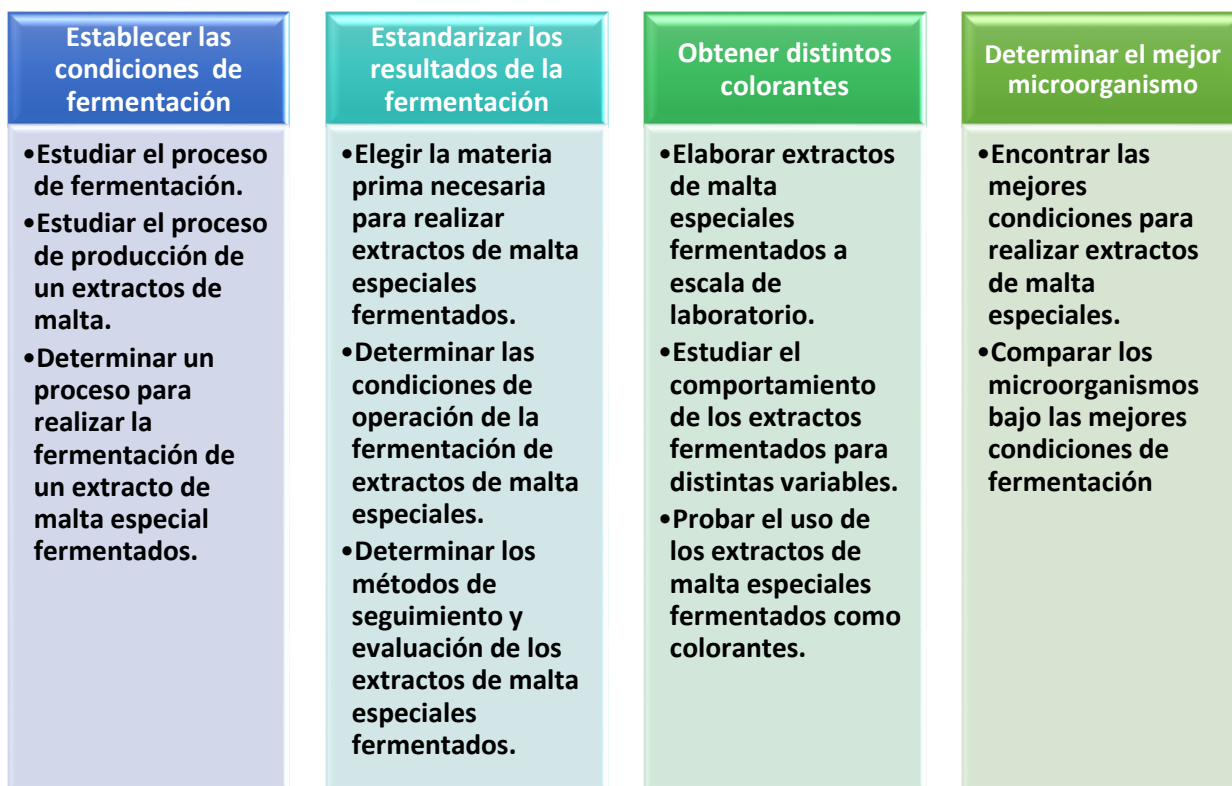


Figura 6 Esquema de la metodología propuesta.

Para establecer las condiciones de fermentación, fue necesario realizar una búsqueda bibliográfica para familiarizarse con el proceso fermentación y también con el proceso de extractos de malta, con el objetivo de determinar un proceso para producir los extractos de malta especiales fermentados.

Para la estandarización de los resultados de la fermentación se hizo necesario elegir la materia prima necesaria para llevar a cabo las fermentaciones, entre ellas los tipos de extracto de malta especial y los microorganismos encargados de la fermentación. Posteriormente, se determinaron las condiciones de operación del proceso de fermentación de las muestras y los métodos de seguimiento y evaluación de los extractos de malta especiales fermentados producidos.

Para la obtención de distintos colorantes se debió elaborar los extractos de malta especiales fermentados a escala de laboratorio, de manera de estudiar su comportamiento según las variables de operación utilizadas para finalmente probar el uso de los extractos de malta especiales fermentados como colorantes.

Para determinar el mejor microorganismo para la fermentación fue necesario encontrar las mejores condiciones para producir extractos de malta especiales fermentados. Bajo esas condiciones elaborar colorantes a partir de extractos de malta especiales fermentados a mayor escala para finalmente realizar un análisis sensorial de los colorantes producidos.

4.1. Establecimiento de las condiciones de fermentación

Para establecer las condiciones de fermentación de los extractos de malta especiales se debió realizar un estudio bibliográfico del proceso de fermentación con el fin de entender como la fermentación era capaz de mejorar las propiedades de los extractos de malta especiales y poder ser utilizados como colorantes naturales. De la literatura se desprende que la fermentación, según su tipo, es capaz de cambiar las propiedades organolépticas de un alimento.

La fermentación alcohólica transforma los azúcares presentes en el alimento en etanol y dióxido de carbono. Al perder azúcares se reduce el sabor del alimento, mientras que el etanol y el dióxido de carbono ayudan a eliminar otros compuestos volátiles producidos en la reacción de Maillard, como son las pirazinas, compuesto producido al final de la reacción y uno de los responsables del aroma del alimento [19] . Para la fermentación láctica se tiene el antecedente que las bacterias ácido lácticas son conocidas por tener un efecto adverso en las cervezas, reduciendo su sabor y aroma [30] .

Dado lo anterior, se concluye que tanto la fermentación alcohólica como la fermentación láctica son buenas alternativas para mejorar las propiedades organolépticas de los extractos de malta especiales para ser utilizados como colorante natural. A su vez, se debió estudiar el proceso de extracción de la malta, con el objetivo de detectar un punto en el proceso en que se pudiera añadir una etapa de fermentación. La Figura 7 muestra el proceso de fermentación desarrollado para producir extractos de malta especiales fermentados.



Figura 7 Proceso de fermentación para extractos de malta especiales.

Del estudio bibliográfico se determinó que la fermentación solo podía ser realizada posterior a la etapa de hervido y decantado, puesto que en esta etapa se obtiene el extracto puro, el cual es concentrado en la etapa de evaporación y por tanto la única diferencia con la etapa anterior es la cantidad de agua presente en el extracto. Lo anterior también es posible debido a que el proceso de extracto es análogo al proceso cervecero y en este caso, la etapa de hervido y decantado tiene su símil con la etapa de cocción del proceso cervecero.

A pesar de lo anterior, se decidió que cualquier tipo de fermentación debía iniciar posterior a la concentración, ya que la empresa Maltexco ya disponía de extractos de malta especiales puros para ser utilizados como muestras. Sin embargo, como una manera de facilitar y estandarizar el trabajo sobre los extractos, se decidió que el proceso debía iniciar con una etapa de dilución, reduciendo la concentración de los extractos previa a la fermentación.

Por otro lado, se debía incluir una etapa de hervido para esterilizar el extracto de malta especial diluido. Una vez realizada esta etapa, era posible realizar la fermentación del extracto de malta especial. Ésta fermentación, de carácter anaeróbica, podía ser realizada por cualquiera de los microorganismos disponibles, entre los que se destacan las levaduras cerveceras y las bacterias lácticas.

Posterior a la fermentación, el extracto fermentado debe volver a ser concentrado. Esta concentración no solo elimina el agua añadida previamente en la dilución, sino también elimina compuestos producidos en la fermentación, como el alcohol producido durante la fermentación alcohólica, dado que el punto de ebullición del alcohol etílico ($78\text{ }^{\circ}\text{C}$) es menor al del agua ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$). También la concentración asegura la eliminación de las levaduras o bacterias utilizadas en la fermentación, debido a que la concentración se realiza por evaporación, asegurando la eliminación de las especies más volátiles, como los alcoholes.

4.2. Estandarización de los resultados de la fermentación

Para estandarizar los resultados a obtener en la fermentación de los extractos de malta especiales, primero se debía definir las materias primas del proceso de fermentación, tanto las maltas especiales a utilizar, como los microorganismos.

Sobre la elección de las maltas especiales a evaluar, la empresa Maltexco produce cuatro tipos distintos: malta tostada, malta caramelo, cebada tostada perlada y cebada tostada. Al principio de la investigación se había decidido trabajar con las tres primeras, puesto que se disponían extractos puros de esas tres maltas especiales. Sin embargo, a modo de reducir los tiempos de experimentación y acotar el trabajo a desarrollar, se decidió trabajar únicamente con malta caramelo y malta tostada. Las maltas especiales utilizadas estaban disponibles en formato líquido concentrado, hechas especialmente para la investigación de colorantes previo a este trabajo [1]. Estos extractos de malta tostada de 1200 [EBC] y malta caramelo de 700 [EBC] fueron producidos en la planta Temuco de la empresa Maltexco mediante el proceso de extractos explicado anteriormente (Ver 2.5). Ambos extractos se encontraban a una concentración cercana a los $80\text{ }^{\circ}\text{Bx}$.

Para la elección de los microorganismos para la fermentación, primero se decidió trabajar con levaduras cerveceras, puesto que estaban disponibles en la empresa debido a sus relaciones con el rubro cervecero. En particular, la empresa Maltexco disponía levaduras del tipo *Saccharomyces cerevisiae*, tanto del tipo Ale, como del tipo Lager. Los nombres comerciales de las levaduras son Ale 514 y Lager 497, pertenecientes al proveedor de levaduras Mauri Yeast Australia. Adicionalmente se decidió probar con la levadura PDM, del tipo *Saccharomyces bayanus*, utilizada en la elaboración de vino y que también realiza fermentación alcohólica, sin embargo, se consideró oportuna para comparar los resultados entre levaduras del tipo

Saccharomyces. Esta levadura tiene por nombre comercial PDM, perteneciente al mismo proveedor que las levaduras Ale y Lager utilizadas.

Además, se adquirieron cepas de las bacterias lácticas *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus delbrueckii*, con el objetivo probar el efecto de la fermentación láctica en los extractos de malta especiales. Comercialmente, las bacterias utilizadas tienen los nombres WLP672 *Lactobacillus brevis* y WLP677 *Lactobacillus delbrueckii*, pertenecientes al proveedor de levaduras y especialista en procesos de fermentación White Labs Inc.

No obstante, para probar los efectos de la fermentación láctica de manera somera se compraron cápsulas del fármaco Multiflora Plus, el cual está conformado por un consorcio de bacterias del tipo *Lactobacillus*, entre las que destacan las *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* entre otras. Cabe destacar que, aunque estas cápsulas contienen una gran variedad de bacterias lácticas, tanto su función como su formato no fueron diseñados para fermentar alimentos. Una vez definida la materia prima de la fermentación, seguía definir las condiciones de operación con que se realizaron las fermentaciones. La Tabla 1 muestra un resumen de todas las especies utilizadas durante la memoria.

A escala de laboratorio, la fermentación se realizó en tres formatos. El primero se realizó en matraces de 500 [ml], en donde se depositaron muestras de 300 [ml]. El segundo formato era realizado en tubos tipo Falcon de 50 [ml], en donde se realizaron fermentaciones con muestras de 30 [ml]. Adicionalmente se disponía un tercer formato en fermentadores de 30 [l], los cuales fueron utilizados para realizar producir las muestras que fueron sometidas a los análisis sensoriales.

En cuanto a la temperatura de fermentación, ninguno de los tres formatos anteriores disponía de un control de temperatura. No obstante, todas las pruebas fueron desarrolladas en el Laboratorio de Desarrollo de Maltexco, el cual dispone de aire acondicionado y su temperatura oscila entre los 18 a 23 [°C]. También se debe mencionar que ningún formato consta con un sistema de agitación o aireación en su interior. Dado lo anterior se decidió por realizar una fermentación de tipo anaeróbica sin agitación, lo cual es acorde al formato utilizado en la industria cervecera.

Con los puntos anteriores desarrollados, a continuación, se procedió a definir los métodos de seguimiento y evaluación de los parámetros y variables más importantes en la producción de extractos de malta especiales fermentados. Para el seguimiento de la fermentación, se tiene que las variables más importantes son el cambio en la concentración en grados Brix y la atenuación aparente. Finalmente, para la medición del color en unidades EBC, se debe obtener la absorbancia de las muestras y transformar el valor de absorbancia en color EBC.

Tabla 1 Especies fermentadoras utilizados

| Espece | Nombre científico | Tipo de microorganismo | Tipo de Fermentación | Formato |
|--------------------------------|----------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Levadura Ale 514 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Levadura cervecera | Fermentación alcohólica | Polvo granulado |
| Levadura Lager 497 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Levadura cervecera | Fermentación alcohólica | Polvo granulado |
| Levadura PDM | <i>Saccharomyces bayanus</i> | Levadura vinícola | Fermentación alcohólica | Polvo granulado |
| Bacteria WLP672 | <i>Lactobacillus brevis</i> | Bacteria ácido láctica | Fermentación láctica | Concentrado en ampollas |
| Bacteria WLP677 | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> | Bacteria ácido láctica | Fermentación láctica | Concentrado en ampollas |
| Fármaco Multiflora Plus | Consortio de varias especies | Consortio lácticas | Fermentación láctica | Polvo encapsulado |

4.2.1. Herramientas de medición para el estudio de colorantes

4.2.1.1. Medición de color

Existen tres unidades para la medición de color de las maltas y cervezas: Escala Lovibond [°L], escala SMR y escala EBC.

La escala Lovibond es una de las primeras medidas utilizadas y esta busca determinar el color por comparación entre el color de la luz transmitida a través de un determinado espesor de grasa o aceite líquido (puede ser el mosto o la cerveza) y el color de la luz originada por la misma fuente, transmitida a través de vidrios coloreados estandarizados [31]. El hecho que la medición del color dependiera de la percepción de una persona que realizaba la comparación, generaba incoherencias a menudo en los resultados.

Un método más estandarizado es el Método de Referencia Estándar o SMR por sus siglas en inglés. Este método usa la espectrofotometría como base de su medición (grados SMR) y son lineales con los grados Lovibond con factor 1 [32].

La escala EBC (European Brewing Convention) es el método utilizado para informar el color de los productos elaborados por Maltexco y lo utiliza para medir el color de los mostos. El método se basa en la medición de la extinción o absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de 430 [nm] y la multiplicación por 25 [33]. Para maltas base su rango de medición varía entre 3,6 y 25,3 unidades de EBC. Para maltas caramelo pueden medir valores cercanos a 130 [EBC] sin necesidad de diluir. Por otro lado, las maltas tostadas requieren de un proceso de dilución

antes de su medición, lo que cambia su color original. Lo anterior es un problema a la hora de calcular el color de maltas oscuras, en particular la malta tostada, puesto que se ha reportado que no existe una relación lineal en el cambio de color que experimenta el mosto producto de la dilución [34]. Para calcular el color de las maltas caramelo más oscuras se debe medir la absorbancia de un *mosto congreso* (50% malta base, 50% malta especial) de la malta caramelo en una cubeta de 25 [mm], se calcula el color en *EBC* y luego se multiplica por 2 (y por el factor de dilución *F* en caso de ser necesario) y finalmente se resta el color de la malta Pilsen utilizada en el mosto congreso. La Ecuación 5 muestra el cálculo:

$$\text{Color Malta Caramelo [EBC]} = (\text{ABS}_{430 \text{ nm}} * 25 * 2 * F) - (\text{Color Malta Pilsen [EBC]}) \quad (5)$$

Ecuación 5 Formula para el color de una malta caramelo en [EBC].

La Ecuación 5 es válida para colores de hasta los 500 [EBC]. Para obtener la absorbancia de una muestra, la empresa Maltexco dispone de un espectrofotómetro PerkinElmer, el cual permite medir la absorbancia a una longitud de 430 [nm] en una cubeta de 10 [nm]. El equipo utilizado se aprecia en la Figura 8.



Figura 8 Espectrofotómetro PekinElmer [Fuente: Elaboración propia].

4.2.1.2. Medición de concentración

Una medida útil para representar el contenido de azúcares en un mosto son los grados Brix. Los grados Brix indican la presencia de sacarosa dentro de una solución. Un grado Brix (1 [°Bx]) representa a 1 [g] de sacarosa en 99 [g] de solución, por tanto, es una concentración porcentual peso-peso (% w/w) [35].

Para medir la concentración en grados Brix se debe utilizar un refractómetro, el cual es un instrumento óptico basado en el principio de refracción de la luz. La empresa Maltexco dispone de varios refractómetros HANNA, los cuales tienen distintos umbrales de medición (Hay refractómetros de 0 a 25 [°Bx] y de 45 a 82[°Bx]). La Figura 9 muestra algunos refractómetros de la empresa Maltexco.



Figura 9 Refractómetros HANNA [Fuente: Elaboración propia].

4.2.2. Análisis sensorial

El análisis o evaluación sensorial es una disciplina utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de los alimentos y otras sustancias, que son percibidas por los sentidos humanos, es decir la *vista*, el *tacto*, el *olfato*, el *gusto* y el *oído* [36] . En palabras más simples, el análisis sensorial es el análisis de los alimentos u otros materiales a través de los sentidos [36] .

Dada las características que se desean analizar, el análisis sensorial no puede realizarse únicamente mediante métodos instrumentales, puesto que todavía no se conocen todas las respuestas que tiene el ser humano ante los productos alimenticios. Por lo anterior, el desarrollo de esta disciplina se debió a la necesidad de utilizar al ser humano como instrumento objetivo para la caracterización cualitativa o cuantitativa de los alimentos.

Para cualquier alimento, ya sea comestible o bebestible, existen cinco atributos primarios que integran su calidad sensorial, los que son el aspecto, el *sabor*, el *olor*, la *textura* y el *flavor*. Los cuatro primeros se pueden considerar una respuesta a un órgano sensorial concreto: vista, gusto, olfato y tacto respectivamente. Por otro lado, el flavor se define como un conjunto de percepciones constituidas por estímulos olfativos, gustativos, táctiles y cinestésicos (experiencia sensorial percibida a través de los músculos de la cavidad bucal) [37] . Por otro lado, algunos autores entienden el sabor como una interacción entre el olfato y el gusto principalmente, aunque también influye el tacto (sensación termina, textura) [38] . Información reportada respecto al sabor y olor de los alimentos se presenta a continuación.

4.2.2.1. El sabor de los alimentos

Para este estudio, se entenderá el sabor de un alimento como la combinación de sensaciones químicas que se perciben en la cavidad bucal con la intervención de las papilas gustativas. Para que una sustancia química ofrezca sabor, debe cumplir los siguientes requisitos [37] :

- Ser soluble en agua.
- Tomar contacto con el receptor, una vez disuelto en la saliva.
- Disponer de una estructura química concreta, aunque no existe una regla general respecto a este punto.

Las papilas gustativas presentes en la lengua son capaces de percibir cuatro tipos de sabores, los cuales son considerados los cuatro sabores fundamentales: *dulce*, *salado*, *ácido* y *amargo*. Las papilas gustativas asociadas al sabor dulce se ubican fundamentalmente en la punta de la lengua; a continuación de la lengua, en los bordes, se encuentran las papilas gustativas del sabor salado; posteriormente, le siguen las del sabor ácido; al final, en la zona central de la lengua, se ubican las del sabor amargo. No obstante, algunos autores consideran un quinto sabor básico, denominado *umami*, del cual no se han reportado la ubicación exacta de las papilas gustativas receptoras de este sabor, aunque se han caracterizado algunos compuestos que lo producen [37] .

Se ha comprobado que la sensibilidad de las papilas gustativas varía según los diferentes estímulos, esto implica que los receptores gustativos solamente responden cuando la intensidad del estímulo correspondiente supera cierto nivel. En base a lo anterior, para reconocer un sabor determinado generado por una sustancia química específica, ésta debe superar un nivel de concentración mínimo, denominado *umbral absoluto*, el cual varía según el tipo de sabor y la sustancia. El umbral más bajo los disponen los sabores amargos (0,00003 [g] de sulfato de quinina en 100 [ml] de agua) y el más alto los sabores salados (0,2 [g] de cloruro de sodio en 100 [ml] de agua).

Por otro lado, también es variable la velocidad a la que tiene lugar la percepción consciente de un sabor, una vez que la sustancia ha tomado contacto con la lengua. Esto permite hablar de sabores inmediatos (como la acidez del ácido nítrico) y sabores lentos (como la acidez del ácido málico).

Los sabores básicos son capaces de generar distintas sensaciones de placer o desagrado, según la concentración de agente saborizante. Para ello, se utiliza el denominado umbral de reconocimiento, el cual indica la concentración necesaria para llegar a reconocer un sabor específico. Se han establecido soluciones patrones cuya concentración proporciona una identificación correcta del estímulo:

- Dulce: Sacarosa al 0,5%.
- Salado: Cloruro de Sodio al 0,1%.
- Ácido: Ácido Tartárico al 0,002%.
- Amargo: Cafeína al 0,015%.

4.2.2.2. El olor de los alimentos

Para este estudio, se entenderá el olor de los alimentos como el estímulo provocado por sustancias volátiles liberadas desde un alimento en el sentido del olfato, localizado en la cavidad nasal [37]. Para que un compuesto sea oloroso, este ha de ser volátil y llegar hasta la interacción física con el correspondiente receptor, situado en el epitelio nasal.

El sentido del olfato resulta extraordinariamente sensible para detectar olores, pues le bastan unas pocas moléculas de una sustancia volátil para generar la sensación de olfativa, que abarca un número indefinido de olores cualificados. Su sensibilidad va más lejos que la de cualquier instrumento analítico y es capaz de detectar compuestos volátiles a concentraciones molares tan ínfimas (10^{-18} [M]), que vienen a ser veinte mil veces menores que las necesarias para percibir el sabor [37].

El umbral de percepción de un olor varía con la naturaleza de la sustancia y también con la forma en que el olor entra en contacto con el receptor olfativo. También hay que señalar que no todos los compuestos volátiles que llegan a la cavidad nasal son capaces de conectar con su receptor. Se sabe que el ser humano es capaz de distinguir entre 2000 a 4000 impresiones olfativas diferentes, posibles gracias a la estimulación generada por 17000 sustancias odoríferas existentes [37].

Un olor puede ser el resultado de una combinación de numerosos compuestos volátiles, de los cuales cada uno por separado presenta un olor particular. Las diferencias entre olores se deben, en parte, a las distintas proporciones de cada compuesto volátil presente. Aquellos compuestos presentes en un alimento que sean responsables de las propiedades olorosas esenciales, reciben el nombre de *compuestos con carácter de impacto*, aunque la mayoría de ellos todavía no han sido identificados [37].

No ha sido definido de manera exacta la naturaleza química de las sustancias capaces de estimular el sentido del olfato. Hasta ahora, solo se puede afirmar que son sustancias orgánicas cuyos pesos moleculares oscilan entre los 15 y 300 [37].

4.3. Obtención de colorantes

Siguiendo el proceso propuesto en la Figura 7, se procedió a producir distintos extractos de malta especiales fermentados a escala de laboratorio.

Las primeras experiencias de laboratorio corresponden a fermentaciones realizadas en fermentadores de 30 [l] y tenían por objetivo tener una idea somera del comportamiento de la fermentación para distintos parámetros y principalmente aprender a utilizar los equipos e instrumentos de medición a utilizar durante todo el trabajo experimental. Fueron un total de dos fermentaciones, usando levadura tipo Ale y fermentando a distinta concentración inicial. Dado que el fermentador no disponía ningún sistema para regular la temperatura, se observó el comportamiento de la fermentación a la temperatura del Laboratorio de Desarrollo de Maltexco. Posterior a esta experimentación de carácter inductivo, se procedió a realizar dos diseños experimentales.

El primer diseño fue considerado para realizar pruebas en malta tostada. Este diseño consideró el uso de levaduras tipo Ale y Lager. Los extractos de malta tostada variaban su concentración inicial en tres valores distintos, como resultado de la dilución: 20, 25 y 30 [°Bx]. Además, las muestras tuvieron un volumen de 300 [ml] y contenían 1 [g] de levadura por litro de muestra, el cual es agregado posterior a la etapa de hervido de la muestra. Posteriormente, los extractos fueron fermentados por un periodo de 7 días. Toda muestra tuvo una réplica de manera de dar mayor validez a los resultados, dando un total de 12 fermentaciones.

El segundo diseño fue considerado para realizar pruebas en malta caramelo. Este diseño consideró el uso de levaduras tipo Ale, Lager y PDM. Los extractos de malta caramelo variaban su concentración inicial en tres valores distintos, como resultado de la dilución: 20, 25 y 30 [°Bx]. Las muestras tuvieron un volumen de 300 [ml] y contenían 1 [g] de levadura por litro de muestra. Posterior a la etapa de hervido, los extractos fueron fermentados por un periodo de 7 días. Al igual que el primer diseño, cada muestra tuvo una réplica y, por ende, se realizaron 12 fermentaciones.

Ambos diseños fueron realizados en paralelo y tuvieron por objetivo ver el comportamiento de la concentración inicial de las muestras y el tipo de microorganismo fermentador como variable de entrada. Adicionalmente los resultados entre ambos diseños eran comparables de manera de comparar el comportamiento de la malta tostada y la malta caramelo. El comportamiento de las variables de entrada fue analizado según la atenuación aparente de las muestras, la cual se obtuvo midiendo las densidades iniciales y finales de cada muestra utilizando un picnómetro.

Posterior a cada fermentación, las muestras fueron concentradas por medio de un rotavapor Buchi, disponible en el Laboratorio de Calidad de Maltexco, el cual opera a un máximo de 100 [°C]. La Figura 10 muestra el equipo utilizado para concentrar. La muestra concentrada fue utilizada para observar el comportamiento del extracto fermentado como colorante, del cual se obtuvo el valor de las absorbancias mediante el espectrofotómetro mencionado previamente y se realizó un análisis sensorial preliminar de los colorantes. Las mediciones de absorbancia se realizaron añadiendo por goteo una cantidad de extracto fermentado concentrados en 150 [ml] de agua destilada. Cabe destacar la necesidad de diluir los extractos fermentados concentrados nuevamente debido a que el espectrofotómetro tiene un rango de validez de absorbancia entre 0 y 2, muy por debajo del valor del extracto fermentado concentrado original. El valor obtenido por espectrofotometría permitió el cálculo del color de los extractos fermentados en unidades EBC sin dilución de manera aproximada.



Figura 10 Rotavapor Buchi [Fuente: Elaboración propia].

4.4. Determinación del mejor microorganismo

Los resultados demostraron que, de manera somera, la levadura tipo Lager presentaba mejor fermentación que el resto de las levaduras disponibles.

Para corroborar el resultado anterior y trabajar con otro tipo de microorganismos, se realizó un tercer diseño experimental, el cual constó con el microorganismo fermentador como única variable de entrada. En esta oportunidad, se trabajó con las tres levaduras utilizadas anteriormente (Ale, Lager y PDM) y además del consorcio láctico presente en las capsulas de Multiflora Plus. Este diseño fue realizado en malta caramelo y consideró extractos a una concentración de 17 [°Bx], un volumen de 25 [ml], una masa de 4 [g] de microorganismo por litro de muestra (esta proporción fue elegida debido la cantidad de consorcio láctico presente en cada capsula de Multiflora Plus). Este formato permitió la preparación de cuatro réplicas por muestra y así dar mayor solidez a los resultados obtenidos. Además, se hizo el seguimiento de una muestra de extracto libre de microorganismos, de manera de contrastar los resultados con las muestras fermentadas.

De los extractos fermentados obtenidos se estimó la densidad final de la muestra, concentración final de la muestra y absorbancia de la muestra, de manera de obtener la atenuación aparente y las diferencias de color entre las muestras. También, dada la cantidad de datos, fue posible realizar un análisis estadístico para comparar los resultados obtenidos en relación a la atenuación aparente y concentración final. Los análisis estadísticos utilizados fueron el análisis de varianza (ANOVA) [39] y la prueba t-student [40]. Ambas herramientas de análisis se encuentran disponibles en el software Excel.

Con la información obtenida, se realizó un cuarto diseño experimental, la cual también tuvo a los microorganismos fermentadores como una variable de entrada. Sin embargo, en esta oportunidad se trabajó solo con la levadura tipo Lager y con las dos bacterias lácticas utilizadas en procesos cerveceros *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus delbrueckii*, que estaban a disposición. El objetivo de este diseño era observar el efecto de las bacterias lácticas en los colorantes y comparar su efecto combinado con la levadura tipo Lager. Este diseño fue realizado con malta caramelo con una concentración inicial de 20,8 [°Bx] y un volumen de 300 [ml] por fermentación. La cantidad de levadura utilizada fue de 1 [g] por litro de muestra y de 1,8 [ml] de bacteria láctica por litro de muestra (Esta relación fue elegida según la proporción sugerida por el fabricante). Las muestras que solo contuvieron bacterias lácticas usaron el doble de bacterias para compensar la diferencia. Cada muestra constó de dos réplicas más una muestra libre de microorganismos.

De los extractos fermentados obtenidos se midió la densidad final, concentración final y absorbancia de las muestras, al igual que en la experiencia anterior. En este caso, también se realizó un análisis estadístico para comparar los resultados.

Finalmente, el extracto fermentado que mostró los mejores resultados en términos de fermentación, fue concentrado de manera de obtener un colorante para realizar un análisis sensorial y realizar mediciones de absorbancia.

5. Resultados y Discusión

5.1. Primera experiencia: Malta tostada

En la Tabla 2 se muestra un resumen de los resultados obtenidos indicando el tipo de levadura utilizada en la fermentación, la concentración inicial de la muestra al momento de la fermentación, la atenuación aparente promedio obtenida y la desviación estándar entre las muestras. El detalle con los valores obtenidos en esta experiencia se encuentra en el Anexo A.1. El valor de atenuación aparente promedio corresponde al valor promedio obtenido entre las dos muestras a igual concentración inicial y fermentada con el mismo microorganismo.

Tabla 2 Atenuación aparente promedio obtenida para malta tostada.

| Levadura | Concentración Inicial [$^{\circ}Bx$] | Atenuación Aparente Promedio [%] (2 valores) | Desviación Estándar |
|----------|--|---|---------------------|
| Ale | 20 | 12,70 | 4,49 |
| Ale | 25 | 26,73 | 1,40 |
| Ale | 30 | 27,24 | 0,57 |
| Lager | 20 | 18,25 | 1,12 |
| Lager | 25 | 26,24 | 9,10 |
| Lager | 30 | 28,46 | 2,30 |

Lo primero a destacar es como la atenuación aparente aumenta a medida que aumenta la concentración inicial para ambos tipos de levaduras. Este fenómeno se debe a que, a mayor concentración inicial, aumenta la cantidad de azúcares fermentables presentes en la muestra y por consiguiente aumenta la cantidad de alcohol etílico producido, lo que se expresa en un mayor valor de atenuación aparente. Es importante recordar que esta tendencia debe tener un valor límite en que, una concentración lo suficientemente alta, inhibe los microorganismos presentes, reduciendo la fermentación de los azúcares. Se ha reportado como la concentración de sustrato inicial influye durante la fermentación alcohólica [41].

Por otra parte, se aprecia una mayor atenuación aparente para las muestras fermentadas con levaduras tipo Lager en 20 y 30 [$^{\circ}Bx$], sin embargo, la tendencia no se mantiene a 25 [$^{\circ}Bx$]. Inicialmente se podría considerar a la levadura Lager como un microorganismo de mejor fermentación que la levadura Ale, sin embargo, la desviación estándar es muy grande para los valores obtenidos. Este gran error se explica no solo por la baja cantidad de réplicas, sino también por la forma en que fueron desarrolladas las muestras, las cuales empezaron su fermentación en distintos tiempos y, aunque se trató de corregir los errores por diferencia de temperatura, se generó una diferencia entre las réplicas desarrolladas.

También es apreciable como la diferencia entre levaduras es mayor a 20 [°Bx] que las obtenidas a concentraciones mayores, donde incluso los valores obtenidos son cercanos entre sí. Esto hace suponer que la concentración inicial máxima posible para realizar la fermentación de los extractos es cercana a estos valores y, por consiguiente, sería razonable realizar fermentaciones a concentraciones menores, no solo para evitar acercarse a la concentración máxima posible, sino para que la diferencia entre microorganismos sea más visible. La diferencia será más visible a bajas concentraciones iniciales debido a que al reducir la cantidad de azúcares fermentables iniciales, también se reduce la cantidad total de alcohol que se puede generar independiente del tiempo que dure la fermentación y la falta de agitación de las muestras.

En cuanto al comportamiento de estos extractos como colorantes, se eligió uno de los extractos para realizar pruebas sensoriales preliminares y medición de su absorbancia. El extracto elegido fue un extracto fermentado con levadura tipo Ale con una concentración inicial de 30 [°Bx], debido a la alta atenuación aparente obtenida (cercana al 30 %) y por presentar una desviación estándar menor que los resultados con levadura tipo Lager a la misma concentración (del orden de 0,57).

La prueba del extracto de malta tostada fermentada utilizada como colorante fue realizada en agua, de manera de comprobar fácilmente un cambio en su color, sabor o aroma. La Figura 11 muestra la prueba realizada, donde se añadieron pequeñas cantidades del colorante desarrollado. La cantidad de colorante aumenta en 0,3 [ml] en cada vaso, siendo el primer vaso de izquierda a derecha una muestra de agua 150 [ml] sin colorante, mientras que el último vaso acumula 1,2 [ml] de colorante en 150 [ml] de agua.



Figura 11 Extracto de malta tostada fermentado utilizado como colorante en agua.

Se observa como a medida que aumenta la cantidad de colorante, se obtiene un color más oscuro. Cabe destacar el cambio de color entre el agua sin colorante y el agua con solo una gota de colorante, la cual tenía un volumen de 0,3 [ml]. El análisis sensorial preliminar arrojó una ausencia de sabor y aroma en todas las muestras, lo que fue catalogado como un buen resultado para el colorante, puesto que los colorantes comerciales se caracterizan por su baja influencia en el sabor y aroma en la mezcla en que se encuentren.

Para analizar el cambio de color en detalle, la Figura 12 presenta los valores de absorbancia medidos para cada muestra diluida. La figura muestra una clara tendencia al alza a medida que aumenta la concentración, con una pendiente 0,1007, es decir que una gota de colorante (0,3 [ml] de colorante) aumenta en 0,1 la absorbancia del agua coloreada con extracto de malta tostada fermentada. Se ha determinado que esta tendencia no se mantiene a altas concentraciones, dado que los colorantes alcanzan una cantidad de saturación que indica su punto de mayor rendimiento [42] .

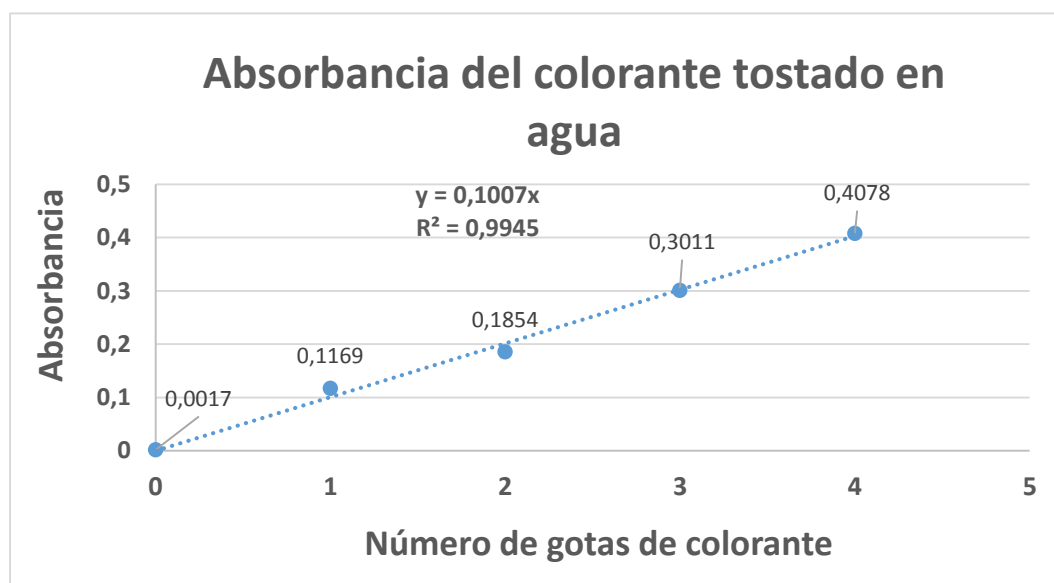


Figura 12 Absorbancia del colorante desarrollado con extracto de malta tostada.

5.2. Segunda experiencia: Malta caramelo

En la Tabla 3 se muestra un resumen de los resultados obtenidos indicando el tipo de levadura utilizado en la fermentación, la concentración inicial de la muestra al momento de la fermentación, la atenuación aparente promedio obtenida y la desviación estándar entre las muestras. El detalle con los valores obtenidos en esta experiencia se encuentra en el Anexo A.2. El valor de atenuación aparente promedio corresponde al valor promedio obtenido entre las dos muestras a igual concentración inicial y fermentada con el mismo microorganismo.

Al igual que en la primera experiencia, se observa un alza en la atenuación aparente a medida que aumenta la concentración inicial de la muestra. Al igual que en el caso anterior, este fenómeno se explica por la mayor concentración de azúcares fermentables presentes en la muestra al inicio de la fermentación.

Luego, si se comparan los resultados entre las distintas levaduras, la levadura Lager presenta valores más altos que las levaduras Ale y PDM cuando la concentración inicial fue de 20 y 30 [°Bx], puesto que a 25 [°Bx], la levadura Ale obtiene una mayor atenuación aparente al final de la fermentación. Sin embargo y al igual que en la primera experiencia, la desviación

estándar es muy grande como para asegurar que un microorganismo sea mejor que el resto, en particular a concentraciones iniciales altas donde la diferencia entre las levaduras es menor.

Tabla 3 Atenuación aparente promedio obtenida para malta caramelo.

| Levadura | Concentración Inicial [$^{\circ}Bx$] | Atenuación Aparente Promedio [%] (2 valores) | Desviación Estándar |
|----------|--|--|---------------------|
| Ale | 20 | 18,05 | 5,05 |
| Ale | 25 | 25,04 | 2,77 |
| Ale | 30 | 29,46 | 2,19 |
| Lager | 20 | 22,03 | 3,24 |
| Lager | 25 | 23,08 | 1,55 |
| Lager | 30 | 29,46 | 1,10 |
| PDM | 20 | 18,32 | 2,00 |
| PDM | 25 | 23,00 | 4,24 |
| PDM | 30 | 26,38 | 1,67 |

Para realizar las pruebas como colorante, se eligió una muestra fermentada con levadura Lager con una concentración inicial de 30 [$^{\circ}Bx$], dada su alta atenuación aparente (cercana al 30%) y menor desviación estándar (del orden de 1,1). La Figura 13 muestra los ensayos del extracto fermentado siendo utilizado como colorante. La cantidad de colorante aumenta en 0,3 [ml] en cada vaso, siendo el primer vaso de izquierda a derecha una muestra de agua 150 [ml] sin colorante, mientras que el último vaso acumula 1,2 [ml] de colorante en 150 [ml] de agua.



Figura 13 Extracto de malta caramelo fermentado utilizado como colorante en agua.

Visiblemente, se observa un comportamiento similar al del extracto de malta tostada fermentada. Por un lado, se observa tonos más opacos a medida que aumenta la concentración de colorante, aunque también se aprecia que los colores obtenidos con el extracto de malta caramelo son de menor intensidad que los obtenidos con malta tostada. Este fenómeno se ve reflejado comúnmente en el color de las cervezas fabricadas con maltas especiales, ya que las cervezas oscuras son producidas con malta tostada y las cervezas ámbar son hechas con malta caramelo. Por otro lado, el análisis sensorial arrojó una ausencia de sabor y aroma, lo que cataloga al extracto de malta caramelo fermentado como un buen colorante, aunque su nivel de coloración es visiblemente menor que el colorante de extracto de malta tostada fermentada.

A continuación, la Figura 14 presentan los resultados del análisis espectrofotométrico, entregando los valores de absorbancia obtenidos para cada ensayo.

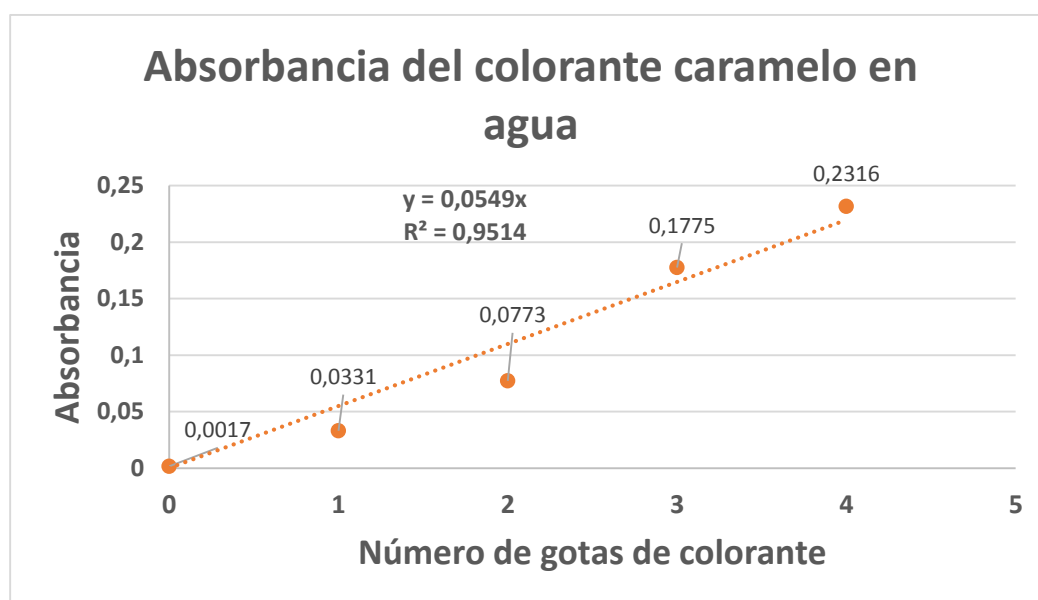


Figura 14 Absorbancia del colorante desarrollado con extracto de malta caramelo.

Los resultados muestran la misma tendencia al alza de manera lineal a medida que aumenta la concentración de colorante, pero con una pendiente de 0,0549. Al igual que los resultados del extracto de malta tostada, esta tendencia lineal era esperable debido al alto nivel de dilución de los ensayos y además es esperable que a diluciones altas esta tendencia se pierda.

Por otro lado, se aprecian valores de absorbancia menores para igual concentración de colorante en comparación con los resultados del extracto de malta tostada fermentada. La pendiente de la recta obtenida para el extracto de malta tostada es cercana a 0,1, mientras que la obtenida para el extracto de malta caramelo es del orden de 0,05, claramente inferior al anterior y corroborando el hecho que las maltas tostadas, debido a su tonalidad más oscura, presentan mayor absorbancia a igual concentración.

Finalmente, y dado que ambas experiencias se realizaron en paralelo, a continuación, se presentan algunos resultados de manera de comparar los valores obtenidos entre las dos maltas especiales. La Tabla 4 y la Tabla 5 resumen las atenuaciones aparentes obtenidas para las levaduras Ale y Lager respectivamente, según el tipo de extracto de malta especial fermentado. En ambos casos se aprecia una mayor atenuación aparente para la malta caramelo sobre la malta tostada, excepto para una concentración inicial de 25 [°Bx]. Era esperable que el extracto de malta caramelo tuviera mayor fermentación, dada la mayor concentración de azúcares fermentables presentes generados en la etapa de caramelización, proceso que no ocurre durante una etapa de tostación. No obstante, esta diferencia de azúcares no fue cuantificada.

Tabla 4 Atenuación aparente promedio obtenida con levadura Ale.

| Concentración Inicial [°Bx] | Atenuación Aparente Malta Tostada | Atenuación Aparente Malta Caramelo |
|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 20 | 12,70 | 18,05 |
| 25 | 26,73 | 25,04 |
| 30 | 27,24 | 29,46 |

Tabla 5 Atenuación aparente promedio obtenida con levadura Lager.

| Concentración Inicial [°Bx] | Atenuación Aparente Malta Tostada | Atenuación Aparente Malta Caramelo |
|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 20 | 18,25 | 22,03 |
| 25 | 26,24 | 23,08 |
| 30 | 28,46 | 29,46 |

El hecho que, para todos los resultados en ambas experiencias, se observe una tendencia distinta a una concentración inicial de 25 [°Bx], hace suponer un error experimental al momento de desarrollar las experiencias, dado que no hay motivo aparente para este comportamiento a esta concentración.

Sin embargo, se puede concluir que, a una concentración inicial de 20 [°Bx], es más apreciable la diferencia entre las distintas levaduras. La Tabla 6 muestra la diferencia obtenida para las fermentaciones realizadas con extracto de malta caramelo. También se observan mejores resultados a mayor concentración inicial, aunque la diferencia entre los microorganismos se reduzca. Además, se observa una mayor fermentación en los extractos de malta caramelo fermentados sobre los extractos de malta tostada fermentados.

Tabla 6 Diferencia entre los valores obtenidos de atenuación aparente para distintas levaduras en extractos de malta caramelo

| Concentración Inicial [$^{\circ}Bx$] | Atenuación Aparente promedio obtenida para Levadura Ale | Atenuación Aparente promedio obtenida para Levadura Lager | Diferencia |
|--|---|---|------------|
| 20 | 18,05 | 22,03 | 3,98 |
| 25 | 25,04 | 23,08 | 1,96 |
| 30 | 29,46 | 29,46 | 0,00 |

5.3. Tercera experiencia: Comparación entre distintos Microorganismos

La Figura 15 muestra los resultados obtenidos durante la tercera experiencia, indicando los valores obtenidos de atenuación aparente para cada microorganismo. Para mostrar de mejor manera los resultados, se decidió utilizar un gráfico de cajas para presentar los valores de atenuación aparente obtenidos. Esto fue posible debido a que en esta experiencia se realizaron cuatro réplicas por microorganismo. La equis dentro de la caja indica el valor promedio obtenido entre las cinco repeticiones. El detalle de estos resultados se encuentra en el Anexo A.3.

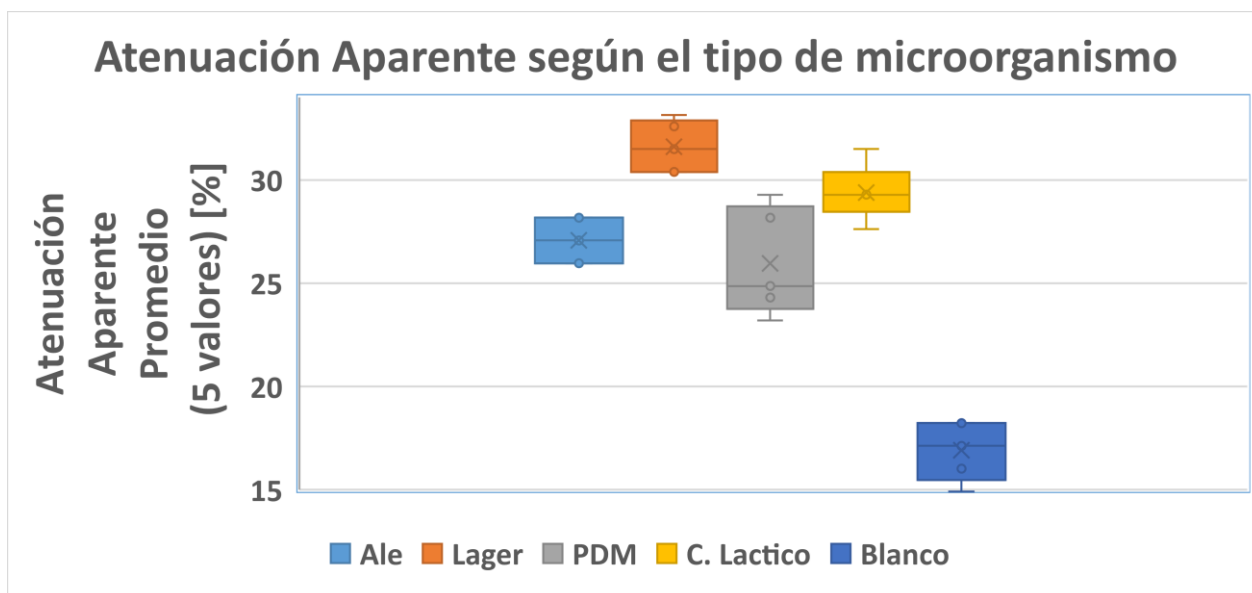


Figura 15 Atenuación aparente en función del microorganismo utilizado.

Lo primero a destacar es la clara diferencia entre las muestras que fermentaron, ya sea con una levadura o con el consorcio láctico, en comparación a las muestras sin fermentación (Blanco). La reducción de la atenuación aparente que presentaron las muestras sin fermentar se debe al agua añadida al momento de iniciar las fermentaciones. Esto se debió porque las levaduras requerían cierta cantidad de agua para rehidratarse antes de iniciar la fermentación. Dado que la fermentación se realizó en tubos tipo Falcon de 45 [ml], el volumen de agua añadido no era despreciable en comparación a la utilizada en fermentaciones de mayor volumen. Para

compensar esta diferencia, se añadió la misma cantidad de agua a las muestras sin microorganismos, resultando en un cambio de densidad.

También se aprecia una mayor atenuación aparente en las fermentaciones con levadura Lager respecto al resto de los microorganismos, dando validez a los resultados obtenidos anteriormente. Este fenómeno se explica por las características de la fermentación de las levaduras tipo Lager. Las levaduras tipo Lager se caracterizan por depositarse al fondo del fermentador, a diferencia de las levaduras tipo Ale que se mantienen en la superficie. Los extractos de malta especiales desarrollados tendieron a decantar cierta cantidad de azúcares después de un periodo de tiempo después que fueron diluidos, debido a que los fermentadores, matraces y tubos tipo Falcon no recibieron ningún tipo de agitación. Este hecho permitió a las levaduras tipo Lager estar más expuesta a los azúcares fermentables y, por ende, tener una mayor fermentación durante todo el periodo que duró la experiencia. Para corroborar esta hipótesis, una muestra de extracto de malta caramelo diluida hasta una concentración de 20 [°Bx] se mantuvo intacta por un periodo de una semana. El último día, se tomaron dos muestras del extracto, una en su superficie y otra en el fondo del matraz donde fue guardado. Una medición de concentración de ambas muestras arrojó que la muestra tomada desde la superficie del extracto de malta caramelo tenía una concentración de 19,4 [°Bx], mientras que la muestra tomada desde el fondo del matraz presentaba una concentración de 22,4 [°Bx], es decir, una diferencia de 3 [°Bx], lo que comprueba que existe una mayor concentración de azúcares en la parte baja del recipiente utilizado como fermentador. Este efecto puede reducirse si el fermentador tuviera una forma de agitación constante.

Además, se aprecia que el consorcio láctico presenta la segunda mejor atenuación aparente promedio, siendo un resultado auspicioso para estos microorganismos, dado que su formato no era el apropiado para realizar una fermentación. Para dar mayor validez estos resultados, se presentan las concentraciones finales promedio obtenidas para las distintas muestras. La Figura 16 muestra los resultados mediante un gráfico de caja. Nuevamente se observa la diferencia entre las muestras fermentadas y las muestras sin fermentar, las cuales redujeron levemente su concentración debido al agua añadida para compensar el agua utilizada en la hidratación de las levaduras.

También se observa una menor concentración final en las muestras fermentadas con levadura tipo Lager. Esta baja en la concentración es señal de una mayor fermentación de azúcares y, por ende, razonable con las conclusiones observadas en la atenuación aparente de las mismas muestras. Sin embargo y aunque el consorcio láctico vuelve a tener un mejor resultado que las levaduras Ale y PDM, esta diferencia no es del todo apreciable como en el caso anterior. Este suceso podría explicarse por el funcionamiento de los refractómetros utilizados para medir la concentración. El principio del funcionamiento de los refractómetros se basa en la refracción de la luz y en particular los refractómetros están hechos para medir la refracción de la luz a través de una muestra líquida con concentración de azúcares. Una fermentación alcohólica genera alcohol etílico, mientras que la fermentación láctica genera ácido láctico. Ambos compuestos alteran la refracción al momento de la medición, lo que lleva al refractómetro a medir valores levemente más altos que el valor real.

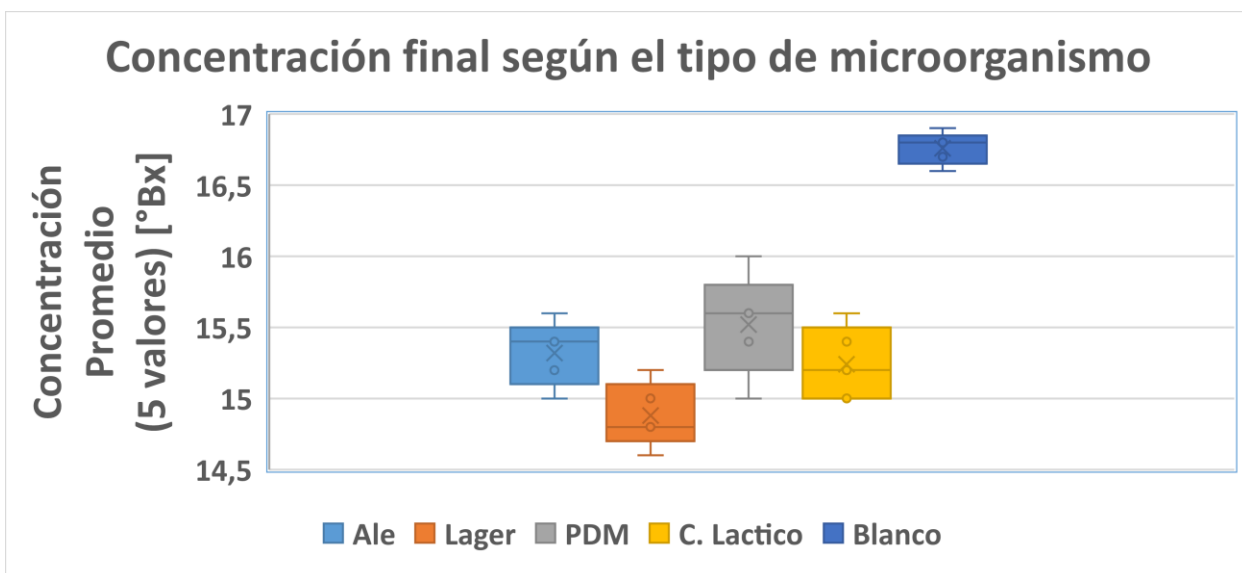


Figura 16 Concentración final en función del microorganismo utilizado.

Hasta el momento, este fenómeno no había sido considerado, puesto que todas las fermentaciones eran del tipo alcohólica y, por tanto, todas eran afectadas de la misma manera. Sin embargo, la composición del ácido láctico puede generar una alteración mayor al alcohol etílico. No obstante, se sigue destacando la ventaja del consorcio láctico debido a su formato y utilidad ajenas a una fermentación.

Para corroborar las diferencias observadas en ambos gráficos, se realizó un estudio estadístico, de manera de comprobar si la diferencia existente entre las levaduras Lager, Ale y el consorcio láctico eran reales o aleatorias. Para ello, se realizó un análisis de varianza y un análisis T de Student con los datos disponibles. Los resultados del p-valor de ambas metodologías se presentan en la Tabla 7 y la Tabla 8 respectivamente. El detalle de los resultados de ambos análisis se puede encontrar en el Anexo B.

Tabla 7 Resultados del análisis de varianza.

| | Lager - Ale | Lager - C. Láctico | Ale - C. Láctico |
|----------------------------|-------------|--------------------|------------------|
| Concentración final | 0,016 | 0,049 | 0,620 |
| Atenuación aparente | 0,000 | 0,029 | 0,019 |

Tabla 8 Resultados del análisis T de Student.

| | Lager - Ale | Lager - C. Láctico | Ale - C. Láctico |
|----------------------------|-------------|--------------------|------------------|
| Concentración final | 0,008 | 0,024 | 0,310 |
| Atenuación aparente | 0,000 | 0,015 | 0,009 |

Como se había supuesto, los resultados con levadura tipo Lager son diferentes a los resultados con levadura tipo Ale y el consorcio láctico, arrojando todos los p-valor menor a 0,05 (incluso menor a 0,01 en algunos casos). Sin embargo, al comparar los resultados entre la levadura Ale y el consorcio láctico, el p-valor solo marca diferencia en la atenuación aparente (0,019 y 0,009), mientras que los valores para la concentración final no marcan mayor diferencia (0,620 y 0,310). Este resultado es acorde al planteamiento desarrollado anteriormente.

Finalmente, y para observar el efecto de los microorganismos en el color de las muestras, se midió la absorbancia para cada uno de ellos por espectrofotometría. Debido a que las muestras obtenidas no tenían la misma concentración final, lo que hace que los valores de absorbancia obtenidos no sean comparables, se eligió una muestra por cada microorganismo, eligiendo muestras que presentaran igual concentración o que no presentaran más de 2 décimas de diferencia hacia arriba. En este último caso, se añadió agua destilada de manera de igualar las concentraciones.

Sin embargo, debido a la baja cantidad de muestras comparables, los datos obtenidos fueron descartados. Este error en el procedimiento impidió validar los resultados obtenidos con un mayor nivel de precisión, dado que la sensibilidad del espectrofotómetro otorga información más precisa sobre el efecto de los colorantes que la observación directa. En cuanto a este análisis, no se aprecia una diferencia entre las muestras al momento de ser utilizadas como colorantes. La Figura 17 muestra los distintos extractos siendo usados como colorantes. En todos los casos se utilizó la misma concentración de extracto fermentado en la misma cantidad de agua (0,5 [ml] de colorante en 50 [ml] de agua). Además del análisis visual, un análisis sensorial preliminar arroja una ausencia de sabor y aroma en todas las muestras fermentadas, mientras que la muestra sin fermentar, presenta un leve cambio de sabor y aroma, lo que corrobora los resultados de las experiencias 1 y 2, asegurando que la fermentación de los extractos de malta elimina sabores y aromas no deseados en un colorante.

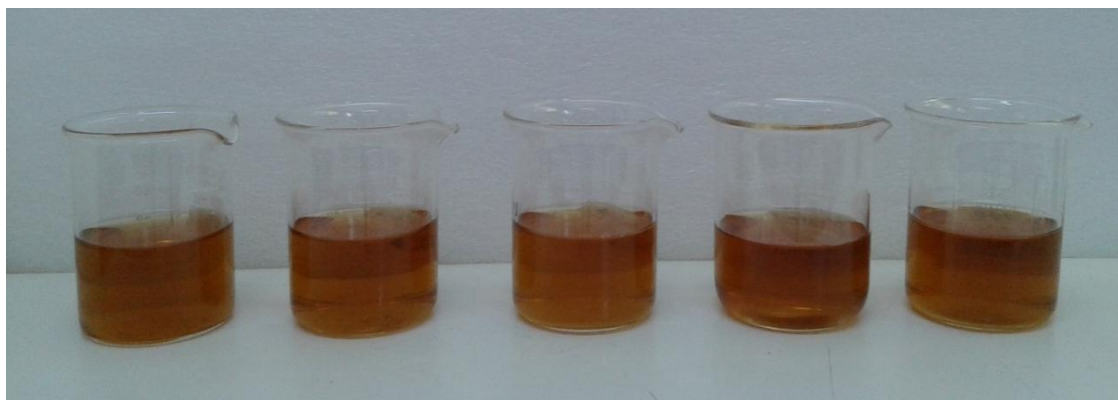


Figura 17 Extractos de malta especiales fermentados por distintos microorganismos siendo utilizados como colorantes.

De izquierda a derecha, los tipos de microorganismo fueron: Ale, Lager, PDM, consorcio láctico y extracto sin fermentar.

5.4. Cuarta Experiencia: Bacterias Lácticas

La Figura 18 muestra los resultados obtenidos durante la cuarta experiencia. Nuevamente los resultados son presentados en un gráfico de caja y bigote. En el gráfico se presentan los resultados de la fermentación láctica con las dos bacterias lácticas por separado y su combinación con la levadura cervecera. En este caso, no se incluyó en el gráfico la atenuación aparente de la muestra sin microorganismos, puesto que no presentó una variación significativa en su densidad, sin embargo, hubo una variación al alza en su densidad, lo que arrojó una atenuación aparente negativa y cercana a cero. En cada fermentación se realizaron dos repeticiones adicionales, con excepción de la muestra sin fermentar que no tuvo repeticiones. El detalle de los resultados se encuentra en el Anexo A.4.

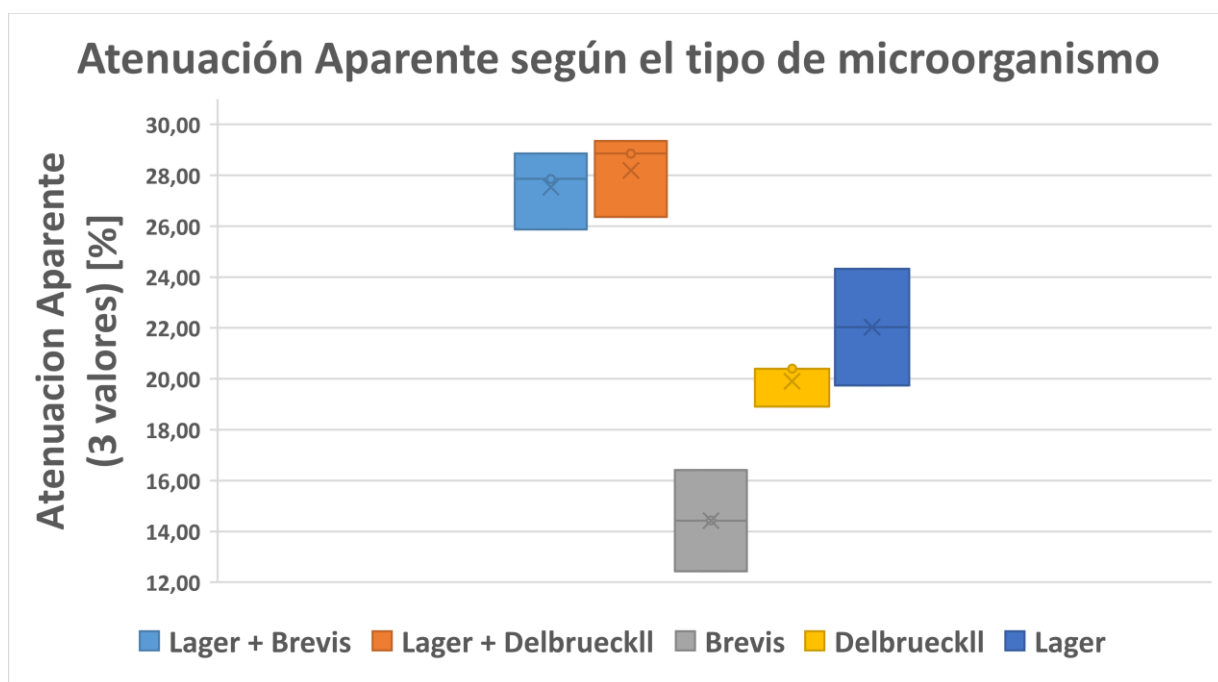


Figura 18 Atenuación aparente dada la combinación de microorganismos utilizados.

Los resultados muestran que las bacterias lácticas, tanto la *Lactobacillus brevis* como la *Lactobacillus delbrueckll*, tuvieron una menor fermentación que los extractos fermentados con levadura tipo Lager. Esto se debió a que las bacterias lácticas fermentaban principalmente en la zona superior de los fermentadores debido a la diferencia de densidad entre el medio en que se encontraban las bacterias y el extracto a fermentar.

Por otro lado, todas las fermentaciones presentaron una atenuación aparente menor a la experiencia anterior. Esto se debe principalmente a la menor concentración inicial de azúcares y la mayor cantidad de extracto, puesto que esta experiencia se realizó en matraces con 300 [ml] de muestra en vez de los 25 [ml] de muestra en las fermentaciones realizadas en tubos Falcon. No obstante, las muestras que contenían tanto la levadura como las bacterias lácticas presentaron resultados mucho mejores, siendo incluso los mejores resultados obtenidos en términos de fermentación para un extracto fermentado con una concentración inicial de 20 [°Bx]. Este resultado fue posible porque la levadura tipo Lager fermenta en la parte baja del fermentador,

mientras que las bacterias lácticas fermentan en la superficie. Este comportamiento permite que los microorganismos fermenten en zonas distintas del fermentador, consumiendo azúcares en distintos espacios al mismo tiempo, sin entrar en una competencia por ellos. Dado este resultado, no solo se acepta que las levaduras tipo Lager son el mejor microorganismo para fermentar los extractos de malta especiales, sino también que esta fermentación puede ser mejorada en presencia de las bacterias lácticas. Cabe destacar que esta aseveración es válida por ahora únicamente para fermentaciones sin agitación. Un medio agitado no permitiría la división natural entre levaduras cerveceras y bacterias, lo que podría generar una competencia entre los microorganismos por alimentarse.

Para respaldar los resultados obtenidos, la Figura 19 presenta las concentraciones finales obtenidas en la experiencia. Nuevamente los resultados asociados a la muestra original sin fermentar no fueron incluidos, puesto que no presentó variación, presentando una concentración final igual a la inicial.

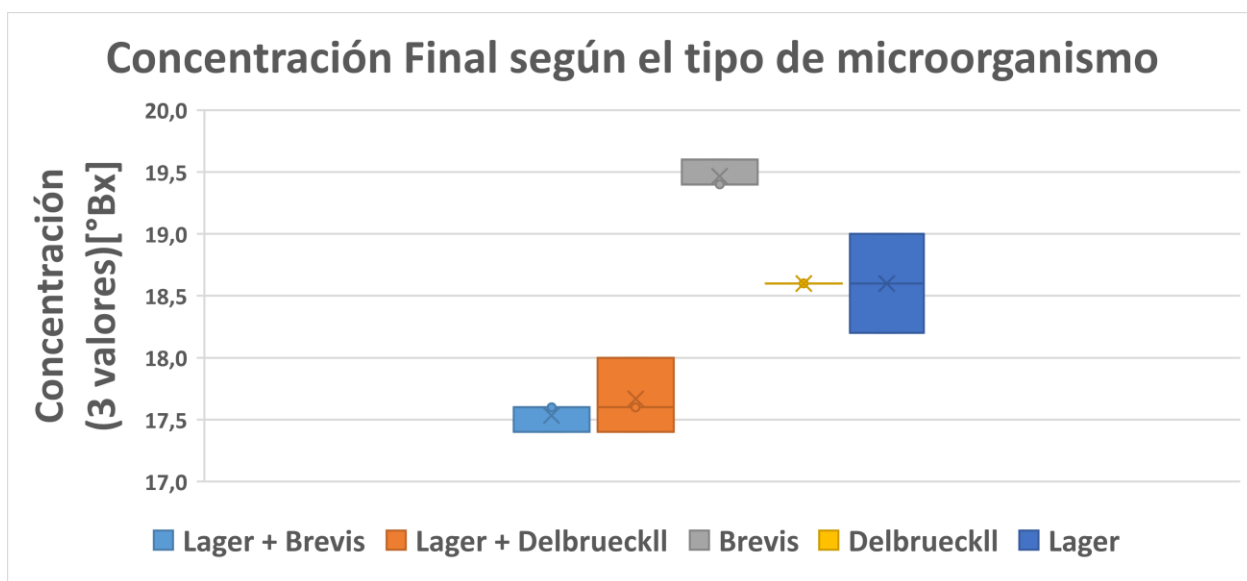


Figura 19 Concentración final dada la combinación de microorganismos utilizados.

Los resultados muestran el mismo comportamiento visto en las fermentaciones según su atenuación aparente. En este caso, la concentración final que presenta menor variación se encuentra en los extractos fermentados con la bacteria láctica *Lactobacillus brevis*, luego le sigue la bacteria *Lactobacillus delbrueckll* junto con la levadura Lager, aunque esta última presenta una mayor variación en sus resultados. Por otro lado, también se observa que los extractos que redujeron en mayor medida su concentración de azúcares fueron las muestras fermentadas tanto con levadura tipo Lager, como con bacterias lácticas, lo que respalda los resultados presentados anteriormente.

No obstante, tanto para la atenuación aparente como con la concentración final, los resultados obtenidos para las muestras fermentadas con dos tipos de microorganismo presentan resultados muy similares, en contraste con los resultados independientes de cada bacteria. Por separado, la bacteria *Lactobacillus delbrueckll* muestra tanto una mayor atenuación aparente

como una menor concentración final que la bacteria *Lactobacillus brevis*. En cambio, y dada la similitud de los resultados obtenidos para las fermentaciones con levadura y bacteria combinadas, se realizó un estudio estadístico para comparar los resultados entre estas fermentaciones, el cual es presentado en la Tabla 9. El detalle del estudio estadístico se encuentra en el Anexo C.

Tabla 9 Resultados del estudio estadístico para las fermentaciones alcohólicas y lácticas combinadas.

| | Test de Varianza | Test T de Student |
|----------------------------|------------------|-------------------|
| Concentración final | 0,519 | 0,265 |
| Atenuación aparente | 0,630 | 0,315 |

Como se puede observar, en ningún test se obtuvo un p-valor inferior a 0,05, por tanto, no se puede establecer una diferencia entre las fermentaciones combinadas bajo los parámetros de concentración final de azúcares o de atenuación aparente.

Para obtener el efecto de los extractos fermentados obtenidos como colorantes, se midió la absorbancia de una de las muestras para cada fermentación realizada, mediante espectrofotometría. Sin embargo, al igual que en la experiencia anterior, la falta de repeticiones y las diferencias entre las concentraciones de las muestras hace que los valores obtenidos por espectrofotometría no sean comparables, por lo que los resultados fueron descartados.

Finalmente, el mejor extracto fermentado obtenido mediante el uso de la levadura tipo Lager y la bacteria láctica *Lactobacillus delbrueckii* fue concentrado para ser utilizado como colorante. El extracto fermentado concentrado obtenido alcanzó una concentración no medible con los refractómetros disponibles, lo que indica que su concentración es superior a los 75 [°Bx]. Este concentrado fue utilizado como colorante de la misma manera que los concentrados obtenidos en la primera y la segunda experiencia. De las muestras coloreadas, se obtuvo la absorbancia de cada una, la cual es presentada en la Figura 20.

Los resultados muestran que el colorante obtenido tiene un comportamiento lineal más menos hasta la sexta gota de colorante, es decir, un volumen cercano a 1,8 [ml]. La pendiente de la recta es aproximadamente 0,2, es decir que un aumento de una gota de extracto (0,3 [ml]), genera un aumento en la absorbancia de 0,2. Ésta pendiente es mayor que las pendientes obtenidas por los colorantes desarrollados en las experiencias anteriores, por tanto, el colorante desarrollado presenta un mayor poder de coloración. Por otro lado, la misma recta presenta un coeficiente de correlación cercano a 0,96, lo que asegura un bajo margen de error. La Figura 21 muestra al colorante desarrollado siendo utilizado en muestras de agua.

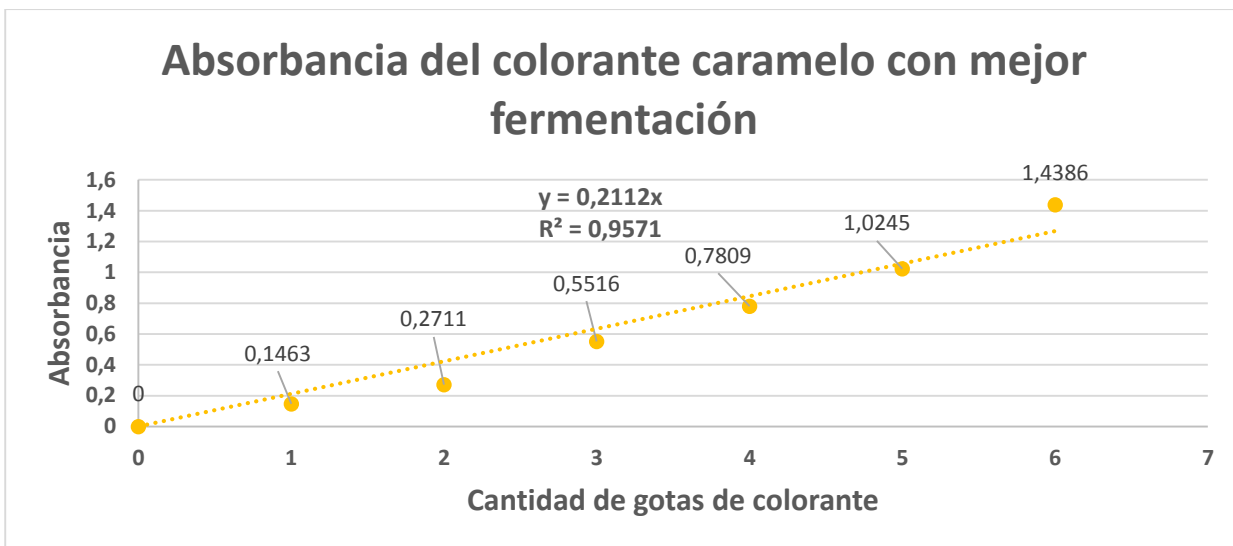


Figura 20 Absorbancia del colorante desarrollado con extracto de malta caramelo fermentado con levadura tipo Lager y bacteria *Lactobacillus delbrueckii*.

Visiblemente, el colorante desarrollado alcanza una amplia gama de tonalidades según la concentración utilizada. No obstante, el análisis sensorial mostró que el colorante desarrollado presenta un leve cambio en el aroma del agua cuando la muestra tiene más de 1,2 [ml] de colorante, mientras que, sobre 2 [ml] de colorante, el agua presentó un intenso olor a caramelo. En cuanto al sabor del agua, ésta presentó la misma tendencia, es decir, un cambio leve sobre 1 [ml] e intenso sobre 2 [ml]. Esto indica que, aunque el colorante sea capaz de entregar una buena gama de tonalidades, sigue presentando aromas y sabores no deseados en altas concentraciones. Esto último se puede deber principalmente a la temperatura de ebullición del ácido láctico (122 [°C]), superior a la temperatura de ebullición del agua, lo que indica que este ácido no puede ser removido totalmente con el rotavapor.



Figura 21 Extracto de malta caramelo fermentado con levadura cervecera y bacteria láctica utilizado como colorante en agua.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1. Condiciones de fermentación para los extractos de malta especiales

Se logró establecer las condiciones de fermentación para los extractos de malta especiales, lo cual fue posible al establecer el proceso para producir extractos fermentados. El proceso tuvo como principal materia prima los extractos de malta especiales concentrados en formato líquido, fabricados previamente en la empresa Maltexco para favorecer la homogeneidad de los resultados. Ésta materia prima requiere de una etapa de dilución para reducir la concentración de los extractos, puesto que una alta concentración puede inhibir los microorganismos fermentadores o incluso matarlos. Primero se evaluó la concentración inicial de los extractos previo a la fermentación. Aunque los resultados mostraron que una concentración entre los 20 [°Bx] y 25 [°Bx] pareciera ser la mejor concentración para fermentar, no se realizó un estudio detallado para ello, sino que fueron utilizadas estas concentraciones por temas prácticos, como el hecho de que a 20 [°Bx] fuera más notoria la diferencia entre las levaduras cerveceras. Posteriormente, se procede con una etapa de hervido para esterilizar la muestra de cualquier agente que pudieran aparecer en la etapa de dilución y así, dar inicio a la etapa de fermentación. Finalmente, el extracto fermentado debe ser concentrado nuevamente, de manera de eliminar el agua añadida en la etapa de dilución, para remover compuestos volátiles que mantengan en el extracto y eliminar los microorganismos puedan continuar la fermentación. Las etapas elegidas para desarrollar el proceso buscaron replicar las posibles condiciones para la fabricación de los colorantes a escala industrial.

Aunque el proceso pareciera ser el más adecuado para la fermentación con levaduras cerveceras, éste puede requerir una mejor concentración o una etapa adicional en el caso de la fermentación láctica, puesto que el ácido láctico tiene una temperatura de ebullición superior al agua y la concentración con un rotavapor no asegura la eliminación del ácido láctico.

6.2. Estandarización de resultados de la fermentación de extractos de malta especiales

Se realizó una estandarización de los resultados de la fermentación de los extractos de malta especiales, logrado con la utilización de dos tipos de maltas especiales: malta caramelo y malta tostada. Estos extractos de malta, sin importar el volumen utilizado en la fermentación, fueron fermentados con distintos microorganismos en una relación de 1 [g] de microorganismo por 1 [l] de extracto líquido diluido a fermentar, a excepción de la tercera experiencia, donde se privilegió la cantidad de muestras y la velocidad de fermentación. La fermentación, ya sea de tipo alcohólica o láctica, se puede realizar durante un periodo de siete días, tiempo en que la fermentación se realiza a temperatura ambiente. No obstante, el tiempo y temperatura óptimos de fermentación varían entre cada tipo de microorganismo. Por otro lado, la atenuación aparente resultó un buen parámetro para realizar un seguimiento de la fermentación de los extractos, tanto durante como al final de la fermentación. Además, la variación en la concentración de grados Brix en el extracto fermentado, tendió a un comportamiento similar a la atenuación aparente, aunque presento diferencias entre las fermentaciones alcohólicas y lácticas. Por lo anterior, se recomienda usar la concentración en grados Brix como parámetro para comparar fermentaciones

de un mismo tipo y utilizar la atenuación aparente para comparar las fermentaciones en cualquiera de los casos. Cabe destacar que, dado que la fermentación láctica genera ácido láctico, el pH pudiera ser un mejor parámetro para comparar fermentaciones de este tipo. Se consideró usar el pH como parámetro durante la búsqueda bibliográfica, sin embargo, fue descartado durante la etapa experimental.

Se recomienda realizar un estudio más detallado para obtener los mejores tiempos de fermentación de cada uno de los microorganismos utilizados. En particular se destaca el evaluar los tiempos de fermentación para las levaduras tipo Lager, que obtuvieron mejores resultados que las levaduras Ale pese a que en la industria cervecera, los tiempos de fermentación de las levaduras Lager son cercanos a 4 semanas, mientras que durante este trabajo las fermentaciones tuvieron una duración de una semana. Otra variable del proceso que no fue estudiada fue la relación entre la cantidad de microorganismo fermentador y el volumen de extracto a fermentar. Aunque la proporción fue distinta en la fermentación en tubos tipo Falcon, esto fue necesario debido a los volúmenes de las muestras y el formato de las bacterias lácticas dentro de la capsula de Multiflora Plus, por tanto, no permitió hacer un estudio mayor u obtener alguna conclusión directa. Tampoco fue posible estudiar las temperaturas de fermentación, puesto que no había un sistema de refrigeración o calefacción en los fermentadores o en cualquiera de los recipientes utilizados para fermentar.

6.3. Los colorantes obtenidos a partir de extractos de malta especiales

Se obtuvieron dos tipos de colorantes, los cuales mantienen las tonalidades de las maltas especiales utilizadas en su elaboración. Los colorantes obtenidos de una misma malta especial, fuera malta tostada o malta caramelo, presentaron una misma tonalidad a simple vista, sin importar el microorganismo utilizado en la fermentación. No obstante, se requiere una baja concentración de colorante para cambiar el color de la sustancia que se requiera colorear.

Los colorantes obtenidos también demostraron no tener influencia significativa en el sabor o en el aroma en las sustancias coloreadas. Aunque la mayoría de las pruebas se realizaron en agua, la influencia de los colorantes es mucho menor cuando es utilizado en cervezas neutras, como las cervezas a base de malta Pilsen, debido a la similitud natural que poseen al ser elaboradas con la misma materia prima. Por otro lado, no se realizaron pruebas de coloración en otros alimentos que son reconocidos por utilizar colorantes caramelo, como cereales, pasteles o galletas entre otros debido a que los tiempos de trabajo se centraron en las pruebas en agua, de manera de apreciar más fácilmente un cambio en el sabor o aroma de esta. Se recomienda realizar pruebas sensoriales con los colorantes en este tipo de alimentos, puesto que, de ser efectivos y no afectar el sabor o aroma de las preparaciones, pudieran aumentar los posibles demandantes de este producto.

Aunque la diferencia de los colores obtenidos no fuera notoria a simple vista, estos alcanzaban una clara diferencia a nivel de absorbancia. Sin embargo, las diferencias en las concentraciones de los extractos medidos y la gran sensibilidad del espectrofotómetro hicieron que los datos obtenidos tuvieran que ser descartados. También se reconoce que las mediciones no fueron realizadas con una pulcritud aceptable para aceptar los resultados. Por lo anterior se recomienda realizar un estudio más detallado al respecto, el cual debe considerar usar muestras a

una misma concentración al momento de la medición y una mayor cantidad de repeticiones para eliminar los errores asociados a la sensibilidad del espectrofotómetro.

6.4. *El mejor microorganismo para fermentar extractos de malta especiales*

Entre los tipos de microorganismos estudiados, la levadura tipo Lager se mostró como la más eficiente entre las levaduras del tipo *Saccharomyces*. En particular se aprecia una diferencia significativa con la levadura tipo Ale y la levadura PDM. Esta diferencia pudiera ser aún mayor si se realizara la fermentación en las condiciones óptimas de una levadura tipo Lager. Por ende, se recomienda estudiar las condiciones óptimas de fermentación de la levadura tipo Lager para fermentar extractos de malta especiales, puesto que las condiciones utilizadas eran más cercanas a las del proceso cervecero. También se destacan los resultados obtenidos con el consorcio láctico, los cuales presentaron buenos resultados pese a que el formato no era el adecuado para una fermentación. Además, las bacterias del tipo *Lactobacillus* presentes en las capsulas no eran las bacterias lácticas utilizadas en la industria cervecera.

Por otro lado, tanto la *Lactobacillus brevis* como la *Lactobacillus delbrueckii*, presentaron una menor fermentación que la levadura tipo Lager. Sin embargo, cuando la levadura fue utilizada en conjunto con las bacterias lácticas, se obtuvieron tanto de fermentación como de coloración mucho más altas que en los casos anteriores, a excepción de los casos con menor concentración inicial y menor cantidad total de extracto de malta especial fermentable. Respecto a lo anterior, se destaca que la mejor fermentación obtenida fue la realizada con levadura tipo Lager y la bacteria láctica *Lactobacillus delbrueckii*.

Finalmente, se recuerda que la idea de utilizar la fermentación como alternativa para mejorar los colorantes naturales desarrollados a partir de extractos de malta especiales surgió al hacer un símil entre el proceso de extractos y el proceso cervecero. Por tanto, se recuerda que, en el proceso cervecero, la etapa de maduración posterior a la fermentación permite la eliminación de aromas y sabores indeseados, por ende, el extracto de malta especial fermentado podría mejorarse añadiendo esta etapa al proceso de producción. En este mismo escenario, pudiera ser necesario incluir etapas que se alejan del proceso cervecero, como la utilización de etapas que eliminen de mejor manera los elementos residuales de las fermentaciones, en particular en el caso de la fermentación láctica, puesto que la remoción del ácido láctico es más compleja que la del alcohol etílico. Además, y dado que la levadura tipo Lager fue más eficiente a pesar de no estar dentro de su rango común de temperatura, se propone realizar fermentaciones a menor temperatura para aumentar el rendimiento de este tipo de microorganismo.

7. Bibliografía

- [1] RODRÍGUEZ C. 2014. Elaboración de Colores Naturales a Partir de Extractos de Cebada y Derivados. Trabajo de Titulación de Ingeniero en Ejecución Químico. Santiago, Universidad de Santiago de Chile, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química. 102p.
- [2] MALTEXCO FOOD 2013. Extracto de Malta [en línea] <http://www.maltexcofood.com/extracto_malta.html> [consulta: 22 Agosto 2015].
- [3] DZIUK C. 2010. Tendencias en Colorantes Mundiales [en línea] Industria Alimenticia. 1 de diciembre 2010 <<http://www.industriaalimenticia.com/articulos/83005-tendencias-en-colorantes-mundiales>> [consulta: 22 Agosto 2015].
- [4] SHAB D. y TRINH N. 2004. Do Artificial Food Colors Promote Hyperactivity in Children with Hyperactive Syndromes? A Meta-Analysis of Double-Blind Placebo-Controlled Trials. Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics 25(6): 423-434.
- [5] CHILE. Ministerio de Salud. 1997. Decreto número 977/96: Reglamento Sanitario de los Alimentos, 13 de mayo 1997. 182p.
- [6] INTERNATIONAL FOOD INFORMATION COUNCIL 2010. Food. Ingredients & Colors [en línea] <http://www.foodinsight.org/Content/3843/v3_FoodIngredColors_6-21-10.pdf> [consulta: 23 Agosto 2015].
- [7] ADITIVOS ALIMENTICIOS. 2015. E150a – Caramelo Cáustico [en línea] <<http://www.aditivos-alimentarios.com/2014/01/e150a-caramelo-caustico.html>> [consulta: 24 Diciembre 2015].
- [8] ADITIVOS ALIMENTICIOS. 2015. E150b – Caramelo Cáustico de Sulfito [en línea] <<http://www.aditivos-alimentarios.com/2014/01/e150b-caramelo-caustico-sulfito.html>> [consulta: 24 Diciembre 2015].
- [9] ADITIVOS ALIMENTICIOS. 2015. E150c – Caramelo Amónico [en línea] <<http://www.aditivos-alimentarios.com/2014/01/e150c-caramelo-amonico.html>> [consulta: 24 Diciembre 2015].
- [10] ADITIVOS ALIMENTICIOS. 2015. E150d – Caramelo Sulfito de Amoniaco [en línea] <<http://www.aditivos-alimentarios.com/2014/01/e150d-caramelo-sulfito-amonico.html>> [consulta: 24 Diciembre 2015].
- [11] EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. 2011. Re-evaluation of Caramel Colours (E150 a, b, c, d) as Food Additives. EFSA Journal 2011; 9(3): 2004.
- [12] MALTAS CERVECERAS 2015. Maltas Base [en línea] <<http://www.maltascervceras.com/malta-base/>> [consulta: 9 Marzo 2016].
- [13] MALTEXCO FOOD 2013. Proceso de Malteo [en línea] <http://www.maltexcofood.com/proceso_malteo.html> [consulta: 22 Agosto 2015].
- [14] HOUGH J. 2001. Biotecnología de la cerveza y de la Malta, Zaragoza, España. Acrabia. 184p.
- [15] MARDONES N. 2012. Evaluación del Uso de Maltas Caramelo en la Elaboración de Cerveza, 2012. Memoria de Ingeniero en Civil en Biotecnología. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. 159p.

- [16] PATAGONIA MALT 2013. Productos [en línea] <<http://www.patagoniamalt.com/#productos>> [consulta: 26 Octubre 2015].
- [17] MALTEXCO FOOD 2013. Proceso Extractos [en línea] <http://www.maltexcofood.com/proceso_extractos.html> [consulta: 23 Agosto 2015].
- [18] DAVIES C. y LABUZA T. 1995. The Maillard Reaction Application to Confectionary Products. Department of Food Science and Nutrition, University of Minnesota.
- [19] NUFFIELD FOUNDATION. 1984. Química Avanzada Nuffield Ciencia de la Alimentación. Barcelona, España. Reverte. 174p.
- [20] GONZALEZ F.; CASTELLO P.; GAGLIARDINO J. y ROSSI J. 2000. Esquema de reacción del proceso de glucosilación no enzimática de proteínas [Artículo] Recuperado de <<http://www.ciencia.cl/CienciaAlDia/volumen3/numero2/articulos/articulo2.html>> [consulta: 4 Diciembre 2015].
- [21] BRUMOVSKY L. 2015. Pardeamiento no enzimático [Presentación] En: Curso Bromatología y Nutrición. Universidad Nacional de Misiones.
- [22] BRUMOVSKY L. 2015. Reacción de Caramelización [Presentación] Recuperado de <<http://www.aulavirtual-exactas.dyndns.org/claroline/backends/download.php?url=L1BORTIwMTUucGRm&cidRese t=true&cidReq=RICIONUTRI>> [consulta: 4 Diciembre 2015].
- [23] COX M. y NELSON D. 2007. Lehninger: Principios de Bioquímica. 5ª ed. Barcelona, España. Omega. 1296p.
- [24] MATHEWS C.; VAN HOLDE K. y AHERN K. 2002. Bioquímica. 3ª ed. Madrid, España. Pearson Educación. 1368p.
- [25] HORTON H.; MORAN L.; SCRIMGEOUR K.; PERRY M. y RAWN J. 2008. Principios de Bioquímica. 4ª ed. México. Pearson Educación. 976p.
- [26] PERROTTA D. 2015. Las levaduras cerveceras [en línea] <<http://ceresvis.com/index.php/notas-cerveceras/elaboracion-de-cerveza/basicos/item/11-levaduras>> [consulta: 9 Mayo 2016].
- [27] CERVEZAS ARRIACA S.L. 2015. La levadura en la cerveza: diferencia entre Ale y Lager. [en línea] <<http://www.arriaca.es/index.php/en/blog-arriaca/88-cerveza-artesana-arriaca/224-la-levadura-en-la-cerveza-diferencia-entre-ale-y-lager>> [consulta: 4 Diciembre 2015].
- [28] NUMMER B. 2012. Brewing with Lactic Acid Bacteria [en línea] <https://www.morebeer.com/articles/brewing_with_lactic_acid_bacteria> [consulta: 22 Agosto 2015].
- [29] RODRIGUEZ C. 2015. Área de Investigación y Desarrollo Maltexco - Chile. Entrevista Personal, Talagante.
- [30] LIU S. -Q. 2015. Impact of yeast and bacteria on beer appearance and flavour. Brewing Microbiology. Cap 17: 357-374.
- [31] MATERIA HNOS. 2015. Métodos de Análisis. [en línea] <<http://www.materiaoleochemicals.com/metodos.html>> [consulta: 24 Agosto 2015].
- [32] BIEHMAN P. 2009. Color de la Cerveza: Comprensión del SRM, Lovibond y EBC [en línea] <<http://apuntessobrecerveza.blogspot.cl/2009/05/color-de-la-cerveza-comprension-del-srm.html>> [consulta: 24 Agosto 2015].

- [33] ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE FABRICANTES DE CERVEZA. 1999. Métodos de Análisis Cerveceros, Tomo II. 4^a ed. Caracas, Venezuela. Asociación Latinoamericana de Fabricantes de Cerveza. 273p.
- [34] DANIELS R. 1996. Designing Great Beers. EE.UU. Brewers Publications, Division of Association of Brewers.
- [35] A. KRÜSS OPTRONIC. 2013. Informe de Aplicación: Refractómetro – Medición Brix en la industria de bebidas y zumos. [en línea] <http://www.kruess.com/documents/Applikationsberichte/AP130710_001_Medicion_Brix_en_la_industria_de_bebidas_ES.pdf> [consulta: 18 Marzo 2016].
- [36] HERNANDEZ E. 2005. Evaluación Sensorial, Bogotá, Colombia. Universidad Abierta y a Distancia, Facultad de Ciencias Básicas e Ingeniería. 577p.
- [37] BELLO J. 2000. Ciencia Bromatológica principios generales de los alimentos, Madrid, España. Díaz de Santos. 577p.
- [38] MASON R. y NOTTINGHAM S. 2002. Sensory Evaluation Manual. [en línea] <<https://es.scribd.com/doc/8940001/Sensory-Evaluation-Manual>> [consulta: 24 Agosto 2015].
- [39] VICÉNS J.; HERRARTE A. y MEDINA E. 2005. Análisis de Varianza (ANOVA) [en línea] <https://www.uam.es/personal_pdi/economicas/eva/pdf/anova.pdf> [consulta: 2 Mayo 2016].
- [40] CHITARRONI H. 2014. La prueba de T de Student para diferencia de medias y proporciones [en línea] <<http://www.catedras.fsoc.uba.ar/salvia//programa/La%20prueba%20de%20T.pdf>> [consulta: 2 Mayo 2016].
- [41] INEI G; VELASCO H; DÍAZ M y TOBÓN C. 2001. Influencia de la concentración de sustrato inicial en la fase lag de la fermentación alcohólica, en cultivo por lote. En: II CONGRESO INTERNACIONAL de Ingeniería Bioquímica: 10 al 15 de septiembre de 2001. Veracruz, México. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.
- [42] PÉREZ O. 2001. Cinética y extracción de colorantes naturales para la industria textil, 14 de mayo de 2001. Tesis profesional de Maestría en Ciencias con Especialidad en Ingeniería Química. Puebla, Universidad de las Américas Puebla, Escuela de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. 128p.

Anexos

A. Tablas de datos

1. Primera experiencia: Malta tostada

Tabla 10 Resultados obtenidos durante la fermentación de muestras de extracto de malta tostada con distintas levaduras y a distintas concentraciones iniciales.

| Número de la muestra | Levadura Utilizada | Concentración Inicial [$^{\circ}Bx$] | Inicio de la Fermentación | Densidad Inicial [$\frac{g}{ml}$] | Densidad Final [$\frac{g}{ml}$] | Atenuación Aparente [%] |
|----------------------|--------------------|--|---------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| 1 | Ale | 25 | 13-nov | 1,101 | 1,075 | 25,74 |
| 2 | Ale | 30 | 4-nov | 1,123 | 1,090 | 26,83 |
| 3 | Lager | 30 | 4-nov | 1,123 | 1,090 | 26,83 |
| 4 | Lager | 25 | 13-nov | 1,101 | 1,081 | 19,80 |
| 5 | Lager | 20 | 16-nov | 1,063 | 1,052 | 17,46 |
| 6 | Lager | 20 | 16-nov | 1,063 | 1,051 | 19,05 |
| 7 | Lager | 30 | 4-nov | 1,123 | 1,086 | 30,08 |
| 8 | Ale | 30 | 4-nov | 1,123 | 1,089 | 27,64 |
| 9 | Ale | 20 | 16-nov | 1,063 | 1,057 | 9,52 |
| 10 | Lager | 25 | 13-nov | 1,101 | 1,068 | 32,67 |
| 11 | Ale | 20 | 16-nov | 1,063 | 1,053 | 15,87 |
| 12 | Ale | 25 | 13-nov | 1,101 | 1,073 | 27,72 |

2. Segunda experiencia: Malta caramelo

Tabla 11 Resultados obtenidos durante la fermentación de muestras de extracto de malta caramelo con distintas levaduras y a distintas concentraciones iniciales.

| Número de la muestra | Levadura Utilizada | Concentración Inicial [$^{\circ}Bx$] | Inicio de la Fermentación | Densidad Inicial [$\frac{g}{ml}$] | Densidad Final [$\frac{g}{ml}$] | Atenuación Aparente [%] |
|----------------------|--------------------|--|---------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| 1 | Ale | 25 | 18-nov | 1,091 | 1,07 | 23,08 |
| 2 | Ale | 30 | 11-nov | 1,129 | 1,093 | 27,91 |
| 3 | Lager | 30 | 11-nov | 1,129 | 1,09 | 30,23 |
| 4 | PDM | 20 | 9-nov | 1,076 | 1,061 | 19,74 |
| 5 | PDM | 25 | 18-nov | 1,095 | 1,076 | 20,00 |
| 6 | PDM | 30 | 23-nov | 1,127 | 1,095 | 25,20 |
| 7 | Lager | 25 | 18-nov | 1,091 | 1,069 | 24,18 |
| 8 | Lager | 20 | 20-nov | 1,074 | 1,056 | 24,32 |
| 9 | Lager | 20 | 9-nov | 1,076 | 1,061 | 19,74 |
| 10 | Lager | 30 | 11-nov | 1,129 | 1,092 | 28,68 |
| 11 | PDM | 30 | 23-nov | 1,127 | 1,092 | 27,56 |
| 12 | Ale | 30 | 11-nov | 1,129 | 1,089 | 31,01 |
| 13 | Ale | 20 | 9-nov | 1,076 | 1,065 | 14,47 |
| 14 | Lager | 25 | 18-nov | 1,091 | 1,071 | 21,98 |
| 15 | Ale | 20 | 20-nov | 1,074 | 1,058 | 21,62 |
| 16 | PDM | 25 | 20-nov | 1,100 | 1,074 | 26,00 |
| 17 | PDM | 20 | 18-nov | 1,071 | 1,059 | 16,90 |
| 18 | Ale | 25 | 20-nov | 1,100 | 1,073 | 27,00 |

3. Tercera experiencia: Comparación entre distintos microorganismos

Tabla 12 Resultados obtenidos durante la fermentación de muestras de extracto de malta caramelo con distintos microorganismos.

| Número de la muestra | Microorganismo Utilizada | Concentración Final [$^{\circ}Bx$] | Densidad Final [$\frac{g}{ml}$] | Atenuación Aparente [%] |
|----------------------|--------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| 1 | Ale | 15,2 | 1,051 | 25,967 |
| 2 | Ale | 15,6 | 1,051 | 25,967 |
| 3 | Ale | 15,4 | 1,050 | 28,177 |
| 4 | Ale | 15,4 | 1,050 | 28,177 |
| 5 | Ale | 15 | 1,051 | 27,072 |
| 6 | Lager | 14,6 | 1,048 | 30,387 |
| 7 | Lager | 14,8 | 1,047 | 32,597 |
| 8 | Lager | 15,2 | 1,046 | 33,149 |
| 9 | Lager | 15 | 1,048 | 30,387 |
| 10 | Lager | 14,8 | 1,048 | 31,492 |
| 11 | PDM | 15,4 | 1,050 | 28,177 |
| 12 | PDM | 15,6 | 1,052 | 24,862 |
| 13 | PDM | 15 | 1,049 | 29,282 |
| 14 | PDM | 16 | 1,053 | 24,309 |
| 15 | PDM | 15,6 | 1,053 | 23,204 |
| 16 | C. Láctico | 15 | 1,049 | 29,282 |
| 17 | C. Láctico | 15,6 | 1,049 | 29,282 |
| 18 | C. Láctico | 15,4 | 1,048 | 31,492 |
| 19 | C. Láctico | 15,2 | 1,049 | 29,282 |
| 20 | C. Láctico | 15 | 1,050 | 27,624 |
| 21 | Blanco | 16,9 | 1,058 | 17,127 |
| 22 | Blanco | 16,8 | 1,057 | 18,232 |
| 23 | Blanco | 16,7 | 1,058 | 16,022 |
| 24 | Blanco | 16,8 | 1,057 | 18,232 |

| | | | | |
|----|--------|------|-------|--------|
| 25 | Blanco | 16,6 | 1,059 | 14,917 |
|----|--------|------|-------|--------|

4. Cuarta experiencia: Bacterias lácticas

Tabla 13 Resultados obtenidos durante la fermentación de muestras de extracto de malta caramelo con distintas combinaciones utilizando bacterias lácticas cerveceras.

| Numero Muestra | Microorganismo | Concentración Final [°Bx] | Densidad final [g/ml] | Atenuación Aparente [%] |
|----------------|---------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1 | Lager + Brevis | 17,4 | 1,056 | 27,86 |
| 2 | Lager + Brevis | 17,6 | 1,055 | 28,86 |
| 3 | Lager + Brevis | 17,6 | 1,057 | 25,87 |
| 4 | Lager + DelbrueckII | 17,6 | 1,054 | 29,35 |
| 5 | Lager + DelbrueckII | 17,4 | 1,057 | 26,37 |
| 6 | Lager + DelbrueckII | 18,0 | 1,055 | 28,86 |
| 7 | Brevis | 19,4 | 1,066 | 14,43 |
| 8 | Brevis | 19,4 | 1,064 | 16,42 |
| 9 | Brevis | 19,6 | 1,068 | 12,44 |
| 10 | DelbrueckII | 18,6 | 1,063 | 18,91 |
| 11 | DelbrueckII | 18,6 | 1,061 | 20,40 |
| 12 | DelbrueckII | 18,6 | 1,061 | 20,40 |
| 13 | Blanco | 21,4 | 1,081 | -4,48 |
| 14 | Lager | 18,2 | 1,056 | 24,32 |
| 15 | Lager | 19 | 1,061 | 19,74 |

B. Resultados del análisis estadístico para la tercera experiencia

1. Test de Varianza

1.1. Resultados para levadura Lager vs levadura Ale

Tabla 14 Resultados del test de varianza para la atenuación aparente entre levadura tipo Lager y tipo Ale.

| Análisis de varianza de un factor (Atenuación Aparente) | | | | | | |
|--|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------|---------------------|-----------------------------|
| RESUMEN | | | | | | |
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza | | |
| Columna 1 | 5 | 135,359116 | 27,0718232 | 1,22096395 | | |
| Columna 2 | 5 | 158,01105 | 31,6022099 | 1,58725314 | | |
| | | | | | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 51,31101 | 1 | 51,31101 | 36,5434783 | 0,00030757 | 5,31765507 |
| Dentro de los grupos | 11,2328683 | 8 | 1,40410854 | | | |
| | | | | | | |
| Total | 62,5438784 | 9 | | | | |

Tabla 15 Resultados del test de varianza para la concentración final entre levadura tipo Lager y tipo Ale.

| Análisis de varianza de un factor (Concentración final) | | | | | | |
|--|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------|---------------------|-----------------------------|
| RESUMEN | | | | | | |
| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> | | |
| Columna 1 | 5 | 76,6 | 15,32 | 0,052 | | |
| Columna 2 | 5 | 74,4 | 14,88 | 0,052 | | |
| | | | | | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
| Entre grupos | 0,484 | 1 | 0,484 | 9,30769231 | 0,0158006 | 5,31765507 |
| Dentro de los grupos | 0,416 | 8 | 0,052 | | | |
| | | | | | | |
| Total | 0,9 | 9 | | | | |

1.2. Resultados para levadura Lager vs Consorcio Láctico

Tabla 16 Resultados del test de varianza para la atenuación aparente entre levadura tipo Lager y el consorcio láctico.

| Análisis de varianza de un factor (Atenuación Aparente) | | | | | | |
|---|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| RESUMEN | | | | | | |
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza | | |
| Columna 1 | 5 | 158,01105 | 31,6022099 | 1,58725314 | | |
| Columna 2 | 5 | 146,961326 | 29,3922652 | 1,89249412 | | |
| | | | | | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 12,2096395 | 1 | 12,2096395 | 7,01754386 | 0,02929829 | 5,31765507 |
| Dentro de los grupos | 13,918989 | 8 | 1,73987363 | | | |
| | | | | | | |
| Total | 26,1286286 | 9 | | | | |

Tabla 17 Resultados del test de varianza para la concentración final entre levadura tipo Lager y el consorcio láctico.

| Análisis de varianza de un factor (Concentración final) | | | | | | |
|---|-------------------|--------------------|---------------------------|----------|--------------|----------------------|
| RESUMEN | | | | | | |
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza | | |
| Columna 1 | 5 | 76,2 | 15,24 | 0,068 | | |
| Columna 2 | 5 | 74,4 | 14,88 | 0,052 | | |
| | | | | | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 0,324 | 1 | 0,324 | 5,4 | 0,04863085 | 5,31765507 |
| Dentro de los grupos | 0,48 | 8 | 0,06 | | | |
| | | | | | | |
| Total | 0,804 | 9 | | | | |

1.3. Resultados para levadura Ale vs Consorcio Láctico

Tabla 18 Resultados del test de varianza para la atenuación aparente entre levadura tipo Ale y el consorcio láctico.

| Análisis de varianza de un factor (Atenuación Aparente) | | | | | | |
|---|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| RESUMEN | | | | | | |
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza | | |
| Columna 1 | 5 | 135,359116 | 27,0718232 | 1,22096395 | | |
| Columna 2 | 5 | 146,961326 | 29,3922652 | 1,89249412 | | |
| | | | | | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 13,4611276 | 1 | 13,4611276 | 8,64705882 | 0,01869282 | 5,31765507 |
| Dentro de los grupos | 12,4538323 | 8 | 1,55672904 | | | |
| | | | | | | |
| Total | 25,9149599 | 9 | | | | |

Tabla 19 Resultados del test de varianza para la concentración final entre levadura tipo Ale y el consorcio láctico.

| Análisis de varianza de un factor (Concentración final) | | | | | | |
|---|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| RESUMEN | | | | | | |
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza | | |
| Columna 1 | 5 | 76,6 | 15,32 | 0,052 | | |
| Columna 2 | 5 | 76,2 | 15,24 | 0,068 | | |
| | | | | | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 0,016 | 1 | 0,016 | 0,26666667 | 0,61954375 | 5,31765507 |
| Dentro de los grupos | 0,48 | 8 | 0,06 | | | |
| | | | | | | |
| Total | 0,496 | 9 | | | | |

2. Test T de Student

2.1. Resultados para levadura Lager vs levadura Ale

Tabla 20 Resultados del test T de Student para la atenuación aparente entre levadura tipo Lager y tipo Ale.

| Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales (Atenuación Aparente) | | |
|---|-------------------|-------------------|
| | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
| Media | 29,3922652 | 31,6022099 |
| Varianza | 1,89249412 | 1,58725314 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 8 | |
| Estadístico t | -2,64906471 | |
| P(T<=t) una cola | 0,01464914 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1,85954804 | |
| P(T<=t) dos colas | 0,02929829 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2,30600414 | |

Tabla 21 Resultados del test T de Student para la concentración final entre levadura tipo Lager y tipo Ale.

| Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales (Concentración Final) | | |
|---|-------------------|-------------------|
| | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
| Media | 15,24 | 14,88 |
| Varianza | 0,068 | 0,052 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 8 | |
| Estadístico t | 2,32379001 | |
| P(T<=t) una cola | 0,02431543 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1,85954804 | |
| P(T<=t) dos colas | 0,04863085 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2,30600414 | |

2.2. Resultados para levadura Lager vs Consorcio Láctico

Tabla 22 Resultados del test T de Student para la atenuación aparente entre levadura tipo Lager y el consorcio láctico.

| Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales (Atenuación Aparente) | | |
|---|-------------------|-------------------|
| | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
| Media | 27,0718232 | 31,6022099 |
| Varianza | 1,22096395 | 1,58725314 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 8 | |
| Estadístico t | -6,0451202 | |
| P(T<=t) una cola | 0,00015379 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1,85954804 | |
| P(T<=t) dos colas | 0,00030757 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2,30600414 | |

Tabla 23 Resultados del test T de Student para la concentración final entre levadura tipo Lager y el consorcio láctico.

| Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales (Concentración Final) | | |
|---|-------------------|-------------------|
| | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
| Media | 15,32 | 14,88 |
| Varianza | 0,052 | 0,052 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 8 | |
| Estadístico t | 3,05085108 | |
| P(T<=t) una cola | 0,0079003 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1,85954804 | |
| P(T<=t) dos colas | 0,0158006 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2,30600414 | |

2.3. Resultados para levadura Ale vs Consorcio Láctico

Tabla 24 Resultados del test T de Student para la atenuación aparente entre levadura tipo Ale y el consorcio láctico.

| Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales (Atenuación Aparente) | | |
|---|-------------------|-------------------|
| | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
| Media | 27,0718232 | 29,3922652 |
| Varianza | 1,22096395 | 1,89249412 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 8 | |
| Estadístico t | -2,94058818 | |
| P(T<=t) una cola | 0,00934641 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1,85954804 | |
| P(T<=t) dos colas | 0,01869282 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2,30600414 | |

Tabla 25 Resultados del test T de Student para la concentración final entre levadura tipo Ale y el consorcio láctico.

| Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales (Concentración Final) | | |
|---|-------------------|-------------------|
| | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
| Media | 15,32 | 15,24 |
| Varianza | 0,052 | 0,068 |
| Observaciones | 5 | 5 |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 8 | |
| Estadístico t | 0,51639778 | |
| P(T<=t) una cola | 0,30977187 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1,85954804 | |
| P(T<=t) dos colas | 0,61954375 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2,30600414 | |

C. Resultados del análisis estadístico para la cuarta experiencia

1. Test de Varianza

Tabla 26 Resultados del test de varianza para la atenuación aparente entre la fermentación con bacteria *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus delbrueckii* con levadura tipo Lager

| Análisis de varianza de un factor (Atenuación Aparente) | | | | | | |
|---|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| RESUMEN | | | | | | |
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza | | |
| Columna 1 | 3 | 82,5870647 | 27,5290216 | 2,31017384 | | |
| Columna 2 | 3 | 84,5771144 | 28,1923715 | 2,55769247 | | |
| | | | | | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 0,66004967 | 1 | 0,66004967 | 0,27118644 | 0,63003478 | 7,70864742 |
| Dentro de los grupos | 9,73573261 | 4 | 2,43393315 | | | |
| | | | | | | |
| Total | 10,3957823 | 5 | | | | |

Tabla 27 Resultados del test de varianza para la concentración final entre la fermentación con bacteria *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus delbrueckii* con levadura tipo Lager

| Análisis de varianza de un factor (Concentración final) | | | | | | |
|--|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------|---------------------|-----------------------------|
| RESUMEN | | | | | | |
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza | | |
| Columna 1 | 3 | 52,6 | 17,53333333 | 0,013333333 | | |
| Columna 2 | 3 | 53 | 17,66666667 | 0,093333333 | | |
| | | | | | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 0,02666667 | 1 | 0,02666667 | 0,5 | 0,51851852 | 7,70864742 |
| Dentro de los grupos | 0,213333333 | 4 | 0,053333333 | | | |
| | | | | | | |
| Total | 0,24 | 5 | | | | |

2. Test T de Student

Tabla 28 Resultados del test T de Student para la atenuación aparente entre la fermentación con bacteria *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus delbrueckii* con levadura tipo Lager

| Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales (Atenuación Aparente) | | |
|---|-------------------|-------------------|
| | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
| Media | 27,5290216 | 28,1923715 |
| Varianza | 2,31017384 | 2,55769247 |
| Observaciones | 3 | 3 |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | -0,52075564 | |
| P(T<=t) una cola | 0,31501739 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 2,13184679 | |
| P(T<=t) dos colas | 0,63003478 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2,77644511 | |

Tabla 29 Resultados del test T de Student para la concentración final entre la fermentación con bacteria *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus delbrueckii* con levadura tipo Lager

| Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales (Concentración Final) | | |
|---|-----------------|-------------|
| | 17,53333333 | 17,66666667 |
| Media | 0,013333333 | 0,093333333 |
| Varianza | 3 | 3 |
| Observaciones | 0 | |
| Diferencia hipotética de las medias | 3 | |
| Grados de libertad | - 0,70710678 | |
| Estadístico t | 0,26523889 | |
| P(T<=t) una cola | 2,35336343 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 0,53047777 | |
| P(T<=t) dos colas | 3,18244631 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 17,53333333 | 17,66666667 |

D. Proceso Cervecer

El proceso cervecero considera 6 etapas principales, las cuales se presentan en la Figura 22 y se describen a continuación [14].

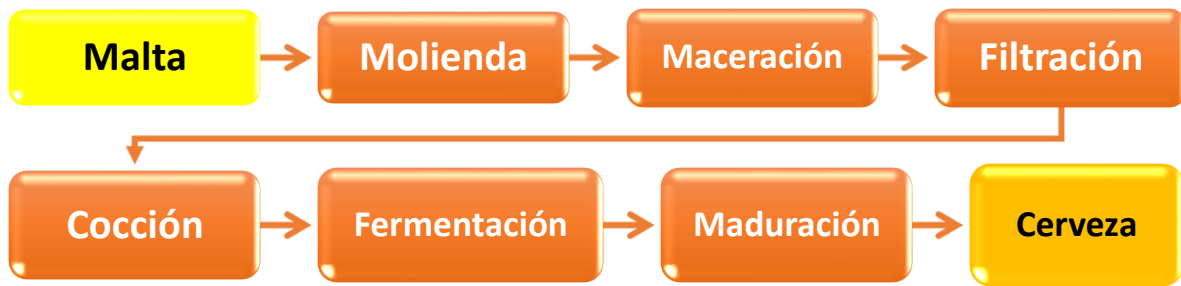


Figura 22 Diagrama de bloques del proceso de producción de Cerveza

Este empieza con la molienda y la rehidratación del grano de malta reactivando las enzimas presentes las que empiezan a degradar el almidón y estructuras proteicas que no habían sido afectadas con anterioridad en la germinación.

La molienda previa es para disminuir el tamaño de partícula y favorecer la extracción de los compuestos solubles. La etapa de maceración consiste justamente en dar las condiciones apropiadas (pH, temperatura y cofactores principalmente) para favorecer una determinada acción enzimática por un tiempo específico.

Del macerado se obtiene un mosto líquido con alto porcentaje de sustancias solubles y sólidos correspondientes a los granos agotados. Posteriormente los granos agotados son separados del mosto mediante una etapa de filtración.

Luego, durante la cocción se produce la concentración, esterilización y precipitación de proteínas por denaturación térmica; formación de color debido la caramelización de azúcares y reacción de Maillard; y formación de compuestos que confieren sabor y aromas en el mosto. En el hervor se adiciona lúpulo, una flor perteneciente a la familia de las *cannabixaceas*, que entrega los sabores amargos típicos de la cerveza y componentes antioxidantes [14].

En la fermentación los azúcares presentes en el mosto hervido son metabolizados por las levaduras para producir etanol y la consecuente liberación de dióxido de carbono. Los aminoácidos y compuestos nitrogenados son consumidos como nutrientes en el crecimiento celular. En el mosto también están presentes iones zinc (provenientes del agua utilizada y su pretratamiento), los cuales actúan como cofactores en las rutas metabólicas de las levaduras.

La maduración se produce una precipitación de sustancias no deseables como proteínas y polifenoles, también se produce la gasificación que cervecería artesanal se logra con la adición de glucosa al recipiente final de la cerveza, produciendo una segunda fermentación y reteniendo el dióxido de carbono producido, el que se diluye gasificando la bebida. Esta última etapa permite la eliminación de sabores y olores indeseados [14].