



**UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**CARRERA AGROINDUSTRIA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN COMO REQUISITO PREVIO PARA  
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO  
INGENIERA AGROINDUSTRIAL**

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE LÚPULO  
EN LAS BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS EN EL PROCESO DE  
FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA MEDIANTE LEVADURAS  
(*Saccharomyces cerevisiae*)**

**AUTORA**

**LARA MIRANDA ARELLYS CRISTINA**

**TUTOR**

**ING. FLORES CADENA CRISTIAN ANDRÉS, MSc.**

**MILAGRO - ECUADOR**

**2026**



**UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**CARRERA AGROINDUSTRIA**

**APROBACIÓN DEL TUTOR**

El suscrito, docente de la Universidad Agraria del Ecuador, en mi calidad de Tutor, certifico que el presente trabajo de titulación: “EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE LÚPULO EN LAS BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA MEDIANTE LEVADURAS (*Saccharomyces cerevisiae*)” realizado por el estudiante LARA MIRANDA ARELLYS CRISTINA; con cédula de identidad N° 0942478041 de la carrera AGROINDUSTRIA, Ciudad Universitaria Milagro, ha sido orientado y revisado durante su ejecución; y cumple con los requisitos técnicos y legales exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador; por lo tanto, se aprueba la presentación del mismo.

Atentamente,

---

ING. FLORES CADENA CRISTIAN ANDRÉS, M.Sc  
TUTOR

Milagro, 24 de abril del 2026



**UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**CARRERA AGROINDUSTRIA**

**APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN**

Los abajo firmantes, docentes designados por el H. Consejo Directivo como miembros del Tribunal de Sustentación, aprobamos la defensa del trabajo de titulación: “EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE LÚPULO EN LAS BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA MEDIANTE LEVADURAS (*Saccharomyces cerevisiae*)”, realizado por la estudiante LARA MIRANDA ARELLYS CRISTINA, el mismo que cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador.

Atentamente,

---

Ph.D Gavilánez Luna Freddy  
**PRESIDENTE**

---

Ing. Gaibor Vallejo Lady, M.Sc.  
**EXAMINADOR PRINCIPAL**

---

Ing. Cedeño Bermeo Jéssica, M.Sc.  
**EXAMINADOR PRINCIPAL**

Milagro, 24 de abril del 2026

## **Dedicatoria**

A Dios, por brindarme la vida, la fortaleza y la sabiduría necesarias para culminar esta etapa.

A mis padres, Angélica Miranda y Christian Lara, quienes han sido el pilar de todo lo que soy. Gracias por cada sacrificio, por su amor incondicional y por enseñarme que rendirse nunca fue una opción.

A mi hermano, Cristhian Lara. A quien dedico este logro de manera muy especial, porque has sido mi compañero de vida, mi apoyo incondicional y una de mis mayores fuerzas en este camino. Gracias por estar siempre. Este triunfo también es tuyo.

A mi familia y amigos, por su cariño y por estar presentes en cada etapa importante de este proceso.

## **Agradecimiento**

A mi tutor, Ing. Cristian Flores Cadena, MSc., por su orientación académica, su paciencia y su compromiso durante el desarrollo de la presente investigación.

Al Ing. Marlon Núñez Serrano, MSc., por su constante apoyo, su permanente disposición y por los valiosos aportes brindados a lo largo de este proceso de investigación.

### **Autorización de Autoría Intelectual**

Yo, LARA MIRANDA ARELLYS CRISTINA, en calidad de autor(a) del proyecto realizado, sobre “EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE LÚPULO EN LAS BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA MEDIANTE LEVADURAS (*Saccharomyces cerevisiae*)” para optar el título de INGENIERO AGROINDUSTRIAL, por la presente autorizo a la UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor(a) me correspondan, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8; 19 y demás pertinentes de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Milagro, 24 de abril del 2026

---

LARA MIRANDA ARELLYS CRISTINA

C.I. 0942478041

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la incidencia del extracto de lúpulo sobre las bacterias ácido-lácticas durante el proceso de fermentación alcohólica de melaza empleando levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. La fermentación alcohólica es un proceso biotecnológico ampliamente utilizado en la producción de alimentos, bebidas y biocombustibles, en el cual las levaduras convierten los azúcares fermentables en etanol y dióxido de carbono. Sin embargo, la eficiencia del proceso puede verse afectada por la presencia de bacterias ácido-lácticas (BAL), microorganismos que compiten por los azúcares disponibles y generan metabolitos que alteran las condiciones del medio fermentativo. Frente a esta problemática, el uso de compuestos naturales con actividad antimicrobiana surge como una alternativa al empleo de aditivos químicos. En este contexto, el lúpulo (*Humulus lupulus*) destaca por sus compuestos bioactivos con capacidad para inhibir bacterias sin afectar significativamente la actividad de las levaduras. Metodológicamente, se realizó la caracterización fisicoquímica y microbiológica de la melaza utilizada como sustrato fermentable. Posteriormente, se aplicaron diferentes concentraciones de extracto de lúpulo mediante un diseño completamente al azar (DCA) con dos factores y dos niveles cada uno. El factor A correspondió a la concentración de extracto de lúpulo (22,22 y 30 mg/L) y el factor B al contenido de sólidos solubles (16 y 18 °Brix), además de un tratamiento testigo, con el fin de evaluar su efecto sobre el crecimiento de bacterias ácido-lácticas y la eficiencia del proceso fermentativo. Los resultados indicaron que la melaza presentó una acidez moderada y un pH entre 5,38 y 5,55, condiciones adecuadas para la fermentación, además de un alto contenido de sólidos solubles (83,25°Brix), lo que evidencia una elevada disponibilidad de azúcares fermentables. El análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \geq 0,05$ ) respecto a la población bacteriana. No obstante, la eficiencia fermentativa estuvo influenciada por la concentración del extracto de lúpulo, ya que el tratamiento T1 (22,22 mg/L) presentó los mayores valores de grado alcohólico y eficiencia de fermentación, mientras que concentraciones superiores evidenciaron un efecto negativo sobre el desempeño fermentativo, lo que resalta la importancia de mantener un equilibrio entre el control microbiano y la actividad metabólica de la levadura.

**Palabras clave:** extracto de lúpulo, bacterias ácido-lácticas, melaza, fermentación alcohólica.

## ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effect of hop extract on lactic acid bacteria during the alcoholic fermentation process of molasses using *Saccharomyces cerevisiae*. Alcoholic fermentation is a biotechnological process widely used in the production of food, beverages, and biofuels, in which yeasts convert fermentable sugars into ethanol and carbon dioxide. However, the efficiency of this process can be affected by the presence of lactic acid bacteria (LAB), microorganisms that compete for available sugars and produce metabolites that alter the conditions of the fermentation medium.

To address this issue, the use of natural compounds with antimicrobial activity has emerged as an alternative to chemical additives. In this context, hops (*Humulus lupulus*) stand out due to their bioactive compounds capable of inhibiting bacteria without significantly affecting yeast activity. Methodologically, a physicochemical and microbiological characterization of the molasses used as a fermentable substrate was carried out.

Subsequently, different concentrations of hop extract were applied using a completely randomized design (CRD) with two factors and two levels each. Factor A corresponded to the concentration of hop extract (22.22 and 30 mg/L), and factor B to the soluble solids content (16 and 18 °Brix), in addition to a control treatment. The aim was to evaluate their effect on the growth of lactic acid bacteria and the efficiency of the fermentation process.

The results indicated that the evaluated molasses showed moderate acidity and a pH between 5.38 and 5.55, conditions suitable for fermentation. In addition, its high soluble solids content ( $\approx 83.25$  °Brix) indicated a high availability of fermentable sugars. Statistical analysis showed no significant differences among treatments ( $p \geq 0.05$ ) regarding the bacterial population. However, fermentation efficiency was influenced by the concentration of hop extract, as treatment T1 (22.22 mg/L) presented the highest alcohol content and fermentation efficiency values, while higher concentrations showed a negative effect on fermentative performance.

These findings highlight the importance of maintaining a balance between microbial control and yeast metabolic activity.

**Keywords:** hop extract, lactic acid bacteria, molasses, alcoholic fermentation.

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
1.1 Antecedentes del problema .....	11
1.2 Planteamiento y formulación del problema .....	12
1.3 Justificación de la investigación .....	13
1.4 Delimitación de la investigación .....	14
1.3 Objetivo general .....	14
1.4 Objetivos específicos .....	14
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>16</b>
2.1 Estado de arte .....	16
2.1. Bases teóricas .....	18
2.1.1. Fermentación alcohólica .....	18
2.1.2 Bacterias ácido-lácticas (BAL) en procesos fermentativos .....	23
2.1.3 Lúpulo ( <i>Humulus lupulus</i> ) y sus compuestos bioactivos .....	29
2.1.4 Efecto del extracto de lúpulo en la fermentación alcohólica .....	35
2.2. Marco legal .....	41
2.2.1. NORMA TÉCNICA ECUATORIANA - NTE INEN 375 .....	41
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
3.1 Enfoque de la investigación .....	44
3.1.1 Tipo de investigación .....	44
3.1.2 Diseño de investigación .....	44
3.2 Metodología .....	44
3.2.1 Variables .....	44
3.2.2. Tratamientos .....	45
3.2.3. Diseño experimental .....	46
3.2.4. Recolección de datos .....	47
3.3. Análisis estadísticos .....	52
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>

4.1 Caracterización fisicoquímica y microbiológicamente de la melaza utilizada como sustrato en el proceso de fermentación, mediante análisis de laboratorio.

53

4.2 Evaluación de la incidencia del extracto de lúpulo, aplicado a diferentes concentraciones, sobre el crecimiento de bacterias ácido-lácticas durante el proceso fermentativo. .... 54

4.3 Determinación de la eficiencia del proceso de fermentación de melaza con *Saccharomyces cerevisiae*, en presencia del extracto de lúpulo. .... 60

**5. DISCUSIÓN..... 63**

**6. CONCLUSIONES..... 65**

**7. RECOMENDACIONES ..... 66**

Bibliografía ..... 67

Anexos ..... 71

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes del problema

La fermentación alcohólica es una tecnología bioquímica milenaria utilizada ampliamente en la producción de bebidas, alimentos y biocombustibles. Este proceso transforma carbohidratos en etanol y dióxido de carbono, siendo mediado principalmente por levaduras del género *Saccharomyces*. Dentro de este grupo, *Saccharomyces cerevisiae* se destaca por su alta eficiencia fermentativa, tolerancia al etanol, baja demanda nutricional y notable capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales (Acevedo et al., 2023).

No obstante, este proceso no es exclusivo de las levaduras. Diversos microorganismos presentes en el sustrato o en el entorno pueden interferir en la dinámica de fermentación. En particular, las bacterias ácido-lácticas (BAL), pertenecientes al orden *Lactobacillales*, son bacilos Gram positivos, catalasa negativos, no esporulados y anaerobios facultativos que metabolizan azúcares para producir ácido láctico. Estas bacterias suelen estar presentes en frutas, cereales, tubérculos o superficies de contacto, introduciéndose en los sistemas fermentativos mediante el microbiota natural del sustrato o por deficiencias en los protocolos de higiene (Blasko y Lñaki, 2021).

La coexistencia entre levaduras y BAL ha sido documentada en fermentaciones mixtas como las del vino, la cerveza, la kombucha y algunos destilados, donde la interacción puede ser sinérgica o competitiva. En el contexto industrial, sin embargo, la presencia de BAL se considera contaminante, ya que compiten por los azúcares fermentables, modifican el pH del medio y producen metabolitos antimicrobianos como ácido acético, peróxidos y bacteriocinas, que inhiben el crecimiento y el metabolismo de *S. cerevisiae* (De Oliveira Lino et al., 2024; Blasko y Lñaki, 2021).

Estudios recientes han evidenciado que ciertas cepas como *Limosilactobacillus fermentum* pueden reducir la eficiencia fermentativa en aproximadamente un 5 % en condiciones simuladas, y hasta en un 30 % en procesos industriales contaminados (de Oliveira Lino et al., 2024). Además, se ha observado que estas bacterias alteran parámetros fisicoquímicos claves, como la acidez total del medio, lo cual interfiere con enzimas esenciales de la vía glucolítica, retrasa la producción de etanol y favorece la formación de subproductos no deseados como glicerol y ácidos grasos volátiles (Qi et al., 2025).

Aunque existen investigaciones que exploran la incorporación de BAL en fermentaciones mixtas con fines tecnológicos o funcionales, estos estudios rara vez analizan su impacto directo sobre la eficiencia de producción de etanol. A ello se suma la escasez de estudios en contextos latinoamericanos, donde muchas fermentaciones se desarrollan en sistemas artesanales o semindustrializados sin un control microbiológico riguroso (Patel et al., 2023).

## **1.2 Planteamiento y formulación del problema**

### **1.2.1 Planteamiento del problema**

En la producción de bebidas alcohólicas, como la cerveza o etanol destilado, uno de los principales desafíos es el crecimiento indeseado de bacterias ácido-lácticas (BAL) por ejemplo, del género *Lactobacillus* que compiten con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* por recursos y alteran tanto el rendimiento alcohólico como el perfil sensorial final. Estas BAL pueden producir ácidos (láctico, acético) que deterioran la fermentación, disminuyen la viabilidad de la levadura y reducen el contenido de etanol incluso en un 22 % (Malta, 2023; p. ej. según estudios con mostos de maíz) (García, Ruíz, Suarez, y Romero, 2022). Actualmente, el control típico incluye aditivos antimicrobianos como antibióticos o biocidas, pero su uso se ve limitado por el desarrollo de resistencias bacterianas, restricciones regulatorias y crecientes exigencias del consumidor por alternativas naturales (Santos, 2022). Ante este panorama, los compuestos provenientes del lúpulo como los ácidos iso- $\alpha$  y  $\beta$  emergen como candidatos prometedores. Se ha demostrado su capacidad para inhibir patógenos como *Pediococcus pentosaceus* sin afectar la actividad de *S. cerevisiae* (Michiuet al., 2024)

No obstante, aunque existen investigaciones sobre la actividad antimicrobiana del lúpulo en sistemas fermentativos, aún falta evidencia específica en el BAL durante fermentación alcohólica realizada por *S. cerevisiae*. Y escasez de estudios recientes que integren controles, variables sensoriales y rendimiento etanólico manteniendo la actividad viable de *S. cerevisiae*. Por tanto, surge una necesidad clara: evaluar el efecto antimicrobiano del extracto de lúpulo frente a BAL durante la fermentación alcohólica, asegurando que la levadura mantenga su funcionalidad. Esto podría representar una alternativa sostenible frente a químicos sintéticos, alineada con las tendencias hacia prácticas más limpias y seguras en la industria de alimentos y bebidas.

### 1.2.2 Formulación del problema

¿Cómo incide la presencia de bacterias ácido-lácticas en la eficiencia del proceso de fermentación alcohólica llevado a cabo por levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, considerando parámetros como la producción de etanol, el consumo de azúcares y la acidez total del medio fermentativo?

### 1.3 Justificación de la investigación

De forma científica, es importante explorar más a fondo las interacciones entre microbios, específicamente entre *Saccharomyces* y las bacterias ácido-lácticas durante las fermentaciones alcohólicas. Aunque a menudo se encuentran juntas en fermentaciones naturales, su relación puede oscilar entre ser competitiva y sinérgica, dependiendo del sustrato, el ambiente y la cantidad de microorganismos presentes al inicio. Evidencia reciente muestra que las BAL disminuyen la eficiencia fermentativa al competir por azúcares y generar ácidos orgánicos que inhiben el metabolismo de *S. cerevisiae* (de Oliveira Lino et al., 2024; Qi et al., 2025). Asimismo, estudios en alimentos fermentados reportan interacciones específicas, donde levaduras inhiben la acidificación causada por BAL (Wenkang et al., 2024), lo que refuerza la necesidad de caracterizar estos mecanismos en fermentaciones industriales.

Desde el punto de vista tecnológico, *S. cerevisiae* es esencial tanto en alimentos como en bioetanol por su capacidad para fermentar azúcares bajo estrés. No obstante, su desempeño se ve afectado por cepas contaminantes de BAL, que incrementan la acidez y reducen la actividad de la levadura (de Oliveira Lino et al., 2024). Comprender esta interacción permitirá diseñar modelos predictivos de rendimiento y definir umbrales críticos de contaminación, lo cual es clave para optimizar el pH, la nutrición microbiana, el tipo de levadura y los protocolos de limpieza.

En el ámbito económico, la contaminación por BAL representa pérdidas significativas: estudios demuestran reducciones de rendimiento del 5 % en sistemas piloto y hasta del 27–30 % en plantas industriales (de Oliveira et al., 2024). Estas pérdidas no solo afectan la rentabilidad, sino que incrementan costes operativos y tiempos de producción por la necesidad de tratamientos correctivos y descarte de lotes. Desde una perspectiva social, muchas comunidades rurales y emprendimientos agroindustriales operan en condiciones semiartesanales sin control microbiológico riguroso. La contaminación por BAL ocurre sin detectarse

hasta que los productos muestran defectos sensoriales o baja graduación alcohólica. La generación de conocimiento técnico local, basado en evidencias científicas, permitirá capacitar a estos productores, mejorando la sostenibilidad de sus prácticas.

Finalmente, el componente ambiental es significativo: una fermentación más eficiente reduce el desperdicio de materia prima y el consumo de recursos. Procesos optimizados con controles adecuados contribuyen a los Objetivos de Desarrollo Sostenible, como el ODS 9 (industria, innovación e infraestructura) y el ODS 12 (producción y consumo responsables) (Rachwał y Gustaw, 2024).

#### **1.4 Delimitación de la investigación**

**Espacio:** El trabajo de titulación se desarrolló en la Universidad Agraria del Ecuador, Extensión Ciudad Universitaria Milagro en el laboratorio de procesamiento de alimentos.

**Tiempo:** El período de tiempo que tomó el desarrollo del trabajo de titulación fue de 8 meses.

**Población:** Este trabajo de investigación fue dirigido a la población en general, exceptuando personas alérgicas.

#### **1.3 Objetivo general**

Evaluar la incidencia del extracto de lúpulo sobre las bacterias ácido-lácticas en el proceso de fermentación de melaza con levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*).

#### **1.4 Objetivos específicos**

Caracterizar fisicoquímica y microbiológicamente la melaza utilizada como sustrato en el proceso de fermentación, mediante análisis de laboratorio.

Evaluar la incidencia del extracto de lúpulo, aplicado a diferentes concentraciones, sobre el crecimiento de bacterias ácido-lácticas durante el proceso fermentativo.

Determinar la eficiencia del proceso de fermentación de melaza con *Saccharomyces cerevisiae*, en presencia del extracto de lúpulo como agente antimicrobiano.

### **1.5 Hipótesis**

El extracto de lúpulo presenta un efecto antimicrobiano significativo sobre el crecimiento de la población de las bacterias ácido-lácticas durante el proceso de fermentación alcohólica mediante levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Estado de arte

El lúpulo, conocido por su uso en la cerveza, no solo le da amargor y aroma a la bebida, sino que también posee propiedades antimicrobianas. Investigaciones recientes han mostrado que los compuestos presentes en el lúpulo, como los ácidos alfa, los flavonoides y los humulonas, tienen un efecto inhibitorio sobre diversas bacterias, incluidas algunas patógenas como *Escherichia coli* y *Salmonella*. Estos elementos modifican la composición y la capacidad de absorción de las membranas celulares de las bacterias, lo que dificulta su proliferación. Asimismo, el lúpulo podría ser un recurso valioso para gestionar el microbiota durante la fermentación, aunque su impacto sobre las bacterias lácticas sigue siendo objeto de estudio (Lix, 2023).

Las bacterias del tipo ácido-láctico; como *Lactobacillus* y *Pediococcus*, son relevantes en la fermentación alcohólica, aunque también pueden ocasionar inconvenientes al modificar el perfil sensorial de los productos o competir con las levaduras por los recursos nutritivos. Una investigación realizada por Zhao et al. 2022 reveló que los extractos de lúpulo tienen un efecto antimicrobiano evidente sobre estas bacterias, lo que podría ser ventajoso en la elaboración de cervezas y otros productos fermentados. En particular, los ácidos alfa presentes en el lúpulo inhibieron el crecimiento de diversas cepas de bacterias ácido-lácticas sin afectar de manera significativa la actividad de *Saccharomyces cerevisiae*, la levadura que lleva a cabo la fermentación. Este hallazgo indica que el lúpulo podría ser una herramienta efectiva para manejar la contaminación bacteriana durante la fermentación.

Aunque el lúpulo presenta propiedades antimicrobianas frente a las bacterias, su relación con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* no está del todo definida. Una investigación de EL-Sherbin y colaboradores (2018) indicó que el extracto de lúpulo, aunque limita el desarrollo de bacterias ácido-lácticas, en cantidades elevadas podría perjudicar a la levadura, causando una desaceleración o incluso la interrupción del proceso fermentativo. Este es un punto importante a tener en cuenta, ya que es fundamental gestionar las bacterias sin perjudicar la actividad de la levadura para asegurar una fermentación eficaz. A pesar de estos posibles efectos negativos, el estudio

continúa analizando como modificar las dosis de extracto de lúpulo para maximizar sus beneficios sin poner en riesgo la viabilidad de la levadura.

El método de obtención de los componentes del lúpulo también afecta su capacidad para combatir microorganismos. Una investigación comparativa de las diversas técnicas de extracción, como el empleo de etanol y CO<sub>2</sub> en estado supercrítico, demostró que los extractos producidos por estos procesos presentan distintas cantidades de ácidos alfa, que son los principales responsables de la efectividad antimicrobiana. Estas técnicas permiten la obtención de extractos más potentes y concentrados para la lucha contra bacterias, lo que podría abrir nuevas vías para controlar las bacterias ácido-lácticas durante el proceso de fermentación. No obstante, es necesario seguir perfeccionando estos métodos para asegurar que no se alteren las características organolépticas del producto final (Thomson, 2020).

La gestión de la microbiota indeseada es esencial en la elaboración de cerveza, puesto que las bacterias ácido-lácticas pueden modificar tanto el sabor como la calidad de la bebida. Estudios recientes han indicado que los extractos de lúpulo podrían favorecer una fermentación más controlada al suprimir las bacterias ácido-lácticas sin perjudicar a *Saccharomyces cerevisiae*. Emplear lúpulo no solo podría ayudar a evitar contaminaciones, sino que también disminuiría la necesidad de productos químicos adicionales. Una investigación reciente reveló que, aparte de sus propiedades antimicrobianas, los extractos de lúpulo pueden mejorar el perfil sensorial de ciertos estilos de cerveza, convirtiendo esto en una alternativa atractiva para la industria. (García et al., 2022).

Aunque muchos estudios sobre el lúpulo se enfocan en la elaboración de cerveza, su aplicación en otros productos fermentados también ha sido investigada. Por ejemplo, en el vino, se ha estudiado la habilidad del lúpulo para regular las bacterias lácticas, a menudo responsables de defectos en el sabor y la calidad del vino. Investigaciones recientes han indicado que, similar a su función en la cerveza, los extractos de lúpulo podrían ser útiles para gestionar el microbiota sin afectar negativamente a las levaduras, resultando en una fermentación más controlada y un producto final de mejor calidad. Esta área sigue siendo prometedora y podría generar nuevas aplicaciones para el lúpulo en la elaboración de otros alimentos fermentados (López, 2022).

## 2.1. Bases teóricas

### 2.1.1. Fermentación alcohólica

#### 2.1.1.1 **Concepto y fundamentos de la fermentación alcohólica.**

La fermentación etílica es uno de los métodos biotecnológicos más antiguos y comunes, utilizado para convertir azúcares en etanol y dióxido de carbono gracias a la intervención de levaduras, en particular *Saccharomyces cerevisiae* (Dequin, 2018). Este proceso metabólico es esencial en la producción de bebidas tales como vino, cerveza y sidra, y también se considera un modelo importante para estudiar procesos de bioconversión tanto en el ámbito industrial como en el académico.

Bioquímicamente, la fermentación etílica se presenta como un proceso anaeróbico catabólico donde los carbohidratos, en su mayoría hexosas como glucosa y fructosa, sufren una descomposición a través de la glucólisis, produciendo piruvato. Este considerado producto luego se transforma en acetaldehído y, más adelante, en etanol por medio de enzimas específicas como la descarboxilasa de piruvato y la deshidrogenasa de alcohol (Piskur et al., 2023). Este proceso posibilita que las levaduras regeneren el  $\text{NAD}^+$  que es fundamental para mantener el flujo glucolítico en condiciones sin oxígeno, garantizando así su supervivencia y capacidad de fermentación.

La importancia industrial de este procedimiento se basa en la habilidad de las levaduras para ajustarse a diversas condiciones ambientales, soportar distintos niveles de etanol y rivalizar con otros microorganismos, garantizando así rendimientos suficientes de alcohol y características sensoriales atractivas. Además, la fermentación alcohólica abarca no solo factores microbiológicos, sino también aspectos fisicoquímicos y tecnológicos que fijan parámetros clave como la temperatura de fermentación, la disponibilidad de nutrientes, la relación carbono/nitrógeno y la concentración osmótica del entorno (Steensels y Verstrepen, 2022).

Es importante saber, en este contexto, que la fermentación alcohólica no es un sistema independiente; por el contrario, se integra en una interacción dinámica con levaduras, bacterias y otros microorganismos que están presentes en el mosto o el sustrato fermentable. Por ejemplo, las bacterias ácido-lácticas pueden convivir y tener un impacto en la fermentación primaria, alterando así la estabilidad microbiológica y la composición química del producto final (Padilla et al., 2022).

Controlar de manera estricta las variables del proceso (Fleet, 2018), mejorar genéticamente, emplear nutrientes adicionales y seleccionar cepas son técnicas que han posibilitado la optimización de procesos gracias al dominio de los principios de la fermentación alcohólica. Estos progresos han mejorado la seguridad, la calidad sensorial y la eficiencia de fermentación en los productos alcohólicos, lo que ha añadido valor a la industria agroindustrial y ha creado nuevas posibilidades para investigación y desarrollo.

La fermentación alcohólica es un ejemplo sobresaliente de cómo la biotecnología puede convertir recursos naturales en bienes de gran valor, incorporando principios tecnológicos, microbiológicos y bioquímicos que posibilitan su control y mejora con el fin de cumplir con las exigencias de un mercado que cada vez prioriza más la sostenibilidad y la calidad.

#### **2.1.1.2 Factores que afectan la fermentación alcohólica.**

La fermentación alcohólica es un proceso biológico complicado que se basa en la interacción de diversos elementos fisicoquímicos, microbiológicos y tecnológicos. Para asegurar la calidad, seguridad y eficacia de los productos fermentados, es esencial su comprensión. La concentración de azúcares, la composición del sustrato, la temperatura, la presencia de microorganismos que contaminen o compitan y la aireación son algunos de estos elementos que sobresalen. (Pretorius, 2022).

La temperatura es uno de los factores decisivos, pues afecta directamente la rapidez de crecimiento y la actividad enzimática de *Saccharomyces cerevisiae*. Temperaturas ideales propician una fermentación intensa, en cambio, desviaciones pueden hacer que el proceso se retrase o que se produzcan metabolitos no deseados, por ejemplo, compuestos sulfurados o alcoholes superiores (Steensels y Verstrepen, 2022). Por lo tanto, en la industria de la cerveza o el vino, el manejo térmico es un procedimiento esencial para conservar perfiles sensoriales estables.

La composición del sustrato es otro elemento significativo. La formación de subproductos secundarios y el rendimiento alcohólico están determinados por la presencia de azúcares reductores y no reductores, así como también de carbohidratos fermentables como la glucosa, la fructosa o la maltosa (Fleet, 2018). Asimismo, la carencia de nutrientes fundamentales como el magnesio o el zinc, las vitaminas del complejo B y el nitrógeno tiene la capacidad de limitar la actividad

fermentativa, lo que puede resultar en fermentaciones incompletas o interrupciones imprevistas (Salazar et al., 2023).

El contenido de oxígeno en las fases iniciales también tiene un impacto. A pesar de que la fermentación alcohólica es un proceso anaerobio, se requiere una pequeña aireación al principio para sintetizar ácidos grasos insaturados y esteroides, los cuales refuerzan la membrana plasmática de las levaduras y les permiten resistir el estrés etanólico (Zhang et al., 2018). La escasez de oxígeno puede limitar la viabilidad celular y afectar negativamente el proceso fermentativo.

La concentración de etanol producida a lo largo del proceso es otro elemento importante. La presencia de etanol en niveles elevados tiene un efecto limitante, ya que impacta tanto la actividad de enzimas esenciales como la integridad de la membrana celular; esto puede interrumpir el proceso de fermentación antes de que se terminen los azúcares disponibles (Walker y Stewart, 2022).

Por último, la interacción con otros microorganismos, como bacterias ácido-lácticas u hongos contaminantes, puede alterar significativamente la dinámica de la fermentación. Estos microorganismos pueden competir por nutrientes, producir metabolitos inhibitorios o provocar desviaciones organolépticas no deseadas (Padilla et al., 2022). Por tal motivo, el control microbiológico y la higiene de los equipos son estrategias imprescindibles en la industria.

En síntesis, la fermentación alcohólica responde a un delicado equilibrio de variables que deben ser monitoreadas y ajustadas para garantizar resultados óptimos. El dominio de estos factores permite a la industria agroindustrial innovar y adaptar procesos, asegurando productos con alta calidad, estabilidad y aceptación por parte de los consumidores.

### **2.1.1.3 Rol de las levaduras en la fermentación (*Saccharomyces cerevisiae*).**

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es, sin lugar a duda, el microorganismo más relevante en la fermentación alcohólica, tanto desde una perspectiva histórica como biotecnológica. Su domesticación y aprovechamiento datan de milenios atrás, pero su estudio científico ha permitido perfeccionar procesos industriales hasta niveles de alta eficiencia y control (Pretorius, 2022). Esta especie se caracteriza por su notable capacidad para transformar azúcares fermentables en etanol y dióxido de carbono, proceso que no solo genera alcohol,

sino también una diversidad de compuestos secundarios determinantes para el perfil sensorial de bebidas como vino, cerveza o sidra (Fleet, 2018).

El rol de *S. cerevisiae* en la fermentación se explica a partir de su metabolismo facultativamente anaerobio. Bajo condiciones anaerobias, la levadura canaliza la glucosa hacia la vía glucolítica y la posterior fermentación etílica para mantener el balance redox mediante la regeneración de NAD<sup>+</sup> (Piskur et al., 2023). Esta estrategia metabólica les confiere una ventaja competitiva frente a otras especies microbianas, ya que su alta tolerancia al etanol que puede superar el 15% v/v en algunas cepas inhibe a organismos competidores, asegurando así su predominio en el medio fermentativo (Walker y Stewart, 2022).

Otro aspecto fundamental es su contribución a la generación de metabolitos secundarios. Además de etanol y CO<sub>2</sub>, *S. cerevisiae* produce ésteres, alcoholes superiores, ácidos orgánicos y compuestos de azufre en concentraciones controladas que moldean el aroma y sabor del producto final (Steensels y Verstrepen, 2022). La regulación de estas rutas metabólicas depende de la cepa empleada, las condiciones de cultivo y la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno y vitaminas (Salazar et al., 2023). De ahí la importancia de seleccionar y manejar cepas robustas y adaptadas a condiciones específicas.

El control tecnológico sobre las levaduras no se limita a su uso como inóculo. El mejoramiento genético, mediante técnicas de mutagénesis o edición génica, ha permitido desarrollar cepas con características optimizadas: mayor resistencia al etanol, menor producción de compuestos indeseables y mejor rendimiento en sustratos diversos, como melazas o subproductos agrícolas (Pretorius, 2022). Además, la fermentación con cepas no convencionales o mezclas de levaduras se explora actualmente como alternativa para diversificar perfiles organolépticos, respondiendo a la demanda de consumidores por bebidas diferenciadas (Ciani y Comitini, 2022).

Además, el comportamiento de *S. cerevisiae* dentro de comunidades mixtas de microorganismos es un tema que interesa, ya que su interacción con otras levaduras y bacterias ácido-lácticas puede afectar la evolución química y microbiológica del proceso (Padilla et al., 2022). Para evitar que se desvíe el proceso de fermentación y asegurar la calidad del producto final, es vital investigar estas sinergias o competencias.

*Saccharomyces cerevisiae* es el motor biológico que impulsa la fermentación alcohólica. Su investigación y administración posibilitan que el sector agroindustrial innove de manera constante, mejorando la producción de bebidas fermentadas con características sensoriales reguladas y estándares de inocuidad cada vez más rigurosos.

#### **2.1.1.4 Interacciones microbianas durante la fermentación alcohólica.**

La fermentación alcohólica no se lleva a cabo en un entorno estéril; al contrario, es un ecosistema activo donde *Saccharomyces cerevisiae* convive y compete con distintas especies de microorganismos, especialmente otras levaduras y bacterias ácido-lácticas (BAL). La calidad sensorial de los productos fermentados, la estabilidad microbiológica y la eficacia del proceso se ven fuertemente afectadas por estas interacciones, que pueden ser antagónicas o sinérgicas (Ciani y Comitini, 2022).

En lo que respecta a la elaboración de cerveza artesanal y la vinificación, las BAL (bacterias ácido-lácticas), como *Pediococcus*, *Lactobacillus* y *Oenococcus oeni*, tienen la capacidad de coexistir con *S. cerevisiae*. Estas bacterias llevan a cabo la fermentación maloláctica, que consiste en convertir el ácido málico en ácido láctico, lo cual reduce la acidez del vino y añade propiedades organolépticas atractivas (Bartowsky, 2022). No obstante, un aumento desmedido de BAL puede producir compuestos indeseables, a saber: ácidos volátiles o biogénicos, que pueden comprometer la estabilidad y la aceptabilidad del producto (Nisiotou y Nychas, 2022).

La concentración de etanol, la presencia de nutrientes y la existencia de compuestos antimicrobianos naturales, como los ácidos iso-alfa que provienen del lúpulo (Rojo et al., 2022), son algunos de los factores que regulan la relación entre bacterias y levaduras. *S. cerevisiae* produce etanol, acidifica el medio y genera metabolitos secundarios como los ácidos grasos de cadena media, lo cual tiene un efecto inhibitorio sobre BAL (Fleet, 2018). Esta oposición microbiológica es beneficiosa para evitar contaminaciones y mejorar la fermentación principal.

Por otro lado, las interacciones entre *S. cerevisiae* y levaduras no-*Saccharomyces* cobran cada vez mayor relevancia. Especies como *Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* o *Pichia kluyveri* pueden contribuir positivamente a la complejidad aromática, ya que presentan rutas metabólicas

complementarias que potencian la producción de ésteres y terpenos (Padilla et al., 2020). No obstante, estas especies presentan menor tolerancia al etanol, por lo que suelen dominar solo en fases iniciales de la fermentación, siendo posteriormente desplazadas por *S. cerevisiae* (Ciani y Comitini, 2022).

La cofermentación controlada mediante cultivos mixtos intencionalmente diseñados es una estrategia tecnológica que aprovecha estas sinergias para diversificar perfiles sensoriales y optimizar la cinética fermentativa (Jolly et al., 2022). Para ello, es fundamental comprender las relaciones de competencia por nutrientes, producción de killer factors (toxinas proteicas que eliminan cepas sensibles) y efectos de inhibición cruzada entre especies (Fleet, 2018).

Las interacciones de los microorganismos durante la fermentación alcohólica son un elemento para determinar la calidad final de las bebidas fermentadas. El manejo controlado de estos microorganismos, apoyado en el conocimiento de sus dinámicas ecológicas, ofrece a la industria agroindustrial herramientas para innovar en la creación de productos diferenciados, de mayor valor agregado y con estándares de inocuidad cada vez más rigurosos.

## **2.1.2 Bacterias ácido-lácticas (BAL) en procesos fermentativos**

### **2.1.2.1 Generalidades y características de las BAL.**

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son un conjunto de microorganismos que tienen una gran importancia en términos sanitarios y tecnológicos, y se les reconoce ampliamente por su intervención en la fermentación de las comidas y las bebidas. Se trata de microorganismos que son Gram positivos, aerotolerantes, anaerobios facultativos y catalasa negativos; su rasgo más distintivo es su habilidad para convertir carbohidratos en ácido láctico como producto metabólico principal (Zheng et al., 2022). Esta capacidad fermentativa otorga a las BAL un rol crucial como agentes de bioconservación, de mejoramiento de la textura y de producción de compuestos que regulan el gusto y el olor (Gänzle, 2022). Dentro de este grupo destacan géneros como *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus* y *Lactococcus*, cada uno con características fisiológicas y metabólicas particulares que definen su aplicación en procesos fermentativos específicos (Wuyts et al., 2022). Por ejemplo, *Lactobacillus plantarum* es ampliamente utilizado en fermentaciones vegetales y cárnicas por su versatilidad y robustez, mientras que *Oenococcus oeni* desempeña un rol protagónico en la fermentación maloláctica de

vinos, suavizando la acidez y aportando estabilidad microbiológica (Bartowsky, 2022).

Las BAL pueden ser heterofermentativas u homofermentativas, según el metabolismo. Las primeras transforman primordialmente la glucosa en ácido láctico mediante la vía de Embden-Meyerhof-Parnas, mientras que las heterofermentativas producen, además, compuestos secundarios como dióxido de carbono, etanol o ácido acético mediante la vía de la fosfoacetolasa (Gänzle, 2022). Esta diferenciación metabólica explica su influencia en la formación de perfiles organolépticos diversos y su capacidad para competir con otros microorganismos en sustratos fermentables.

La habilidad de generar bacteriocinas, péptidos antimicrobianos de amplio espectro que suprimen microorganismos o patógenos no deseados, es otra característica sobresaliente de las BAL. Esto aumenta su uso como cultivos protectores o iniciadores en sistemas fermentativos (Bali et al., 2022). Este sistema natural de biocontrol ayuda en gran medida a que los productos alimenticios sean seguros y su vida útil se alargue.

No obstante, en algunos procesos, las BAL pueden considerarse contaminantes indeseables. En fermentaciones alcohólicas como la vinificación o la cervecería, un crecimiento no controlado de BAL puede generar metabolitos no deseados, como ácido acético o biaminas, alterando la estabilidad microbiológica y sensorial del producto (Nisiotou y Nychas, 2022). Por ello, su manejo adecuado, mediante prácticas de higiene, control de parámetros y uso de compuestos antimicrobianos como el lúpulo, resulta fundamental para evitar contaminaciones.

En suma, las BAL representan un grupo versátil de microorganismos, cuya correcta gestión permite potenciar la calidad, seguridad y funcionalidad de alimentos y bebidas fermentadas. El estudio y la implementación estratégica de esta son, hasta el día de hoy, bases esenciales de la biotecnología alimentaria contemporánea.

### **2.1.2.2 *Metabolismo de las bacterias ácido-lácticas.***

Uno de los cimientos que apoya el uso amplio de las bacterias ácido-lácticas (BAL) en la fermentación alimentaria es su metabolismo, ya que este regula la generación de metabolitos primarios y secundarios que tienen un impacto sobre la seguridad, calidad e inocuidad de los alimentos (Gänzle, 2022). Según Zheng et al. (2022), su vía metabólica central se fundamenta en la fermentación de

carbohidratos, sobre todo hexosas como la glucosa, para conseguir energía en condiciones microaerófilas o anaerobias.

Desde el punto de vista bioquímico, las BAL se dividen en homofermentativas y heterofermentativas, según la vía metabólica que predomina. Las BAL homofermentativas, como *Lactococcus lactis* o *Streptococcus thermophilus*, convierten la glucosa a través de la vía EMP (Embden-Meyerhof-Parnas), produciendo ácido láctico como el único producto principal y escasas cantidades de subproductos (Wuyts et al., 2022). Este camino posibilita que la conversión de hexosas en energía se maximice (2 moles de ATP por mol de glucosa), garantizando así altos rendimientos de ácido láctico y, en consecuencia, una acidificación del medio rápida y eficaz.

Por otro lado, las BAL obligadas heterofermentativas, como *Oenococcus oeni* o *Leuconostoc mesenteroides*, emplean la ruta heterofermentativa o de la fosfoctolasa para convertir parcialmente la glucosa en ácido láctico; al mismo tiempo producen dióxido de carbono (Gänzle, 2022) y acetato o etanol. Esta ruta genera menos ATP (1 mol de ATP por cada mol de glucosa) pero brinda beneficios ecológicos, pues los compuestos secundarios añaden complejidad sensorial y tienen efectos antimicrobianos contra especies competidoras (Bartowsky, 2022).

Una característica particular de las BAL es su escaso poder respiratorio, que se debe a la falta de citocromos y a que no tienen una cadena completa para el transporte de electrones. Sin embargo, algunas cepas pueden utilizar oxígeno de forma limitada, incrementando su resistencia al estrés oxidativo mediante la actividad de enzimas como la peroxidasa y el superóxido dismutasa (Zheng et al., 2022). Este rasgo les permite sobrevivir en condiciones variables de oxígeno, como ocurre en la fermentación de vegetales o productos lácteos.

Además de los ácidos orgánicos, las BAL pueden sintetizar compuestos de interés tecnológico, como diacetilo, acetaldehído y bacteriocinas. Estos metabolitos secundarios contribuyen al perfil aromático de quesos, vinos y embutidos, al tiempo que incrementan la estabilidad microbiológica del alimento (Bali et al., 2022). El diacetilo, por ejemplo, aporta notas mantecosas características en mantequillas y yogures, mientras que las bacteriocinas actúan como conservantes naturales, limitando el desarrollo de patógenos como *Listeria monocytogenes*.

El metabolismo de las BAL no solo sustenta su función como agentes acidificantes, sino que las posiciona como microorganismos versátiles capaces de

modulares características sensoriales y de seguridad. Comprender la complejidad de estas rutas metabólicas permite optimizar su aplicación como cultivos iniciadores o protectores en la industria agroalimentaria contemporánea.

### **2.1.2.3 Efectos de las bacterias ácido-lácticas en la calidad y seguridad de bebidas alcohólicas.**

En los procesos de elaboración de bebidas alcohólicas como vinos, cervezas artesanales y sidras, las bacterias ácido-lácticas (BAL) juegan un rol dual: pueden actuar como agentes benéficos que aportan complejidad sensorial y estabilidad microbiológica, pero también como contaminantes que comprometen la calidad e inocuidad del producto final (Nisiotou y Nychas, 2022).

Un efecto positivo ampliamente aprovechado es la fermentación maloláctica, conducida principalmente por *Oenococcus oeni* y, en menor medida, por especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus* (Bartowsky, 2022). Esta transformación bioquímica convierte el ácido málico, de sabor áspero, en ácido láctico, más suave y estable, reduciendo la acidez y aportando redondez al perfil sensorial del vino. Además, este proceso contribuye a la estabilidad microbiológica, ya que agota un nutriente clave para microorganismos indeseables (Lerm et al., 2023).

Sin embargo, cuando el crecimiento de las BAL no es controlado, pueden surgir problemas significativos. En cervezas, por ejemplo, especies como *Lactobacillus brevis* y *Pediococcus damnosus* son responsables de la turbidez, la generación de acidez excesiva y aromas desagradables, como notas a mantequilla rancia, atribuibles al diacetilo (Rojo et al., 2022).

La generación de biaminas, como la tiramina y la histamina, que son metabolitos resultantes de la descarboxilación de aminoácidos, representa otro riesgo importante. Su acumulación en cervezas y vinos puede suponer un peligro para la salud de aquellos consumidores sensibles a estas sustancias, provocando reacciones negativas como eritema facial, malestar gastrointestinal y cefaleas (Liu et al., 2023). Por esta razón, elegir cultivos malolácticos que tengan una capacidad de formación de biaminas baja es un procedimiento aconsejable en la enología moderna.

Las BAL también tienen la capacidad de producir ácido acético en niveles altos, lo que puede dar lugar a sabores avinagrados y a fallas aromáticas indeseadas. Cuando las condiciones de fermentación no favorecen que *Saccharomyces cerevisiae* sea dominante, es habitual que ocurra este efecto, lo

que permite que BAL indeseables se multipliquen (Nisiotou y Nychas, 2022). La ausencia de sulfuroso en vinos, la presencia de oxígeno y una higiene deficiente son elementos que contribuyen a este tipo de desviaciones.

A pesar de estos riesgos, la gestión adecuada de las BAL mediante buenas prácticas de manufactura, monitoreo microbiológico y uso de herramientas biotecnológicas como cultivos iniciadores seleccionados y compuestos antimicrobianos naturales, por ejemplo, extractos de lúpulo en cervezas permite maximizar sus beneficios y mitigar efectos negativos (Rojo et al., 2022). Además, la aplicación de bacteriocinas producidas por ciertas cepas de BAL representa una estrategia emergente para mejorar la seguridad microbiológica de las bebidas fermentadas (Bali et al., 2022).

En definitiva, el impacto de las BAL en la calidad y seguridad de las bebidas alcohólicas depende de su manejo controlado. Comprender su metabolismo, sus interacciones y sus efectos sobre el perfil sensorial y la inocuidad es clave para la industria agroindustrial, que apuesta cada vez más por procesos fermentativos estandarizados, sostenibles y diferenciados.

#### **2.1.2.4 Estrategias de control de bacterias ácido-lácticas en fermentaciones industriales.**

En la industria de bebidas alcohólicas y otros productos fermentados, la presencia de bacterias ácido-lácticas (BAL) puede ser un factor beneficioso o problemático, dependiendo de su control. Si bien ciertas especies son esenciales para procesos como la fermentación maloláctica en vinos, su proliferación no deseada puede generar defectos organolépticos, turbidez, formación de biaminas y pérdidas económicas (Nisiotou y Nychas, 2022). Por ello, las estrategias para gestionar su presencia se basan en prácticas integrales que combinan medidas físicas, químicas y biológicas.

Una de las tácticas más habituales consiste en limpiar y desinfectar con rigor las superficies de contacto y los equipos. Según Bokulich y Bamforth (2024), una limpieza efectiva utilizando detergentes alcalinos, ácidos o desinfectantes específicos disminuye de manera importante la carga microbiana y evita las contaminaciones cruzadas, sobre todo en bodegas vinícolas y plantas cerveceras.

Otra herramienta esencial es el control de los parámetros fisicoquímicos. Para limitar el desarrollo de BAL contaminantes y beneficiar a levaduras preferibles como *Saccharomyces cerevisiae*, se modifican variables tales como la

temperatura, la disponibilidad de oxígeno y el pH. Por ejemplo, en las fábricas de cerveza, mantener bajas temperaturas y regular el pH del mosto previene la presencia de especies no deseadas de *Lactobacillus* (Garofalo et al., 2022).

En la enología, es habitual añadir dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ) para suprimir BAL no deseadas. El  $\text{SO}_2$  funciona como un agente antioxidante y antimicrobiano, salvaguardando al vino de contaminaciones y oxidaciones a lo largo de la fermentación y el almacenamiento (Bartowsky, 2022). No obstante, las tendencias actuales indican que su uso se reduce porque los consumidores exigen productos con menos aditivos.

Para la cerveza, emplear compuestos que provienen del lúpulo, por ejemplo los iso-alfa-ácidos, representa una táctica eficaz y natural. Según Rojo et al. (2022), estos compuestos tienen propiedades antimicrobianas selectivas que limitan a las BAL, pero no alteran de forma importante la actividad de las levaduras cerveceras. Esta ventaja se utiliza particularmente en estilos de cerveza con alto contenido de lúpulo, como las IPAs.

La selección y el uso de cultivos iniciadores dominantes, ya sean bacterias lácticas específicas o levaduras, representan otra opción biotecnológica. En la vinificación, el uso de *Oenococcus oeni* seleccionado para realizar la fermentación maloláctica permite desplazar especies contaminantes y garantizar un proceso controlado (Lerm et al., 2023). Además, el desarrollo de cepas de levaduras productoras de bacteriocinas o killer factors amplía las opciones de biocontrol (Bali et al., 2022).

En contextos industriales avanzados, la monitorización microbiológica mediante técnicas moleculares (PCR en tiempo real, secuenciación de ADN) permite identificar y cuantificar rápidamente la población microbiana, facilitando la toma de decisiones oportunas para corregir desviaciones (Nisiotou y Nychas, 2022). Finalmente, la innovación en materiales y recubrimientos antimicrobianos para superficies de contacto y sistemas de tuberías se presenta como una línea emergente para limitar biofilms de BAL en ambientes de producción de bebidas (Garofalo et al., 2022).

En conjunto, estas estrategias reflejan la necesidad de aplicar un enfoque integral de control, adaptado a cada proceso y alineado con la demanda de productos seguros, estables y con mínima intervención química. El conocimiento y

manejo de las BAL, por tanto, se consolidan como competencias clave en la biotecnología y la ingeniería de procesos fermentativos modernos.

### **2.1.3 Lúpulo (*Humulus lupulus*) y sus compuestos bioactivos**

#### **2.1.3.1 Origen, variedades y composición química del lúpulo.**

El lúpulo (*Humulus lupulus* L.) es una planta trepadora perenne de la familia Cannabaceae, originaria de regiones templadas del hemisferio norte. Su uso documentado en la elaboración de cerveza data de la Edad Media, cuando comenzó a emplearse sistemáticamente por sus propiedades conservantes y su aporte de amargor y aroma (Stevens et al., 2022). Hoy en día, el lúpulo se cultiva extensamente en países como Alemania, Estados Unidos, República Checa y China, siendo uno de los insumos agrícolas estratégicos para la industria cervecera (Stewart et al., 2022). En términos botánicos, *H. lupulus* se caracteriza por ser una planta dioica, es decir, presenta flores masculinas y femeninas en plantas separadas. Solo las flores femeninas sin fecundar, conocidas como conos o inflorescencias, se utilizan en la industria cervecera debido a su alto contenido de resinas y aceites esenciales responsables de sus propiedades funcionales (Muranyi, 2023).

La diversidad genética del lúpulo ha dado lugar a múltiples variedades y cultivares, cada uno con perfiles específicos de compuestos bioactivos y características sensoriales. Variedades nobles como Saaz, Tettnang y Hallertau Mittelfrüh son reconocidas por su perfil aromático delicado y bajo contenido de alfa-ácidos, ideales para cervezas de tipo lager y pilsner (Stewart et al., 2022). En contraste, variedades modernas como Cascade, Citra o Simcoe, originarias principalmente de Estados Unidos, se caracterizan por sus intensos aromas cítricos, florales y resinosos, con mayores concentraciones de alfa-ácidos y aceites esenciales, favoreciendo estilos lupulados como las IPA (India Pale Ale) (Muranyi, 2023).

La composición química del lúpulo es compleja y se organiza principalmente en tres fracciones: resinas amargas, aceites esenciales y polifenoles. Las resinas se subdividen en alfa-ácidos (humulonas) y beta-ácidos (lupulonas). Los alfa-ácidos son precursores del amargor de la cerveza, ya que durante la cocción del mosto se isomerizan formando iso-alfa-ácidos, responsables del sabor amargo y de propiedades antimicrobianas selectivas contra bacterias Gram positivas, como las BAL (Pires y Brányik, 2022).

Los aceites esenciales, que representan aproximadamente el 0,5-3 % del peso seco de los conos, incluyen una mezcla de terpenos y sesquiterpenos, como mirceno, humuleno, cariofileno y farneseno, los cuales aportan los perfiles aromáticos característicos del lúpulo (Stewart et al., 2022). Estos compuestos son altamente volátiles y su perfil varía significativamente según la variedad, condiciones de cultivo y técnicas de poscosecha.

Los polifenoles del lúpulo, como flavonoides y taninos, desempeñan funciones antioxidantes y contribuyen a la estabilidad coloidal y sensorial de la cerveza. Además, estos compuestos pueden ejercer efectos bioactivos beneficiosos, como actividad antioxidante y propiedades antiinflamatorias, lo que ha motivado investigaciones para su aplicación en alimentos funcionales y nutracéuticos (Muranyi, 2023).

En conjunto, el origen, diversidad varietal y riqueza química del lúpulo lo posicionan como un insumo clave no solo para aportar amargor y aroma, sino también como fuente de compuestos con potencial antimicrobiano y funcional, aspecto de creciente interés en el desarrollo de cervezas artesanales innovadoras y productos fermentados de valor agregado.

#### **2.1.3.2 Principales compuestos antimicrobianos del lúpulo (alfa-ácidos, beta-ácidos y polifenoles).**

El lúpulo (*Humulus lupulus* L.) destaca no solo por su contribución sensorial a la cerveza, sino también por su contenido de compuestos con actividad antimicrobiana, que desempeñan un papel determinante en la estabilidad microbiológica del producto final. Los principales responsables de este efecto son los alfa-ácidos, los beta-ácidos y ciertos polifenoles, cuyas propiedades han sido objeto de interés tanto para la industria cervecera como para aplicaciones biotecnológicas emergentes (Muranyi, 2023).

En las glándulas de lupulina de los conos femeninos se hallan los alfa-ácidos, entre ellos la cohumulona, la adhumulona y la humulona. Estos compuestos se isomerizan durante la cocción del mosto, produciendo iso-alfa-ácidos. Estos son los que le dan a la cerveza su amargor característico y tienen una actividad selectiva contra bacterias Gram positivas, como las ácido-lácticas (BAL) (Pires y Brányik, 2022). Esta propiedad es particularmente apreciada en la cervecería, ya que funciona como una barrera natural contra la expansión de contaminantes que

tienen el potencial de afectar la estabilidad y el perfil sensorial de la cerveza (Stewart et al., 2022).

Los beta-ácidos, entre los que se destacan lupulona, colupulona y adlupulona, no se isomerizan durante el hervor, pero muestran un potente efecto bacteriostático. Aunque poseen menor solubilidad que los alfa-ácidos, su actividad antimicrobiana se activa particularmente en ambientes con pH bajo, como ocurre en estilos de cerveza con acidez elevada o en condiciones de almacenamiento prolongado (Muranyi, 2023). Estudios recientes evidencian que los beta-ácidos pueden actuar sinérgicamente con los iso-alfa-ácidos, potenciando el efecto inhibitorio sobre BAL resistentes y otras bacterias contaminantes (Liu et al., 2023).

Adicionalmente, el lúpulo es rico en polifenoles, entre los cuales destacan flavonoides como la xantohumol y el isoxantohumol. Estos compuestos no solo contribuyen con propiedades antioxidantes, que favorecen la estabilidad oxidativa de la cerveza, sino que también exhiben actividad antimicrobiana complementaria. Su modo de acción implica la alteración de la permeabilidad de membranas bacterianas, la inhibición de enzimas clave y la interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos (Muranyi, 2023). Esta acción combinada refuerza la eficacia natural del lúpulo como bioconservante, alineándose con la tendencia de sustituir aditivos sintéticos por alternativas de origen natural.

Los efectos antimicrobianos de estos compuestos han despertado interés más allá de la industria cervecera. Investigaciones recientes exploran la incorporación de extractos de lúpulo en otros alimentos y bebidas fermentadas, como quesos y sidras, para controlar microorganismos indeseables sin afectar cepas tecnológicamente beneficiosas, como *Saccharomyces cerevisiae* (Stewart et al., 2022). Esta aplicación potencial abre perspectivas para desarrollar productos con etiquetas “clean label”, cumpliendo con la demanda de consumidores por alimentos menos procesados y libres de conservantes sintéticos.

En suma, los alfa-ácidos, beta-ácidos y polifenoles del lúpulo conforman un sistema de defensa natural, que, integrado con prácticas tecnológicas adecuadas, fortalece la inocuidad y prolonga la vida útil de bebidas fermentadas. Su aprovechamiento estratégico representa un ejemplo de cómo compuestos bioactivos de origen vegetal pueden sustituir aditivos convencionales, generando valor agregado en la agroindustria actual.

### **2.1.3.3 Mecanismos de acción antimicrobiana de los extractos de lúpulo.**

Los extractos de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) han sido ampliamente valorados no solo por su contribución sensorial en la elaboración de cervezas, sino también por su potente efecto antimicrobiano, principalmente frente a bacterias Gram positivas como las bacterias ácido-lácticas (BAL) (Muranyi, 2023). Este efecto biopreservante se fundamenta en mecanismos de acción bien caracterizados, sustentados en la actividad de sus principales compuestos bioactivos: iso-alfa-ácidos, beta-ácidos y polifenoles (Liu et al., 2023).

El mecanismo más estudiado es el de los iso-alfa-ácidos, productos de la isomerización térmica de los alfa-ácidos (humulonas) durante la cocción del mosto. Estos compuestos funcionan, sobre todo, modificando la permeabilidad de la membrana celular de las bacterias y perturbando el traslado de protones y otros iones vitales. Los iso-alfa-ácidos, al provocar una disminución del gradiente de protones (PMF, Proton Motive Force), limitan la habilidad de las BAL para conservar su equilibrio energético, lo que afecta procesos esenciales como la síntesis de ATP (Stewart et al., 2022).

A pesar de su baja capacidad de isomerización y solubilidad, los beta-ácidos muestran una destacada actividad antimicrobiana en entornos ácidos, como el que se encuentra en la cerveza y otras bebidas fermentadas. Estos compuestos se introducen en la membrana de las células y modifican su estructura lipídica, lo que causa filtraciones del contenido intracelular y altera sistemas enzimáticos críticos (Muranyi, 2023). Se ha notado que los beta-ácidos tienen un efecto sinérgico con los iso-alfa-ácidos, lo cual extiende el espectro de acción contra cepas de BAL más resistentes (Liu et al., 2023).

Asimismo, los polifenoles del lúpulo, incluyendo la isoxantohumol, la xantohumol y otros flavonoides, contribuyen a esta función antimicrobiana a través de varios procedimientos. Tienen el efecto de actuar como quelantes de metales necesarios para la actividad enzimática bacteriana, obstruir las vías de señalización celular y afectar la integridad de la pared celular (Muranyi, 2023). Algunos estudios sugieren que los polifenoles también pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS) en contacto con la membrana bacteriana, intensificando el daño oxidativo en células sensibles (Liu et al., 2023).

Un aspecto clave de la acción antimicrobiana de los extractos de lúpulo es su selectividad. A diferencia de conservantes de amplio espectro, los compuestos amargos del lúpulo actúan principalmente sobre bacterias Gram positivas, como *Lactobacillus* y *Pediococcus*, sin afectar significativamente el crecimiento y la actividad fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* (Pires y Brányik, 2022). Esta selectividad explica su rol histórico y actual como bioconservantes naturales en la cervecería, donde permiten mantener la pureza microbiológica del producto final.

En investigaciones recientes, se ha explorado la sinergia entre extractos de lúpulo y otros métodos de conservación, como el uso combinado con bacteriocinas, aceites esenciales y técnicas de biocontrol. Estos métodos persiguen conseguir una mayor eficacia antimicrobiana, disminuir la cantidad de lúpulo que se necesita y ampliar su uso en alimentos funcionales y bebidas fermentadas que no sean cerveza (Liu et al., 2023). En resumen, los extractos de lúpulo tienen una acción antimicrobiana que se manifiesta de manera selectiva y a través de varios factores, incluyendo alteraciones estructurales, interferencias en el metabolismo y la producción de estrés oxidativo. Entender estos mecanismos hace posible mejorar su utilización como instrumento biotecnológico, lo que contribuye a aumentar la inocuidad de las bebidas fermentadas y fomenta opciones de conservación más sustentables y naturales.

#### **2.1.3.4 Aplicaciones del lúpulo en la industria de bebidas fermentadas.**

El lúpulo (*Humulus lupulus* L.) es de vital importancia y tiene funciones múltiples en la industria de las bebidas fermentadas, sobre todo en la elaboración de cerveza, donde su función no se limita a dar aroma y amargor. Según Stewart et al. (2022), su uso consolidado se debe a que es capaz de mejorar la estabilidad microbiológica, modificar el perfil sensorial y ayudar a mantener la vida útil del producto final.

La aplicación más conocida del lúpulo es agregarlo al mosto cervecero en el proceso de cocción, tiempo en el que los alfa-ácidos se isomerizan para crear iso-alfa-ácidos. Estas últimas son las encargadas de proporcionar el típico amargor y una función conservante significativa (Pires Brányik, 2022). Esta acción antimicrobiana selectiva actúa principalmente sobre bacterias Gram positivas, como *Lactobacillus* y *Pediococcus*, frecuentes contaminantes de la cerveza, sin inhibir la actividad de *Saccharomyces cerevisiae* (Liu et al., 2023). Gracias a este

efecto, el lúpulo reemplaza la necesidad de conservantes sintéticos, alineándose con las tendencias de producción “clean label”.

En la cervecería moderna, el lúpulo también se emplea en etapas de late hopping y dry hopping, técnicas que potencian los perfiles aromáticos mediante la adición de flores o pellets de lúpulo en fases posteriores de la fermentación o durante la maduración. Este enfoque resalta notas cítricas, florales o resinosas, diversificando la oferta de estilos, como las IPAs (India Pale Ale) y cervezas artesanales de autor (Muranyi, 2023). La calidad y perfil sensorial del lúpulo influyen directamente en la diferenciación de marca y en la preferencia de nichos de consumidores especializados.

Fuera del ámbito cervecero, la funcionalidad del lúpulo está siendo explorada en la elaboración de otras bebidas fermentadas, como sidras y vinos artesanales, donde se evalúa su efecto conservante y potenciador de aroma (Stewart et al., 2022). Por ejemplo, los extractos de lúpulo pueden añadirse a la sidra para disminuir el crecimiento de BAL no deseadas y proporcionar una complejidad aromática, lo que extiende la variedad de productos únicos para mercados gourmet. Según Liu et al. (2023), los extractos de lúpulo tienen el potencial de ser usados como componentes funcionales en kombuchas y en bebidas fermentadas no alcohólicas, gracias a sus características antimicrobianas naturales y a su perfil de polifenoles con actividad antioxidante. Para mantener su estabilidad y funcionalidad durante el almacenamiento, estos extractos pueden incorporarse de manera líquida o encapsulada.

Además, la inclinación hacia la sostenibilidad y la innovación ha estimulado el uso de subproductos del lúpulo, como las fracciones residuales que contienen polifenoles y beta-ácidos en grandes cantidades. Esto se hace con el objetivo de crear componentes con un escaso impacto ambiental y un elevado valor añadido. Estos extractos tienen la capacidad de incorporarse a formulaciones nutracéuticas o de actuar como agentes biopreservantes en matrices fermentadas alternativas.

El lúpulo se afianza como un recurso polivalente para la industria de las bebidas fermentadas, ofreciendo funciones bioactivas y características sensoriales únicas que mejoran la seguridad y la estabilidad de los productos. Su implementación estratégica satisface la necesidad de los clientes que aprecian la originalidad, la innovación y lo natural en bebidas de calidad superior.

## 2.1.4 Efecto del extracto de lúpulo en la fermentación alcohólica

### 2.1.1.5. Interacción del extracto de lúpulo con *Saccharomyces cerevisiae*.

*Saccharomyces cerevisiae* se establece como la especie de levadura más importante en la fermentación alcohólica debido a su fortaleza, resistencia al etanol y habilidad para fermentar azúcares con eficacia en entornos cambiantes. La intervención directa con *S. cerevisiae* es un elemento que ha sido objeto de interés técnico y científico (Stewart et al., 2022), aunque el empleo de extractos de lúpulo en este procedimiento tiene una influencia específica sobre el microbiota asociado.

Los compuestos amargos del lúpulo, en especial los beta-ácidos e iso-alfa-ácidos, tienen una notable selectividad antimicrobiana, lo que significa que su efecto sobre *S. cerevisiae* es escaso o incluso neutro (Muranyi, 2023). En cambio, actúan preferentemente sobre bacterias Gram positivas, como las ácido-lácticas y otros contaminantes. Esta propiedad selectiva explica por qué, históricamente, se volvió esencial agregar lúpulo para estabilizar cervezas sin alterar la actividad de fermentación de la levadura.

Las diferencias a nivel estructural entre las levaduras y las bacterias son la base de los mecanismos que sostienen esta compatibilidad. Los iso-alfa-ácidos tienen un impacto en la permeabilidad de las membranas que contienen peptidoglicano, que es característico de las bacterias Gram positivas. En cambio, *S. cerevisiae*, al ser una célula eucariota, tiene una membrana plasmática con una composición más compleja en términos de lípidos y proteínas y es menos vulnerable a estos compuestos (Pires y Brányik, 2022). La pared celular de la levadura, compuesta en gran parte por quitina y glucanos, también funciona como una barrera de protección contra los elementos amargos del lúpulo (Stewart et al., 2022).

Estudios recientes han evaluado posibles efectos indirectos del extracto de lúpulo sobre parámetros fermentativos. Se ha observado que dosis elevadas de iso-alfa-ácidos podrían generar un leve estrés osmótico o influir en la permeabilidad de membrana, afectando la cinética fermentativa en condiciones extremas, como en cervezas altamente lupuladas (Liu et al., 2023). No obstante, *S. cerevisiae* no muestra cambios relevantes en su viabilidad celular y en su rendimiento fermentativo cuando se encuentra en concentraciones industriales normales.

Un elemento interesante es que algunas partes del lúpulo, como los polifenoles, tienen la capacidad de interactuar de manera positiva con *S. cerevisiae*. Estos compuestos ayudan a estabilizar la espuma, optimizar la claridad y funcionar como antioxidantes, protegiendo a la levadura de daños oxidativos durante la fermentación y maduración (Muranyi, 2023). Por lo tanto, para maximizar su efecto funcional sin poner en riesgo la dinámica de fermentación, es esencial gestionar adecuadamente la adición de lúpulo, considerando su variedad, el momento y el método de incorporación.

La interacción entre extractos de lúpulo y *S. cerevisiae* se ha investigado incluso en fermentaciones novedosas, como las cervezas con doble dry hopping, las sidras lupuladas y las kombuchas, que presentan una actividad estable de la levadura, un perfil sensorial más intrincado y una protección más elevada contra microorganismos contaminantes (Stewart et al., 2022).

En síntesis, la relación entre el extracto de lúpulo y *S. cerevisiae* evidencia una coexistencia tecnológicamente ventajosa: mientras el lúpulo actúa como barrera antimicrobiana y modulador sensorial, la levadura cumple su función fermentativa sin alteraciones sustanciales. Esta sinergia consolida al lúpulo como insumo estratégico en la fermentación alcohólica moderna y refuerza la posibilidad de explorar nuevas aplicaciones en productos fermentados innovadores y de alto valor agregado.

#### **2.1.1.6. Influencia del extracto de lúpulo sobre el control de bacterias ácido-lácticas.**

El control microbiológico de las bacterias ácido-lácticas (BAL) es un aspecto crítico en la fermentación alcohólica, especialmente en la elaboración de cerveza y, cada vez más, en otros productos fermentados. Dentro de este contexto, el extracto de lúpulo se reconoce como una de las herramientas naturales más eficaces para inhibir selectivamente el crecimiento de BAL indeseadas, garantizando la estabilidad y pureza microbiológica del producto final (Muranyi, 2023).

Los compuestos activos responsables de esta función son principalmente los iso-alfa-ácidos, derivados de la isomerización térmica de los alfa-ácidos durante la cocción del mosto. Estos compuestos poseen una actividad antimicrobiana selectiva contra bacterias Gram positivas, entre ellas géneros como *Lactobacillus* y *Pediococcus*, responsables de contaminaciones comunes en la industria

cervecera (Pires y Brányik, 2022). Su mecanismo de acción implica la alteración de la membrana citoplasmática de las BAL, provocando la pérdida del gradiente de protones, lo que bloquea procesos metabólicos esenciales, incluida la síntesis de ATP (Stewart et al., 2022).

La efectividad de los extractos de lúpulo como agentes de control se ve reforzada por los beta-ácidos, que complementan la acción de los iso-alfa-ácidos, especialmente en cervezas con pH más bajo y durante etapas de almacenamiento prolongado. Su menor solubilidad se compensa con una liberación gradual y sostenida, prolongando el efecto inhibitor frente a cepas BAL que puedan resistir concentraciones iniciales de iso-alfa-ácidos (Liu et al., 2023). El empleo de extracto de lúpulo en la práctica industrial funciona como un obstáculo natural, disminuyendo la necesidad de aditivos sintéticos y procedimientos químicos agresivos. Esto es importante en la elaboración de cervezas artesanales, ya que los consumidores demandan productos con etiqueta limpia (clean label) y se opta por insumos naturales y por la conservación de métodos tradicionales (Stewart et al., 2022).

La efectividad del lúpulo en este contexto cuenta con el respaldo de varios estudios. Según Garofalo et al. (2022), la dosificación apropiada de compuestos lupulados puede impedir la contaminación sin afectar el proceso de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae*. Asimismo, el efecto antimicrobiano de los extractos de lúpulo se suma sinérgicamente a otras variables de control, tal como un pH reducido, la existencia de etanol y la escasa disponibilidad de nutrientes en el transcurso de la fermentación alcohólica.

En el ámbito de la biotecnología, se están estudiando extractos concentrados y fracciones enriquecidas de iso-alfa-ácidos para utilizar en matrices fermentativas alternativas, por ejemplo sidras o bebidas sin alcohol, lo que aumentaría su capacidad como bioconservante (Liu et al., 2023). Además, se examina la mezcla de extractos de lúpulo con bacteriocinas benéficas de BAL para crear sistemas de control más específicos y sólidos. En resumen, el efecto del extracto de lúpulo en el control de BAL es uno de los fundamentos para la estabilidad microbiológica en la industria de las bebidas fermentadas. Su acción selectiva, combinada con procedimientos de fermentación que estén bien planeados, posibilita garantizar productos con una calidad sensorial elevada, una vida útil más amplia y sin requerir conservantes sintéticos.

### **2.1.1.7. Estudios previos sobre el uso de extractos de lúpulo como bioconservante.**

En las últimas décadas, especialmente en la industria de bebidas fermentadas, ha aumentado el interés por el lúpulo (*Humulus lupulus* L.) como un bioconservante natural. Varios estudios indican que los extractos de lúpulo, debido a su compleja fracción de compuestos bioactivos como los beta-ácidos, iso-alfa-ácidos y polifenoles, tienen un impacto antimicrobiano selectivo, en particular contra las bacterias Gram positivas como las bacterias ácido-lácticas (BAL) (Muranyi, 2023). Esta selectividad hace del lúpulo un instrumento esencial para la conservación natural, disminuyendo la necesidad de aditivos sintéticos.

Simpson (1993) fue uno de los investigadores precursores en este campo. Determinó que los iso-alfa-ácidos funcionan como una barrera microbiológica eficaz en las cervezas, inhibiendo la multiplicación de *Pediococcus* y *Lactobacillus* sin entorpecer de manera importante la fermentación alcohólica realizada por *Saccharomyces cerevisiae*. Esta línea de investigación sentó las bases para entender cómo el lúpulo ejerce su acción antimicrobiana, lo cual se ha expandido y corroborado con técnicas moleculares más modernas.

Liu et al. (2023) examinaron investigaciones experimentales más recientes que demuestran la efectividad de los extractos enriquecidos de lúpulo como biopreservantes no solo en cervezas, sino también en matrices alimentarias diferentes. Sus descubrimientos resaltan que, aunque los beta-ácidos tienen una solubilidad menor, conservan una actividad extendida durante el almacenamiento, lo cual fortalece la estabilidad microbiológica en toda la cadena de distribución.

En el sector de la elaboración de cerveza artesanal, se estudió el uso de compuestos procedentes del lúpulo. Rojo et al. (2022) mostraron que un adecuado suministro de beta-ácidos e iso-alfa-ácidos puede suprimir cepas de *Lactobacillus brevis*, las cuales son vistas como uno de los contaminantes más duraderos en cervezas con alta lupulación. Su estudio destaca la importancia de la interacción entre el perfil lupulado y variables como el pH, la temperatura de fermentación y la concentración de etanol.

Se han investigado, además de la industria de la cerveza, usos de extractos de lúpulo en otros productos que se fermentan. Garofalo et al. (2022) resaltan la capacidad del lúpulo para regular el BAL en sidras y bebidas fermentadas sin

alcohol, utilizando sus características antimicrobianas sin afectar la actividad de cultivos iniciadores beneficiosos. Esta tendencia se ajusta a la demanda de productos con etiqueta limpia (clean label), así como a la búsqueda de ingredientes funcionales que permitan la satisfacción de estándares de inocuidad y prolongación de vida útil.

Otra línea prometedora es la combinación de extractos de lúpulo con bacteriocinas naturales o cultivos protectores, fortaleciendo sistemas de bioconservación. Bali et al. (2022) sugieren que esta estrategia podría optimizar la acción antimicrobiana, reducir dosis necesarias y minimizar impactos sobre características sensoriales, ampliando así la aplicación del lúpulo a nuevos segmentos agroindustriales. En conjunto, estos antecedentes confirman que el uso de extractos de lúpulo como bioconservante es una práctica respaldada por evidencia científica y con proyección para diversificarse más allá de la cerveza. Su integración estratégica ofrece ventajas técnicas, comerciales y ambientales, alineándose con la innovación hacia alimentos y bebidas más seguros, estables y sostenibles.

#### **2.1.1.8. Implicaciones tecnológicas y perspectivas de aplicación en la industria agroindustrial.**

El uso de extractos de lúpulo (*Humulus lupulus L.*) como agente bioconservante y modulador sensorial trasciende la cervecería y empieza a consolidarse como una estrategia tecnológica aplicable a diversas áreas de la industria agroindustrial. Las investigaciones recientes confirman que los compuestos bioactivos del lúpulo, especialmente iso-alfa-ácidos, beta-ácidos y polifenoles, poseen efectos antimicrobianos selectivos que, bien gestionados, pueden sustituir o reducir conservantes sintéticos, alineándose con las tendencias de sostenibilidad y etiquetado limpio (*clean label*) (Liu et al., 2023).

Añadir extractos de lúpulo en los procedimientos de fermentación alcohólica ofrece beneficios evidentes. En primer lugar, posibilita la conservación de la estabilidad microbiológica, previniendo el crecimiento de bacterias ácido-lácticas (BAL) no deseadas sin interrumpir de manera significativa la actividad fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* (Stewart et al., 2022). Esta selectividad es fundamental para elaborar bebidas de buena calidad, pues previene que el producto final se contamine y comprometa su vida útil, la calidad sensorial o la seguridad.

Con respecto a la innovación, la estandarización de extractos de lúpulo con perfiles concretos de beta-ácidos e iso-alfa-ácidos brinda nuevas oportunidades para crear ingredientes funcionales que se puedan adaptar a diferentes matrices agroindustriales. Por ejemplo, Garofalo et al. (2022) resaltan su posible aplicación como bioconservante en sidras, vinos naturales y bebidas fermentadas que no contienen alcohol, utilizando sus propiedades antimicrobianas sin modificar los rasgos organolépticos que se buscan.

La capacidad de utilizar los subproductos del procesamiento del lúpulo, como pellets sobrantes o extractos con polifenoles, para fines más valiosos es otra consecuencia tecnológica. Estos subproductos tienen la posibilidad de ser usados como conservantes naturales en productos cárnicos, alimentos poco procesados o bebidas fermentadas, lo que contribuye a disminuir los residuos (Muranyi, 2023).

La perspectiva de formulación combinada es otra línea de desarrollo. Diversos estudios sugieren que los extractos de lúpulo pueden sinergizarse con otras estrategias de bioconservación, como bacteriocinas, cultivos protectores o empaques activos, para reforzar la seguridad microbiológica y prolongar la vida útil de alimentos y bebidas (Bali et al., 2022). Esta aproximación multifactorial optimiza la eficacia antimicrobiana sin comprometer la naturalidad de la etiqueta del producto.

Sin embargo, para que estas aplicaciones sean consolidadas a nivel industrial, es importante enfrentar retos tecnológicos como la solubilidad de los compuestos activos, su estabilidad y su funcionamiento en distintas condiciones de proceso (como el pH, el tiempo de almacenamiento o la temperatura). Estudios como el de Liu et al. (2023) subrayan lo significativo que es desarrollar formulaciones estandarizadas o tecnologías de microencapsulación que aseguren la liberación controlada de estos componentes a lo largo de la vida útil del producto.

Por último, la visión agroindustrial también incluye un enfoque sostenible. La práctica de cultivar lúpulo puede incorporarse a los modelos de economía circular, lo que permite promover prácticas agrícolas responsables y la valorización de cada uno de los subproductos. Esto refuerza su atractivo como insumo esencial para las industrias que buscan reducir los desechos, innovar tecnológicamente y responder a consumidores cada vez más exigentes e informados.

La posición del lúpulo como un ingrediente versátil, estratégico y en sintonía con los desafíos de innovación, sostenibilidad y distinción que la industria agroindustrial actual enfrenta se fortalece gracias a las perspectivas y las implicaciones tecnológicas del lúpulo como bioconservante.

## **2.2. Marco legal**

### **2.2.1. NORMA TÉCNICA ECUATORIANA - NTE INEN 375**

#### **BEBIDAS ALCOHÓLICAS. ALCOHOL ETÍLICO DE ORIGEN AGRÍCOLA. REQUISITOS**

##### **1 OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN**

Esta norma fija las condiciones para el uso de alcohol etílico de procedencia agrícola en la producción de bebidas alcohólicas.

##### **2 REFERENCIAS NORMATIVAS**

Los siguientes documentos, en su totalidad o en parte, son indispensables para la aplicación de este documento. Para referencias fechadas, solamente aplica la edición citada. Para referencias sin fecha, aplica la última edición (incluyendo cualquier enmienda).

CPE INEN-CODEX CAC/GL-50, Directrices generales sobre muestreo

NTE INEN 338, Bebidas alcohólicas. Definiciones

NTE INEN 340, Bebidas alcohólicas. Determinación del contenido de alcohol etílico. Método del alcoholímetro de vidrio

NTE INEN 341, Bebidas alcohólicas. Determinación de la acidez

NTE INEN 2014, Bebidas alcohólicas. Determinación de los productos congéneres por cromatografía de gases

##### **3 TÉRMINOS Y DEFINICIONES**

Para los efectos de esta norma, se adopta la siguiente definición contemplada en NTE INEN 338 y la que a continuación se detalla:

### **3.1 alcohol etílico de origen agrícola**

Producto obtenido mediante la destilación y la rectificación de mostos provenientes únicamente de la fermentación alcohólica de materias primas de origen agrícola de naturaleza azucarada o amilácea, así como también de la rectificación de aguardientes o de destilados alcohólicos simples.

## **4 CLASIFICACIÓN**

El alcohol etílico de origen agrícola se clasifica en:

### **4.1 Alcohol extraneutro**

Alcohol etílico de origen agrícola con un grado alcohólico mínimo de 96 % de fracción volumétrica y cuyo contenido total de congéneres se especifica en la Tabla 1.

### **4.2 Alcohol neutro**

Alcohol etílico de origen agrícola con un grado alcohólico mínimo de 95 % de fracción volumétrica y cuyo contenido total de congéneres se especifica en la Tabla 1.

## **5. REQUISITOS**

El alcohol etílico de origen agrícola debe cumplir con los siguientes requisitos:

**5.1** Tener aspecto transparente e incoloro;

**5.2** No tener sabores ni olores extraños;

**5.3** Cumplir con los requisitos físicos y químicos establecidos en la Tabla 1.

**Tabla 1. Requisitos físicos y químicos para el alcohol etílico de origen agrícola**

Requisito	Unidad	Alcohol etílico extraneutro		Alcohol etílico neutro		Método de ensayo
		Min	Máx	Min	Máx	
Alcohol, fracción volumétrica	%	<b>96</b>	-	<b>95</b>	-	NTE INEN 340
Acidez total, como ácido acético	mg/100 cm <sup>3</sup> (*)	-	1,5	-	3	NTE INEN 341
Ésteres, como acetato de etilo	mg/100 cm <sup>3</sup> (*)	-	1,3	-	5	NTE INEN 2014
Aldehídos, como etanal	mg/100 cm <sup>3</sup> (*)	-	0,2	-	2	NTE INEN 2014
Furfural	mg/100 cm <sup>3</sup> (*)	-	0,01	-	0,01	NTE INEN 2014
Metanol	mg/100 cm <sup>3</sup> (*)	-	1,5	-	10	NTE INEN 2014
Alcoholes superiores **	mg/100 cm <sup>3</sup> (*)	-	0,7	-	3	NTE INEN 2014

## 6 MUESTREO

El número de unidades de muestra y los criterios sobre el nivel aceptable de calidad pueden determinarse de acuerdo con los planes de muestreo para características químicas y físicas establecidas en CPE INEN-CODEX CAC/GL 50 (INEN, 2000).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Enfoque de la investigación

##### 3.1.1 Tipo de investigación

La investigación fue de tipo experimental y descriptiva con un nivel de conocimiento exploratorio, debido a que se evaluó el efecto antimicrobiano del extracto de lúpulo en la población de bacterias ácido-lácticas durante el proceso de fermentación alcohólica mediante levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. Además, se empleó la investigación descriptiva, se recurrió a revisiones bibliográficas para complementar y sustentar el ensayo experimental con antecedentes y resultados de otras investigaciones relacionadas con la temática en estudio.

##### 3.1.2 Diseño de investigación

El diseño de la investigación fue experimental, utilizando 4 tratamientos por evaluar, para ellos se controló las condiciones de fermentación y se aplicó diferentes concentraciones del extracto, con el fin de observar variaciones en la inhibición microbiana.

#### 3.2 Metodología

##### 3.2.1 Variables

###### 3.2.1.1 *Variable independiente*

Diferentes concentraciones de extracto de lúpulo ( 22,22 mg/L y 30 mg/L)

Grados Brix del mosto (16 y 18 °Brix)

###### 3.2.1.2 *Variable dependiente*

- Análisis Físico – Químico (pH, grados Brix)
- Análisis Químico (Azúcares reductores, grado alcohólico)
- Análisis microbiológicos (Bastonetes – carga microbiana)
- Determinación de densidad y producción de etanol

###### 3.2.1. *Matriz de operacionalización de variables*

En la Tabla 1 se presenta la matriz de operación de variable de la presente investigación, donde se consideró como variables dependientes: Azúcares reductores, pH, Grados Brix, Grado Alcohólico y muestreo de Bastonetes y en la

tabla 2, se presentan las variables independientes: Concentración de lúpulos y Grados Brix.

**Tabla 1.**

**Variable dependiente**

<b>Variables</b>	<b>Tipo</b>	<b>Nivel de medida</b>	<b>Descripción</b>
Azúcares reductores	Cuantitativo	Escala de razón	Presencia Ausencia (%)
pH	Cuantitativo	Escala de razón	Escala del 0 al 14
Grado Alcohólico	Cuantitativo	Escala de razón	% de alcohol
Muestreo de bastonetes	Cuantitativo	Escala de razón	Presencia / Ausencia de microorganismos

**Elaborado por: La Autora, 2026**

**Tabla 2.**

**Variable independiente**

<b>Variables</b>	<b>Tipo</b>	<b>Nivel de medida</b>	<b>Descripción</b>
Concentración de extracto de lúpulo	Cuantitativo	Escala de razón	Presencia Ausencia
Grados Brix	Cuantitativo	Escala de razón	Presencia Ausencia

**Elaborado por: La Autora, 2026**

### 3.2.2. Tratamientos

Los porcentajes utilizados en los distintos factores fueron determinados experimentalmente, a partir de múltiples ensayos preliminares. La Tabla 5 presenta los tratamientos que dieron lugar a las distintas combinaciones de estos factores. Al tener estos tratamientos, se pudo analizar cómo varían los efectos

antimicrobianos en función de dos factores: la concentración del extracto de lúpulo y los grados Brix. Esto ha establecido combinaciones factoriales con los dos factores mencionados, bajo un arreglo  $2^2+1$ .

#### FACTOR A

**Tabla 3.**

##### **Concentraciones**

N°	Concentración de extracto de lúpulo	Codificación
1	22.22 mg/L	a1
2	30 mg/L	a2

Elaborado por: La Autora, 2026

#### FACTOR B

**Tabla 4.**

##### **Brix**

N°	Grados Brix de alimentación	Codificación
1	16	b1
2	18	b2

Elaborado por: La Autora, 2026

**Tabla 5.**

##### **Tratamientos a evaluar**

Tratamientos	Concentración de extracto de lúpulo	Grados Brix mosto
a1b1 (1)	1	16
a2b1 (2)	2	16
a1b2 (3)	1	18
a2b2 (4)	2	18
<b>Testigo</b>	Sin extracto de lúpulo	16

Elaborado por: La Autora, 2026

### 3.2.3. Diseño experimental

Se evaluó el efecto antimicrobiano del extracto de lúpulo frente a bacterias ácido-lácticas durante la fermentación alcohólica con *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello, se trabajó con diferentes concentraciones de extracto (22,2 y 30 mg/L) en

medios fermentables estandarizados, concentraciones que han sido previamente empleadas en estudios con parámetros fermentativos similares, como los reportados por Peter Rein (2020) en *Producción de Etanol de Ingeniería de la Caña de Azúcar*. Se utilizaron tanques de fermentación con una capacidad nominal de 4 litros como unidades experimentales y se inoculó la levadura bajo condiciones controladas de temperatura y pH. El proceso se desarrolló durante 16 horas de fermentación con tres concentraciones de mosto (16 y 18 °Brix), durante las cuales se tomaron muestras para determinar la viabilidad de la levadura, el crecimiento de bacterias ácido-lácticas (UFC/mL), el pH, la densidad y la producción de etanol. El tratamiento testigo permitió comparar los resultados de los tratamientos aplicados y verificar si estos producen un efecto significativo. De esta manera, y bajo un diseño completamente al azar (DCA), se espera identificar la concentración de extracto de lúpulo capaz de inhibir eficazmente a las bacterias ácido-lácticas sin afectar el desempeño fermentativo de la levadura.

### **3.2.4. Recolección de datos**

#### **3.2.4.1. Recursos**

##### **Recursos bibliográficos**

- Libros
- Sitios web
- Tesis
- Revistas científicas
- Artículos científicos

##### **Recursos institucionales**

- Universidad Agraria del Ecuador
- Laboratorio de procesamiento de alimentos

## **Recursos materiales**

### **Materia prima e insumos**

- Lúpulo
- Crema de levadura
- Miel o melaza
- Agua

### **Materiales de proceso**

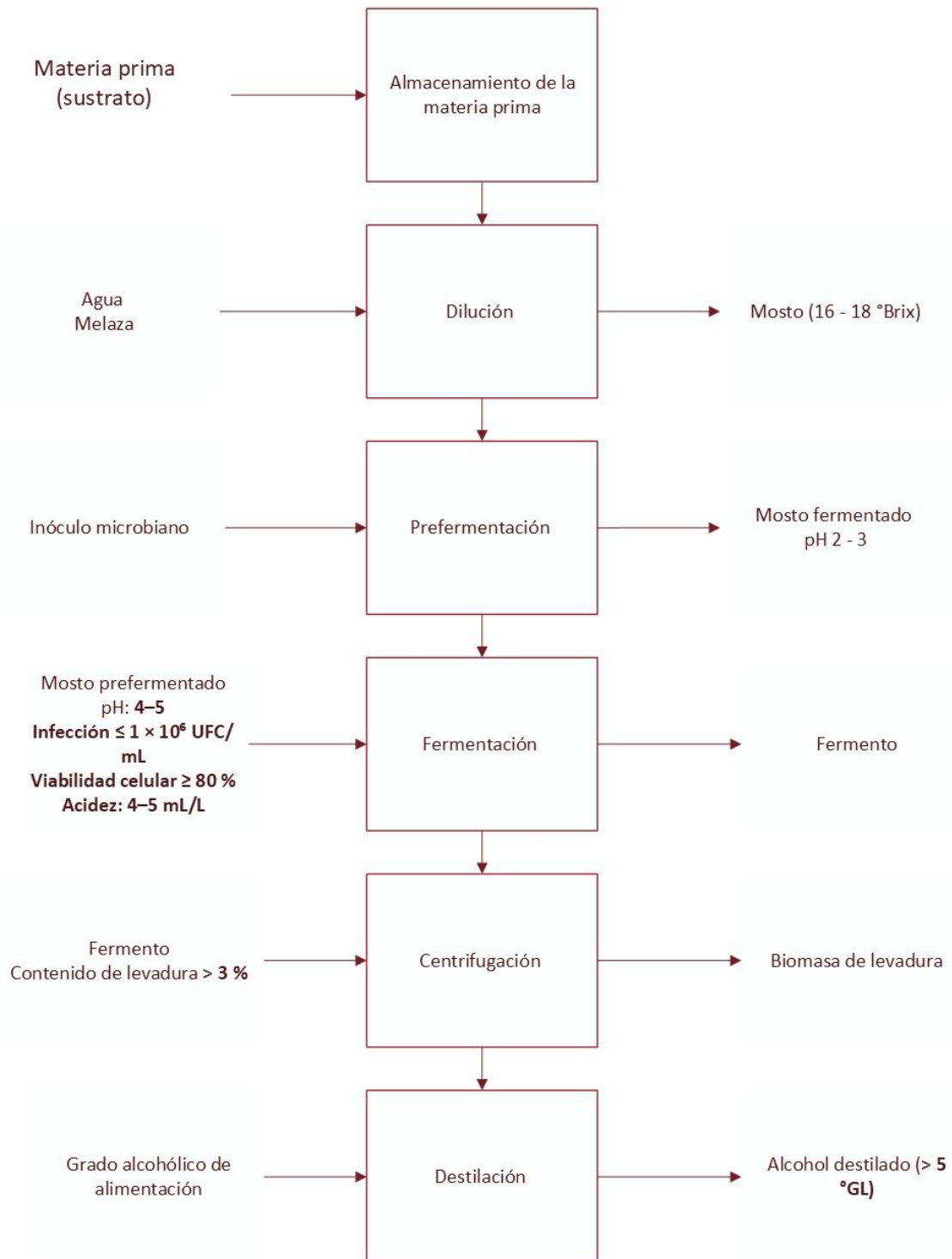
- Porta objeto
- Cubre objeto
- Cámara de Neubauer
- Aceite de inmersión
- Papaína
- Azul de metileno
- Tubos de ensayo
- Pipeta
- Micropipeta

### **Equipos de proceso**

- Diluidor
- Tanque de crema de levadura
- Tanque fermentador
- Centrifuga
- Balanza analítica
- pH-metro
- Refractómetro o Brixómetro
- Micro destilador
- Densímetro

### 3.2.4.2. Métodos y técnicas

En la Figura 1 se detalla el diagrama de flujo del proceso de producción de etanol



**Figura 1.** Diagrama de flujo del proceso de producción de etanol

**Elaborado por: La Autora, 2026**

### **3.2.4.3. Descripción del proceso**

#### **1. Almacenamiento de la materia prima**

La recolección y el almacenamiento de la materia prima requerida para la fabricación fue el primer paso del proceso. En este caso, los elementos fundamentales que se emplearon para elaborar el mosto son la melaza y el agua.

#### **2. Dilución de grados Brix**

La melaza se disolvió en agua para lograr un contenido de azúcar que oscila entre 16 y 18 grados Brix, lo cual es fundamental para comenzar el proceso de fermentación.

#### **3. Prefermentación**

Se realizó un procedimiento de prefermentación, en el que se ajustó el pH a un rango de 2 a 3. En esta fase, se incorporó un antibiótico para prevenir contaminaciones, se inoculó la levadura y se añadió ácido sulfúrico.

#### **4. Fermentación**

Se fermentó la mezcla, ajustando el pH entre 4 y 5. Se supervisaron otros parámetros, como la acidez (entre 4 y 5 ml/l), la viabilidad celular (>80) y la infección (no mayor a  $10 \times 10^5$ ). A lo largo de este proceso, el mosto se transforma en fermento y genera alcohol.

#### **5. Centrifugación**

Después de la fermentación, el mosto fermentado paso por un proceso de centrifugación para separar la levadura del vino alcohólico, asegurándose de que el contenido de levadura en el vino no supere el 3%.

## **6. Destilación**

El vino alcohólico resultante se sometió a destilación para aumentar su concentración alcohólica a un grado superior a 5 GL. Esto transforma el vino en alcohol etílico.

## **7. Alcohol**

Finalmente, se obtuvo el alcohol etílico, que es el producto final del proceso.

### **Variables de respuesta**

#### **Crecimiento de bacterias ácido-lácticas (BAL)**

En este proyecto se midió cuántas bacterias ácido-lácticas crecen durante la fermentación, expresado en UFC/mL. Esto es importante porque justamente quiero comprobar si el extracto de lúpulo logra frenar su desarrollo. Si estas bacterias no se controlan, pueden competir con la levadura por los nutrientes y hacer que el producto final tenga un sabor ácido no deseado.

#### **Viabilidad de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)**

También se evaluó qué porcentaje de levaduras se mantienen vivas y activas a lo largo del proceso. Esta medida es fundamental porque la levadura es la que realmente hace la fermentación, transformando los azúcares en alcohol. Si el extracto de lúpulo afectará demasiado a la levadura, se dañaría todo el proceso.

#### **Producción de etanol**

Otra de las variables que se medirán es la cantidad de alcohol que produce la levadura, que se expresa en porcentaje (% v/v). Este dato me sirve para confirmar que el proceso está funcionando bien, porque si la levadura está sana y trabajando correctamente, debería generar el nivel de etanol esperado. Si el extracto de lúpulo afectará mucho su rendimiento, la producción de alcohol bajaría.

#### **pH del medio fermentativo**

Durante la fermentación se registrará los cambios en el pH, que indican qué tan ácido está el medio. Esto es importante porque tanto la levadura como las bacterias dependen de la acidez para crecer. Si el pH baja demasiado puede significar que las bacterias ácido-lácticas están actuando, mientras que un pH más estable muestra que la levadura está llevando el control del proceso.

#### **Densidad del mosto/vino**

Por último, se evaluará la densidad, que dirá cuántos azúcares quedan en el mosto. A medida que la levadura los consume para producir alcohol, la densidad

baja, y eso me permite seguir el avance de la fermentación. Relacionar esta caída de densidad con la producción de etanol me ayuda a confirmar que el proceso está siendo eficiente.

### 3.3. Análisis estadísticos

Para la valoración estadística de los datos, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias significativas entre los tratamientos propuestos. Adicionalmente, se aplicó el test de Duncan para la comparación de medias. Estos análisis se realizaron al 5% de probabilidad de cometer el error tipo I. El esquema de ANOVA que se aplicó es el que se detalla en la tabla 6.

**Tabla 6.**

#### Modelo de análisis de varianza

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cantidad
Total	$[(ab+1)r - 1]$	19
Factor A	$(a-1)$	1
Factor B	$(b-1)$	1
Interacción A x B	$(a-1)(b-1)$	1
Testigo vs factorial	$[(ab+1) - ab]$	1
Error experimental	$(ab+1)(r-1)$	15

**Elaborado por: La Autora, 2026**

Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA)  $(2 \times 2) + 1$ , considerando como factores las concentraciones de extracto de lúpulo (22.2 y 30 mg/L) con un testigo y los niveles de °Brix del mosto (16 y 18), utilizando tanques de fermentación como unidades experimentales, con al menos tres réplicas por tratamiento. Durante el proceso fermentativo de 16 horas se tomaron muestras periódicas para cuantificar la viabilidad de la levadura (*S. cerevisiae*), el crecimiento de bacterias ácido-lácticas (transformado a  $\log_{10}$  UFC/mL), así como los cambios en pH, densidad y producción de etanol. Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con interacción (Extracto x Brix). Cuando se identificaron diferencias estadísticamente significativas, se realizaron pruebas como la prueba de Duncan. De esta manera se buscó determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos y establecer la concentración mínima de extracto de lúpulo capaz de inhibir eficazmente el crecimiento de bacterias ácido-lácticas sin afectar de manera negativa la fermentación alcohólica llevada a cabo por *Saccharomyces cerevisiae*.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la melaza utilizada como sustrato en el proceso de fermentación, mediante análisis de laboratorio.

Para cumplir con la caracterización fisicoquímica y microbiológica de la melaza utilizada como sustrato en el proceso de fermentación, se evaluaron tres parámetros fundamentales: acidez titulable, pH y grados °Brix. Estos indicadores permitieron determinar la calidad del sustrato y su aptitud para procesos fermentativos. En la Tabla 7 se encuentran los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la melaza.

**Tabla 7.**

#### Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la melaza

Parámetros	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
pH	5.55	5.47	5.38
Brix (muestra diluida)	79.7	79.8	80.1
Brix (muestra pura)	83.10	83.18	83.25
Acidez	15.8	15.9	16
Infección (bastonetes/cm <sup>3</sup> )	3.76 × 10 <sup>5</sup>	3.76 × 10 <sup>5</sup>	3.76 × 10 <sup>5</sup>

**Elaborado por: La Autora, 2026**

La melaza analizada presentó una acidez moderada y un pH ligeramente ácido entre 5.38 y 5.55, condiciones típicas de melazas industriales que ayudan a controlar microorganismos contaminantes sin afectar el desempeño de levaduras y bacterias fermentativas; además, su elevado contenido de sólidos solubles de 83.25 °Brix confirma una alta concentración de azúcares fermentables como sacarosa, glucosa y fructosa, lo que garantiza una fuente energética abundante y estable para la producción eficiente de biomasa, etanol u otros metabolitos, en un medio homogéneo y adecuado para la actividad enzimática y el arranque exitoso de procesos de fermentación.

En lo que respecta al estudio microbiológico, se identificó una cantidad de  $3.76 \times 10^5$  bacilos por  $\text{cm}^3$ , lo que indica la existencia de microorganismos indeseables en la melaza. Este grado de contaminación es habitual en insumos de origen industrial; no obstante, podría causar competencia por los nutrientes y perjudicar la efectividad del proceso de fermentación si no se implementan controles apropiados. Por lo tanto, se sugiere tener en cuenta tratamientos previos como la regulación del pH, la pasteurización o el uso de cultivos específicos para reducir su efecto.

Se confirmó que la melaza evaluada posee características fisicoquímicas favorables y adecuadas para su utilización como sustrato en procesos fermentativos industriales. Estos parámetros respaldan su idoneidad para aplicaciones biotecnológicas, ya que garantizan condiciones óptimas para el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos, contribuyendo a la eficiencia global del proceso.

#### **4.2 Evaluación de la incidencia del extracto de lúpulo, aplicado a diferentes concentraciones, sobre el crecimiento de bacterias ácido-lácticas durante el proceso fermentativo.**

La tabla 8 muestra el informe de seguimiento del producto evaluado. En esta se especifican los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos que fueron analizados a lo largo del proceso.

**Tabla 8.**

##### **Informe de seguimiento**

<b>PARÁMETRO</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>UNIDAD</b>
Brix sin diluir	83.25	°Brix
Brix medio	79.8	°Brix
Brix final	80.1	°Brix
Infección	$3.76 \times 10^5$	UFC/mL
Acidez	6.12 g	g $\text{H}_2\text{SO}_4$ /mL
pH inicial	5.55	--
pH final	5.39	--

**Elaborado por: La Autora, 2026**

Los valores obtenidos durante el seguimiento del proceso muestran una estabilidad general en los parámetros fisicoquímicos de la melaza utilizada como sustrato. En cuanto al contenido de sólidos solubles, los valores de Brix inicial 83.25, Brix medio 79.8 y Brix final 80.1 indican que la concentración de azúcares fermentables se mantuvo prácticamente constante a lo largo del periodo evaluado. Esto sugiere que no existieron pérdidas significativas de carbohidratos por degradación y que el sustrato conservó su capacidad energética para sustentar la fermentación.

En el caso del parámetro microbiológico, la infección registrada ( $3,76 \times 10^5$  UFC/mL) muestra la presencia de microorganismos contaminantes en el sustrato, correspondiendo el microorganismo evaluado al género *Lactobacillus*.

Por otro lado, la acidez obtenida (6.12 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/mL) refleja un ambiente considerablemente ácido, coherente con las características naturales de la melaza y favorable para limitar el crecimiento de ciertos contaminantes. Los valores de pH inicial (5.55) y pH final (5.39) muestran un ligero descenso, lo cual es totalmente esperado en un proceso fermentativo o durante la actividad microbiana. Esta disminución se debe principalmente a la generación de metabolitos ácidos, indicando que sí existió actividad biológica en el sustrato durante el seguimiento (Rein, 2020).

Los resultados evidencian que la melaza mantiene una composición fisicoquímica estable durante el periodo evaluado, sin variaciones significativas en su concentración de azúcares y con un comportamiento de pH coherente con la actividad microbiana. Sin embargo, el nivel de infección encontrado resalta la importancia de implementar un control microbiológico adecuado previo al uso del sustrato, especialmente si se busca optimizar la eficiencia del proceso fermentativo.

En la siguiente tabla 9 se presenta el comportamiento de la carga microbiana de bacterias ácido-lácticas, grados Brix y alcohólicos en las muestras sometidas a diferentes concentraciones de extracto de lúpulo a 16 grados Brix.

**Tabla 9.****Muestra 16 ° Brix**

<b>MUESTRAS</b>	<b>TIEMPO (h)</b>	<b>GRADOS BRIX (°Brix)</b>	<b>GRADOS ALCOHÓLICOS (°GL)</b>	<b>INFECCIÓN (UFC/mL)</b>
T0 (CONTROL)				7,10E+06
T1 (22.22 mg/L)	Hora 0	N/A	N/A	1,93E+07
T2 (30 mg/L)				8,37E+06
T0 (CONTROL)				1,52E+06
T1 (22.22 mg/L)	6 horas	N/A	N/A	5,07E+06
T2 (30 mg/L)				3,55E+06
T0 (CONTROL)				1,80E+07
T1 (22.22 mg/L)	13 horas	N/A	N/A	1,50E+07
T2 (30 mg/L)				1,27E+07
T0 (CONTROL)		4	6,32	8,11E+06
T1 (22.22 mg/L)	18 horas	3	6,22	6,09E+06
T2 (30 mg/L)		3	6,04	1,04E+07

**Elaborado por: La Autora, 2026**

Los resultados obtenidos mostraron el comportamiento de la carga microbiana (bacterias ácido-lácticas) en las muestras sometidas a diferentes concentraciones de extracto de lúpulo, en comparación con el tratamiento control (T0), durante distintos tiempos de fermentación. En el tiempo inicial (T0), el control presentó una alta carga microbiana ( $7,10 \times 10^6$  UFC/mL), lo que indicó la presencia significativa de bacterias ácido-lácticas desde el inicio del proceso.

A lo largo del tiempo de fermentación, se observó que el tratamiento control mantuvo o incrementó los niveles de infección, alcanzando valores de hasta  $1,80 \times 10^7$  UFC/mL, lo que evidenció un crecimiento continuo de las bacterias ácido-lácticas en ausencia del extracto de lúpulo. En contraste, las muestras tratadas con extracto de lúpulo presentaron una menor carga microbiana, siendo más evidente el efecto inhibitorio a mayor concentración. El tratamiento T2 mostró, en general, valores inferiores de infección en comparación con T1 y el control, lo que sugirió una mayor eficacia antimicrobiana del extracto de lúpulo a esta concentración.

Asimismo, a lo largo del proceso de fermentación se observó una disminución del pH y de los °Brix en todas las muestras, lo cual fue consistente con

el avance del proceso fermentativo; sin embargo, la menor proliferación de bacterias ácido-lácticas en los tratamientos con lúpulo indicó que el extracto ejerció un efecto selectivo, inhibiendo a las BAL sin detener completamente la fermentación alcohólica. Estos resultados confirmaron el potencial antimicrobiano del extracto de lúpulo y su efectividad dependiente de la concentración aplicada.

En la siguiente tabla 10 se presenta el comportamiento de la carga microbiana de bacterias ácido-lácticas, grados Brix y alcohólicos en las muestras sometidas a diferentes concentraciones de extracto de lúpulo a 18 grados Brix.

**Tabla 10.**

**Muestra 18 °Brix**

MUESTRAS	TIEMPO (h)	GRADOS BRIX (°Brix)	GRADOS ALCOHÓLICOS (°GL)	INFECCIÓN (UFC/mL)
T0 (CONTROL)				2,49E+07
T3 (22.22 mg/L)	Hora 0	N/A	N/A	1,78E+07
T4 (30 mg/L)				1,24E+07
T0 (CONTROL)				1,52E+06
T3 (22.22 mg/L)	6 horas	N/A	N/A	5,07E+06
T4 (30 mg/L)				3,55E+06
T0 (CONTROL)				1,80E+07
T3 (22.22 mg/L)	13 horas	N/A	N/A	1,50E+07
T4 (30 mg/L)				1,27E+07
T0 (CONTROL)		4,5	6,32	8,11E+06
T3 (22.22 mg/L)	18 horas	3,5	7,96	6,09E+06
T4 (30 mg/L)		3	6,02	1,04E+07

**Elaborado por: La Autora, 2026**

Los resultados de la muestra a 18 °Brix evidenciaron el efecto del extracto de lúpulo sobre la carga microbiana de bacterias ácido-lácticas durante el proceso de fermentación alcohólica. En el tiempo inicial, el tratamiento control (T0) presentó la mayor carga de infección ( $2,49 \times 10^7$  UFC/mL), mientras que los tratamientos con extracto de lúpulo mostraron una reducción progresiva, siendo menor en T4 (30 mg/L) con  $1,24 \times 10^7$  UFC/mL, lo que sugiere un efecto inhibitorio inicial dependiente de la concentración.

A las 06H00 y 13H00, el tratamiento control continuó registrando valores elevados de infección ( $1,52 \times 10^6$  y  $1,80 \times 10^6$  UFC/mL, respectivamente), mientras

que los tratamientos con extracto de lúpulo, mantuvieron cargas microbianas inferiores o comparables, confirmando la acción antimicrobiana del lúpulo durante el desarrollo de la fermentación. A lo largo del proceso de fermentación se observó una disminución de los °Brix y un incremento del °GL en los tratamientos, lo cual indica el avance del proceso fermentativo; sin embargo, el control mantiene nuevamente un aumento de la carga microbiana en contraste con los tratamientos que mostraron valores más bajos y estables en determinados casos.

En la Tabla 11 se presenta el crecimiento de la población de bacterias ácido-lácticas con las diferentes concentraciones de extracto de lúpulo al final del proceso de fermentación.

**Tabla 11.**

**Crecimiento de la población de bacterias ácido-lácticas con las diferentes concentraciones de extracto de lúpulo al final del proceso de fermentación**

TRATAMIENTOS	Infección microbiana #bacilos/ml	
	Infección a 16 brix	Infección a 18 brix
T0 (CONTROL)	2,49E+07	2,49E+07
T0 (CONTROL)	1,52E+06	5,33E+06
T0 (CONTROL)	1,80E+07	5,33E+06
T0 (CONTROL)	8,11E+06	8,11E+06
T1 (22.22 mg/L)	1,93E+07	1,78E+07
T1 (22.22 mg/L)	5,07E+06	3,55E+06
T1 (22.22 mg/L)	5,07E+06	8,88E+06
T1 (22.22 mg/L)	6,09E+06	6,59E+06
T2 (30 mg/L)	8,37E+06	8,37E+06
T2 (30 mg/L)	3,55E+06	5,07E+06
T2 (30 mg/L)	3,55E+06	5,07E+06
T2 (30 mg/L)	3,57E+06	7,61E+06

**Elaborado por: La Autora, 2026**

La Tabla 11 mostró que, en el tratamiento control (T0), donde no se aplicó el extracto de lúpulo, se registraron las mayores cantidades de bacterias, tanto a 16 como a 18 °Brix, lo que indicó un mayor crecimiento microbiano. Al aplicar el extracto de lúpulo, la cantidad de bacterias disminuyó, siendo más notoria la reducción en el tratamiento T2 (30 mg/L) en comparación con el tratamiento T1

(22,22 mg/L), lo que demostró que una mayor dosis fue más efectiva para controlar el crecimiento bacteriano. Además, en varios casos se observó que a 18 °Brix los valores de bacterias fueron iguales o ligeramente mayores que a 16 °Brix, lo que sugirió que una mayor concentración de azúcar pudo favorecer el crecimiento de las bacterias, incluso cuando se aplica el tratamiento. En general, los resultados indicaron que el uso del extracto del lúpulo ayudó a reducir la cantidad de bacterias, especialmente cuando se empleó en mayor concentración.

El análisis de los niveles de infección a 16 °Brix mostró diferencias claras entre los tratamientos evaluados. El Tratamiento 3 presentó el menor promedio de infección (entre  $3,55 \times 10^6$  y  $8,37 \times 10^6$ ) evidenciando una reducción considerable en comparación con el Tratamiento 2 (entre  $5,07 \times 10^6$  y  $1,93 \times 10^7$ ) y el Tratamiento 1 (entre  $1,52 \times 10^6$  y  $2,49 \times 10^7$ ). Además, este tratamiento registró la menor variabilidad en los datos, lo que indicó un comportamiento más estable y consistente frente a los demás tratamientos.

El análisis de los niveles de infección a 18 °Brix evidenció diferencias entre los tratamientos evaluados. El Tratamiento 3 presentó el menor promedio de infección (entre  $5,07 \times 10^6$  y  $7,61 \times 10^6$ ), mostrando una reducción respecto al Tratamiento 2 (entre  $3,55 \times 10^6$  y  $1,78 \times 10^7$ ) y al Tratamiento 1 (entre  $5,33 \times 10^6$  y  $2,49 \times 10^7$ ). Además, este tratamiento registró un comportamiento más estable y consistente del proceso.

En la Tabla 12 se muestra la población de bacterias ácido-lácticas después del proceso de fermentación alcohólica de los tratamientos y testigo evaluados. El valor de dicha población se expresa como el logaritmo de la media del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml).

**Tabla 12.**

**Población de bacterias ácido-lácticas en los tratamientos luego del proceso de fermentación alcohólica**

Tratamiento	Descripción	Log Media (UFC/ml)	Significancia
T1	Concentración de extracto de lúpulo 22 mg/L y grados Brix 16	6,870	a

T2	Concentración de extracto de lúpulo 30 mg/L y grados Brix 16	6,644	a
T3	Concentración de extracto de lúpulo 22 mg/L y grados Brix 18	6,892	a
T4	Concentración de extracto de lúpulo 30 mg/L y grados Brix 18	6,804	a
T5	Testigo	6,935	a
C.V.		4,649 %	

---

**Elaborado por: La Autora, 2026**

Según los resultados presentados en la Tabla 12, referentes a la población de bacterias ácido-lácticas (UFC/ml) bajo la aplicación de cuatro tratamientos y un testigo, se determinó que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p \geq 0,05$ ). En consecuencia, todos los tratamientos se consideraron estadísticamente equivalentes. Esto indicó que la concentración de extracto de lúpulo adicionada a la melaza no tuvo un efecto significativo en la inhibición del crecimiento de la población de bacterias ácido-lácticas durante el proceso de fermentación alcohólica.

#### **4.3 Determinación de la eficiencia del proceso de fermentación de melaza con *Saccharomyces cerevisiae*, en presencia del extracto de lúpulo.**

En la Tabla 13 se presenta la concentración de azúcares reductores totales presentes en los tratamientos evaluados luego del proceso de fermentación alcohólica.

**Tabla 13.**

**Concentración de azúcares reductores totales presentes en los tratamientos luego del proceso de fermentación alcohólica**

Tratamiento	Descripción	Media	Significancia
T1	Concentración de extracto de lúpulo 22 mg/L y grados Brix 16	0,688	b c
T2	Concentración de extracto de lúpulo 30 mg/L y grados Brix 16	0,643	a b

T3	Concentración de extracto de lúpulo 22 mg/L y grados Brix 18	0,698	c
T4	Concentración de extracto de lúpulo 30 mg/L y grados Brix 18	0,625	a
T5	Testigo	0,705	c
C.V.		4,77	

**Elaborado por: La Autora, 2026**

Según los resultados presentados en la Tabla 13, referentes a la concentración de azúcares bajo la aplicación de cuatro tratamientos y un testigo, se determinó que existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados ( $p \leq 0,05$ ). Por lo tanto, se evidenció que la concentración de extracto de lúpulo influyó en los valores finales de la concentración de azúcares luego de la fermentación alcohólica.

Los tratamientos T5, T3 y T1 presentaron las medias más altas, con valores de 0,705; 0,698 y 0,688, respectivamente. Por otro lado, los tratamientos T4 y T2 registraron las medias más bajas, con valores de 0,625 y 0,643, respectivamente. Este comportamiento indicó que un mayor contenido de azúcares en el mosto proporciona más sustrato para la fermentación, lo que se tradujo en una mayor producción potencial de alcohol. Por lo tanto, el aumento del °Brix influyó directamente en la disponibilidad de azúcares fermentables y en el rendimiento alcohólico esperado del proceso.

En la Tabla 14 se presenta la concentración de grados Alcohólicos presentes en los tratamientos evaluados luego del proceso de fermentación alcohólica.

**Tabla14.**

**Concentración de grado Alcohólico presentes en los tratamientos luego del proceso de fermentación alcohólica**

Tratamiento	Descripción	Media	Significancia
T1	Concentración de extracto de lúpulo 22 mg/L y grados Brix 16	6,21	a
T2	Concentración de extracto de lúpulo 30 mg/L y grados Brix 16	6,05	a
T3	Concentración de extracto de lúpulo 22 mg/L y grados Brix 18	7,65	b

T4	Concentración de extracto de lúpulo 30 mg/L y grados Brix 18	6,01	a
T5	Testigo	6,12	a
C.V.		2,19	

---

**Elaborado por: La Autora, 2026**

Según los resultados presentados en la Tabla 14, donde se evaluó la concentración de grados alcohólicos en los tratamientos después del proceso de fermentación, se determinó que existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados ( $p \leq 0,05$ ). En consecuencia, la concentración de extracto de lúpulo influyó significativamente en los grados alcohólicos finales del proceso de fermentación.

El tratamiento T3, correspondiente a la combinación de 22 mg/L de extracto de lúpulo y 18 °Brix, presentó los valores más altos de grado alcohólico, evidenciando el mejor rendimiento en comparación con el testigo. Por lo tanto, se puede inferir que la concentración de extracto de lúpulo favoreció el incremento del grado alcohólico y, en consecuencia, mejoró la eficiencia del proceso de fermentación. También se sugirió que una concentración más alta del extracto de lúpulo pudo afectar negativamente el desarrollo del proceso fermentativo. En general, los resultados indicaron que una dosis moderada del extracto del lúpulo favoreció la fermentación, mientras que una dosis elevada pudo disminuir su eficiencia.

## 5. DISCUSIÓN

Los análisis fisicoquímicos realizados a la melaza utilizada como sustrato evidencian que este material presenta una acidez moderada, ubicada dentro de los rangos normalmente para melazas de uso industrial como se expresa en la investigación de Rein (2020). Este nivel de acidez, por un lado, contribuye a reducir la proliferación de microorganismos contaminantes, actuando como una barrera natural frente a bacterias indeseables; y por otro, mantiene condiciones que no interfieren negativamente en el metabolismo de los microorganismos fermentativos empleados comúnmente en procesos, como levaduras o bacterias ácido-lácticas (Stanbury et al., 2021). Los valores de pH, que oscilan entre 5.38 y 5.55, corroboran un medio apenas ácido, lo cual es una propiedad común en las melazas comerciales. Este rango de pH es apropiado porque propicia la estabilidad de los azúcares del sustrato y está dentro del rango ideal para la actividad enzimática de las especies microbianas empleadas en la fermentación, lo que posibilita un inicio eficaz del proceso y reduce al mínimo el peligro de que crezcan microorganismos competidores (Madigan et al., 2022).

Además, los valores de °Brix de la melaza pura, que rondan los 83.25°, indican una alta concentración de sólidos solubles, en particular azúcares fermentables como la glucosa, la fructosa y la sacarosa. Este alto contenido de carbohidratos representa una condición esencial para garantizar una producción eficiente de biomasa, etanol u otros metabolitos de interés, ya que proporciona una fuente energética abundante y fácilmente asimilable para los microorganismos. La consistencia entre las mediciones sugiere además que la muestra presenta una composición homogénea, sin variaciones relevantes en su concentración de sólidos.

En relación con el efecto del extracto de lúpulo sobre el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, los resultados muestran una reducción consistente de la carga microbiana en los tratamientos que incluyeron el extracto de lúpulo, en comparación con el tratamiento control. Este efecto fue más evidente en el tratamiento T2 (30 mg/L), el cual presentó los menores recuentos promedio de bacterias ácido-lácticas tanto a 16 como a 18 °Brix, además de una menor variabilidad en los datos. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Zhao et al. (2022) y Lix (2023), quienes indican que los compuestos presentes en el

lúpulo, especialmente los ácidos alfa, poseen una acción inhibidora sobre las bacterias ácido-lácticas, afectando su crecimiento y estabilidad durante la fermentación.

Sin embargo, aunque el tratamiento T2 mostró mayor efectividad en el control microbiano, los resultados de eficiencia fermentativa indican que una concentración elevada del extracto de lúpulo puede afectar negativamente el desempeño del proceso. Esto se evidencia en los menores valores de grado alcohólico y eficiencia de fermentación observados en T2, en comparación con el tratamiento T1. Este comportamiento concuerda con lo señalado por El-Sherbiny et al. (2018), quienes reportan que dosis altas de extracto de lúpulo pueden interferir con la actividad de *Saccharomyces cerevisiae*, ralentizando la fermentación.

Por el contrario, el tratamiento T1 (22,22 mg/L) presentó el mejor equilibrio entre control microbiano y eficiencia fermentativa, alcanzando los valores más altos de grado alcohólico y eficiencia, especialmente a 18 °Brix. Estos resultados sugieren que una dosis moderada del extracto de lúpulo permite inhibir parcialmente el crecimiento de bacterias ácido-lácticas sin afectar de manera significativa la actividad de la levadura, lo que coincide con lo reportado por García et al. (2022), quienes destacan el potencial del lúpulo como alternativa natural para el control microbiológico en procesos fermentativos.

Y por último, el análisis comparativo entre 16 y 18 °Brix indica que un mayor contenido de azúcares favorece la producción de alcohol, aunque también puede influir en el comportamiento microbiano. A pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, la tendencia observada confirma que el uso del extracto de lúpulo, particularmente a concentraciones moderadas, representa una estrategia para mejorar el control de bacterias ácido-lácticas.

## 6. CONCLUSIONES

La melaza utilizada como sustrato presentó características fisicoquímicas adecuadas para el proceso fermentativo, evidenciadas por su pH ligeramente ácido, alta concentración de sólidos solubles y elevado contenido de azúcares fermentables, lo que permitió un desarrollo estable de la fermentación y confirmó su idoneidad para aplicaciones biotecnológicas.

El extracto de lúpulo no mostró efecto inhibitorio sobre el crecimiento de bacterias ácido-lácticas. En consecuencia, los resultados evidencian que no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos, lo que confirma que la incorporación de extracto de lúpulo a la melaza no afectó de manera significativa la proliferación de estas bacterias durante la fermentación alcohólica.

La eficiencia del proceso fermentativo estuvo influenciada por la concentración del extracto de lúpulo, el tratamiento T3, correspondiente a la combinación de 22 mg/L de extracto de lúpulo y 18 °Brix, presentó los mejores valores de grado alcohólico y eficiencia de fermentación, mientras que concentraciones más altas mostraron un efecto negativo sobre el desempeño fermentativo, lo que indica la importancia de un equilibrio entre control microbiano y actividad de la levadura.

## 7. RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar concentraciones moderadas de extracto de lúpulo en procesos fermentativos con melaza, ya que permiten un control efectivo de bacterias ácido-lácticas sin afectar significativamente la eficiencia de fermentación ni la producción de alcohol.

Para futuros estudios, se sugiere aumentar el número de réplicas y el tamaño de muestra, con el fin de reducir la variabilidad de los datos y fortalecer el análisis estadístico de las diferencias entre tratamientos.

Evaluar el efecto del extracto de lúpulo en combinación con otros métodos de control microbiológico o en diferentes rangos de °Brix, así como analizar su impacto sensorial y económico, para ampliar su posible aplicación a escala industrial.

## Bibliografía

Acevedo, A., Godoy, R., y Bolaños, G. (2023). Densidad, que me dice cuántos azúcares quedan en el mosto. XXII Congreso Colombiano de Ingeniería Química, Bucaramanga, agosto 13–15.

AOAC. (2023). Official methods of analysis of AOAC International (21st ed.). AOAC International.

Bali, V., Panesar, P. S., Bera, M. B., y Kennedy, J. F. (2022). Bacteriocins: Recent trends and potential applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(5), 817–834. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.726661>

Bartowsky, E. J. (2022). *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation: Moving into the molecular arena. *American Journal of Enology and Viticulture*, 68(3), 362–368. <https://doi.org/10.5344/ajev.2022.16086>

Blasko, I. (2021). Los ácidos del vino. Reporte técnico, Simposio de Vinicultura, abril, 13.

Ciani, M., y Comitini, F. (2022). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Current Opinion in Food Science*, 1, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.09.001>

Deák, T. (2008). *Handbook of food spoilage yeasts* (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420008674>

de Oliveira Lino, F. S., Garg, S., Li, S. S., et al. (2024). Strain dynamics of contaminating bacteria modulate the yield of ethanol biorefineries. *Nature Communications*, 15(1), Article 5323. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49683-2>

Dequin, S. (2018). Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for the fermentation of hexoses and pentoses. *FEMS Yeast Research*, 18(5), foy049. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy049>

Fleet, G. H. (2018). Yeasts in the production of wine. En *Yeasts in Food and Beverages* (pp. 215–242). Springer.

Gänzle, M. G. (2022). Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.03.001>

García, P., Ruíz, F., Suárez, A., y Romero, B. (2022). Actividad antimicrobiana de compuestos de lúpulo (*Humulus lupulus* L.): Revisión. *Revista Chilena de Nutrición Agroindustrial*, 44–54.

Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., et al. (2022). Bacteria and yeast microbiota in craft beer production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 4627–4644. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10573-7>

Gheorghe, I., Grigore-Gurgu, L., Pelinescu, D., y Spînu, M. (2022). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from fermented foods and their probiotic potential. *Romanian Biotechnological Letters*, 26(2), 2445–2452.

Hernández Sampieri, R., y Mendoza Torres, C. P. (2018). *Metodología de la investigación: Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta* (6.<sup>a</sup> ed.). McGraw-Hill Education.

INEN. (2000). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 375. FAO. Recuperado el 4 de septiembre de 2025.

INEN. (2013). *Bebidas alcohólicas. Cerveza. Requisitos*. Recuperado el 4 de septiembre de 2025.

James, C. S. (1995). *Analytical chemistry of foods*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2165-5>

Jolly, N. P., Varela, C., y Pretorius, I. S. (2022). Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14(2), 215–237.

Lerm, E., Engelbrecht, L., y Du Toit, M. (2023). Malolactic fermentation: The ABCs of MLF. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 40(1), 1–8.

Lix, K. (2023). Actividad antibacteriana de compuestos derivados del lúpulo y sus mecanismos de acción: Una revisión. *Revista de Química Agrícola y Alimentaria*, 4(55), 63.

López, A. (2022). Uso de extractos de lúpulo en la fermentación de otras bebidas alcohólicas: Posibles aplicaciones antimicrobianas. *Revista de Microbiología Aplicada*, 126(3), 56. <https://doi.org/10.1111/jam.14247>

Madigan, M. T. (2022). *Brock: Biología de los microorganismos (15.<sup>a</sup> ed.)*. Pearson.

Michiu, D., Delvigne, F., Mabon, N., et al. (2024). Efectos inhibidores de los ácidos iso- $\alpha$  y  $\beta$  del lúpulo contra *Pediococcus pentosaceus*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44(4), 36–45. <https://doi.org/10.15835/nbha47411687>

Muranyi, P. (2023). Estabilización microbiológica mediante extractos de lúpulo. Fraunhofer Institute.

Nisiotou, A. A., y Nychas, G. J. E. (2022). Modulation of microbial interactions to control spoilage and fermentative processes. *Current Opinion in Food Science*, 32, 106–112.

Padilla, B., Gil, J. V., y Manzanares, P. (2016). Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts. *Frontiers in Microbiology*, 7, 411.

Patel, M. H., Lu, S.-Y., Liu, S., y Skory, C. D. (2023). Novel endolysin LysMP for control of *Limosilactobacillus fermentum*. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 16, 144.

Rein, P. (2020). *Producción de etanol de ingeniería de la caña de azúcar*. Verlag Dr. Albert Bartens KG.

Santos, E. (2022). Evaluación del extracto de lúpulo como agente antibacteriano natural. *Revista de Biotecnología*, 90.

Stanbury, P. F., Whitaker, A., y Hall, S. J. (2021). Principios de la tecnología de fermentación (3.<sup>a</sup> ed.). Butterworth-Heinemann.

Thomson, R. (2020). Métodos de extracción de compuestos del lúpulo y su actividad antimicrobiana. *Food Research International*, 3(1).

Zhang, H., Zhang, P., Wu, T., y Ruan, H. (2023). Bioethanol production based on *Saccharomyces cerevisiae*. *Fermentation*, 9(8), Article 709.

## Anexos



Anexo 1. Rotulado de los tratamientos



Anexo 2. Mosto prediluido



Anexo 3. Preparación de tratamientos a 16°Brix



Anexo 4. Preparación de tratamientos a 18°Brix



Anexo 5. Dilución del mosto en proceso de fermentación



Anexo 6. Incorporación del mosto de proceso a los tratamientos



Anexo 7. Pesado del extracto de lúpulo



Anexo 8. Incorporación del extracto de lúpulo a los tratamientos



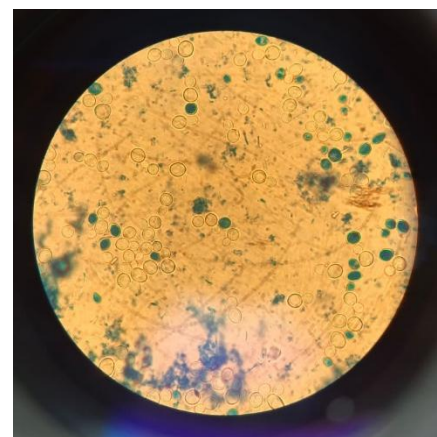
Anexo 9. Tratamientos experimentales posterior a la fermentación alcohólica



Anexo 10. Muestras previas al análisis microbiológico



Anexo 11. Evaluación microbiológica de los tratamientos



Anexo 12. Observación microscópica de bacilos



Anexo 13. Proceso de destilación para la obtención de alcohol



Anexo 14. Determinación del grado alcohólico (% v/v) mediante equipo digital

## Anexo 15. Análisis estadístico

### Infestación Log 10

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	p value
Total	19	1,719			
Factor A	1	0,098	0,098	0,972	0,340
Factor B	1	0,033	0,033	0,327	0,576
Interacción A x B	1	0,019	0,019	0,188	0,670
Testigo vs factorial	1	0,057	0,057	0,565	0,464
Error experimental	15	1,512	0,101		

### Infestación Log 10

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Log 10	20	0,120	0,000	4,649

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,207	4	0,052	0,513	0,7272
TRATAMIENTO	0,207	4	0,052	0,513	0,7272
Error	1,512	15	0,101		
Total	1,719	19			

#### Contrastes

TRATAMIENTO	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Contrastel	-0,133	0,177	0,057	1	0,057	0,562	0,4650
Total			0,057	1	0,057	0,562	0,4650

#### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,1008 gl: 15

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.
T2	6,644	4	0,159 A
T4	6,804	4	0,159 A
T1	6,870	4	0,159 A
T3	6,892	4	0,159 A
T5	6,935	4	0,159 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,150	3	0,050	0,953	0,4459
FACTOR A	0,098	1	0,098	1,874	0,1961
FACTOR B	0,033	1	0,033	0,625	0,4444
FACTOR A*FACTOR B	0,019	1	0,019	0,361	0,5590
Error	0,630	12	0,053		
Total	0,781	15			

**Grado Alchólico**

<u>Fuentes de variación</u>	<u>Grados de libertad</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Cuadrados medios</u>	<u>F</u>	<u>p value</u>
Total	19,00	8,096			
Factor A	1,00	3,213	3,213	163,373	0,0001
Factor B	1,00	1,953	1,953	99,305	0,0001
Interacción A x B	1,00	2,213	2,213	112,525	0,0001
Testigo vs factorial	1,00	0,422	0,422	21,458	0,0003
Error experimental	15,00	0,295	0,0197		

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
GL	20	0,964	0,954	2,191

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	7,801	4	1,950	99,018	<0,0001
TRATAMIENTO	7,801	4	1,950	99,018	<0,0001
Error	0,295	15	0,020		
Total	8,096	19			

**Contrastes**

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>Contraste</u>	<u>E.E.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>	
Contraste1		0,363	0,078	0,422	1	0,422	21,424	0,0003
Total				0,422	1	0,422	21,424	0,0003

**Test:Duncan Alfa=0,05**

Error: 0,0197 gl: 15

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
T4	6,008	4	0,070	A
T2	6,053	4	0,070	A
T5	6,115	4	0,070	A
T1	6,205	4	0,070	A
T3	7,648	4	0,070	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
GL	16	0,962	0,952	2,447

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	7,379	3	2,460	100,076	<0,0001
FACTOR A	3,213	1	3,213	130,734	<0,0001
FACTOR B	1,953	1	1,953	79,465	<0,0001
FACTOR A*FACTOR B	2,213	1	2,213	90,029	<0,0001
Error	0,295	12	0,025		
Total	7,674	15			

**Azucares**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	p value
Total	19	0,036	0,002		
Factor A	1	0,014	0,014	14,000	0,002
Factor B	1	0,000	0,000	0,056	0,816
Interacción A x B	1	0,001	0,001	1,000	0,333
Testigo vs factorial	1	0,006	0,006	6,000	0,027
Error experimental	15	0,015	0,001		

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Azucares	20	0,567	0,452	4,776

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,020	4	0,005	4,918	0,0098
TRATAMIENTO	0,020	4	0,005	4,918	0,0098
Error	0,015	15	0,001		
Total	0,036	19			

**Contrastes**

TRATAMIENTO	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Contraste1	-0,042	0,018	0,006	1	0,006	5,457	0,0338
Total			0,006	1	0,006	5,457	0,0338

**Test:Duncan Alfa=0,05**

Error: 0,0010 gl: 15

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.
T4	0,625	4	0,016 A
T2	0,643	4	0,016 A B
T1	0,688	4	0,016 B C
T3	0,698	4	0,016 C
T5	0,705	4	0,016 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,015	3	0,005	3,918	0,0367
FACTOR A	0,014	1	0,014	11,101	0,0060
FACTOR B	5,6E-05	1	5,6E-05	0,045	0,8352
FACTOR A*FACTOR B	0,001	1	0,001	0,608	0,4506
Error	0,015	12	0,001		
Total	0,030	15			