

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES**  
**FACULTAD DE TECNOLOGÍA**  
**CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL**



**“IMPLEMENTACIÓN DE PROCEDIMIENTOS DE REUTILIZACIÓN DE  
LEVADURAS (*Saccharomyces cerevisiae*) PARA LA EJECUCIÓN EN  
UN SEGUNDO PROCESO FERMENTATIVO DE CERVEZAS DE  
PRODUCCIONES MÍNIMAS ELABORADAS EN LA CERVECERÍA  
ARTESANAL NIEBLA BREWING COMPANY SRL”**

**Informe de Pasantía Para Optar al Título de Técnico Universitario Superior**

**POR: ELISEO SERGIO MONTECINOS MAMANI**

**TUTOR: ING. RAFAEL GARCIA PADILLA**

**La Paz – Bolivia**

**2022**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios y al universo por haber conspirado para mantenerme firme y no decaer durante este gran esfuerzo que comprendió mi carrera como Químico Industrial.

Al Ingeniero Rafael Garcia por su ayuda y colaboración en cada momento del desarrollo de este trabajo de investigación.

A mis docentes Ing. Luis Cuevas y Dra. María Monasterios que siguieron cada paso dado como estudiante y colaboración en momentos de consulta y soporte en este trabajo.

A la empresa Niebla Brewing Company SRL. por permitirme la oportunidad y la confianza de aportar con mis conocimientos al trabajo desarrollado.

## **DEDICATORIA**

Es mi deseo como sencillo gesto de agradecimiento, dedicar:

A mi linda mamá Lidia Mamani por ser la persona más maravillosa y perseverante que con mucho amor guío mis pasos para yo poder alcanzar mi vida profesional.

A mi querida esposa Samantha Panozo por su gran apoyo incondicional y dedicación en esta etapa de mi vida.

A toda mi familia.

## RESUMEN

En esta investigación cuyo objetivo es implementar el diseño de procedimientos de reutilización de levaduras *S. Cerevisiae* para la ejecución en un segundo proceso fermentativo de la cerveza en producciones mínimas elaboradas en la cervecería artesanal Niebla Brewing Company Srl. Se baso en ser una Investigación Exploratoria con una metodología mixta en Análisis Cualitativa de datos y Cuantitativa Descriptiva. De esta manera los resultados responden a los objetivos específicos de la siguiente manera; primeramente obtener datos acordes al procedimiento de investigación de acuerdo a las necesidades de la empresa, esto con el objetivo de diseñar correctamente la tamaño de análisis para el proceso, para así, diseñar un procedimiento aséptico en el muestreo de levaduras en fermentadores de 500lt, para su análisis microbiológico y concretar la ausencia o presencia de microorganismos dañinos a la reutilización de levaduras y su siguiente fermentación, para así, con la confirmación de cuantificación 0 en todos los parámetros propuestos en este primer paso, dar continuidad al siguiente procedimiento para el lavado y acondicionamiento del barro de levaduras extraídos del fermentador donde posteriormente el diseño y adaptación del procedimiento para el recuento de levaduras al método de cuantificación por Cámara Neubauer y cálculo de viabilidad, ayudara a la decisión de proseguir o no con el procedimiento para desarrollar un Starter. Finalmente, el diseño del procedimiento para el cálculo de requerimiento de levaduras en la inoculación de cualquier estilo de cerveza y el cálculo final de requerimiento en ml de levaduras a partir del barro recuperado en los fermentadores contribuye a recircular la levadura recuperada y obtener productos de buena calidad dentro la empresa aminorando los gastos en la materia prima como lo es la levadura, en el proceso de la fermentación para la producción de estilos de cervezas especiales, logrando cumplir con el objetivo general al implementar una secuencia de procedimientos de reutilización de levaduras *S. Cerevisiae* para la ejecución en un segundo proceso fermentativo de la cerveza en producciones mínimas dentro de la empresa Niebla Brewing Company SRL.

## **ABSTRACT**

In this research whose objective is to implement the design of procedures for the reuse of *S. cerevisiae* yeasts for the execution in a second fermentation process of beer in minimum productions elaborated in the craft brewery Niebla Brewing Company Srl.

It was based on being an Exploratory Research with a mixed methodology in Qualitative Data Analysis and Descriptive Quantitative. In this way the results respond to the specific objectives as follows; Firstly, obtain data according to the investigation procedure according to the needs of the company, this with the objective of correctly designing the analysis size for the process, in order to design an aseptic procedure in the sampling of yeasts in 500lt fermenters, to its microbiological analysis and specify the absence or presence of microorganisms harmful to the reuse of yeast and its subsequent fermentation, in order to, with the confirmation of 0 quantification in all the parameters proposed in this first step, continue the following procedure for washing and conditioning of the mud of yeasts extracted from the fermenter where later the design and adaptation of the procedure for the count of yeasts to the method of quantification by Neubauer Chamber and calculation of viability, will help the decision to continue or not with the procedure to develop a Starter. Finally, the design of the procedure for calculating the yeast requirement in the inoculation of any style of beer and the final calculation of the yeast requirement in ml from the mud recovered in the fermenters contributes to recirculating the recovered yeast and obtaining products of good quality. quality within the company, reducing expenses on raw materials such as yeast, in the fermentation process for the production of special beer styles, achieving the general objective by implementing a sequence of procedures for the reuse of yeast *S. cerevisiae* for the execution in a second fermentation process of the beer in minimum productions within the company Niebla Brewing Company SRL.

## ÍNDICE

<b>CAPITULO I: ORGANIZACIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. NIEBLA BOLIVIANA S.R.L. BREWING COMPANY.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Antecedentes de la institución .....	1
1.1.2. Descripción de la empresa y sus productos .....	1
<b>1.2. CARACTERISTICAS OBJETIVOS Y FINES DE LA EMPRESA.....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Misión.....	2
1.2.2. Visión.....	2
1.2.3. Valores.....	2
<b>1.3. ASPECTO TECNICO DE LA PLANTA .....</b>	<b>3</b>
1.3.1. Estructura de la Organización de la Empresa.....	3
1.3.2. Diagrama de flujo .....	4
1.3.3. Procesos en etapas .....	4
1.2.4. Selección (1).....	5
1.2.5. Molienda (2) .....	5
1.2.6. Preparación (3) .....	5
1.2.7. Maceración (4).....	5
1.2.8. Cocción (5).....	5
1.2.9. Enfriado (6).....	5
1.2.10. Fermentación (7).....	5
1.2.11. Envasado (8).....	5
1.2.12. Productos ofertados por NIEBLA S.R.L. ....	6
<b>CAPITULO II: TRABAJO DENTRO LA EMPRESA .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. ÁREA DE PRODUCCIÓN Y CALIDAD.....</b>	<b>7</b>
2.1.1. Área de materias primas y selección .....	7

2.1.2.	Tostado y molienda .....	7
2.1.3.	Maceración .....	7
2.1.4.	Recirculado, cocción y lupulaje.....	7
2.1.5.	Whirlpool y enfriado .....	7
2.1.6.	Fermentación y maduración .....	8
2.1.7.	Lavado, embotellado y carbonatado.....	8
2.1.8.	Tapado y Etiquetado.....	8
<b>2.2.</b>	<b>CONTROL DE CALIDAD Y MÉTODO DE ANÁLISIS.....</b>	<b>8</b>
<b>CAPITULO III: ASPECTOS AMBIENTALES .....</b>		<b>9</b>
<b>3.1.</b>	<b>ASPECTOS GENERALES DE OPERACIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2.</b>	<b>PLANIFICACIÓN DE ACCIONES .....</b>	<b>9</b>
<b>CAPITULO IV: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.....</b>		<b>10</b>
<b>3.1.</b>	<b>Planteamiento de problema .....</b>	<b>10</b>
<b>3.2.</b>	<b>Alcances y limitaciones .....</b>	<b>10</b>
3.2.1.	Alcances.....	10
3.2.2.	Limitaciones .....	10
<b>3.3.</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>10</b>
3.3.1.	Objetivo general .....	10
3.3.2.	Objetivos específicos.....	10
<b>3.4.</b>	<b>Justificación.....</b>	<b>11</b>
<b>3.5.</b>	<b>Metodología .....</b>	<b>11</b>
<b>3.6.</b>	<b>Fundamento teórico.....</b>	<b>12</b>
3.6.1.	Definición de cerveza .....	12
3.6.2.	Clasificación de las cervezas por su fermentación .....	12
3.6.3.	Bioquímica de la fermentación alcohólica .....	14

3.6.4.	Generalidades de la levadura <i>S. Cerevisiae</i> .....	17
3.6.5.	Concepto de cultivo puro.....	20
3.6.6.	Cultivo Starter.....	20
3.6.7.	Propagación de cultivo en laboratorio.....	24
3.6.8.	Re-pitching.....	26
3.6.9.	Factores que influye en la bioquímica de la fermentación.....	27
3.6.10.	Vitalidad y Viabilidad de levaduras.....	28
3.6.11.	Análisis en Cámara de Neubauer.....	30
3.6.12.	Hongos y levaduras.....	33
3.6.13.	Mesófilos aerobios.....	34
3.6.14.	Coliformes.....	34
3.6.15.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	35
3.6.16.	Acetobacterias.....	35
3.6.17.	<i>Pediococcus</i> sp.....	35
<b>3.7.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>37</b>
3.7.1.	Procedimiento de Muestreo de levaduras.....	37
3.7.2.	Procedimiento para el extraído de levaduras del fermentador, lavado y acondicionamiento.....	39
3.7.3.	Procedimiento para el recuento de levaduras y cálculo de viabilidad de levaduras recuperadas.....	41
3.7.4.	Procedimiento para desarrollar un Starter en la elaboración de 40 a 50 litros de cerveza	44
3.7.5.	Procedimiento para el cálculo de requerimiento de levaduras en la inoculación de cualquier estilo de cerveza y el cálculo final de requerimiento en ml de levaduras a partir del barro recuperado en los fermentadores.....	47
<b>3.7.6.</b>	<b>CONSIDERACIONES GENERALES.....</b>	<b>48</b>



<b>CAPITULO V: CONCLUSIONES</b> .....	<b>49</b>
<b>4.1. Conclusiones</b> .....	<b>49</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>50</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>52</b>
<b>Anexo 1</b> .....	<b>52</b>
<b>Anexo 2</b> .....	<b>55</b>
<b>Anexo 3</b> .....	<b>56</b>
<b>Anexo 4</b> .....	<b>58</b>
<b>Anexo 5</b> .....	<b>61</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Estructura de la organización de la empresa Niebla Srl. ....	<b>3</b>
<b>Figura 2.</b>	Diagrama de proceso Niebla Srl. ....	<b>4</b>
<b>Figura 3.</b>	Proceso en etapas Niebla Srl. ....	<b>4</b>
<b>Figura 4.</b>	Esquema de la fermentación alcohólica .....	<b>15</b>
<b>Figura 5.</b>	Células de levadura en germinación.....	<b>18</b>
<b>Figura 6.</b>	Fases de la propagación de levaduras (1) Fase de inducción (2) Fase de aceleración (3) Fase exponencial (4) Fase de deceleración (5) Fase estacionaria (6) Fase declinante .....	<b>18</b>
<b>Figura 7.</b>	Instalación de propagación de levaduras Conti-Prop .....	<b>22</b>
<b>Figura 8.</b>	Propagación optimizada de levaduras .....	<b>23</b>
<b>Figura 9.</b>	Preparación de cultivos starter.....	<b>24</b>
<b>Figura 10.</b>	Flujo para la propagación en el laboratorio de levadura cervecera .....	<b>26</b>
<b>Figura 11.</b>	Dilución seriada de suspensión celular.....	<b>33</b>
<b>Figura 12.</b>	Frascos de vidrio esterilizados de 200ml.....	<b>52</b>
<b>Figura 13.</b>	Balanza Analítica.....	<b>52</b>
<b>Figura 14.</b>	Mangueras de conexión para el fermentador.....	<b>52</b>
<b>Figura 15.</b>	Atomizador de gatillo industrial .....	<b>53</b>
<b>Figura 16.</b>	Caja de transporte de muestras biológicas.....	<b>53</b>
<b>Figura 17.</b>	Ácido Peracético.....	<b>53</b>
<b>Figura 18.</b>	Soda Caustica .....	<b>54</b>
<b>Figura 19.</b>	10 frascos de vidrio esterilizables graduados de 1000ml (esterilizados).....	<b>55</b>
<b>Figura 20.</b>	Refrigerador ultra freezer .....	<b>55</b>
<b>Figura 21.</b>	Microscopio binocular de un objetivo de 40x y ocular de 10 aumento para llegar a 400x. ....	<b>56</b>

<b>Figura 22.</b> Cámara de Neubauer de 0,100 mm de profundidad y un área de 0,0025 mm <sup>2</sup> .....	<b>56</b>
<b>Figura 23.</b> Pipeta de 1ml .....	<b>56</b>
<b>Figura 24.</b> Pipeta de 10ml .....	<b>57</b>
<b>Figura 25.</b> Tubos cónicos de 15ml con tapón rosca, graduado y gradilla.....	<b>57</b>
<b>Figura 26.</b> Agitador Magnético.....	<b>58</b>
<b>Figura 27.</b> Buzo Magnético.....	<b>58</b>
<b>Figura 28.</b> Matraz Erlenmeyer de 5000 ml .....	<b>58</b>
<b>Figura 29.</b> Probeta de vidrio de 100ml.....	<b>59</b>
<b>Figura 30.</b> Frascos plásticos de 5000 ml .....	<b>59</b>
<b>Figura 31.</b> Nutrientes de levadura .....	<b>59</b>
<b>Figura 32.</b> Observación a la conclusión del Starter, por coloración de la preparación dentro del matraz .....	<b>60</b>
<b>Figura 33.</b> Balanza de Precisión.....	<b>61</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Volúmenes de propagación en laboratorio .....	<b>25</b>
<b>Tabla 2.</b>	Comparación de la preparación y almacenamiento de las soluciones de colorantes vitales. ....	<b>32</b>
<b>Tabla 3.</b>	Pitch Rate según estilo de Cerveza.....	<b>47</b>

## ÍNDICE DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1.</b> Concentración ppm.....	<b>37</b>
<b>Ecuación 2.</b> Recuento de levaduras .....	<b>43</b>
<b>Ecuación 3.</b> Porcentaje de Viabilidad.....	<b>43</b>
<b>Ecuación 4.</b> Número de células vivas.....	<b>43</b>
<b>Ecuación 5.</b> Número de células Requeridas para el Starter .....	<b>45</b>
<b>Ecuación 6.</b> Cantidad en ml de la levadura recuperada.....	<b>45</b>
<b>Ecuación 7.</b> Ecuación de Pitch Rate .....	<b>47</b>
<b>Ecuación 8.</b> Determinación de volumen de levaduras recuperadas a inocular en la fermentación .....	<b>48</b>

## **CAPITULO I: ORGANIZACIÓN**

### **1.1. NIEBLA BOLIVIANA S.R.L. BREWING COMPANY**

#### **1.1.1. Antecedentes de la institución**

La microempresa cervecera está situada en la zona central de la ciudad Industrial de Viacha, con más de 360 m<sup>2</sup>, y 6 años de recorrido desde su fundación, a largo ha logrado establecerse en el mercado nacional e internacional, con reconocimientos locales y nacionales, es una empresa basada en la elaboración de cerveza artesanal, con un producto estrella denominado Viacheña y 6 otras variedades de cerveza.

Los propietarios son 3 hermanos que empezaron con un emprendimiento lechero, los hermanos estudiaron Ingeniería Industrial en Chile, posteriormente hicieron una maestría donde su proyecto era Niebla Boliviana, y soñaban con volver al país y continuar con el emprendimiento. La maquinaria la trajeron de Chile, e incluyeron a su papá quien se formó como maestro cervecero, también en Chile, y el llegó primero a Bolivia a realizar sus primeas pruebas, con los insumos que sus hijos les mandaban, inicio el 2015, la empresa tiene 4 años de antigüedad, la planta se encuentra en Viacha. Empezaron con una capacidad de producción de 3000 L mensuales, pero gracias a la aceptación del producto se amplió la capacidad a 8000 L mensuales de diferentes estilos Niebla Brewing Company, lanzó su primera cerveza experimental Beto's en sus distintos tipos, Barley Wine, Bock, German Pilsner, Pale Ale, Amber Ale y Stout, planificando a corto plazo la masificación de su producción.

#### **1.1.2. Descripción de la empresa y sus productos**

NIEBLA®, es una empresa dedicada a la elaboración de cerveza, de manera 100% artesanal, con una delicada selección de los mejores ingredientes para entregar un excelente aroma, cuerpo y sabor.

Una cerveza sin filtrar y con segunda fermentación en botella para una gasificación natural.

NIEBLA® con sus estilos: Pale Ale, cerveza de color dorado intenso, refrescante con un suave sabor a frutas. Red Ale, cerveza de color ámbar intenso, suave olor a cítricos y equilibrado dulzor. Stout, cerveza de color oscuro, de gran carácter y un distintivo aroma a café y chocolate.

## **1.2. CARACTERISTICAS OBJETIVOS Y FINES DE LA EMPRESA**

### **1.2.1. Misión**

Producir y Ofrecer distintos tipos de cerveza artesanal; Pale Ale, Red Ale y Stout, que rescaten el sabor original de ésta y que esté adecuado a la exigencia del consumidor, y que además valoren mucho el sabor de una cerveza y estén seguros del estatus que está le brinda. Nos enfocaremos a nuestro Target situado en la zona sur y centro de la ciudad de La Paz, llevando nuestros productos (premium) de sabor único donde sea que se encuentren nuestros clientes.

### **1.2.2. Visión**

Posicionamos en el mercado paceño a corto plazo (dos años) como una de las empresas cerveceras con mayor participación de mercado regional, para después expandirnos al eje troncal, Santa Cruz y/o Cochabamba en un lapso de tres a cuatro años.

### **1.2.3. Valores**

- **Honestidad:** Respetamos la verdad en la relación con nuestros clientes, socios empleados, proveedores, la sociedad y el Estado.
- **Respeto:** Reconocemos los intereses y sentimientos de nuestros clientes, empleados, socios y empresas competidoras a través de unas excelentes relaciones interpersonales.
- **Cumplimiento:** Efectuamos todas las promesas y obligaciones que nuestra entidad asume con sus clientes, empleados, proveedores y Estado, buscando el prestigio de nuestra empresa por medio de esta fuerza, alcanzando un nivel diferenciado en nuestra organización.
- **Calidad:** Efectuamos altos controles de calidad a nuestros diferentes productos para que los clientes y finalmente la sociedad creen hábitos de consumo con nuestra empresa logrando así una alta fidelidad de los compradores con nuestra organización.
- **Responsabilidad Social:** Adoptamos una postura firme frente a la responsabilidad que tenemos con nuestros clientes y ante la sociedad en temas de protección ambiental.

### 1.3. ASPECTO TECNICO DE LA PLANTA

#### 1.3.1. Estructura de la Organización de la Empresa

Figura 1. Estructura de la organización de la empresa Niebla Srl.



Fuente: Adaptado NIEBLA S.R.L. BREWING COMPANY



### 1.3.2. Diagrama de flujo

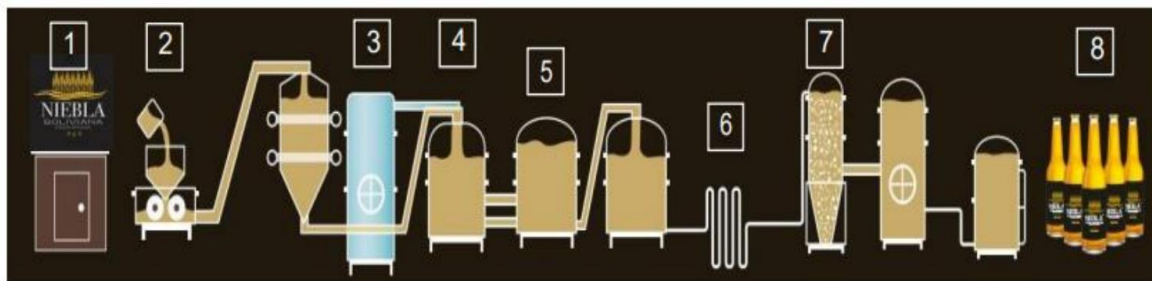
Figura 2. Diagrama de proceso Niebla Srl.



Fuente: Adaptado NIEBLA S.R.L. BREWING COMPANY

### 1.3.3. Procesos en etapas

Figura 3. Proceso en etapas Niebla Srl.



Fuente: NIEBLA S.R.L. BREWING COMPANY

#### **1.2.4. Selección (1)**

De acuerdo al estilo de cerveza que fabricamos escogemos los cereales. En Niebla, utilizamos principalmente cebada malteada con diversos granos tostados.

#### **1.2.5. Molienda (2)**

Los cereales escogidos son pasados por un rodillo que chanca el grano, el grano con el fin de exponer su interior lleno de almidones.

#### **1.2.6. Preparación (3)**

Extraemos agua potable de la red y la purificamos eliminando el cloro a través de un filtro y luego la calentamos hasta alcanzar una temperatura cercana a los 70°C.

#### **1.2.7. Maceración (4)**

Los granos de cereal son depositados en el estanque macerado y se sumerge en el agua caliente para activar los procesos enzimáticos que transformarán los almidones en azúcares fermentables.

#### **1.2.8. Cocción (5)**

El mosto se transfiere al estanque de cocción donde se lleva a ebullición y se agregan lúpulos que le otorgan amargor, sabor y aroma a la cerveza.

#### **1.2.9. Enfriado (6)**

Dado que para fermentar requerimos temperaturas cercanas a los 20° C, se hace necesario enfriar el mosto haciéndolo pasar a contracorriente por agua fría a través de un intercambiador de calor.

#### **1.2.10. Fermentación (7)**

En el fermentador el mosto es inoculado con levaduras que en unos 7 días transforman a los azúcares fermentables en alcohol y CO<sub>2</sub> luego la cerveza se deja reposar otros 7 días para que sus cualidades se establezcan y se clarifiquen naturalmente.

#### **1.2.11. Envasado (8)**

La cerveza se envasa en barriles y se agrega dextrosa para que las levaduras residuales generen CO<sub>2</sub> necesario para una gasificación natural así al servir la cerveza tendremos una espuma suave y cremosa.

### **1.2.12. Productos ofertados por NIEBLA S.R.L.**

La variedad de esta cervecería es la siguiente:

#### **➤ Pale ale**

Cerveza de color cobrizo, refrescante con un suave sabor a frutas, 100% artesanal, con un 5.0% de grado alcohólico. Conocida como la cerveza de verano está a base de 3 maltas, ideal para compartir con los amigos.

#### **➤ Barley wine**

Cerveza denominada Vino de Cebada, con tonos licorosos y vinosos, 100% artesanal, con 9.0% de graduación alcohólica. Potente equilibrio de amargor y dulzor, ideal como bajativo después de las comidas.

#### **➤ Red ale**

Cerveza de color ámbar intenso, de equilibrado dulzor y suave sabor a cítricos, 100% artesanal a base de 4 maltas, con un grado alcohólico de 5.6%. Ideal para festejos importantes.

#### **➤ German pilsen**

Cerveza ligera de color claro, refrescante, con un refinado aroma y sabor a lúpulo, 100% artesanal, con un grado alcohólico de 4.5%. Ideal para tomarlo en días calurosos, para acompañar almuerzos o para disfrutar después de la oficina.

#### **➤ Stout**

Cerveza de estilo irlandés, con un color oscuro y de gran carácter, distintivo aroma a café y chocolate. 100% artesanal, 6.0% de grado alcohólico. Llamada la cerveza de invierno, ideal para momentos especiales.

#### **➤ Quinoa Gold**

Cerveza híbrida de color cobrizo claro, ligera, pero con fuertes notas frutales y un potente retrogusto a quinua. Su cuerpo medianamente ligero, hace que ésta sea ideal para compartir en momentos especiales. Cuenta con un grado alcohólico de 9.0%.

## **CAPITULO II: TRABAJO DENTRO LA EMPRESA**

### **2.1. ÁREA DE PRODUCCIÓN Y CALIDAD**

El área de producción estará dada por todo el proceso en sí de la cerveza, por la dimensión y las cantidades producidas por día, entonces separaremos 3 tipos de producción:

- Producción de 500 L a 8000 L: son en Red Ale y la Viacheña, es así que todo el personal en planta se encarga de la producción empezando en el área de selección hasta producto final.
- Producción de 20 L a 100 L: Son de los diferentes estilos de cerveza que presenta la empresa, son de proceso más artesanal y de trabajo ligero.

#### **2.1.1. Área de materias primas y selección**

De acuerdo al estilo de cerveza que fabricamos escogemos los cereales. Se hace el pesado y el control de la formulación para cada estilo.

#### **2.1.2. Tostado y molienda**

Posteriormente la materia prima seleccionada es tostada (solo la malta o cebada que necesite ser tostada), a fuego lento logrando la uniformidad de la malta o cebada para posteriormente los cereales escogidos pasar por un rodillo que chanca el grano, con el fin de exponer su interior lleno de almidones.

#### **2.1.3. Maceración**

Los granos de cereal son depositados en el estanque macerado y se sumerge en el agua caliente para activar los procesos enzimáticos que transformarán los almidones en azúcares fermentables, tendrá la duración de 1 hora aproximada para dejar la temperatura entre 71 y 66°C.

#### **2.1.4. Recirculado, cocción y lupulaje**

Se lavará el grano haciendo llover agua a la misma temperatura con la finalidad de obtener todo el azúcar fermentable y el color del estilo de cerveza, es así que el mosto se transfiere al estanque de cocción donde se lleva a ebullición y se agregan lúpulos que le otorgaran amargor, sabor y aroma a la cerveza.

#### **2.1.5. Whirlpool y enfriado**

Se hará el Whirlpool con el removido del mosto durante cierto tiempo para lograr la unión de partículas en suspenso y de esa manera provocar el decantamiento de las mismas en 15 min. Posteriormente dado que para fermentar requerimos temperaturas cercanas a los 20° C, se hace

necesario enfriar el mosto haciéndolo pasar a contracorriente por agua fría a través de un intercambiador de calor.

#### **2.1.6. Fermentación y maduración**

En el fermentador el mosto es inoculado con levaduras pesadas bajo fórmula para que en unos 7 días logre transformar a los azúcares fermentables en alcohol y CO<sub>2</sub> luego la cerveza se deja reposar otros 7 días para que sus cualidades se estabilicen y se clarifiquen naturalmente.

#### **2.1.7. Lavado, embotellado y carbonatado**

La máquina embotelladora se encarga del lavado primeramente con soda para posteriormente tener 3 enjuagues con agua a 85°C para posteriormente ser desinfectado con ácido peracético al 0.002%,

Posteriormente la cerveza se embotella en barriles y/o botellas de 330ml o 620 ml agregándose dextrosa para que las levaduras residuales generen CO<sub>2</sub> necesario para una gasificación natural así al servir la cerveza tendremos una espuma suave y cremosa.

El segundo método es por gasificación con garrafa de CO<sub>2</sub> a una temperatura de 1°C y una presión de 1 a 1,5 bares dependiendo el estilo.

#### **2.1.8. Tapado y Etiquetado**

El tapado y etiquetado es llevado por la maquina embotelladora en las 2 presentaciones, dejando el producto terminado listo en almacén.

### **2.2. CONTROL DE CALIDAD Y MÉTODO DE ANÁLISIS**

En la empresa no se cuenta con un laboratorio de control y calidad, pero eso no hace que se puedan realizar pruebas asertivas para determinar la calidad del producto.

- En las materias primas se tiene el control de temperaturas y condiciones de almacenaje, al mismo tiempo el registro de tiempo de vida útil de las mismas.
- Las temperaturas en todo el proceso son llevadas con termómetros en casos de producciones pequeñas y el sistema de máquinas en producciones grandes.
- Control de Densidad con un densímetro.
- Cantidad de alcoholes producidos con un alcoholímetro.
- Y el análisis sensorial y organoléptico, bajo tablas y parámetros de cata de cerveza para el producto terminado.

## **CAPITULO III: ASPECTOS AMBIENTALES**

### **3.1. ASPECTOS GENERALES DE OPERACIÓN**

Se identifican a continuación la relación de los aspectos ambientales, incluidos aquellos asociados con la operación en condiciones normales, condiciones anormales, situaciones de emergencia y accidentes. A continuación, vamos enunciar los que se consideran como impactos ambientales significativos, ya que están asociados a las actividades, productos y servicios de la organización misma sobre los cuales ésta ejerce un control directo de gestión, pudiendo conocer en todo momento el costo y el tiempo que se requiere para emprender el análisis y la disponibilidad de datos fiables.

Estos aspectos ambientales son:

- Emisiones a la atmósfera.
- Vertidos al agua.
- Descargas al suelo.
- Uso de materias primas y recursos naturales.
- Uso de energía.
- Energía emitida.
- Generación de residuos y/o subproductos.

### **3.2. PLANIFICACIÓN DE ACCIONES**

La planificación de acciones realizada para abordar los aspectos ambientales significativos y los requisitos legales y otros requisitos queda recogida en el Manual de Procedimientos y descrita en los procedimientos correspondientes:

- Aspectos Ambientales.
- Requisitos Legales y Otros Requisitos.

Para los Aspectos Ambientales se utilizará un sistema de evaluación para indicar aquellos aspectos que sean significativos. La identificación de los aspectos ambientales se realizará entre los empleados y el responsable de Gestión Ambiental, que rellenará los documentos correspondientes y realizará un seguimiento y actualización de los mismos mediante la aprobación y revisión de la Dirección. En cuanto a los Requisitos, el responsable de Gestión Ambiental es el encargado de la revisión, control, archivo y evaluación de los requisitos, así como del seguimiento y actualización. La Dirección se encarga de aplicar el cumplimiento de la legislación e informar sobre cambios legislativos.

## **CAPITULO IV: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

### **3.1. Planteamiento de problema**

En el sector cervecero artesanal es muy importante tener en cuenta el costo de las materias primas para la producción, en ese sentido, muchas de estas medianas empresas chocan con el problema de gastos en la utilización de levaduras por su alto costo. Así Niebla Srl. Tiene un problema mayor, pues realizan 9 estilos de cerveza, 2 en cantidades superiores a los 1000lt mes y los demás hasta 80lts semana, y el gasto en compra de levaduras es muy elevado, por lo que se ve necesario buscar una solución a esta problemática.

En muchas pequeñas empresas han buscado la manera técnica de ejecutar este proceso de reutilización de levaduras, por lo que se ve necesario formalizar, unificar y adaptar para la empresa Niebla varios de estos procedimientos para la mejor reutilización de levaduras.

### **3.2. Alcances y limitaciones**

#### **3.2.1. Alcances**

El presente trabajo se adaptará a la capacidad y necesidades de la empresa Niebla SRL, por lo que maneja datos e información de la misma, para su requerimiento.

#### **3.2.2. Limitaciones**

No se cuenta con mucha investigación e información formal con respecto a este proceso de reutilización, puesto que muchas empresas recurrieron a la forma empírica y bajo la necesidad de la misma, por lo que es necesario la adaptabilidad de procedimientos al tamaño de empresa y poner en exposición los conocimientos adquiridos.

### **3.3. Objetivos**

#### **3.3.1. Objetivo general**

Implementar el diseño de procedimientos de reutilización de levaduras *S. Cerevisiae* para la ejecución en un segundo proceso fermentativo de la cerveza en producciones mínimas elaboradas en la cervecería artesanal Niebla Brewing Company Srl.

#### **3.3.2. Objetivos específicos**

- Obtener datos acordes al procedimiento de investigación de acuerdo a las necesidades de la empresa.

- Diseñar un procedimiento aséptico en el muestreo de levaduras en fermentadores de 500lt, para su análisis microbiológico y concretar la ausencia o presencia de microorganismos dañinos a la reutilización de levaduras y su siguiente fermentación.
- Crear el procedimiento para el lavado y acondicionamiento del barro de levaduras extraídos del fermentador.
- Adaptar un procedimiento para el recuento de levaduras al método de cuantificación por Cámara Neubauer y cálculo de viabilidad.
- Diseñar un procedimiento para desarrollar un Starter.
- Diseñar un procedimiento para el cálculo de requerimiento de levaduras en la inoculación de cualquier estilo de cerveza y el cálculo final de requerimiento en ml de levaduras a partir del barro recuperado en los fermentadores.

### **3.4. Justificación**

Este desarrollo de investigación es usada para la búsqueda de nuevos conocimientos implementados en el área productiva de cervezas artesanales y así de esta manera contribuir con la reducción de costes en materias primas, y dar solución a la necesidad económica de esta institución productiva a partir de conocimientos adquiridos dentro de nuestra universidad con la aplicación de las asignaturas de Microbiología, Tecnología de Alimentos, Química Instrumental, conocimientos básicos en Química Analítica Cuantitativa.

De esta manera no solo tendrá impacto en esta empresa pues el procedimiento puede ser adaptado para otras microempresas artesanales de cervezas y vinícolas, por el aporte económico que podría brindar al reducir costos en una empresa.

No solo aportara la parte económica, sino también la parte ambiental y pese a que es materia orgánica los desechos del barro de levadura, estos ya no serán desechados al 100% al alcantarillado, sino que se podrá dar una nueva vida útil a la materia prima.

### **3.5. Metodología**

El presente trabajo se basará en ser una Investigación Exploratoria con una metodología mixta en Análisis Cualitativa de datos y Cuantitativa Descriptiva.



### **3.6. Fundamento teórico**

#### **3.6.1. Definición de cerveza**

Bebida alcohólica hecha con granos germinados de cebada u otros cereales fermentados en agua, y aromatizada con lúpulo, boj, casia, etc.(RAE, 2001)

Se trata de una bebida resultante de la fermentación alcohólica, mediante levadura seleccionada, de un mosto procedente de malta de cebada y / u otros cereales en grano (mínimo de un 80% de la carga base) junto con lúpulo, y sometida a un proceso de elaboración bajo el control de un maestro cervecero artesano. Se le pueden añadir otras materias primas como frutas, especias, flores, etc. que nunca tengan como objetivo conseguir azúcares fermentables a bajo precio. Consta como mínimo de cinco etapas: maceración, cocción, enfriamiento, fermentación y envasado. (Freixis & Punsola, 2014)

#### **3.6.2. Clasificación de las cervezas por su fermentación**

En general, los consumidores de cerveza reconocen y clasifican la cerveza según su color: rubia, rojiza, ámbar u oscura. Por el contrario, los tipos de cerveza vienen determinados por la forma de fermentar a la que se ha sometido, así como por ciertos elementos que caracterizan el proceso de elaboración y el resultado final.

Se distinguen tres tipos de fermentación:

- Fermentación espontánea: Que recuerda las fermentaciones realizadas antiguamente y catalizadas («cerveza fecundada» a la serena) por la utilización de levaduras naturales presentes en el aire.
- Fermentación alta o Tipo Ale
- Fermentación baja o Tipo Lager

Tendremos, entonces, en cuenta esta distinción fundamental para tratar los diferentes tipos de cerveza.(Pilla & Vinci, 2012)

##### **3.6.2.1. Cervezas de fermentación espontanea**

Las cervezas de fermentación espontánea más clásicas reciben el nombre de lambic; su nombre procede de Lembeek, la ciudad belga donde nacieron, abriendo, seguramente, el camino a todas las demás. Esta variedad de cerveza se enfría en grandes cubas poco profundas y se hace fermentar a continuación en voluminosos toneles de roble. Después, se deja reposar durante

bastante tiempo en barricas de roble albar. Se elabora con un 30 % de trigo, lo que le confiere unas notas ácidas y cítricas características; se aromatiza ligeramente con lúpulo.

Estas cervezas, generalmente de un color amarillo más o menos intenso, tienen una espuma muy consistente. Su grado alcohólico es bajo (alrededor del 5 % en volumen). (Pilla & Vinci, 2012)

### **3.6.2.2. Cervezas de fermentación baja o de Tipo Lager**

La familia de las cervezas de fermentación baja, la más importante en producción independientemente del volumen de consumo, es la de las lagers. Esta cerveza, la más conocida y consumida en el mundo, debe su nombre a los almacenes (Lager, en alemán) o mejor dicho, a las bodegas, donde los maestros cerveceros bávaros tenían la costumbre de conservar hasta la primavera las cervezas elaboradas a finales de otoño. (Pilla & Vinci, 2012)

La palabra Lager se deriva del vocablo alemán “*lagern*” que significa guarda o permanencia en bodega y se refiere al largo periodo de reposo de la cerveza para una lenta fermentación. Este proceso se realiza a bajas temperaturas (10 a 12°C), y en él la levadura se mantiene al fondo del estanque permitiendo que el lúpulo y la cebada malteada dominen el aroma y sabor del producto. (de Clerck, 1957)

Las levaduras *Saccharomyces carlsbergensis* y *Saccharomyces cerevisiae* de cervecería se clasifican de acuerdo con su modo de acción. *S. carlsbergensis* es una levadura de fondo que no suele formar esporas, se adapta bien a la fermentación lenta a bajas temperaturas y es la preferida para elaborar cerveza tipo Lager. La levadura de *S. cerevisiae* produce una fuerte fermentación a temperatura elevada y tiende a flotar en la superficie. Es preferida para la elaboración de cerveza tipo pilsner. (Compton, 1977)

### **3.6.2.3. Cervezas de fermentación alta o de Tipo Ale**

Las cervezas *abbaye* (de abadía), originarias de Bélgica, En general, la nota de malta domina sobre la del lúpulo, además de estar impregnada de aromas de especias más complejas y persistentes. El alcohol en volumen es elevado, entre 6 y 10 %, lo que se explica por la tradición que exige que las cervezas realicen una segunda fermentación en botella. (Pilla & Vinci, 2012)

La cerveza tipo Ale se originó en Baviera en la época medieval y posteriormente ha llegado a ser el tipo predominante en el mundo. Esta cerveza es, por tradición, el producto de la

fermentación de las cepas “de superficie”, de *S. Cerevisiae*, denominada así debido a que una parte de la levadura sube hasta formar una densa “cabeza de levaduras” en la superficie del fermentador. (Brown et al., 1989)

La fermentación de la cerveza Ale ocurre de manera más rápida y a temperaturas de 20°C aproximadamente, actuando la levadura en la superficie del mosto. Además, tienen un elevado porcentaje de alcohol y son muy aromáticas<sup>18</sup>. La cerveza tipo Ale es distinta de la cerveza Lager por la disminución más rápida del extracto de azúcar en la etapa de fermentación, causada por el uso de levadura *S. Cerevisiae*, que permanece en suspensión, y por las temperaturas más altas utilizadas (20 - 23°C). (Compton, 1977)

### **3.6.3. Bioquímica de la fermentación alcohólica**

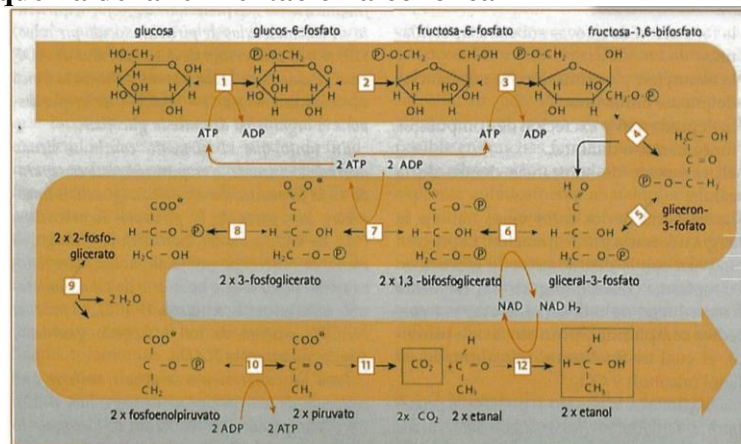
#### **3.6.3.1. Fermentación alcohólica como glicolisis anaerobia**

Como en todos los otros seres vivos, tanto plantas como animales, la célula de levadura requiere una cantidad de energía y de esta depende todos los procesos relacionados, por ejemplo:

- La formación de nuevas sustancias celulares.
- La absorción y asimilación de sustancias del medio ambiente.
- La degradación y excreción de compuestos innecesarios o dañinos.
- El transporte de sustancias dentro de la célula.

La energía que se obtiene principalmente por respiración. El proceso comienza con la degradación de la glucosa en el citoplasma, durante este tiempo se forma lo que se conoce como piruvato (ácido pirúvico) a partir de etapas intermedias complicadas el cual es transformado en etanol y CO<sub>2</sub>, tal como se observa en la (figura 4).

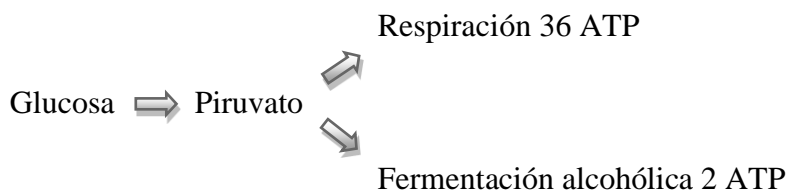
**Figura 4. Esquema de la fermentación alcohólica**



**Fuente:** KUNZE.Wolfgang. Tecnología para cerveceros y malteros. p.420

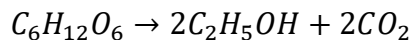
En la glicólisis, la glucosa es combinada primeramente con fósforo (fosforilada). Esto sucede por recepción de un átomo de fósforo de ATP (adenosín trifosfato) y la transformación de este último en ADP (adenosín difosfato) (1). Se forma glucosa-6-fosfato, que a continuación es transformada en fructosa-6-fosfato (2), con ayuda de la isomerasa de glucosa-fosfato. A continuación, ocurre una nueva fosforilación por pasaje de otro átomo P de ATP por parte de la 6- fosfofructoquinasa. Se forma fructosa-1,6-bisfosfato (3). A continuación, ocurre una disociación en dos triosa-fosfatos isómeros por la fructosa-bisfosfatoaldolasa (4). El glicerol- y gliceron-3-fosfato (5) formado es reducido ahora por la deshidrogenasa de gliceral-3-fosfato a 2 moléculas de 1,3- bifosfoglicerato (6) y al mismo tiempo es ligado un ion hidrógeno por NAD. Luego ocurre una doble desfosforilación, por la fosfogliceratoquinasa, a dos moléculas de fosfoglicerato (7). En esto, el fósforo es ligado nuevamente dos veces por conversión de ADP en ATP (en 1 y en 3) y se lo suministra con ello nuevamente al ciclo. A través de la fosfoglicerato-mutasa (8), el 3- fosfoglicerato es convertido en 2- fosfoglicerato y transferido por la fosfopiruvato-hidratasa (9) a fosfoenolpiruvato. La piruvatoquinasa convierte finalmente las dos moléculas de fosfoenolpiruvato en dos moléculas de piruvato (ácido pirúvico) (10). En la conversión de dos moléculas de ADP en ATP, que tiene lugar en esto, se libera la única cantidad de energía (2 x 30,5 kJ), de la que dispone el organismo durante la glicólisis. En tanto que el piruvato continúa siendo degradado durante la respiración, éste es separado en la fermentación alcohólica (glicólisis anaerobio), por parte del piruvato decarboxilasa (11), en CO<sub>2</sub> y etanal (acetaldehído). Luego, el etanal es convertido por la alcoholdehidrogenasa (bajo la presencia necesaria de cinc) en etanol (alcohol etílico) (12), donde el NADH<sub>2</sub> entrega su ion hidrógeno guardado, siendo nuevamente NAD.

Para las conversiones se debe transferir una molécula de hidrógeno. Para tales procesos de reducción, se ha impuesto en la naturaleza la transferencia a través del compuesto nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), el cual impide la liberación de gas hidrógeno peligroso. Las curvas con las denominaciones NAD NADH<sub>2</sub> aluden a esto. Si se observa de cerca el rendimiento ATP/ADP, la conversión ATP/ADP de las etapas de reacción 1 + 3 y de la etapa 7 es reconvertida nuevamente. De esta manera se forma un ciclo ininterrumpido. La ganancia de energía en sí tiene lugar en la etapa 10 con una doble desfosforilación y una doble conversión de ADP ATP. La conversión de la glucosa en 2 piruvatos, a través de 10 etapas intermedias, se denomina glicólisis. Tiene lugar en todas las células de plantas, animales y seres humanos. Posteriormente, se conduce aquí el piruvato a las mitocondrias y se lo degrada (se consume por respiración) completamente, a través del ciclo de ácido cítrico y la cadena de respiración, en muchas etapas intermedias a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, con una enorme ganancia de energía (36 ATP/mol), La levadura es el único ser vivo que, bajo determinadas circunstancias, como la ausencia de aire, puede conmutar a fermentación alcohólica, partir del piruvato:



En ausencia de oxígeno, la levadura es capaz de fermentar el piruvato. Sin embargo, en presencia de oxígeno, la fermentación es fuertemente restringida o impedida completamente (efecto Pasteur). Si, por otro lado, hay azúcar presente en concentraciones mayores que 0,1 g/l, el complejo de enzimas de respiración es inhibido en sí mismo y al mismo tiempo ocurre fermentación parcial (efecto Crabtree).

Resumiendo, la fermentación alcohólica se expresa, según la fórmula de Gay-Lussac:



$$\Delta G = -230 \text{ KJ}$$

Si se calculan cuantitativamente los productos formados según su masa atómica, resultan las siguientes relaciones:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

C: 72	48	24
H: 72	12	
O: 96	32	64
180	92	88

Si se calculan cuantitativamente los productos formados según su masa atómica, resultan las siguientes relaciones: De 1 mol de glucosa = 180g se forman durante la fermentación alcohólica 92 g de alcohol y 88 g de CO<sub>2</sub>. Es decir, que el azúcar es separado en partes casi iguales en masa de alcohol y CO<sub>2</sub>. En esto, la porción volumétrica del dióxido de carbono es incomparablemente más grande que la del alcohol, dado que los gases tienen una densidad substancialmente menor.(Wolfgang, 2006)

### 3.6.4. Generalidades de la levadura *S. Cerevisiae*

#### 3.6.4.1. La levadura

La levadura es un sacaromiceto unicelular, el cual es capaz de cubrir su demanda de energía:

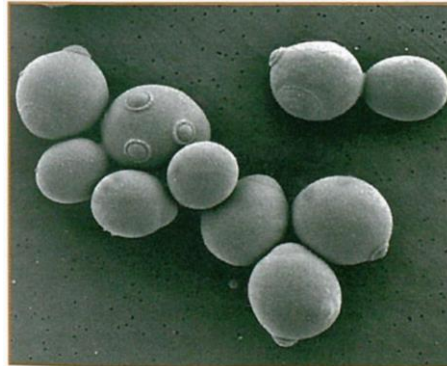
- En presencia de oxígeno (aerobio), por respiración.
- En ausencia de oxígeno (anaerobio), por fermentación.

En la fabricación de cerveza, el azúcar del mosto es fermentada por la levadura a alcohol y CO<sub>2</sub>. Para ello, en la fábrica de cerveza se utilizan hongos de levadura del tipo *S. Cerevisiae*. Cepas seleccionadas de estas levaduras son aisladas y cultivadas de forma sistemática, como cultivos puros de levadura para cerveza. Otras cepas de esta levadura se utilizan como levadura para hornear, para destiladores o para viñateros. Dado que la levadura no realiza únicamente una fermentación alcohólica, sino que también tiene, debido a su metabolismo, una gran influencia sobre el sabor y el carácter de la cerveza, es importante el conocimiento de las sustancias contenidas en la levadura, de su metabolismo y de su reproducción. Dentro de los tipos y razas de levadura de cultivo hay una serie de características diferenciadoras.

### 3.6.4.2. Reproducción y crecimiento de levaduras

La forma típica de propagación de las levaduras es la gemación. Es por ello que se las llama también hongo por gemación. En la gemación, la célula madre forma una pequeña protuberancia vesiculosa, en la cual entran una parte del citoplasma, así como también un núcleo hija, formado por división, dando forma a la célula hija completa. En algunas cepas de levadura, las células madre e hijo se separan entre sí, quedando cicatrices de gemación en la célula madre.

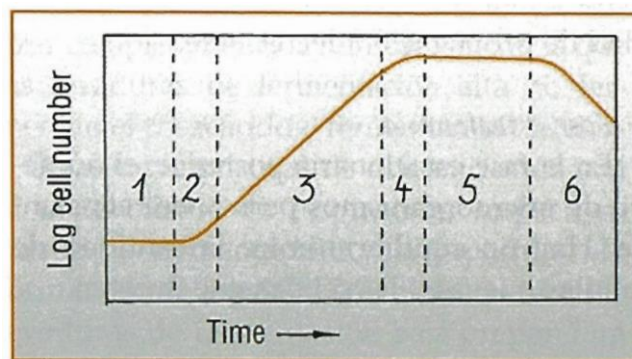
**Figura 5. Células de levadura en germinación**



**Fuente:** Dr. Inge Russell, Labatt Brewing p.70

En otras cepas, las células permanecen unidas entre sí y forman cadenas. Si se transfieren microorganismos a una solución nutritiva fresca, tal como sucede, por ejemplo, en la fábrica de cerveza, en el inicio de la fermentación del mosto con la levadura, éstos comienzan a crecer. El crecimiento está caracterizado por determinadas leyes naturales. No se desarrolla a una velocidad constante, sino que se diferencian seis fases.

**Figura 6. Fases de la propagación de levaduras (1) Fase de inducción (2) Fase de aceleración (3) Fase exponencial (4) Fase de deceleración (5) Fase estacionaria (6) Fase declinante**



**Fuente:** (Wolfgang, 2006) p.420

➤ **Fase de latencia o inducción.**

En la fase de latencia, también llamada fase de inducción, tiene lugar una activación del metabolismo. La duración de esta fase varía fuertemente. Depende del tipo de organismo, de la edad del cultivo y de las condiciones de cultivación. La fase de latencia o inducción finaliza con la primera división celular.

➤ **Fase de aceleración.**

En la fase de aceleración, que sigue a la fase de latencia, aumenta progresivamente la velocidad de división.

➤ **Fase exponencial.**

En la fase de propagación exponencial o logarítmica, la velocidad de propagación es constante y máxima. El tiempo de generación esto es, el período en que se duplica el número de células alcanza un mínimo en esta fase. En esta fase, la levadura tiene su mayor vitalidad.

➤ **Fase de deceleración.**

La fase exponencial está limitada temporalmente, debido a diferentes factores, por ejemplo, empobrecimiento del substrato de nutrientes o enriquecimiento en productos metabólicos que inhiben el crecimiento. Ella pasa a una fase de deceleración con velocidad de propagación decreciente.

➤ **Fase estacionaria.**

En la fase estacionaria posterior, el número de microorganismos permanece constante. Hay un equilibrio entre la cantidad de células nuevas y las células que mueren.

➤ **Fase declinante.**

En esta última fase mueren más células que las nuevas, que se forman por propagación. De esta manera, disminuye el número de células.(Wolfgang, 2006)



### **3.6.4.3. Caracterización de las levaduras para cerveza**

Dentro del tipo de levadura utilizada predominantemente como levadura de cultivo en la fábrica de cerveza, se diferencian numerosas cepas. En la práctica cervecera, estas cepas se dividen en dos grandes grupos:

- Levaduras de fermentación alta (*Saccharomyces cerevisiae*)
- Levaduras de fermentación baja (*Saccharomyces carlsbergensis*)

Entre las levaduras de fermentación alta y las de fermentación baja existen diferencias morfológicas, fisiológicas y tecnológicas de fermentación.(Wolfgang, 2006)

### **3.6.5. Concepto de cultivo puro**

La industria cervecera trabaja principalmente con un único tipo de levadura, es decir, con cultivos puros, el uso de células limpias, puras y muy viables asegura que las bacterias y las levaduras salvajes, no conduzcan a fermentaciones inconsistentes y de mal sabor. Los cultivos puros se preparan mediante el aislamiento de una única célula, de manera tal, que se garantiza una masa genéticamente homogénea de levaduras, por replicación vegetativa. Las ventajas de trabajar con un cultivo puro son la obtención de fermentaciones más regulares, cervezas de sabor más homogéneo y puro.(Gonzales, 2015)

La cantidad necesaria para la realización de la fermentación puede ser obtenida por propagación de cultivo puro de la levadura. El principio de propagación de cultivo puro de la levadura consiste en aislar células de levadura apropiadas y fuertes y propagarlas, bajo condiciones libres de contaminación, durante el tiempo necesario hasta que su cantidad sea suficiente para iniciar la fermentación en una cuba.(Wolfgang, 2006)

### **3.6.6. Cultivo Starter**

En la actualidad, la mayor parte de las fermentaciones industriales son procesos dirigidos en los que se añade de forma deliberada cultivos de microorganismos específicos llamados cultivos iniciadores o “Starters”, la palabra anglosajona “*starter*” puede traducirse al castellano como “inóculo” y ser definido como preparaciones microbianas constituidas por un elevado número de células de al menos un microorganismo y que se añaden para acelerar y conducir la fermentación de un alimento.(Leroy & de Vuyst, 2004)

Las ventajas de su uso no se limitan a la reducción del tiempo de fermentación, sino que además disminuye la probabilidad de que se produzcan alteraciones y permiten la obtención de productos de mejor calidad organoléptica, más estables y homogéneos. Por ello, actualmente la industria alimentaria relacionada con la producción a gran escala de productos fermentados, utiliza casi exclusivamente cultivos iniciadores que contienen cepas definidas o el empleo de iniciadores con una mezcla de cepas. (Paul Ross et al., 2002)

#### **3.6.6.1. Condiciones e instalaciones de propagación de levadura a nivel industrial.**

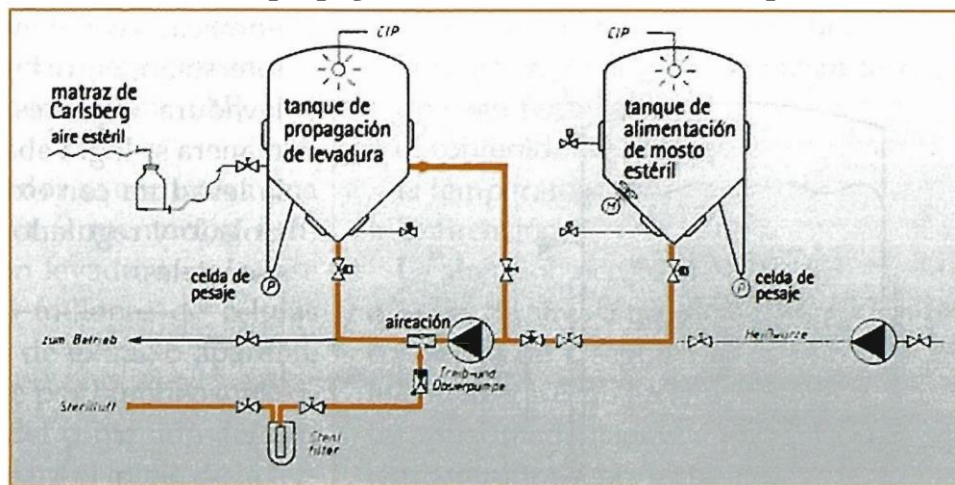
Las instalaciones de propagación de levadura consisten en recipientes cerrados de diferentes tamaños, de acero al cromo-níquel, en los cuales se propaga la levadura hasta que su cantidad es suficiente para el inicio de la fermentación en una cuba o un tanque. Existen varios métodos para la propagación de levadura. Una instalación de propagación de levadura está compuesta por un esterilizador de mosto, en el cual se esteriliza y se vuelve a enfriar el mosto a fermentar. La propagación de la levadura se realiza a través de varios tanques de propagación (propagadores) de diferente tamaño, hasta aquel tamaño que posibilite el inicio de la fermentación en un tanque de fermentación cilindrocónico. Para la propagación de levadura son importantes algunos puntos:

- Se debe trabajar bajo condiciones estériles hasta el tanque de propagación de levadura. Los organismos contaminantes no pueden ser extraídos posteriormente, dada que generalmente crecen bajo las mismas condiciones que la levadura.
- La aireación intensiva y estéril de la levadura es una condición básica para un rápido crecimiento de la misma y con ello para una levadura sana y de fermentación vigorosa.
- La levadura se propaga considerablemente más rápido a temperaturas de 20 a 25°C que a temperaturas menores. Pero es necesario llevarla, durante el desarrollo de la propagación, a las temperaturas correspondientes a las condiciones de operación, para alcanzar allí su total capacidad de fermentación.
- Para la propagación se utiliza mosto de paila llena, dado que los compuestos amargos de lúpulo contenidos allí ejercen un efecto inhibitorio de gérmenes sobre las contaminaciones.

El desarrollo de la operación prevé los siguientes pasos:

- El esterilizador de mosto es llenado con este último y se lo calienta durante mínimamente 30 minutos a 100°C para eliminar todos los gérmenes. Posteriormente, el mosto es enfriado hasta aproximadamente 14 a 16°C.
- La levadura es adicionada al tanque de propagación para el inicio de la fermentación. Si se tienen tanques de propagación de tamaños diferentes, se inocula entonces el más pequeño con la levadura del matraz de Carlsberg, bajo condiciones estériles. Para ello, se flamean primero ambas aberturas en los grifos, para excluir todas las posibilidades de infección. Es importante que el mosto sea aireado intensivamente, para acelerar la propagación de la levadura. Se trasiega para esto el mosto desde el tanque de alimentación estéril al tanque de propagación de levadura y luego de alcanzado el volumen de partida requerido, es recirculado por bombeo, desde y hacia el tanque de propagación de levadura, siendo simultáneamente aireado (figura 7). La medición del volumen de partida se realiza a través de una cápsula de medición de presión.

**Figura 7. Instalación de propagación de levaduras Conti-Prop**



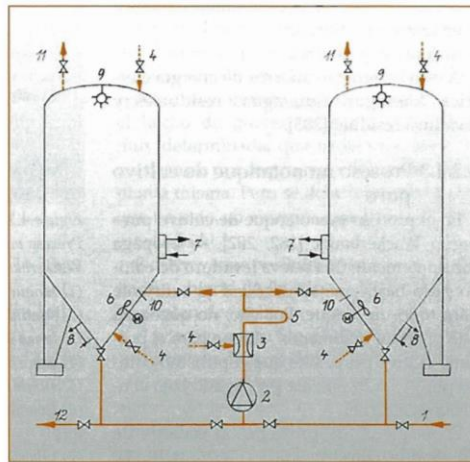
Fuente: según empresa Esau&Hueber (Wolfgang, 2006)

- Después de aproximadamente un día (24 a 36 h), el contenido se encuentra en fermentación vigorosa (fase logarítmica) y todo el contenido del recipiente es trasgado bajo condiciones estériles al recipiente próximo mayor y completado con mosto estéril y aireado. Este proceso prosigue hasta alcanzar la cantidad de levadura requerida.

- Cuando se ha alcanzado el volumen máximo en el recipiente de propagación, la cerveza verde, que se encuentra fermentando en el estado de fermentación vigorosa, es bombeada al tanque de fermentación. En esto, ocurre una nueva aireación intensiva a los efectos de asegurar un inicio óptimo de la fermentación.
- En el tanque de propagación queda un remanente en estado de fermentación vigorosa, el cual es mezclado inmediatamente con mosto estéril, para comenzar nuevamente el programa de propagación. Para la limpieza, el tanque de propagación es vaciado completamente. Por esta forma de la "adición del mosto por etapas", es posible obtener cultivos puros, propagados bajo condiciones de operación, de forma permanente y en intervalos cortos, lográndose con ello una calidad constante de levadura.

**Figura 8. Propagación optimizada de levaduras**

- (I) asimilador 1
- (II) asimilador 2
- (1) entrada de mosto
- (2) bomba controlada por frecuencia
- (3) tobera tipo Venturi
- (4) aire estéril
- (5) tramo de disolución
- (6) agitador de aireación
- (7) refrigeración
- (8) calentador
- (9) equipo de CIP
- (10) tramo de medición para O<sub>2</sub>, pH y extracto
- (11) CO<sub>2</sub>
- (12) levadura



**Fuente:** según Back (Wolfgang, 2006)

- La posibilidad de obtener para cada cocimiento levadura de operación en condiciones óptimas es altamente deseable para toda planta. Hemos visto que la levadura extraída en la fase logarítmica ofrece muchas ventajas en la fermentación:
  - Rápida fermentación inicial
  - Reducción del tiempo de fermentación
  - Rápida disminución del valor pH (caída de PH)
  - Degradación rápida y amplia de diacetilo
  - Un sabor de cerveza redondeado y puro

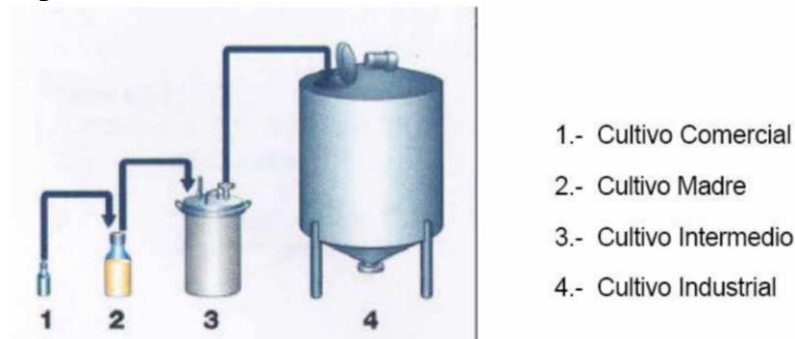
- Luego de la extracción por bombeo, se deja una parte del cultivo puro en fase logarítmica como sedimento de levadura, para obtener nueva levadura con mosto nuevo. Se trabaja con un "depósito de levadura" (proceso de asimilación).
- Se propaga constantemente nueva levadura de un cultivo puro. El proceso trabaja con "vaciado total" (proceso monotanque).(Wolfgang, 2006)

### 3.6.7. Propagación de cultivo en laboratorio

El procedimiento para preparar el “inoculo” o “cultivo starter” se realiza bajo estrictas condiciones asépticas para evitar contaminación de los cultivos e incluye tres etapas:

- 1) Recuperación de la cepa, las cepas utilizadas en cervecerías se encuentran generalmente conservadas en tubo de agar inclinado, en un cultivo liofilizado o comercial.
- 2) Crecimiento en un medio de cultivo sólido. La suspensión de microorganismo es incubada en un medio de cultivo solido bajo condiciones y temperaturas adecuadas para su crecimiento.
- 3) Crecimiento en un medio de cultivo líquido o también denominado “cultivo madre”.
- 4) A partir de este se prepara el cultivo intermedio (Balón de Carlsberg) y finalmente el cultivo industrial en el tanque de propagación.

**Figura 9. Preparación de cultivos starter**



Fuente: (Cabeza, E 2006) p.3

En las cervecerías, la propagación en el laboratorio se utiliza recipientes con diferentes volúmenes, y ocurrirá por transferencia del contenido de un recipiente en alta fermentación a otro recipiente de mayor tamaño, según la Tabla 1 Transfiriéndose luego a un balón de Carlsberg, que es un recipiente de metal, cerrado herméticamente por medio de un sello roscado, que posee un filtro esterilizante de aire, una conexión de inoculación con membrana de goma y

un grifo de vaciado que permite tomar muestras. Existen dos tamaños de balón de Carlsberg, el pequeño de 8 a 10 L y el grande de 20 a 25 L. Este balón permite la transferencia a la fábrica de cerveza en condiciones de asepsia.

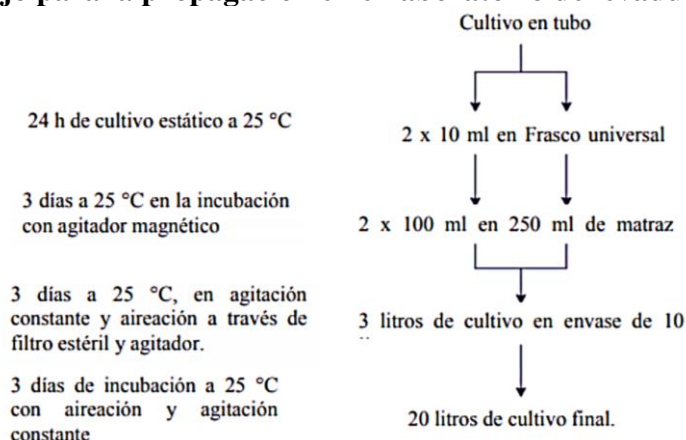
**Tabla 1. Volúmenes de propagación en laboratorio**

<b>RECIPIENTE N°</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Tamaño del recipiente</b>	10 ml	100 ml	1000 ml
<b>Cantidad de mosto estéril</b>	5 ml	50 ml	500 ml
<b>Volumen de inoculación</b>	-	5 ml	55 ml
<b>Contenido total:</b>	5 ml	55 ml	555 ml

**Fuente:** (Tamayo & de Ciencias, 2015)

Las etapas iniciales de propagación pueden utilizar medios artificiales, tales como extracto de levadura, peptona, glucosa. El mosto puede ser utilizado en la fase de laboratorio; sin embargo, debe ser esterilizado en autoclave antes de su uso. El esquema que se muestra es una sugerencia, sin embargo, es conveniente limitar en lo posible el número de transferencias, dado que representan los puntos de mayor riesgo de contaminación. En las cervecerías el escalamiento se realiza, con dosis pequeñas, el Instituto Siebel recomienda incrementos de 1 en 8, los cerveceros británicos recomiendan incrementos de 1 en 10, y los cerveceros alemanes recomiendan incrementos de 1 en 4 o más. Estos incrementos pueden influir en el rendimiento de la fermentación, en la eficiencia del metabolismo de los azúcares fermentables, principalmente la maltosa y maltotriosa, que son los últimos en fermentar. Según (Boulton & Quain, 2001), “el crecimiento de la levadura en la etapa de propagación en laboratorio está influenciada por: (a) volumen de mosto utilizado en cada paso de la propagación, (b) Densidad del mosto utilizado y (c) la concentración estimada de células de levadura antes de propagar.”

**Figura 10. Flujo para la propagación en el laboratorio de levadura cervecera**



Fuente: (Boulton & Quain, 2001) p. 491

### 3.6.8. Re-pitching

En la industria cervecera, al finalizar la fermentación, parte de la levadura utilizada, es recolectada y conservada para su posterior reutilización en fermentaciones posteriores, sometiéndola de esta forma a subcultivos. Este proceso se conoce en las cervecerías como Re-pitching (repique, refloculación o pase), que es la reutilización de las levaduras de un tanque de fermentación para fermentar otro lote. Se sabe que se llega a utilizar de tres a siete generaciones e inclusive varios autores mencionan de diez a veinte generaciones. Aunque eso dependerá de la cepa de levadura y las buenas prácticas de recolección y almacenamiento. Sin embargo, se conoce que esta práctica puede provocar mutaciones, degeneraciones y contaminación ya que el proceso influye en los rendimientos del proceso de producción.

La recuperación de la levadura se realiza al final de cada fermentación, por lo cual se toman cepas de levadura en la fase estacionaria avanzada de crecimiento, sin embargo, la influencia de un “Re-pitching” en la fisiología de la levadura y el rendimiento de la fermentación es incierta. La práctica del Re-pitching, exige tener instalaciones para el manejo de la levadura durante el intervalo entre almacenar y volver a inocular. Una característica del proceso es que la levadura se somete a períodos de crecimiento en fermentación entre mezclado con intervalos de limitación de nutrientes durante el almacenamiento. (Boulton & Quain, 2001)

El re-pitching tiene importancia dentro de la industria cervecera artesanal, desde el punto de vista económico, ya que disminuye los recursos en materias primas y el tiempo de propagación, y esta práctica es y seguirá siendo la más utilizada en cervecería artesanal, no obstante, las

investigaciones sobre su impacto en la levadura se siguen estudiando al mismo tiempo de poder formalizar el proceso.

### **3.6.9. Factores que influye en la bioquímica de la fermentación**

Según Boulton y Quain, (2001) “tres aspectos generales influyen en la bioquímica de la fermentación. Estos son la composición del mosto, el genotipo de la cepa de levadura y la expresión fenotípica del genotipo como influencia de la práctica de fermentación.

En términos de nutrición, la levadura requiere macronutrientes, tales como carbohidratos fermentables, como fuente de carbono, aminoácidos, como una fuente de nitrógeno, y oxígeno para proporcionar una fuente de ácidos grasos insaturados y esteroides. Muchos micronutrientes tales como vitaminas, iones no metálicos tales como iones fosfato y sulfato, e iones metálicos también son requeridos por la levadura y todos estos requerimientos los proporciona el mosto. En el mosto aromatizado con lúpulo, se encuentra la siguiente composición:

- **Carbohidratos:** disponibles como azúcares de bajo peso molecular tales como los monos, di y oligosacáridos. Los azúcares presentes según el orden de concentración son: maltosa, maltotriosa, glucosa, sacarosa, fructosa y que en conjunto constituyen del 75 al 85 por ciento del extracto total. El otro 15 a 20 por ciento son azúcares no fermentables tales como dextrinas, beta-glucanos, pentosanos y oligosacáridos.
- **Nitrógeno:** disponible como aminoácidos, péptidos y sales de amonio. La levadura suele utilizar sales de amonio, sin embargo, éstos están presentes en el mosto en muy pequeñas cantidades.
- **Vitaminas:** tales como biotina, ácido pantoténico, tiamina, e inositol son esenciales para la función enzimática y el crecimiento de la levadura. La biotina se obtiene a partir de la malta durante la maceración y está implicada en la carboxilación de ácido pirúvico, síntesis nucleica, la síntesis de proteínas, y la síntesis de ácidos grasos. Las deficiencias de biotina pueden ocasionar altas tasas de mortalidad en la levadura. El ácido pantoténico (vitamina B5 hidrosoluble, participa en el ciclo de Krebs) es requerido por muchas cepas de levadura en la fermentación y es un factor esencial en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y en la función de la membrana celular. Las deficiencias de ácido pantoténico pueden conducir a la acumulación del sulfuro del hidrógeno. La tiamina (vitamina B1) ayuda a las células de las levaduras a la degradación de



carbohidratos, El inositol se requiere para la formación de las membranas celulares y para la división de célula, deficiencias de inositol disminuirán el índice del metabolismo de los carbohidratos.

- **Minerales:** tales como fosfato, potasio, calcio, magnesio, azufre, y elementos traza. El fosfato está implicado en la conservación de energía, necesario para el crecimiento rápido de levadura, y es parte de muchos compuestos orgánicos en la levadura. El calcio mejora las características de la floculación de la levadura y debe estar presente en un 50 por ciento de concentración mayor al de magnesio. Este último se requiere para el crecimiento de la levadura y actúa como activador de enzimas. La levadura requiere del sulfuro para la síntesis de la metionina (uno de los aminoácidos esenciales en la cadena de proteínas) y la cisteína (un aminoácido no esencial, azufrado). El zinc, es el elemento traza más importante, es un cofactor en reacciones enzimática dentro de la célula, es requerido para el crecimiento de la levadura, interviene en la síntesis de proteínas y metabolismo de los carbohidratos. Normalmente, la malta de cebada, contiene el zinc necesario, pero ciertas cepas de levadura pueden requerir más de lo normal, por lo que podrá ser necesario suplementar el mosto con sales de zinc.(Wolfgang, 2006)

### **3.6.10. Vitalidad y Viabilidad de levaduras**

#### **3.6.10.1. Vitalidad de levaduras**

El análisis de la vitalidad o viabilidad de las levaduras es útil para conocer las condiciones de salud de las células de levadura, es decir para determinar si son capaces de alimentarse y reproducirse, con el objetivo de dar lugar a una correcta fermentación alcohólica.

Este parámetro es muy importante porque al reutilizar la levadura es necesario prestar mucha atención a la eficiencia de las células recuperadas.(FOODLAB, n.d.)

Así también Stewart y Russell describen a la Vitalidad de la levadura como la medida del rendimiento de actividad o fermentación de levadura, en función de la viabilidad celular total y el estado fisiológico de la población de células viables. Es, por tanto, que en una población de células de levadura empleadas como Starter, no todas las células poseen las mismas características de vitalidad, pero todavía tienen un papel activo en la fermentación. Es probable que una célula de levadura, pierda, por cualquier razón su capacidad de reproducción, sin embargo, puede contribuir a la fermentación por la asimilación de nutrientes y la producción de

compuestos aromáticos que influyen en la cerveza. Las pruebas de viabilidad estándar no son capaces de proporcionar información sobre los diferentes estados fisiológicos de la fracción viable de la población de levaduras. Las pruebas de viabilidad, no necesariamente indican que el cultivo de levaduras tendrá un buen crecimiento y/o rendimiento óptimo en la fermentación. Solo identifican el estado en general en que se encuentran, es decir vivas o muertas, representan sólo el porcentaje de células vivas dentro de una población. Por tanto, la vitalidad de una población de levaduras en el Starter, predecirá el rendimiento de estas en la fermentación, es por eso que en las cervecías estas pruebas se realizan paralelamente. Las pruebas de vitalidad comúnmente empleadas son:

- 1) **Prueba de la tasa de Consumo específica de oxígeno.** - Desarrollada por investigadores en el Brewing Research Foundation International (BRFI), donde demuestran una correlación entre la tasa de absorción de oxígeno de levaduras y el rendimiento de la fermentación, si la viabilidad de las levaduras es inferior al 90 por ciento.
- 2) **La prueba del poder de acidificación.** - Desarrollado por Opekarova y Sigler (1982), la prueba mide la disminución en el pH extracelular de una suspensión de células de levadura después de la adición de glucosa. Este método es útil para detectar las grandes diferencias en la actividad metabólica de la levadura, pero requiere lavado extenso de la levadura y múltiples puntos de muestra.
- 3) **El método del pH intracelular.** - que utiliza un reactivo fluorescente sensible al pH para medir el pH intracelular de células individuales y masa celular. Este examen puede ser capaz de detectar cambios más sutiles en la vitalidad de la célula de levadura en comparación con la prueba del poder de acidificación. El último método se relaciona con la capacidad de las células para soportar o superar el estrés.
- 4) **La prueba del lanzamiento de magnesio.** - basada en la observación de moléculas de bajo peso molecular como los iones fosfato, potasio y magnesio que son liberadas por la levadura inmediatamente después de la inoculación de glucosa en el medio. (Stewart & Russell, 1998)

### **3.6.10.2. Viabilidad de levaduras**

La Viabilidad de las levaduras se define como el porcentaje de células vivas en una muestra y existen varios criterios para evaluar la viabilidad celular de las levaduras. En consecuencia, la viabilidad de una muestra de levadura puede variar dependiendo del criterio seleccionado. En la industria de elaboración de la cerveza, la técnica más utilizada para evaluar la viabilidad, es la Tinción con azul de metileno, debido a su rápida respuesta, además, esta técnica permite el recuento de células viables de levaduras en cámara de Neubauer y un microscopio de luz. Esta técnica se basa en la capacidad de las células viables para reducir el tinte en su forma incolora, mientras que las células no viables son incapaces de reducir el tinte tomando un tono púrpura azul. Sin embargo esta técnica se considera un método preciso sólo cuando la viabilidad celular de las levaduras es superior al 90 por ciento, recientemente se ha cuestionado este método, por su baja reproducibilidad e inexactitud cuando es menor al 90 por ciento, por tanto, se han realizado muchas investigación, respecto a la viabilidad con otros tintes, tales como el cristal violeta, el azul de anilina, la rodamina B y la eosina Y, Sin embargo el azul de metileno sigue siendo el más empleado.(Boulton & Quain, 2001)

La viabilidad celular es, sin duda, un aspecto importante en el control de la fermentación alcohólica. Cuanto mayor es el número de células vivas, mejor será el rendimiento neto del proceso. La presencia de alcoholes superiores (n-butanol, alcohol isoamílico), ácidos grasos y ésteres, incluso a bajas concentraciones, hace que estos actúen de una manera sinérgica como compuestos tóxicos de las células de levadura, dando lugar a la muerte y, en consecuencia, a una disminución de la viabilidad celular.(Aráoz et al., 2016)

De esta manera podemos observar que tanto Boulton y Quain; Stewart y Russel sugieren el método microbiológico para la evaluación de viabilidad, por recuento en placa, pero, teniendo en cuenta el tiempo que toma este análisis no es rápido pues demoraría al menos tres días para poder contabilizar, es por este motivo que se propone en muchas empresas cerveceras artesanales realizar el conteo de viabilidad por el método de la cámara de Neubauer.

### **3.6.11. Análisis en Cámara de Neubauer**

Existen numerosas pruebas para determinar la viabilidad celular, entre las que se pueden mencionar la coloración de células por microscopía directa y el cultivo en medios agarizados. Se planteó como objetivo del presente trabajo estudiar el uso del colorante eritrosina para

determinar la viabilidad de células de levadura, como una alternativa al azul de metileno, que se emplea convencionalmente.

*Saccharomyces cerevisiae* es la especie de levadura empleada por excelencia en la obtención de etanol por su capacidad fermentativa (rendimiento y velocidad), tolerancia osmótica al etanol, resistencia a medios ácidos y a temperaturas, alta viabilidad celular para reciclajes y estabilidad genética. Sus células elípticas miden alrededor de 6-8  $\mu\text{m}$  de longitud por 5  $\mu\text{m}$  de ancho y su reproducción asexual se realiza por brotación.

En la búsqueda de optimizar el estudio del comportamiento de las levaduras en los procesos de fermentación es importante emplear técnicas confiables y de mejor resolución. (Aráoz et al., 2016)

Generalmente el recuento más confiable recomendado por Aráoz et al mencionan a la cámara de Neubauer incluso en la comparación que realizan en dos tipos de tinciones de eritritol y azul de metileno usado generalmente para este análisis bajo el siguiente procedimiento sencillo usando cualquier de estos dos tipos de tinción:

#### **3.6.11.1. Soluciones para recuentos de células**

##### **➤ Eritrosina**

Se disolvió 1g de eritrosina en 100 ml de agua destilada; luego se agregó 1 ml de esta solución en 50 ml de solución tampón, partes iguales de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M, y se obtuvo una solución del colorante de 1:5000 (Oliveira et al., 1996).

##### **➤ Azul de metileno**

Se pesaron 0,025g de azul de metileno; 0,9g de  $\text{NaCl}$ ; 0,042g de  $\text{KCl}$ ; 0,048g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,02g de  $\text{NaHCO}_3$  y 1g de glucosa. Se disolvieron en 100 ml de agua destilada con agitación constante durante seis horas. Posteriormente, la solución se filtró empleando papel de filtro tipo Whatman N° 1, y se almacenó en un recipiente oscuro para preservarla de la luz.

**Tabla 2. Comparación de la preparación y almacenamiento de las soluciones de colorantes vitales.**

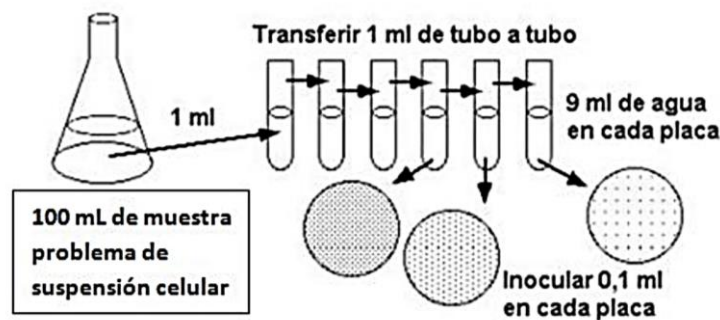
	Azul de metileno	Eritrosina
	Azul de metileno	Eritrosina
<b>Preparación</b>	NaCl	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	KCl	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	
	NaHCO <sub>3</sub>	
	Glucosa	
<b>Disolución</b>	Con agitación 6h	En el momento
<b>Filtración</b>	Si	No
<b>Limpieza del material de vidrio y plástico</b>	Difícil	Fácil y rápida
<b>Almacenamiento</b>	En frasco oscuro	Cualquier recipiente Heladera 8 meses

Fuente: (Aráoz et al., 2016) p.41

### 3.6.11.2. Dilución seriada de las suspensiones celulares

Para poder realizar un conteo celular en cámara de Neubauer de una suspensión la cual tiene una alta densidad celular se debe realizar la técnica de diluciones seriadas para evitar las estimaciones erróneas y crecimientos confluentes en placas. También es importante que cuando se hacen cultivos en placa petri el número de colonias no sea demasiado bajo para que el cálculo sea estadísticamente significativo. En la práctica el número de colonias por placa oscila entre 30 y 300 para obtener el número apropiado de colonias casi siempre se diluye la muestra. Como raramente se sabe de antemano que el número de células viables, normalmente se hace más de una dilución, lo más frecuente es realizar diluciones decimales de la muestra. Para hacer una dilución  $10^{-1}$  se mezclan 0.5 mL de muestra con 4.5mL de diluyente o 1mL de muestra con 9mL de diluyente, si se necesita una dilución de  $10^{-2}$  se puede mezclar 0.05mL de la muestra con 4.95 mL de diluyente o 0.1mL con 9.9 mL por otra parte, una dilución de  $10^{-2}$  se puede hacer de modo seriado haciendo dos diluciones de tipo  $10^{-1}$ . En la mayor parte de los casos se realizan dichas diluciones hasta alcanzar la dilución deseada. Así si se quiere dilución  $10^{-6}$  se puede lograr haciendo diluciones sucesivas de  $10^{-2}$  o seis diluciones de  $10^{-1}$ . Procedimiento para determinación de viables usando las diluciones seriadas de la muestra y el método de vertido en placa, el líquido usado para hacer las diluciones es una solución salina equilibrada. El factor de dilución es el inverso de la dilución en muestras de 0.1 mL. (Altamirano, 2013)

**Figura 11. Dilución seriada de suspensión celular**



Fuente: (Altamirano, 2013) p. 48

### 3.6.11.3. Recuento en cámara de Neubäuer

Se mezclaron 100  $\mu$ l de cada uno de los colorantes con igual volumen de diluciones de las muestras, y se colocó posteriormente un volumen de las mezclas en la cámara de recuento. Se observó al microscopio empleando un aumento de 400x. (Aráoz et al., 2016)

Consiste en la observación al microscopio de volúmenes muy pequeños de suspensiones de células. Se usan unos portaobjetos especiales denominados cámaras de Neubauer. Está diseñada de manera de contener una cantidad fija de suspensión celular líquida. Consta de un cuadrado central de 1 mm de lado dividido en 25 cuadraditos. Cada uno de ellos está, a su vez, dividido en 16 cuadrados. Se coloca un cubreobjetos sobre la zona cuadrículada, apoyado sobre dos hombros laterales de manera que cuando hay un buen contacto entre ellos, queda una distancia de 0.1 mm entre el cubreobjetos y la cámara. Esto determina que el líquido quede contenido en un volumen de 0.1 mm<sup>3</sup>. Para que la medida sea correcta es necesario que la densidad de células sea del orden de 10<sup>5</sup> células/ml. (Altamirano, 2013)

### 3.6.12. Hongos y levaduras

El grupo grande y diverso de levaduras y mohos (hongos) microscópicos transmitidos por los alimentos incluye varios cientos de especies. La capacidad de estos organismos para atacar muchos alimentos se debe en gran parte a sus requisitos ambientales relativamente versátiles. Aunque la mayoría de las levaduras y mohos son aerobios obligados (requieren oxígeno libre para crecer), su requerimiento ácido/alcalino para crecer es bastante amplio, variando desde pH 2 hasta pH superior a 9. Su rango de temperatura (10-35°C) también es amplio, con unas pocas especies capaces de crecer por debajo o por encima de este rango.

Tanto las levaduras como los mohos provocan diversos grados de deterioro y descomposición de los alimentos. Su detectabilidad en o sobre los alimentos depende del tipo de alimento, los organismos involucrados y el grado de invasión; el alimento contaminado puede tener imperfecciones leves, imperfecciones severas o estar completamente descompuesto, con el crecimiento real manifestado por manchas de podredumbre de varios tamaños y colores, costras antiestéticas, baba, micelio algodonoso blanco o moho esporulado muy coloreado. También se pueden producir sabores y olores anormales. Ocasionalmente, un alimento parece estar libre de moho, pero tras un examen micológico se descubre que está contaminado.(FDA, 2013)

#### **3.6.13. Mesófilos aerobios**

El recuento de aerobios en placa (APC) pretende indicar el nivel de microorganismos en un producto. La Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC 3) y la Asociación Estadounidense de Salud Pública (APHA 1), han desarrollado procedimientos detallados para determinar el APC de los alimentos. El método convencional de recuento en placa para examinar alimentos congelados, refrigerados, precocinados o preparados.(FDA, 2013)

#### **3.6.14. Coliformes**

*Escherichia coli*, originalmente conocida como *Bacterium coli commune*, fue identificada en 1885 por el pediatra alemán Theodor Escherich. *E. coli* está ampliamente distribuida en el intestino de humanos y animales de sangre caliente y es el anaerobio facultativo predominante en el intestino y parte de la flora intestinal esencial que mantiene la fisiología del huésped sano. *E. coli* es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, que incluye muchos géneros, incluidos patógenos conocidos como *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* no se consideran patógenos, pueden ser patógenos oportunistas que causan infecciones en huéspedes inmunocomprometidos. También hay cepas patógenas de *E. coli* que, cuando se ingieren, causan enfermedades gastrointestinales en seres humanos sanos.

Actualmente, los 3 grupos se utilizan como indicadores, pero en diferentes aplicaciones. La detección de coliformes se utiliza como indicador de la calidad sanitaria del agua o como indicador general de la condición sanitaria en el entorno de procesamiento de alimentos.(FDA, 2013)

### **3.6.15. *Lactobacillus acidophilus***

*Lactobacillus acidophilus* es un tipo de probiótico (bacteria "buena") que se encuentra en el intestino, la boca y la vagina humanos, y también en ciertos alimentos. Las bacterias "buenas" como *L. acidophilus* pueden ayudar a descomponer los alimentos, absorber los nutrientes y combatir los organismos "malos" que pueden causar enfermedades. También a veces se agrega a alimentos fermentados como el yogurt y así se encuentra en suplementos probióticos.(FDA, 2013)

### **3.6.16. Acetobacterias**

Las bacterias que lo conforman son pleomórficas, pudiendo tener forma de bastones u ovoide. Además, se caracterizan porque tienen la capacidad de producir ácido acético a partir de etanol. Esta es una habilidad que ha sido explotada por el hombre a nivel comercial, en la producción de vinagre y de una amplia variedad de productos derivados de este. La mayoría de las bacterias que integran al género *Acetobacter* son Gram negativas. Esto quiere decir que cuando son sometidas a la tinción de gram adquieren una coloración fucsia. Esto se debe a que en su pared celular no tienen una capa de peptidoglicano lo suficientemente gruesa como para retener las partículas del colorante.(FDA, 2013)

Así mismo, estas bacterias son aeróbicas obligadas. Debido a esto, para desarrollarse deben estar obligatoriamente en un ambiente en el que haya una amplia disponibilidad de oxígeno.(FDA, 2013)

### **3.6.17. *Pediococcus* sp**

*Pediococcus* un género de bacterias homofermentativas, cocos Gram positivo, no esporulados, inmóviles, aerobio facultativo, catalasa negativa. Las células son esféricas, nunca alargadas, de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, forman tétradas bajo condiciones favorables, algunas veces solo se observan en pares. La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 40 °C. Este género es el responsable de la clásica alteración de la cerveza "enfermedad sarcina" que, en su forma más grave, se caracteriza por un exceso de acidez, turbidez, un sedimento granular y malos sabores y aromas a consecuencia de la formación de diacetilo. Sin embargo, una alteración así solo se produce cuando hay un crecimiento elevado y en las demás situaciones la producción de diacetilo es el problema más importante.



Las contaminaciones por *P. damnosus* son más frecuentes durante la fermentación de la cerveza, debido en parte por su habilidad para crecer a bajas temperaturas, en donde se ha observado que se adhiere a las levaduras y algunas veces ocasiona sedimentación prematura de las mismas, resultando en una retardación del proceso de fermentación (FDA, 2013)

### 3.7. Resultados

#### 3.7.1. Procedimiento de Muestreo de levaduras

##### I. Requerimiento de Equipos y Material (Anexo 1)

- Frascos de vidrio esterilizados de 200ml
- Balanza
- Mangueras de conexión para el fermentador
- Atomizador de gatillo industrial
- EPP's desinfectados
- Caja de transporte de muestras biológicas

##### II. Reactivos

- Ácido Peracético
- Agua Estéril

##### III. Procedimiento

1. Preparar ácido peracético a una concentración de 2000ppm para una esterilización química del lugar.
  - Tomar 1.8ml con una pipeta e introducir a 1 litro de agua.
  - Si se requiere la esterilización de más superficies. Recalcular la cantidad bajo la siguiente ecuación.

#### Ecuación 1. Concentración ppm

$$ppm = \frac{m_{soluta}}{V_{solución}}$$

La masa de soluto multiplicar por su densidad para determinar la cantidad en volumen de ácido peracético.

2. Esterilizar con la solución toda la superficie en donde se tomará la muestra de levaduras con la ayuda de un atomizador:
  - Fermentador; Tubo de salida y palancas
  - Mangueras
  - Suelo
  - Guantes
  - Otros instrumentos en uso

3. Abrir los frascos esterilizados cerca de la salida de las levaduras.
4. Abrir la llave de salida y extraer la muestra.
5. Introducir a la caja transportadora de muestras biológicas, cerrar y llevar la muestra a laboratorio.
6. ANALISIS A SOLICITAR:
  - Recuento total de hongos
  - Recuento total de levaduras
  - Recuento total de mesófilos aerobios
  - Recuento total de Coliformes
  - Ausencia / Presencia *Lactobacillus sp.*
  - Ausencia / Presencia de *Acetobacterias*
  - Ausencia / Presencia de *Pediococcus sp.*

**Nota:** Si los resultados muestran presencia o recuento en cualquier de los parámetros, se debe tener en cuenta que el proceso de elaboración de la cerveza no fue inocuo en alguna de sus etapas, por lo que no se podrá reutilizar las levaduras.

7. Si los resultados son favorables proseguir con los siguientes procedimientos.

### 3.7.2. Procedimiento para el extraído de levaduras del fermentador, lavado y acondicionamiento.

#### I. Requerimiento de Equipos y Material (Anexo 2)

- 10 frascos de vidrio esterilizables graduados de 1000ml (esterilizados)
- Mangueras de conexión para el fermentador
- Atomizador de gatillo industrial
- EPP's desinfectados
- Refrigerador ultra freezer
- Balanza

#### II. Reactivos (Anexo 1)

- Ácido Peracético
- Soda Caustica
- Agua destilada y estéril temperatura < 15°C

#### III. Procedimiento

1. Preparar ácido peracético a una concentración de 2000ppm para una esterilización química del lugar.
  - Tomar 2ml con una pipeta e introducir a 1 litro de agua.
  - Si se requiere la esterilización de más superficies. Recalcular la cantidad bajo la siguiente ecuación.

#### Ecuación 1. Concentración ppm

$$ppm = \frac{m_{soluta}}{V_{solución}}$$

La masa de soluto multiplicar por su densidad para determinar la cantidad en volumen de ácido peracético.

2. Esterilizar con la solución toda la superficie en donde se tomará la muestra de levaduras con la ayuda de un atomizador:
  - Fermentador; Tubo de salida y palancas
  - Mangueras
  - Suelo
  - Guantes

➤ Otros instrumentos de Uso

3. Abrir los frascos esterilizados cerca de la salida de las levaduras.

**Nota:** Si no se cuenta con una autoclave de esterilización lavar los frascos bajo protocolo de lavado de botellas de cerveza.

- i. Lavar con detergente
  - ii. Enjuagar con bastante agua corriente
  - iii. Lavar con solución de agua a 80°C y Soda Caustica en una concentración de 10000ppm (10g de soda por cada 1 litro de agua caliente).
  - iv. Enjuagar con agua a 80°C, 3 veces en distintas fuentes de enjuague.
  - v. Rosear con el atomizador y solución de ácido peracético a 2000ppm cada frasco y dejarlos tapados, hasta el uso.
4. Antes de abrir la llave del fermentador, lavar con agua destilada y estéril (8-15°C) el frasco de 1000ml para coleccionar la levadura.
  5. Llenar con 300ml de agua destilada y estéril el frasco lavado.
  6. Abrir la llave de salida y extraer la levadura en los frascos de 1000ml hasta los 700ml de graduación. (300ml agua + 400ml barro de levadura)
  7. Desarrollar este paso con los siguientes 4 frascos.
  8. En ese instante agitar vigorosamente cada frasco.
  9. Dejar reposar por 30 min los frascos a una temperatura de 10°C. El frasco se dividirá en 2 fases, la parte superior es la que contiene las levaduras y la parte inferior el trub.
  10. Lavar y desinfectar el área de trasvasado, antes de trasvasar la levadura, lavar con agua destilada y estéril (<15°C) el otro frasco de 1000ml con roseado de ácido peracético.
  11. Trasvasar la fase superior al nuevo frasco, dejando así la parte sedimentada es decir el trub atrás.
  12. Si se observan partículas en suspensión o nuevo sedimento, repetir el proceso nuevamente, si no se observan mantener cadena de frio para la conservación.

**Nota:** Para un mayor tiempo, superior al 1 mes de conservación se sugiere un Ultra freezer y no así un refrigerador convencional.

### 3.7.3. Procedimiento para el recuento de levaduras y cálculo de viabilidad de levaduras recuperadas.

#### I. Requerimiento de Material (anexo 3)

- Microscopio binocular de un objetivo de 40x y ocular de 10 aumento para llegar a 400x.
- Cámara de Neubauer de 0,100 mm de profundidad y un área de 0,0025mm<sup>2</sup>.
- Pipeta de 1ml
- Pipeta de 10ml
- Tubos cónicos de 15ml con tapón rosca, graduado y gradilla.

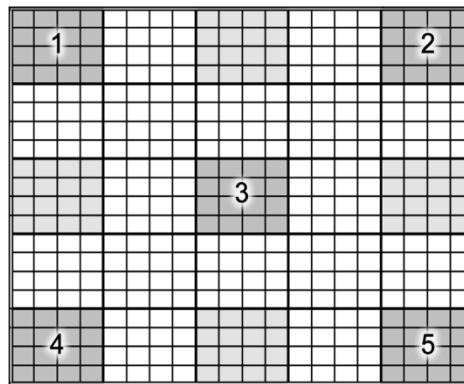
#### II. Reactivos

- Ácido Peracético
- Agua destilada y estéril
- Azul de metileno

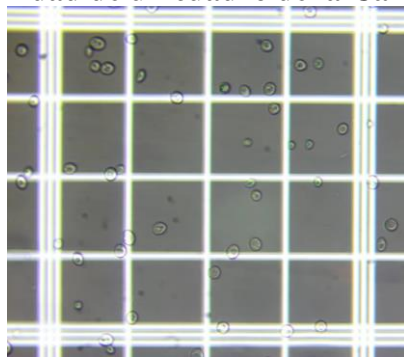
#### III. Procedimiento

1. Tener el área de trabajo y material limpio, desinfectado y esterilizado con la solución preparada de ácido peracético a 2000ppm, y enjuagado con agua destilada estéril.
2. Preparar diluciones en 3 fases de la levadura recupera de los frascos de 1000ml:
  - i. Primera Fase Dilución 1:10**
    - Del frasco con la levadura recuperada tomamos 1 ml de levadura con la pipeta y diluimos con 9 ml de agua destilada estéril en un tubo de ensayo.
    - Agitamos muy bien para homogenizar la muestra 1.
  - ii. Segunda Fase Dilución 1:10 (dilución 1:100)**
    - Del tubo de ensayo anterior tomamos nuevamente 1 ml de muestra y la diluimos con 9ml agua destilada estéril en un tubo de ensayo.
    - Agitamos muy bien para homogenizar la muestra 2.
  - iii. Fase final de Dilución 1:2 (dilución 1:200)**
    - Del tubo de ensayo anterior (muestra 2) tomamos nuevamente 1 ml y la diluimos con 1ml de solución de azul de metileno.
    - Agitamos muy bien para homogenizar la muestra final.

3. Ponemos el cubre objeto a la Cámara de Neubauer y cargamos con una gota de la última dilución 1:2 con azul de metileno.
4. Comenzamos a contar la cantidad de levaduras visibles en cada cuadro de la cámara y registramos de la siguiente manera:
  - Levaduras Transparentes: serán levaduras vivas
  - Levaduras Azules: serán levaduras muertas
  - Total, de levaduras: conteo de ambas
5. Otra forma reducida de conteo será: Contar 5 recuadros distribuidos de manera cruzada.



#### **Ejemplo de Visibilidad de un cuadro de la Cámara de Neubauer**



- Contar bajo el mismo registro:
  - Levaduras Transparentes: serán levaduras vivas
  - Levaduras Azules: serán levaduras muertas
  - Total, de levaduras: conteo de ambas
- Los datos multiplicamos por 5 para obtener el resultado de la cámara total.
- Calculamos la totalidad de levaduras en nuestra muestra bajo la siguiente ecuación.

### **Ecuación 2. Recuento de levaduras**

$$\# \text{ Total de levaduras en los 5 cuadros} * 5 * \text{Dilución} * 10000 = \frac{\text{Levaduras [millon o billones]}}{\text{ml}}$$

- Si se cuentan el total de los 25 cuadrantes para mayor precisión el dato se remplazará por:

$$\# \text{ Total de levaduras en los 5 cuadros} * 5 = \text{Al total de levaduras en 25 cuadrantes}$$

6. Para el cálculo de viabilidad de levaduras nos guiamos bajo la siguiente ecuación:

### **Ecuación 3. Porcentaje de Viabilidad**

$$\frac{\# \text{ de Levaduras Vivas(transparentes)}}{\# \text{ de Levaduras Totales}} * 100 = \% \text{ de Viabilidad}$$

### **Ecuación 4. Número de células vivas**

$$\frac{\# \text{ de levaduras totales}}{\text{ml}} * \% \text{ de Viabilidad} = \frac{\# \text{ de celulas vivas[millon o billon]}}{\text{ml}}$$

**Nota:** El porcentaje de viabilidad debería ser superior al 90 % para poder usar en una nueva fermentación, si no se cuenta con la Viabilidad adecuada es recomendable realizar un Starter.



### **3.7.4. Procedimiento para desarrollar un Starter en la elaboración de 40 a 50 litros de cerveza**

#### **I. Requerimiento de Material (Anexo 4)**

- Agitador Magnético
- Buzo Magnético
- Matraz Erlenmeyer de 5000 ml
- Probeta de vidrio de 100ml
- Frascos plásticos de 5000 ml

#### **II. Reactivos**

- Ácido Peracético
- Agua destilada y estéril
- Mosto en sobre o Mosto recolectado.
- Nutriente de levaduras a base de Zinc.

#### **III. Procedimiento**

##### **1. PREPARACIÓN DEL MOSTO**

##### **i. Partiendo de un sobre de extracto de mosto**

- Preparar el mosto en el Erlenmeyer según datos de preparación del producto adquirido.
- Generalmente sugieren 100g del extracto en 1litro de agua

##### **ii. Partiendo del mosto recolectado de una producción de cerveza liviana de baja densidad.**

- Retirar mosto en los frascos plásticos de 5000ml de una producción anterior de cerveza liviana. (Tipo Ale)
- O en otro caso preparar malta y cebada para elaborar mosto en cantidades de 5 litros.

2. Densidad adecuada del mosto debe ser entre 1,3 y 1,4 g/ml

3. Pasar 3000ml de mosto preparado al matraz Erlenmeyer de 5000ml.

4. Introducir el nutriente a base de Zinc bajo dosificación del producto [gramos por litro].

5. Tapar el matraz con papel aluminio

6. Hervir para sanitizar el mosto durante 20 a 30 min ebullición

**Nota:** A partir de este punto es importante la asepsia en el procedimiento

7. Enfriar en baño de agua fría y alcanzar una temperatura de 20 a 25°C

**Nota:** El Starter debe partir de entre 10 y 30 millones de levaduras/ml introducidos a los 3000ml de mosto en el matraz.

8. Calculamos la cantidad de levadura a introducir al mosto.

- i. Colectamos el dato del V paso de recuento de levaduras en la recuperación del barro de levaduras e introducimos a la nueva ecuación.

#### **Ecuación 4. Número de células vivas**

$$\frac{\# \text{ de levaduras totales}}{\text{ml}} * \% \text{ de Viabilidad} = \frac{\# \text{ de celulas vivas} [\text{millon o billon}]}{\text{ml}}$$

- ii. Para tener 30 millones de levaduras introducidas al mosto partiremos del mismo dato.

#### **Ecuación 5. Número de células Requeridas para el Starter**

$$\frac{30 \text{ millones de levaduras}}{\text{ml}} * 3000\text{ml} = \# \text{ levaduras requeridas para el Starter}$$

#### **Ecuación 6. Cantidad en ml de la levadura recuperada**

$$\# \text{ levaduras requeridas (Starter)} * \frac{\text{ml}}{\# \text{ de levaduras totales}} = \text{ml de levaduras recuperadas}$$

9. Medir con la probeta (previamente lavada y desinfectada bajo protocolo de esterilización química), la cantidad de levadura recuperada resultante del ejercicio.
10. Introducimos el bazo (previamente esterilizado bajo protocolo de esterilización química).
11. Tapamos inmediatamente con el mismo tapón de papel aluminio usado en la cocción del mosto.
12. Ponemos en el agitador magnético el matraz y comenzamos con la agitación.

13. Regular la cantidad de rpm hasta que el vórtice o remolino llegue al buzo.
14. Esperamos 24 hrs de Starter si las levaduras son frescas o hasta 48 hrs si las levaduras son guardadas mucho tiempo o en su caso a punto de caducar.
15. Hacer el recuento microscópico bajo procedimiento de Recuento de Levaduras.

**Nota:** Para el paso XIV, otra manera de observar la conclusión del Starter, es por la coloración de la preparación dentro del matraz (ANEXO 4, figura 32), Primeramente, presentara una coloración Café por el mosto, pero cuando ya haya concluido el proceso el matraz presentara una coloración Crema por la cantidad propagada de levaduras.

**3.7.5. Procedimiento para el cálculo de requerimiento de levaduras en la inoculación de cualquier estilo de cerveza y el cálculo final de requerimiento en ml de levaduras a partir del barro recuperado en los fermentadores.**

**I. Requerimiento de Material (Anexo 5)**

- Balanza de precisión

**II. Reactivos**

- Levaduras

**III. Procedimiento**

**1. Procedimiento de cálculo para el requerimiento de levaduras o Tasa de inoculación para elaborar cerveza (Método de la Ecuación del Pitch Rate)**

- i. Ecuación de Pitch Rate

**Ecuación 7. Ecuación de Pitch Rate**

$$\text{Pitch Rate} * V.\text{Mosto}[ml] * \text{Densidad } (^\circ P) = \text{Tasa de inoculación [millones o billones]}$$

**Datos:**

**Pitch Rate:** Seleccionar dato según el estilo de cerveza a preparar.

**Densidad:** Densidad de mosto en grados plato según estilo de cerveza

**V. Mosto:** Volumen de Mosto en ml a preparar.

**Tasa de Inoculación:** Cantidad de levaduras requeridas para inocular en la fermentación a ese volumen y estilo.

- ii. Tabla de Pitch Rate según estilo de Cerveza

**Tabla 3. Pitch Rate según estilo de Cerveza**

<b>PITCH RATE RECOMENDADOS</b>	
<b>PITCH RATE</b>	<b>TIPO DE CERVEZA</b>
<b>0.35</b>	<b>Para tipo Ale de baja densidad menor a 1.050</b>
<b>0.75</b>	<b>Ales hasta 1,060 de densidad</b>
<b>0.76 - 1.4</b>	<b>Ales mayores a 1,060 de densidad</b>
<b>1.5</b>	<b>Para tipo Lager 1.070 de densidad</b>
<b>2.02</b>	<b>Para lager de alta densidad mayor a 1.070</b>

## 2. Procedimiento de cálculo para el requerimiento de levaduras o Tasa de inoculación para elaborar cerveza (Método de la Ecuación del Pitch Rate)

- iii. Con los resultados de la ecuación (7) y la ecuación (4) realizamos un factor de conversión para determinar la cantidad de ml para la inoculación en la fermentación de la nueva cerveza.

### Ecuación 8. Determinación de volumen de levaduras recuperadas a inocular en la fermentación

$$T.S. [millon o billon] * \frac{ml}{\# C.V. [millon o billon]} = V [ml]$$

#### Datos:

**T.S.** = resultado de Tasa de inoculación en ecuación 7.

**# C.V.** = resultado de Número de células vivas en ecuación 4.

**V** = Volumen a extraer de frascos de levadura recuperadas.

### 3.7.6. CONSIDERACIONES GENERALES

- Se debe tener en cuenta que todo el proceso diseñado debe realizarse después de los 14 días de fermentado y madurado de la cerveza en el fermentador.

## CAPITULO V: CONCLUSIONES

### 4.1. Conclusiones

Se obtuvo datos acordes al procedimiento de investigación de acuerdo a las necesidades de la empresa.

Se diseñó un procedimiento aséptico en el muestreo de levaduras en fermentadores de 500lt, para su análisis microbiológico y concretar la ausencia o presencia de microorganismos dañinos a la reutilización de levaduras y su siguiente fermentación.

Se creó el procedimiento para el lavado y acondicionamiento del barro de levaduras extraídos del fermentador.

Se adaptó un procedimiento para el recuento de levaduras al método de cuantificación por Cámara Neubauer y cálculo de viabilidad.

Se diseñó un procedimiento para desarrollar un Starter.

Se diseñó un procedimiento para el cálculo de requerimiento de levaduras en la inoculación de cualquier estilo de cerveza y el cálculo final de requerimiento en ml de levaduras a partir del barro recuperado en los fermentadores.

En general se implementó el diseño de procedimientos de reutilización de levaduras *S. Cerevisiae* para la ejecución en un segundo proceso fermentativo de la cerveza en producciones mínimas elaboradas en la cervecería artesanal Niebla Brewing Company Srl.

## BIBLIOGRAFIA

- Altamirano, C. (2013). *Optimización de un Método para la Producción de Biomasa de Saccharomyces cerevisiae empleada en la etapa de Fermentación del Mosto de Cerveza, desde un nivel de Laboratorio a un nivel Piloto*. Universidad Nacional de San Marcos.
- Aráoz, J., Cárdenas, G., Ruiz, M., & Gusils, C. (2016). ANÁLISIS COMPARATIVO DE COLORANTES VITALES EN EL ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE LEVADURAS. *Rev. Ind. y Agríc. de Tucumán Tomo, 93(1)*, 39–42.
- Boulton, Chris., & Quain, David. (2001). *Brewing yeast and fermentation*. Blackwell Science.
- Brown, C., Campbell, F., & Priest, G. (1989). *INTRODUCCIÓN A LA BIOTECNOLOGIA* (E. S. A. Acribia, Ed.; ilustrada).
- Cabeza, E. (n.d.). *Cultivos Estárter: Seguridad, funcionalidad y propiedades tecnológicas*.
- Compton, J. (1977). *El cervecero en la práctica* (Madison, Ed.; 2da ed.).
- de Clerck, J. (1957). *A TEXTBOOK OF BREWING* (Chapman & Hall, Ed.; b, Vol. 2).
- FDA. (2013). *MÉTODOS DE LABORATORIO (ALIMENTOS)*.  
<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>
- FOODLAB. (n.d.). *Determinación de la vitalidad de las levaduras*. Quality Control System for Food and Beverage.
- Freixis, S., & Punsola, A. (2014). *EL MUNDO DE LA CERVEZA ARTESANAL* (Larousse, Ed.; 4ta ed.).
- Gonzales, B. (2015). *Brewing Science & Technology*. UNALM.
- Leroy, F., & de Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology, 15(2)*, 67–78.  
<https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2003.09.004>

- Paul Ross, R., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1–2), 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00174-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00174-5)
- Pilla, S., & Vinci, G. (2012). *Cervezas de todo el mundo ENCICLOPEDIA PRÁCTICA* (S. A. de Vecchi Ediciones, Ed.; 1ra ed.).
- RAE. (2001). *Definición de cerveza*. <https://www.rae.es/drae2001/cerveza>
- Stewart, G., & Russell, I. (1998). *Brewing Science & Technology* (The Institute of Brewing And Distilling, Ed.; 2da ed.).
- Tamayo, K. T., & de Ciencias, F. (2015). *UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA “EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD COMO STARTER DE *Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis* PARA LA PRODUCCIÓN DE CERVEZA TIPO LAGER.”*
- Wolfgang, K. (2006). *TECNOLOGÍA PARA CERVECEROS Y MALTEROS* (Wesrkreuz-Druckerei Ahrens KG, Ed.; Primera, Vol. 1).



## ANEXOS

### Anexo 1

**Figura 12. Frascos de vidrio esterilizados de 200ml**



**Figura 13. Balanza Analítica**



**Figura 14. Mangueras de conexión para el fermentador**



**Figura 15. Atomizador de gatillo industrial**



**Figura 16. Caja de transporte de muestras biológicas**



**Figura 17. Ácido Peracético**



**Figura 18. Soda Caustica**



## Anexo 2

**Figura 19. 10 frascos de vidrio esterilizables graduados de 1000ml (esterilizados)**



**Figura 20. Refrigerador ultra freezer**



## Anexo 3

**Figura 21. Microscopio binocular de un objetivo de 40x y ocular de 10 aumento para llegar a 400x.**



### Microscopio Binocular Euromex MicroBlue 40-400x

Marca: Euromex

- Microscopio binocular con tubo porta-ocular inclinado 45°. Ocular gran angular WF 10x/18 mm. Revólver porta-objetivos cuádruple. Objetivos acromáticos 4x/0.10, 10x/0.25 y S40x/0.65. Enfoque coaxial macro y micrométrico. Platina mecánica integrada de 115 x 100 mm con desplazamiento en los ejes X e Y de 55 x 20 mm. Condensador Abbe A.N. 1.25 de altura regulable Batería interna recargable.
- Producto: Microscopio Binocular MicroBlue 40-400x
- Recubrimientos: Tratamientos anti-Hongos y anti-reflexivos
- Accesorios (Incluidos): Adaptador de corriente (cargador) Funda protectora Manual de usuario Filtro neutro
- Cabezal de objetivos: Revólver para 4 Objetivos

#### Especificaciones para este producto

EAN	8436541512849
Nombre de la marca	Euromex
Número de pieza	MB1052

**Figura 22. Cámara de Neubauer de 0,100 mm de profundidad y un área de 0,0025mm<sup>2</sup>.**




**Figura 23. Pipeta de 1ml**



**Figura 24. Pipeta de 10ml**



**Figura 25. Tubos cónicos de 15ml con tapón rosca, graduado y gradilla.**



Pasa el mouse encima de la imagen para aplicar zoom

Especificaciones para este producto

Capacidad	15.0 mililitros
Clasificación de temperatura superior	121.00 degrees_celsius
Color de marcado	white
Código UNSPSC	41000000
Diámetro externo	0.59 pulgadas
Especificación cumplida	
Intervalo de graduación	0.5 mililitros
Longitud	120 millimeters milímetros
Material	Plástico
Nombre de la marca	Buytra
Número de artículos	30
Número de pieza	CA-SH-BI-121-A2
Tipo de tapa	Screw Cap
Volumen del artículo	50.00 mililitros

[^ Ve menos](#)

## Anexo 4

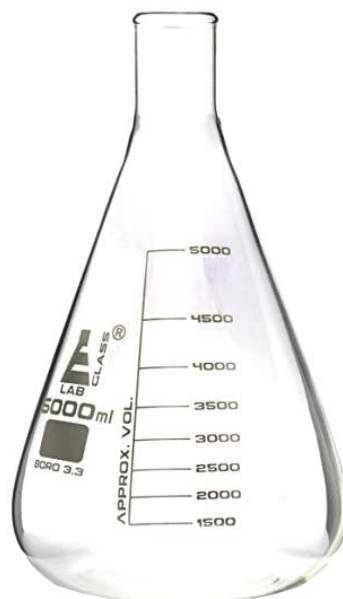
Figura 26. Agitador Magnético



Figura 27. Buzo Magnético



Figura 28. Matraz Erlenmeyer de 5000 ml



**Figura 29. Probeta de vidrio de 100ml**



**Figura 30. Frascos plásticos de 5000 ml**



**Figura 31. Nutrientes de levadura**



Lallemand  
*Servomyces: nutriente de levadura - 10g*

9,24 € IVA inc.

Acumula 28 Puntos Cocinista con este artículo

1

Ref.: 14099

Completa tu compra ahora y recíbelo **mañana Jueves** (entregas en Península)

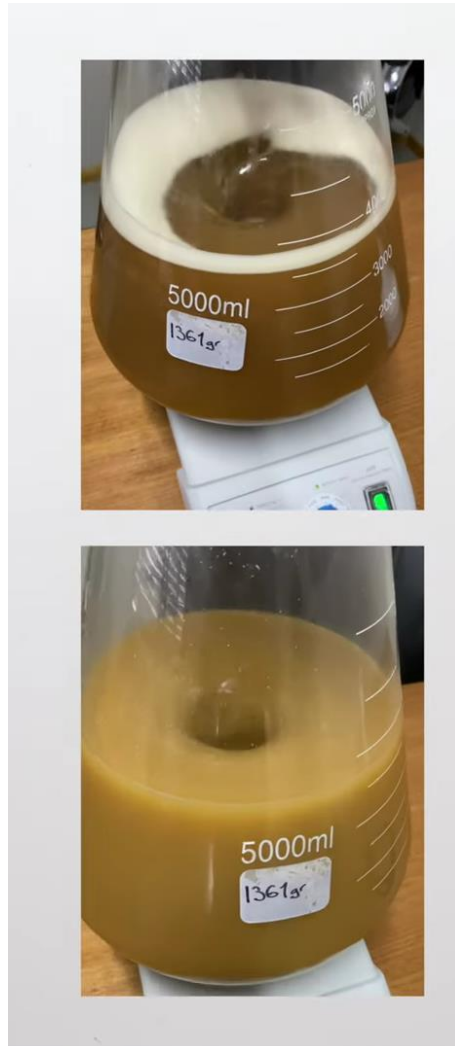
Este nutriente de levadura es una sustancia biológica natural, sin aditivos, que mejora el rendimiento de nuestra levadura aumentando la atenuación. Acorta los tiempos de fermentación, aumenta el nivel de floculación dando lugar a cervezas más claras y reduce notablemente los posibles aromas a azufre que se generan en algunas cervezas.

El modo de utilizar este nutriente para levaduras es agregandolo a la olla 10 minutos antes de que finalice la ebullición, sin embargo si su receta no requiere hervir, debe agregar el nutriente al mosto ante de agregar la levadura.

La dosis es de 1g por 100 litros de mosto para la fermentación.



**Figura 32. Observación a la conclusión del Starter, por coloración de la preparación dentro del matraz**



## Anexo 5

Figura 33. Balanza de Precisión

