

EVALUACIÓN DE LA REUTILIZACIÓN DE LEVADURA *SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE* PARA LA IMPLEMENTACIÓN EN UN SEGUNDO PROCESO  
FERMENTATIVO DE LA CERVEZA TIPO PALE ALE BELGA PRODUCIDA EN LA  
CERVECERÍA MOONSHINE

EDSON LEONARDO CRUZ DAZA

LINA MARIA MEYER SANCHEZ

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA

FACULTAD DE INGENIERÍAS

PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA

BOGOTÁ D.C.

2019

EVALUACIÓN DE LA REUTILIZACIÓN DE LEVADURA *SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE* PARA LA IMPLEMENTACIÓN EN UN SEGUNDO PROCESO  
FERMENTATIVO DE LA CERVEZA TIPO PALE ALE BELGA PRODUCIDA EN LA  
CERVECERÍA MOONSHINE

EDSON LEONARDO CRUZ DAZA

LINA MARIA MEYER SANCHEZ

Proyecto integral de grado para optar por al título de  
INGENIERO QUIMICO

Director

JULIAN BECERRA

Ingeniero Químico

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA

FACULTAD DE INGENIERÍAS

PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA

BOGOTÁ D.C.

2019

Nota de Aceptación

---

---

---

---

---

---

Ingeniero Felipe Correa Mahecha  
Jurado 1

---

Microbióloga Adriana Inés Páez Morales  
Jurado 2

Bogotá D.C, Agosto 2019

## **DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD**

Presidente Institucional y Rector del Claustro

**Dr. MARIO POSADA GARCIA PEÑA**

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

**Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA**

Vicerrectora Académica y de Posgrados

**Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS**

Decano de la Facultad de Ingenierías

**Ing. JULIO CÉSAR FUENTES ARISMENDI**

Director Programa Ingeniería Química

**Dr. LEONARDO DE JESÚS HERRERA GUTIÉRREZ**

Las directivas de la Fundación Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

## DEDICATORIA

A Dios por el mejor regalo que tengo en mi vida, que es mi familia, por las bendiciones dadas a lo largo de este camino. Por brindarme las fuerzas necesarias para continuar cuando lo necesitaba, por darme la oportunidad de cruzarme en el camino con personas que aportaron a mi vida conocimiento, apoyo y felicidad. Por el don de amor tan grande que me regalaste.

*“Yo te instruiré y te guiaré por el mejor camino para tu vida; y te aconsejaré y velaré por ti” - Salmo 32:8*

A mi Mami, por su amor, trabajo y sacrificio todos estos años; gracias a ella he logrado llegar hasta acá. Por ser ejemplo de inspiración, fortaleza y dedicación. Por siempre estar a mi lado brindándome su mano amiga, sus sabios consejos y ante todo su amor incondicional. Por enseñarme que cualquier cosa que me proponga la lograré con la ayuda de Dios. Gracias por el ánimo brindado todas esas noches interminables a lo largo de la carrera y, por la caminar a la par conmigo a lo largo de esta experiencia. Le dedico este logro con todo el amor del mundo, porque gracias a ella soy quien soy hoy en día.

***Me siento muy orgullosa de ti. Te amo mami.***

A mi abuelita, Tatis, por su amor incondicional, por estar conmigo siempre ayudándome a ser mejor en lo que me propongo y realizo. Por enseñarme a ser una mujer fuerte, por ser mi segunda mamá y por su apoyo incondicional.

***Eres una bendición en mi vida Tatis.***

A mi hermanita, Mariana, por ser el regalo más lindo de mi vida, por llegar cuando menos lo esperaba para alegrar mis días con sus ocurrencias e historias, por inspirarme a ser mejor cada día y ser un ejemplo para ti.

***Gracias por pintar mi mundo con miles de colores Mary.***

A mi papá, por siempre tener un consejo sabio que brindarme.

***Te amo.***

A mis primos y tíos, por siempre creer en mí, por apoyarme en cada paso que doy, por aconsejarme e inspirarme a seguir y, a ser mejor en este largo camino.

***Los amo.***

A mi compañero de tesis, Leonardo, por ser una persona incondicional en mi vida, por acompañarme desde los inicios de este recorrido hasta trabajar juntos para obtener este logro. Por ser un buen equipo de trabajo, por brindarme sus conocimientos y, su amistad. Por las aventuras vividas en este proceso. Por inspirarme a siempre soñar alto y lograr lo que me proponga. Por ayudarme a ser mejor persona y mejor ingeniera.

***¡Lo logramos!***

También dedico este logro a mis amigos, *Andrés Jaime, Andrea Pedraza, Paula Espinoza, Laura Leal y Juliana Narváez*. Esto también es de ustedes, y estaré muy orgullosa cuando culminen esta etapa. Gracias por el amor brindado, por su sincera amistad, por su apoyo incondicional y por las largas conversaciones llenas de risas, consejos, lágrimas y demás. Me siento muy feliz de contar con personas como ustedes. Gracias por las enseñanzas brindadas a lo largo de este camino.

***Por siempre en mi corazón.***

***Lina Meyer***

## DEDICATORIA

*El esfuerzo puesto en el desarrollo de esta investigación y de igual forma la dedicación a lo largo de mi proceso de formación se lo dedico a mis padres María Nelly Daza Fuentes y Saul Cruz Herrera por brindarme todo su cariño y apoyo incondicional a lo largo de mi proceso de formación como ser humano e ingeniero, me han enseñado a lo largo de la vida los valores más importantes que cada uno de nosotros debemos tener para ser personas integrales. Gracias por ser los pilares más importantes en mi vida y quiero que sepan que todo el esfuerzo tendrá su recompensa, ustedes son mi motivación y mi motor para salir adelante en esta vida que algunas veces tiene sus altibajos, por ende, trabajare en pro a que se sientan orgullosos de cada logro que alcance a lo largo de mi trayecto. Si bien no se los digo todos los días, los amo con todo mi corazón.*

*De igual forma quiero dedicar este trabajo de grado a mi hermano Daniel Alejandro Cruz Daza por estar conmigo siempre y ser mi confidente en todos los aspectos de mi vida, por estar siempre acompañándome mientras me encontraba realizando trabajos o estudiando para alguna materia. Si bien aún estas pequeño y te falta toda una vida por delante, te admiro por ser una persona íntegra e inteligente, sé que serás un excelente profesional y trabajare día a día para ayudarte a cumplir de igual forma como lo hice yo, el sueño de ser un gran ingeniero. Siempre estaré ahí para colaborarte, apoyarte y brindarte mi compañía. ¡Te amo bro!*

*También dedico este trabajo de grado a mi gran compañera de aventuras, mi gran confidente a lo largo de la universidad y mi compañera de tesis Lina María Meyer Sánchez, Gracias por ser la persona que me brindo apoyo en los momentos que más lo necesite. Gracias por darme ánimo y motivarme día a día a ser mejor persona. Gracias por nunca dudar de mis capacidades y siempre corregirme cuando actuaba de manera incorrecta. Fueron 5 años de sonrisas, de estrés, de peleas, ¡pero míranos hoy!, estamos culminando una etapa que nos cambió la vida y nos transformó en personas integrales y preparadas para servir a la sociedad. Como siempre lo hablamos, el día en que obtengamos nuestro reconocimiento por culminar esta bella carrera diremos... ¡Lo logramos!*

**Leonardo**

## **AGRADECIMIENTOS**

Queremos agradecer en primera medida a Dios por su amor y bondad que no tienen fin, permitiéndonos salir adelante con todos nuestros logros que son resultados de su ayuda constante. Por cada momento vivido durante estos 5 años de carrera, por la oportunidad de corregir los errores y brindarnos la oportunidad de ser mejor personas e ingenieros en esta etapa tan importante para nuestras vidas.

A nuestras familias, por todo el apoyo brindado a lo largo de nuestras vidas y en especial durante el desarrollo de este proyecto de grado. Son el motor de nuestras vidas, los que nos motivan a ser mejores personas, ingenieros y, ante todo, marcar la diferencia en lo que nos proponemos y, por apoyarnos en cada una de las metas y proyectos que nos hemos propuesto.

A la cervecería Moonshine y al ingeniero Julián Becerra, por abrirnos las puertas de su empresa y darnos la oportunidad de trabajar con ellos, brindándonos las herramientas necesarias y los conocimientos justos para llevar a cabo nuestro proyecto de grado.

A los profesores Diana Morales y Fernando Moreno, por los consejos, sugerencias y correcciones que nos hicieron a lo largo del desarrollo del proyecto, ya que sin ellos no hubiera sido posible este proyecto de grado.

A la Fundación Universidad de América, el departamento de Ingeniería Química y los profesores que nos brindaron su conocimiento a lo largo de los 5 años de carrera.

Al maestro cervecero Oscar Martínez, por apoyar nuestro proyecto de grado y por brindarnos su conocimiento en cuanto a las pruebas organolépticas.

## CONTENIDO

	pág.
<b>RESUMEN</b>	<b>26</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
<b>1. MARCO TEORICO</b>	<b>29</b>
1.1 ORÍGENES DE LA ELABORACIÓN DE LA CERVEZA	29
1.2 DEFICION DE CERVEZA	32
1.3 CLASIFICACION DE LAS CERVEZAS	32
1.3.1 Clasificación por su fermentación	33
1.3.1.1 Cervezas de fermentación Alta o tipo Ale	.33
1.3.1.2 Cervezas de fermentación baja o tipo Lager	33
1.3.1.3 Cervezas de fermentación espontánea	34
1.4 PROCESO DE ELABORACION DE CERVEZA TIPO ALE	34
1.4.1 Materias Primas	34
1.4.1.1 El Agua	35
1.4.1.2 La Levadura	35
1.4.1.3 La Malta	36
1.4.1.4 El lúpulo	36
1.4.2 Etapas de elaboración	37
1.4.2.1 Elaboración de la malta	37
1.4.2.2 Elaboración del mosto	39
1.4.2.3 Fermentación y maduración	.41
1.4.2.4 Bioquímica de la fermentación alcohólica	42
1.4.2.5 Filtración, envasado y almacenamiento	45
1.5 CERVEZA ARTESANAL	45
1.5.1 Mercado de la cerveza artesanal en Colombia	46
1.6 GENERALIDADES DE LA LEVADURA	47
1.6.1 Levadura	.47
1.6.1.1 Levaduras del género <i>Saccharomyces</i> ...	51
1.6.1.2 Levaduras del género <i>Saccharomyses Cerevisiae</i>	52
1.6.1.3 Concepto de cultivo Puro	54
1.6.1.5 Cultivo Starter	55
1.6.1.6 Propagación de Cultivo Puro de levaduras	56
1.6.1.7 Subcultivos o “Re-pitching” en las cervecerías	62
1.6.1.8 Metabolismo de la levadura en el mosto	63
1.6.1.9 Factores que influyen en la bioquímica de la Fermentación	63
1.6.1.10 Compuestos excretados por la levadura, que componen la cerveza	66
1.6.1.11 Estabilidad de cultivos de levadura en cervecería	67
1.7 CARACTERISTICAS INDUSTRIALES DE LA LEVADURA CERVECERA	69
1.8 PROCESOS ANOMALOS QUE SUFREN LAS LEVADURAS EN CERVECERIA	71
<b>2. METODOLOGÍA</b>	<b>73</b>

2.1 CERVEZA ARTESANAL: ELABORACIÓN DE CERVEZA TIPO PALE ALE BELGA EN LA CERVECERÍA MOONSHINE	73
2.2 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA PALE ALE BELGA FABRICADA EN LA MICROCERVECERÍA MOONSHINE	73
2.2.1 Recepción de la materia prima	74
2.2.2 Elaboración del mosto	77
2.2.3 Reutilización de la Levadura	.89
2.2.3.1 Ubicación de la etapa experimental	.89
2.2.3.2 Materiales y Equipos	89
2.2.3.3 Obtención y Preparación de la muestra	90
2.2.3.4 Toma de muestras	92
2.2.3.5 Acondicionamiento de la levadura a trabajar: Lavado	93
2.2.3.6 Metodología de los análisis.	94
2.2.3.7 Determinación de la viabilidad	101
2.2.3.8 Preparación de Stater	104
2.2.4 Fermentación de la cerveza tipo Pale Ale Belga	111
2.2.5 Metodología de análisis de Vitalidad en la levadura recuperada	114
2.2.6 Carbonatación y Envasado de la cerveza	117
<b>3.RESULTADOS Y ANALISIS</b>	<b>121</b>
3.1 ANALISIS MICROBIOLÓGICOS DE LA LEVADURA REUTILIZADA	121
3.1.1 Análisis de resultados de microorganismos deteriorantes potenciales de la levadura para un próximo proceso fermentativo	125
3.1.2 Presencia de coliformes en las muestras de levadura	126
3.2 VIABILIDAD CELULAR	128
3.2.1 Viabilidad de la levadura extraída del tanque fermentador	130
3.2.2 Viabilidad de la levadura en la etapa de propagación	132
3.3 VITALIDAD CELULAR Y PRUEBAS FÍSICOQUÍMICAS DE LA CERVEZA	139
3.3.1 pH	140
3.3.2 Grados Brix	143
3.3.3 Densidad	145
3.3.4 Grado de Alcohol	148
3.4 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS DE LA CERVEZA	153
3.5 PRUEBAS ORGANOLEPTICAS DE LA CERVEZA	157
3.6 TABLAS COMPARATIVAS DE RESULTADOS	162
<b>4. ANALISIS DE COSTOS PARA LA REUTILIZACIÓN DE LA LEVADURA A ESCALA INDUSTRIAL EN LA MICROCERVECERÍA MOONSHINE</b>	<b>165</b>
4.1 COSTOS DE MATERIAS PRIMAS SIN TENER EN CUENTA LA REUTILIZACIÓN	166
4.2 COSTOS DE MATERIAS PRIMAS TENIENDO EN CUENTA LA REUTILIZACIÓN DE LEVADURA	170
4.3 MANO DE OBRA REQUERIDA Y EQUIPOS NECESARIOS PARA REALIZAR EL PROCESO DE RE-PITCHING	173

4.4 DEPRECIACION DEL EQUIPO REQUERIDO PARA REALIZAR EL RE-PITCHING	176
4.5 CONSUMO ENERGETICO DE LOS EQUIPOS USADOS EN EL PROCESO DE REUTILIZACIÓN	178
4.6 ANÁLISIS DE LABORATORIOS REQUERIDOS PARA CERTIFICAR QUE LA MUESTRA ESTÉ LIBRE DE CONTAMINANTES	179
<b>5.CONCLUSIONES</b>	<b>181</b>
<b>6.RECOMENDACIONES</b>	<b>183</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>184</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>193</b>

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Diagrama de flujo de elaboración de malta en una maltería	39
<b>Figura 2.</b> Diagrama de flujo de elaboración de cerveza en una cervecería	40
<b>Figura 3.</b> Esquema de la fermentación alcohólica, según Embden-Meyerhof-Parnas	42
<b>Figura 4.</b> Esquema de diversas formas de levadura.	47
<b>Figura 5.</b> Esquema de proceso de gemación de levaduras.	48
<b>Figura 6.</b> Esquema del ciclo de vida de la levadura <i>S. cerevisiae</i>	.49
<b>Figura 7.</b> Típico tanque de propagación de cultivos puros de levaduras	57
<b>Figura 8.</b> Preparación de cultivos Starters.	.59
<b>Figura 9.</b> Balón de Carlsberg	60
<b>Figura 10.</b> Flujo para la propagación en laboratorio de levadura cervecera.	.61
<b>Figura 11.</b> Degradación del almidón durante la maceración.	81
<b>Figura 12.</b> Rangos de temperatura de acción de las principales enzimas durante la maceración.	82
<b>Figura 13.</b> Ubicación de la planta cervecera en la ciudad de Bogotá D.C.	89
<b>Figura 14.</b> Ubicación de CEDIMI.	95
<b>Figura 15.</b> Instalaciones del CEDIMI	95
<b>Figura 16.</b> Cuadrante de la cámara de Neubauer con células vivas y células muertas	103
<b>Figura 17.</b> Estructura de la calculadora de inóculo y propagación de levadura, para determinar la cantidad apropiada en cada paso del crecimiento del starter.	105
<b>Figura 18.</b> Características de mosto a fermentar para realizar la fermentación a escala banco.	. 106
<b>Figura 19.</b> Características de levadura recuperada del tanque fermentador.	108
<b>Figura 20.</b> Inoculación de levadura para la reutilización.	.109
<b>Figura 21.</b> Número de pasos para reutilizar la propagación de la levadura a reutilizar.	110
<b>Figura 22.</b> Método de propagación del a levadura a fermentar.	111
<b>Figura 23.</b> Morfología 1, Colonias redondas, cremosas, blancas, Bacilos Gram Negativos correspondientes a <i>Escherichia coli</i>	123
<b>Figura 24.</b> Morfología 2. Colonias redondas, cremosas, blancas. Bacilos Gram Negativos correspondientes a <i>Citrobacter Kosseri</i> .	123
<b>Figura 25.</b> Tipos de bacterias que pueden afectar la levadura recuperada del tanque fermentador.	126
<b>Figura 26.</b> Manera de realizar las disoluciones.	130
<b>Figura 27.</b> Tanque de fermentación cilindro-cónico en la producción de cerveza.	135
<b>Figura 28.</b> Cepas de levadura formadas en un tanque fermentador.	136
<b>Figura 29.</b> Ubicación del laboratorio.	154
<b>Figura 30.</b> Instalaciones de NULAB LTDA.	.154
<b>Figura 31.</b> Cantidad teórica de levadura recuperada requerida para la elaboración de un lote de cerveza de 400 litros en la cervecería Moonshine	174

<b>Figura 32.</b> Propagaciones requeridas para la elaboración de un lote de cerveza de 400 litros en la cervecería Moonshine.	174
<b>Figura 33.</b> Equipo de propagación de levaduras.	176

## LISTA DE TABLAS

	pág
<b>Tabla 1.</b> Claves para evaluar a las especies del genero <i>Saccharomyces</i>	51
<b>Tabla 2.</b> Crecimiento de la <i>S.cerevisiae</i> sobre diferentes fuentes de carbono.	53
<b>Tabla 3.</b> Clasificación taxonómica <i>S. cerevisiae</i> .	54
<b>Tabla 4.</b> Vólumenes de propagación en laboratorio.	.59
<b>Tabla 5.</b> Lapso de tiempo en los cuales son agregados las adiciones al mosto.	83
<b>Tabla 6.</b> Ingredientes y cantidades para realizar la carbonatación artesanal.	118
<b>Tabla 7.</b> Resultados del primer análisis microbiológico a la levadura recuperada el día 09 de febrero. ....	122
<b>Tabla 8.</b> Resultados del segundo muestreo de levadura correspondiente al 04 de marzo de 2019.	124
<b>Tabla 9.</b> Resultados del tercer muestreo de levadura correspondiente al 15 de marzo 2019.	124
<b>Tabla 10.</b> Resultados del cuarto muestreo de levadura correspondiente al 15 de marzo de 2019.	124
<b>Tabla 11.</b> Volumen en ml de mosto usado para cada fase de propagación en el laboratorio.	129
<b>Tabla 12.</b> Recuento de células viables en la primera fase	130
<b>Tabla 13.</b> Concentración y viabilidad de cada fase de propagación del experimento 1.	133
<b>Tabla 14.</b> Concentración y viabilidad final de cada fase de propagación del experimento 2.	133
<b>Tabla 15.</b> Valores de pH	.140
<b>Tabla 16.</b> Valores de Grados Brix	143
<b>Tabla 17.</b> Valores de Densidad.	146
<b>Tabla 18.</b> Índice de refracción a diferentes concentraciones de etanol.	151
<b>Tabla 19.</b> Grado de alcohol después de la maduración.	152
<b>Tabla 20.</b> Resultados de los análisis microbiológicos de las cervezas fermentadas con la levadura reutilizada.	155
<b>Tabla 21.</b> Descriptores organolépticos que pueden estar presentes en la cerveza	158
<b>Tabla 22.</b> Parámetros de calificación.	159
<b>Tabla 23.</b> Análisis organolépticos realizados por Oscar Martinez.	.159
<b>Tabla 24.</b> Análisis sensorial	.161
<b>Tabla 25.</b> Comparación de parámetros fisicoquímicos.	162
<b>Tabla 26.</b> Comparación de parámetros organolépticos.	163
<b>Tabla 27.</b> Precio por kilogramo de cada una de las maltas empleadas en el proceso	167
<b>Tabla 28.</b> Cantidades de malta usadas para producir 400L de cerveza y su respectivo costo.	167
<b>Tabla 29.</b> Costo correspondiente a uso de agua para la producción de la cerveza Pale Ale Belga en la cervecería Moonshine.	168
<b>Tabla 30.</b> Costo de adiciones de lúpulo, clarificante, potenciadores de olor, sabor y, levadura.	.....

168 <b>Tabla 31.</b> Adiciones empleadas en la etapa de cocción del mosto y sus respectivas cantidades.	169
<b>Tabla 32.</b> Costo de producción por lote sin emplear el proceso de re-pitching.	169
<b>Tabla 33.</b> Costo de producción por lote empleando el proceso de re-pitching	170
<b>Tabla 34.</b> Costo de la producción en la reutilización de cerveza anualmente sin contemplar la reutilización.	171
<b>Tabla 35.</b> Costo de la producción en la reutilización de cerveza anualmente contemplando la reutilización.	171
<b>Tabla 36.</b> Especificaciones que pueden modificar el valor del equipo requerido para la propagación.	175
<b>Tabla 37.</b> Depreciación del equipo de propagación de levadura a lo largo de su vida útil de acuerdo al método de línea recta	177
<b>Tabla 38.</b> Costo energético	179
<b>Tabla 39.</b> Costo de análisis microbiológicos requeridos para evaluar la calidad de la levadura.	180

## LISTA DE CUADROS

	pág.
<b>Cuadro 1.</b> Tipos de maltas usadas en la elaboración de cerveza tipo Pale Ale Belga	74
<b>Cuadro 2.</b> Lúpulos usados para la preparación de la cerveza	76
<b>Cuadro 3.</b> Levadura usada en la etapa fermentativa.	76
<b>Cuadro 4.</b> Adiciones al mosto para dar sabor y olor a la cerveza tipo Pale Ale Belga.	77

## LISTA DE FOTOGRAFIAS

	pág.
<b>Fotografía 1.</b> Maltas pesadas listas para la molienda.	78
<b>Fotografía 2.</b> Pesaje de la pimienta negra.	.78
<b>Fotografía 3.</b> Pesaje de semillas de mostaza.	78
<b>Fotografía 4.</b> Lúpulo pesado.	79
<b>Fotografía 5.</b> Molino cervecero.	79
<b>Fotografía 6.</b> Molino de café.	79
<b>Fotografía 7.</b> Ollas de maceración.	80
<b>Fotografía 8.</b> Mezclado de las maltas.	80
<b>Fotografía 9.</b> Agitación constante.	80
<b>Fotografía 10.</b> Residuos después de la maceración.	81
<b>Fotografía 11.</b> Adición del azúcar al mosto.	83
<b>Fotografía 12.</b> Adición de semillas de mostaza y pimienta negra.	84
<b>Fotografía 13.</b> Adición de lúpulo cascade al mosto.	84
<b>Fotografía 14.</b> Desechos de cocción del mosto.	84
<b>Fotografía 15.</b> Intercambiador de calor para enfriar el mosto.	88
<b>Fotografía 16.</b> Oxigenación del mosto antes de la fermentación.	88
<b>Fotografía 17.</b> Fermentación casera con mosto.	88
<b>Fotografía 18.</b> Tanque fermentador de donde se extrajo la levadura.	90
<b>Fotografía 19.</b> Recipientes utilizados con la levadura extraída.	91
<b>Fotografía 20.</b> Recipientes para almacenamiento y lavado de levadura.	91
<b>Fotografía 21.</b> Extracción de levadura recuperada del tanque fermentador.	92
<b>Fotografía 22.</b> Extracción de levadura recuperada del tanque fermentador.	92
<b>Fotografía 23.</b> Levadura recuperada.	92
<b>Fotografía 24.</b> Recipiente con agua esterilizada y levadura a lavar.	93
<b>Fotografía 25.</b> Mezcla de agua esterilizada y levadura.	93
<b>Fotografía 26.</b> Levadura y trub sedimentado.	94
<b>Fotografía 27.</b> Cámara de Neubauer.	101
<b>Fotografía 28.</b> Disoluciones para el recuento celular.	102
<b>Fotografía 29.</b> Montaje de la cámara neubauer en el microscopio.	103
<b>Fotografía 30.</b> Recipiente en donde se realizó la fermentación.	.112
<b>Fotografía 31.</b> Montaje final de los fermentadores.	113
<b>Fotografía 32.</b> Fermentación de la levadura.	113
<b>Fotografía 33.</b> Toma de muestra del fermentador.	.114
<b>Fotografía 34.</b> Toma de pH e.1	115
<b>Fotografía 35.</b> Toma de pH e.2	115
<b>Fotografía 36.</b> Toma de densidad e.1	116
<b>Fotografía 37.</b> Toma de densidad e.2	116
<b>Fotografía 38.</b> Toma de grados brix e.1	117
<b>Fotografía 39.</b> Toma de grados brix e.2	117
<b>Fotografía 40.</b> Azúcar y ácido ascórbico.	118
<b>Fotografía 41.</b> Mezcla lista para carbonatación.	118
<b>Fotografía 42.</b> Cerveza fermentada 1.	119

<b>Fotografía 43.</b> Cerveza fermentada 2.	119
<b>Fotografía 44.</b> Llenado de botellas.	119
<b>Fotografía 45.</b> Tapado de botellas.	120
<b>Fotografía 46.</b> Tapado de botellas	120
<b>Fotografía 47.</b> Muestras a analizar.	139

## LISTA DE ECUACIONES

	pág
<b>Ecuación 1.</b> Estimación de viabilidad celular.	103
<b>Ecuación 2.</b> Estimación del porcentaje de células muertas.	103
<b>Ecuación 3.</b> Estimación la concentración total de levaduras.	104
<b>Ecuación 4.</b> Cálculo de la viabilidad aproximada en la calculadora de inculo.	107
<b>Ecuación 5.</b> Cantidad de levadura estimada que se dispone inicialmente.	107
<b>Ecuación 6.</b> Cantidad de levadura necesaria para el inculo.	108
<b>Ecuación 7.</b> Atenuación.	145
<b>Ecuación 8.</b> Grados de Alcohol.	149
<b>Ecuación 9.</b> Ecuación en la linealización.	152
<b>Ecuación 10.</b> Determinación de la depreciación por el método de línea recta.	177

## LISTA DE GRAFICAS

	<b>pág.</b>
<b>Grafica 1.</b> Comportamiento del pH en los días de fermentación.	142
<b>Grafica 2.</b> Comportamiento de los grados Brix con el paso de los días de fermentación	144
<b>Grafica 3.</b> Comportamiento de la densidad durante la fermentación.	148
<b>Grafica 4.</b> Concentración de etanol vs indice de refracción	151

## LISTA DE DIAGRAMAS

	pág.
<b>Diagrama 1.</b> Determinación de Mohos y levaduras.	96
<b>Diagrama 2.</b> Determinación de <i>Lactobacillus sp</i> y <i>Pediococcus sp</i> .	98
<b>Diagrama 3.</b> Determinación de acetobacterias.	99

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
<b>Anexo A.</b> Especificaciones técnicas de la malta munich usada en el proceso de elaboración de la cerveza tipo pale ale belga.	. 194
<b>Anexo B.</b> Especificaciones técnicas de la malta 2rp usada en el proceso de elaboración de la cerveza tipo pale ale belga.	195
<b>Anexo C.</b> Especificaciones técnicas de la malta crystal usada en el proceso de elaboración de la cerveza tipo pale ale belga.	196
<b>Anexo D.</b> Especificaciones técnicas de la malta special belguim usada en el proceso de elaboración de la cerveza tipo pale ale belga.	197
<b>Anexo E.</b> Prueba microbiologica correspondiente a la primer toma de muestra de levadura en a cervecería monshine.	198
<b>Anexo F.</b> Prueba microbiologica correspondiente a la segunda toma de muestra de levadura en la cervecería moonshine.	.199
<b>Anexo G.</b> Prueba microbiologica correspondiente a la tercera toma de muestra de levadura en la cervecería moonshine.	200
<b>Anexo H.</b> Prueba microbiologica correspondiente a la cuarta toma de muestra de levadura en la cerveceria moonshine.	.201
<b>Anexo I.</b> Muestra de resultados de viabilidad para cada fase de propagación de levadura - experimento 1.	202
<b>Anexo J.</b> Muestra de resultados de viabilidad para cada fase de propagación de levadura - experimento 2.	209
<b>Anexo K.</b> Toma de meustra en los dias de fermentación.	. 215
<b>Anexo L.</b> Pruebas microbiologicas de la cerveza- experimento 1.	217
<b>Anexo M.</b> Pruebas microbiologicas de la cerveza - experimento 2.	218
<b>Anexo N.</b> Prueba organoleptica cerveza - experimento 1.	219
<b>Anexo O.</b> Prueba organolpeptica cerveza - experimento 2.	220
<b>Anexo P.</b> Prueba organoleptica cerveza moonshine.	221

## GLOSARIO

**ASTRINGENCIA:** la astringencia es una sensación en boca que se percibe mezcla de una sequedad intensa y amargor.

**ATENUACION:** porcentaje de azúcares totales que se convierten en alcohol y CO<sub>2</sub> durante el proceso completo de fermentación.

**CERVEZA TIPO ALE:** la clasificación ale responde al tipo de fermentación de la cerveza. En este caso, las ales se caracterizan por tener una fermentación alta (en la parte superior del tanque) con una temperatura de 15°C a 25°C. Esta temperatura permite la creación de ésteres, compuestos orgánicos o inorgánicos que modifican el sabor de la cerveza otorgándole diferentes tonos de color, sabores afrutados y dulces.

**DENSIDAD APARENTE:** densidad es la cantidad de azúcar disuelta en un volumen de líquido. Se puede medir en grados plato (°P), Brix, o en densidad específica. La densidad específica es relativa al peso de un litro de líquido con el azúcar disuelto.

**DEPRECIACION:** la depreciación es el mecanismo mediante el cual se reconoce el desgaste y pérdida de valor que sufre un bien o un activo por el uso que se haga de él con el paso del tiempo. Cuando un activo es utilizado para generar ingresos, este sufre un desgaste normal durante su vida útil que el final lo lleva a ser inutilizable.

**FERMENTACION ALCOHOLICA:** la fermentación alcohólica (o fermentación etílica) es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire (oxígeno), originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono (por regla general azúcares: como pueden ser por ejemplo la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el almidón, etc.) para obtener como productos finales un alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico.

**GRADO DE ALCOHOL:** se refieren a la expresión en grados del número de volúmenes de alcohol por cada 100 volúmenes de la bebida.

**LEVADURA:** se llama levadura o fermento a un conjunto diverso de hongos, por lo general microscópicos y unicelulares, capaces de iniciar los procesos de descomposición (fermentación) de distintas sustancias orgánicas, particularmente los azúcares y los carbohidratos, obteniendo como subproducto otras sustancias específicas (como alcoholes).

**MADURACION:** es el período posterior a la fermentación primaria, durante el cual se mantiene la cerveza en reposo, a temperaturas determinadas, con el fin de

mejorar las condiciones organolépticas de la misma antes de ser finalmente consumida.

**MEDIO DE CULTIVO:** son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos.

**PROPAGACION DE LEVADURAS:** la propagación de levaduras consiste en aumentar la población de células a partir de la inoculación en un medio de cultivo con el fin de obtener la biomasa necesaria para realizar un próximo proceso fermentativo.

**STATER:** medio rico en nutrientes, azúcares y aminoácidos en el cual se reproduce la levadura y obtenga células jóvenes y activas.

**VIABILIDAD:** la viabilidad de las levaduras se define como el porcentaje de células vivas en una muestra.

**VITALIDAD:** la vitalidad de la levadura es una expresión de la capacidad de una población de levaduras para crecer, reproducirse e interactuar con el medio ambiente.

## RESUMEN

El trabajo de grado desarrollado a continuación se basa en la forma de cultivo de levadura conocida como “*Re-pitching*”; con el fin de llevar a cabo un “*starter*” óptimo para fermentar un próximo lote de cerveza tipo Pale Ale Belga a escala banco producida por la cervecería Moonshine.

En primera instancia, la levadura *S. cerevisiae*, fue sometida a pruebas microbiológicas, de viabilidad y de vitalidad con el objetivo de medir su estabilidad para producir un nuevo lote de cerveza. Es importante mencionar que la viabilidad de la levadura se midió antes, durante y una vez finalizada la propagación de la esta. De igual manera, estos análisis se realizaron como base principal para medir y establecer las condiciones óptimas del cultivo para la reutilizar esta levadura.

Una vez realizada la cerveza tipo Pale Ale Belga a escala banco, se realizó la comparación con respecto a la cerveza elaborada por la cervecería Moonshine. Para llevar a cabalidad este objetivo, se realizó análisis microbiológicos, fisicoquímicos y organolépticos y, así lograr un resultado más acertado en cuanto a la cerveza elaborada por medio del “*Re-pitching*”. Es conveniente mencionar, que el proceso de reutilización y de fermentación se realizó por duplicado, esto con la finalidad de realizar una mejor comparación entre las cervezas elaboradas y la cerveza de referencia.

Finalmente, se realizó un análisis de costos con el objeto de entregar a los directivos de la cervecería un soporte económico para la implementación de la alternativa de reutilización a nivel industrial. En esta parte, se llevó a cabo un análisis de costos implementando o no esta alternativa y, así comparar los costos con un valor aproximado de reducción de inversión en materias primas. También, se entrega un soporte de la maquinaria y mano de obra necesaria para llevar a cabo este procedimiento en los nuevos procesos productivos en la cervecería.

Se concluye, que las cervezas llevadas a cabo por el método de “*Re-pitching*” tuvieron mejor atenuación que la cerveza realizada por Moonshine; sin embargo, estas cervezas presentan contaminación por mesófilos aerobios, las cuales son bacterias que miden la asepsia con la que se llevó a cabo el proceso de fermentación.

**Palabras claves:** *Cerveza tipo Ale, Saccharomyces cerevisiae, Re-pitching, viabilidad, vitalidad.*

## INTRODUCCION

En el proceso de producción de cerveza, la levadura cumple un rol importante en la fermentación, este proceso se da por acción microbiana que permite la formación de alcohol y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y, dependiendo de las condiciones de producción en que se realice, se puede obtener resultados diferentes, haciendo referencia a la calidad organoléptica del producto final.

El uso de las levaduras en el proceso de elaboración de cerveza es fundamental, puesto de esto depende varias características propias de la cerveza, por tanto, los estudios de reactivación, propagación, escalamientos sucesivos de los cultivos, fermentación y obtención de la cerveza, permiten conocer el comportamiento de la levadura. De ahí se deriva lo que se conoce en las cervecerías como Re-pitching (repique, re-floculación o pase), es decir, la reutilización de las levaduras de un tanque de fermentación para fermentar otro lote.

Es importante mencionar que la levadura de cerveza es el segundo subproducto más grande obtenido de la industria cervecera. El término "Levadura de cerveza gastada" se usa para describir la levadura que es excedente a la necesidad del cervecero o que ya no se necesita en el proceso de elaboración. La razón por la cual hay un exceso de levadura, es porque el proceso de fermentación genera aproximadamente de cuatro a cinco veces la cantidad de levadura en exceso de la agregada para iniciar la fermentación. Esto significa que, por cada kilogramo de levadura utilizada para comenzar la fermentación, se generan 4 a 5 kg adicionales. Es por esto que dicho excedente puede ser reutilizado en un nuevo lote de fermentación permitiendo en primera instancia un mejor aprovechamiento de los residuos generados y contribuyendo de igual forma a la reducción de costos correspondientes a compra de levadura seca importada.

El objetivo de este proyecto de grado es analizar la viabilidad de llevar a cabo la implementación de la reutilización de la levadura en un proceso fermentativo en la cervecería Moonshine, para la cerveza tipo Pale Ale Belga. Evaluando de igual forma la calidad de la levadura recuperada de los tanques fermentadores con el fin de seleccionar las mejores cepas de esta para producir un lote cervecero. En el documento se muestra todo el análisis realizado desde la extracción de la crema de levadura hasta su inoculación en lote cervecero a escala banco (10 litros), analizando la viabilidad, la vitalidad y la presencia de microorganismos que pueden afectar el proceso.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar la reutilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la implementación en un segundo proceso fermentativo de la cerveza tipo pale ale belga producida en la cervecería Moonshine.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer las condiciones óptimas del cultivo para la reutilización de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* en el proceso fermentativo.
- Comparar un lote de cerveza tipo pale ale belga a escala banco utilizando la levadura recuperada frente a la producida actualmente por la microcervecería Moonshine.
- Realizar un análisis de costos para la reutilización de la levadura a escala industrial en la microcervecería Moonshine.

## 1. MARCO TEORICO

### 1.1 ORÍGENES DE LA ELABORACIÓN DE LA CERVEZA

Apartándonos de los relatos más legendarios, diversos antropólogos afirman que hace cien mil años, nuestros antepasados, elaboraban una bebida a base de raíces, cereales y otras materias feculentas. Más tarde, para favorecer la fermentación, estas civilizaciones recurrían a masticar los elementos empleados, debido a que la saliva sacarifica la fécula, producían una fermentación más rápida. Posteriormente, otros ancestros se ayudaban, entre otros productos, de miel, bayas de enebro o semillas de zanahoria silvestre, para endulzar y dar aroma al producto<sup>1</sup>. Los primeros documentos relativos a la cerveza, datan de la época de los sumerios, por el año 4000 a.C., donde se menciona una bebida obtenida por la fermentación de granos. Se cree que los sumerios dedicaban casi una tercera parte del grano cosechado a la fabricación de la cerveza, ellos llamaban al líquido obtenido Sikaru<sup>2</sup>. Así mismo, Hornsey afirma que “lo que ahora conocemos como cerveza fue producida por primera vez por los sumerios, en el sur de Babilonia, al final del cuarto milenio antes de Cristo, donde ahora es Irán o Irak según otros autores”<sup>3</sup>, en la Figura 1, se aprecia una imagen de la civilización babilónica bebiendo cerveza. Otros autores como Sanchís<sup>4</sup>, sitúan el origen de la cerveza antes del año 6000 a.C. En cualquier caso, la cerveza fue en Mesopotamia, la bebida más popular. Según Gutiérrez, “en Egipto fue donde la cerveza se empezó a comercializar en grandes cantidades, y donde se hace el primer esfuerzo industrial para hacer de la cerveza una bebida comercial”<sup>5</sup>. Según Hornsey<sup>6</sup>, la cerveza y el pan fueron los ingredientes más importantes en la dieta de los antiguos egipcios, sugiriéndose que los obreros de las pirámides también lo bebían. La cerveza en Egipto se consumió hasta el final del siglo octavo después de Cristo, debido a que los musulmanes conquistaron la región. No obstante, con

---

<sup>1</sup> MARTINEZ LAÍNEZ, Fernando. La cerveza en España. Citado por TORIBIO, Karin. Evaluación de la estabilidad como stater de *Saccharomyces Pastorianus ssp. Carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo lager. [En línea]. Trabajo de grado para obtener el grado de Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de ciencias, 2015. p. 5. [Consultado: 5 de marzo de 2019]. Disponible en Internet: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1894/Q02.T67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

<sup>2</sup> Ibid. p. 5.

<sup>3</sup> HORNSEY, Ian. Elaboración de cerveza: Microbiología, Bioquímica y tecnología. 2 ed. España: Editorial Acribia. 2002. p. 3. ISBN 84-200-0967-9.

<sup>4</sup> SANCHIS, V. Aspectos tecnológicos y nutritivos de la cerveza. Avances en ciencia y Tecnología de los alimentos. 2004. p 65-72.

<sup>5</sup> GUTIERREZ, Enrique. La cerveza. Citado por TORIBIO, Karin. Evaluación de la estabilidad como stater de *Saccharomyces Pastorianus ssp. Carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo lager. [En línea]. Trabajo de grado para obtener el grado de Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de ciencias, 2015. p. 5. [Consultado: 5 de marzo de 2019]. Disponible en Internet: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1894/Q02.T67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

<sup>6</sup> HORNSEY, Ian. Op. Cit., p 6

anterioridad se dice que los comerciantes propagaron las técnicas de fabricación. Conde Escribano coincide con lo anterior afirmando “se producía a gran escala para templos y palacios, pero también a escala doméstica”<sup>7</sup>, quien además añade que la elaboración de cerveza en esta época, frecuentemente se ha interpretado con base en los testimonios aportados por los relieves procedentes de tumbas.

Con los romanos, Ceres, diosa de la agricultura, dará nombre a los cereales y a la bebida preparada a raíz de su fermentación. En el siglo I, según Plinio, los habitantes de Europa Occidental bebían cerevisium, un caldo elaborado con trigo y agua que, aunque de naturaleza y propiedades iguales, su nombre y su proceso de elaboración eran diferentes según los países. De este modo, los galos la llamaban cervisia o cerevisia, y los hispanos ceria o celia, señalando que estos últimos habían logrado una variedad que se conservaba durante largo tiempo<sup>8</sup>.

La cristianización de Europa hizo perder su función y jerarquía a la cerveza. La influencia romana la hizo descender a bebida popular y ordinaria. En la Edad Media, con la invasión de los pueblos bárbaros y la caída del imperio romano en el siglo V, Europa sufre una profunda transformación cultural y política, sumergiéndola en un período de oscurantismo, siendo los monasterios los que, durante varios siglos, ostentaron los principales saberes de la cultura, la ciencia, la medicina, la literatura, la música, la agricultura y por consiguiente también de la fabricación de cerveza, consiguiendo mejorar el aspecto, el sabor y el aroma, dando lugar a lo que se conoció como cerevisia monacorum, siendo ésta el antecedente más próximo a la cerveza actual<sup>9</sup>.

Según Hough<sup>10</sup>, la elaboración de la cerveza era considerada un arte o un misterio, y los detalles de su elaboración eran guardados por los maestros cerveceros. El lúpulo fue usado por primera vez en el año 736 d.C. por los frailes cerveceros de una región de Baviera y se fue generalizando su uso por el norte de Europa, llegando a Gran Bretaña en el siglo XVI.

La adición del lúpulo fue el comienzo de una nueva época, marcó el final de las cervezas turbias y dulces del mundo antiguo y el comienzo de la cerveza amarga y clara que degustamos en la actualidad. Se descubrió que el lúpulo era un excelente conservante, con un sabor amargo, una mayor transparencia y que producía una cerveza espumosa. Los monjes, desarrollaron accidentalmente, una cerveza llamada “Lager”.

---

<sup>7</sup> CONDE, M. et al., La cerveza en el Egipto Antiguo: Procesos de fabricación y variedades. Sevilla. Fundación Cruzcampo. 2001. p. 40

<sup>8</sup> MARTINEZ LAINEZ, F. Citado por TORIBIO, Karin Op. Cit., pág. 7.

<sup>9</sup> Ibid., p. 7

<sup>10</sup> HOUGH, J. S. Biotecnología de la cerveza y de la malta. España. Acibia ed. 1990. p. 3. ISBN: 84-200-06981-5

En Múnich, las cervecerías empezaron a almacenar la cerveza en cuevas con hielo. Cuando se guardaba en un almacén (Lager, en alemán), la cerveza se volvía estable naturalmente, este método de almacenamiento condujo accidentalmente a un nuevo tipo de levadura, que dio paso a su vez, a una nueva cerveza, conocida como “Lager”. Luego en el siglo XII, los cerveceros de oficio sustituyeron a los monjes, dando comienzo a la era de las corporaciones cerveceras<sup>11</sup>.

A partir de finales del siglo XVIII, se producen diversos hallazgos consecutivos que tendrían una muy relevante repercusión en la fabricación de cerveza, éstos fueron: la máquina de vapor, que facilitó la trituración de la malta y la presión y bombeo del agua para la limpieza de los depósitos y el braceado; el ferrocarril, que favorecería la expansión a nuevos mercados más alejados de la ubicación física de las fábricas; los refrigeradores por compresión, que permitieron la refrigeración del mosto y la conservación de la cerveza en frío, así como ayudaron a conseguir el producto mediante una baja fermentación en cavas enfriadas artificialmente, dando lugar a la llamada producción en frío. Pero sin duda, el hecho más relevante se produjo gracias a los estudios de Pasteur (1876) sobre procesos de fermentación<sup>12</sup>.

En 1876, Louis Pasteur, publicó su libro «Estudios sobre la cerveza» (Etudes sur la Bière), Pasteur demostró que la levadura de cerveza es un microorganismo vivo presente en materiales naturales como la cebada. Explicó el proceso de fermentación por el cual la levadura transforma el azúcar en alcohol, eso significó por primera vez, que la fermentación podía ser controlada. También demostró que las “enfermedades” de la cerveza provenían de desarrollos microbianos no deseados, conocidos como bacterias. Descubrió que elevando la temperatura las bacterias pueden ser eliminadas evitando así la descomposición de las bebidas. Este método se utiliza hoy en día y se conoce como “pasteurización”. Expuso los fundamentos, de una fabricación racional, introduciendo medidas de higiene industrial y la esterilización como medio de conservación<sup>13</sup>.

Estos estudios abrieron camino a la expansión de la industria cervecera a lo largo del siglo XX. En 1883 el micólogo danés Emil Christian Hansen de los laboratorios de Carlsberg, en Copenhague, ideó un método que empleaba cultivos unicelulares en la producción de levaduras, fue el inicio del uso de la técnica del cultivo puro de levadura. Esta técnica sustituyó la fermentación de mostos con “pies de cuba” en donde los mostos se inoculaban con las fermentaciones precedentes, este proceso era poco eficiente e impredecible. El empleo de cultivos puros de

---

<sup>11</sup> HOUGH, J. S. Op.cit., p. 3

<sup>12</sup> MARTINEZ LAINEZ, F. Citado por TORIBIO, Karin Op. Cit., pág. 8.

<sup>13</sup> MORENO, Alonso. Historia de la cerveza y su introducción en España. España. 2013. [En línea]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4855650>.

levaduras se adoptó de inmediato en todo el mundo, primero en las cervezas de tipo Lager y posteriormente en las de tipo Ale<sup>14</sup>.

En 1893 Paul Lindner, mejoro la técnica por medio de su “método de cultivo por gotas pequeñas”, sentando así las bases para la utilización de razas puras de levaduras y disminuir la influencia de los contaminantes. La investigación en el terreno de la microbiología aplicada a los mecanismos de las levaduras permitió la aparición de nuevos tipos de cervezas desconocidos hasta esa fecha. Con la evolución de las industrias y la mejora en los procesos de elaboración de cerveza, surge una creciente demanda mundial de cerveza. Por ello, la cerveza adquiere su globalización y es industrializada en la mayoría de los países del mundo<sup>15</sup>.

## **1.2 DEFICION DE CERVEZA**

Según el Ministerio de Salud y Protección social la cerveza se define como la bebida obtenida por fermentación alcohólica de un mosto elaborado con cebada germinada y otros cereales o azúcares, adicionado de lúpulo o su extracto natural, levadura y agua potable, a la cual se le podrán adicionar sabores naturales permitidos por este. Esta bebida está comprendida entre 2.5 y 12 grados alcoholimétricos. Las cervezas con una graduación alcoholimétrica, inferior a 2.5 grados alcoholimétricos, se denominarán cervezas sin alcohol o cervezas no alcohólicas y se clasificarán como alimento. Y según el «Reglamento Español Técnico-sanitaria para la elaboración y comercio de la cerveza y de la malta líquida», define a la cerveza como: “La bebida resultante de la fermentación alcohólica, mediante levadura seleccionada, de un mosto procedente de malta de cebada, solo o mezclado con otros productos amiláceos transformables en azúcares por digestión enzimática, adicionando lúpulo y/o sus derivados y sometido a un proceso de cocción”.

## **1.3 CLASIFICACION DE LAS CERVEZAS**

En el mundo existen muchas clases de cerveza y cada cual posee un particular aroma, sabor, color y cuerpo; muchas veces llevan el nombre de los pueblos de los cuales son originarias. Si bien todas se fabrican con los mismos ingredientes, cebada malteada, lúpulo, levadura y agua, lo que establece la diferencia entre una y otra son las variaciones de las materias primas y el tipo de fermentación que

---

<sup>14</sup> GARIBAY, Mariano. et al., Biotecnología Alimentaria. México D.F. Limusa S.A. 1993. p. 266. ISBN: 968-18-4522-6.

<sup>15</sup> Ibid. p. 267

experimentan. Por tanto, la clasificación más aceptada, es según su tipo de fermentación<sup>16</sup>.

**1.3.1 Clasificación por su fermentación.** Se diferencian por la levadura utilizada y se clasifican en cervezas de baja, alta y espontánea.

**1.3.1.1 Cervezas de fermentación Alta o tipo Ale.** 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 *Saccharomyces cerevisiae*, denominada así debido a que una parte de la levadura sube hasta formar una densa “cabeza de levaduras” en la superficie del fermentador<sup>17</sup>.

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 *Saccharomyces cerevisiae*, que permanece en suspensión, y por las temperaturas más altas utilizadas (20 - 23°C)<sup>19</sup>.

**1.3.1.2 Cervezas de fermentación baja o tipo Lager.** La palabra Lager se deriva del vocablo alemán “lager” 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<sup>20</sup>.

---

<sup>16</sup> RODRÍGUEZ, Hipatia. Determinación de Parámetros Físico-Químicos para la Caracterización de Cerveza Tipo Lager Elaborada por Compañía Cervecería Kunstmann S.A. [En línea]. Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero de Alimentos. Chile. Universidad Austral de Chile. Facultad de ciencias agrarias. 2003.p. 10. [Consultado: 5 de marzo de 2019]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2003/far696d/doc/far696d.pdf>

<sup>17</sup> BROWN, C., CAMPBELL, I., y PRIEST, F. Introducción a la biotecnología. Zaragoza. España. Editorial Acibia .1989. p. 98-99. ISBN: 978-84-200-0666-6.

<sup>18</sup> DE CLERK, Jean. Textbook of brewing. EE.UU. Chapman and Hall.2009. p. 132 [En línea]. Disponible en:

[https://books.google.com.co/books?id=1NIJAAAAYAAJ&hl=es&source=gbs\\_book\\_other\\_versions](https://books.google.com.co/books?id=1NIJAAAAYAAJ&hl=es&source=gbs_book_other_versions)

<sup>19</sup> KNUDSEN, F. El Cervecería en la práctica. 3 ed. Wisconsin. Madison. 1977. p. 211.

<sup>20</sup> DE CLERK, J. Op., Cit., p. 133.

**1.3.1.2 Cervezas de fermentación espontánea.** Este tipo de cervezas, es producido por la fermentación de levaduras de cepas salvajes, las cervezas de este tipo son: Lambic, Gueuze y Faro. Según Boldú Gonzales, “las del tipo Lambic, provienen del valle de Zenne, Bélgica. En donde los cerveceros, no añaden levadura al mosto para provocar la fermentación, sino dejan que los microorganismos salvajes que están en el ambiente actúen sobre el líquido”<sup>21</sup>. La levadura sin seleccionar puede provocar aromas y sabores no deseados.

Pero en esta área de Bélgica existe un microclima en el que conviven un elevado número de microorganismos entre los que destacan *Bretanomyces lambicus* y *bruxellensis*, que son los encargados de producir la fermentación del mosto y dar lugar a la cerveza. La fermentación y el almacenamiento se producen en los mismos recipientes y la cerveza se mantiene allí durante dos o más años, se fabrica a partir de un 60 por ciento de cebada y un 40 por ciento de trigo.

## **1.4 PROCESO DE ELABORACION DE CERVEZA TIPO ALE**

Se describirá el proceso de elaboración industrial de la cerveza tipo ale, desde la materia prima, procesos, etapas y conservación final, el conocimiento del proceso biotecnológico, permite tener el control sobre este

**1.4.1 Materias Primas.** Para lograr una cerveza de gran calidad, es necesario utilizar los mejores ingredientes. La contribución de las avanzadas tecnologías que hay en la actualidad sería inútil si no se combinase con la experiencia y el conocimiento humano en el momento de elegir las materias primas más adecuadas para la elaboración del producto deseado. Cuando se trata de cerveza, los factores a considerar son el agua, la levadura, la malta y el lúpulo<sup>22</sup>.

---

<sup>21</sup> BOLDU GONZALES, Aleixo. Projecte d'una planta de fabricació de la cervesa. Citado por TORIBIO, Karin. Evaluación de la estabilidad como stater de *Saccharomyces Pastorianus ssp. Carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo lager. [En línea]. Trabajo de grado para obtener el grado de Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de ciencias, 2015. p. 24. [Consultado: 7 de marzo de 2019. Disponible en Internet: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1894/Q02.T67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

<sup>22</sup> PILLA, Simone; VINCI, Genny. Cervezas de todo el mundo. Enciclopedia Práctica. Traducido por Cristina Sala Carbonell. México. De Vicchi Ediciones, S-A 2012. p. 10.

**1.4.1.1 El Agua.** Es la materia prima más utilizada en la producción de cerveza, sin embargo, solamente una parte de la cantidad inicial es usada directamente en la cerveza. Las características del agua son determinantes para la calidad de la cerveza fabricada y debe cumplir con las características necesarias de potabilidad, como lo es el exceso de sales o de materia orgánica, y debe estar libre de olores y sabores extraños<sup>23</sup>.

Antes de la llegada de los medios de transporte modernos, la distribución de la cerveza era limitada, siendo distribuida únicamente al consumo local. Con el paso del tiempo y las mejoras disponibles por medio del transporte, los puntos de producción se instalan en la actualidad cerca de las fuentes y manantiales para disponer siempre, de buena cantidad de agua, y a su vez la calidad de esta<sup>24</sup>.

La composición de las sales presentes en el agua, tiene una influencia directa en la regulación del pH del mosto y de la cerveza, el cual varía entre 5.0 y 6.0. Un pH muy elevado no es favorable para las reacciones importantes como lo son, la sacarificación y la coagulación de las proteínas en la ebullición. De igual manera, las aguas ricas en carbonatos son ideales para cervezas oscuras; las aguas ricas en sulfato de calcio hacen que las cervezas sean más claras y se realza el sabor del lúpulo, mientras que el agua de mineralización débil confiere suavidad a la cerveza<sup>25</sup>.

**1.4.1.2 La Levadura.** Indispensable para la producción de la cerveza, las levaduras son microorganismos vegetales responsables de la fermentación y, por lo tanto, de la transformación del azúcar en alcohol y en gas carbónico. En la actualidad, este proceso se realiza en ambientes sometidos a temperatura controlada, con cepas de levaduras seleccionadas (*Saccharomyces cerevisiae*) y así se logra obtener un resultado seguro<sup>26</sup>.

El metabolismo de la levadura, tiene 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 su reproducción. Las levaduras se preparan en los laboratorios de las propias fábricas a partir de cepas seleccionadas, y pueden reutilizarse en el proceso cervecero, varias veces<sup>27</sup>.

Por medio de las levaduras, se logran distinguir la fermentación alta, que se produce a una temperatura de 15 – 30°C; la fermentación baja, que se da a 10 –

---

<sup>23</sup> KUNZE, Wolfgang. Tecnología para cerveceros y malteros. Berlín, Alemania. Editorial Westkreuz- Druckerei. 2006. p. 75. ISBN: 978-3-921690-54-3

<sup>24</sup> PILLA, Simone; VINCI, Genny. Op, cit. p.10

<sup>25</sup> ROS, José Luis. Estabilidad coloidal de la cerveza. Pamplona, España. Editorial DIALNET. 1980. p. 45

<sup>26</sup> PILLA, Simone; VINCI, Genny. Op. Cit. p. 11

<sup>27</sup> KUNZE, Wolfgang. Op, Cit. p. 98

15°C, y finalmente la fermentación espontánea, que utiliza las levaduras naturales presentes en el aire, como lo son *Brettanomyces bruxellensis* y *lambicus*<sup>28</sup>.

**1.4.1.3 La Malta.** La malta es el punto de partida de la cerveza se centra en la lección de la malta, que es el resultado de un proceso de transformación de cereales, sobre todo de la cebada, pero también del trigo, la avena y el maíz. El proceso de malteado prevé un remojo del cereal durante 36-38 horas en agua que se remueve con frecuencia; luego se escurre y se acomoda en el germinador durante una semana. Durante este tiempo, el cereal se airea y se mezcla continuamente para que germine en las mejores condiciones. Finalmente, sigue la fase de secado, que da a cada malta su nota característica<sup>29</sup>.

La variedad de malta más conocidas y utilizadas<sup>30</sup>:

- Malta de Múnich: aromática, limpia y estructurada.
- Malta de Viena: utilizada para la producción de cerveza lager.
- Malta pils: suave y con tendencia a lo dulce.
- Malta caramelo: la más producida en diversos tonos de colores.
- Malta cristal: sabor característico a avellana, utiliza para las ales.
- Malta chocolate: utilizada para las stouts y las porters y por su característico aroma, debido a su alta temperatura de secado.
- Malta trigo, malta avena, malta centena: utilizada para dar a la cerveza una nota especiada y ligero amargor.

**1.4.1.4 El lúpulo.** Esta planta trepadora es el auténtico aromatizante de la cerveza. De las flores femeninas del lúpulo se extrae un polvo amargo de color amarillento, la lupulina, que contiene resinas, como la humulona y la lupulona, así como ácidos que contrarrestan el dulzor de las maltas y dan una nota de ligero amargor a la cerveza. Con la presencia de lúpulo noble, rico en aceites esenciales, se obtiene una mejor aportación de aromas. Además, los taninos contenidos en la parte verde de la flor posibilitan la clarificación de la cerveza en la fase de cocción del mosto al coagular con las proteínas<sup>31</sup>.

Desde el punto de vista cervecero, la composición del lúpulo es muy importante para la calidad de la cerveza y está dada por<sup>32</sup>:

- a) Sustancias amargas, son el 18,5% de la composición del lúpulo. Las sustancias amargas además de su importancia sensorial en la cerveza, tienen un efecto antiséptico para el crecimiento de microorganismos e influyen positivamente en la estabilidad de la espuma de la cerveza.

---

<sup>28</sup> PILLA, Simone; VINCI, Genny. Op. Cit. p. 11

<sup>29</sup> Ibid., p. 12

<sup>30</sup> Ibid., p. 13

<sup>31</sup> Ibid., p. 14

<sup>32</sup> BOLDÚ GONZALEZ, Aleixo. Op. Cit. p 33

- b) Los aceites son el 0,5% de la composición del lúpulo. Son producidos por las brácteas y son responsables del aroma.
- c) Los polifenoles son el 3,5% de la composición del lúpulo.
- d) La fracción proteica o compuestos nitrogenados en el lúpulo varía de un 12 a 20% y casi la mitad queda en el mosto.
- e) Sustancias inorgánicas, son el 8% de la composición.

Las variedades de lúpulo más conocidas y utilizadas<sup>33</sup>:

- Saaz: lúpulo rojo de bohemia, fresco y fino
- Columbus: amargo y con aromas cítricos.
- Hallertau Mittelfruch: con aroma característico a limón, fino y floral.
- Mount Hood: es muy afrutado y floral.
- Nugget: aroma muy intenso y agradable.
- Fuggle: es la variedad más resinosa y amarga, aunque su sabor es suave y afrutado.
- Golding Canterbury: sabor áspero y cítrico.
- Tettnang: especialmente aromático.

**1.4.2 Etapas de elaboración.** El proceso de elaboración de una cerveza puede parecer algo complejo, en las Fig. 1 y 2 se muestran de manera esquemática los principales procesos físicos, químicos y biológicos involucrados en la fabricación de una cerveza. La misma no debe interpretarse como una secuencia de pasos rigurosos sino más bien como una guía general teórica que en la práctica puede implicar muchas variaciones<sup>34</sup>.

A continuación, se analizará brevemente cada una de sus etapas.

**1.4.2.1 Elaboración de la malta.** En la elaboración de malta o malteado, es el primer paso en la elaboración de cerveza y es el proceso por el cual se obtiene la materia prima principal. Básicamente, es la germinación controlada de un cereal, seguida por la interrupción de este proceso natural, secando el grano por medio de calor. Es importante que durante la producción de malta sean muchos los parámetros que deben ser controlados y así lograr las maltas especiales, para elaborar los diversos tipos de cervezas, con sus colores y sabores característicos, palatibilidad, estabilidad de espuma, entre otras cualidades<sup>35</sup>.

---

<sup>33</sup> PILLA, Simone; VINCI, Genny. Op. Cit. p. 15-16

<sup>34</sup> GONZALEZ, Marcos. Principios de Elaboración de las Cervezas Artesanales. Práctico libro de consulta para aficionados y expertos 1 ed. Carolina del Norte: Estados Unidos. Editorial Lulu press inc. 2017. p. 99. ISBN: 978-1-365-67284-2

<sup>35</sup> GIGLIARELLI, Pablo. Fermentación. Ciencia Cervecera. [en línea]. 28 de febrero de 2019. Disponible en internet: <http://www.revistamash.com.ar/detalle.php?id=379>.

Este proceso, consta de los siguientes pasos<sup>36</sup>:

- a) **Recepción:** El cereal llega a la cervecería en donde es almacenada en condiciones adecuadas de acuerdo a su origen, variedad y proteínas. Si la cebada cumple con los requisitos mínimos para el malteo, se recibe y se limpia en varias etapas, eliminando todo aquello que no sea cereal.
- b) **Remojo:** Se utiliza para poder activar las enzimas útiles para el malteado es necesario hidratar el grano llevando su humedad a un 35 a 46%. Para hidratar la cebada se remoja por inmersión en agua a unos 15°C, para que el embrión no se ahogue se debe airear perfectamente el agua de remojo para oxigenarla. Una vez que la hidratación llega al nivel buscado se drena toda el agua y comienza la etapa de “descanso” o etapa de aire, que dura entre dos a tres días.
- c) **Germinación:** El embrión comienza su desarrollo hacia el final de la etapa de descanso y necesita de nutrientes para seguir creciendo. A este proceso se le conoce como “modificación” o “desagregación”. La modificación continuara luego cuando el maestro cervecero utilice la malta en el proceso de maceración que reactiva la conversión enzimática transformando el resto de almidón soluble en los azúcares simples que servirán de alimento para las levaduras de fermentación.
- d) **Secado:** una vez que la modificación dentro del grano es la suficiente, se interrumpe el proceso aplicando calor, secando la malta verde para convertirla en malta estable capaz de ser almacenada en forma segura. Durante el secado, además de disminuir el contenido de agua y de detener la modificación del grano se forman componentes de aroma, sabor y color. Normalmente, las temperaturas para el secado para maltas tipo ale esta entre 60 a 95°C, seguido a esto se realiza la fragmentación de los granos para obtener la malta en polvo<sup>37</sup>.
- e) **Desbrotado:** Finalizado el horneado la malta se pasa a través de una máquina que extraerá todas las raíces y el tallo que han emergido durante la germinación y con las cuales se genera un subproducto que se vende normalmente como alimento animal por su contenido proteico. La malta entonces se pone en el almacén por un periodo específico antes de ser utilizada.

---

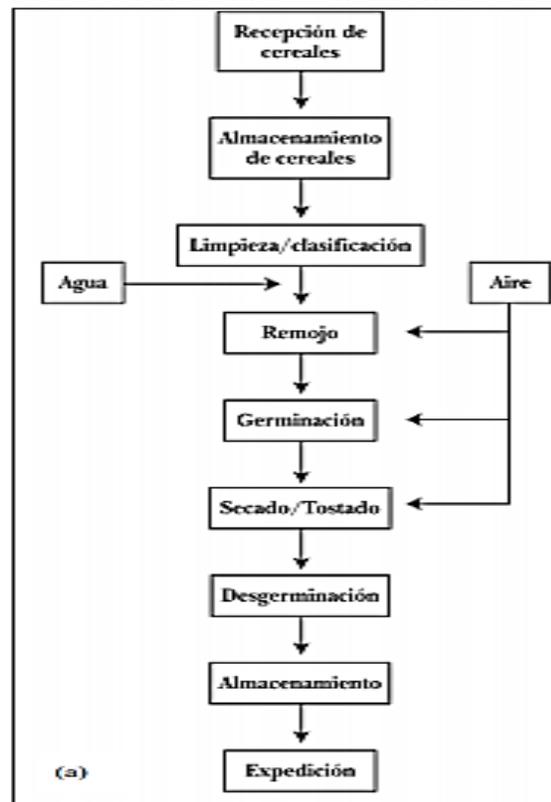
<sup>36</sup> KUNZE, Wolfgang. Op, Cit. p. 112, 114, 136.

<sup>37</sup> VARNAM, Alan; SUTHERLAND, Jane. Bebidas alcohólicas: Cerveza. Bebidas. Tecnología, Química y Microbiología. Zaragoza, España. Editorial Acribia. 1996. Pág. 307 - 373.

**1.4.2.2 Elaboración del mosto.** La producción del mosto, consiste de las siguientes etapas<sup>38</sup>:

- a) **Molienda:** La importancia de la molienda radica en que ella depende la eficiencia en la extracción de los azúcares atrapados en el grano, influye también en el filtrado del mosto durante el recirculado y lavado del grano. Cuanto más pequeño se parte el grano más superficie del mismo se expone a la acción de las enzimas encargadas de transformar el almidón y más eficiente será la extracción de los azúcares.
- b) **Maceración:** Consiste básicamente en someter una mezcla de agua y de granos a una serie de descansos a diferentes temperaturas, por intervalos de tiempos determinados. Estas tres variables (relación agua/grano, tiempo y temperatura) son determinantes en el momento de planear la receta de fabricación de la cerveza y puede variar dependiendo de los ingredientes usados, que el maestro cervecero quiera darle a su cerveza.

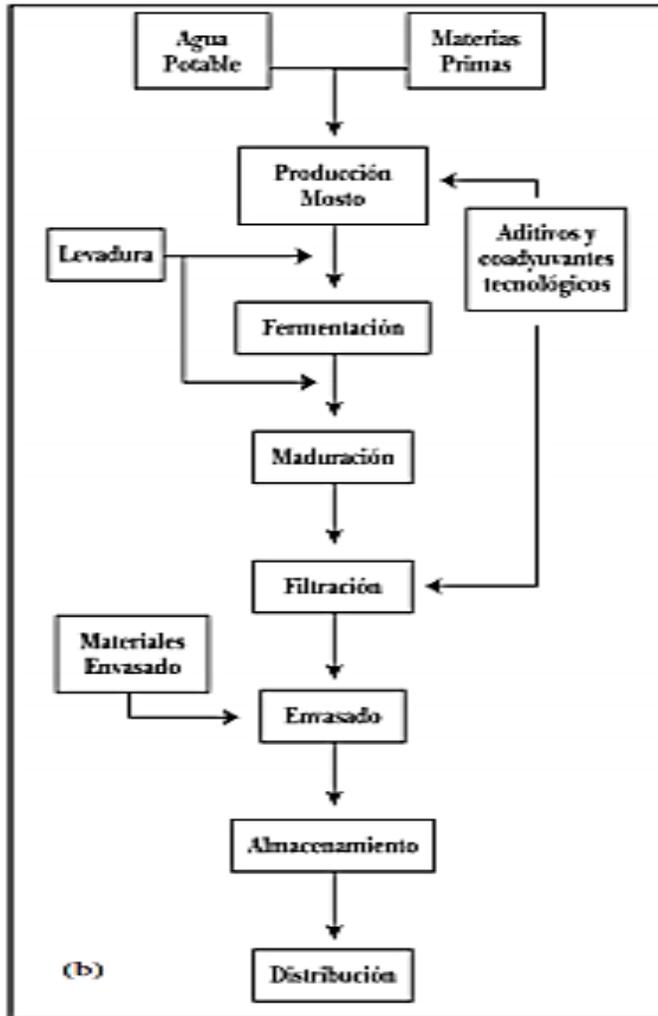
**Figura 1.** Diagrama de flujo de elaboración de malta en una maltería



Fuente. IICA & AECI, 1999; pág. 17

<sup>38</sup> FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY. Handbook of Brewing, 2 Edición. (Editado por FERGUS, Priest; GRAHAM, Stewart.) Boca Raton, FL, USA. Editorial Taylor & Francis Group, LLC.2006.

**Figura 2.** Diagrama de flujo de elaboración de cerveza en una cervecería.



Fuente. IICA & AECL, 1999; pág. 24.

En la maceración, son las enzimas las que realizan todo el trabajo. Tanto la temperatura como el pH son factores importantes para el accionar de las enzimas; las enzimas activadas son las que se encargan luego de la acidificación del mosto, de la degradación de las proteínas y fundamentalmente de la conversión del almidón en azúcares más simples que pueden ser utilizados por las levaduras.

**c) Cocimiento:** En este paso, se expone al mosto en una fuente de calor hasta que alcance una ebullición constante y se mantiene bajo estas condiciones por 60 y 120 minutos. Se busca básicamente, es remover todos los compuestos volátiles indeseados, la isomerización de los ácidos del lúpulo, las desnaturalización y floculación de las proteínas, la esterilización, la inactivación enzimática, la concentración del mosto, y además es en ese punto donde se define el color y algunos sabores y aromas característicos de la cerveza.

Antes de pasar el mosto al fermentador, se debe separar el “*Trub*” del mosto, es decir, los flósculos formados por proteínas, materiales ricos en lípidos, componentes insolubles del lúpulo. Inmediatamente después de esto, se deja enfriar el mosto en el menor tiempo posible hasta llevarlo a la temperatura adecuada de inoculación.

**1.4.2.3 Fermentación y maduración.** Una vez obtenido el mosto, este es aireado de manera estéril, e inoculado con levadura para que inicie la fermentación. En la elaboración industrial de la cerveza, la fermentación alta, se utiliza en la elaboración de cerveza tipo “*A/e*”, y esta fermentación opera bajo condiciones de cepas, tiempo y diferentes temperaturas. De igual manera se tienen en cuenta dos etapas, la fermentación y la maduración<sup>39</sup>.

Para la elaboración de la cerveza tipo *A/e*, se consideran las siguientes etapas<sup>40</sup>:

- a) **Fermentación primaria:** Esta se inicia cuando las levaduras son introducidas en el mosto aireado y se dan las siguientes etapas: la fase de latencia, en donde las levaduras acumulan sus reservas de glicógeno y la fase de crecimiento, designada a menudo como la fase de la respiración, donde, las células de la levadura utilizan el oxígeno en el mosto para oxidar una variedad de compuestos ácidos, dando por resultado una baja significativa en el pH, acidificando el mosto.
- b) **Fermentación secundaria:** Acá se da lugar la fase de fermentación y sedimentación; donde se sigue rápidamente la fase de crecimiento, en el cual las levaduras han agotado la fuente del oxígeno, y da inicio a un proceso caracterizado por la reducción de la densidad del mosto y la producción del dióxido de carbono, etanol, y los sabores de la cerveza, durante esa fase, la levadura está en dispersión y el contacto máximo con el mosto; acá se aumenta el contenido de alcohol y el agotamiento de los azúcares y nutrientes, que origina que la levadura empiece a sedimentarse en el fondo del fermentador.
- c) **Maduración:** Esta etapa se lleva a cabo cuando se ha comenzado el extracto final deseable, los tanques se enfrían a temperaturas de refrigeración de -1 a 5°C. durante este tiempo la levadura flocula y sedimenta. Al finalizar la fermentación principal, la cerveza está muy turbia. Esta turbidez es debida principalmente al contenido de la levadura en suspensión; durante el tiempo de maduración estas precipitan y se depositan principalmente en el fondo del tanque, originándose la clarificación, lo que favorece la filtración de la cerveza y la estabilidad coloidal de la misma.

---

<sup>39</sup> KUNZE, Wolfgang. Op, Cit. p. 418

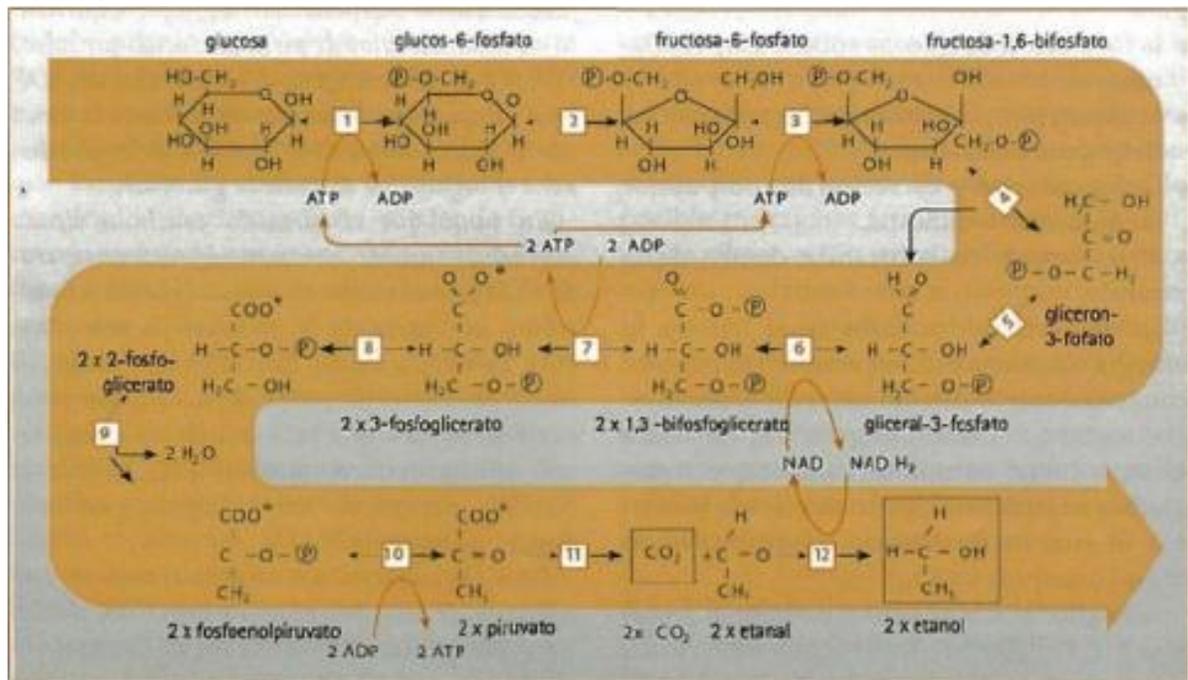
<sup>40</sup> Ibid., p. 419

**1.4.2.4 Bioquímica de la fermentación alcohólica.** Como en todos los procesos que realizan los seres vivos, 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 3.

**Figura 3.** Esquema de la fermentación alcohólica, según Embden-Meyerhof-Parnas.



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 (adenosin trifosfato) y la transformación de este último en ADP (adenosin 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).

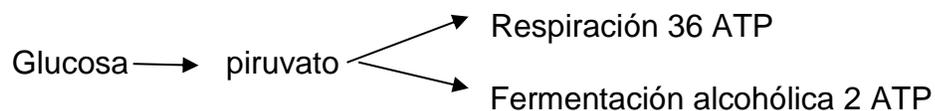
A continuación, ocurre una disociación en dos triosa-fosfatos isómeros por la fructosa-bifosfatoaldolasa (4). El glicerol- y gliceron-3-fosfato (5) formado es reducido ahora por la deshidrogenasa de gliceral-3-fosfato a 2 moléculas de 1,3-bifosfoglicerato (6) y al mismo tiempo es ligado un ion hidrógeno 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 anaerobia), 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).

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.<sup>41</sup>

El ATP producido puede ser usado como fuente de energía por la levadura. Algunos de los compuestos intermedios también son usados para el crecimiento de la levadura, tales como el ácido pirúvico pueden ser liberados de la célula de levadura a la cerveza, nuevamente el ácido pirúvico es un ejemplo. Cuando esto pasa, la levadura queda con un exceso de NADH<sub>2</sub> es usado para formar glicerol a partir de la dihidroxiacetona fosfato. Después del alcohol y CO<sub>2</sub>, el principal subproducto de la fermentación por levadura es el glicerol.

Además del proceso de la glicolisis hay otro proceso que interviene en la producción de etanol el cual es el **ciclo de ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs)**; La fermentación vía glucólisis es muy poco eficiente en la liberación de energía y formación de ATP, ya que alrededor del 95% de las calorías utilizables de los azúcares del mosto permanece en el alcohol formado durante la fermentación. En presencia de oxígeno, mucha más energía aprovechable en la formación de ATP puede ser obtenida de la glucosa.

Después de la glucólisis el ácido pirúvico formado pasa a través de una serie de reacciones conocidas como el ciclo del ácido cítrico. Al comienzo el ácido oxalacético se combina con el ácido acético en la forma de acetil-coenzima A. Cuando el ciclo se completa, el resultado neto es la oxidación del ácido acético a CO<sub>2</sub> y agua; el ácido oxalacético es liberado para comenzar otra vez el ciclo con otra molécula de ácido acético obtenida del ácido pirúvico. El hidrógeno removido en las fracciones intermedias del ciclo en la forma de coenzimas reductoras puede ser oxidado en presencia de oxígeno por una serie de reacciones que generan más ATP.

El resultado final es producir alrededor de 38 ATP de una molécula de glucosa. La fermentación sin oxígeno produce sólo dos ATP a partir de una molécula de glucosa. Algunos compuestos intermedios del ciclo TCA son usados por la

---

<sup>41</sup> KUNZE, Wolfgang. Op, Cit. p. 603

levadura para su crecimiento. Por ejemplo, acetil-CoA y  $\alpha$ -cetoglucano. Pequeñas cantidades de algunos ácidos del ciclo son liberados por la célula de la levadura y contribuyen a la acidez de la cerveza. Por ejemplo, al ácido succínico. Los ácidos unidos a la coenzima A son muy inestables y algunas veces reaccionan para formar ésteres, los cuales tienen una gran influencia en el aroma de la cerveza.

Las reacciones de la glucólisis ocurren dentro de la célula, en el citoplasma. Las TCA también ocurren dentro de ella, pero sólo en una parte muy especializada en la célula, llamada mitocondria. La mitocondria puede ser formada solamente a partir de otra mitocondria algunas veces durante la gemación de la levadura, una célula hija puede formarse sin mitocondrias. Cuando esto ocurre la célula hija y toda su descendencia no podrán nunca formar mitocondrias, por lo tanto, crecen muy lentamente en los medios de cultivo de laboratorio, porque no pueden usar el oxígeno del aire para crecer más eficientemente; forman sólo pequeñas colonias en el agar; por esta razón estas levaduras son llamadas “petite verdant o respiratorias deficientes” (RD).

Las levaduras RD producen fermentaciones pobres, con poca atenuación y tienden a liberar gran cantidad de diacetilo en la cerveza. Por esta razón las levaduras con cierto porcentaje de RD deben ser descartadas.

**1.4.2.5 Filtración, envasado y almacenamiento.** Finalmente, luego del proceso de maduración, la cerveza se filtra eliminando hasta el máximo las materias insolubles, como levadura o proteínas coaguladas que puedan contener. Una vez filtrada la cerveza, se realiza el proceso de carbonatación, en donde una inyección de gas carbónico cuyo contenido es el necesario para que la cerveza produzca buena formación de espuma. La cerveza saliente de los filtros y carbonatada, se recibe en los tanques de almacenamiento, para su posterior envasado<sup>42</sup>.

Las botellas de envase, se lavan y esterilizan antes de ser utilizadas, luego de ser llenadas estas pasan por puntos de control de inspección que aseguran su calidad, posteriormente se pasteuriza para garantizar su conservación.

## 1.5 CERVEZA ARTESANAL

Como tal no se puede definir una cerveza artesanal ya que para cada maestro cervecero hay una definición distinta. El término cerveza artesanal, o más concretamente el de cervecería artesanal, encuentra su origen en el Reino Unido, en la década de los setenta, cuando una nueva generación de cervecerías pequeñas comenzó a surgir. En contraposición a las grandes que producen de forma industrializada, a gran escala y optimizando costes para conseguir vender

---

<sup>42</sup> Ibid., p. 419-421

más barato, ahorrando en ingredientes y procesos, estas micro cervecerías optaban y optan por hacerlo de otro modo. Por una producción tradicional, más manual y menos automatizada. Centrándose en la calidad de los ingredientes y los procesos por encima de la cantidad. Supeditando las cualidades del producto a los costes que entraña producirlo y, consecuentemente, al precio que debe venderse<sup>43</sup>.

Las cervezas artesanales optan en su elaboración por materia prima de alta calidad, totalmente natural, de variedades poco comunes y menos apreciadas. En su proceso productivo emplean productos destinados a intensificar el aroma o el sabor, a proporcionar una mayor espuma o preservarlas durante más tiempo en buen estado.

Debido a esto las cervezas artesanales son más intensas organolépticamente hablando en términos generales, además recurren normalmente a una fermentación extra en botella, con el fin de obtener más gas carbónico y espuma de una forma natural, y tengan una fecha de caducidad sensiblemente próxima a la fecha de su producción y envasado, esto debido especialmente a que no emplean técnicas de pasteurización.

**1.5.1 Mercado de la cerveza artesanal en Colombia.** El mercado cervecero actual en Colombia en cuanto a consumo se refiere, está dominado en gran medida por las cervezas producidas industrialmente, pero poco a poco con el surgimiento de emprendedores que han identificado que en el país existe el potencial para producir cerveza artesanal; se han ido formando pequeñas micro cervecerías que han adquirido una participación en el mercado significativa. Anualmente la producción ha ido creciendo alrededor de 30% hasta el punto que el día de hoy en el país funcionan más de 151 cervecerías artesanales.

---

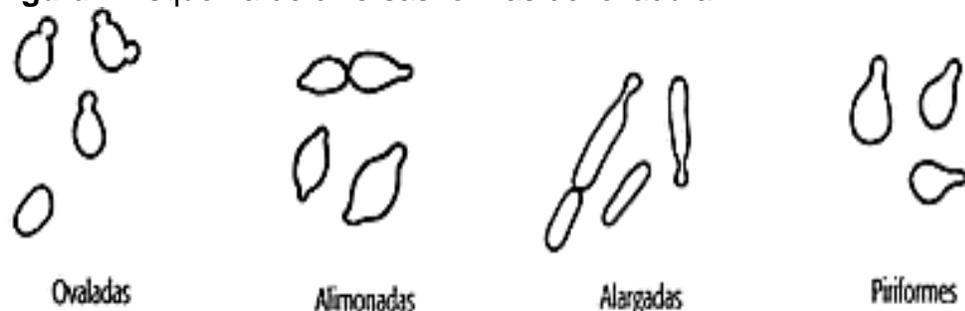
<sup>43</sup> CASTILLO Toni. Cervezas artesanales: ¿Cuándo lo son? [en línea]. (2016). Disponible en: (<http://www.bonviveur.es/the-food-street-journal/cervezas-artesanales-cuando-lo-son>)

## 1.6 GENERALIDADES DE LA LEVADURA

**1.6.1 Levadura.** Las levaduras son células eucariotas, unicelulares, pertenecientes al reino de los hongos<sup>44</sup>. Las levaduras están agrupadas en unas 350 especies (clasificadas a su vez en 39 géneros), lo que muestran que dentro de los hongos constituyen un grupo muy pequeño. Las levaduras son heterogéneas en su morfología y fisiología; sin embargo, su forma común es la unicelular<sup>45</sup>. Es importante señalar que las condiciones ambientales influyen para que los hongos crezcan como filamentos o como levadura; este fenómeno se conoce como dimorfismo.

Las levaduras se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, localizada en el suelo, en la superficie de las frutas, en el néctar de las flores y en los ambientes acuáticos. Las levaduras son relativamente grandes, su tamaño puede variar entre 3 y 8  $\mu\text{m}$  de diámetro; típicamente, las levaduras tienen forma ovoide pero también las hay alargadas, esféricas o incluso triangulares<sup>46</sup>.

**Figura 4.** Esquema de diversas formas de levadura.



Fuente: VERA, G. Introducción a la Microbiología. 2ª. Edición. Pág. 109

La mayoría de las levaduras se reproducen asexualmente por gemación y unas pocas por fisión binaria. En la gemación se forma una pequeña protuberancia en la superficie de la célula, el cual se debe a un debilitamiento en la pared celular. Gracias al líquido citoplasmático proveniente de la célula madre, esta protuberancia se va llenando hasta alcanzar un tamaño de esta. El material nuclear se replica por mitosis y una parte pasa a la célula hija. Luego se forma la pared que divide las dos células y la hija se desprende de la madre dejando así una pequeña marca, es decir, una cicatriz<sup>47</sup>.

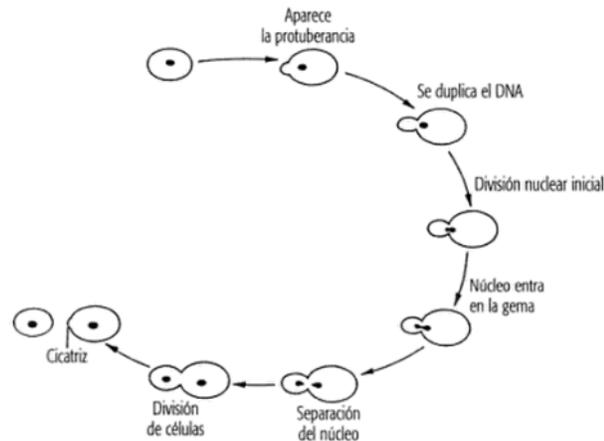
<sup>44</sup> LEZCANO, E. Levaduras. Revista de alimentos argentinos. [en línea]. (2011). Disponible en: [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/revista/ediciones/53/productos/r53\\_07\\_Levaduras.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/revista/ediciones/53/productos/r53_07_Levaduras.pdf)

<sup>45</sup> GARCIA, VERA. Introducción a la Microbiología. 2ª. Edición. San José, Costa Rica. Editorial universidad estatal a distancia. 2004. Pág. 108

<sup>46</sup>Ibíd., pág. 108-109

<sup>47</sup> VERA, G. Op,cit., p. 109

**Figura 5.** Esquema de proceso de gemación de levaduras.



Fuente: VERA, G. Introducción a la Microbiología. 2ª. Edición. Pág. 110

La reproducción sexual de las levaduras se da por medio de esporas sexuales y dependiendo del tipo de célula especializada donde se formen, pueden ser ascosporas o basidiosporas. Ambos tipos de esporas requieren que ocurra la unión de núcleos compatibles y una división meiótica. La mayoría de las levaduras son ascosporadas, y una de las más estudiadas es la levadura que lleva a cabo la fermentación alcohólica, *Saccharomyces cerevisiae*<sup>48</sup>.

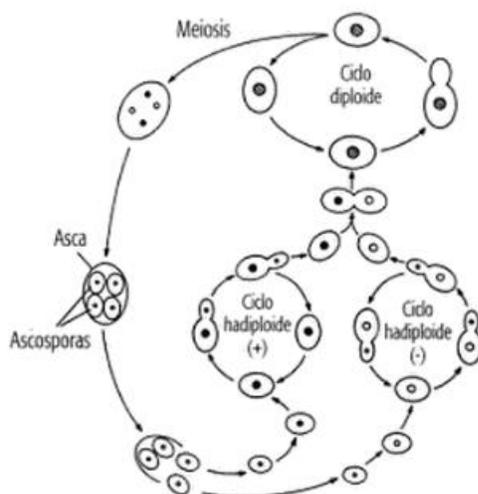
La reproducción sexual de *S. cerevisiae* ocurre mediante la fusión de dos células vegetativas compatibles, es decir, cuando las células se van a aparear, al ponerse en contacto, sus paredes se disuelven en el punto correspondiente y se produce la fusión de plasma. Posterior a esto, ocurre la cariogamia o unión de núcleos, lo cual origina una célula diploide (cigótica) y así, seguirse reproduciendo asexualmente por gemación, o pueden entrar en un ciclo meiótico, lo cual da la formación de cuatro (4) núcleo; cada uno de los núcleos se rodea de citoplasma y pared propia, lo que origina las ascosporas, que quedan contenidas en la vieja pared de la célula<sup>49</sup>.

Una vez liberadas las ascosporas, estas germinan y se reproducen asexualmente produciendo el ciclo haploide. Cabe resaltar que de acuerdo a las condiciones que se den en el medio, podría suceder que la mayor parte de la población pase por alguno de los dos ciclos, pero en la mayoría de los casos los dos ciclos se dan simultáneamente como se muestra en la imagen.

<sup>48</sup> GARCIA, VERA. Op,cit., p. 111

<sup>49</sup> Ibid., p. 111

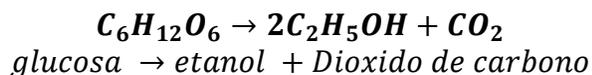
**Figura 6.** Esquema del ciclo de vida de la levadura *S. cerevisiae*



*Fuente:* VERA, G. Introducción a la Microbiología. 2ª. Edición. Pág. 111

Entre los requerimientos nutricionales de la levadura, al ser organismos heterótrofos, requieren de carbón orgánico para obtener la energía y el carbono para la síntesis de sus componentes celulares. Al hablar de levaduras, los azúcares constituyen el mejor alimento energético, muchas pueden carbonizar la glucosa, ya sea de forma anaerobia (fermentación) o aerobia (respiración). El proceso más típico que encontramos es el de la disimilación anaerobia, conocida normalmente como fermentación alcohólica y da como resultado etanol y dióxido de carbono<sup>50</sup>.

A continuación, se muestra la reacción química que ocurre en la fermentación alcohólica



Bajo condiciones aerobias, las levaduras, al utilizar oxígeno del aire pueden oxidar la glucosa completamente hasta dióxido de carbono y agua, o parcialmente, en productos intermedios como ácidos orgánicos<sup>51</sup>.

Al igual que los demás seres vivos, las levaduras, requieren de minerales para su crecimiento como lo son el potasio, el magnesio, el sodio y el calcio. La mayor parte de las levaduras crece mejor en medios en los que tengan gran presencia de agua, sin embargo, muchas de ellas pueden crecer en medios con poca cantidad

<sup>50</sup> VERA, G. Op,cit., p. 112

<sup>51</sup> VERA, G. Op,cit., p. 112

de agua, pero en condiciones con altas concentraciones de soluto (sal o azúcar). Las levaduras, a diferencia que las bacterias requieren menor humedad para su crecimiento; pero tampoco pueden desarrollarse en condiciones extremas de sequedad como los mohos<sup>52</sup>.

En las condiciones ambientales requeridas para el crecimiento óptimo de las levaduras, encontramos que son estrictamente aerobias y facultativas. Las levaduras facultativas crecen mejor en condiciones de aerobiosis, y crecen lentamente en condiciones anaerobias. Las levaduras aerobias estrictas se conocen como oxidativas, y son las levaduras que crecen en ambas condiciones, es decir, es condiciones anaerobias y aerobias, y también se conocen como fermentativas. En cuanto al pH, las levaduras llegan a tolerar un rango entre 2,0 hasta 8,0. La temperatura óptima para su crecimiento oscila entre 22°C a 30°C<sup>53</sup>.

Las levaduras, al igual que los hongos, pueden crecer en los medios de cultivo que se utilizan para las bacterias, pero con problemas de contaminación si se parte de poblaciones mixtas. Los medios utilizados son semejantes a aquellos usados para el crecimiento hongos filamentosos, de manera universal como medios estándares para el crecimiento de levaduras se encuentran los agares y caldos de extracto de malta o extracto de levadura. En ocasiones, también se pueden utilizar jugos de frutas o de vegetales para el estudio de las levaduras que se desarrollan mejor en ellos<sup>54</sup>.

Las levaduras, especialmente las del género *Saccharomyces*, han sido conocidas históricamente por el hombre debido a su capacidad de fermentar. Tradicionalmente, las levaduras han sido utilizadas en la industria para la producción de alcohol y de dióxido de carbono; así las principales industrias que se involucran con levaduras son las cervecerías, la producción de vino, destilería y la panadería<sup>55</sup>. Con el paso del tiempo ha ido aumentando el interés por este microorganismo, ya que no solo funciona para ciertas industrias, si no que ha tenido un avance en producir vitaminas, grasa y proteínas a partir de residuos de las industrias de petróleos y de papel.

---

<sup>52</sup> Ibíd. Pág. 113

<sup>53</sup> Ibíd. Pág. 113

<sup>54</sup> VERA, G. Op,cit., p. 114

<sup>55</sup>Ibíd. Pág. 116

**1.6.1.1 Levaduras del género *Saccharomyces*.** Las levaduras del género *Saccharomyces* son, sin duda las levaduras más explotadas comercialmente debido a que contribuyen en muchos de los procesos industriales. En la actualidad, el género *Saccharomyces* se divide en 14 especies que se muestran a continuación en la Tabla 1<sup>56</sup>. Las relaciones entre las 14 especies del género *Saccharomyces* se han investigado intensamente, llegándose a demostrar que se pueden agrupar en pequeños subgrupos<sup>57</sup>.

Basado en las diferencias bioquímicas del grupo *Saccharomyces sensuo stricto*, se puede dividir en dos sub especies *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* que pueden utilizar la melabiosa, asimilar la fructosa mediante un mecanismo de transporte facilitado y pueden crecer a una temperatura máxima de 37 °C. Mientras que las especies. *S. bayanus* y *S. pastorianus* no pueden utilizar melabiosa, presentan un sistema de transporte activo para la absorción de la fructosa y no son capaces de crecer por encima de los 34 °C.

Se conoce que *S. cerevisiae*, se utiliza en la preparación de panes, así como también en la elaboración de cerveza y vinificación. Las cepas de *S. bayanus* son utilizadas exclusivamente para propósitos enológicos, mientras que *S. pastorianus* son utilizadas en la fermentación de la cerveza tipo Lager. Por tanto, como se mencionó anteriormente es posible que *S. bayanus* surgiera debido a su capacidad para fermentar a temperaturas relativamente bajas y soportar altas concentraciones de etanol, en la producción de vino. Del mismo modo las cepas de *S. pastorianus* fueron seleccionadas por su capacidad de fermentar a bajas temperaturas, en comparación con *S. paradoxus* que solo se encuentra en hábitats naturales como los árboles, los suelos y los insectos.

**Tabla 1.** Claves para evaluar a las especies del género *Saccharomyces*.

NUMERO	PRUEBA A EVALUAR	RESULTADO POSITIVO
1	a. Máximo crecimiento a temperatura superior a 30°C. b. Crecimiento ausente por encima de 30°C.	-> 3 ->2
2	a. sacarosa, rafinosa y trehalosa fermentado. b. sacarosa, rafinosa y trehalosa no fermentado.	<i>S. barnettii</i> <i>S. rosini</i>
3	a. Etilamina-HCL asimilado. b. Etilamina-HCL no asimilado.	->4 ->6
4	a. Crecimiento en presencia de 1000ppm de ciclohexamida. b. No hay crecimiento en la presencia de 1000 ppm ciclohexamida.	<i>S. unisporus</i> ->5

<sup>56</sup> KURTZMAN, Cletus. FELL, . The Yeasts, A Taxonomic Study. 4ta edición. Ámsterdam, Países bajos. Editorial Elsevier Science. 1998. p. 365

<sup>57</sup> BRIGGS, Dennis; BOULTON, Chris; BROOKES, Peter; STEVENS, Roger. Brewing Science and practice. Cambridge, Inglaterra. Woodhead Publishing limited y CRC press LLC. 2004. p. 368

**Tabla 1.** Continuación

NUMERO	PRUEBA A EVALUAR	RESULTADO POSITIVO
5	a. Maltosa, rafinosa y etanol asimilado. b. Maltosa, rafinosa y etanol no asimilados.	<i>S. kluyveri</i> <i>S. spencerorum</i>
6	a. Maltosa asimilada. b. Maltosa no asimilada.	->7 ->10
7	a. Crecimiento en un medio libre de vitaminas. b. No hay crecimiento en un medio libre de vitaminas.	<i>S. bayanus</i> ->9
8	a. D-manitol asimilado, la temperatura máxima de crecimiento 37°C o mayor. b. D-manitol no asimilada, la temperatura máxima de crecimiento de menor a 37°C	<i>S. paradaxus</i> ->9
9	a. Mecanismo de transporte activo para la fructosa presente; máximo crecimiento a temperaturas menores a 34°C. b. Mecanismo de transporte activo para la fructosa no presente; máximo crecimiento a temperatura viable.	<i>S. pastorianus</i> <i>S. cerevisiae</i>
10	a. Sacarosa, rafinosa y trehalosa fermentado. b. Sacarosa, rafinosa y trehalosa no fermentado.	<i>S. exiguus</i> -> 11
11	a. Crecimiento en presencia de 1000 ppm cicloheximida. b. Crecimiento en presencia de 1000 ppm cicloheximida.	<i>S. servazzii</i> ->12
12	a. D-ribosa normalmente asimilada; 8-10 cromosomas 600 – 3000 kilobases. b. D-ribosa no asimilada, en su mayoría solo ascosporas, 8 cromosomas 400 – 2200 kilobases. c. D-ribosa normalmente no asimilados, 7-9 cromosomas 750-3000 kilobases.	<i>S. castelli</i> <i>S. transvaalensis</i> <i>S. dairiensis</i>

Fuente. elaboración propia.

**1.6.1.2 Levaduras del género *Saccharomyces Cerevisiae*.** El nombre *cerevisiae* deriva del latín: Ceres (grano) y Vise (fuerza). Estas levaduras se caracterizan por fermentar a temperaturas altas de 15 °C a 25 °C y es utilizada para la elaboración de cervezas tipo Ale o de fermentación Alta, denominada así por la capacidad de las levaduras de ascender hacia el final del proceso fermentativo a la superficie del fermentador<sup>58</sup>.

<sup>58</sup> KUNZE, Wolfgang. Op, Cit. p. 94

Desde el punto de vista de la elaboración de bebidas alcohólicas, *S. cerevisiae* ha evolucionado hasta llegar a ser un excelente microorganismo. Debido a sus características fisiológicas de crecer aún en condiciones anaeróbicas y de producción de etanol, estas ofrecen una ventaja selectiva para la levadura y el hombre. Se sabe que sus genes son regulados de manera diferente bajo condiciones aerobias y anaerobias, en la Tabla 2, se muestra una visión general de los diferentes azúcares en los que *S. cerevisiae* puede crecer.

Además *S. cerevisiae* no es exclusivamente un microorganismo industrial, pero es quizás el más popular y usado a nivel mundial como un “eucariota modelo”. Estas cepas difieren significativamente de las cepas cerveceras de *S. cerevisiae* que son genéticamente más simples y están bien definidos. Estas cepas carecen de la solidez y la complejidad genética de sus parientes taxonómicos que son incapaces de producir algo remotamente parecido a cerveza<sup>59</sup>.

**Tabla 2.** Crecimiento de la *S. cerevisiae* sobre diferentes fuentes de carbono.

<b>FUENTE DE CARBONO</b>	<b>CRECIMIENTO ANAERÓBICO</b>	<b>CRECIMIENTO AERÓBICO</b>
<b>D-glucosa</b>	Si	Si
<b>D-galactosa</b>	Variable	Variable
<b>Metil-<math>\alpha</math>-D-glucopiranosida</b>	Variable	Variable
<b>Maltosa</b>	Variable	Variable
<b>Sacarosa</b>	Variable	Variable
<b>Trehalosa</b>	Variable	Variable
<b>Melibiosa</b>	Variable	Variable
<b>Lactosa</b>	No	No
<b>Celobiosa</b>	No	No
<b>Melezitosa</b>	Variable	Variable
<b>Rafinosa</b>	Variable	Variable
<b>Inulina</b>	No	No
<b>Almidon</b>	No	Variable
<b>L-sorbosa</b>	No	No
<b>DL-Lactato</b>	No	Variable
<b>Glicerol</b>	No	Variable
<b>D-glucosamina</b>	No	No
<b>D-glucitol</b>	No	No
<b>D-manitol</b>	No	Variable

<sup>59</sup> BOULTON Y QUAIN, D. Brewing Yeast and Fermentation. Citado por TORIBIO, Karin. Evaluación de la estabilidad como stater de *Saccharomyces Pastorianus ssp. Carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo lager. [En línea]. Trabajo de grado para obtener el grado de Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de ciencias, 2015. p. 18. [Consultado: 6 de marzo de 2019. Disponible en Internet: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1894/Q02.T67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**Tabla 2.** Continuación.

<b>Acido succínico</b>	<b>No</b>	<b>Variable</b>
<b>D-xylosa</b>	No	No
<b>Xilitol</b>	No	No
<b>Etanol</b>	No	
<b>Metanol</b>	No	No

Fuente: elaboración propia

**Tabla 3.** Clasificación taxonómica *S. cerevisiae*.

<b>TAXÓN</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>COMENTARIOS</b>
<b>Reino</b>	Fungi	
<b>Filum</b>	<i>Ascomicotina</i>	Formas Teliomorficas caracterizados por la formación de ascosporas encerrados dentro de ascas
<b>Sub-filum</b>	<i>Saccharomycotina (Sin. Hemiascomycotina)</i>	
<b>Clase</b>	<i>Saccharomycetas (Sin. Hemiascomycetos)</i>	Ascas no están dentro de ascosporas, se desarrollan directamente de cigotos.
<b>Orden</b>	<i>Saccharomicetalos (Sin. Endomicetalos)</i>	Levadura rara vez en hifas
<b>Familia</b>	<i>Saccharomycetaceae</i>	
<b>Genero</b>	<i>Saccharomyces</i>	Forma ovoide, elíptica o cilíndrica. La reproducción vegetativa es por gemación multilateral. Pueden formarse Pseudohifas, pero las hifas no son septadas. La forma vegetativa es predominante. Diploide o de mayor poliploidía.
<b>Especie-tipo</b>	<i>S. cerevisiae</i>	

Fuente. elaboración propia.

**1.6.1.3 Concepto de cultivo Puro.** Se denomina cultivo puro (axénico) al que contiene sólo un tipo de microorganismos. Los cultivos puros se inician a partir de colonias aisladas, de manera que todos los individuos del mismo tengan la misma

composición genética. Los cultivos puros son esenciales para poder estudiar las características de los microorganismos y para poder identificarlos con seguridad<sup>60</sup>.

**1.6.1.4 Cultivo puro en la industria cervecera.** 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<sup>61</sup>.

La práctica de usar cultivos puros de levadura, fue iniciada por el botánico Emil C. Hansen del laboratorio Carlsberg hace 100 años. Él empleó técnicas de dilución, para aislar células y seleccionar cepas de levadura cervecera, permitiendo obtener las propiedades deseadas en la elaboración de la cerveza. El primer cultivo puro de levadura en una escala de producción fue introducido por la cervecería Carlsberg en 1883, los beneficios de usar un cultivo puro se hicieron evidente rápidamente. Es así, que pronto, 23 países habían instalado plantas de cultivo puro de Hansen, por ejemplo, en América del norte, Pabst, Schlitz, Anheuser Busch y 50 pequeñas cervecerías utilizaban cultivos puros para elaborar cerveza rubia en 1892.<sup>62</sup>

**1.6.1.5 Cultivo Starter.** Actualmente, 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<sup>63</sup>.

---

<sup>60</sup> GENMIC. Microbiología general. Tema 2: Cultivo de microorganismos. Obtenido de Genetics and Microbiology Research Group: University of Navarre, Pamplona, Spain. [En línea]. Disponible en: <http://www.unavarra.es/genmic/microgral/Tema%202.-%20Cultivo%20de%20microorganismos.pdf>

<sup>61</sup>BOLDU GONZALES. Citado por TORIBIO, Karin. Op. cit., p. 37.

<sup>62</sup> STEWART, G. Y RUSSELL, I. Yeast Management. Brewing Science & Technology: Brewer's Yeast. Citado por TORIBIO, Karin. Evaluación de la estabilidad como starter de *Saccharomyces Pastorianus ssp. Carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo lager. [En línea]. Trabajo de grado para obtener el grado de Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de ciencias, 2015. p. 37. [Consultado: 5 de marzo de 2019. Disponible en Internet: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1894/Q02.T67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

<sup>63</sup> LEROY, F. Y De VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. En: Trends in Food Science and Technology. Volume 15, Number 2. p. 75.

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<sup>64</sup>

La selección de las cepas, que son cultivadas como cultivo puro de levaduras y utilizadas como cultivo starter, cumple determinados criterios, estos son esencialmente: el comportamiento de fermentación (fermentación alta o baja), el comportamiento de floculación (levaduras no floculantes y levaduras floculantes, el poder de fermentación (velocidad de fermentación y grado de fermentación), intensidad de propagación, y la formación y degradación de subproductos de fermentación (formación de aroma)<sup>65</sup>.

**1.6.1.6 Propagación de Cultivo Puro de levaduras.** La primera planta de propagación fue diseñada por el Botánico Hansen, y consistió en un tanque receptor y propagador, en donde el mosto se esterilizaba por inyección de vapor suministrando aire estéril por un impulsor. Los principios básicos de la propagación en 1890, han cambiado muy poco. La propagación puede ser por lotes o semicontinua y generalmente consta de tres tanques de acero inoxidable, con diferentes tamaños, equipados con control de temperaturas y sistemas de ventilación estériles, en la figura 6 se muestra este sistema.

Cada tanque está equipado con un sistema CIP (Cleaning In Place), en donde la esterilización se realiza por vapor y tiene sistemas de enfriamiento para el mosto. Idealmente el sistema de propagación de la levadura debe ubicarse en una sala separada de la zona de fermentación con presión de aire positiva, un sistema de esterilización del aire, control de humedad, alfombras desinfectantes en las puertas y el acceso limitado al personal<sup>66</sup>.

En la elaboración de la cerveza, la propagación de levaduras se da bajo condiciones estériles, con el objetivo de obtener un cultivo puro, capaz de proveer en el menor tiempo posible, levadura para iniciar la fermentación con un metabolismo correcto, el cual conduzca a una fermentación normal y a una buena calidad de cerveza<sup>67</sup>. Por tanto, el objetivo de la propagación, no es obtener el máximo rendimiento de la levadura sino la biomasa necesaria para la inoculación en los tanques de fermentación<sup>68</sup>.

---

<sup>64</sup> ROSS, R. et al., Preservation and fermentation: past, present and future. En: International Journal of Food Microbiology. p. 79.

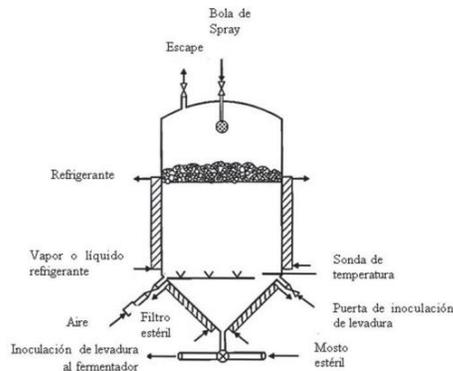
<sup>65</sup> KUNZE.W. Op. cit., p. 439.

<sup>66</sup> STEWART, G. Y RUSSELL, I. Citado por TORIBIO. Karin. Op. cit., p. 39.

<sup>67</sup> KUNZE.W. Op. cit., p. 440.

<sup>68</sup> BOLDU GONZALES. Citado por TORIBIO. Karin. Op. cit., p. 39.

**Figura 7.** Típico tanque de propagación de cultivos puros de levaduras.



Fuente. Adaptado de Stewart y Russell, Citado por TORIBIO. Karin. Op. cit., p. 39.

La propagación se realiza frecuentemente a temperaturas ligeramente más altas y con aireación intermitente, para estimular el crecimiento de la levadura. Se realiza a escalas, en una progresión de fermentaciones con aumento de tamaño. La esterilidad del mosto normalmente se asegura mediante ebullición de 30 minutos o puede ser pasteurizada utilizando un intercambiador de calor, este debe de estar estéril y ser enfriado<sup>69</sup>.

Los factores que influyen en la propagación son: el abastecimiento de oxígeno, aminoácidos y oligoelementos, así como también la temperatura, pH, y agitación. El oxígeno, es un factor importante, debido a que comienza la respiración y activa el metabolismo de la levadura, sin embargo, el contenido de azúcar del mosto inhibe la respiración y favorece el inicio de la fermentación (efecto Crabtree). Por ello no se puede aumentar la propagación por medio de aireación. El mosto se oxigena y distribuye, antes de inocularse con la levadura. Los aminoácidos y sustancias minerales contenidos en el mosto permiten realizar la fermentación, sin embargo, en el caso de propagación de levaduras, éstas, necesitan más aminoácidos y minerales que no están presentes en el mosto, de manera que la propagación se detiene en un crecimiento celular de aproximadamente 100 a 140 millones de células de levadura/ml, aun cuando se encuentre bajo condiciones de aireación<sup>70</sup>.

En la propagación de cultivo puro de levaduras se diferencia tres etapas:

<sup>69</sup> STEWART, G. Y RUSSELL, I. Citado por TORIBIO. Karin. Op. cit., p. 40

<sup>70</sup> KUNZE.W. Op. cit., p. 439 - 440

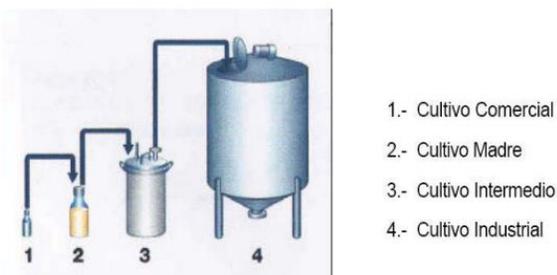
a. **Obtención de un cultivo puro:** Para la propagación del cultivo puro de levaduras, se utilizan células de una levadura que haya demostrado un buen comportamiento en la práctica. Estas levaduras se encuentran en “Bancos de levadura”, de Instituciones dedicadas al mantenimiento y comercialización de cepas puras. Existen cuatro tipos de levaduras utilizadas en propagación, estas son: - **Las levaduras liofilizadas:** generalmente vienen en sobres o paquetes en presentaciones de 5 g, 11 g o 500 g, algunas marcas conocidas son Lallemand, Danstar o Fermentis. Se estima que la viabilidad de este tipo de levadura decae aproximadamente en cuatro por ciento, por mes desde su fecha de fabricación o almacenamiento. - **Levadura comercial líquida:** Se adquiere comercialmente en presentaciones de viales o sachet las marcas más conocidas son de White Labs o Wyeast. Estas tienen una cantidad aproximada de 100 billones de células/paquete. La viabilidad de esta levadura decae aproximadamente en 21 por ciento, por mes desde su fecha de fabricación, comercialmente dura cuatro meses. - **Levaduras recuperadas:** Son levaduras de una fermentación anterior recuperada y almacenada en un ambiente refrigerado. Posee una viabilidad menor a las levaduras líquidas, debido a que el medio en el que se encuentra tiene presencia de alcohol, no tiene nutrientes y oxígeno. (d) **Levadura conservada:** Son las levaduras comercializadas por los “Bancos de levadura”.

b. **Propagación en el 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: (a) Recuperación de la cepa, las cepas utilizadas en cervecerías se encuentran generalmente conservadas en tubo de agar inclinado, en un cultivo liofilizado o comercial. (b) crecimiento en un medio de cultivo sólido. La suspensión de microorganismo es incubada en un medio de cultivo sólido bajo condiciones y temperaturas adecuadas para su crecimiento. (c) crecimiento en un medio de cultivo líquido o también denominado “cultivo madre”. (d) A partir de este se prepara el cultivo intermedio (Balón de Carlsberg) y finalmente el cultivo industrial en el tanque de propagación (figura 7).<sup>71</sup>

---

<sup>71</sup> CABEZA, E. A. Cultivos Estárter: Seguridad, funcionalidad y propiedades tecnológicas. Simposio Regional de Microbiología. Barranquilla, Colombia: Universidad de Pamplona. 2006. p. 3. [En línea]. Disponible en: [https://www.academia.edu/992790/Cultivos\\_Est%C3%A1rter\\_Seguridad\\_funcionalidad\\_y\\_propiedad\\_des\\_tecnol%C3%B3gicas](https://www.academia.edu/992790/Cultivos_Est%C3%A1rter_Seguridad_funcionalidad_y_propiedad_des_tecnol%C3%B3gicas)

**Figura 8.** Preparación de cultivos Starters.



Fuente. Cabeza Herrera, 2006. p. 3.

Según Kunze, “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”<sup>72</sup>, según la Tabla 4. Transfiriéndose luego a un balón de Carlsberg (figura 8), 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.

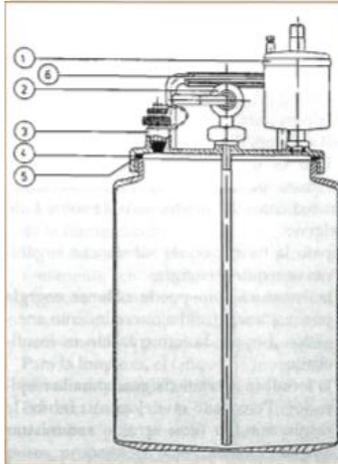
**Tabla 4.** Volúmenes de propagación en laboratorio.

<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. elaboración propia.

<sup>72</sup> KUNZE.W. Op. cit., p. 441

**Figura 9.** Balón de Carlsberg



Fuente: Tomado de KUNSE. W. Tecnología para cerveceros y malteros. p 441.

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. Un régimen típico de propagación de laboratorio se muestra en la Figura 9. 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<sup>73</sup>.

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.<sup>74</sup>

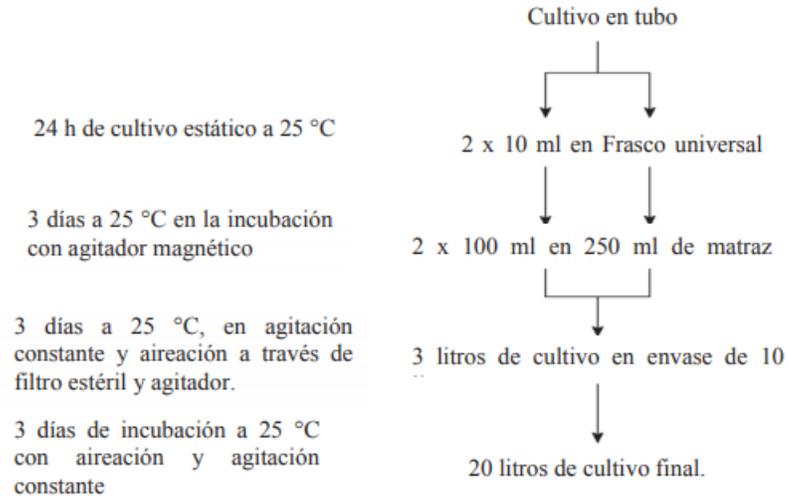
Según Pascual, “el crecimiento de la levadura en la etapa de propagación en laboratorio está influenciada por: (a) volumen de mosto utilizado en cada paso de la propagación, (b) Densidad del mosto utilizado y (c) la concentración estimada de células de levadura antes de propagar.”<sup>75</sup>

<sup>73</sup> BOULTON Y QUAIN, D. Citado por TORIBIO, Karin. Op. cit., p.30.

<sup>74</sup> KUNZE.Wolfgang. Op. cit., p. 444

<sup>75</sup>PASCUAL, Guillermo. Calculadora de inóculo y propagación de levadura. Descubriendo Cervezas. [en línea], 6 de marzo de 2019. Disponible en internet: [http:// descubriendo cervezas.blogspot.com/2014/03/calculadora-de-inoculo-y-propagacion-de.html](http://descubriendocervezas.blogspot.com/2014/03/calculadora-de-inoculo-y-propagacion-de.html)

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



Fuente. Adaptado de Boulton & Quain, 2006, pág. 491.

**c. Propagación en planta:** La última fase de propagación ocurre en la planta, se trabaja bajo condiciones estériles y se debe de contar con las instalaciones adecuadas para la propagación de levadura, que consiste en recipientes cerrados de diferentes tamaños, de acero inoxidable<sup>76</sup>. Las cervecerías modernas consideran que la levadura se debería de obtener en el menor tiempo posible y que se deberían estar en un estado fisiológico óptimo. Esto se podría lograr mediante el cuidadoso control de la temperatura y oxigenación. Sin embargo, la propagación en el mosto está limitada por el metabolismo de represión catabólica.

Esto se podría evitar mediante el crecimiento por oxidación en una fuente de carbono, tales como el glicerol y etanol o como en el caso de la industria panadera, se utilizaría un enfoque de alimentación por lotes. En donde, se aseguraría que la fuente de carbono se mantenga a bajas concentraciones en todo momento y la represión no se activa. Estos enfoques aún no se han aplicado en la elaboración de la cerveza a escala de producción<sup>77</sup>.

La duración de todo el proceso de propagación, demanda varias semanas de trabajo, el proceso es lento y el uso de múltiples fermentadores eleva el coste de instalación, mantenimiento y de operación.

<sup>76</sup> KUNZE.Wolfgang. Op. cit., p. 442.

<sup>77</sup> BOULTON Y QUAIN, D. Citado por TORIBIO. Karin Op. cit., p. 32

**1.6.1.7 Subcultivos o “Re-pitching” en las cervecerías.** 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, re-floculación 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. Sin embargo, es un proceso muy utilizado en todas las cervecerías del mundo, debido a que disminuye el tiempo de propagación y producción de cerveza<sup>78</sup>.

Algunas cervecerías tradicionales, especialmente aquellas que utilizan cepas ale han seguido esta práctica durante muchos años sin interrupción. Sin embargo, en las cervecerías modernas, se limita el número de serie de fermentaciones, cuando se alcanza el número permitido de generaciones, para evitar la deriva genética y contaminaciones bacterianas y de levaduras silvestres que pueden conducir a un bajo rendimiento de fermentación y a una cerveza inconsistente y de mal sabor.

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<sup>79</sup>. 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.

El re-pitching en serie tiene importancia en la industria cervecera, desde el punto de vista económico, ya que disminuye los recursos y el tiempo de propagación, y esta práctica es y seguirá siendo la más utilizada en cervecería, no obstante, las investigaciones sobre su impacto en la levadura se siguen estudiando.

---

<sup>78</sup> BOULTON Y QUAIN, D. Citado por TORIBIO. Karin Op. cit., p. 32

<sup>79</sup> Ibid., p. 33.

**1.6.1.8 Metabolismo de la levadura en el mosto.** El metabolismo de la levadura en el mosto es complejo y muchos de sus aspectos aún no sean dilucidados plenamente. Las reacciones del crecimiento de las levaduras durante la fermentación y la conversión del mosto en cerveza, son parte del metabolismo celular de la levadura. Por tanto, la fermentación cervecera es una manifestación del crecimiento de la levadura y la cerveza es el subproducto de esa actividad.

Se mencionará, aquellos aspectos que son propios de la fermentación de cerveza, en particular, los factores que controlan el flujo de carbono y otros nutrientes entre la formación de la biomasa, etanol y la formación de metabolitos que contribuyen al sabor de la cerveza.

**1.6.1.9 Factores que influyen en la bioquímica de la Fermentación.** Según Boulton y Quain, “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<sup>80</sup>.

La composición del mosto, contiene carbohidratos asimilables, una amplia gama de aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas simples, sales de minerales y vitaminas que satisfacen todas las necesidades de las levaduras, es un medio de cultivo rico<sup>81</sup>.

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<sup>82</sup>.

En el mosto aromatizado con lúpulo, se encuentra la siguiente composición:

**a. 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.

---

<sup>80</sup> BOULTON Y QUAIN, D. Citado por TORIBIO. Karin Op. cit., p. 37

<sup>81</sup> HOUGH, J. S.Op., cit. p. 133

<sup>82</sup> TAIDI, Behnam. et al., Wort Substitutes and Yeast Nutrition. Citado por: SMART. Katherine. Brewing Yeast Fermentation Performance. 2 ed. Estados Unidos. Blackwell Science. 2003. p. 88. ISBN: 9780470696040

- b. 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.
- c. 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.
- d. 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. Según Klimovitz y Bamforth, “el calcio favorece la formación de lectina en la pared celular y facilita la unión lectina-manosa entre las células de la levadura. La presencia de azúcares (como la manosa) o de proteínas tipo lectina en el mosto pueden bloquear los sitios de atracción de la pared de la célula e interrumpir la floculación”<sup>83</sup>. 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<sup>84</sup>.

---

<sup>83</sup> KLIMOVITZ, Ray. Y BAMFORTH, Charles. El cervecero en la práctica: un manual para la industria cervecera. 3 ed. Estados Unidos. Master Brewers Association of the Americas. 2002. p. 363-364

<sup>84</sup> KUNZE.Wolfgang. Op. cit., p. 49.

El mosto tiene una composición adecuada que proporciona un medio potencial a las levaduras para que se reproduzcan, sin embargo, este potencial, está controlado por otros parámetros tales como la temperatura, el pH, la oxigenación y la tasa de inoculación. Si algunos de estos parámetros varía, incluido la composición del mosto, la levadura desarrollara sus propias estrategias para crecer, por tanto, producirá cambios deseables o no deseables en la obtención de la cerveza.

Los parámetros que influyen en la fermentación en el mosto son:

- a. La temperatura:** es el factor de influencia decisiva para las actividades de las levaduras. La temperatura óptima dependerá de la cepa utilizada. Este factor afecta e influye directamente en la velocidad de fermentación. Por ejemplo, las temperaturas a las que normalmente se fermentan las cervezas de tipo Ale harán que la levadura produzca ésteres y otros subproductos deseados en este tipo de cervezas. En cambio, en las cervezas tipo Lagers una temperatura mayor a la recomendada para estas cervezas, acortará el proceso de fermentación, pero los subproductos producidos, en este caso, pueden ser no deseados<sup>85</sup>.
- b. El pH:** Los microorganismos se diferencian entre sí, según el valor de pH óptimo. Las levaduras crecen preferentemente con valores ácidos de pH. En la fermentación alcohólica, el pH varía normalmente entre un mínimo de 2.8 y un máximo de 3.8, rango que depende básicamente de la composición del medio a ser fermentado. Los valores menores a 3.0, pueden presentar el fenómeno de inhibición por pH, en donde los centros activos de las enzimas se ionizan y pierden actividad enzimática. El pH también depende del tipo de agua y su tratamiento con ácidos y/o sales de calcio<sup>86</sup>.
- c. La oxigenación:** La velocidad de fermentación al inicio del proceso fermentativo, depende estrechamente de las condiciones de aireación, desarrollándose dicha fermentación más rápidamente cuando las levaduras están mejor aireadas. En la elaboración de cerveza el mosto es generalmente aireado con oxígeno puro a través de la inyección a presión de aire estéril<sup>87</sup>. La

---

<sup>85</sup> GIGLIARELLI, Pablo. Op cit., p.253.

<sup>86</sup>SUÁREZ LEPE, José Antonio. A. Y IÑIGO LEAL. Baldomero. Microbiología enológica: fundamentos de vinificación. Citado por TORIBIO, Karin. Evaluación de la estabilidad como stater de *Saccharomyces Pastorianus ssp. Carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo lager. [En línea]. Trabajo de grado para obtener el grado de Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de ciencias, 2015. p. 39. [Consultado: de marzo de 2019. Disponible en Internet: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1894/Q02.T67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

<sup>87</sup> SUÁREZ LEPE, José Antonio. A. Y IÑIGO LEAL. Baldomero. Citado por: TORIBIO. Karin. Op. cit., p. 39.

concentración de oxígeno dependerá de la cepa de levadura utilizada y de sus requerimientos. El crecimiento de la levadura está limitado por el oxígeno. Por tanto, variando las dosis de oxígeno se puede tener un control del crecimiento de la levadura y, por consiguiente, de ciertos perfiles en la cerveza. Si la cantidad de oxígeno disuelta en el mosto es pobre, al momento de la adición de levadura, se tiende a producir una cantidad mayor de ésteres, la levadura perderá viabilidad y la fermentación será lenta o incompleta. Una cantidad adecuada concentración de oxígeno en el mosto es de aproximadamente 8 a 14 ppm, que disminuirá el tiempo de adaptación y aumentará la tasa de crecimiento de la levadura asegurando una buena fermentación<sup>88</sup>.

#### **1.6.1.10 Compuestos excretados por la levadura, que componen la cerveza.**

El etanol es el compuesto de mayor cantidad producida por la levadura durante la fermentación del mosto, este alcohol primario tiene poco impacto en el sabor de la cerveza final. El tipo y concentración de otros muchos productos de excreción de levadura son los que determinan principalmente el sabor. La formación de estos productos de excreción depende del equilibrio metabólico global del cultivo de levadura, y de muchos otros factores nutricionales y ambientales. Los compuestos que otorgan sabor a la cerveza son: compuestos volátiles, los ácidos grasos y orgánicos, alcoholes, ésteres, carbonilos, compuestos de azufre, aminas, fenoles, entre otros.<sup>89</sup>

Los Ácidos grasos y orgánicos, derivan en parte, de la malta y de otros constituyentes del mosto, pero otra proporción surge como resultado del metabolismo de la levadura durante la fermentación. Los ácidos grasos de cadena corta y los ácidos orgánicos, surgen del metabolismo de los carbohidratos e incluyen el piruvato, succinato, citrato, y acetato. Se presume que la mayoría de estos surge como resultado del ciclo incompleto del ácido tricarbóxico, que se da en condiciones anaeróbicas. Se ha observado que el piruvato se secreta en el mosto durante la fase de fermentación activa y en etapas posteriores, cuando el crecimiento de la levadura ha cesado. Los ácidos grasos de cadena media se producen como productos intermedios de la formación de los ácidos grasos de cadena larga, estos formaran parte de las distintas clases de lípidos de la levadura. La liberación de ácidos grasos de cadena de media y larga durante la fermentación, está probablemente asociado con cierta pérdida de la viabilidad de la levadura y lisis celular. Este proceso, ocurre durante la fase de maduración de la cerveza.

---

<sup>88</sup> GIGLIARELLI, Pablo. Op. cit., p. 254.

<sup>89</sup> STEWART, G. Y RUSSELL, I. Citado por TORIBIO. Karin. Op. cit., p. 47.

**1.6.1.11 Estabilidad de cultivos de levadura en cervecería.** La estabilidad de cultivos de levadura en cervecerías, se entiende como la capacidad de una población de levaduras para realizar una óptima fermentación y obtener una buena cerveza, esta se mide a través de su viabilidad y vitalidad de los cultivos.

- **Viabilidad.** 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.<sup>90</sup>
- **Vitalidad.** La vitalidad de la levadura es una expresión de la capacidad de una población de levaduras para crecer, reproducirse e interactuar con el medio ambiente<sup>5</sup>, 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.<sup>91</sup>

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 cervecerías estas pruebas se realizan paralelamente.

Las pruebas de vitalidad comúnmente empleadas son:

---

<sup>90</sup> BOULTON, C., Y QUAIN, D. Citado por TORIBIO, Karin. Op cit., p. 49.

<sup>91</sup> MASKELL, Dawn. et al., Chronological and replicative lifespan in lager brewing yeast. Oxford, UK. K. A. SMART (Ed.) 2003. p. 281-290.

- a. **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.
- b. **La prueba del poder de acidificación**, 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<sup>92</sup>.
- c. **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.
- d. **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<sup>93</sup>.

Sobre la «Comparación de los métodos de viabilidad/vitalidad de la levadura y su relación con el rendimiento de la fermentación.» concluyeron que la interpretación de la "salud de la levadura" debe ser un enfoque multitécnica, ya que la "vitalidad" o "viabilidad" de la levadura se refleja en varios sistemas celulares. Por tanto, en las cervecerías se considera el rendimiento de la levadura como la capacidad de la levadura para atenuar el mosto<sup>94</sup>.

Sin embargo, no existe una única prueba standard para evaluar la vitalidad de la levadura, no hay consenso para la evaluación de la vitalidad, sin embargo, las pruebas de vitalidad presentan información de la condición fisiológica de toda la población de células de levadura y en las cervecerías, se evalúa la vitalidad como la capacidad de la levadura para modificar el mosto, mediante la evaluación de la variación en los parámetros de: porcentaje de alcohol en v/v, porcentaje de extracto aparente en p/p y el grado aparente de fermentación (ADF %). Se

---

<sup>92</sup> OPEKAROVA, M; SIGLER, K. Acidification power: indicator of metabolic activity and autolytic changes in *Saccharomyces cerevisiae*. UK. Folia Microbial. 1972. Pág. 395-403

<sup>93</sup> STEWART, G. Y RUSSELL, I. Citado por TORIBIO. Karin. Op. cit., p. 51.

<sup>94</sup> WHITE, L. Comparison of yeast viability/vitality methods and their relationship to fermentation performance. Brewing Yeast Fermentation Performance (2da Edición). Oxford, Inglaterra. Blackwell Science. 2003. Pág. 138-147

consideran a estos parámetros como los más importantes en las cervecerías, por el impacto que tienen en la toma de decisión.

Las mediciones se evalúan durante la fermentación y parte del líquido que se mide está compuesto de alcohol, cuya densidad es menor que del agua. Por tanto, la palabra “Aparente”, indica una muestra con alcohol, es por eso que todas las mediciones son aparentes y no reales.

El equipo con el cual se mide todos los parámetros de vitalidad es el “Alcolyzer Beer Analyzing System”, equipo de última generación, que tiene rangos de medición y repetitividad muy exactos. Con este equipo, la medición de alcohol en los análisis es expresado como porcentaje de etanol en volumen (% v/v). El sistema “Alcolyzer Beer”, se basa en la medición de la Espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR), es una técnica no destructiva, simple y rápida, que proporciona análisis de prácticamente cualquier matriz con los niveles de exactitud y precisión que son comparables a los métodos de referencia primarios.

## 1.7 CARACTERÍSTICAS INDUSTRIALES DE LA LEVADURA CERVECERA

El tipo de cerveza está definido por la levadura a utilizar, sin embargo, estas levaduras tienen como características industriales de interés en su comportamiento lo siguiente<sup>95 96</sup>

- a. Capacidad de multiplicación:** La capacidad de multiplicación está asociada con la concentración del inóculo, y es necesario que la dosis inicial tenga un período corto de adaptación y que sea capaz de una rápida multiplicación que asegure una baja del pH inicial y protección de contaminaciones no deseadas. Una dosis baja retardaría la baja del pH y no se produciría una adecuada atenuación. Y con una dosis elevada acelera la fermentación, pero las células más viejas producen autólisis que provocan un sabor espeso y desagradable a la futura cerveza.
- b. Alto poder fermentativo:** Se necesita que la levadura metabolice rápidamente la mayor cantidad de azúcares posible. El motivo es para conseguir cervezas menos dulces y con menor valor energético. Además de evitar el crecimiento de células en la botella.
- c. Resistencia a la degeneración:** El cervecero observa datos prácticos como: Fermentaciones perezosas (aumento del tiempo de arranque), aumento de la floculación de las levaduras antes de llegar al punto de atenuación requerida, y

---

<sup>95</sup> MARTINEZ QUESADA, M. Hongos domésticos: *Saccharomyces uvarum*. Micobotánica-Jaén. 2012. Disponible en: <http://www.micobotanicajaen.com/>.

<sup>96</sup> BOLDU GONZALES. Citado por TORIBIO. Karin. Op. cit., p. 52.

disminución de la biomasa de levadura después de las fermentaciones. Estos datos indican pérdida de la vitalidad de la levadura, que sería provocado por la degeneración de las levaduras. Los cerveceros seleccionan levaduras capaces de mantener sus características de fermentación por varias generaciones y que tengan una baja mortalidad.

- d. Baja producción de cetonas:** Las levaduras producen inicialmente diacetilo y acetona de sabor desagradable, y en la fase final de la fermentación las eliminan al exterior. Se buscan cepas que sean capaces de eliminar al límite estos metabolitos.
- e. Resistencia al alcohol:** El grado alcohólico del sustrato va aumentando a lo largo del proceso de fermentación. El alcohol producido es inhibidor del metabolismo de las células. Se necesitan las cepas sean capaces de continuar su metabolismo a mayores concentraciones de alcohol para que el ciclo se acorte.
- f. Alcoholes y ácidos producidos:** Cada cerveza tiene un perfil organoléptico que define su calidad gustativa. Se buscan cepas que tengan acentuada producción de las especies químicas que definan la cerveza.
- g. Elevada floculación:** El término "floculación" se refiere a la tendencia a formar los grupos de flóculos de levadura. El aspecto más importante de las características de floculación de una cepa de levadura cervecera es el momento en que la levadura flocula, ya que levaduras con una floculación temprana producirán cervezas poco atenuadas; sin embargo, cuando la floculación tiene lugar a estados avanzados de la fermentación se obtienen cervezas poco clarificadas o turbias a la vista. La floculación está influenciada por factores físicos y químicos y la manifestación de esta propiedad es muy dependiente de la presencia de iones metálicos, especialmente del  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>97</sup>

Durante la etapa de crecimiento estacionario se produce un mecanismo en el cual las células de levadura segregan lecitina a la superficie celular y a través de estas lecitinas se unen unas a otras células, produciéndose la floculación, este mecanismo solo se produce cuando la concentración de azúcar es baja, en la solución acuosa circulante, en altas concentraciones de azúcar se inhibe la floculación. Además, el pH debe de estar en un rango por encima del punto isoeléctrico y debe de haber presencia de calcio<sup>98</sup>.

---

<sup>97</sup> HOUGH, J. S.Op., cit. p. 156.

<sup>98</sup> BOLDU GONZALES. Citado por TORIBIO. Karin. Op. cit., p. 53.

## 1.8 PROCESOS ANOMALOS QUE SUFREN LAS LEVADURAS EN CERVECERIA

Las levaduras utilizadas en el proceso de elaboración de la cerveza, son sometidas a condiciones críticas que alteran su metabolismo y fisiología, se han observado los siguientes aspectos en las levaduras:

- a. **Mutación de la levadura:** En el proceso cervecero las mutaciones pueden deberse por las malas prácticas en el manejo de la levadura (condiciones externas de almacenamiento, lavado ácido, contaminación con levaduras diferentes, etc.). Sin embargo, no es muy común que se presenten mutaciones a gran escala en el proceso típico cervecero. Las mutaciones más comunes que se pueden presentar son: La levadura no flocula adecuadamente (separación difícil); no asimilación de la maltotriosa, pudiendo generar fermentaciones con precipitación temprana; respiración deficiente, en donde la levadura presenta deficiencias en su respiración generando malas fermentaciones<sup>99</sup>.
- b. **Degeneración de la levadura:** Esta se refiere al deterioro gradual de su desempeño como cepa cervecera, afectando el curso de la fermentación y es un fenómeno complejo que se atribuye a causas diversas: sucesivos ciclos de asimilación que producen envejecimiento prematuro de las mitocondrias y las células mueren, falta de iones en el mosto, exceso de “turbas” frío en el mosto, pérdida de poder respiratorio de la levadura, entre otros<sup>100</sup>.
- c. **Cepas killers:** Las levaduras killer son encontradas y aisladas en numerosos medios naturales como cerveza y vino. El carácter killer fue descubierto en las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* de laboratorio al observar que ciertas levaduras eran capaces de inhibir el crecimiento de otras, de forma similar a como sucedía al emplear antibióticos para impedir el desarrollo de las bacterias. Las levaduras killer, se caracterizan por secretar una toxina proteica, llamada “toxina killer” que es letal para cepas sensibles de su misma especie o especies de diferentes géneros, pero siendo ellas mismas inmunes a sus propias toxinas. Las toxinas killer actúan sobre las levaduras sensibles, provocando alteraciones a nivel de la membrana plasmática que en definitiva provocan una alteración del gradiente electroquímico de la célula con la consiguiente muerte celular<sup>101</sup>.

---

<sup>99</sup> HEGGART, Heather. Factors Affecting Yeast Viability and Vitality Characteristics: A Review. Master Brewers Association of the Americas. Wisconsin. Estados Unidos. [En línea]. 1999. Pág. 383-406. Disponible en: <https://www.worldcat.org/title/factors-affecting-yeast-viability-and-vitality-characteristics-a-review/oclc/44373637>

<sup>100</sup> BOLDU GONZALES. Citado por TORIBIO. Karin. Op. cit., p. 56.

<sup>101</sup> BUSTAMANTE, Luis. Sistema Killer de levaduras. Universidad de Talca (Chile). Escuela de Tecnología Médica. 2010. Disponible en: <http://dspace.otalca.cl/handle/1950/8636>

**d. Contaminación por levaduras salvajes y bacterias:** Se considera como “levadura salvaje” o “silvestre” cualquier espécimen que no corresponda al utilizado en el proceso y que aparece como contaminante del medio o equipos de trabajo. Algunos tipos de levaduras salvajes, pueden producir velos (turbidez), malos olores, sabores anormales, floculación deficiente y fermentación diferente. Algunas de las levaduras salvajes más comunes en cervecería son: *Saccharomyces elipsoideus*, *S. turbidans*, *S. pastorianus*, *S. chevaliere*, *Cándida utilis*, *C. tropicales* y *C. mycodema*<sup>102</sup>. Las bacterias contaminantes provocan turbidez y generan olores y sabores anómalos. Las bacterias Gram positivas que causan graves problemas, son las bacterias ácido láctico. Pertenecientes a los géneros: *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Las bacterias ácido lácticas representan una contaminación grave de la cerveza y producen cantidades importantes de metabolitos indeseables, entre los que se halla el precursor del diacetilo, responsable del aroma y sabor a mantequilla<sup>103</sup>.

Con base a la teoría explicada anteriormente en el siguiente capítulo, se procede a explicar la metodología detallada de la cerveza tipo Pale Ale Belga, los parámetros para la reutilización de levadura en nuevos fermentativos, la fase de propagación del inóculo, los análisis microbiológicos a realizar, la viabilidad y vitalidad de la muestra y, las condiciones de fermentación a escala banco; de esta manera en los posteriores capítulos se expondrán los resultados de los parámetros a evaluar y, el análisis de costos para dar cumplimiento a los objetivos propuestos.

---

<sup>102</sup> HEGGART, Heather. Op. Cit., p. 383-406.

<sup>103</sup> HOUGH, J. S.Op., cit. p. 126-127

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 CERVEZA ARTESANAL: ELABORACIÓN DE CERVEZA TIPO PALE ALE BELGA EN LA CERVECERÍA MOONSHINE

En materia de elaboración de cervezas, el volumen de producción de un establecimiento, sin duda alguna, marca una diferencia fundamental. De ello se deriva una enorme distancia que separa empresas como Heineken, Budweis, Corona, entre otras y, las pequeñas fábricas artesanales diseminadas por todo el mundo<sup>104</sup>.

Las cervecerías artesanales o microcervecería son fábricas que producen un volumen limitado de cerveza. Siempre son mucho más pequeñas que las fábricas corporativas de gran escala y en todos los casos sus dueños son independientes y se consideran también como cerveceros artesanales. La **Brewers Association** de Estados Unidos, establece tres requisitos básicos para considerar a un cervecero como artesanal: **a)** Ser productores de volúmenes pequeños **b)** ser independiente y no estar relacionados con ninguna gran empresa fabricante y **c)** cuidar el aspecto tradicional de su método de elaboración<sup>105</sup>.

Actualmente la microcervecería Moonshine produce un tipo de cerveza tipo **Pale Ale Belga**, la cual es la fuente principal de este proyecto de grado. Esta cerveza se caracteriza por poseer un color amarillo cobre y una claridad brillante, un aroma ligeramente dulce gracias lúpulos y su espuma difiere entre un blanco moderado y un blanco pálido y puede escasear debido a la baja carbonatación.

La microcervecería Moonshine comercializa y distribuye este tipo de cerveza con el nombre de **Pepper Strong Ale**, la cual cuenta con 7 grados de alcohol y con 35 grados de amargor (IBUs) respectivamente; es una cerveza de alcohol medio, balanceada con un toque de pimienta negra y semillas de mostaza.

### 2.2 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA PALE ALE BELGA FABRICADA EN LA MICROCERVECERÍA MOONSHINE

A continuación, se explica la metodología para la elaboración de la cerveza tipo **PALE ALE BELGA** incluyendo sus materias primas y las marcas que implementa la microcervecería.

---

<sup>104</sup> GONZALEZ, Marcos. Op. Cit., p. 5.

<sup>105</sup> *Ibíd.*, p. 6.

**2.2.1 Recepción de la materia prima.** A continuación, se detallan las materias primas implementadas en la elaboración de la cerveza tipo Pale Ale Belga en la microcervecería Moonshine, con sus respectivas marcas y distribuidores.

**a) Malta:** para este tipo de cerveza se necesitan cuatro tipos de granos diferentes, como lo es la malta Munich, la Special B, la Pilsen 2RP y, la Crystal. Estas maltas son importadas de una maltería ubicada en Bélgica, conocida como *Castle Malting*, la cual produce una variedad de maltas de calidad Premium. Estas maltas cuentan con calidades y perfiles de rendimiento considerablemente distintos de las maltas del resto del mundo, ya que presentan características específicas tales como lo es el sabor, la claridad del mosto, el color, el rendimiento, entre otros.

A continuación, se explican las características de cada una de las maltas implementadas en el proceso de elaboración de la cerveza

**Cuadro 1.** Tipos de maltas usadas en la elaboración de cerveza tipo Pale Ale Belga.

<p style="text-align: center;"><b>Múnich</b></p> <p>Malta rica y dorada. Intensifica ligeramente el color acercándolo a un agradable color naranja dorado. Añade un marcado sabor de malta y grano a numerosos estilos de cerveza sin afectar ni a la estabilidad ni al cuerpo de la espuma. También se utiliza en pequeñas cantidades en combinación con la malta Pilsen 2RS a fin de producir cervezas de color claro mejorando su sabor a malta.</p>	
	<p style="text-align: center;"><b>Pilsen 2RP</b></p> <p>Malta con un color claro, tiene un proceso de maceración fácil con una infusión simple de una sola temperatura, es muy usada como malta base debido a su potencia enzimática.</p>

**Cuadro 2.** Continuación.

<p style="text-align: center;"><b>Crystal (caramelo)</b></p> <p>es una malta color caramelo-cobre que proporciona aroma y sabor rico de malta a las cervezas, es una malta diferente a otras tradicionales ya que tiene una mayor potencia diastática (poder enzimático de la malta) y le proporciona a la cerveza un amargor más suave.</p>	
	<p style="text-align: center;"><b>Special B</b></p> <p>Es utilizada para obtener coloraciones rojas oscuras y conseguir un mayor cuerpo en la cerveza, tiene matices de sabor a nueces y ciruelas.</p>
<p><i>Las especificaciones técnicas correspondientes a parámetros específicos de las maltas utilizadas en el proceso se detallan en los <b>ANEXOS A, B, C y D.</b></i></p>	
<p>Fuente: elaboración propia.</p>	

- b) Lúpulo:** Para esta cerveza se utilizan dos tipos de lúpulos diferentes, uno encargado del amargor y el sabor y, el otro especializado en las propiedades de la una pale ale americana. Estos lúpulos los provee la distribuidora de insumos de cerveza DISTRINES S.A.

**Cuadro 3.** Lúpulos usados para la preparación de la cerveza.

<p style="text-align: center;"><b>Lúpulo el dorado</b></p> <p>Este lúpulo es muy bueno para intensificar el amargor y el sabor, agregando a la cerveza sabores de frutas como tropicales y, aromas a pera, sandía y durazno.</p>	<p style="text-align: center;"><b>DETALLES DEL AROMA</b> Tropical, Limón y Vainilla.</p> 
<p style="text-align: center;"><b>AROMA EVALUATION</b></p> 	<p style="text-align: center;"><b>Cascade</b></p> <p>Define el estilo americano Pale Ale. El cascade es una explosión de sabor y aroma picante con altos niveles de aceite mirceno. El sabor cítrico está respaldado en tonos florales suaves.</p>
<p>Fuente: Elaboración propia.</p>	

- c) **Levadura:** Para la cerveza tipo Pale Ale Belga se utiliza levadura denominada *Saccharomyces cerevisiae* conocida como **SafAle s-04**. Esta levadura es una levadura seca, especializada para la cerveza Ale. De igual manera, la levadura se provee en la distribuidora de insumos DISTRINES S.A.

**Cuadro 4.** Levadura usada en la etapa fermentativa.

<p style="text-align: center;"><b>SafAle S-04</b></p> <p>Cepa ale inglesa seleccionada por su rápida capacidad fermentativa y por formar un sedimento compacto al final de la fermentación, ayudando a mejorar la claridad de la cerveza.</p>	
<p>Fuente: Elaboración propia.</p>	

d) **Otros:** En este ítem se tiene en cuenta las adicciones que se le hacen al mosto en la etapa de cocción, con el fin de darle un sabor y aroma característicos, para ello se adiciona pimienta negra y semillas de mostaza. Además, se adiciona un clarificante conocido como Whirlfloc y azúcar blanca para modificar las condiciones específicas del mosto, que se mencionan a continuación.

**Cuadro 5.** Adicciones al mosto para dar sabor y olor a la cerveza tipo Pale Ale Belga.

<p style="text-align: center;"><b>Pimienta Negra</b></p> <p>Brinda un delicioso sabor y aroma a la cerveza.</p>	
	<p style="text-align: center;"><b>Semillas de mostaza</b></p> <p>Brinda un delicioso sabor y aroma a la cerveza.</p>
<p style="text-align: center;"><b>Whirlfloc</b></p> <p>Permite la precipitación de proteínas y beta glucanos que causan turbidez. Se obtienen cerveza más claras y brillantes.</p>	
	<p style="text-align: center;"><b>Azúcar</b></p> <p>Su uso radica en el aumento de los grados brix del mosto durante la etapa de cocción.</p>
<p>Fuente: elaboración propia.</p>	

**2.2.2 Elaboración del mosto.** En la microcervecería Moonshine realizan las siguientes etapas de elaboración.

- a) **Pesaje de granos:** En esta etapa se realiza el pesaje de los cuatro tipos de malta que se utilizan para la elaboración de la cerveza tipo Pale Ale Belga, es decir, de la malta Pilsen 2RP, Múnich, Special B y Crystal; también se realiza el pesaje de las adiciones como lo son la pimienta negra y las semillas de mostaza y, finalmente también del lúpulo.

A continuación, se muestran algunas de las evidencias tomadas el día de la elaboración del mosto.

**Fotografía 1.** Maltas pesadas listas para la molienda.



Fuente. elaboración propia

**Fotografía 2.** Pesaje de la pimienta negra.



Fuente. elaboración propia.

**Fotografía 3.** Pesaje de semillas de mostaza.



Fuente. elaboración propia.

**Fotografía 4.** Lúpulo pesado.



Fuente. elaboración propia.

- b) Molienda:** Su importancia radica en que de ella depende la eficiencia de la extracción de los azúcares atrapados en el grano. Para realizar la molienda se hace uso de un molino cervecero. De igual manera, para moler las semillas de mostaza y la pimienta negra se hace uso de un molino manual de café, como se muestra en las siguientes imágenes.

**Fotografía 5.** Molino cervecero.



Fuente. elaboración propia.

**Fotografía 6.** Molino de café.



Fuente. elaboración propia.

- c) Maceración:** Se realiza por medio de dos ollas maceradoras; es decir, en la primera olla se realiza el proceso de calentamiento del agua hasta  $73^{\circ}\text{C}$  que

luego será llevada a la segunda olla para hacer el lavado del grano, realizando lo que se conoce como una infusión. Durante este proceso es vital la agitación constante para que todas las propiedades del grano se aprovechen al máximo, de esta manera se transformara el almidón de las maltas, en azúcares, mediante procesos enzimáticos y bioquímicos naturales. El proceso de maceración se realiza por una hora aproximadamente.

A continuación, se logra evidenciar a grandes rasgos lo que se realiza en la etapa de la maceración.

**Fotografía 7.** Ollas de maceración.



Fuente. elaboración propia.

**Fotografía 8.** Mezclado de las maltas.



Fuente. elaboración propia

**Fotografía 9.** Agitación constante.



Fuente. elaboración propia.

**Fotografía 10.** Residuos después de la maceración.

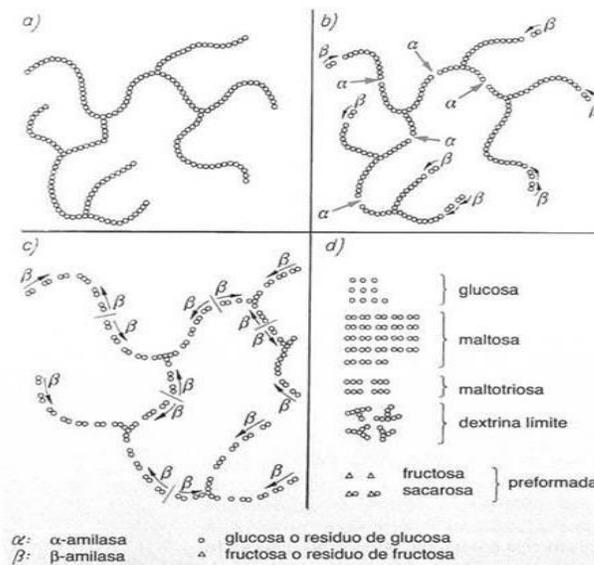


Fuente. elaboración propia.

A lo largo de la maceración se van degradando varias enzimas que serán explicadas a continuación<sup>106</sup>:

- Degradación del almidón: este debe ser degradado completamente en azúcares para que durante la fermentación estos azúcares se formen en alcohol.

**Figura 11.** Degradación del almidón durante la maceración.



Fuente. GIGLIARELLI, Pablo.  
 Fermentación. Ciencia Cervecera.  
 [en línea]. [20 de marzo de 2019].  
 Disponible en internet:  
[\[http://www.revistamash.com.ar/de-talle.php?id=379\]](http://www.revistamash.com.ar/de-talle.php?id=379)

<sup>106</sup>SANCHO, Rubén. Diseño de una micro-planta de fabricación de cerveza y estudio de técnicas y procesos de producción. [en línea]. [20 de marzo de 2019]. Disponible en internet: [\[https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/76575/02\\_Memoria.pdf?sequence=5&isAllowed=y\]](https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/76575/02_Memoria.pdf?sequence=5&isAllowed=y). p. 61 – 66.

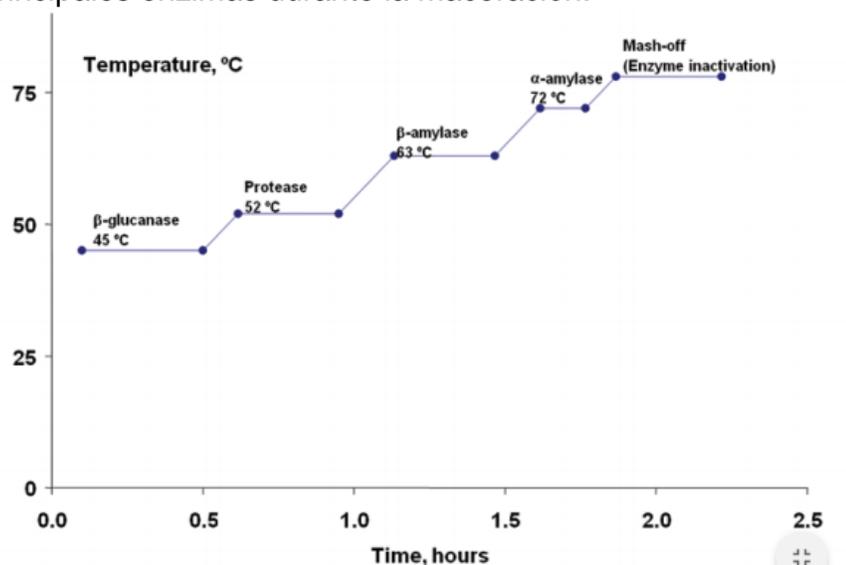
Así pues, las amilasas degradan el almidón de la siguiente forma:

- La  $\alpha$ -amilasa degrada las cadenas largas de almidón a dextrinas más pequeñas. Actúa de forma óptima a temperaturas de 72 a 75°C.
- La  $\beta$ -amilasa disocia maltosa de los extremos de la cadena no reducidos, pero también se forma glucosa y malttriosa. Actúa de forma óptima a temperaturas de 60 a 65°C.

A continuación, se explica las diferencias que existen entre los distintos productos de la degradación del almidón, en cuanto a la fermentación:

- ✓ *Dextrinas límite*: no son fermentables.
  - ✓ *Malttriosa*: es fermentada durante el proceso de maduración.
  - ✓ *Maltosa*: estos disacáridos son rápidamente fermentados por la levadura.
  - ✓ *Glucosa*: es la primera en ser utilizada por la levadura.
- Degradación del  $\beta$ -glucano: Durante el malteado pueden ser degradados entre 45 y 50°C.
  - Degradación de las sustancias albuminoides: a temperaturas de 45 a 55°C, se forman productos de degradación de proteínas de bajo peso moléculas, en especial péptidos y aminoácidos. A temperaturas de 60 a 70°C, se forman más productos de degradación de alto peso molecular. En las pequeñas fábricas de cerveza la maceración inicia a 60°C.

**Figura 12.** Rangos de temperatura de acción de las principales enzimas durante la maceración.



Fuente. GIGLIARELLI, Pablo. Fermentación. Ciencia Cervecera. [en línea]. [20 de marzo de 2019]. Disponible en internet: [<http://www.revistamash.com.ar/detalle.php?id=379>]

En la gráfica anterior, se puede observar el comportamiento de la temperatura durante el transcurso de la maceración, en la que se degradan en primer lugar, los  $\beta$ - glucanos (45°C), seguido de las proteínas (52°C), luego se degradan el almidón con las enzimas de  $\beta$ -amilasa (63°C) y la  $\alpha$ -amilasa (72°C), finalizando con la maceración a 78°C.

**e) Cocción del mosto:** Una vez finalizo la etapa de maceración, se obtiene un mosto azucarado el cual se hierve para estabilizarlo enzimática y microbiológicamente y, así coagular las proteínas. Esta ebullición se realiza en un tanque de hervido durante una hora, en la cual se van adicionando las diferentes clases de lúpulo, el azúcar, los potenciadores de olor y sabor y, por último, el clarificante en diferentes lapsos de tiempo los cuales son mostrados en la tabla 5.

**Tabla 5.** Lapso de tiempo en los cuales son agregados las adiciones al mosto.

<b>ADICCION</b>	<b>TIEMPO EN EL CUAL SE AGREGO</b>
<b>Lúpulo el dorado</b>	Al inicio de la etapa de cocción.
<b>Clarificante Whirfloc</b>	45 minutos después de comenzar la cocción
<b>Azúcar</b>	45 minutos después de comenzar la cocción
<b>Lúpulo Cascade</b>	55 minutos después de comenzar la cocción
<b>Adición de semillas de mostaza y pimienta negra</b>	Al finalizar la etapa de cocción,

Fuente. elaboración propia.

**Fotografía 11.** Adición del azúcar al mosto.



Fuente. elaboración propia.

**Fotografía 12.** Adición de semillas de mostaza y pimienta negra.



Fuente. elaboración propia.

**Fotografía 13.** Adición de lúpulo cascade al mosto.



Fuente. elaboración propia.

**Fotografía 14.** Desechos de cocción del mosto.



Fuente. Elaboración propia.

Cabe mencionar que durante la cocción del mosto suceden una serie de eventos, los cuales serán explicados a continuación<sup>107</sup>:

- **Esterilización del mosto:** Todas las materias primas usadas en la elaboración de cerveza, están llenas de bacterias; por eso, es de gran importancia eliminar estos microorganismos para no afectar el producto final, es decir, la cerveza. El lactobacilo, es la bacteria con mayor presencia en el mosto, pero, es fácil eliminarla mediante el calor. De igual manera, cabe mencionar que gracias al

---

<sup>107</sup> GIGLIARELLI, Pablo. El Hervor. Ciencia Cervecera. [en línea]. 5 de agosto del 2019. Disponible en internet: <http://www.revistamash.com/2017/detalle.php?id=364>

pH bajo sumando a la acción antibiótica de ciertos componentes del lúpulo se asegura la eliminación de los microorganismos patógenos y esporas que pueden lograr sobrevivir al hervor del mosto.

- **Inactivación enzimática:** Durante la cocción se detiene la actividad enzimática remanente y se fija la composición de los carbohidratos en el mosto.
- **Efecto de la cocción del mosto sobre las Proteínas:** es de gran importancia mencionar que el mosto contiene una gran diversidad de proteínas (sustancias albuminoideas), varias de ellas son perjudiciales y deben ser removidas porque causan turbidez y sabores indeseables; de igual manera, se presentan proteínas que ayudan en la formación de espuma, con el color de la cerveza y la sensación de esta en la boca.

Bajo condiciones favorables de cocción, las proteínas y otros polipéptidos presentes en el mosto se combinarán con los polifenoles y taninos (aportan astringencia, cierto amargor y turbidez. No aportan cualidades organolépticas, aunque sí antioxidantes y antiinflamatorias<sup>108</sup>) aportados por la malta y los lúpulos. Los cúmulos de proteínas-taninos colisionan y se adhieren entre sí hasta formar una masa y precipitar hasta el fondo de la olla, como se puede observar en la fotografía 14.

A continuación, se explica a fondo el “**hot trub**” y el “**cold trub**”, es decir, los turbios calientes y fríos.

- Hot Trub: estos turbios pueden verse a simple vista y se ven favorecidos por la adición de productos específicos que atraen las proteínas buenas del mosto. De igual forma, un pH bajo causa que los acúmulos de proteínas sean más grandes y estables.
- Cold Trub: El exceso de este producto puede reducir considerablemente el nivel de proteínas responsables de la formación de la espuma en la cerveza.
- **Coagulación de las proteínas:** es mucho más difícil, se realiza por etapas, la primera es la desnaturalización que consiste en la ruptura de puentes de hidrógeno en la molécula de proteína, manteniéndose en suspensión únicamente por su carga eléctrica; luego de la desnaturalización se produce la coagulación propiamente dicha por agrupación de micelios deshidratados, es aquí donde el pH juega un papel importante, pues la coagulación si se realiza en el punto isoeléctrico, es decir, se ha optado por un pH aproximadamente de 5,3.<sup>109</sup>

---

<sup>108</sup> HARRÁIZ, Héctor. Licenciado en Biología. [en línea]. 5 de agosto del 2019. Disponible en internet: [<http://culturillacervecera.blogspot.com/2011/04/el-lupulo.html>]

<sup>109</sup> HORNSEY, I. Elaboración de cerveza: microbiología, bioquímica y tecnología. Ed. Acribia. Zaragoza, España 2003. Capítulos 2,4,6.

- **Adición del lúpulo:** Es de gran importancia para la cerveza, ya que contribuye significativamente en el sabor y en el aroma de la cerveza, sus aceites aportan amargor imprescindible para balancear el dulzor de la malta. La cantidad de amargor se expresa en International Bittering Units (IBU).
- **Disolución e isomerización de los lúpulos:** De todas las reacciones que ocurren durante la cocción del mosto, la primera es la **isomerización** de los alfa-ácidos, ellos son los responsables del sabor amargo de la cerveza y su componente principal es la **humulona**. Una de las reacciones secundarias es la oxidación de la **lupulona** que también tiene que ver con el amargor en la cerveza.
- **Factores que afectan la utilización del lúpulo:** Al aumentar la duración la cocción, aumentan el rendimiento de la isohumulona. También, la isomerización se identifica con una mayor temperatura y un pH más alto, sin embargo; un valor pH más bajo siempre es considerado más balanceado y más fino.

Una parte considerable de isohumulona es absorbida por los turbios calientes durante la cocción del mosto, por esta razón, la mayoría de los cerveceros caseros esperan hasta que comiencen a formarse los primeros turbios para agregar el lúpulo.

- **Oxidación de la lupulona:** Como se explicó anteriormente los beta-ácidos son insolubles, pero al oxidarse, durante el almacenamiento, se producen una gran variedad de compuestos que durante el hervor del mosto estos se solubilizan. Es importante mencionar, que el amargor que se producen por la oxidación es diferente al de la isomerización; de acuerdo al punto de vista de varios investigadores dicen que el amargor de los óxidos es más suave y otros mencionan que es más astringente.
- **Aroma a lúpulo:** el lúpulo contiene aceite esencial como componente que es responsable del aroma, cada aceite imparte su propio aroma y olor; por lo general, estos aceites son solubles en mosto caliente y son muy volátiles y, se evaporan rápidamente. Suele pasar que los cerveceros adicionan este lúpulo lo más tarde posible para no perder muchas de sus propiedades.
- **Evaporación de compuestos aromáticos indeseables:** para lograr un buen perfil aromático, es de gran importancia deshacerse de las sustancias indeseables como, sulfuros de dimetilos y los productos de degradación de grasas.

Los sulfuros de dimetilo, son compuestos intensamente aromáticos presente en la cerveza y pueden ser percibidos en su aroma o en su sabor, es decir, presentan un sabor parecido al maíz hervido o a vegetales cocidos.

- **Evaporación:** el S-metilmationina (SMM) se ha convertido por efecto de calor en sulfuro de dimetilo, que es mucho más volátil y se remueve durante el hervido. Es importante mencionar que no todos los DMS son removidos durante la cocción, por esta razón al finalizar este proceso, el mosto se debe purgar antes de entrar al fermentador. Como los cerveceros artesanales no poseen tecnologías necesarias para llevar a cabo estos procedimientos, es importante que realicen la cocción en una olla sin tapar y deben enfriar el mosto lo antes lo posible antes de pasarlo al fermentador.
- **Desarrollador del color:** la caramelización de los azúcares del mosto lo oscurecen durante el hervor, a medida que las moléculas de azúcar pierden agua, estas van cambiando la forma de absorber la luz afectando el color del mosto.

De igual manera, el desarrollo del color se obtiene también a partir de la **glicación** no enzimática de proteínas, este proceso se trata de un conjunto complejo de reacciones químicas que se producen entre las proteínas y los azúcares reductores que se dan al ser calentados; estas reacciones se dan lentamente debido al bajo pH del mosto.

- **Descenso del valor pH en el mosto:** el mosto se acidifica levemente, primariamente por la precipitación del fosfato de calcio. Los iones de calcio de agua reaccionan con los fosfatos de la malta y forman fosfatos de calcio y iones de hidrogeno, que bajan el pH del mosto.

El pH del mosto caerá de 5.6 – 5.8 al comenzar el hervor alrededor de 5.2 – 5.4 al final. Para lograr el nivel deseado del pH se usan agentes como el carbonato de calcio para subirlo o agentes ácidos para bajarlo como el sulfato de calcio.

Una vez finalizada la etapa de elaboración del mosto, este debe enfriarse lo más rápido posible para iniciar la etapa de fermentación. Este intercambio de calor se da gracias a un intercambiador de serpentín, en el cual el mosto azucarado es enfriado por el fluido de servicio (agua fría a una temperatura aproximada de 5°C). Durante este intercambio de calor, el mosto es oxigenado por una adicción de oxígeno puro, es decir, se adiciona oxígeno con el fin de que el mosto posea entre 8 a 10 ppm de este. Cabe mencionar, que el mosto pasa al fermentador a una temperatura de 32°C.

A continuación, se muestran las evidencias pertinentes para esta parte del proceso.

**Fotografía 15.** Intercambiador de calor para enfriar el mosto.



Fuente. elaboración propia.

**Fotografía 16.** Oxigenación del mosto antes de la fermentación.



Fuente. elaboración propia.

Una vez que se enfría y se oxigena el mosto, se extraen 25 litros para realizar la fermentación a escala banco con la levadura a reutilizar. A continuación, se puede observar la Fotografía 17 de los dos fermentadores caseros.

**Fotografía 17.** Fermentación casera con mosto.



Fuente. elaboración propia.

A continuación, se explica el proceso de reutilización y propagación de la levadura con los análisis microbiológicos pertinentes y los procedimientos a seguir.

## 2.2.3 Reutilización de la Levadura

**2.2.3.1 Ubicación de la etapa experimental.** La investigación se desarrolló en la cervecería Moonshine, ubicada en la Cl. 134a #50-30 en la ciudad de Bogotá D.C., en donde se realizó la toma de muestra de levadura recuperada de los tanques fermentadores y a su vez en donde se realizó el mosto a fermentar con la cepa de levadura mencionada anteriormente.

**Figura 13.** Ubicación de la planta cervecera en la ciudad de Bogotá D.C.



Fuente: Google Maps. Cervecería Moonshine. 2019

## 2.2.3.2 Materiales y Equipos

- **Materiales.** Los materiales empleados para realizar la parte experimental del proceso de reutilización de levadura son mostrados a continuación:
- Erlenmeyer de 250 ml.
  - Erlenmeyer de 500 ml.
  - Erlenmeyer de 1000 ml
  - Barras de agitación.
  - Tubos de ensayo.
  - Gradilla
  - Probeta de 250 ml.
  - Pipeta de 10 ml.
  - Pipeta de 25 ml.
  - Micropipeta.
  - Puntas de tips estériles, para micropipeta
  - Pipeteadores.
  - Microscopio.
  - Cámara de conteo Neubauer.
  - Válvula airlock
  - Fermentador con capacidad de 20 litros.
  - Manguera atóxica de un metro de longitud.
  - Válvula para toma de muestra.

- Botellas de capacidad de 330 ml.
- Grifos plásticos para bidones.
- Tapas para cerveza.
- Rollo de papel aluminio.
- Tarros estériles para almacenamiento de levadura.

➤ **Equipos.**

- pH metro digital.
- Densímetro cervecero.
- Alcoholímetro
- Refractómetro.
- Agitador Magnético.
- Mechero Bunsen con conexión a gas.

**2.2.3.3 Obtención y Preparación de la muestra.** La muestra de levadura *S. cerevisiae* a reutilizar, fue extraída del tanque número 2 de la microcervecería como se puede observar en la fotografía 18. Al finalizar el proceso fermentativo, la levadura flocula al fondo del tanque creando allí varias capas entre levadura muertas y levaduras vivas; debido a esto, la muestra que se obtiene es una mezcla de levaduras y trub, es decir, de sedimentos como el lúpulo y el clarificante usados en la etapa de elaboración del mosto.

**Fotografía 18.** Tanque fermentador de donde se extrajo la levadura.



Fuente. elaboración propia.

Para realizar el correcto muestreo, es fundamental tener muy buenas condiciones de asepsia por parte de los manipuladores, de los recipientes, de las mangueras de extracción y de los contenedores de transporte para evitar alteraciones microbiológicas.

A continuación, se muestran los recipientes utilizados para la toma de muestra, de igual manera, se menciona el método de desinfección realizada en los mismos con el fin de prevenir contaminación microbiológica.

En primera instancia se muestra en la Fotografía 19 los recipientes en los cuales se extrajo la levadura recuperada del tanque fermentador.

**Fotografía 19.** Recipientes utilizados con la levadura extraída.



Fuente. elaboración propia.

Estos recipientes fueron desinfectados con ácido peracético al 5% el cual actúa como un biocida de acción muy rápida, estudiado especialmente para su utilización en la industria alimentaria, debido a sus peculiares características, ya que a las concentraciones de uso no afecta las propiedades organolépticas de los productos procesados con el fin de eliminar posibles bacterias presentes en la superficie de los estos, cabe resaltar que este procedimiento se hizo en duplicado con el fin de obtener mejores resultados

Los recipientes usados para el lavado y almacenamiento de la levadura son de vidrio con una capacidad de 350 ml. Fueron desinfectados de igual forma con ácido peracético ya que es muy efectivo contra todo tipo de microorganismos incluso virus y esporas. Esta desinfección se realizó aproximadamente por una hora en donde cada frasco fue sumergido en dicho agente.

**Fotografía 20.** Recipientes para almacenamiento y lavado de levadura.



Fuente. elaboración propia.

**2.2.3.4 Toma de muestras.** La toma de muestra se realizó con ayuda de uno de los operarios de la microcervecería como se observa en las fotografías 21 y 22, en la cual la muestra fue extraída gracias a una manguera atóxica conectada al tanque fermentador, que previamente fue descontaminada por medio de ácido peracético.

**Fotografía 21.** Extracción de levadura recuperada del tanque fermentador.



Fuente. elaboración propia.

**Fotografía 22.** Extracción de levadura recuperada del tanque fermentador.



Fuente. elaboración propia.

**Fotografía 23.** Levadura recuperada.



Fuente. elaboración propia.

**2.2.3.5 Acondicionamiento de la levadura a trabajar: Lavado.** El enjuague o lavado de la levadura es, principalmente, un procedimiento para garantizar que sólo la levadura más saludable sea utilizada en la siguiente fermentación, dejando atrás otras partículas no deseadas.

El enjuague diluirá la levadura en suspensión y ayudará a separarla de partículas de lúpulo y levadura muerta. De igual forma, también puede ayudar a eliminar el grado de alcohol presente en esta, debido a que al reutilizar la levadura se tiene que asegurar que no sea un lote con bastante graduación alcohólica ya que, si es así, generalmente no se recomendaría realizar una reutilización de levaduras. El proceso de enjuague se puede realizar las veces que sea necesaria para eliminar los sólidos no deseados.

Para realizar un correcto lavado de levadura se siguieron los siguientes pasos:

- Se desinfectan los recipientes de vidrio como se explicó anteriormente para ser usados en la separación de materia en suspensión, para esto en dicho envase contiene 100 ml de agua esterilizada.
- Verter aproximadamente 200ml de la levadura recuperada en uno de los recipientes anteriormente esterilizados.

**Fotografía 24.** Recipiente con agua esterilizada y levadura a lavar.



Fuente. elaboración propia.

- Agitar vigorosamente para que se realice una mezcla homogénea.
- Dejar reposar durante 30 minutos para que las partículas más pesadas se asienten en el fondo del recipiente, como se observa en la fotografía 26.

**Fotografía 25.** Mezcla de agua esterilizada y levadura.



Fuente. elaboración propia.

- Transvasar el líquido a un segundo recipiente esterilizado, dejando así la parte sedimentada, es decir, el trub atrás.

**Fotografía 26.** Levadura y trub sedimentado.



Fuente. elaboración propia.

- Si se observan partículas en suspensión se puede repetir el proceso nuevamente. Si no se observan, mantener en cadena de frío.

**2.2.3.6 Metodología de los análisis.**

➤ **Determinación de microorganismos presentes en la levadura.** La calidad de la cerveza depende de varios factores que tienen relación con las materias primas utilizadas, con el proceso de elaboración y con el mercado que evalúa sensorialmente esta calidad, ya sea, por medio del sabor, aroma, presencia de espuma, presencia de residuos, olor, amargor, entre otros. Sin embargo, la calidad de la cerveza también se ve afectada por el desarrollo de bacterias que provocan acidez, turbidez y pueden generar aromas y sabores anormales<sup>110</sup>

Para realizar la caracterización microbiológica de la levadura extraída del proceso fermentativo, la muestra se llevó a un laboratorio especializado en el cual se evaluó la presencia/ ausencia de los siguientes contaminantes:

- Ausencia/Presencia de mohos y levaduras.
- Ausencia/Presencia de lactobacillus sp.
- Ausencia/Presencia de Pediococcus sp.
- Ausencia/Presencia de acetobacterias.
- Recuento de mesófilos aerobios por ml.
- Recuento de Coliformes totales.

---

<sup>110</sup> MILLARAY, Paola. Detección de la contaminación por bacterias lácticas en cerveza tipo Ale elaborada por la compañía cervecera Kunstmann. Valdivia, Chile, 2004, p 11-17. Trabajo de grado (licenciado para ingeniería de alimentos). Universidad Austral de Chile. Facultad de ciencias agrarias.

Esta identificación se realizó en el Centro de Diagnóstico Microbiológico (CEDIMI), el cual es un laboratorio de control de calidad ubicado en la carrera 22 No. 159 a 31 en la ciudad de Bogotá D.C., el cual brinda servicios de control de calidad, asesorías, asistencia técnica y solución a problemas microbiológicos.

**Figura 14.** Ubicación de CEDIMI.



Fuente: Google Maps. CEDIMI. 2019

**Figura 15.** Instalaciones del CEDIMI



Fuente: Google Maps. CEDIMI.  
2019

Estas identificaciones se realizaron por medio de método de recuento en placa, en el cual la población microbiana se determina por el recuento de las colonias sembradas por vertido en placa de una muestra, en presencia de un medio de cultivo y las colonias por identificar se desarrollan en el mismo.

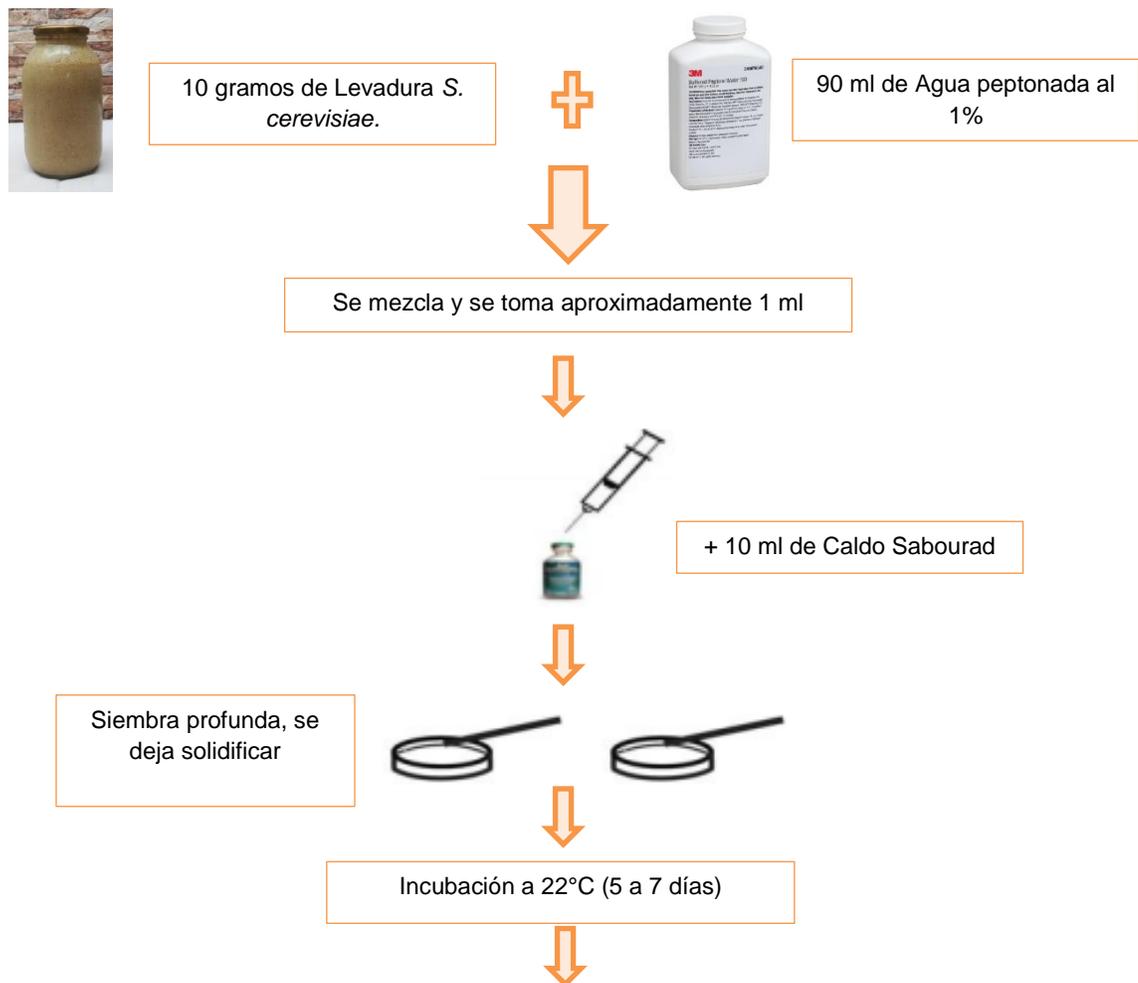
Los medios de cultivo implementados y las diversas condiciones del montaje se mencionan a continuación.

➤ **Ausencia/Presencia de mohos y levaduras.** Los mohos se encuentran en todas partes, son multicelulares, tienen estructuras filamentosas. Crecen en medios ácidos. Su aspecto por lo general es aterciopelado algodonoso, de color blanco, verde o negro. Se reproducen asexualmente. Tienen un pH entre 2,0 – 11,0 (ácidos).

Las levaduras son microorganismos unicelulares. Producen la fermentación alcohólica de los azúcares. Producen deterioro en materias primas, azúcar, producto en proceso jarabes y producto terminado. Su aspecto por lo general es esférico, ovoide, cilíndrico, triangular. Su reproducción es asexual. Tiene un pH entre 2,0 – 9,0 (ácidos).

A continuación, en el siguiente diagrama se explica de manera general el procedimiento a seguir para a determinación de los mohos y levaduras.

**Diagrama 1.** Determinación de Mohos y levaduras.





Fuente. elaboración propia.

Algunas de las NTC encontradas que podemos utilizar son las siguientes:

- **NTC 4491-1** microbiología de alimentos y alimentos para animales. Preparación de muestras para ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para análisis microbiológicos. Parte 1. Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y de diluciones decimales.<sup>111</sup>
- **NTC 5698-1** microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 1: Técnica de recuento de colonias en productos con actividad acuosa superior a 0,95.<sup>112</sup>
- **NTC 5698-2** microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 2: Técnica de recuento de colonias en productos con actividad acuosa inferior a 0,95.<sup>113</sup>
- **NTC 4092** microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos.<sup>114</sup>

---

<sup>111</sup> INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. microbiología de alimentos y alimentos para animales. Preparación de muestras para ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para análisis microbiológicos. Parte 1. Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y de diluciones decimales. NTC 4491-1. [En línea] [10 de agosto del 2019]. Disponible en internet: [<https://tienda.icontec.org/wp-content/uploads/pdfs/NTC4491-1.pdf>]

<sup>112</sup> INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 1: Técnica de recuento de colonias en productos con actividad acuosa superior a 0,95. NTC 5698-1. [En línea] [10 de agosto del 2019]. Disponible en internet: [<https://es.scribd.com/document/354958300/NTC-5698-1>]

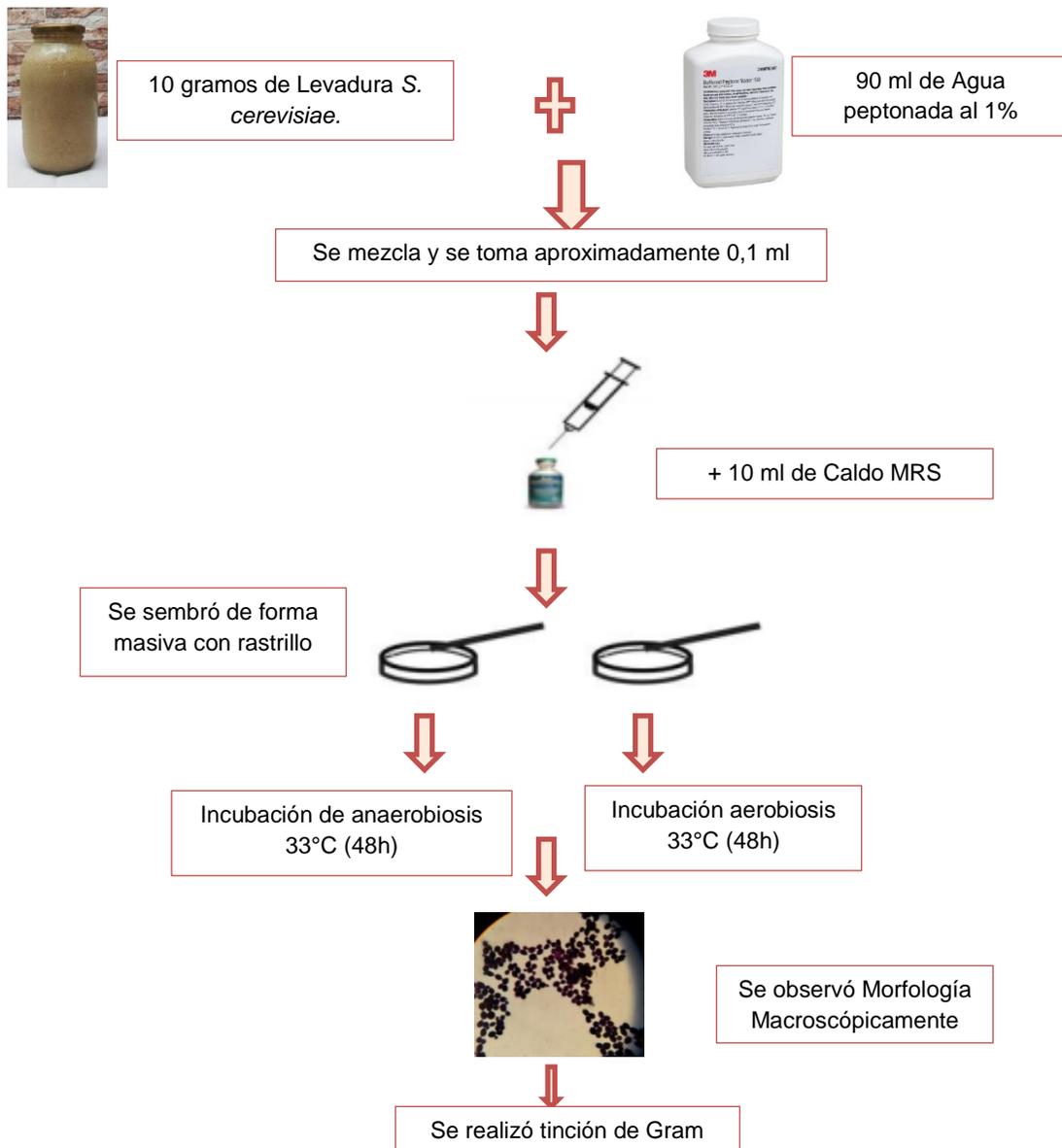
<sup>113</sup> INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 2: Técnica de recuento de colonias en productos con actividad acuosa inferior a 0,95. NTC 5698-2. [En línea] [10 de agosto del 2019]. Disponible en internet: [<https://es.scribd.com/document/284429280/NTC5698-2-MOHOS>]

<sup>114</sup> INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos NTC 5698-2. [En línea] [10 de agosto del 2019]. Disponible en internet: [<https://es.scribd.com/doc/163602988/NTC-4092-Guia-General-Para-El-Recuento-de-Microorganismos>]

➤ **Ausencia/Presencia de *Lactobacillus sp.* y *Pediococcus sp.*** Las bacterias ácido lácticas constituyen un grupo de bacterias Gram-positivas, en el cual se incluyen cocos y bacilos no esporulados. Estas bacterias, fermentan diversos azúcares, produciendo ácido láctico en cantidades suficientemente elevadas como para inhibir o matar a la mayoría de los otros microorganismos.

A continuación, en el siguiente diagrama se explica de manera general el procedimiento a seguir para a determinación de *Lactobacillus sp* y *pediococcus sp*

**Diagrama 2. Determinación de *Lactobacillus sp* y *Pediococcus sp*.**



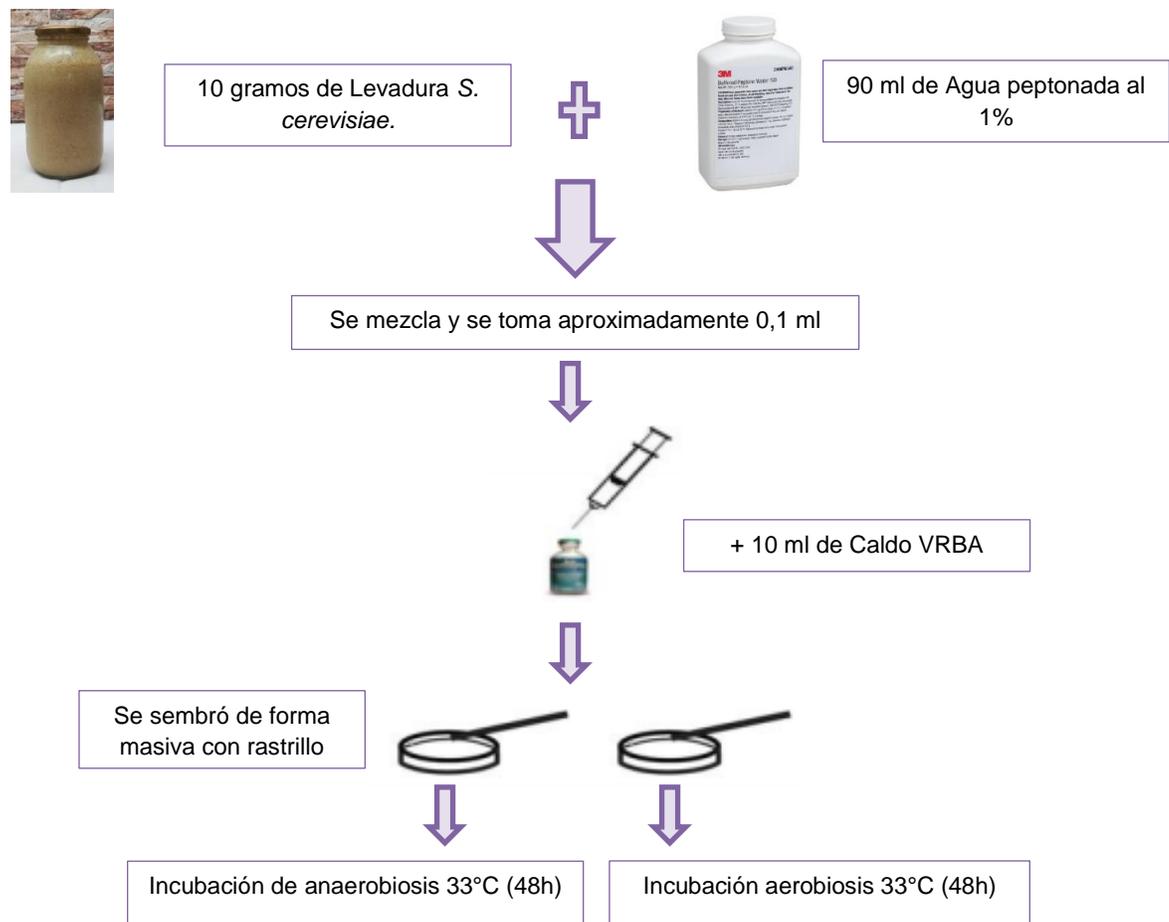
Fuente: elaboración propia

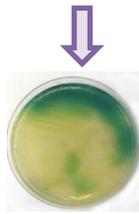
De acuerdo a la norma estandarizada por el laboratorio CEDIMI para la determinación de Lactobacillus tenemos, **International journal of food microbiology. 2008; 121-115- ISO 11133:2014** methods for testing of food and water samples.

➤ **Ausencia/Presencia de acetobacterias.** La actividad de las bacterias acéticas se conoce desde hace siglos por la producción de vinagre, la acetificación de bebidas alcohólicas y el deterioro de frutos. Las acetobacterias son un grupo de microorganismos gram-negativos que se desarrollan en distintos medios. Además, muchas de ellas son capaces de crecer en presencia de ácido acético, produciendo acidificación cuando crecen en presencia de etanol. Para determinar la presencia o ausencia de las bacterias acéticas se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

A continuación, en el siguiente diagrama se explica de manera general el procedimiento a seguir para a determinación de acetobacterias.

**Diagrama 3.** Determinación de acetobacterias.

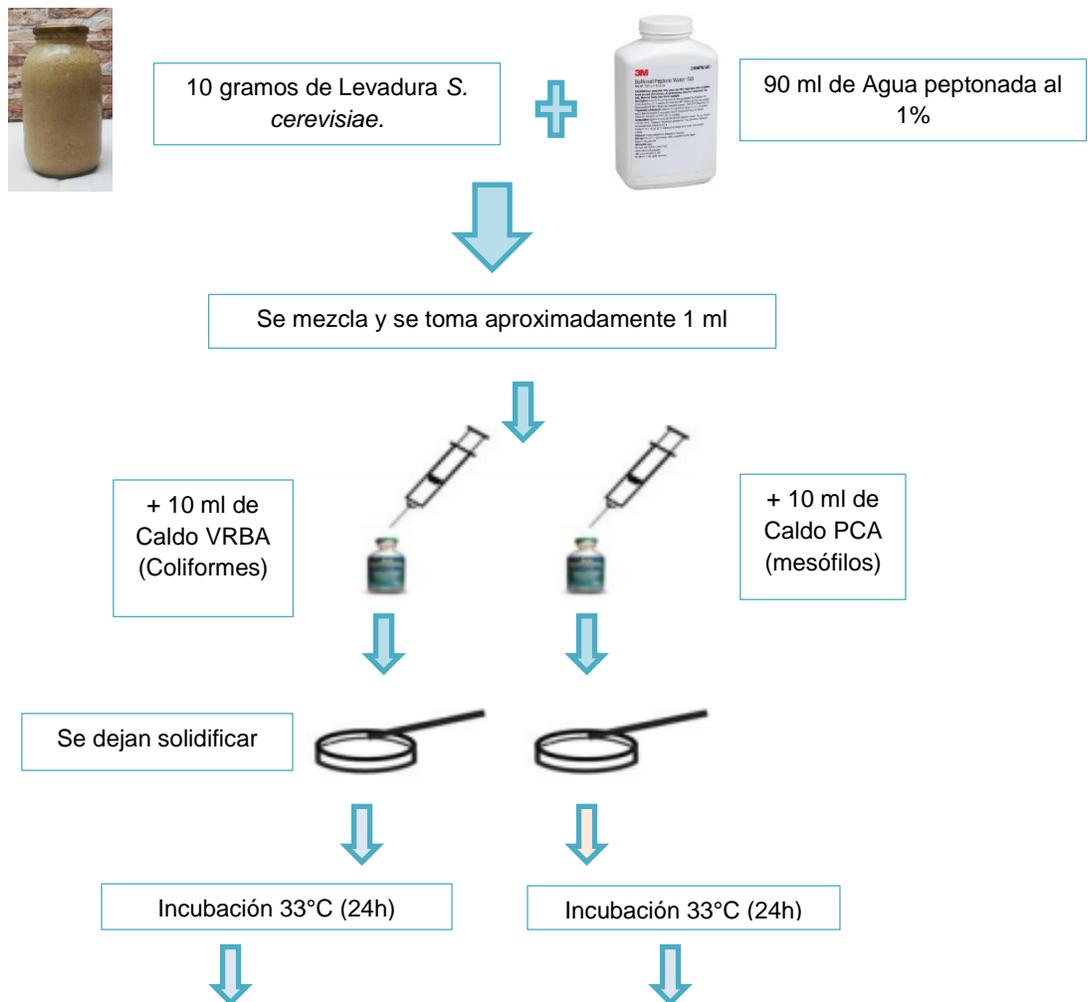


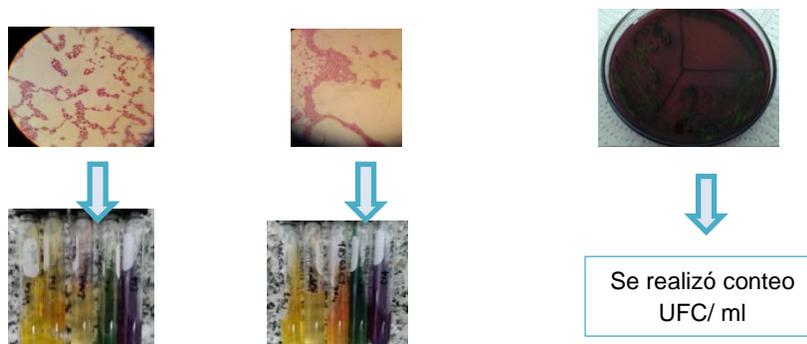


Se observó Morfología Macroscópica

➤ **Recuento de mesófilos aerobios y coliformes totales.** Los mesófilos aerobios son seres unicelulares que se reproducen con gran rapidez. Una sola bacteria puede llegar a formar una colonia visible a simple vista en pocas horas y ocasionar graves enfermedades, para la identificación de este tipo de microorganismos se realizó el siguiente procedimiento:

**Diagrama 4.** Determinación de Mesofilos aerobios y coliformes totales



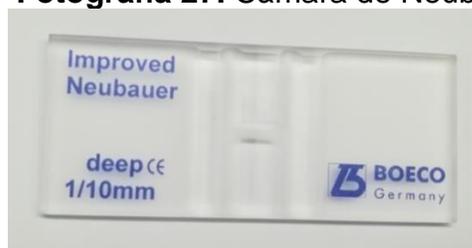


Con base a la información suministrada por el laboratorio CEDIMI, se tiene que los procesos de recuento de mesofilos aerobios se realizó según **PROCEDIMIENTOS SEGÚN BAM, Capítulo 3, enero de 2001, Iso 4833-1:2013** y, el recuento de coliformes se basó en **USP<61> UNE-EN ISO 21528-1:2018**.

**2.2.3.7 Determinación de la viabilidad.** Para determinar la viabilidad de la levadura se realiza una tinción con azul de metileno, la cual tiñe las células muertas de una coloración azul presentes en la muestra y por medio de la cámara de Neubauer se realiza el conteo de las células vivas (de color transparente) y de las mencionadas anteriormente, logrando identificar el porcentaje de estas que se encuentran metabólicamente vivas y aptas para realizar una nueva fermentación.

En primera instancia se tomó una alícuota de la levadura recuperada y anteriormente lavada con el fin de realizar varias disoluciones para efectuar el conteo celular en la cámara de Neubauer. Esta cámara cuenta con 25 cuadrantes en los cuales se realiza el conteo por medio del microscopio como se observa en la siguiente imagen.

**Fotografía 27.** Cámara de Neubauer.



Fuente. elaboración propia.

Seguido a esto, se realizan tres disoluciones 1:10, 1:100 y 1:1000, para llevar a cabo el conteo celular. Cada una de las mezclas se homogenizan de manera continua y uniforme con el fin de evitar la producción de burbujas previniendo alteraciones en los resultados. Es importante mencionar que estas disoluciones se realizan con el fin de ver en cuál de las tres se logra un mejor conteo celular de la levadura recuperada y realizar una mejor estimación de la viabilidad.

**Fotografía 28.** Disoluciones para el recuento celular.



Fuente. elaboración propia.

➤ **Tinción con azul de metileno.** Según Gonzales Juárez “Este tinte es un colorante catiónico, Cloruro de metionina, el cual cambia de color debido a una reacción de óxido-reducción, las células de levaduras tienen la actividad reductora, y pueden transformar el azul de metileno en su derivado incoloro, mientras que las células de levadura muertas ya no tienen la capacidad, por tanto, estas se tiñen de azul”<sup>115</sup>.

Inicialmente en un tubo de ensayo se colocan 10ml de levadura anteriormente lavada, en un segundo tubo de ensayo se realiza la primera disolución que contiene 9ml de agua destilada estéril y 1ml de levadura del primer tubo de ensayo para realizar la disolución conocida como 1:10. La segunda disolución se realiza en un tercer tubo de ensayo con 9ml de agua destilada estéril y con 1ml de la primera disolución, esta disolución se conoce como 1:100. Finalmente, la última disolución conocida como 1:1000 se realiza con 9ml de agua destilada estéril y con 1ml de la segunda disolución.

Seguido a esto se realiza la tinción con azul de metileno, es decir, se pone una gota en cada una de las disoluciones, se homogeniza y se deja reposar, esto con el fin de realizar el conteo en la cámara de Neubauer. De acuerdo a los conteos realizados y a lo que se pudo observar por medio del microscopio, se tiene que en la disolución 1:10 se observan mayor cantidad de células, por lo tanto, los resultados de este procedimiento se dan en base a esta disolución.

Como se explicó anteriormente, el recuento celular se realiza por medio de la cámara Neubauer; cabe resaltar que este instrumento de laboratorio es muy delicado y su uso debe de ser con el mayor cuidado posible. Para la limpieza de la cámara, se realiza con agua destilada, limpiando los dos recuadros de esta, seguido a esto se limpia la laminilla de vidrio que va encima de la cámara y finalmente, se procede a realizar el montaje de la cámara en el microscopio como se muestra a continuación en la Fotografía 29.

---

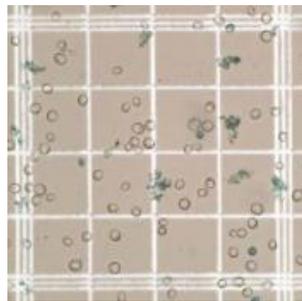
<sup>115</sup> *Ibíd.*, p.182.

**Fotografía 29.** Montaje de la cámara neubauer en el microscopio.



Fuente. elaboración propia.

**Figura 16.** Cuadrante de la cámara de Neubauer con células vivas y células muertas.



Fuente. Tomada en línea

[<https://mascapacitacioncerveza.files.wordpress.com/2018/03/enapra-calidad-leva-2018-clara.pdf>]

Al realizar el conteo celular se pueden identificar las células vivas y las células muertas presentes en la muestra. A continuación, se puede observar la ecuación que es utilizada para hallar la viabilidad de la levadura a reutilizar:

**Ecuación 1.** Estimación de viabilidad celular.

$$\%Viabilidad = 100 - \%Células muertas$$

En donde el porcentaje de células muertas se halla de la siguiente manera:

**Ecuación 2.** Estimación del porcentaje de células muertas.

$$\%Células muertas = \frac{Conc. de células teñidas}{(Conc. de levaduras + Conc. de células teñidas)} * 100$$

Dónde:

- *Concentración de células teñidas*: Es la suma de todas las células teñidas de azul en los 25 cuadrantes de la cámara de Neubauer, por el factor de dilución y por  $10^4$ .
- *Concentración de levaduras*: Es el recuento de todas las células sin teñir en los 25 cuadrantes de la cámara de Neubauer, por el factor de dilución y por  $10^4$ . La concentración de levaduras por mililitro es determinada mediante la ecuación número 3, la cual es mostrada a continuación:

**Ecuación 3.** Estimación la concentración total de

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = \text{Levadura total} * F * 10^4$$

Dónde:

- *Levadura total* - Número total de levaduras en los 25 cuadrantes del área demarcada.
- *F* es el factor de dilución.  
El conteo celular se realiza antes de la propagación de la levadura en un medio de cultivo (stater), durante la propagación y una vez finaliza este proceso, esto con el fin de evaluar el comportamiento de la levadura y la tendencia a reproducirse por la presencia de los nutrientes dados por el mosto.

**2.2.3.8 Preparación de Stater.** Para la realización de la cerveza, es necesario hacer una propagación, que consiste en obtener a partir de una pequeña cantidad de células una masa celular suficientemente alta que sirva de inóculo a la fermentación final conservando las características específicas y las propiedades que conllevan a producir un producto de calidad uniforme que constituye una de las etapas críticas en el proceso cervecero.

Por ende, es necesario que la muestra extraída del tanque fermentador se someta a este proceso previamente con el fin de obtener una cepa a propagar que cumpla los requerimientos óptimos para la fermentación de 10 litros de cerveza. Para esto, en la búsqueda bibliográfica de información se encontró una herramienta que es de gran ayuda para determinar la cantidad requerida de stater para producir la cerveza tipo Pale Ale Belga.

Esta herramienta consiste básicamente en una hoja de Excel, conocida como calculadora *de inóculo y propagación de levadura*, en donde se ingresan ciertos datos de la levadura extraída y el mosto a fermentar. La calculadora fue realizada para guiar a cerveceros artesanales usando métodos estimativos, en la figura 17 se puede observar la interfaz principal y su estructura secuencial.

Los modelos matemáticos que esta calculadora utiliza son basados en investigaciones realizadas en la página braukaiser la cual es un portal que publica investigaciones acerca de temas de levadura; de igual forma los estudios por Chris White en su libro: Yeast: The practical guide to beer fermentation también fueron usados para el estructuramiento de esta.

**Figura 17.** Estructura de la calculadora de inóculo y propagación de levadura, para determinar la cantidad apropiada en cada paso del crecimiento del starter.

Calculadora de inóculo y propagación de levadura v1

---

**Características del mosto a fermentar**

Densidad inicial: 1.050 SG  
 Volumen: 40 Litros

---

**¿Cuánta levadura tengo inicialmente?**

Tipo de levadura: Ale  
 Origen de la levadura: Seca en sobre  
 Cantidad: 11.0 gr  
 Fecha de fabricación: 27-Jan-2014

Densidad estimada: 20 Billones de células / gr  
 Densidad estimada de referencia: 20 Billones de células / gr

% viabilidad estimado: 91.75%  
 Cantidad de levadura disponible: 202 Billones de células

---

**¿Cuánta levadura necesito inocular?**

Tasa de inoculación deseada: 0.75 (millones de células / ml / grado plato)  
 Tasa de inoculación recomendada: 0.75 (millones de células / ml / grado plato)

Cantidad de levadura necesaria: 372 Billones de células

La levadura que tengo cubre el 54% de lo que necesito  
 Es necesario hacer un starter

---

**Propagación de la levadura (starter)**

Si la cantidad de levadura inicial no cubre la cantidad que necesita, entonces es necesario un starter con uno o más pasos de crecimiento para propagar la levadura. Seleccione un método de crecimiento e ingrese la cantidad y densidad del mosto utilizado en cada paso para obtener los valores estimativos de crecimiento.

Método de crecimiento	Volumen (ml)	Densidad (SG)	Cantidad de levadura (billones de células)		% de la cantidad necesaria	Verificación del tamaño del paso
			Inicial	Final		
1. Agitador magnético	1500	1.035	202	412	111%	Ok
2.						
3.						
4.						
5.						
6.						

Fuente: Pascual Guillermo. Descubriendo cervezas (Blog personal). 2014. [En línea] Disponible en: <http://descubriendocervezas.blogspot.com/2014/03/calculadora-de-inoculo-y-propagacion-de.html>

La plantilla consta de 4 secciones con información necesaria para dimensionar un inóculo:

- Características del mosto a fermentar.
- ¿Cuánta levadura se tiene inicialmente?

- ¿Cuánta levadura se necesita inocular?
- Propagación de la levadura (starter).

Las celdas con fondo amarillo son las que se deben completar, mientras que las celdas con fondo celeste son calculadas. A continuación, se detalla cada sección y el criterio de escogencia para la reutilización de levadura que es el tema principal de este trabajo.

- Características del mosto a fermentar: En esta sección se ingresan las características significativas del mosto tales como, la densidad, la cual define la cantidad de extracto disponible para las levaduras, esta tiene que darse en unidades de gravedad específica (SG); de igual manera se define el volumen en litros de mosto a fermentar.

La densidad inicial del mosto de la cerveza tipo Pale Ale Belga, según el densímetro cervecero es de **1.062** con una cantidad de 10 litros, que es la cantidad de cerveza que se desea producir en cada fermentador. A continuación, se puede observar cómo se ingresan los datos a la calculadora. (ver figura 18).

**Figura 18.** Características de mosto a fermentar para realizar la fermentación a escala banco.

Calculadora de inóculo y propagación de levadura

v.1

Características del mosto a fermentar		
Densidad Inicial	1.062	SG
Volumen	10	Litros

Fuente. elaboración propia.

- ¿Cuánta levadura se tiene inicialmente?: En esta sección se ingresan las características de la levadura que inicialmente se tienen, correspondientes a:
  - *Tipo de levadura*: se debe seleccionar entre 3 opciones Ale, Lager o Híbrida. Las cepas híbridas son aquellas Ales que tienen un rango de temperatura de trabajo más bajo.
  - *Origen de la levadura*: se debe seleccionar entre 4 opciones: **Levadura comercial seca**: Es el típico sobre o paquete de levadura seca que se puede adquirir comercialmente. **Levadura comercial líquida**: Son los viales o sachet de levadura líquida que se puede adquirir comercialmente. **Barro recuperado**: esta opción se escoge en caso de estar reusando levadura de una fermentación anterior. **Cultivo propio**: se selecciona si se está utilizando levadura desde un cultivo como placa de Petri, solución isotónica, glicerol congelado, etc.
  - *Cantidad*: Colocar la cantidad de levadura que corresponda de acuerdo al tipo seleccionado, se tiene que colocar en mililitros.

- *Fecha de fabricación:* Este dato es utilizado para estimar la viabilidad de la levadura disponible. Para levadura reusada ingresar la fecha de cosecha desde el fermentador.
- *Densidad estimada:* es la densidad de células por unidad que se estima tiene el cultivo original. Los datos de densidad estimada de referencia son establecidos de acuerdo a la cantidad de células que los fabricantes de levadura como WhiteLabs proveen de acuerdo al tipo que se quiera fermentar por tanto para levaduras seca hay un estimativo de 20 billones de células/ml, para levaduras líquidas 100 millones de células/ml y para barro recuperado la estimación disminuye considerablemente a 1 billón de células/ml.
  - *% viabilidad estimada:* Es la viabilidad de la levadura estimada desde la fecha de fabricación ingresada. Si cuenta con esta información, puede ajustar la fecha de fabricación hasta obtener el valor correcto.

Para la determinación de este parámetro la calculadora tiene en cuenta la fecha de fabricación o de extracción de levadura la cual la multiplica por un factor de viabilidad dependiendo el tipo de levadura, dicha factor podría ser:

- Si la levadura es seca (comprada en sobre): 0,00133
- Si la levadura es líquida: 0,007
- Si la levadura es extraída de un tanque fermentador (barro recuperado): 0,00833

La fórmula con la que se calcula la viabilidad aproximada es:

**Ecuación 4.** Cálculo de la viabilidad aproximada en la calculadora de inóculo.

$$1 - ((360\text{días} - \text{dia de extraccion}) * \text{factor de viabilidad})$$

- *Cantidad de levadura disponible:* Es la cantidad de levadura estimada que se dispone inicialmente, presentada en billones de células, la forma en que la calculadora estima este valor es:

**Ecuación 5.** Cantidad de levadura estimada que se dispone inicialmente.

$$\text{Cantidad de lev. disponible} = \text{Cantidad de levadura inicial} * \text{Densidad estimada} * \% \text{viabilidad estimado}$$

En la figura 19 se puede observar los datos ingresados de acuerdo a la información que se tiene de la levadura extraída en donde se puede observar que la propagación inicio con 15 mililitros de levadura, la cual fue escogida analizando

la variación del número de pasos requeridos para propagarla; de igual forma, el escalamiento del stater se realiza con la muestra de levadura que previamente fue analizada en el laboratorio microbiológico, es importante mencionar que la muestra a reutilizar tiene que estar libre de cualquier tipo de contaminante. Para este caso en específico, la muestra obtenida libre de contaminantes tiene una fecha de cosecha correspondiente al 22 de marzo de 2019.

**Figura 19.** Características de levadura recuperada del tanque fermentador.

¿Cuánta levadura tengo inicialmente?	
Tipo de levadura:	Ale
Origen de la levadura:	Barro recuperado
Cantidad:	15.0 ml
Fecha de fabricación:	22-Mar-2019
Densidad estimada:	1 Billones de células / ml
Densidad estimada de referencia:	1 Billones de células / ml
% viabilidad estimado:	75.84%
Cantidad de levadura disponible:	11 Billones de células

Fuente. elaboración propia.

- ¿Cuánta levadura se necesita inocular?: En esta sección, se debe seleccionar la tasa de inoculación que se esté buscando y como resultado se obtiene la cantidad de células que necesitamos.
  - *Tasa de inoculación deseada*: Debe seleccionar entre las siguientes opciones.
    - \*0.75: Para levaduras Ale con densidad de mosto < 1.060
    - \*1.00: Para levaduras Ale con densidad de mosto > 1.060
    - \*1.50: Para levaduras Híbridas o bien Lager con densidad de mosto < 1.060
    - \*2.00: Para levaduras Lager con densidad de mosto > 1.060
  - *Cantidad de levadura necesaria*: Es la cantidad de levadura estimada que se necesita para fermentar correctamente el mosto especificado, presentada en billones de células. Para la determinación de este parámetro la calculadora tiene en cuenta la formulada que estableció Chris White en su libro *Yeast: The practical guide to beer*, la cual es mostrada a continuación:

**Ecuación 6.** Cantidad de levadura necesaria para el inoculo.

$$Cel. de lev. necesarias = SG * V_{mosto} * Tasa de inoculación deseada$$

Donde: SG es la gravedad específica del mosto a fermentar, también puede usarse los grados plato del mosto. Debido a que el mosto con el que se trabaja tiene una densidad aproximada de 1.062 y es levadura tipo Ale, la tasa de inoculación escogida es el número dos, como se puede observar en la figura 20.

**Figura 20.** Inoculación de levadura para la reutilización-

¿Cuánta levadura necesito inocular?	
Tasa de inoculación deseada	<input type="text" value="1"/> (millones de células / ml / grado plato)
Tasa de inoculación recomendada	<input type="text" value="1"/> (millones de células / ml / grado plato)
Cantidad de levadura necesaria	<input type="text" value="152"/> Billones de células
La levadura que tengo cubre el	<input type="text" value="7%"/> de lo que necesito
Es necesario hacer un starter	

Fuente: elaboración propia.

Como se puede observar en el recuadro rojo, los 15 mililitros de levadura que se trabajan no son suficientes para realizar la fermentación de 10 litros de cerveza, ya que la cantidad de levaduras no es suficiente, por tanto, es necesario realizar un medio propagador que le permita a las células multiplicarse, pasando de la fase de latencia a la fase de crecimiento exponencial y, de esta manera obtener la cantidad de células adecuadas para elaborar la cerveza. En el siguiente recuadro de la calculadora de inóculo, se establece el número de pasos requeridos que se necesitan para obtener dicha cantidad.

- Propagación de la levadura (starter): En caso de no contar con la cantidad necesaria de levadura, será necesario propagarla. En esta sección deberá preparar uno o más pasos de propagación hasta alcanzar la cantidad de levadura necesaria, para ello se deben ingresar tres datos con el fin de obtener la cantidad apropiada de pasos tales como lo son el método de crecimiento, el volumen de mosto para cada paso y su densidad correspondiente, cada ítem se explica a continuación:
  - *Método de crecimiento*: Es el método utilizado para propagar la levadura. Se debe seleccionar entre estas 3 opciones, **Agitador Magnético**: Es el uso de un dispositivo con una velocidad suficiente para provocar un vortex sostenido. Es el método que genera mayor crecimiento. **Agitación manual**: Consiste en mover manualmente el recipiente cada cierto tiempo para forzar la levadura a que se suspenda en el mosto y continúe trabajando. **Sin agitación**: Significa que no se interfiere en el crecimiento de ninguna forma. Se deja crecer la levadura de forma natural hasta que flocule y decante. Es el método que genera menor crecimiento.
  - *Volumen*: Es la cantidad de mosto utilizado en cada paso de la propagación, expresada en mililitros.
  - *Densidad*: Es la densidad del mosto utilizado en cada paso de la propagación, expresada en unidades de Gravedad Específica (SG).
  - *Cantidad de levadura inicial*: Es la cantidad de células de levadura estimada antes de propagar.
  - *Cantidad de levadura final*: Es la cantidad de células levadura estimada al finalizar la propagación.

- *% de la cantidad necesaria:* Es la relación entre la cantidad de células obtenidas y las que se necesitan. Este valor debe llegar al 100% con uno o más pasos de propagación.
- *Verificación del tamaño del paso:* Para que se produzca crecimiento debe haber una cantidad de extracto suficiente. En caso de no serlo, un mensaje aparecerá indicando que debe aumentar la cantidad mosto para este paso.

El método de crecimiento seleccionado fue por agitación constante, debido a que cada starter se deja durante tres días en la plancha de agitación. Se escoge este método gracias a que es el que presenta mayor crecimiento de levaduras con el paso de los días. A continuación, se determina la cantidad de pasos necesarios para obtener el número de levaduras adecuado, que en este caso es de 3 pasos, el primero paso contiene 100ml de mosto estéril con la cantidad de levadura anteriormente descrita, el segundo paso contiene 200ml más de mosto estéril a los 100 ml iniciales y finalmente, se adicionan 500ml más de mosto para completar la propagación con 800ml de mosto con levadura propagada.

A continuación, en la figura 21 se observa los cálculos correspondientes determinados en la calculadora del inoculo.

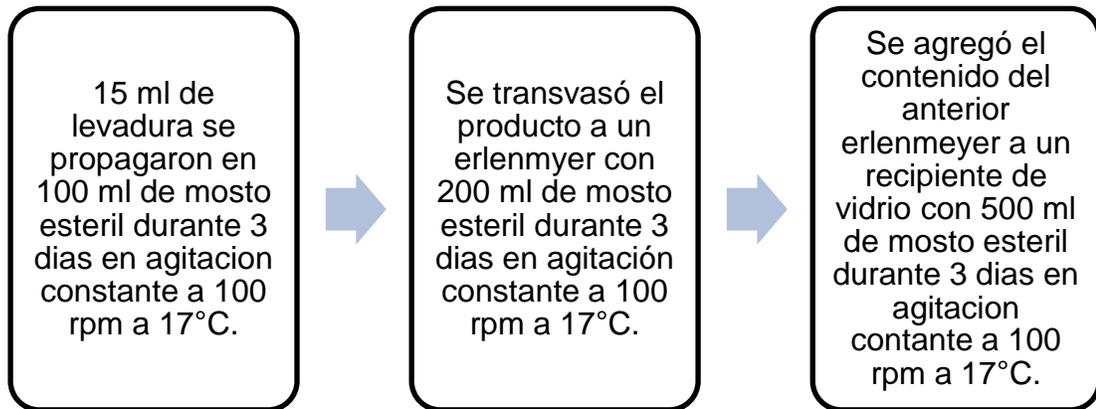
**Figura 21.** Número de pasos para reutilizar la propagación de la levadura a reutilizar.

Propagación de la levadura (starter)							
Si la cantidad de levadura inicial no cubre la cantidad que necesita, entonces es necesario un starter con uno o más pasos de crecimiento para propagar la levadura. Seleccione un método de crecimiento e ingrese la cantidad y densidad del mosto utilizado en cada paso para obtener los valores estimativos de crecimiento.							
	Método de crecimiento	Volumen (ml)	Densidad (SG)	Cantidad de levadura (billones de células)		% de la cantidad necesaria	Verificación del tamaño del paso
				Inicial	Final		
1	Agitador magnético	100	1.062	11	36	24%	Ok
2	Agitador magnético	200	1.062	36	86	56%	Ok
3	Agitador magnético	500	1.062	86	209	138%	Ok
4							
5							
6							

Fuente. elaboración propia.

Como se puede observar al final del último paso de propagación se obtiene una cantidad de células mayor a las que se requieren, sin embargo, esto no afecta la próxima fermentación, si se modifica el volumen en esta etapa, disminuyendo su valor el stater se saturará, generando inconsistencias en la calculadora de inoculo. En la figura 22 se resume la forma de realizar la propagación de la levadura a reutilizar.

**Figura 22.** Método de propagación de la levadura a fermentar.



Fuente. elaboración propia

El producto final de la propagación, son 800 mililitros de starter el cual se utilizó para realizar la fermentación del lote de 10 litros de la cerveza tipo Pale Ale belga. Es importante mencionar que el procedimiento se realiza por duplicado para tener dos fermentaciones diferentes. Finalmente, cabe decir que la calculadora usada no ofrece garantías de un 100% de exactitud en sus resultados, por tanto, no debe usarse en la elaboración de cerveza de forma profesional, esta herramienta es una versión adaptada y traducida de <https://www.brewersfriend.com/yeast-pitch-rate-and-starter-calculator/>.

Una vez finalizada la propagación de la levadura, se procede a reutilizarla en el nuevo proceso fermentativo. A continuación, se explica el proceso de fermentación, el acondicionamiento de su montaje y la metodología de análisis de la vitalidad.

Una vez realizado estos procedimientos, la levadura puede conservarse por un tiempo promedio de dos meses para su reutilización en un proceso fermentativo, en el tiempo que dure en cadena de frío, está, entrará en una fase estacionaria ya que no hay presencia de nutrientes generando una inactividad metabólica. Los mecanismos más simples para determinar si una levadura es apta para su reutilización pueden ser el color y el aroma de esta, ya que si la muestra presenta una coloración café es signo que está muerta, el color apropiado que debe tener es una coloración crema.

#### **2.2.4 Fermentación de la cerveza tipo Pale Ale Belga.**

- a. **Acondicionamiento del montaje para la fermentación:** Para realizar la fermentación alcohólica del mosto a escala artesanal, es necesario contar con un recipiente que permita las condiciones anaeróbicas correctas y que permita

la realización de una bebida alcohólica apta para el consumo humano. Existen en el mercado varios fermentadores caseros que están diseñados para realizar el proceso fermentativo de una manera correcta y se asemejan en grandes rasgos a los fermentadores industriales usados por las cervecerías.

Los bidones de agua plásticos, son popularmente usados para este fin ya que en términos económicos son de costo reducido y de fácil accesibilidad, las principales ventajas sanitarias para realizar el proceso fermentativo en un recipiente hecho con plástico son:

- No transmiten sustancias tóxicas.
- No modifican olores, colores y sabores.
- Resisten al desgaste, impacto, oxidación y corrosión.
- Tienen una superficie lisa, no porosa y fácil de limpiar.

Debido a las ventajas mencionadas anteriormente, la fermentación se realiza en un bidón de agua con capacidad para 20 litros como se puede ver en la siguiente **fotografía 30**.

**Fotografía 30.** Recipiente en donde se realizó la fermentación.



Fuente. elaboración propia.

Es importante realizar una correcta desinfección del recipiente con el fin de evitar contaminación en el producto final, por ende, los botellones de agua usados se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5,25% mezclado con agua, el cual es un desinfectante que elimina contaminantes de una manera certera. Para realizar la desinfección se realiza una disolución 1:10 para obtener una solución diluida al 0,5%. De igual manera, este procedimiento se realiza para la desinfección del tapón usado para obtener un medio anaeróbico y el airlock, el cual permite la salida del  $\text{CO}_2$  producido por la fermentación que a su vez impide la entrada de cualquier producto que contamine dentro la fermentación y oxide la cerveza. A continuación, se muestra evidencia de como quedo finalmente el montaje de fermentación.

**Fotografía 31.** Montaje final de los fermentadores.



Fuente. elaboración propia.

- b. Fermentación:** Esta etapa inicia con la adición del inóculo de la levadura propagada, es decir, a cada uno de los tanques fermentadores se les adiciona los 800ml de mosto con la levadura propagada anteriormente. Seguido a esto, se realiza el montaje de la fermentación y se procede a dejar fermentar durante 10 días aproximadamente.

En la etapa de fermentación se presentan 3 fases importantes:

- Fase de latencia (durante las primeras 15 horas). En esta etapa la levadura se adapta a su nuevo medio, donde adquiere de los nutrientes necesarios del mosto para alimentarse y crecer.
- Fase exponencial (durante el día 1 al 4). Es la etapa de crecimiento de la levadura, donde esta comienza consumir azúcar y a producir CO<sub>2</sub>. Se produce una capa de espuma conocida como el krausen sobre la cerveza.
- Fase de acondicionamiento (durante el día 3 al 10). En esta etapa se hace referencia a una etapa de fase estacionaria, es decir, hay presencia de un estancamiento reproductivo. Acá la levadura ya ha producido los sabores y el aroma necesario, pero no el justo que se lleva a cabo en la maduración.

**Fotografía 32.** Fermentación de la levadura.



Fuente. elaboración propia.

A lo largo de los días de fermentación, se toman muestras de ambos tanques con el fin de realizar el análisis de vitalidad que será explicado más adelante. Es importante mencionar que los tanques fueron dejados en un lugar oscuro y,

dispuesto solamente para la fermentación evitando posibles contaminantes. De igual manera, la persona encargada de tomar las muestras, debía cumplir una serie de parámetros asépticos como lo es el uso de guantes, tapabocas, bata, cofia y alcohol al 70% tanto en las manos como en los recipientes a utilizar.

**Fotografía 33.** Toma de muestra del fermentador.



**Fuente.** elaboración propia.

**2.2.5 Metodología de análisis de Vitalidad en la levadura recuperada.** La vitalidad nos indica si una célula está metabólicamente viva mediante una medida de su capacidad a desarrollarse y producir activamente moléculas de interés. Este parámetro es muy importante porque al reutilizar la levadura es necesario prestar mucho cuidado a la eficiencia de las células recuperadas.

Para llevar a cabo este análisis, es necesario que se midan parámetros como lo son los grados brix, la densidad de la muestra y el pH, con la finalidad de obtener la capacidad fermentativa de la levadura en la cerveza. A continuación, se explica cada uno de los parámetros a medir

**a) pH:** La medición del pH es muy importante, porque de éste dependen considerablemente todos los procesos enzimáticos y también los microorganismos en lo que a su comportamiento respecta. La medición del pH se realiza con un electrodo de vidrio y un electrodo de referencia, ambos están generalmente combinados en una cadena monovarilla de medición. La monovarilla es colocada usualmente es una carcasa protectora y así también es utilizable bajo condiciones de trabajo<sup>116</sup>.

Esta prueba físico-química se basó de acuerdo a la Norma Técnica Colombiana NTC 4592, que habla de productos de frutas y verduras – determinación de pH. Aquí podemos encontrar principalmente, los equipos a utilizar, la preparación de la muestra, la calibración del electrodo, entre otros.<sup>117</sup>

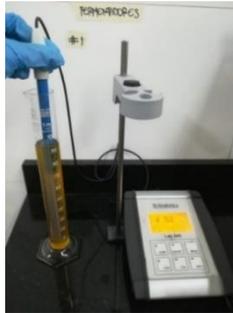
---

<sup>116</sup> KUNZE, Wolfgang. Op, Cit. p. 874

<sup>117</sup> INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. productos de frutas y verduras – determinación de pH. NTC 4592. [en línea]. [6 de agosto del 2019]. Disponible en internet: [[https://kupdf.net/download/ntc-4592-ph\\_59de20d808bbc55168e657de\\_pdf](https://kupdf.net/download/ntc-4592-ph_59de20d808bbc55168e657de_pdf)]

La medición del pH es importante a la hora de reutilizar levaduras ya que si este aumenta a lo largo de la fermentación alcohólica puede ser un indicio que el metabolismo de la levadura a lo largo de la actividad fermentativa no es óptimo por lo tanto no sería factible realizar una reutilización. El valor pH es usualmente entre 5,3 a 5,5 en el mosto caliente y 4,3 a 4,6 en la cerveza<sup>118</sup>.

**Fotografía 34.** Toma de pH e.1



Fuente. elaboración propia.

**Fotografía 35.** Toma de pH e.2



Fuente. elaboración propia

**b) Densidad:** La densidad del líquido resulta del contenido de alcohol y del extracto. De esta manera es posible determinar el contenido de mosto original del índice de refracción, de la densidad aparente y de nomogramas especiales. La densidad aparente se determina por medio del densímetro<sup>119</sup>.

Basados en la NTC GTC4- Manual de métodos analíticos para el control de calidad de bebidas alcohólicas, se lleva a cabo la prueba físico-química de densidad o de gravedad específica. Aquí se puede encontrar el fundamento del método, el procedimiento a seguir y, los cálculos y expresiones de los resultados obtenidos.<sup>120</sup>

<sup>118</sup> KUNZE, Wolfgang. Op, Cit. p. 874.

<sup>119</sup> Ibid., p. 882.

<sup>120</sup> INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. Manual de métodos analíticos para el control de calidad de bebidas alcohólicas. NTC GTC-4. [En línea] [6 de agosto del 2019]. Disponible en internet: (<https://es.scribd.com/document/94364417/GTC4>)

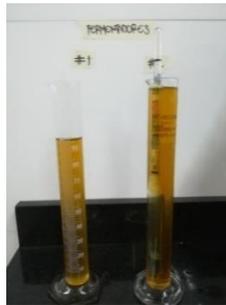
La determinación de la densidad es importante para identificar el consumo de azúcares a lo largo de la fermentación por parte de la levadura (a lo largo de la actividad fermentativa la levadura ira produciendo etanol) debido a esto el valor de la densidad ira disminuyendo conforme pasan los días, estas mediciones son importantes para hallar el grado alcohólico de la cerveza producida, el cual es un parámetro fundamental para realizar la comparación del producto que se obtiene y el producto que realiza la microcervecería

**Fotografía 36.** Toma de densidad e.1



Fuente. elaboración propia

**Fotografía 37.** Toma de densidad e.2



Fuente. elaboración propia.

- c) Grados Brix:** Los grados Brix miden la cantidad de sólidos solubles presentes en una bebida expresadas en porcentaje de sacarosa. Los sólidos solubles están compuestos por los azúcares, ácidos, sales y demás compuestos solubles en agua presentes en las bebidas. Se mide por medio de un refractómetro digital<sup>121</sup>. La determinación de este parámetro es importante para establecer como la levadura se comporta a lo largo de la fermentación consumiendo los azúcares del mosto y los convierte (gracias a la bioquímica de la fermentación) en etanol.

---

<sup>121</sup> UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. Pruebas de análisis a bebidas fermentadas. [En línea]. [20 de marzo]. Disponible en internet: [[http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php?option=com\\_content&view=article&id=92&Itemid=94](http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php?option=com_content&view=article&id=92&Itemid=94)]

De igual manera, para la determinación de los grados brix, la NTC GTC4, es nuestra referencia para realizar el fundamento del método y el procedimiento a seguir; de igual manera, se muestran tablas con los valores correspondientes entre la densidad aparente y los grados brix correspondientes.<sup>122</sup>

**Fotografía 38.** Toma de grados brix e.1



Fuente. elaboración propia.

**Fotografía 39.** Toma de grados brix e.2



Fuente. elaboración propia.

## 2.2.6 Carbonatación y Envasado de la cerveza.

- a) **Maduración:** Una vez finalizado los 10 días de fermentación se procede a realizar la etapa de maduración en botella y su respectiva carbonatación, la cual consiste en iniciar una nueva fermentación para producir CO<sub>2</sub>. Para realizar dicho procedimiento se utiliza una formulación que era utilizada por la microcervecería Moonshine en sus inicios para carbonatar sus productos artesanalmente, la cual se muestra en la tabla 6.

---

<sup>122</sup> INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. Manual de métodos analíticos para el control de calidad de bebidas alcohólicas. NTC GTC-4. Op., Cit. Pag 95-105

**Tabla 6.** Ingredientes y cantidades para realizar la carbonatación artesanal.

<b>INGREDIENTES PARA LA CARBONATACIÓN</b>	<b>CANTIDAD</b>
<b>Azúcar de mesa</b>	4 g por litro de cerveza
<b>Ácido Ascórbico</b>	0,25 g por litro de cerveza
<b>Agua</b>	3,5 L por cada 90 litros de cerveza

Fuente. elaboración propia.

El azúcar y el ácido ascórbico previamente pesados (Fotografía 40) son mezclados con el agua para formar un almíbar el cual es depositado por medio de una jeringa en la cual se depositan 10 ml de esta mezcla a cada botella previamente lavada y desinfectada (Fotografía 41).

**Fotografía 40.** Azúcar y ácido ascórbico.



Fuente. elaboración propia.

**Fotografía 41.** Mezcla lista para carbonatación.



Fuente. elaboración propia.

**b) Envasado y tapado:** Una vez agregada la cantidad de almíbar anteriormente descrita, se procede a realizar el llenado de estas, las cuales tienen una capacidad de 330 cm<sup>3</sup> (figura 45), dichas botellas son de color ámbar ya que las botellas verdes o transparentes no filtran los rayos ultravioletas de la luz y esto causa un olor a zorrillo en la cerveza. En esta parte del proceso, fue

utilizado un tubo para embotellar, el cual permite la salida de la cerveza al presionarlo sobre el fondo de la botella.

Posteriormente se tapó cada una de las botellas gracias a una herramienta llamada tapadora de botellas (fotografías 45 y 46.) para iniciar la etapa de carbonatación.

A continuación, se muestra la evidencia respectiva del proceso

**Fotografía 42.** Cerveza fermentada 1.



Fuente. elaboración propia.

**Fotografía 43.** Cerveza fermentada 2.



Fuente. elaboración propia.

**Fotografía 44.** Llenado de botellas.



Fuente. elaboración propia.

**Fotografía 45.** Tapado de botellas.



Fuente. elaboración propio.

**Fotografía 46.** Tapado de botellas



Fuente. elaboración propia.

Finalmente, las botellas se dejan en un lugar fresco y seco a temperatura ambiente con el fin de realizar el proceso de maduración y carbonatación durante diez días, una vez terminado este lapso de tiempo de cada lote producido (fermentador 1 y fermentador 2) se escoge una botella al azar para ser llevada a realizar los análisis microbiológicos para descartar la presencia de coliformes totales e identificar número de mesófilos aerobios presentes en cada una y, de esta forma certificar que el producto final es apto para el consumo humano y, así pasar a la etapa de pruebas organolépticas para realizar la comparación.

Una vez explicada la metodología de cada una de las etapas de elaboración de la cerveza tipo Pale Ale Belga de manera artesanal, la propagación de la levadura que se quiere volver a utilizar en un nuevo proceso fermentativo, la vitalidad de esta y, la fermentación con la levadura reutilizada; en el siguiente capítulo se expondrán los resultados a lo largo de los parámetros fisicoquímicos, los análisis organolépticos y las pruebas microbiológicas del producto obtenido; con el fin de determinar si el proceso realizado es viable y realizar la comparación entre las cervezas fermentadas con levadura propagada y las elaboradas por la cervecería Moonshine.

### 3. RESULTADOS Y ANALISIS

Es importante establecer si la levadura extraída del tanque fermentador cumple con los parámetros óptimos para ser implementada en un segundo proceso de fermentación.

Uno de los principales análisis a realizar, es el de la presencia de microorganismos contaminantes, ya que ellos pueden afectar el producto final de la fermentación, es decir, pueden afectar las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de la cerveza. De acuerdo a lo mencionado en el capítulo anterior, las muestras de levadura tomadas en la microcervecería fueron llevadas al Centro de Diagnóstico Microbiológico con el fin de realizar los análisis pertinentes y así asegurarse de que la levadura cumplía con los parámetros requeridos para pasar a la segunda fase de la experimentación.

#### 3.1 ANALISIS MICROBIOLÓGICOS DE LA LEVADURA REUTILIZADA

Es posible que la muestra de levadura tomada pueda verse afectada con ciertos microorganismos desde la extracción en el tanque fermentador hasta su reutilización en un próximo proceso fermentativo. Por ende, es de gran importancia realizar análisis microbiológicos para determinar la ausencia o presencia de estos contaminantes; ya que, si estos se propagan, pueden generar desde un enturbiamiento de la cerveza hasta modificaciones en el metabolismo de la fermentación.

Una vez finalizado el proceso fermentativo, se puede distinguir en tres grupos el grado de contaminación según el efecto perjudicial<sup>123</sup>:

- La flora acompañante inofensiva (microorganismos que pueden deteriorar el producto final de forma indirecta).
- Los microorganismos deteriorantes potenciales.
- Microorganismos que deterioran la cerveza inevitablemente.

La levadura extraída del tanque fermentador fue llevada a análisis microbiológicos con el fin de descartar la presencia de mohos y levaduras, acetobacterias, lactobacilos y pediococos. Estos contaminantes pueden afectar potencialmente la calidad de la cerveza a elaborar y, según la clasificación anterior se ubican en el segundo grupo de contaminantes según su efecto perjudicial.

En total se realizaron cuatro análisis microbiológicos, esto se debió a que tres de los resultados obtenidos contaban con presencia de microorganismos que

---

<sup>123</sup> HOUGH, J. S. Op.cit., p. 126

impedían que la levadura extraída se usara en un próximo proceso fermentativo. A continuación, se detalla cada uno de los análisis obtenidos

En el primer análisis de laboratorio entregado por el centro de diagnóstico microbiológico (**ANEXO E**), se analizaron 200ml de levadura y se obtuvo el siguiente resultado

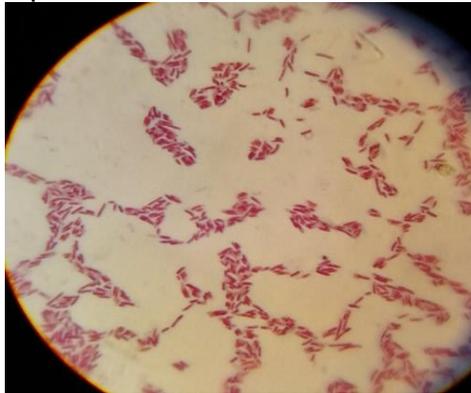
**Tabla 7.** Resultados del primer análisis microbiológico a la levadura recuperada el día de 09 de febrero.

<b>RECUEENTOS E INVESTIGACIONES</b>	<b>RESULTADOS</b>
RECUEENTO TOTAL DE MESOFILOS AEROBIOS MEDIO PCA T° 32.5°C± 2.5°C X 48 Horas	43 ufc/ml
RECUEENTO TOTAL DE HONGOS Medio Sabouraud Agar T° 22.5°C± 2.5°C X 7 Días	<10 ufc/ml
RECUEENTO TOTAL DE LEVADURAS Medio Sabouraud Agar T° 22.5°C± 2.5°C X 7 Días	27 x 10 <sup>2</sup> ufc/ml
RECUEENTO TOTAL DE COLIFORMES Medio VRB Agar T°32.5°C±2.5°C X 48 Horas	90 ufc/ml
DETERMINACION DE <i>Pediococcus sp.</i> Medios: AGAR MRS, T° 32.5°C± 2.5°C X 24 Horas	<b>AUSENTE</b>
DETERMINACION DE <i>Lactobacillus sp.</i> Medios: AGAR MRS, T° 32.5°C± 2.5°C X 24 Horas	<b>AUSENTE</b>
DETERMINACION DE <i>Acetobacterias</i> Medios: AGAR MRS, T° 32.5°C± 2.5°C X 24 Horas	<b>AUSENTE</b>

Fuente: elaboración propia.

Como se puede observar claramente en los análisis anteriormente descritos en la Tabla 7, la muestra no presenta *Pediococcus sp*, *Lactobacillus Sp* y *Acetobacterias*; sin embargo, en el recuento total de coliformes no arrojo resultados óptimos, ya que se puede evidenciar que la levadura recolectada, presenta un total de 90 unidades formadoras de colonia por mililitro. Por medio de identificación bioquímica, se encontraron dos tipos de morfologías diferentes como se observa en las figuras 23 y 24, es decir, los microorganismos encontrados fueron *Escherichia Coli* y de *Citrobacter Kosseri*. De acuerdo a los resultados obtenidos, la levadura recuperada no es apta para utilizarse en un próximo proceso fermentativo. De igual manera, es necesario realizar un nuevo muestreo en la cervecería Moonshine contando con las mejores condiciones asépticas y así lograr resultados nulos en las próximas muestras.

**Figura 23.** Morfología 1, Colonias redondas, cremosas, blancas, Bacilos Gram Negativos correspondientes a *Escherichia coli*.



Fuente: Centro de diagnóstico microbiológico.

**Figura 24.** Morfología 2. Colonias redondas, cremosas, blancas. Bacilos Gram Negativos correspondientes a *Citrobacter Kosseri*.



Fuente: Centro de diagnóstico microbiológico.

Debido a los resultados obtenidos, fue necesario realizar varios muestreos posteriores, con el fin de obtener una muestra libre de contaminantes potenciales que pudieran producir afectaciones a la salud de los consumidores finales. En la segunda y la tercera toma de muestra, las condiciones de asepsia fueron más estrictas; sin embargo, los resultados que se obtuvieron no fueron los esperados. Como se puede observar en las tablas 8 y 9, se redujo la cantidad de unidades formadoras de colonia en el recuento de coliformes totales considerablemente pero aun había presencia de la *Escherichia coli*.

**Tabla 8.** Resultados del segundo muestreo de levadura correspondiente al 04 de marzo de 2019.

<b>RECUENTOS E INVESTIGACIONES</b>	<b>RESULTADOS</b>
RECuento TOTAL DE MESOFILOS AEROBIOS MEDIO PCA T°32.5°C±2.5°C X 48 Horas	11* 10 <sup>2</sup> ufc / ml
RECuento TOTAL DE COLIFORMES MEDIO VRB Agar T°32.5°C±2.5°C X 48 Horas	6 ufc / ml

Fuente: elaboración propia.

**Tabla 9.** Resultados del tercer muestreo de levadura correspondiente al 15 de marzo 2019.

<b>RECUENTOS E INVESTIGACIONES</b>	<b>RESULTADOS</b>
RECuento TOTAL DE COLIFORMES MEDIO VRB Agar T°32.5°C±2.5°C X 48 Horas	3 ufc / ml

Fuente: elaboración propia.

*Los resultados dados por el centro de diagnóstico microbiológico son mostrados en los **ANEXOS F y G.***

Con los posteriores resultados obtenidos, las muestras de levaduras recuperadas y anteriormente lavadas, se desecharon, ya que no contaban con las condiciones óptimas para su reutilización. Debido a esto, se realizó un cuarto análisis con nueva levadura el día 22 de marzo de 2019, dando como resultado un valor negativo para la presencia de Coliformes totales; gracias a este resultado, la levadura paso a fase de almacenamiento para después ser dispuesta en la propagación y así poderla reutilizar en un próximo proceso fermentativo.

**Tabla 10.** Resultados del cuarto muestreo de levadura correspondiente al 15 de marzo de 2019.

<b>RECUENTOS E INVESTIGACIONES</b>	<b>RESULTADOS</b>
RECuento TOTAL DE COLIFORMES MEDIO VRB Agar T°32.5°C±2.5°C X 48 Horas	0 ufc / ml

Fuente: elaboración propia.

*Los resultados dados por el centro de diagnóstico microbiológico son mostrados en el **ANEXO H***

**3.1.1 Análisis de resultados de microorganismos deteriorantes potenciales de la levadura para un próximo proceso fermentativo.** Como bien se sabe, el mosto es un medio de cultivo lleno de nutrientes el cual se somete a ebullición y posteriormente se inocula con levadura. Durante la fermentación se consume los azúcares y se produce etanol, disminuyendo así aminoácidos y vitaminas. Por tanto, la cerveza y la levadura final asentada constituyen un medio poco adecuado para el desarrollo de bacterias, las cuales provocan turbidez y generan olores y bouquets anómalos. Las únicas bacterias que generan graves problemas en la reutilización de levadura y en general en la producción de cerveza son las bacterias ácido lácticas, las que comúnmente pertenecen a dos grandes géneros: *Lactobacillus* y *Pediococcus*; las especies del género *Lactobacillus* tienen células en forma de bastoncillo y las del género *Pediococcus* son esféricas, las cuales pueden generar desde el punto de vista bioquímico ácido láctico o ácido acético como metabolito fundamental<sup>124</sup>.

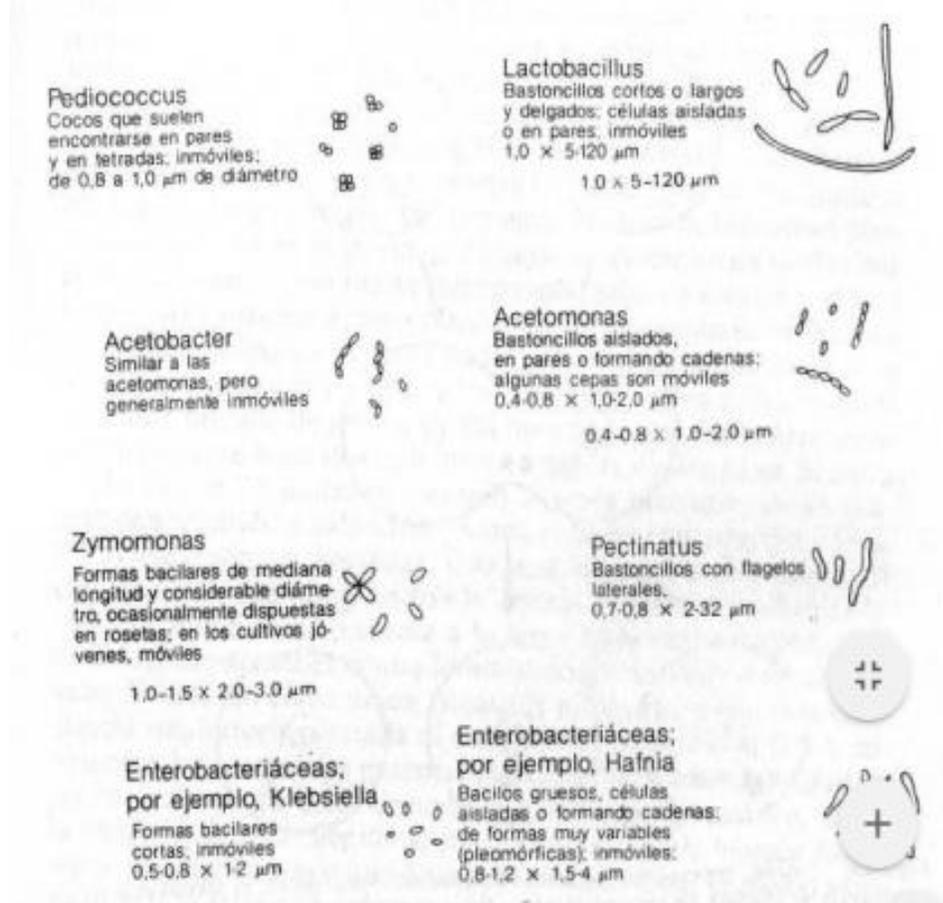
Las bacterias ácido lácticas representan una grave contaminación en la levadura ya que la presencia de estas genera durante la fermentación cantidades importantes de metabolitos indeseables, entre los cuales se encuentra el precursor del diacetilo, el cual es el responsable del aroma y el bouquet a mantequilla de igual manera las bacterias ácido-acéticas son microorganismos acetificantes que son ampliamente usados para la producción de vinagre a partir del vino, si este microorganismo se encuentra en la levadura a reutilizar puede generar durante una futura fermentación la oxidación del alcohol y producir ácido acético lo que genera un sabor diferente a la cerveza producida.

Como se puede observar en el numeral 3.1., los resultados obtenidos para la identificación de mohos y levaduras, acetobacterias, lactobacilos y pediococos arrojaron resultados negativos, ya que se registró la ausencia de cada uno de estos. Si bien, la levadura recuperada puede tener diversos tipos de microorganismos que la pueden afectar. Los mencionados anteriormente, son fundamentales a la hora de evaluar la calidad de la cerveza obtenida como producto final, en la figura 25 se muestran diferentes tipos de bacterias que pueden afectar la levadura y posteriormente la fermentación de un nuevo mosto entre las cuales se muestra los microorganismos analizados y descritos anteriormente.

---

<sup>124</sup> HOUGH, J. S. Op.cit., p. 126

**Figura 25.** Tipos de bacterias que pueden afectar la levadura recuperada del tanque fermentador.



Fuente: HOUGH. J.S. Biotecnología de la cerveza y la malta. España: Acribia S.A. 1990.p. 127.

**3.1.2 Presencia de coliformes en las muestras de levadura.** En base a los resultados obtenidos en las tres primeras muestras analizadas, se puede decir que durante la fase de muestreo hubo contaminación cruzada, lo que hace referencia, a la contaminación de las bacterias que van de una superficie a otra por contacto directo o indirecto. Si bien el procedimiento de toma de muestra fue óptimo, es decir, hubo una correcta esterilización de los recipientes en donde se almacenó la muestra, esterilización de mangueras extractoras de levadura del tanque fermentador, uso de implementos de protección tales con guantes, tapabocas, bata de laboratorio, esto no fue suficiente para que la levadura fuera afectada por contaminantes que impedían su reutilización en una próxima fermentación.

Las dos bacterias que se identificaron en la levadura fueron la *Escherichia coli* y *Citrobacter koseri*. La *Escherichia coli* es una bacteria habitual en el intestino del ser humano y de otros animales de sangre caliente. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar graves enfermedades de

transmisión alimentaria; por ende, la normatividad colombiana exige que en productos de consumo humano no haya presencia de esta, ya que puede generar síntomas como cólicos y diarrea que puede ser sanguinolenta, de igual forma pueden aparecer fiebre y vomito<sup>125</sup>.

El género *Citrobacter* es un grupo de bacilos Gram negativos aerobios encontrados con mucha frecuencia en el agua, el suelo, la comida y como flora saprófita en el tracto intestinal de animales y humanos; son microorganismos que causan frecuentemente infecciones importantes, especialmente en huéspedes inmunodeprimidos<sup>126</sup>.

La presencia de las dos bacterias anteriormente descritas, son un indicador claro de contaminación. Los factores de propagación de estas bacterias en la levadura no se pueden determinar concretamente, pero se tienen posibles focos, los cuales se mencionan a continuación:

- *Mala manipulación por parte de los operarios o de los estudiantes:* la propagación de la *Escherichia coli* y de *Citrobacter koseri* se puede dar a través de las personas que no se lavan adecuadamente las manos luego de ir al baño, estas bacterias pueden quedar en la superficie de estas y se transmiten por contacto directo. En los primeros muestreos, los operarios que colaboraron para la extracción de la levadura del tanque fermentador no tenían guantes, únicamente rociaron alcohol etílico al 70% en sus manos, que para este caso actúa como desinfectante.
- *Las mangueras extractoras* de levadura de los tanques fermentadores también pudieron estar contaminadas a la hora de tomar las muestras y por ende afectar la levadura que salía de esta, dichas mangueras no se les tiene un estricto control sanitario ya que solo son usadas para extraer los desechos generados a finalizar el proceso fermentativo (restos de lúpulo, levadura, trub, etc.).
- *Los recipientes que estuvieron en contacto con la levadura extraída,* también se tienen en cuenta como posible foco contaminante aun sabiendo la manera en la que se realizó la desinfección y su esterilización, sin embargo, pudo haber contaminación en algún momento del traslado, es decir, contaminación cruzada.

Se descarta que la contaminación de la levadura se haya presentado durante la fermentación en la cervecería Moonshine; esto debido a que las dos bacterias identificadas son enterobacterias, las cuales no sobreviven en ambientes con pH

---

<sup>125</sup> OMS. *Escherichia coli*. Organización Mundial de la Salud. [En línea], 20 de abril de 2019. Disponible en internet: [https://www.who.int/topics/escherichia\\_coli\\_infections/es/](https://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/)

<sup>126</sup> DAZA. Lisette. Identificación de *Citrobacter koseri* como nuevo patógeno en pacientes con rinitis crónica. *An Orl Mex*. [En línea], 20 de abril de 2019. Disponible en internet: <https://www.medigraphic.com/pdfs/anaotomex/aom-2014/aom141a.pdf>

bajos y, durante la fermentación estos valores varían entre una tasa del 2 al 4,4% que son condiciones características en la producción de la cerveza<sup>127</sup>.

De acuerdo a las pruebas realizadas, la cuarta muestra analizada fue la que arrojó el resultado favorable para dar inicio a la propagación de la levadura. Esta muestra en sus resultados arrojó un valor negativo para la presencia de E. Coli y de Citrobacter. Es importante mencionar que, para lograr este parámetro, fue necesario que los recipientes y las mangueras de toma de muestra se sometieran a un lavado con ácido práctico que es un agente antimicrobiano y desinfectante debido a su potencial oxidante, de igual manera, durante la toma de muestra una sola persona fue la encargada de manipular los recipientes y la muestra evitando a toda costa la contaminación cruzada.

Una vez obtenido este resultado, se procede a la siguiente fase experimental, la cual consiste en evaluar la viabilidad celular, para que posteriormente se realice la propagación de la levadura para alcanzar la biomasa necesaria para fermentar el lote a escala banco.

Se debe mencionar que la etapa experimental correspondiente a la evaluación de parámetros como la viabilidad, la vitalidad, la fase de propagación y la elaboración de cerveza con la levadura reutilizada se realizó por duplicado, con el fin de tener un mejor estimativo de los resultados obtenidos; al tener dos experimentos independientes se minimiza el riesgo de obtener un producto final con parámetros que no sean óptimos y, de esta manera es necesario aclarar que si alguna de las fermentaciones no arroja resultados adecuados se tiene un segundo experimento de respaldo.

Teniendo en cuenta lo anterior cada experimento realizado se documenta en este trabajo como 1 y 2, asimismo se tiene que tener en cuenta que las cantidades de levadura reutilizada y el volumen de propagación del starter fueron los mismos para cada uno.

### **3.2 VIABILIDAD CELULAR**

Como se mencionó en el capítulo 2, la finalidad de hallar la viabilidad de la levadura es determinar la tasa de crecimiento o de mortalidad de la muestra. Para ello se evaluó el porcentaje de células vivas durante la fase de propagación, estableciendo las condiciones de cultivo adecuadas para el proceso fermentativo.

El estudio de la viabilidad se realizó en dos periodos los cuales se detallan a continuación:

---

<sup>127</sup> HOUGH, J. S. Op.cit., p. 127.

- El primero, evaluó la cantidad de células vivas presentes en la levadura antes de realizar la propagación.
- El segundo ensayo, fue durante la propagación y, esta se realizó en tres etapas, como se muestra en la tabla 11.  
El crecimiento de la levadura en la fase de propagación está influenciado principalmente por tres factores principales:
  - Volumen de mosto utilizado en cada propagación.
  - Densidad del mosto.
  - La concentración estimada de células de levadura antes de propagar.

Gracias a la **calculadora de inóculo y propagación de levadura** se establecieron las cantidades adecuadas de mosto a utilizar, esto con el fin de no saturar el stater ocasionando resultados poco óptimos en la fase de propagación. A continuación, se muestran las cantidades estimadas por la calculadora.

**Tabla 11.** Volumen en ml de mosto usado para cada fase de propagación en el laboratorio.

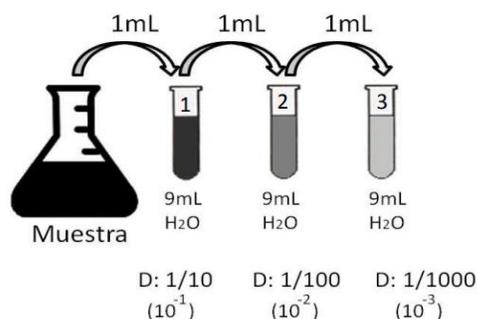
ETAPA DE PROPAGACIÓN	VOLUMEN EN ML DE MOSTO ESTÉRIL USADO
1	100
2	200
3	500

Fuente. elaboración propia.

Como se mencionó en el capítulo anterior, para llevar a cabo el conteo celular, es necesario realizar tres disoluciones buscando en cuál de ellas es posible obtener la mejor estimación de viabilidad celular. Teniendo en cuenta lo anterior, los resultados, son dados en base a la mejor disolución.

La figura 26 muestra de manera explicativa y detallada como se realizaron las respectivas disoluciones

**Figura 26.** Manera de realizar las disoluciones.



Fuente: LIBKIND DIEGO, TOGNETTI CELIA, MOLINE MARTÍN. Curso teórico-practico sobre microscopia y recuento de levaduras para productores de cerveza. Instituto de investigaciones en biodiversidad y medioambiente IMBIOMA. 2014. [En línea] Disponible en <http://www.somoscervecedores.com/wp-content/uploads/2014/11/Teorica-Curso-Microscopio-La-Plata-2014-V5.pdf>

La disolución 1:10 fue la que mejores resultados arrojó, debido a su concentración celular analizada.

**3.2.1 Viabilidad de la levadura extraída del tanque fermentador.** Una vez extraída la levadura del primer proceso fermentativo, se realizó el conteo celular de la muestra para determinar si esta está metabólicamente viva. Con ayuda de la cámara de Neubauer, se contó un total de 122 células en los 25 cuadrantes, de las cuales solo 10 se tiñeron con azul de metileno, lo que indica que estas estaban muertas. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 12.** Recuento de células viables en la primera fase.

CUADRANTE	NÚMERO DE CÉLULAS VIVAS	NÚMERO DE CÉLULAS MUERTAS
1	2	0
2	10	1
3	2	0
4	5	0
5	6	2
6	2	0
7	3	0
8	4	0

**Tabla 13.** Continuación.

CUADRANTE	NÚMERO DE CÉLULAS VIVAS	NÚMERO DE CÉLULAS MUERTAS
9	7	2
10	3	0
11	4	0
12	3	0
13	5	1
14	3	0
15	6	0
16	4	1
17	2	0
18	7	0
19	5	1
20	5	0
21	6	0
22	3	1
23	2	0
24	8	0
25	5	1

Fuente. elaboración Propia.

**Recuento de células viables: 112**

**Recuento de células no viables: 10.**

Con los resultados obtenidos es posible determinar la viabilidad de la muestra con las ecuaciones 1 y 3 mostradas en el capítulo anterior. Los resultados se muestran a continuación.

En primera instancia se hallan las concentraciones de células viables y no viables, a partir de la disolución 1:10.

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = \text{Levadura total} * F * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = 112 * 10^1 * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = 1,12 * 10^7$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = \text{Celulas no viables} * F * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = 10 * 10^1 * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = 1 * 10^6$$

Una vez realizado esto, es posible determinar el porcentaje de células muertas en la muestra, a partir de la ecuación 2:

$$\% \text{Células muertas} = \frac{\text{Conc. de células teñidas}}{(\text{Conc. de levaduras} + \text{Conc. de células teñidas})} * 100$$

$$\% \text{Células muertas} = \frac{1 * 10^6 \text{ células teñidas/ml}}{(1,12 * 10^7 \text{ levaduras/ml} + 1 * 10^6 \text{ células teñidas/ml})} * 100$$

$$\% \text{Células muertas} = 8,1967$$

Con los datos hallados es posible conocer la viabilidad en la primera etapa experimental.

$$\text{Viabilidad} = 100 - \% \text{Células muertas}$$

$$\% \text{Viabilidad} = 91,8$$

Este resultado obtenido es aceptable ya que es superior al 90%, por tanto, el método de la tinción con azul de metileno arroja una confiabilidad en los resultados. En caso de que se obtenga una viabilidad inferior, es necesario realizar un recuento en placa para obtener un resultado más aproximado<sup>128</sup>.

Dicho porcentaje de viabilidad sirve como referencia en la etapa de propagación; si esta se hace de manera adecuada, la levadura aumentará su población, ya que tenderá a reproducirse pasando de la fase de latencia (inactividad metabólica) a la fase logarítmica y, de esta manera aumentar el número de células vivas.

**3.2.2 Viabilidad de la levadura en la etapa de propagación.** Una vez determinada la viabilidad de la muestra extraída del tanque fermentador, se dio inicio a la fase de propagación, la cual tiene como objetivo obtener la biomasa necesaria para producir una determinada cantidad de cerveza; con base a esto, se preparó un medio de cultivo (stater) en el cual la levadura obtuviera las

<sup>128</sup> BOULTON Y QUAIN, D. Citado por TORIBIO, Karin. Op. cit., p.49.

condiciones idóneas para reproducirse, cada fase se dejó en promedio tres días con agitación constante evitando la oxigenación y la contaminación; terminado esto, se procedió a hallar la viabilidad de cada etapa, los resultados se muestran en el ANEXO I y J.

Obtenidos los resultados de la viabilidad de la levadura en la etapa de propagación, se conoce la concentración y el porcentaje de células vivas que se utilizarán para el próximo proceso fermentativo, que se llevará a cabo a escala banco. En la tabla 13 se resumen todos estos datos.

**Tabla 14.** Concentración y viabilidad de cada fase de propagación del experimento 1.

<b>EXPERIMENTO NUMERO 1</b>		
	<b>Concentración de levaduras por ml</b>	<b>Viabilidad</b>
<b>PRIMERA FASE DE PROPAGACION</b>	1,50 * 10 <sup>7</sup>	94,33%
<b>SEGUNDA FASE DE PROPAGACION</b>	1,67 * 10 <sup>7</sup>	97,09%
<b>TERCERA FASE DE PROPAGACION</b>	<b>1,78 * 10<sup>7</sup></b>	<b>98,34%</b>

Fuente. elaboración propia

**Tabla 15.** Concentración y viabilidad final de cada fase de propagación del experimento 2.

<b>EXPERIMENTO NUMERO 2</b>		
	<b>Concentración de levaduras por ml</b>	<b>Viabilidad</b>
<b>PRIMERA FASE DE PROPAGACION</b>	1,35 * 10 <sup>7</sup>	93,10%
<b>SEGUNDA FASE DE PROPAGACION</b>	1,57 * 10 <sup>7</sup>	96,31%
<b>TERCERA FASE DE PROPAGACION</b>	<b>1,65 * 10<sup>7</sup></b>	<b>97,63%</b>

Fuente. elaboración propia.

Según las normas de control de calidad de diversas empresas cerveceras, la viabilidad para hacer una futura reutilización de levadura debe de ser superior al 95%<sup>129</sup> para obtener cervezas con características similares en comparación con una realizada con levadura nueva; teniendo en cuenta esto, la levadura al salir del fermentador en la cervecería Moonshine no cumple dicho parámetro, ya que se

<sup>129</sup> KUNZE, Wolfgang. Op, Cit. p. 508

obtuvo un resultado del 91,8%. El resultado de dicha viabilidad pudo haber sido afectado por los siguientes factores:

- La levadura extraída del tanque fermentador fue almacenada en cadena de frío durante unos días antes de que se analizara la viabilidad por medio del conteo celular. Ya que en primera instancia la muestra fue llevada a analizar en el laboratorio con el fin de determinar si cumplía los parámetros microbiológicos exigidos para la realización de un nuevo proceso fermentativo, esta, con el transcurso del tiempo va ir disminuyendo la cantidad de células vivas, debido a que entra en una fase estacionaria en ausencia de nutrientes que permitan su crecimiento óptimo, este fenómeno es conocido como autólisis de levaduras.
- Otro factor que puede afectar la viabilidad celular es la contaminación de la levadura una vez que es extraída del tanque fermentador, lo cual puede afectar drásticamente el metabolismo celular y provocar una autólisis fácil de identificar ya que el olor y el color de esta cambiaran en un periodo corto de tiempo. Normalmente el barro recuperado de los tanques de fermentación, presenta una coloración crema, es decir, este es un signo empírico usado por los cerveceros artesanales para la identificación bacteriana que afecta a la levadura en el cambio de tonalidad a un color café. No necesariamente la presencia de algún contaminante en la levadura mostrara signos notorios a simple vista, por ende, es conveniente realizar análisis microbiológicos que certifiquen que esta no presenta microorganismos que podrían afectar un nuevo lote de cerveza.
- La geometría del tanque fermentador consiste en un cilindro cónico, como se puede observar en la figura 27, en el cual la levadura una vez finaliza el proceso fermentativo flocula y se sedimenta junto a materia sólida como lúpulo y otros residuos generados en el proceso, formando lo que se conoce como cuba cervecera.

**Figura 27.** Tanque de fermentación cilindro-cónico en la producción de cerveza.



Fuente.  
Tomado en  
línea de  
[\[http://www.plevnik.si/es/plevnik.asp?FolderId=456\]](http://www.plevnik.si/es/plevnik.asp?FolderId=456)  
]

En primera instancia se debe mencionar que hay diversos mecanismos de floculación de la levadura y esta se define como la capacidad que tienen las células de levadura para adherirse unas con otras formando grupos que rápidamente sedimentan (levaduras de fondo) o alcanzan la superficie del líquido (levaduras de superficie)<sup>130</sup>. Una levadura que flocule de manera adecuada facilita la separación y recolección de la levadura, disminuye tiempos de proceso y evita que pase excesiva cantidad de levadura a maduración (riesgos de autólisis). Existe diversos métodos físicos por los cuales la levadura flocula al transcurrir el proceso fermentativo los cuales son:

- **Hidrofobicidad:** la pared celular presenta características hidrófobas (repele el agua) lo que hace que se aglomeren. Esta propiedad está asociada a la edad de la célula.<sup>131</sup>
- **Potencial Zeta:** Es una medida de la carga eléctrica de la superficie celular. La reducción en esta carga favorece el acercamiento celular (y por ende la floculación). La carga superficial se afecta por el pH del medio y la presencia de sustancias “buffer” como los fosfatos.<sup>132</sup>
- **Interacción proteínas – azúcares:** Existe una proteína llamada lectina que tiene la propiedad de “reconocer” (atraer) sacáridos como la manosa. Como la pared

---

<sup>130</sup> KLIMOVITZ, Ray. Y BAMFORTH, Charles. Op cit. p. 368.

<sup>131</sup> MARIA PAULA. Valoración de la calidad microbiológica del producto en proceso de una planta productora de bebidas alcohólicas. [En línea]. Trabajo de grado para optar por el título de Microbiólogo Industrial. Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. 2007. p. 24. [Consultado: 08 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis16.pdf>

<sup>132</sup> TORRES, M. Op cit., p 24.

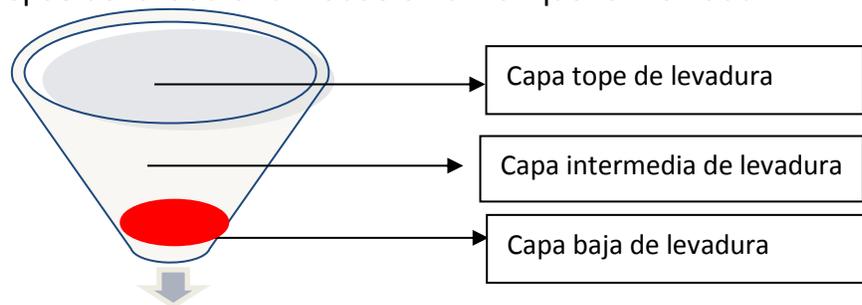
celular de la levadura es rica tanto en lectina como en manosa se considera factible que estos compuestos se atraigan entre si uniendo las células.<sup>133</sup>

La manera en la cual la levadura realice el proceso de floculación afecta de manera directa la viabilidad de esta a la hora de realizar una próxima reutilización ya que la ubicación de las células de levadura en lo que se conoce como cuba cervecera determinará el rendimiento metabólico de esta.

La levadura forma tres capas en dicha cuba, la primera es la capa tope de la levadura, esta está formada esencialmente por partículas de espuma que colapsó durante el proceso fermentativo y por células de levadura que sedimentaron de manera tardía. La capa intermedia, es la levadura de núcleo, está compuesta por células de levaduras metabólicamente sanas y que tienen una fermentación activa y su aspecto debe ser lo más claro posible; la capa más baja, es la levadura de fondo y, está compuesta por diversas partículas que sedimentaron mucho antes que la levadura, acá también se encuentran células muertas y partículas de trub.

Debido a esto en la extracción de levadura del tanque de fermentación, si bien se esperó un tiempo para que la capa baja se desechara, se pudo obtener cierta cantidad de esta mezcla y, por ende, traer consigo una significativa cantidad de células muertas que afectará la viabilidad para una próxima fermentación, en la figura 28 se explica de manera gráfica la zona en donde se cree que se pudo obtener la muestra con el porcentaje de viabilidad descrito anteriormente.

**Figura 28.** Cepas de levadura formadas en un tanque fermentador.



Fuente: elaboración propia.

La zona demarcada con color rojo es la interfaz entre cada fase y en donde se considera que se realizó la toma de muestra, en la cual no se obtuvo toda la levadura metabólicamente sana y en consecuencia se arrastró parte de células muertas presentes en la zona baja que pudieron afectar la viabilidad celular,

<sup>133</sup> Ibid., p. 24

aunque esto es muy difícil de conocer ya que no hay una manera concreta de determinar las diferencias metabólicas entre fase y fase.

Como se vio en los resultados de la propagación realizada mostrados en las tablas 13 y 14, realizar un medio de cultivo óptimo que le proporcione a la levadura los nutrientes necesarios para reproducirse, arroja buenos resultados en lo que a viabilidad se refiere, ya que, para ambos experimentos el porcentaje de células vivas presentes en cada muestra al final de esta etapa son superiores al 95%. Además de esto, se puede observar que la concentración de levaduras por mililitro de muestra aumentó de manera considerable durante el tiempo en el cual se realizó cada stater.

Para el primer experimento la concentración final de células viables para realizar la fermentación del lote de 10 litros de cerveza fue de  $1.78 \cdot 10^7$  levaduras/ml y para el segundo fue de  $1.65 \cdot 10^7$  levaduras/ml; este rápido crecimiento indica que la levadura se adaptó rápidamente al medio de cultivo y que no se vio en condiciones de estrés. Según lo menciona Briggs, et al, durante las diferentes fases, la levadura está expuesta a una gran variedad de tensiones que pueden generar efectos en la viabilidad celular, pero a su vez la levadura ha desarrollado diversas estrategias metabólicas para mitigar los efectos nocivos de dichas afectaciones<sup>134</sup>.

Las células en el re-pitching se encuentran en fase estacionaria (E), ya que una vez extraída del proceso fermentativo no tienen nutrientes con los cuales puedan producir energía, el traslado a un nuevo mosto (propagaciones que se realicen hasta llegar a la fermentación en masa) induce en ellas un cambio relativamente sincronizado desde la fase E y el progreso del start.

En las primeras horas de propagación no hay cambios significativos en el número de células o extracto aparente del mosto (cambios en el porcentaje de azúcar en el medio), al transcurrir del tiempo las células progresivamente pasan a la fase de crecimiento exponencial aumentando el volumen celular en aproximadamente un 20% gracias a las síntesis de esteroides que se lleva a cabo a expensas del glucógeno celular y oxígeno molecular, de ahí se deriva el crecimiento en la concentración de levadura de la muestra con la que se trabajó. Otro factor que es importante dar a conocer, como lo refiere Hulse en su libro *Yeast Propagation*, menciona que el mejor momento para transferir la levadura con la que se trabaja de una fase de propagación a otra corresponde a la última etapa de crecimiento antes de que esta entre a una fase estacionaria, esto nos indica que el metabolismo de la levadura es muy versátil y es adaptable a diversas condiciones

---

<sup>134</sup> Briggs et al. Op. cit., p. 453-454

ya que factores como la temperatura, las condiciones de agitación ( si es constante o no) influyen en la cantidad de levaduras al final de cada etapa<sup>135</sup>.

Por ende, es necesario antes de hacer una reutilización de levadura realizar una propagación adecuada en la cual se garanticen factores como:

- La concentración adecuada de levaduras por mililitro para realizar una determinada cantidad de cerveza.
- Una óptima viabilidad que garantice que no haya autólisis celular, generando cambios, mutaciones y, productos finales de muy mala calidad.

El objetivo de este trabajo de grado es evaluar la viabilidad de levaduras durante un solo ciclo de reutilización, por ende, si se quisiera hacer este procedimiento de manera continua es necesario tener un control cada vez mayor entre ciclo y ciclo; ya que cuando se realiza durante series prolongadas, la levadura va generando modificaciones progresivas en su capacidad de floculación y viabilidad. En las series de re-pitching, la biomasa de la levadura se somete a largos periodos de estrés, esto ocurre constantemente cuando se pasa de un ciclo celular normal a la fase estacionaria en donde está parcialmente inactiva y posteriormente es llevada a un nuevo ciclo celular<sup>136</sup>; la repetición constante de este proceso, genera daños irreparables en las levaduras la cual muestra como resultado modificaciones fisiológicas.

Sin embargo, uno de los principios primordiales para reutilizar una levadura es producir un cultivo en muy buenas condiciones que muestren una fermentación posterior óptima y no necesariamente en aumentar el número de levaduras en el menor tiempo posible; por esta razón antes de tomar una decisión acerca de si es recordable o no usar levaduras reutilizadas durante varios ciclos fermentativos se debe evaluar el comportamiento de esta en la fermentación, lo cual se refiere a la vitalidad celular<sup>137</sup>, ya que no necesariamente si la muestra arroja buenos resultados de viabilidad tendrá los mismos a la hora de evaluar la vitalidad en la etapa fermentativa.

---

<sup>135</sup> HULSE. G. Yeast propagation. Citado por TORIBIO, Karin. Evaluación de la estabilidad como stater de *Saccharomyces Pastorianus ssp. Carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo lager. [En línea]. Trabajo de grado para obtener el grado de Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de ciencias, 2015. p. 88. [Consultado: 24 de abril de 2019. Disponible en Internet: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1894/Q02.T67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

<sup>136</sup> KUNZE, Wolfgang. Op, Cit. p. 506.

<sup>137</sup> KUNZE, Wolfgang. Op, Cit. p. 512.

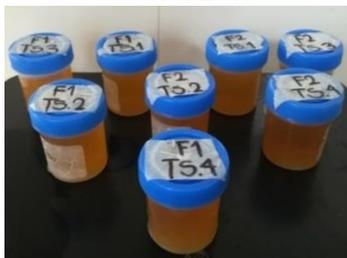
### 3.3 VITALIDAD CELULAR Y PRUEBAS FISICOQUÍMICAS DE LA CERVEZA

Por medio de los análisis de pH, densidad aparente, los grados Brix y el grado de Alcohol se determinó la vitalidad, es decir, se determinó la actividad de la fermentación y/o capacidad fermentativa que tuvo el mosto fermentado con la levadura anteriormente propagada. En el capítulo anterior, se explicaron los equipos utilizados y la importancia de llevar a cabo cada uno de estos análisis.

La determinación de todos estos parámetros, se realizó de manera diaria y de la manera más aséptica posible, con el fin de prevenir contaminación en el proceso de fermentación y de maduración. En los nueve días analizados, se tomaron muestras de aproximadamente 130 ml de cada fermentador como se muestra en el **ANEXO K**.

A continuación, se muestra la evidencia fotográfica de las muestras tomadas uno de los días analizados.

**Fotografía 47.** Muestras a analizar.



Fuente: elaboración propia.

Para tener una cerveza de calidad, se deben controlar permanentemente una serie de parámetros, los cuales serán indicadores claros, no solo en la parte microbiológica, sino también en la parte de calidad en el producto final. A continuación, se explica con detenimiento los resultados obtenidos en la fermentación, las gráficas respectivas de cada uno de los parámetros medidos y los respectivos análisis comparativos.

**3.3.1 pH.** El pH es una medida de acidez o de alcalinidad de una disolución. En disolución acuosa, la escala de pH varía entre 0 a 14. Son ácidas las disoluciones con pH de valores menores a 7 y, alcalinas las sustancias con pH mayores a 7.<sup>138</sup>

En cuanto a la medida de pH realizada en bebidas fermentadas como lo es la cerveza, es importante medir este parámetro ya que, gracias a esto, se pueden acortar las curvas de maceración, se puede evidenciar menor generación de color en el hervido, mejor rendimiento y, fermentación más rápida. El valor del pH advierte una sulfuración, a través de la cual se pueden esconder defectos de calidad, importantes para la carga y la actividad enzimática<sup>139</sup>.

El valor pH recomendado para la cerveza, es <sup>140</sup>

- 5,3 a 5,5 (óptimo en 5,0 a 5,2) en el mosto caliente, cabe mencionar que el valor de pH fuera de ese rango puede afectar considerablemente la fermentación.
- 4,3 a 4,6 (óptimo en 4,2 a 4,3) en la cerveza; si el valor de la cerveza es menor a 3, pueden presentar el fenómeno de inhibición por pH, en donde los centros activos de las enzimas se ionizan y pierden actividad enzimática.

En la siguiente tabla 15, se pueden observar los valores de pH tomados a lo largo de la fermentación y al final de la maduración en ambos experimentos.

**Tabla 16.** Valores de pH

<b>DIA DE FERMENTACIÓN</b>	<b>VALOR DE pH Experimento 1</b>	<b>VALOR DE pH Experimento 2</b>
<b>Día de elaboración de Mosto</b>	<b>5,86</b>	<b>5,86</b>
Día 1	4,54	4,345
Día 2	4,485	4,305
Día 3	4,515	4,405
Día 4	4,515	4,415
Día 5	4,545	4,495
Día 6	4,5	4,495
Día 7	4,52	4,52
Día 8	4,545	4,515
Día 9	4,52	4,59
<b>Día final de la maduración (día 15)</b>	<b>4,27</b>	<b>4,34</b>

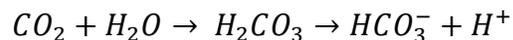
<sup>138</sup> INSTITUTO SUPERIOR DANIEAL ALCIDES CARRIÓN. Determinación de pH. Buffer. Acción amortiguadora. [En línea]. [ 5 de mayo de 2019]. Disponible en internet: [\[https://es.slideshare.net/agc1992/determinacion-de-ph-bioquimica\]](https://es.slideshare.net/agc1992/determinacion-de-ph-bioquimica)

<sup>139</sup> UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. Pruebas de análisis a bebidas fermentadas. [En línea]. [5 de mayo de 2019]. Disponible en internet: [\[http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php?option=com\\_content&view=article&id=92&Itemid=94\]](http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php?option=com_content&view=article&id=92&Itemid=94)

<sup>140</sup> KUNZE, Wolfgang. Op, Cit. p.784

De acuerdo a los valores obtenidos de pH a lo largo de fermentación, se puede analizar que el pH tiene un papel importante frente a la contaminación bacteriana, así como el crecimiento de las levaduras, la velocidad de fermentación y la producción de alcohol<sup>141</sup>.

La variación del pH durante el proceso de fermentación es debido a la transformación de los aminoácidos por pérdida de nitrógeno, pasando a ácidos, lo cual origina una disminución del pH en el medio. Otro de los factores que originan una variación de pH es la producción de dióxido de carbono en la fase de fermentación aerobia, que da lugar a la siguiente reacción, produciendo una caída de pH.



Durante la fermentación anaerobia, aparte de producirse etanol, se produce una serie de ácidos orgánicos como ácido láctico, propiónico y pirúvico, que influyen también en la disminución del pH.

De igual manera, el primer día de fermentación presenta la variación más notoria de pH, esto ocurre por que como se menciona anteriormente la levadura entra en fases de crecimiento, por esta razón al entrar en la fase de latencia, es decir, la primera fase de crecimiento de la levadura esta suele adaptarse al nuevo medio de cultivo después de que esta haya inoculado el mosto. Durante esta fase, la levadura evalúa su nuevo ambiente, realizando balances de azúcar, de oxígeno y de otros nutrientes disponibles, desarrollando las enzimas necesarias para su adaptación<sup>142</sup>. De igual manera, en esta fase se absorbe oxígeno y, amino ácidos (nitrógenos) presentes en el mosto para llevar a cabo la reproducción conocida como la gemación.<sup>143</sup> Durante el día 3 al día 10, la levadura entra en una etapa de atenuación, en la cual, esta convierte los azúcares en CO<sub>2</sub>, alcohol y otros subproductos; de esta forma el azúcar disponible es consumido y, debido al proceso bioquímico de la fermentación se produce alcohol y, la levadura empieza a asentarse indicando a su vez que el proceso ha terminado.<sup>144</sup>

El día 15 se observa el valor real del pH con el que finalizó la cerveza, que, comparado con los valores obtenidos en los días de fermentación en cada uno de

---

<sup>141</sup> SUAREZ, María. Cerveza: Componentes y propiedades. Trabajo fin de Master. Oviedo, España.: Universidad de Oviedo. Master Biotecnología alimentaria. 2013. Pág. 17-18

<sup>142</sup> CERVEZA ARTESANAL DESDE 2003. La guía definitiva de la levadura. [En línea]. [ 5 de mayo de 2019]. Disponibles en internet: [<https://www.cervezartesana.es/blog/post/la-guia-definitiva-de-la-levadura.html>]

<sup>143</sup>KENSHO Mediterranean Sake, Miso & Koji. La fermentación de la cerveza en 4 fases. [En línea]. [5 de mayo de 2019]. Disponible en internet: [ <http://www.kenshosake.com/la-fermentacion-de-la-cerveza-en-4-fases/>]

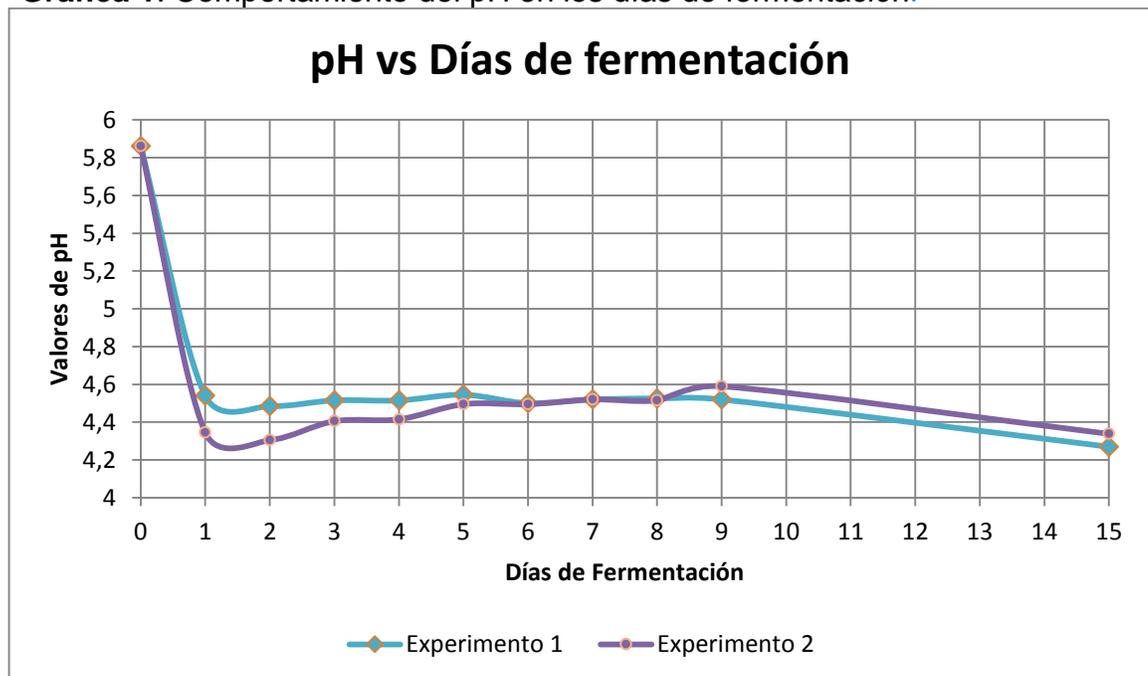
<sup>144</sup> CERVEZA ARTESANAL DESDE 2003. La guía definitiva de la levadura. [En línea]. [5 de mayo de 2019]. Disponibles en internet: [<https://www.cervezartesana.es/blog/post/la-guia-definitiva-de-la-levadura.html>]

los experimentos, este valor es menor. De acuerdo a la literatura, el valor final de pH del **experimento 1** y del **experimento 2**, están en el rango de valores óptimos de pH para cervezas, asegurando así que no hay presencia de patógenos tóxicos que afecten el producto final, ya que de lo contrario el valor del pH suele ser mayor a 6.

El valor de pH del producto final debe estar entre 4.2 y 4.5. Un valor menor implicaría que este es muy ácido y tiene un sabor desagradable, un valor mayor hace el producto propenso a albergar microorganismo.<sup>145</sup> De acuerdo a los valores finales obtenidos, tenemos que el **experimento 1**, finalizó con un pH de **4,27** y, el **experimento 2**, finalizó con un valor de pH de **4,34** lo que nos indica una cerveza óptima para el consumo en cuanto a los resultados de pH. De igual manera, es importante mencionar que en la industria cervecera es de gran importancia el control de este parámetro, pues este valor puede determinar el sabor de la cerveza y, su calidad de producción.

A continuación, se muestra la gráfica de pH de ambos fermentadores, en donde se observa con más claridad lo analizado anteriormente

**Gráfica 1.** Comportamiento del pH en los días de fermentación.



Fuente. elaboración propia.

<sup>145</sup> FARBE. La importancia de los indicadores de pH de la industria de los alimentos y bebidas. [En línea]. [5 de mayo de 2019]. Disponible en internet: [<https://www.farbe.com.mx/la-importancia-de-los-indicadores-de-ph-en-la-industria-de-los-alimentos-y-bebidas/>]

**3.3.2 Grados Brix.** Los grados Brix están directamente relacionados con la cantidad de sólidos solubles presentes en una bebida expresados en porcentaje. Los sólidos solubles están compuestos por los azúcares, ácidos, sales y demás compuestos solubles en agua.

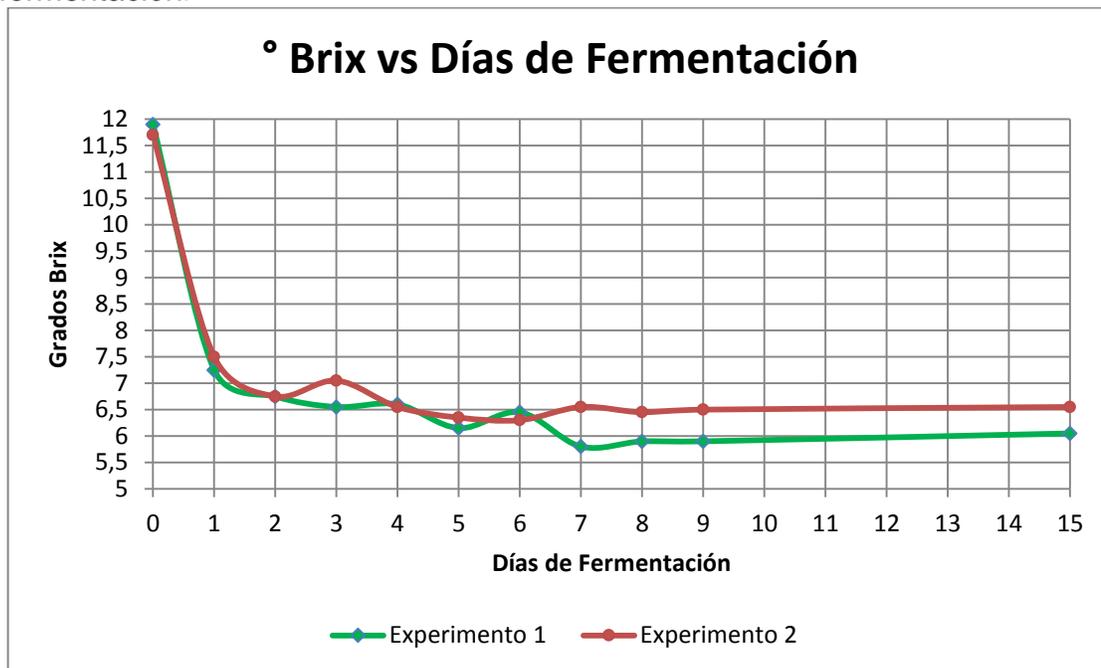
A continuación, la tabla 16 contiene los datos de los grados Brix en ambos experimentos a lo largo de la fermentación

**Tabla 17.** Valores de Grados Brix

<b>DÍA DE FERMENTACIÓN</b>	<b>VALOR ° BRIX Experimento 1</b>	<b>VALOR ° BRIX Experimento 2</b>
<b>Día de elaboración del mosto</b>	<b>11.9</b>	<b>11.7</b>
<b>Día 1</b>	7.25	7.5
<b>Día 2</b>	6.75	6.75
<b>Día 3</b>	6.55	7.05
<b>Día 4</b>	6.6	6.55
<b>Día 5</b>	6.15	6.35
<b>Día 6</b>	6.45	6.3
<b>Día 7</b>	5.8	6.55
<b>Día 8</b>	5.9	6.45
<b>Día 9</b>	5.9	6.5
<b>Día final de maduración (Día 15)</b>	<b>6.05</b>	<b>6.55</b>

Fuente. elaboración propia.

**Grafica 2.** Comportamiento de los grados Brix con el paso de los días de fermentación.



Fuente. elaboración Propia.

De acuerdo a los datos obtenidos a lo largo de la fermentación, se puede analizar que los grados Brix o sólidos solubles totales, dependen directamente de la cantidad de levadura con la que se inocula el mosto debido a que influyen directamente en la tasa de fermentación. Más células utilizando azúcares a un ritmo constante resultan en un aumento general en la velocidad de utilización de los hidratos de carbono. Una mayor masa en la inoculación produce fase de latencia más cortas, mayores tasas de fermentación y tiempos más cortos para alcanzar la atenuación.

Esto se logra evidenciar en la tabla 16 y en la gráfica 2, debido a que en el día 0, es decir, donde el mosto no ha sido inoculado, este tiene el valor más grande de grados brix o grados plato, debido a que durante la maceración se degradan varias enzimas en azúcares y, durante la cocción del mosto se adiciona Candy sugar el cual aumenta significativamente los azúcares fermentables.

De igual manera, es importante mencionar que el mosto antes de ser inoculado debe tener un valor menor o igual a **12° brix**, este parámetro nos indica que es un buen mosto para fermentar, si, por el contrario, los grados plato fueran mayores a este valor, se podrían producir alcoholes superiores a lo largo de la fermentación. Si se tiene un valor menor a **9° brix** en el mosto, puede implicar menores

cantidades de sustancias formadoras de espuma y de amino ácidos que son alimento para las levaduras.<sup>146</sup>

Se logra evidenciar que entre el día 1 al día 6, la tendencia de los grados brix disminuye, esto es posible porque la levadura empieza a degradar los azúcares presentes en el medio convirtiéndolos en etanol. A mayor cantidad de sólidos solubles o de partículas en suspensión, los grados brix pueden variar, por ende, en la toma de muestra este valor presenta pequeñas variaciones.

**3.3.3 Densidad.** Al hablar de densidad, nos referimos a un aspecto de la fermentación que se llama atenuación. Ésta es un indicador del grado de fermentación que nos dice que tanto azúcar se convirtió en alcohol y en dióxido de carbono durante esta etapa<sup>147</sup>.

El concepto de atenuación fue creado por los cerveceros con el objetivo de medir el decrecimiento del azúcar durante la fermentación. Sustituye la medición directa del azúcar por una estimación más o menos precisa basada en el porcentaje de reducción de la densidad o de la gravedad específica del mosto.<sup>148</sup> Para calcular la atenuación se utiliza la siguiente expresión

**Ecuación 7. Atenuación.**

$$\text{Atenuación} = \frac{100 * (D_i - D_f)}{D_i - 1}$$

Donde

- Di: Densidad inicial
- Df: Densidad final

En cuanto a la literatura, el valor de la densidad inicial de una cerveza tipo pale ale varían entre 1.044 a 1.048 descendiendo hasta 1.008 a 1.010; mientras que su grado de atenuación esta entre 70% a 80%.<sup>149</sup>

---

<sup>146</sup> HAMMOND, Jame. Yeast growth and nutrition .Citado por TORIBIO, Karin. Evaluación de la estabilidad como stater de *Saccharomyces Pastorianus* ssp. *Carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo lager. [En línea]. Trabajo de grado para obtener el grado de Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de ciencias, 2015. p. 81. [Consultado: 5 de marzo de 2019. Disponible en Internet: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1894/Q02.T67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

<sup>147</sup> UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. Pruebas de análisis a bebidas fermentadas. [En línea]. [20 de marzo]. Disponible en internet: [[http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php?option=com\\_content&view=article&id=92&Itemid=94](http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php?option=com_content&view=article&id=92&Itemid=94)]

<sup>148</sup> GONZALEZ, Marcos. Op. Cit., p. 31

<sup>149</sup> GARIBAY, Mariano. et al., Op. Cit., p. 284

A continuación, se muestran los datos de densidad tomados a lo largo de la fermentación

**Tabla 18.** Valores de Densidad.

<b>DÍA DE FERMENTACIÓN</b>	<b>DENSIDAD Experimento 1</b>	<b>DENSIDAD Experimento 2</b>
<b>Día de elaboración del mosto</b>	1,062	1,062
<b>1</b>	1,020	1,018
<b>2</b>	1,012	1,012
<b>3</b>	1,012	1,012
<b>4</b>	1,010	1,010
<b>5</b>	1,009	1,009
<b>6</b>	1,008	1,008
<b>7</b>	1,008	1,008
<b>8</b>	1,008	1,008
<b>9</b>	1,008	1,008
<b>Día final de la maduración (Día 15)</b>	<b>1,008</b>	<b>1,008</b>

Fuente. elaboración Propia.

De acuerdo a los datos, se procede a calcular la atenuación de los experimentos. Cabe resaltar, que ambos experimentos tienen los mismos datos, debido a esto, ambos tienen la misma atenuación:

$$\text{Atenuación} = \frac{100 * (1,062 - 1,008)}{1,062 - 1} = 87\%$$

La atenuación es expresada como porcentaje y representa la disminución de densidad del mosto como resultado de la fermentación. Es un parámetro multifactorial que depende de variables como la calidad de la levadura, pH, composición del mosto y temperatura, entre otros. Es decir, para este caso, la levadura recuperada y anteriormente reutilizada, al finalizar la fermentación habrá transformado el 87 por ciento del azúcar en alcohol.

La densidad es otro parámetro de calidad del mosto y del producto final, ya que este influirá en el resultado de la fermentación, debido a que si el mosto fuera macerado a una temperatura demasiado baja produciría un mosto más fermentable de lo requerido generando rangos de atenuación bajos; por el contrario, si se macera a una temperatura demasiado elevada, se producen

azúcares no fermentables de cadena larga provocando rangos de atenuación demasiado altas.<sup>150</sup>

De acuerdo a la tabla 17, el valor inicial de la densidad del mosto antes de ser inoculado es de aproximadamente **1.062**, que basados en la literatura y al realizar la comparación de este valor, se logra ver una variación del 0.016 de acuerdo al rango establecido, esto ocurre debido a que en la elaboración del mosto de la cerveza Pale Ale Belga en la cervecería moonshine se le adiciona cierta cantidad de azúcar con el fin de aumentar el contenido del alcohol sin añadir volumen suplementario a la cerveza y sin hacerla demasiado dulce o malteada<sup>151</sup>.

Como se puede evidenciar en la tabla 17 y en la gráfica 3, la densidad presenta pequeñas variaciones entre el día 1 al día 6, esto ocurre una vez inicia la fermentación, la levadura comienza a asimilar los carbohidratos fermentables, es decir, lo hace en un orden específico empezando por los azúcares simples, primero la glucosa, luego la fructosa y la sucrosa. Después le toca el turno a la maltosa que es el azúcar que más abunda en el mosto (casi en un 60%) y que tiene gran influencia en la formación de sabor de la cerveza. Por último, está la maltotriosa, que es más difícil de asimilar y dependerá de la cepa de levadura, entre más atenuativa esta sea, más fácil de metabolizar será. Por la falta de oxígeno, la levadura empieza a metabolizar los azúcares de forma anaeróbica convirtiendo el piruvato, en etanol y CO<sub>2</sub>. En esta parte del proceso, cuando ocurre el crecimiento de la levadura, se produce la mayor atenuación, es decir, la densidad de la cerveza disminuye llegando a medir de 1/3 a 1/4 de la densidad inicial, esto puede durar entre 2 a 6 días para las cervezas ale<sup>152</sup>. De igual manera, también se puede observar que a partir del día 7 hasta el último día de maduración (día 15), la densidad mantuvo su patrón constante, debido a que la levadura entra en un proceso de fase estacionaria, es decir, la levadura se ha inactivado y se ha sedimentado.

A continuación, se puede observar el comportamiento de la densidad a lo largo de la fermentación en ambos experimentos

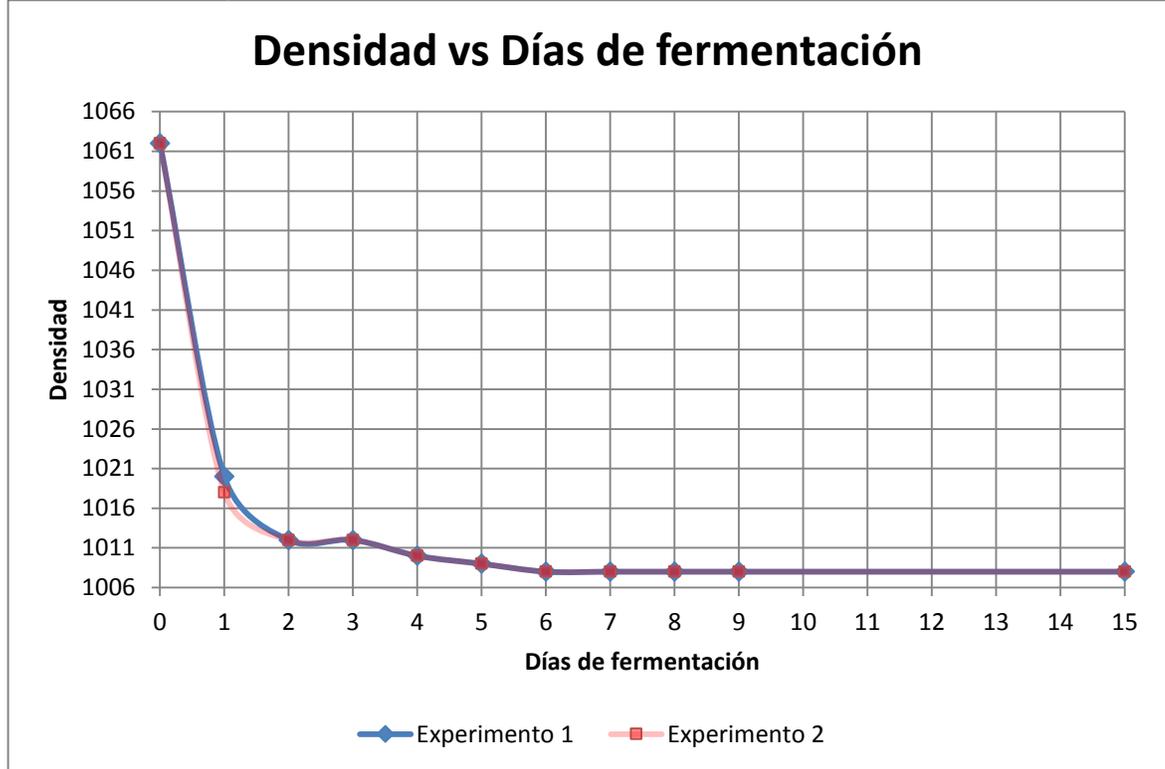
---

<sup>150</sup>KUNZE, Wolfgang. Tecnología para cerveceros y malteros. Citado por TORIBIO, Karin. Evaluación de la estabilidad como stater de *Saccharomyces Pastorianus* ssp. Carlsbergensis para la producción de cerveza tipo lager. [En línea]. Trabajo de grado para obtener el grado de Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de ciencias, 2015. p. 81. [Consultado: 5 de marzo de 2019. Disponible en Internet: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1894/Q02.T67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

<sup>151</sup>CASTLE MALTING. Azúcares candi belgas y otros ingredientes naturales a base de azúcares naturales. [En línea]. [5 de mayo de 2019]. Disponible en internet: [<https://www.castlemalting.com/CastleMaltingSugar.asp?P=105&Language=Spanish>]

<sup>152</sup> GIGLIARELLI, Pablo. Fermentación. Ciencia Cervecera. [en línea]. [20 de marzo de 2019]. Disponible en internet: [<http://www.revistamash.com.ar/detalle.php?id=379>]

**Grafica 3.** Comportamiento de la densidad durante la fermentación.



Fuente. elaboración propia

**3.3.4 Grado de Alcohol.** La graduación alcohólica es la relación entre el volumen de alcohol en estado puro, contenido en el producto a una temperatura de 20°C y el volumen total de mismo producto a la misma temperatura. Se trata de una medida de concentración porcentual en volumen indicando la cantidad de alcohol que contiene la cerveza<sup>153</sup>.

El alcohol producido que contiene la cerveza puede ser determinado mediante el análisis químico utilizado en las grandes plantas industriales. El fabricante artesanal, rara vez dispone de los equipos y productos para realizar dicho ensayo, por lo que se vale de cálculos matemáticos para hacer una estimación a partir de la disminución de la densidad del mosto. Para realizar dicha estimación, se utiliza la siguiente ecuación empírica<sup>154</sup>

<sup>153</sup> UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. Pruebas de análisis a bebidas fermentadas. [En línea]. [20 de marzo]. Disponible en internet: [[http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php?option=com\\_content&view=article&id=92&Itemid=94](http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php?option=com_content&view=article&id=92&Itemid=94)]

<sup>154</sup> GONZALEZ, Marcos. Op. Cit., p. 121

### Ecuación 8. Grados de Alcohol.

$$Alcohol = \frac{1000 * (Di - Df)}{7,4}$$

Donde

- Di= Densidad inicial
- Df= Densidad final
- 7,4 = Constante utilizada

De acuerdo a la litera, las pale ale tienen una graduación alcohólica de aproximadamente entre 6 y 10%, lo que se explica por la tradición que exige que las cervezas realicen la segunda fermentación en botella<sup>155</sup>.

Para realizar este parámetro físico-químico, es importante tener en cuenta la norma técnica colombiana NTC 3952, en donde se explican los diferentes métodos de ensayo para realizar esta prueba, los equipos y reactivos a tener en cuenta y, el procedimiento a seguir.<sup>156</sup>

Al determinar el grado de alcohol de la cerveza con el anterior cálculo matemático, es importante tener en cuenta que se debe medir la densidad inicial antes de la fermentación, es decir, antes de que el mosto sea inoculado y, para la densidad final, se toma el valor antes de añadir el azúcar para la carbonatación.

A continuación, se procede a calcular el grado de alcohol de la cerveza en ambos experimentos realizados. Cabe mencionar que como los datos de densidades para ambos experimentos son iguales, solo se procede a calcular un único dato de grado de alcohol.

$$Alcohol = \frac{1000 * (1.062 - 1.008)}{7,4}$$
$$Alcohol = 7,29 \% vol$$

Al tener cervezas con un contenido de alcohol de 6 a 7% en volumen son bien fermentadas por la mayoría de las levaduras; con un contenido más elevado de alcohol se presentan progresivamente dificultades. El alcohol tiene tres efectos diferentes sobre el metabolismo de la levadura: - Estorba el crecimiento celular, - Disminuye el número de células vivas e, - Inhibe la fermentación. Con el aumento

<sup>155</sup> PILLA, Simone; VINCI, Genny. Op. Cit., p. 26.

<sup>156</sup> INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. Cerveza- Métodos para determinar el contenido de alcohol etílico en cerveza. NTC- 3952. [En línea] [7 de agosto del 2019]. Disponible en internet : <https://es.scribd.com/document/391812255/NTC-3952-Determinacion-de-Etanol-en-Cerveza>

del contenido de alcohol se comprueban importantes cambios en la concentración de ácidos grasos individuales en la célula afectando la calidad de la cerveza<sup>157</sup>.

Otra manera, más exacta de obtener el grado de alcohol de la cerveza elaborada es por medio del **índice de refracción**, que se refiere al cambio de dirección que sufre un rayo de luz al pasar oblicuamente de un medio a otro en distinta densidad. El índice de refracción está directamente relacionado con el número, la carga y la masa de las partículas vibrantes de la sustancia a través de la cual se trasmite la radiación. Así, se ha comprobado que, para un grupo de compuestos estructuralmente parecidos, el índice de refracción varía con la densidad y el peso molecular de la muestra<sup>158</sup>.

El objetivo principal en la determinación por refractometría del grado de alcohol, es mostrar la utilidad de esta técnica para la medición del índice de refracción, propiedad de gran importancia para el análisis cuantitativo y cualitativo, y con esto determinar el grado de etanol de la cerveza.

Para llevar a cabo este método, se requiere de un procedimiento analítico que se conoce como **curva de calibración**, es decir, una representación gráfica de una señal que se mide en función de la concentración de un analito. La etapa de calibración analítica, se realiza por medio de un modelo de *línea recta* que consiste en encontrar la recta de calibrado que mejor se ajuste a una serie de puntos experimentales, donde cada punto se encuentra definido por una variable "x" (variable independiente, generalmente la concentración del analito de interés) y una variable "y" (variable dependiente, generalmente respuesta instrumental). En este procedimiento se compara una propiedad del analito con la de estándares de concentración conocida como analito<sup>159</sup>.

Para llevar a cabo este método, se toma el índice de refracción de disoluciones de etanol del 10% al 90%; de igual manera, se toma el índice de refracción de las cervezas después de la maduración. A continuación, se muestra la tabla 18 de datos con los índices de refracción tomados a las diferentes concentraciones de etanol.

---

<sup>157</sup> KUNZE, Wolfgang. Op, Cit. p. 437

<sup>158</sup> ANONIMO. Determinación de etanol en una bebida alcohólica por refractometría y de sacarosa en azúcar por polarimetría. [En línea] [7 de mayo de 2019]. Disponible en internet: [\[https://es.slideshare.net/jhoanson/determinacin-de-etanol-en-una-bebida-alcoholica-por-refractometra-y-de-sacarosa-en-azcar-por-polarimetra-24366765\]](https://es.slideshare.net/jhoanson/determinacin-de-etanol-en-una-bebida-alcoholica-por-refractometra-y-de-sacarosa-en-azcar-por-polarimetra-24366765)

<sup>159</sup> DOSAL, María José. VILLANUEVA, Marcos. Introducción a la metrología química. Curvas de calibración en los métodos analíticos. [En línea] [7 de agosto de 2019]. Disponible en internet: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CURVASDECALIBRACION\\_23498.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CURVASDECALIBRACION_23498.pdf)

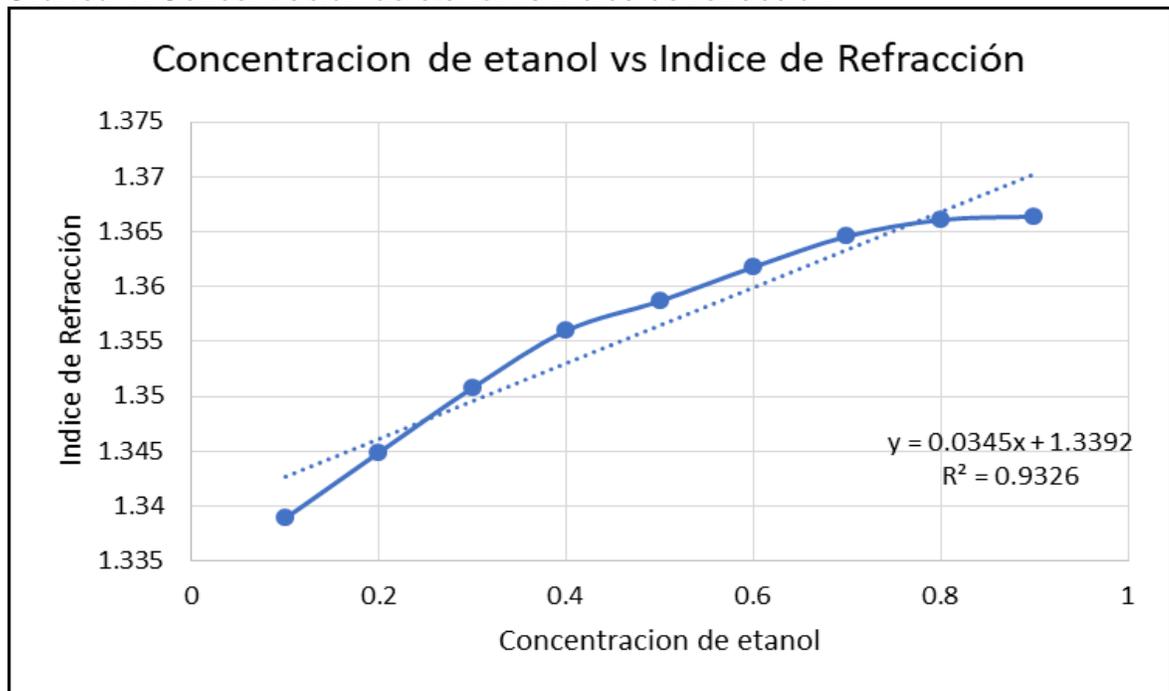
**Tabla 19.** Índice de refracción a diferentes concentraciones de etanol.

CONCENTRACION DE ETANOL	INDICE DE REFRACCION
0.1	1.3389
0.2	1.3449
0.3	1.3508
0.4	1.356
0.5	1.3587
0.6	1.3618
0.7	1.3646
0.8	1.3661
0.9	1.3664

Fuente. elaboración propia.

De acuerdo a los datos anteriormente tomados, se procede a realizar la gráfica de calibración, con el fin de obtener la fórmula de linealización.

**Grafica 4.** Concentración de etanol vs índice de refracción



Fuente: elaboración propia

De acuerdo a la ecuación obtenida en la linealización anterior, es posible obtener el contenido de etanol en las muestras problema. En las Tabla 19, se encuentran los datos consignados de la regresión lineal para el **experimento 1 y 2** después de la maduración.

**Ecuación 9.** Ecuación en la linealización.

$$y = 0.0345 x + 1.3392$$

$$x = \frac{y - 1.3392}{0.0345}$$

Donde

- X= valor de la concentración de la muestra (grado de etanol).
- Y= índice de refracción de cada muestra.
- a= 0,0345 (intersecto).
- b= 1,3392 (pendiente).

**Tabla 20.** Grado de alcohol después de la maduración.

<b>GRADO DE ALCOHOL FINALIZADA LA MADURACION</b>			
<b>Experimento 1</b>		<b>Experimento 2</b>	
<b>Ind. Refracción</b>	1.3420	<b>Ind. Refracción</b>	1.3421
<b>B</b>	1.3392	<b>B</b>	1.3392
<b>M</b>	0.0345	<b>M</b>	0.0345
<b>Conc. Etanol</b>	0.0812	<b>Conc. etanol</b>	0.0841
<b>%Alcohol (v/v)</b>	<b>8.1</b>	<b>%Alcohol (v/v)</b>	<b>8.4</b>

Fuente. elaboración Propia.

Utilizando el método de refractometría y, de acuerdo a los valores obtenidos anteriormente de porcentaje de alcohol una vez finalizada la maduración, se puede observar que este método arroja valores con mayor aproximación que el cálculo matemático anteriormente implementado.

Una vez finalizada la maduración y al obtener el porcentaje de etanol final de las cervezas elaboradas, tanto en el **experimento 1** como en el **experimento 2**, el grado final de alcohol es mayor al realizado por la cervecería; esto se debe a que la levadura reutilizada tuvo mayor atenuación y acondicionamiento que la levadura nueva, implementada en los procesos fermentativos en la cervecería Moonshine.

Al realizar el re-pitching, con levadura que cumpla los parámetros microbiológicos y de viabilidad necesarios, se está asegurando una cerveza con características más marcadas, es decir, una cerveza con mejores condiciones organolépticas de aroma, sabor y cuerpo; de igual manera, se logra una cerveza con mayor grado de alcohol, debido a que la levadura al ser activada en la propagación, esta entra directamente al fermentador a degradar los azúcares en etanol aprovechando al máximo esta conversión y favoreciendo la concentración de alcohol. De esta manera el **primer experimento**, tiene una variación del 4,9%, mientras que, en el **Segundo experimento**, se tiene una variación del 7%, en comparación con la concentración de 7.7% de alcohol que brinda la cerveza tipo Pale Ale Belga producida en Moonshine.

Una vez finalizadas las pruebas correspondientes y, obtenidas los resultados necesarios para determinar la vitalidad de la levadura, es decir, la capacidad que está tiene para fermentar, se puede decir que, al reutilizar levadura en nuevos procesos fermentativos, se presenta un ritmo acelerado de fermentación en comparación con lotes fermentados con levadura nueva. Es importante mencionar, que la fermentación que se realizó en este proyecto, se dejó por un tiempo mayor al que se acostumbra en la cervecería Moonshine, brindándole así a la cerveza un mayor grado de atenuación en comparación a la cerveza ofrecida industrialmente.

La edad de la levadura, influye en la fermentación, la transición de una vida sana y activa a una célula muerta presenta varias etapas intermedias de deterioro; por tanto, la condición fisiológica del cultivo junto con las condiciones ambientales influye en gran parte tanto en la fermentación como en el crecimiento de esta. Al realizar un re-pitching repetitivo, podría ocasionar condiciones de estrés a la levadura causando daños irreversibles, además podría formar mutantes deficientes, lo que daría lugar a fermentaciones de pobre crecimiento, disminución del grado de atenuación y un deterioro progresivo de la fisiología de la levadura.

Otro factor que puede disminuir la capacidad fermentativa de la levadura es el tipo de estrés oxidativo al que está expuesta, debido a la propagación, al almacenamiento y la fermentación que esta vive. De igual manera, las levaduras en fase estacionaria presentan mayor resistencia al estrés que la levadura en fase exponencial. Por lo tanto, de acuerdo a la cepa de levadura utilizada, la fase de crecimiento en la que se encuentre y, por tanto, la fisiología, influyen en el comportamiento de la levadura en la fermentación.

Debido a lo mencionado anteriormente, se puede decir que la vitalidad de la levadura nos muestra con los resultados obtenidos se evidencia una buena capacidad fermentativa. De igual manera, se tuvo el mayor cuidado en no estresar la levadura en la fermentación y, así cumplir con las condiciones adecuadas para producir un lote de cerveza óptimo para el consumo.

### **3.4 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS DE LA CERVEZA**

A la cerveza final obtenida de los procesos de fermentación realizados, una vez analizados los parámetros fisicoquímicos; también es necesario analizar la parte microbiológica con el fin de realizar de manera adecuada la comparación para culminar el objetivo propuesto en el proyecto de grado.

Los análisis microbiológicos permiten valorar la calidad sanitaria de la bebida, la cual puede verse afectada durante el proceso de elaboración, ya que depende de

la manipulación adecuada y de una buena higiene necesaria para eliminar peligros o factores que afecten la salud del consumidor.<sup>160</sup>

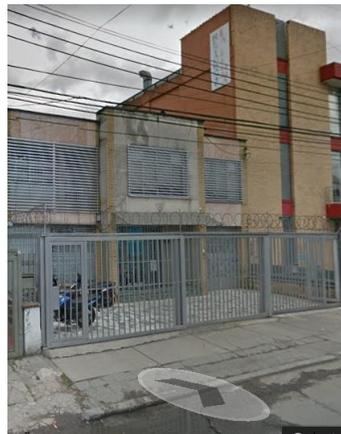
Para estos análisis microbiológicos, las cervezas (una de cada experimento) fueron llevadas a **NULAB LTDA**, que es un laboratorio especializado con más de 30 años de experiencia en servicios de análisis microbiológicos y fisicoquímicos para alimentos de consumo humano. Este laboratorio está ubicado en la carrera 16 # 58<sup>a</sup>-73 en la ciudad de Bogotá D.C.

**Figura 29.** Ubicación del laboratorio.



Fuente. Google Maps. NULAB LTDA

**Figura 30.** Instalaciones de NULAB LTDA.



Fuente. Google Maps.  
NULAB LTDA

<sup>160</sup>PEREZ, E. GONZALEZ, J. CHAVEZ, M. CORTES, C. Caracterización fermentativa de levadura productoras de etanol a partir de jugo de Agave cupreata en la elaboración de mezcal. En: Revista mexicana de Ingeniería Química. Vol.; 12. No 3 (2013)451-461.

NULAB LTDA, para cervezas artesanales recomienda dos análisis microbiológicos importantes para saber si es apta o no para el consumo humano; entre estos análisis encontramos, Coliformes totales (24hr) y recuento de Mesófilos aerobios (72 hr); proporcionando resultados con mayor confiabilidad y precisión en un menor tiempo, ya que este laboratorio cuenta con equipos de última tecnología para el procesamiento de las muestras<sup>161</sup>.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de acuerdo a las pruebas realizadas

**Tabla 21.** Resultados de los análisis microbiológicos de las cervezas fermentadas con la levadura reutilizada.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	Recuento de Mesófilos aerobios UFC/g/ml	Recuento de Coliformes Totales NMP/g/ml
<b>Experimento 1</b>	4500	Menor a 3
<b>Experimento 2</b>	3400	Menor a 3
Sugeridos por Nulab	<b>1600</b>	<b>Menor a 3</b>

Fuente. elaboración Propia.

Los resultados obtenidos en el laboratorio NULAB LTDA son mostrados en los **ANEXOS L y M.**

Al analizar los resultados obtenidos, se puede observar que de acuerdo a lo valores sugeridos en NULAB LTDA ninguna de las dos muestras cumple con lo estipulado en cuanto a la presencia de bacterias aerobias mesófilas.

Al realizar la prueba microbiológica correspondiente de las bacterias mesófilas aerobias, podemos verificar la efectividad de los procedimientos de limpieza y desinfección, determinar si las temperaturas aplicadas en el proceso fueron las indicadas y, verificar las condiciones óptimas de transporte y almacenamiento. Al tener un recuento elevado de estas bacterias, nos indica que hubo contaminación por la deficiente manipulación durante el proceso de fermentación que altera el producto final.<sup>162</sup>

Debido a lo mencionado anteriormente, es posible que la presencia de estas bacterias se deba a los siguientes factores:

<sup>161</sup> NULAB LTDA. Análisis microbiológicos [En línea] [8 de mayo de 2019] Disponible en internet: [<http://nulab.com.co/service/analisis-microbiologicos-alimentos-aguas-industriales/>]

<sup>162</sup> CHAMORRO, Natal. FLORES, Bryan. MUÑOZ, Pilar. QUISPE, Leslie. Análisis microbiano de aerobios mesofilos. [En línea] [9 de mayo de 2019]. Disponible en internet: [<file:///C:/Users/leal/Downloads/345768169-aerobios-mesofilos.pdf> ]

- El día de elaboración del mosto, este no fue inoculado inmediatamente con la levadura anteriormente propagada, es decir, se inoculó aproximadamente de 2 a 3 horas después de ser producido, ocasionando que se contaminara con bacterias que afectarían el medio de fermentación.
- En cuanto a la temperatura de fermentación, esta se mantuvo a temperatura ambiente y no se controló a diario la variación que esta tuviera con el clima. Cabe mencionar, que el lugar de disposición para llevar a cabo este procedimiento fue un lugar oscuro y sin entradas directas de luz o de aire.
- Otra posible causa de contaminación, pudo haber sido durante la toma de muestras en la fermentación, ya que ambos fermentadores eran expuestos al ambiente mientras se llevaba a cabo este procedimiento. Es importante mencionar que así se disponga de un ambiente lo más aséptico posible, el aire puede oxidar la cerveza o estresar la levadura ocasionando la presencia de estas bacterias.

Con base a los factores mencionados, se puede analizar que no se tuvo las mejores condiciones de manipulación, de almacenamiento y de transporte para asegurar que la cerveza no tuviera presencia de estos microorganismos al finalizar la fermentación. **NULAB LTDA** en los resultados entregados menciona que las cervezas NO SON APTAS, debido a que no cumplen los estándares necesarios para asegurar el consumo al 100% de estas.

En cuanto a la literatura, se menciona que las especies de mesófilos aerobios encontradas en los alimentos son generalmente extensas y no poseen un hábitat definido y en general no provocan enfermedades en el ser humano; simplemente son utilizados como indicadores de calidad del proceso realizado, en este caso, el de la fermentación.<sup>163</sup>

En los resultados, también se puede observar que las cervezas estaban libres de coliformes totales, esto indica que no hay presencia de bacterias patógenas, es decir, que la muestra no está contaminada por bacterias presentes en las heces de humano o de animales; en caso contrario, donde la muestra estuviera contaminada con estos microbios podrían provocar enfermedades que pueden causar, diarrea, retortijones, náuseas, cefaleas u otros síntomas.<sup>164</sup>

---

<sup>163</sup>SALGADO, Víctor. Análisis de mesófilos aerobios, mohos y levaduras, coliformes totales y *Salmonella spp.* En cuatro ingredientes utilizados en la planta de lácteos en Zamorano, Honduras. P. 9. Proyecto especial (Título de Ingeniero Agrónomo). Universidad de Zamorano de Zamora. Facultad agroindustrial.

<sup>164</sup> <sup>164</sup>SALGADO, Víctor.; Op. Cit. p 9

### 3.5 PRUEBAS ORGANOLEPTICAS DE LA CERVEZA

La pureza del sabor, el olor de la cerveza, su recencia o la delicadeza de su amargor son factores que no pueden ser registrados analíticamente, sin embargo, estos suelen ser los parámetros que interesan en primer lugar al consumidor. Para registrar estos criterios determinantes de la calidad, la cerveza debe ser degustada examinando su olor y sabor de acuerdo con diferentes aspectos.<sup>165</sup>

Para la degustación, se requieren personas con una muy fina capacidad de diferenciación en sabor y olor. Para llevar a cabo las respectivas pruebas organolépticas, se contactó un maestro cervecero, con el fin de determinar la calidad de la cerveza en cuanto al olor, sabor, formación de burbujas, espuma y sensación en la boca, para llevar a cabo la comparación organoléptica de las cervezas producidas con una cerveza tipo Pale Ale Belga producida en Moonshine.

Al hablar de la fase visual, nos referimos a la apariencia, primero en la botella y luego en la cerveza servida en el vaso; en cuanto al color, este depende del estilo que se haya fabricado y; la espuma depende de la formación y la estabilidad de esta.<sup>166</sup>

En la fase olfativa, se determina las sustancias volátiles de carácter aromático, los aromas percibidos por vía directa o por vía nasal indirecta. En la fase gustativa, se perciben los gustos de la cerveza, al mismo tiempo el sentido del tacto, la reacción de las mucosas bucales que permiten apreciar sensaciones térmicas y táctiles y al final el retrogusto<sup>167</sup>.

El análisis organoléptico se basó en el formato Beer ScoreSheet de la organización BJCP el cual se encuentra en el **ANEXO N, O y P**. Realizado por el maestro Cervecero Profesional Oscar Martínez a los 15 días de terminada la maduración.

El formato Beer ScoreSheet de la organización BJCP, es un formato, en el cual se selecciona la presencia de diferentes características sensoriales que pueden o no estar presentes en la cerveza, ayuda a la evaluación e identificación de problemas presentes en una cerveza.

Los descriptores organolépticos que pueden ser percibidos en la cerveza son:

---

<sup>165</sup> KUNZE, Wolfgang. Op, Cit. p. 863

<sup>166</sup> PEREZ, Carolina. Boan, Martin. Evaluación sensorial de cerveza. [En línea] [ 9 de mayo de 2019]. Disponible en internet: [ [http://somoscerveceros.com/wp-content/plugins/downloads-manager/upload/3\\_evaluacion\\_sensorial\\_santafe2008.pdf](http://somoscerveceros.com/wp-content/plugins/downloads-manager/upload/3_evaluacion_sensorial_santafe2008.pdf)]

<sup>167</sup> PEREZ, Carolina. Boan, Martin. Evaluación sensorial de cerveza. [En línea] [ 9 de mayo de 2019]. Disponible en internet: [ [http://somoscerveceros.com/wp-content/plugins/downloads-manager/upload/3\\_evaluacion\\_sensorial\\_santafe2008.pdf](http://somoscerveceros.com/wp-content/plugins/downloads-manager/upload/3_evaluacion_sensorial_santafe2008.pdf)]

**Tabla 22.** Descriptores organolépticos que pueden estar presentes en la cerveza.

<b>DESCRIPTOR</b>	<b>CARACTERÍSTICA</b>
<b>Acetaldehído</b>	Olor o sabor similar al de la manzana verde.
<b>Alcoholes Superiores</b>	Olor o sabor similar al del Whiskey o del aguardiente.
<b>Astringencia</b>	Sensación en la boca de sequedad.
<b>Diacetilo</b>	Olor o sabor al de la mantequilla o aceitosa en la boca.
<b>DMS (Dimetilsulfuro)</b>	Olor o sabor similar al maíz.
<b>Esteres</b>	Olor o sabor frutal o floral.
<b>Césped</b>	Olor o sabor a césped recién cortado.
<b>Oxidación por luz</b>	Evidencia por aroma similar al de un zorrillo.
<b>Sabor Metálico</b>	Similar a cobre, hierro o sangre.
<b>Olor o sabor similar moho</b>	Olor a sala de fermentación, terroso.
<b>Oxidación</b>	Evidencia por olor o sabor similar al del vino o jerez.
<b>Fenoles</b>	Olor o sabor especiado (pimienta o clavos) – Olor o sabor similar al plástico o cinta adhesiva.
<b>Solventes</b>	Olor o sabores similar al thinner, acetona o quita esmalte.
<b>Ácido Láctico</b>	Olor o sabor ligero.
<b>Ácido Acético</b>	Olor o sabor similar al del vinagre.
<b>Sulfuros</b>	Olor al del huevo podrido.
<b>Olor o sabor vegetal</b>	Olor o sabor vegetal similar al del repollo, cebollas, apio, espárragos o lechuga.
<b>Olor o sabor a levadura</b>	Olor o sabor parecido al pan.

Fuente: Tomado en línea de [ <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6706/1/6131945-2018-1-IQ.pdf> ] P.64

Adicionalmente, este formato, presenta una sección de comentarios y de calificación referentes al aroma (hasta 12 puntos), apariencia (hasta 3 puntos), sabor (hasta 20 puntos), sensación en la boca (hasta 5 puntos) e impresión general (hasta 10 puntos) para un valor total de 50 puntos.

Para llevar a cabo la valoración anteriormente descrita; a continuación, se explican los parámetros de calificación según el formato Beer ScoreSheet.

**Tabla 23.** Parámetros de calificación.

<b>PUNTAJE</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>
<b>45-50</b>	Excepcional	Ejemplo mundial del estilo
<b>38-44</b>	Excelente	Ejemplifica bien el estilo, requiere ajustes menores.
<b>30-37</b>	Muy buena	Generalmente dentro de los estilos. Algunos defectos menores.
<b>21-29</b>	Buena	Pierde la marca del estilo. Fallas menores.
<b>14-20</b>	Justa	Sabores y aromas deficientes. Poco placentera.
<b>0-13</b>	Problemática	Sabores y aromas problemáticos. Difícil de beber.

Fuente: Tomado en línea de <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6706/1/6131945-2018-1-IQ.pdf> [pág. 65]

Las dos cervezas elaboradas fueron sometidas al análisis organoléptico por medio del formato Beer ScoreSheet de la organización BJCP; los análisis se encuentran en el **ANEXO O y P**, a continuación, se muestra un resumen de estos.

**Tabla 24.** Análisis organolépticos realizados por Oscar Martínez.

<b>MUESTRA</b>	<b>DESCRIPTORES PRESENTES</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>
<b>Experimento 1</b>	Acetaldehído	<b>23%</b>
	Esteres	
	Moho	
	Oxidación	
	Fenoles	
	Vegetales	
<b>Experimento 2</b>	Levadura	<b>27%</b>
	Acetaldehído	
	Astringencia	
	Diacetilo	
	DMS	
	Metal	
	Moho	
	Oxidación	
Vegetal		
	Ácido acético	

Fuente. elaboración propia.

En cuanto a los resultados obtenidos y los descriptores presentes, se puede mencionar lo siguiente<sup>168</sup>:

- *Acetaldehído*: se puede presentar debido a altas temperaturas de fermentación, la mala higienización, oxigenación excesiva del mosto antes de la adición de la levadura, presencia de oxígeno en la segunda fermentación o una fermentación abierta.
- *Astringente*: indeseada en la cerveza, debido a la presencia de harinas que pasaron al mosto por exceso de molienda o debidos a la presencia de taninos en la cascara del grano.
- *DMS*: viene en moléculas de SMM que después de ser calentadas en la maceración se producen DMS o DMSO<sup>169</sup>.
- *Esteres*: depende del tipo de lúpulo, hervido, condicione de fermentación y, la cantidad de lúpulos osados.
- *Metálico*: se puede producir por el hierro o acero en contacto con la cerveza, pasivación, material de filtración inadecuado, agua con alto contenido de hierro y grano mal procesado.
- *Mohos*: contaminación del agua, almacenamiento de la cerveza en un lugar húmedo, en contacto con microbios.
- *Oxidación*: por periodos largos de almacenamiento, a temperaturas inadecuadas; mala higienización de los equipos de embotellado.
- *Fenoles*: se debe a levaduras salvajes, mala higienización, cascaras de granos, molturación excesiva o sparging en exceso.
- *Ácido acético*: los motivos principales son, desinfección pobre, cepas de levadura en mal estado, cantidades excesivas de ácido cítrico, temperaturas de fermentación altas, maceración demasiado larga o contacto con fermentadores de plástico.
- *Vegetal*: posible contaminación durante la maduración, dudosa calidad de la levadura o exposición del lúpulo a la luz solar.
- *Levadura*: debido a que a levadura no se activó correctamente y no llevó a cabo la fermentación.<sup>170</sup>

En cuanto a las partes sensoriales se tiene los siguientes resultados

---

<sup>168</sup> CERVEZA ARTESANAL DESDE 2003. La guía definitiva de la levadura. [En línea]. [10 de mayo de 2019]. Disponibles en internet: [ <https://www.cervezartesana.es/blog/post/tu-cerveza-esta-contaminada-aprende-el-por-que.html>]

<sup>169</sup> CERVEZA ARTESANA. DMS: de dónde vienen y cómo combatirlo. [En línea] [11 de mayo de 2019] Disponible en : <https://cervezartesana.es/tienda/blog/dms-de-donde-viene-y-como-combatirlo.html>

<sup>170</sup> HAZ TU CHEVE.COM. Defectos en la cerveza. Sabores indeseables. [En línea]. [11 de mayo de 2019] Disponible en: <http://haztucheve.com/biblioteca/23-generalidades/39-defectos-en-la-cerveza-sabores-indeseables>

**Tabla 25.** Análisis sensorial

	<b>EXPERIMENTO 1</b>	<b>EXPERIMENTO 2</b>
<b>AROMA</b>	Maíz cocido Ácido acético Cartón Oxidación	Oxidación Ácido acético Brett Metálico
<b>APARIENCIA</b>	Claro Limpio Carbonatación media Dorado pálido	Dorado pálido Carbonatación media Limpia Claridad alta Suave
<b>SABOR</b>	Ácido acético Contaminación Pan tostado	Sensación de malta Pan Acidez media-alta Amargor reforzado por acidez
<b>CUERPO (sensación en boca)</b>	Astringente Alcoholes superiores Acida	Cuerpo bajo Astringencia alta
<b>IMPRESIÓN GENERAL</b>	Atenuación buena Alcoholes superiores Astringencia Acidez y oxidación presente	Cerveza atenuada Contaminación presente Alcoholes superiores Acidez y oxidación presente

Fuente. elaboración propia.

Con base a lo mencionado anteriormente, se puede analizar

- La presencia de oxidación evidencia que en algún momento entre la fermentación y la maduración existió presencia de oxígeno; debido a esto es de gran importancia controlar los niveles de oxígeno, antes y después de la elaboración y también durante el embotellado, ya que se puede afectar el resultado final del líquido. Un factor determinante en cuanto a la oxidación en la fermentación, es el cambio de color, ya que esta tiende a oscurecerse y, en cuanto al gusto, esta toma un sabor a cartón o a papel húmedo. Se puede mencionar que la oxidación de la cerveza, pudo ocurrir en la toma de muestra, donde los fermentadores eran destapados una vez al día para la toma de muestra; de igual manera, en el embotellamiento, la cerveza tuvo contacto directo con el oxígeno mientras esta era llenada y posteriormente tapada.
- La astringencia difiere de la amargura por tener una calidad menor, es seca, algo polvoroso y por lo general es el resultado de remojar los granos demasiado tiempo en la maceración o cuando el pH del mosto excede el rango de 5.2 a 5.6. También, la astringencia se puede dar por la adición excesiva de lúpulo de

amargor o de aroma. En cuando a la fermentación, cuando se forma krausen, este se adhiere a las paredes del fermentador y es realmente amargo, al mezclarse con la cerveza puede provocar sabores realmente astringentes<sup>171</sup>.

- La presencia de alcoholes superiores, se debe cuando la temperatura de fermentación es demasiado alta para la cepa de levadura utilizada; también, cuando la cerveza se agita constantemente, a lo largo de la producción de los experimentos realizados, los tanques fermentadores se agitaron en la toma de muestra y, se tuvo aireación intensiva en el mosto antes de la fermentación y en la cerveza durante el embotellamiento.

Según la apreciación del cervecero profesional Oscar Martínez, es importante tener en cuenta para próximas reutilizaciones y fermentaciones, una muy buena asepsia cuando se manipule el mosto y la cerveza a realizar; de igual manera, es importante evitar que la cerveza tenga contacto alguno con el aire, para lograr esto, es importante hacer uso de nuevas prácticas en la toma de muestra y en el embotellado. También, menciono que la mejor levadura para reutilizar en nuevos procesos fermentativos es la levadura líquida, ya que su medio de cultivo y propagación brinda al cervecero varias opciones para utilizarla en diferentes estilos de cerveza; en cambio, la levadura seca, solo se puede reutilizar en cervezas de igual o menor grado alcohólico de la que se elaboró anteriormente.

### 3.6 TABLAS COMPARATIVAS DE RESULTADOS

Una vez finalizados los análisis fisicoquímicos, los análisis microbiológicos y los análisis organolépticos, se procede a realizar las comparaciones respectivas para finalizar el segundo objetivo.

A continuación, se muestran las tablas de resumen de los parámetros fisicoquímicos medidos

**Tabla 26.** Comparación de parámetros fisicoquímicos.

	EXPERIMENTO 1	EXPERIMENTO 2	CERVEZA PRODUCIDA POR MOONSHINE
<b>pH</b>	4,27	4,34	<b>3,98</b>
<b>%BRIX</b>	6,05	6,55	<b>6,45</b>
<b>DENSIDAD</b>	1008	1008	<b>1008</b>

<sup>171</sup> PALMER, John. Off-Flavors: Aromas y sabores no deseados en la cerveza. [En línea] [12 de mayo de 2019]. Disponible en internet: [<https://www.thebeertimes.com/off-flavors-aromas-y-sabores-no-deseados-en-la-cerveza/#Astringente>]

**Tabla 25.** Continuación.

<b>INDICE DE REFRACOMETRIA</b>	<b>1,3420</b>	<b>1,3421</b>	1,3423
<b>GRADO DE ALCOHOL</b>	8,1	8,4	<b>7,7</b>

Fuente. elaboración Propia.

También, se realiza una comparación entre pruebas organolépticas entre las cervezas fermentadas con levadura reutilizada y la cerveza fabricada en la cervecería Moonshine.

**Tabla 27.** Comparación de parámetros organolépticos.

	<b>EXPERIMENTO 1</b>	<b>EXPERIMENTO 2</b>	<b>CERVEZA PRODUCIDA POR MOONSHINE</b>
<b>DESCRIPTORES PRESENTES</b>	Acetaldehído	Acetaldehído	
	Esteres	Astringencia	
	Moho	DMS	
	Oxidación	Diacetilo	Diacetilos
	Fenoles	Metal	
	Vegetales	Moho	
	Levadura	Oxidación Vegetal	
		Ácido acético	

Fuente. elaboración propia.

Con base a la tabla 25, se puede analizar que los valores de **pH** tienen una pequeña variación entre el experimento 1 y 2 respecto a la cerveza de Moonshine de 0,29 y de 0,36 respectivamente, esto se debe a que la cerveza con la que se realizó la comparación fisicoquímica, es decir, la cerveza de referencia, en los análisis organolépticos tuvo presencia de diacetilos según el maestro cervecero Oscar Martínez; esto se puede evidenciar al presentar una baja en el pH, ya que tanto la temperatura como el pH son condiciones determinantes en la presencia de estos microorganismos. La presencia de diacetilos, se puede dar por tres razones principales, durante la fermentación como subproducto; como contaminación bacteriana por las malas prácticas de sanitización o por añejamiento<sup>172</sup>.

En los **grados brix** se presenta mayor variación entre el experimento número 1 y el producto final de la comparación que entre el experimento número 2 y está

<sup>172</sup> APARICIO, Ricardo. Diacetilo: Su producción y reducción. [En línea] [12 de mayo de 2019]. Disponible en internet: <https://www.revistamash.com/2017/detalle.php?id=367>

cerveza; esto se debe a que en el experimento 1 como se mencionó en las pruebas organolépticas entre los descriptores presentes se encuentra la levadura, lo que indica que durante la fermentación esta no fue activada en su totalidad y, de esta manera no se consumieron los azúcares al 100% para lograr los grados brix necesarios en comparación al experimento 2 y a la cerveza elaborada por la cervecería Moonshine.

De igual manera, esto es evidente en **los grados de alcohol** tanto en el experimento 1 como en el experimento 2, ya que a mayor grado de alcohol mayor consumo de azúcares; en comparación a la cerveza producida en la cervecería Moonshine se puede decir que los experimentos realizados tuvieron mayor **atenuación** que esta cerveza y, esto se pudo evidenciar en las pruebas organolépticas. En cuanto a la **densidad**, los valores de los experimentos respecto a la cerveza elaborada en la cervecería, son iguales; esto se debe a que el mosto utilizado para realizar las cervezas fermentadas con levadura reutilizada fue extraído de un lote fabricado en Moonshine, esto con el fin de realizar y obtener una mejor comparación entre la cerveza de referencia y las realizadas con la técnica del re-pitching a escala banco.

En este capítulo como se pudo observar, se encuentran los resultados y análisis de la vitalidad de la levadura, de las pruebas fisicoquímicas, organolépticas y microbiológicas practicadas a las cervezas obtenidas (dos), esto con el fin de; primero determinar la vitalidad de la levadura, es decir, la capacidad fermentativa que esta tuvo a lo largo del proceso de obtención de las cervezas y, segundo, con el fin de realizar una comparación entre los productos elaborados y una cerveza fabricada por Moonshine. Posterior a esto, se procederá en el siguiente capítulo a realizar un análisis de costos, para llevar a cabalidad el tercer objetivo propuesto.

#### **4. ANALISIS DE COSTOS PARA LA REUTILIZACIÓN DE LA LEVADURA A ESCALA INDUSTRIAL EN LA MICROCERVECERÍA MOONSHINE.**

Para realizar la reutilización de la levadura a escala industrial se requiere un montaje óptimo, el cual tiene que garantizar como parámetro más importante la prevención de contaminación en el proceso. Esta reutilización contribuye a reducir los costos de materias primas, debido a que la levadura extraída en los tanques de fermentación una vez haya finalizado este proceso, puede ser inoculada para fermentar el siguiente lote cervecero.

Cabe resaltar que durante el proceso de re-pitching, la levadura puede generar mutaciones debido al estrés al que se ve sometida una vez es extraída hasta su próxima inoculación. Con base a esto, al realizar más de un proceso de reutilización, es recomendable agregar levadura nueva con el fin de ir reemplazando poco a poco las generaciones de esta y así, asegurar las condiciones óptimas para que esta lleve a cabo el proceso de fermentación. Es importante aclarar, que para llevar a cabalidad este trabajo de grado, solo se realizó una etapa de reutilización.

Por tanto, el ahorro en términos económicos de esta actividad no está enfocado en suprimir la compra de levadura sino en contribuir a la reducción de utilización de esta en la fermentación alcohólica para producir cerveza en la cervecería Moonshine. Cabe resaltar que este documento solo se analiza un tipo de cerveza de los cuatro que actualmente produce la cervecería; es por esto, que para el análisis de costos solo se contempla la producción de la cerveza Pepper Strong Ale y no el proceso global de producción.

Para realizar el análisis en términos económicos del re-pitching a escala industrial, se hizo un análisis de los costos directos y costos indirectos, para determinar de manera acertada la reducción en el valor de la inversión en lo que a materias primas se refiere.

Los costos directos en un proyecto son los que guardan una relación cercana con el producto, es decir, todo lo relacionado a la obtención de este<sup>173</sup>, los costos indirectos son aquellos que se relacionan de manera paralela con las actividades de producción y afectan al proceso productivo en general<sup>174</sup>, estos dos factores son determinantes a la hora de identificar si existe una viabilidad financiera para desarrollar las actividades que se planean realizar.

---

<sup>173</sup> GESTION DE PROYECTOS. Que son los costos directos e indirectos y como saber identificarlos para realizar un análisis de costos. GESTION.ORG. Disponible en: <https://www.gestion.org/costos-directos-e-indirectos/>

<sup>174</sup> OBS. Costos directos e indirectos de un proyecto. OBS Business school. Disponible en: <https://www.obs-edu.com/int/blog-project-management/viabilidad-de-un-proyecto/costos-directos-e-indirectos-de-un-proyecto>

Los costos directos del proyecto que se desean analizar en el presente trabajo y que previamente se escogieron por tener una trascendencia significativa fueron:

- Costo de materias primas sin tener en cuenta la reutilización.
- Costo de materias primas contemplando la reutilización de levadura.
- Mano de obra requerida.
- Equipos requeridos para realizar el re-pitching industrialmente.
- Depreciación de dichos equipos.

Los costos indirectos contemplados para el análisis del escalonamiento a nivel industrial fueron:

- Consumo energético.
- Análisis de laboratorios requeridos para certificar que la muestra esté libre de contaminantes.

Estos ítems a analizar son de vital interés para los directivos de la cervecería Moonshine, por ende, son los que principalmente se analizan en este documento.

#### **4.1 COSTOS DE MATERIAS PRIMAS SIN TENER EN CUENTA LA REUTILIZACION**

Es importante determinar en el proceso productivo de la elaboración de la cerveza Pale Ale Belga, el costo que actualmente la empresa invierte para la realización de cada lote cervecero con el fin de realizar una comparación reduciendo la cantidad de levadura usada mediante la técnica del re-pitching.

Teniendo en cuenta que mensualmente se realizan 4 lotes cada uno de 400 litros, el análisis de costos se realizará dentro de un horizonte de evaluación de 12 meses, con el fin de determinar anualmente la inversión que se realiza para la producción de este tipo de cerveza en específico. Para ello, gracias a la receta que maneja el producto, es posible determinar el coste de producción que actualmente la cervecería invierte.

En el segundo capítulo, se describieron los ingredientes requeridos para la elaboración de la cerveza tipo Pale Ale Belga, los precios de venta de cada uno de estos fueron solicitados por Distrines S.A., el cual es una distribuidora de insumos para cervecerías artesanales; dichos precios son mostrados con el IVA correspondiente al año 2019. Para comenzar, en la tabla 27 se muestra el costo de cada una de las maltas utilizadas en el proceso por kilogramo.

**Tabla 28.** Precio por kilogramo de cada una de las maltas empleadas en el proceso

<b>TIPO DE MALTA</b>	<b>COSTO POR KILOGRAMO (\$)</b>
<b>Malta Pilsen</b>	4,900*
<b>Malta Crystal</b>	6,000*
<b>Malta Munich</b>	5,150*
<b>Malta Special B</b>	7,350*

Fuente: elaboración propia.

\*Los precios son sujetos a cambios, debido a costos de importación

Para el proceso de elaboración de la cerveza se requieren las cantidades específicas de malta. En la tabla 28, se muestra la proporción y el valor requerido en el proceso de cada tipo para la realización de un lote de 400 L.

**Tabla 29.** Cantidades de malta usadas para producir 400L de cerveza y su respectivo costo.

<b>TIPO DE MALTA</b>	<b>CANTIDAD USADA EN EL PROCESO (KG)</b>	<b>PORCENTAJE DE UTILIZACIÓN (%)</b>	<b>COSTO EN LA PRODUCCIÓN (PESOS COLOMBIANOS)</b>
<b>Malta Pilsen</b>	94,6	91,31	463,540
<b>Malta Crystal</b>	4,80	2,40	28,800
<b>Malta Munich</b>	2,20	2,12	11,330
<b>Malta Special B</b>	2	1,93	14,700
<b>TOTAL</b>	<b>51,8</b>	<b>100</b>	<b>518,370</b>

Fuente. elaboración propia.

El agua al ser el principal componente de la cerveza, y al jugar un papel importante en la elaboración de la misma, requiere de un volumen específico para la etapa de maceración y cocción del mosto.

La cervecería Moonshine usa para la producción de un lote de 400 Litros de cerveza, en promedio 584 litros de agua (0,584 m<sup>3</sup>), esta, debe ser contemplada dentro de los costos de producción. En primera instancia, es necesario saber la tarifa actual por metro cubico consumido en la ciudad de Bogotá que cobra la empresa de acueducto y alcantarillado, con el fin de determinar el costo por concepto de uso de agua en la cervecería Moonshine como se puede observar en la tabla 29.

**Tabla 30.** Costo correspondiente a uso de agua para la producción de la cerveza Pale Ale Belga en la cervecería Moonshine.

<b>INGREDIENTE</b>	<b>COSTO POR M<sup>3</sup> PARA USO INDUSTRIAL (COP)<sup>175</sup></b>	<b>CANTIDAD DE AGUA USADA POR LOTE (M<sup>3</sup>)</b>	<b>COSTO TOTAL POR LOTE PRODUCIDO (COP)</b>
<b>Agua</b>	3601,81	0,584	2104

Fuente. elaboración propia.

Además, es necesario conocer el costo del resto de materias primas correspondientes a las adicciones en la etapa de cocción del mosto tales como el lúpulo, el clarificante, los potenciadores de olor y sabor, el azúcar y por último la levadura usada en la etapa de fermentación, los cuales se muestran en la tabla 30.

**Tabla 31.** Costo de adicciones de lúpulo, clarificante, potenciadores de olor, sabor y, levadura.

<b>ADICIONES</b>	<b>PRESENTACION</b>	<b>COSTO</b>
<b>Lúpulo el dorado</b>	Bolsas de 500 gr	70,000
<b>Lúpulo cascade</b>	Bolsas de 500 gr	75,000
<b>Clarificante (Whirfloc)</b>	Tarros de 500 gr	110,000
<b>Semillas de mostaza</b>	Bolsas de 1000 gr	65,500
<b>Pimienta negra</b>	Bolsas de 1000 gr	16,000
<b>Azúcar blanca especial para cerveza</b>	Bolsa de 500 gr	10,000
<b>Levadura SafAle S-04</b>	Bolsa de 500 gr	237,000

Fuente. elaboración propia.

Las cantidades específicas empleadas para la elaboración de la cerveza y su respectivo costo aproximado se detallan en la tabla 31.

<sup>175</sup> EMPRESA DE ACUEDUCTO Y ALCANTARILLADO DE BOGOTÁ. Tarifas Bogotá año 2019. Disponible en: [https://www.acueducto.com.co/wps/portal/EAB!/ut/p/z1/tVNbT8lwGP0tPOxR-rEb4FtRMMySCCSqwvpiutKO6raMrQ\\_311IsiCZcYpC-9fOc7PTn5DiJohkhBa5lSI1VBM3uPSfjY7V7ilqvuKOp3PcCTsXuN7y8ARiGalIJlyeQcxeD6NEwAfI8JVvhKA0apYEnSCjqsTVsfFaY0ixQzCIN6tCBirIvN6-YUQ7QiutaMqmq73PFWllwWRJMwv9qRqppaAVmh7SRmwZdiwMtp9sgWDojd2eBxDdulsBGxyx1dDepSGKfDStJV-jh0Lp3Np59we3-gfYYdl-gn2\\_cAhOR3061VF4OupjDBI8TtGeQbUpk0\\_LJcE2IKow\\_MWg2X8kxH6cZir5yjEuEq-TlqK54Jrr5krb54UxZXXugAPr9bqZKpVmvMIU7sC2loWIRrNNJCrvOO9nj2L4ZXnx4P6rTc6-7XdiKEJYtxovAMKrt-T/dz/d5/L2dBISEvZ0FBIS9nQSEh/](https://www.acueducto.com.co/wps/portal/EAB!/ut/p/z1/tVNbT8lwGP0tPOxR-rEb4FtRMMySCCSqwvpiutKO6raMrQ_311IsiCZcYpC-9fOc7PTn5DiJohkhBa5lSI1VBM3uPSfjY7V7ilqvuKOp3PcCTsXuN7y8ARiGalIJlyeQcxeD6NEwAfI8JVvhKA0apYEnSCjqsTVsfFaY0ixQzCIN6tCBirIvN6-YUQ7QiutaMqmq73PFWllwWRJMwv9qRqppaAVmh7SRmwZdiwMtp9sgWDojd2eBxDdulsBGxyx1dDepSGKfDStJV-jh0Lp3Np59we3-gfYYdl-gn2_cAhOR3061VF4OupjDBI8TtGeQbUpk0_LJcE2IKow_MWg2X8kxH6cZir5yjEuEq-TlqK54Jrr5krb54UxZXXugAPr9bqZKpVmvMIU7sC2loWIRrNNJCrvOO9nj2L4ZXnx4P6rTc6-7XdiKEJYtxovAMKrt-T/dz/d5/L2dBISEvZ0FBIS9nQSEh/)

**Tabla 32.** Adiciones empleadas en la etapa de cocción del mosto y sus respectivas cantidades.

<b>ADICIONES</b>	<b>CANTIDAD EMPLEADA EN EL PROCESO (GR)</b>	<b>COSTO EN LA PRODUCCIÓN (PESOS COLOMBIANOS)</b>
Lúpulo el dorado	400	56,000
Lúpulo cascade	132	19,800
Clarificante (Whirfloc)	20 (10 tabletas)	4,400
Semillas de mostaza	40	2,620
Pimienta negra	200	3,200
Azúcar blanca especial para cerveza	1000	20,000
Levadura SafAle S-04	128	60,672

Fuente. elaboración propia.

Realizando una ponderación de costos correspondientes a materias primas empleadas en el proceso de producción, se tiene que para producir un lote de 400 litros de cerveza se requiere de un capital aproximado de **\$687,166 pesos colombianos** como se puede apreciar en la tabla 32.

**Tabla 33.** Costo de producción por lote sin emplear el proceso de re-pitching.

<b>INSUMOS</b>	<b>COSTO EN LA PRODUCCION (COP)</b>
Malta Pilsen	463,540
Malta Crystal	28,800
Malta Munich	11,330
Malta Special B	14,700
Agua	2,104
Lúpulo el dorado	56,000
Lúpulo cascade	19,800
Clarificante (Whirfloc)	4,400
Semillas de mostaza	2,620
Pimienta negra	3,200
Azúcar blanca especial para cerveza	20,000
Levadura SafAle S-04	60,672
<b>TOTAL</b>	<b>687,166</b>

Fuente. elaboración propia.

## 4.2 COSTOS DE MATERIAS PRIMAS TENIENDO EN CUENTA LA REUTILIZACION DE LEVADURA

Realizando el análisis de costos para la elaboración de cerveza reutilizando la levadura del proceso fermentativo, es posible determinar el ahorro en términos monetarios en compra de levadura. A la hora de realizar este proceso es necesario aclarar que las cantidades de malta y de las adicciones realizadas no se modifican en este proceso, por tanto, las tablas mostradas en el ítem anterior en donde se menciona las cantidades y costo de estas serán iguales. El proceso de re-pitching en un nuevo lote de fermentación mitiga el uso de levadura seca nueva. Como se mencionó anteriormente para cada lote de producción se requieren 128 gramos de levadura Safale S-04, la cual tiene un costo aproximado en la producción de 400 litros de cerveza de **\$60,672 COP**, al reutilizarla en un segundo proceso fermentativo dicho costo se reduce, ya que no es necesario emplear nueva levadura. En la tabla 33 se muestra el costo correspondiente a materias primas implementando la técnica de re-pitching.

**Tabla 34.** Costo de producción por lote empleando el proceso de re-pitching

<b>INSUMOS</b>	<b>COSTO EN LA PRODUCCION (COP)</b>
<b>Malta Pilsen</b>	463,540
<b>Malta Crystal</b>	28,800
<b>Malta Munich</b>	11,330
<b>Malta Special B</b>	14,700
<b>Agua</b>	2,104
<b>Lúpulo el dorado</b>	56,000
<b>Lúpulo cascade</b>	19,800
<b>Clarificante (Whirfloc)</b>	4,400
<b>Semillas de mostaza</b>	2,620
<b>Pimienta negra</b>	3,200
<b>Azúcar blanca especial para cerveza</b>	20,000
<b>Levadura SafAle S-04</b>	0
<b>TOTAL</b>	<b>626,494</b>

Fuente. elaboración propia.

La técnica del re-pitching contribuye a una reducción de costos aproximada del 8,8% por lote producido, correspondiente al valor que se deja de invertir en levadura seca nueva. Realizando un buen acondicionamiento en la manipulación de la crema de levadura extraída de los tanques fermentadores, se puede realizar de manera óptima hasta 4 procesos de reutilización teniendo como parámetro fundamental la viabilidad y vitalidad de esta, cabe recalcar que a partir del 5 proceso de fermentación utilizando esta técnica es recomendable inocular levadura nueva para prevenir mutaciones que afecten el producto final, teniendo

en cuenta que un gramo de levadura seca posee alrededor de 20 billones de células<sup>176</sup>.

Como previamente se mencionó para el análisis de costos del proyecto, se tomó un horizonte de evaluación de un año, con el fin de determinar anualmente cuánto dinero se dejaría de invertir en compra de levadura seca nueva; para ello es necesario decir que para la cerveza tipo Pale Ale Belga se realizan cuatro lotes de 400 litros por mes y que la producción continúa en la empresa aproximadamente va desde el 15 de enero hasta el 15 de diciembre por tanto hay un mes de inactividad.

En las tablas 34 y 35 se muestra en términos monetarios la comparación de los dos procesos anteriormente mencionados y el ahorro anual al emplear la técnica del re-pitching.

**Tabla 35.** Costo de la producción en la reutilización de cerveza anualmente sin contemplar la reutilización.

<b>MES DE PRODUCCION (4 LOTES POR MES)</b>	<b>COSTO DE PRODUCCION</b>
<b>Enero – Febrero</b>	2,748,664
<b>Febrero – Marzo</b>	2,748,664
<b>Marzo – Abril</b>	2,748,664
<b>Abril – Mayo</b>	2,748,664
<b>Mayo – Junio</b>	2,748,664
<b>Junio – Julio</b>	2,748,664
<b>Julio – Agosto</b>	2,748,664
<b>Agosto – Septiembre</b>	2,748,664
<b>Septiembre – Octubre</b>	2,748,664
<b>Octubre – Noviembre</b>	2,748,664
<b>Noviembre - Diciembre</b>	2,748,664
<b>TOTAL</b>	<b>30,235,304</b>

Fuente. elaboración propia.

**Tabla 36.** Costo de la producción en la reutilización de cerveza anualmente contemplando la reutilización.

<b>MES DE PRODUCCION</b>	<b>COSTO DE PRODUCCION</b>
<b>Enero – Febrero:</b>	<b>2,566,648</b>
<b>1er lote</b>	<b>687,166</b>
<b>2do lote</b>	626,494
<b>3er lote</b>	626,494
<b>4to lote</b>	626,494

<sup>176</sup> PASCUAL G. ¿Como consigo la cantidad de células que necesito? Descubriendo cervezas. Disponible en: <http://descubriendocervezas.blogspot.com/2014/03/como-consigo-la-cantidad-de-levadura.html>

Tabla 37. Continuación.

MES DE PRODUCCION	COSTO DE PRODUCCION
<b>Febrero – Marzo:</b>	<b>2,515,456</b>
1er lote	626,494
2do lote	635,974
3er lote	626,494
4to lote	626,494
<b>Marzo – Abril:</b>	<b>2,566,648</b>
1er lote	626,494
2do lote	626,494
3er lote	687,166
4to lote	626,494
<b>Abril – Mayo:</b>	<b>2,515,456</b>
1er lote	626,494
2do lote	626,494
3er lote	626,494
4to lote	635,974
<b>Mayo – Junio:</b>	<b>2,505,976</b>
1er lote	626,494
2do lote	626,494
3er lote	626,494
4to lote	626,494
<b>Junio – Julio:</b>	<b>2,566,648</b>
1er lote	687,166
2do lote	626,494
3er lote	626,494
4to lote	626,494
<b>Julio – Agosto:</b>	<b>2,515,456</b>
1er lote	626,494
2do lote	635,974
3er lote	626,494
4to lote	626,494
<b>Agosto – Septiembre:</b>	<b>2,566,648</b>
1er lote	626,494
2do lote	626,494
3er lote	687,166
4to lote	626,494
<b>Septiembre – Octubre:</b>	<b>2,515,456</b>
1er lote	626,494
2do lote	626,494
3er lote	635,974
4to lote	626,494

**Tabla 38.** Continuación.

MES DE PRODUCCION	COSTO DE PRODUCCION
<b>Octubre – Noviembre:</b>	<b>2,566,648</b>
1er lote	626,494
2do lote	626,494
3er lote	626,494
4to lote	687,166
<b>Noviembre – Diciembre:</b>	<b>2,505,976</b>
1er lote	626,494
2do lote	626,494
3er lote	626,494
4to lote	626,494
<b>TOTAL</b>	<b>27,907,016</b>

Fuente. elaboración propia.

Las filas sombreadas de color rojo, corresponden a los lotes de producción con los que se realiza la inoculación del mosto con levadura nueva; de igual manera, las filas que no están sombreadas por un color específico, hacen referencia a los lotes donde se implementa el proceso de re-pitching. A su vez, las filas sombreadas de color azul, son aquellos lotes donde es necesario inocular levadura nueva durante el proceso para prevenir mutaciones que degeneren y modifiquen las condiciones de la levadura en la etapa de fermentación; por ende, cada 4 ciclos después de la inoculación principal se recomienda usar 20 gramos de células de levadura nueva las cuales aproximadamente poseen 400 billones de células metabólicamente activas que contribuirían a realizar una mejor reutilización.

Con la técnica de la reutilización de levadura contribuye a un ahorro anual aproximado de **\$2.328,288 COP**, lo que indica una reducción del **7,7%**. Dicho dinero que se deja de invertir en este proceso puede ser invertido en los análisis de laboratorios que son requeridos para determinar la viabilidad y la vitalidad de cada muestra a reutilizar, de esta manera se obtiene un producto de mejor calidad y contribuyendo a una mejor producción en términos económicos.

#### **4.3 MANO DE OBRA REQUERIDA Y EQUIPOS NECESARIOS PARA REALIZAR EL PROCESO DE RE-PITCHING**

Industrialmente para realizar un correcto acondicionamiento del proceso de reutilización es necesario implementar un sistema de propagación de levaduras, cuyo objetivo principal es obtener una cantidad de biomasa necesaria para realizar la fermentación del mosto realizado. Para el caso de la cervecería Moonshine que actualmente tiene una producción de 400 litros por bache, es necesario hacer

propagaciones de alrededor de 10 a 15 litros de mosto a partir de 600 mililitros de levadura extraída para obtener una población celular capaz de fermentar cada lote cervecero.

*\*\*Es necesario aclarar que esta aproximación que menciono anteriormente se realizó con la calculadora de inóculo y propagación de levadura por tanto son datos aproximados, en las figuras 31 y 32 se muestran los resultados.*

**Figura 31.** Cantidad teórica de levadura recuperada requerida para la elaboración de un lote de cerveza de 400 litros en la cervecería Moonshine.

¿Cuánta levadura tengo inicialmente?

Tipo de levadura:	Ale
Origen de la levadura:	Barro recuperado
Cantidad:	600.0 ml
Fecha de fabricación:	19-Apr-2019

Fuente: Calculadora de inóculo y propagación de levadura. [En línea]. Disponible en:

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1arhO4egVOFbzxz7NMAEudbaRnTM4tBjipCpA7ovzF7g/edit#gid=0>

**Figura 32.** Propagaciones requeridas para la elaboración de un lote de cerveza de 400 litros en la cervecería Moonshine.

Propagación de la levadura (starter)

Si la cantidad de levadura inicial no cubre la cantidad que necesita, entonces es necesario un starter con uno o más pasos de crecimiento para propagar la levadura. Seleccione un método de crecimiento e ingrese la cantidad y densidad del mosto utilizado en cada paso para obtener los valores estimativos de crecimiento.

	Método de crecimiento	Volumen (ml)	Densidad (SG)	Cantidad de levadura (billones de células)		% de la cantidad necesaria	Verificación del tamaño del paso
				Inicial	Final		
1	Agitador magnético	10000	1.062	435	2912	48%	Ok
2	Agitador magnético	15000	1.062	2912	6626	109%	Ok
3							
4							
5							
6							

Fuente: Calculadora de inóculo y propagación de levadura. [En línea]. Disponible en:

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1arhO4egVOFbzxz7NMAEudbaRnTM4tBjipCpA7ovzF7g/edit#gid=0>

Si se quisiera implementar esta técnica en la cervecería Moonshine es necesario contar con un instrumento que pueda realizar la propagación de manera adecuada, mediante la consulta bibliográfica, un equipo que se adapta a las características del proceso que desarrolla actualmente la empresa es el Yeast propagator el cual es un sistema de propagación de levaduras que brinda las condiciones necesarias para realizar un proceso de re-pitching de manera adecuada, brindando al proceso cuatro características fundamentales:

- Homogenización meticulosa de la suspensión de levadura.

- Aireación óptima.
- Control de temperatura adaptado al proceso.
- Alimentación de levadura.

El costo del equipo de propagación de levadura ronda en un rango de precios entre **\$15.000.000** a **\$24.000.000**<sup>177 178 179</sup> COP; este precio está sujeto a las especificaciones que se requieran para cada proceso como por ejemplo el nivel de automatización, ya que puede ser manual, semiautomático o completamente automático como se muestra en la **tabla 36** y de la capacidad de producción que tenga la planta.

**Tabla 39.** Especificaciones que pueden modificar el valor del equipo requerido para la propagación.

CARACTERÍSTICAS		TIPO DE YEAST- STAR**		
		Básico	Estándar	High-end
	Manual	x		
Sistema general	Semiautomático		x	
	Automático			x
Conexión de proceso	Automático			x
Aireación	Automático		x	X
Homogenización	Automático		x	X
Control de temperatura	Automático		x	X
Conexión CIP	Automático			X

Fuente. elaboración propia.

\*\* *Equipo básico para el sistema de propagación.*

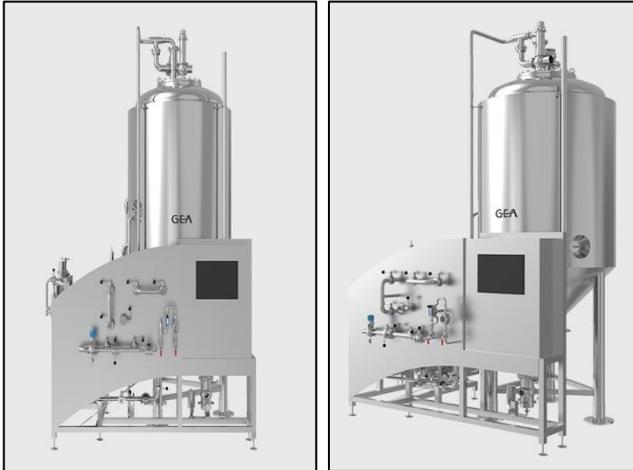
En la figura 33 se puede observar el equipo de propagación estándar de levaduras proporcionado por uno de los fabricantes, conjunto a ciertas especificaciones técnicas para el proceso de la cervecera Moonshine.

<sup>177</sup> GEA GROUP. Sistemas de propagación de levaduras. Disponible en: <https://www.gea.com/es/products/gea-yeast-star.jsp>

<sup>178</sup> KRONES. Gestión de levaduras. Disponible en: <https://www.krones.com/es/productos/maquinas/manejo-de-la-levadura.php>

<sup>179</sup> ALIBABA. Tanque de propagación de levadura. Disponible en: <https://spanish.alibaba.com/p-detail/Frasco-Carlsberg-30L-tanque-de-propagaci%C3%B3n-de-levadura-tanque-de-levadura-de-cerveza-300013107954.html?spm=a2700.8699010.normalList.31.75277898Uhi5j3>

**Figura 33.** Equipo de propagación de levaduras.



Capacidad: 30 a 60 Litros

Material: Acero inoxidable

Temperatura: -10 a 150 °C

Equipo para elaboración de cerveza, procesamiento de levaduras.

Consumo: 1,2 kWh (sistema de control de temperatura, sistema de bombeo para entrada y salida del stater).

Fuente: GEA Group. Sistema de propagación de levadura artesanal. Disponible en: <https://www.gea.com/es/products/craft-yeast-propagator.jsp>

De acuerdo a las especificaciones requeridas por el equipo y, analizando la obra de mano que se necesitaría para su operación, se puede analizar que no se necesita de personal especializado, ya que los trabajadores con los que cuenta la cervecería actualmente pueden manejar el proceso de propagación de manera adecuada; un factor que es importante mencionar es que la cervecería Moonshine realiza un proceso artesanal con una capacidad de producción pequeña, por ende la contratación de nuevo personal conllevaría a una afectación en el proceso del re-pitching en términos de rentabilidad y viabilidad financiera ya que el dinero que se ahorra en el proceso de la reutilización tendría que ser invertido en la nómina de un empleado más

#### **4.4 DEPRECIACION DEL EQUIPO REQUERIDO PARA REALIZAR EL RE-PITCHING**

En primera instancia, la depreciación es definida como el mecanismo con el cual se identifica y reconoce la pérdida de valor de un bien adquirido por el uso que se le realice a este a lo largo del tiempo, cuando un activo es usado para producir un ingreso, este sufre un desgaste normal durante su vida útil hasta el punto que se vuelve inutilizable.<sup>180</sup>

Para realizar el análisis de la depreciación se tiene que tener en cuenta el tiempo de vida útil del bien que se quiera analizar ya que depende de la naturaleza del

<sup>180</sup> GERENCIE. ¿Qué es la depreciación? Gerencie. Disponible en: <https://www.gerencie.com/depreciacion.html>

mismo. Debido a esto, la legislación colombiana ha establecido la vida útil a los diferentes activos clasificándolos de la siguiente manera<sup>181</sup>.

- Inmuebles: Tiempo de vida útil 20 años.
- Barcos, trenes, aviones, maquinaria, equipos y bienes muebles: vida útil 10 años.
- Vehículos automotores y computadores: tiempo de vida útil 5 años.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, el método escogido para hallar la depreciación del equipo y así realizar la propagación de levadura en la cervecería fue el de línea recta, este método es uno de los más utilizados por su sencillez y practicidad, ya que solo se requiere el valor del activo a analizar y el tiempo de vida útil de este como se puede observar en la ecuación 10.

**Ecuación 10.** Determinación de la depreciación por el método de línea recta.

$$D_{LR} = \frac{\text{Valor del activo}}{\text{Vida Util}} = \frac{19,500,000}{10} = \$1,950,000$$

El valor de la depreciación por año del equipo de propagación de levadura es de **\$1,950,000 COP** el cual fue estimado con el valor promedio entre el rango de precios que fue detallado anteriormente en el numeral **1.3.**, en la tabla 37 se detalla el comportamiento de la depreciación a lo largo de la vida útil de este.

**Tabla 40.** Depreciación del equipo de propagación de levadura a lo largo de su vida útil de acuerdo al método de línea recta.

TIEMPO	DEPRECIACIÓN	DEPRECIACIÓN ACUMULADA	VALOR EN LIBROS**
0			19,500,000
1	1,950,000	1,950,000	17,550,000
2	1,950,000	3,900,000	15,600,000
3	1,950,000	5,850,000	13,650,000
4	1,950,000	7,800,000	11,700,000
5	1,950,000	9,750,000	9,750,000
6	1,950,000	11,700,000	7,800,000
7	1,950,000	13,650,000	5,850,000
8	1,950,000	15,600,000	3,900,000
9	1,950,000	17,550,000	1,950,000
10	1,950,000	19,500,000	0

Fuente. elaboración propia.

<sup>181</sup> GERENCIE. ¿Qué es la depreciación? Gerencie. Disponible en: <https://www.gerencie.com/depreciacion.html>

*\*\* Valor que tiene el equipo al transcurrir el tiempo teniendo en cuenta la depreciación, para hallarlo se resta el valor del activo del valor de la depreciación anual.*

Como se puede observar al transcurrir el tiempo el valor del equipo tendera a disminuir debido al uso que tendrá en la cervecería, esto puede generar mayores costos en mantenimiento correspondientes a mejoras en los sistemas de control y reparaciones físicas del equipo (soldaduras, por ejemplo). Debido a que la tecnología de elaboración de cerveza va en constante crecimiento, es necesario contemplar el reemplazo de equipos en determinados instantes de tiempo para realizar una producción óptima y obtener productos de mejor calidad.

De igual forma, como se analizó uno a uno los costos directos del proyecto de la reutilización a escala industrial se tienen que contemplar los costos indirectos de este, los cuales fueron mencionados anteriormente y para ello se analizan a continuación en los numerales 1.5. a 1.6.

#### **4.5 CONSUMO ENERGERTICO DE LOS EQUIPOS USADOS EN EL PROCESO DE REUTILIZACIÓN**

Es importante determinar el costo correspondiente a la energía eléctrica que requeriría el montaje industrial para el proceso de reutilización de levadura, para ello de acuerdo al consumo energético del equipo de propagación es posible determinar el costo en kW/h en el que incurriría la empresa al implementar este proceso. Para ello es necesario conocer la tarifa de energía eléctrica (\$/kWh) dada por la comisión de regulación de energía y gas (CREG) e implementada por la empresa Enel-Codensa para el año 2019, teniendo en cuenta que este valor difiere de factores como: el estrato o si es sector residencial o no<sup>182</sup>. La cervecería Moonshine ubicada en el barrio Prado Veraniego está sujeta a un valor de **528,2058 pesos por kW.**

Teniendo este valor y el consumo que requiere el equipo de propagación de levaduras es posible determinar el costo por hora de energía eléctrica al que incurriría la empresa implementando la reutilización de levadura como se puede ver en la tabla 38.

---

<sup>182</sup> ENEL-CODENSA. Tarifas correspondientes al mes de abril de 2019. Disponible en: <https://www.enel.com.co/content/dam/enel-co/espa%C3%B1ol/personas/1-17-1/2019/Tarifario-abril-2019.pdf>

**Tabla 41.** Costo energético

<b>EQUIPO</b>	<b>PRECIO (COP) KWH</b>	<b>PRECIO (COP) KWH PARA 1,2 KWH</b>	<b>TIEMPO DE TRABAJO (H)</b>
<b>Propagador de levaduras</b>	528,2058	633,85	De acuerdo a conveniencia de la empresa.

Fuente. elaboración propia.

Si el equipo es usado de manera continua durante 1 hora, el costo correspondiente a energía es de **\$633, 85 COP**. La utilización de este puede acoplarse a las condiciones de operación de la empresa, por tanto, no es conveniente mostrar un costo mensual en términos energéticos tal y como se indicó en la tabla anterior, ya que este no estará en operación durante todo el mes, dicho monto como se indicó anteriormente afecta al proceso productivo general y es determinante para analizar la puesta en marcha del proyecto.

#### **4.6 ANÁLISIS DE LABORATORIOS REQUERIDOS PARA CERTIFICAR QUE LA MUESTRA ESTÉ LIBRE DE CONTAMINANTES**

Como se ha mencionado a lo largo de este documento, para realizar el proceso de reutilización es vital que la levadura esté libre de contaminantes potenciales que puedan afectar el proceso de elaboración de cerveza, por tanto, es necesario realizar una serie de análisis de laboratorio que certifiquen que la muestra extraída es apta para reusarla en el proceso.

En la ciudad de Bogotá hay diversos laboratorios microbiológicos que pueden realizar estas identificaciones, para dar una aproximación de los costos a los que se incurren en estos análisis se realizó la respectiva cotización en el centro de diagnóstico microbiológico para determinar cuánto le costaría a la cervecería Moonshine el análisis de la presencia/ausencia de:

- Determinación de mohos y levadura salvajes
- Determinación de *Lactobacillus sp.*
- Determinación de *Pediococcus sp.*
- Determinación de Acetobacterias.

De igual modo es necesario evaluar la viabilidad celular de la levadura mediante el método que se explicó en el capítulo dos por medio del conteo celular con la cámara Neubauer, el recuento de mesófilos aerobios y por último el recuento de coliformes totales, en la tabla 39 se puede observar el costo de cada uno y la duración aproximada de cada análisis.

**Tabla 42.** Costo de análisis microbiológicos requeridos para evaluar la calidad de la levadura.

TIPO DE ANALISIS	COSTO ANALISIS(COP)	METODOLOGIA DE ANALISIS	TIEMPO DE DURACION (días)
Determinación de mohos y levadura salvajes	27.560	Medio: Sabouraud Agar, T° 22.5°C ± 2.5°C	7 días
Determinación de <i>Lactobacillus sp.</i>	36.000	Medio: Agar MRS, T° 32.5°C ± 2.5°C	1 día
Determinación de <i>Pediococcus sp.</i>	36.000	Medio: Agar MRS, T° 32.5°C ± 2.5°C	1 día
Determinación de Acetobacterias.	36.000	Medio: Agar MRS, T° 32.5°C ± 2.5°C	1 día
Evaluación de viabilidad celular	42.400	Conteo cámara Neubauer	1 día
Recuento de mesófilos aerobios	27.560	Medio: PCA T° 32.5°C ± 2.5°C	2 días
Recuento de coliformes totales	28.620	Medio: VRB Agar T° 32.5°C ± 2.5°C	2 días

Fuente. elaboración propia.

Teniendo en cuenta el costo de cada análisis de laboratorio proporcionado por el centro de diagnóstico microbiológico se puede determinar el costo total de las pruebas microbiológicas que se deben realizar correspondiente a **\$234.140 COP**, a este valor debe adicionarse el impuesto de valor agregado I.V.A. para el año 2019 el cual es del 19%, para este caso es un monto de \$44.487 COP. Por tanto, el valor total aproximado que debe ser invertido por la cervecería Moonshine para determinar si la levadura es óptima para su reutilización es de: **\$278.627 COP**, este valor puede variar dependiendo del laboratorio con el que se quiera trabajar.

Finalmente, al cumplir con los objetivos propuestos para llevar a cabo este trabajo de grado, se procede a realizar las conclusiones y recomendaciones pertinentes con el fin de evidenciar la culminación del trabajo del grado.

## 5. CONCLUSIONES

- Se establecieron las condiciones óptimas de cultivo de la levadura extraída de los tanques fermentadores de la cervecería Moonshine para realizar el proceso de re-pitching, dando como resultado que los parámetros más importantes que debe tener esta para ser implementada en un segundo proceso fermentativo son: una viabilidad mayor al 95% la cual fue alcanzada realizando propagaciones por medio de un stater, obteniéndose respectivamente para el experimento uno, un valor de 98.34% y para el número dos del 97,63%. De igual modo la vitalidad de esta a lo largo de la fermentación tuvo resultados idóneos en lo que a pH, densidad, grados brix (°plato) y grado de alcohol se refiere ya que a lo largo de la fermentación alcohólica, la levadura tuvo una buena actividad metabólica demostrando así que no presento condiciones de estrés que afectaran el producto final, esto es corroborado con los intervalos que mencionan varios autores en los cuales debe estar cada parámetro analizado en este trabajo de grado para una cerveza tipo ALE.
- El análisis microbiológico en una muestra de levadura que se quiera implementar para el proceso de reutilización es fundamental para conocer si cumple con los parámetros necesarios exigidos, con el fin de evitar bouquets anómalos en la cerveza que se quiera producir, por ende, la identificación de *Lactobacillus sp*, *Pediococcus sp*, hongos, bacterias ácido lácticas y coliformes totales son determinantes para analizar la viabilidad de implementar este proceso en una cervecería. Para el caso de Moonshine la levadura extraída en la producción de la cerveza tipo PALE ALE BELGA cumple con los parámetros mencionados anteriormente por tanto este proceso puede ser realizado a escala industrial.
- La comparación en el trabajo de grado arrojó los siguientes resultados: de acuerdo a los parámetros escogidos los cuales fueron pH, densidad, grados brix y grado de alcohol los datos recopilados están dentro de un rango óptimo con respecto a los consultados en diversas fuentes bibliográficas para la elaboración de cerveza. En los parámetros microbiológicos, las cervezas elaboradas muestran presencia de mesófilos aerobios los cuales indican que hubo una mala manipulación por parte de los estudiantes en la etapa de fermentación correspondiente a falta de asepsia en el proceso. Finalmente, las pruebas organolépticas, arrojaron como resultado que el experimento 1 y 2 tuvieron una mejor atenuación que la cerveza producida en Moonshine, sin embargo, estas presentan claros indicadores de bacterias acéticas y de oxidación en el producto final lo cual generó bouquets anómalos; de igual forma al analizar el pH se determinó que este en la cerveza producida industrialmente es menor al estipulado para una cerveza tipo Pale Ale Belga, debido a la presencia de diacetilos.

- Se realizó el análisis de costos para el escalonamiento a nivel industrial del proceso de reutilización de levadura en donde se observa que al implementar esta técnica hay una reducción de costos de producción aproximada del 7,7% anual, correspondiente a compra de materias primas, aun cuando el estudio contempla nuevos gastos por consumo energético, debido a la implementación de un tanque de propagación de levaduras.

## 6. RECOMENDACIONES

- Al realizar el proceso de reutilización de levadura por más de 2 ciclos, es necesario tener estricto control sanitario a la hora de realizar el muestreo del tanque fermentador ya que se puede presentar contaminación cruzada por una mala manipulación en el proceso.
- Al momento de llevar a cabo el análisis de viabilidad celular es importante considerar la duración en que transcurre entre la toma de la muestra y el estudio, ya que, al transcurrir del tiempo, el porcentaje de células en la muestra tenderá a disminuir debido a la fase de latencia a la que está sometida la levadura (ausencia de nutrientes) lo que puede generar una autólisis celular. De igual modo es recomendable una vez terminado este estudio, realizar la reutilización en el menor tiempo posible para evitar modificaciones en la estructura celular de la levadura debido al estrés al que se ve sometida.
- De ser posible se recomienda que la microcervecería Moonshine contemple la instalación de un laboratorio en el cual se pueda realizar montajes en los que sea posible, por ejemplo, evaluar la viabilidad por medio del conteo celular mediante la cámara Neubauer y de esta manera contribuir a la reducción de costos en lo que a análisis microbiológicos se refiere.
- Se sugiere realizar el estudio de la viabilidad de implementar el proceso de reutilización de levadura para las cervezas witbier, Amber Ale y Indian Pale Ale las cuales son los otros tipos de cerveza que actualmente produce la cervecería Moonshine y de esta manera contribuir en la reducción de subproductos, obtener productos de mejor calidad y un ahorro en términos económicos.
- Si bien se realizaron dos experimentos a escala banco reutilizando la levadura extraída del proceso de producción, se recomienda hacer un lote de prueba en la cervecería implementando este proceso comparando los parámetros que se analizaron en este documento.

## BIBLIOGRAFIA

ALIBABA. Tanque de propagación de levadura. Disponible en: <https://spanish.alibaba.com/p-detail/Frasco-Carlsberg-30L-tanque-de-propagaci%C3%B3n-de-levadura-tanque-de-levadura-de-cerveza-300013107954.html?spm=a2700.8699010.normalList.31.75277898Uhi5j3>

ANONIMO. Determinación de etanol en una bebida alcohólica por refractometría y de sacarosa en azúcar por polarimetría. [En línea] [7 de mayo de 2019]. Disponible en internet: <https://es.slideshare.net/jhoanson/determinacin-de-etanol-en-una-bebida-alcoholica-por-refractometra-y-de-sacarosa-en-azcar-por-polarimetra-24366765>

APARICIO, Ricardo. Diacetilo: Su producción y reducción. [En línea] [12 de mayo de 2019]. Disponible en internet: <https://www.revistamash.com/2017/detalle.php?id=367>

BOLDU GONZALES, Aleixo. Projecte d'una planta de fabricació de la cervesa. Citado por TORIBIO, Karin. Evaluación de la estabilidad como stater de *Saccharomyces Pastorianus ssp. Carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo lager. [En línea]. Trabajo de grado para obtener el grado de Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de ciencias, 2015. p. 24. [Consultado: 7 de marzo de 2019]. Disponible en Internet: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1894/Q02.T67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

BOULTON Y QUAIN, D. Brewing Yeast and Fermentation. Citado por TORIBIO, Karin. Evaluación de la estabilidad como stater de *Saccharomyces Pastorianus ssp. Carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo lager. [En línea]. Trabajo de grado para obtener el grado de Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de ciencias, 2015. p. 18. [Consultado: 6 de marzo de 2019]. Disponible en Internet: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1894/Q02.T67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

BRIGGS, Dennis; BOULTON, Chris; BROOKES, Peter; STEVENS, Roger. Brewing Science and practice. Cambridge, Inglaterra. Woodhead Publishing limited y CRC press LLC. 2004. p. 368

BROWN, C., CAMPBELL, I., y PRIEST, F. Introducción a la biotecnología. Zaragoza. España. Editorial Acribia .1989. p. 98-99. ISBN: 978-84-200-0666-6.  
BUSTAMANTE, Luis. Sistema Killer de levaduras. Universidad de Talca (Chile). Escuela de Tecnología Médica. 2010. Disponible en: [http:// dspace. utalca.cl/handle/1950/8636](http://dspace. utalca.cl/handle/1950/8636)

CABEZA, E. A. Cultivos Estárter: Seguridad, funcionalidad y propiedades tecnológicas. Simposio Regional de Microbiología. Barranquilla, Colombia: Universidad de Pamplona. 2006. p. 3. [En línea]. Disponible en:

[https://www.academia.edu/992790/Cultivos Est%C3%A1rter Seguridad funcionalidad y propiedades tecnol%C3%B3gicas](https://www.academia.edu/992790/Cultivos_Est%C3%A1rter_Seguridad_funcionalidad_y_propiedades_tecnol%C3%B3gicas)

CASTILLO Toni. Cervezas artesanales: ¿Cuándo lo son? [en línea]. (2016). Disponible en: (<http://www.bonviveur.es/the-food-street-journal/cervezas-artesanales-cuando-lo-son>)

CASTLE MALTING. Azúcares candi belgas y otros ingredientes naturales a base de azúcares naturales. [En línea]. [5 de mayo de 2019]. Disponible en internet: [<https://www.castlemalting.com/CastleMaltingSugar.asp?P=105&Language=Spanish>]

CERVEZA ARTESANA. DMS: de dónde vienen y cómo combatirlo. [En línea] [11 de mayo de 2019] Disponible en : <https://cervezartesana.es/tienda/blog/dms-de-donde-viene-y-como-combatirlo.html>

CERVEZA ARTESANAL DESDE 2003. La guía definitiva de la levadura. [En línea]. [ 5 de mayo de 2019]. Disponibles en internet: [<https://www.cervezartesana.es/blog/post/la-guia-definitiva-de-la-levadura.html>]

CHAMORRO, Natal. FLORES, Bryan. MUÑOZ, Pilar. QUISPE, Leslie. Análisis microbiano de aerobios mesófilos. [En línea] [9 de mayo de 2019]. Disponible en internet: [<file:///C:/Users/leal/Downloads/345768169-aerobios-mesofilos.pdf> ]

CONDE, M. et al., La cerveza en el Egipto Antiguo: Procesos de fabricación y variedades. Sevilla. Fundación Cruzcampo. 2001. p. 40

DAZA. Lisette. Identificación de *Citrobacter koseri* como nuevo patógeno en pacientes con rinitis crónica. An Orl Mex. [En línea], 20 de abril de 2019. Disponible en internet: <https://www.medigraphic.com/pdfs/anaotomex/aom-2014/aom141a.pdf>

DE CLERK, Jean. Textbook of brewing. EE.UU. Chapman and Hall.2009. p. 132 [En línea]. Disponible en: [https://books.google.com.co/books?id=1NIJAAAAYAAJ&hl=es&source=gbs\\_book\\_other\\_versions](https://books.google.com.co/books?id=1NIJAAAAYAAJ&hl=es&source=gbs_book_other_versions)

DOSAL, María José. VILLANUEVA, Marcos. Introducción a la metrología química. Curvas de calibración en los métodos analíticos. [En línea] [7 de agosto de 2019]. Disponible en internet: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CURVASDECALIBRACION\\_23498.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CURVASDECALIBRACION_23498.pdf)

EMPRESA DE ACUEDUCTO Y ALCANTARILLADO DE BOGOTÁ. Tarifas Bogotá año 2019. Disponible en: [https://www.acueducto.com.co/wps/portal/EAB/!ut/p/z1/tVnBt8IwGP0tPOxR-rEb4FtRMMySCCSqwvpiutKO6raMrQ\\_311lsiCZcYpC-9fOc7PTn5DiJohkhBa5ISI1VBM3uPSfjY7V7ilgvuKOP3PcCTsXuN7y8ARiGalIJlyeQcxeD6NEwAfi8JVwhKA0apYEnSCjqsTVsfFaY0ixQzCIN6tCBirIVn6-](https://www.acueducto.com.co/wps/portal/EAB/!ut/p/z1/tVnBt8IwGP0tPOxR-rEb4FtRMMySCCSqwvpiutKO6raMrQ_311lsiCZcYpC-9fOc7PTn5DiJohkhBa5ISI1VBM3uPSfjY7V7ilgvuKOP3PcCTsXuN7y8ARiGalIJlyeQcxeD6NEwAfi8JVwhKA0apYEnSCjqsTVsfFaY0ixQzCIN6tCBirIVn6-)

YUQ7QiutaMqmq73PFWallwWRJMwv9qRqppaAVmh7SRmwZdiwMtp9sgWDojd2eBxDdulsBGxyx1dDepSGKfDStJV-jh0Lp3Np59we3-gfYYdl-gn2\_cAhOR3061VF4OupjDBI8TtGeQbUpk0\_LJcE2IKow\_MWg2X8kxH6cZir5yjEuEq-TlqK54Jrr5krb54UxZXXugAPr9bqZKpVmvMIU7sC2loWlRrNNJCrzvOO9nj2L4ZXnx4P6rTc6-7XdikeJYtxovAMKrt-T/dz/d5/L2dBISEvZ0FBIS9nQSEh/

ENEL-CODENSA. Tarifas correspondientes al mes de abril de 2019. Disponible en: <https://www.enel.com.co/content/dam/enel-co/espa%C3%B1ol/personas/1-17-1/2019/Tarifario-abril-2019.pdf>

FARBE. La importancia de los indicadores de pH de la industria de los alimentos y bebidas. [En línea]. [5 de mayo de 2019]. Disponible en internet: [<https://www.farbe.com.mx/la-importancia-de-los-indicadores-de-ph-en-la-industria-de-los-alimentos-y-bebidas/>]

FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY. Handbook of Brewing, 2 Edición. (Editado por FERGUS, Priest; GRAHAM, Stewart.) Boca Raton, FL, USA. Editorial Taylor & Francis Group, LLC.2006.

GARCIA, VERA. Introducción a la Microbiología. 2ª. Edición. San José, Costa Rica. Editorial universidad estatal a distancia. 2004. Pág. 108

GARIBAY, Mariano. et al., Biotecnología Alimentaria. México D.F. Limusa S.A. 1993. p. 266. ISBN: 968-18-4522-6.

GEA GROUP. Sistemas de propagación de levaduras. Disponible en: <https://www.gea.com/es/products/gea-yeast-star.jsp>

GENMIC. Microbiología general. Tema 2: Cultivo de microorganismos. Obtenido de Genetics and Microbiology Research Group: University of Navarre, Pamplona, Spain. [En línea]. Disponible en: <http://www.unavarra.es/genmic/microgral/Tema%202.-%20Cultivo%20de%20microorganismos.pdf>

GESTION DE PROYECTOS. Que son los costos directos e indirectos y como saber identificarlos para realizar un análisis de costos. GESTION.ORG. Disponible en: <https://www.gestion.org/costos-directos-e-indirectos/>

GERENCIE. ¿Qué es la depreciación? Gerencie. Disponible en: <https://www.gerencie.com/depreciacion.html>

GIGLIARELLI, Pablo. Fermentación. Ciencia Cervecera. [en línea]. 28 de febrero de 2019. Disponible en internet: <http://www.revistamash.com.ar/detalle.php?id=379>.

GONZALEZ, Marcos. Principios de Elaboración de las Cervezas Artesanales. Práctico libro de consulta para aficionados y expertos 1 ed. Carolina del Norte: Estados Unidos. Editorial Lulu press inc. 2017. p. 99. ISBN: 978-1-365-67284-2

GONZALEZ, María. Efecto de diferentes iones metálicos sobre la viabilidad de dos variedades *S. cerevisiae* previamente sometidas “estrés químico”. Tesis de maestría. Monterey, México. Universidad Autónoma de Nuevo León. 2000. p,10.

GUTIERREZ. Enrique. La cerveza. Citado por TORIBIO, Karin. Evaluación de la estabilidad como stater de *Saccharomyces Pastorianus* ssp. *Carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo lager. [En línea]. Trabajo de grado para obtener el grado de Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de ciencias, 2015. p. 5. [Consultado: 5 de marzo de 2019. Disponible en Internet: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1894/Q02.T67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

HAMMOND, Jame. Yeast growth and nutrition. Citado por TORIBIO, Karin. Evaluación de la estabilidad como stater de *Saccharomyces Pastorianus* ssp. *Carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo lager. [En línea]. Trabajo de grado para obtener el grado de Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de ciencias, 2015. p. 81. [Consultado: 5 de marzo de 2019. Disponible en Internet: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1894/Q02.T67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

HAZ TU CHEVE.COM. Defectos en la cerveza. Sabores indeseables. [En línea]. [11 de mayo de 2019] Disponible en: <http://haztucheve.com/biblioteca/23-generalidades/39-defectos-en-la-cerveza-sabores-indeseables>

HEGGART, Heather. Factors Affecting Yeast Viability and Vitality Characteristics: A Review. Master Brewers Association of the Americas. Wisconsin. Estados Unidos. [En línea]. 1999. Pág. 383-406. Disponible en: <https://www.worldcat.org/title/factors-affecting-yeast-viability-and-vitality-characteristics-a-review/oclc/44373637>

HORNSEY, Ian. Elaboración de cerveza: Microbiología, Bioquímica y tecnología. 2 ed. España: Editorial Acribia. 2002. p. 3. ISBN 84-200-0967-9.

HOUGH, J. S. Biotecnología de la cerveza y de la malta. España. Acribia ed. 1990. p. 3. ISBN: 84-200-06981-5

HULSE. G. Yeast propagation. Citado por TORIBIO, Karin. Evaluación de la estabilidad como stater de *Saccharomyces Pastorianus* ssp. *Carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo lager. [En línea]. Trabajo de grado para obtener el grado de Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de ciencias, 2015. p. 88. [Consultado: 24 de abril de 2019. Disponible en Internet:

<http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1894/Q02.T67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. Compendio de normas para trabajos escritos. NTC-1486-6166. Bogotá D.C. El instituto, 2018. ISB 9789588585673 153 p

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. microbiología de alimentos y alimentos para animales. Preparación de muestras para ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para análisis microbiológicos. Parte 1. Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y de diluciones decimales. NTC 4491-1. [En línea] [10 de agosto del 2019]. Disponible en internet: [<https://tienda.icontec.org/wp-content/uploads/pdfs/NTC4491-1.pdf>]

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 1: Técnica de recuento de colonias en productos con actividad acuosa superior a 0,95. NTC 5698-1. [En línea] [10 de agosto del 2019]. Disponible en internet: [<https://es.scribd.com/document/354958300/NTC-5698-1>]

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 2: Técnica de recuento de colonias en productos con actividad acuosa inferior a 0,95. NTC 5698-2. [En línea] [10 de agosto del 2019]. Disponible en internet: [<https://es.scribd.com/document/284429280/NTC5698-2-MOHOS>]

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos NTC 5698-2. [En línea] [10 de agosto del 2019]. Disponible en internet: [<https://es.scribd.com/doc/163602988/NTC-4092-Guia-General-Para-El-Recuento-de-Microorganismos>]

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. productos de frutas y verduras – determinación de pH. NTC 4592. [en línea]. [6 de agosto del 2019]. Disponible en internet: [[https://kupdf.net/download/ntc-4592-ph\\_59de20d808bbc55168e657de\\_pdf](https://kupdf.net/download/ntc-4592-ph_59de20d808bbc55168e657de_pdf)]

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. Manual de métodos analíticos para el control de calidad de bebidas alcohólicas. NTC GTC-4. [En línea] [6 de agosto del 2019]. Disponible en internet: (<https://es.scribd.com/document/94364417/GTC4>)

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. Cerveza- Métodos para determinar el contenido de alcohol etílico en cerveza. NTC- 3952. [En línea] [7 de agosto del 2019]. Disponible en internet : <https://es.scribd.com/document/391812255/NTC-3952-Determinacion-de-Etanol-en-Cerveza>

INSTITUTO SUPERIOR DANIEAL ALCIDES CARRIÓN. Determinación de pH. Buffer. Acción amortiguadora. [En línea]. [ 5 de mayo de 2019]. Disponible en internet: [<https://es.slideshare.net/agc1992/determinacion-de-ph-bioquimica>]

KENSHO Mediterranean Sake, Miso & Koji. La fermentación de la cerveza en 4 fases. [En línea]. [5 de mayo de 2019]. Disponible en internet: [<http://www.kenshosake.com/la-fermentacion-de-la-cerveza-en-4-fases/>]

KLIMOVITZ, Ray. Y BAMFORTH, Charles. El cervecero en la práctica: un manual para la industria cervecera. 3 ed. Estados Unidos. Master Brewers Association of the Americas. 2002. p. 363-364

KNUDSEN, F. El Cervecero en la práctica. 3 ed. Wisconsin. Madison. 1977. p. 211.

KRONES. Gestión de levaduras. Disponible en: <https://www.krones.com/es/productos/maquinas/manejo-de-la-levadura.php>

KUNZE, Wolfgang. Tecnología para cerveceros y malteros. Berlin, Alemania. Editorial Westkreuz- Druckerei. 2006. p. 75. ISBN: 978-3-921690-54-3

KURTZMAN, Cletus. FELL, The Yeasts, A Taxonomic Study. 4ta edición. Ámsterdam, Países bajos. Editorial Elsevier Science. 1998. p. 365

LEROY, F. Y De VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. En: Trends in Food Science and Technology. Volume 15, Number 2. p. 75.

ROSS, R. et al., Preservation and fermentation: past, present and future. En: International Journal of Food Microbiology. p. 79.

LEZCANO, E. Levaduras. Revista de alimentos argentinos. [en línea]. (2011). Disponible en: [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/revista/ediciones/53/productos/r5\\_3\\_07\\_Levaduras.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/revista/ediciones/53/productos/r5_3_07_Levaduras.pdf)

LIBKIND DIEGO, TOGNETTI CELIA, MOLINE MARTÍN. Curso teórico-practico sobre microscopia y recuento de levaduras para productores de cerveza. Instituto de investigaciones en biodiversidad y medioambiente IMBIOMA. 2014. [En línea]

Disponible en <http://www.somoscervecedores.com/wp-content/uploads/2014/11/Teorica-Curso-Microscopio-La-Plata-2014-V5.pdf>

MARTINEZ LAÍNEZ, Fernando. La cerveza en España. Citado por TORIBIO, Karin. Evaluación de la estabilidad como stater de *Saccharomyces Pastorianus ssp. Carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo lager. [En línea]. Trabajo de grado para obtener el grado de Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de ciencias, 2015. p. 5. [Consultado: 5 de marzo de 2019. Disponible en Internet: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1894/Q02.T67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

MARTINEZ QUESADA, M. Hongos domésticos: *Saccharomyces uvarum*. Micobotánica-Jaén. 2012. Disponible en: <http://www.micobotanicajaen.com/>.

MASKELL, Dawn. et al., Chronological and replicative lifespan in lager brewing yeast. Oxford, UK. K. A. SMART (Ed.) 2003. p. 281-290.

MILLARAY, Paola. Detección de la contaminación por bacterias lácticas en cerveza tipo Ale elaborada por la compañía cervecera Kunstmann. Valdivia, Chile, 2004, p 11-17. Trabajo de grado (licenciado para ingeniería de alimentos). Universidad Austral de Chile. Facultad de ciencias agrarias.

MORENO, Alonso. Historia de la cerveza y su introducción en España. España. 2013. [En línea]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4855650>.

OBS. Costos directos e indirectos de un proyecto. OBS Business school. Disponible en: <https://www.obs-edu.com/int/blog-project-management/viabilidad-de-un-proyecto/costos-directos-e-indirectos-de-un-proyecto>

OMS. Escherichia coli. Organización Mundial de la Salud. [En línea], 20 de abril de 2019. Disponible en internet: [https://www.who.int/topics/escherichia\\_coli\\_infections/es/](https://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/)

OPEKAROVA, M; SIGLER, K. Acidification power: indicator of metabolic activity and autolytic changes in *Saccharomyces cerevisiae*. UK. Folia Microbial. 1972. Pág. 395-403

PALMER, John. Off-Flavors: Aromas y sabores no deseados en la cerveza. [En línea] [12 de mayo de 2019]. Disponible en internet: <https://www.thebeertimes.com/off-flavors-aromas-y-sabores-no-deseados-en-la-cerveza/#Astringente>

PASCUAL, Guillermo. Calculadora de inóculo y propagación de levadura. Descubriendo Cervezas. [en línea], 6 de marzo de 2019. Disponible en internet:

[http:// descubriendo\\_cervezas.blogspot.com/2014/03/calculadora-de-inoculo-y-propagacion-de.html](http://descubriendo_cervezas.blogspot.com/2014/03/calculadora-de-inoculo-y-propagacion-de.html)

PASCUAL G. ¿Como consigo la cantidad de células que necesito? Descubriendo cervezas. Disponible en: <http://descubriendocervezas.blogspot.com/2014/03/como-consigo-la-cantidad-de-levadura.html>

PEREZ, Carolina. Boan, Martin. Evaluación sensorial de cerveza. [En línea] [ 9 de mayo de 2019]. Disponible en internet: [ [http://somoscervecedores.com/wp-content/plugins/downloads-manager/upload/3\\_evaluacion\\_sensorial\\_santafe2008.pdf](http://somoscervecedores.com/wp-content/plugins/downloads-manager/upload/3_evaluacion_sensorial_santafe2008.pdf)]

PILLA, Simone; VINCI, Genny. Cervezas de todo el mundo. Enciclopedia Práctica. Traducido por Cristina Sala Carbonell. México. De Vicchi. Ediciones, S-A 2012. p. 10.

RODRÍGUEZ, Hipatia. Determinación de Parámetros Físico-Químicos para la Caracterización de Cerveza Tipo Lager Elaborada por Compañía Cervecería Kunstmann S.A. [En línea]. Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero de Alimentos. Chile. Universidad Austral de Chile. Facultad de ciencias agrarias. 2003.p. 10. [Consultado: 5 de marzo de 2019]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2003/far696d/doc/far696d.pdf>

ROS, José Luis. Estabilidad coloidal de la cerveza. Pamplona, España. Editorial DIALNET. 1980. p. 45

SALGADO, Víctor. Análisis de mesófilos aerobios, mohos y levaduras, coliformes totales y *Salmonella spp.* En cuatro ingredientes utilizados en la planta de lácteos en Zamorano, Honduras. P. 9. Proyecto especial (Título de Ingeniero Agrónomo). Universidad de Zamora. Facultad agroindustrial.

SANCHIS, V. Aspectos tecnológicos y nutritivos de la cerveza. Avances en ciencia y Tecnología de los alimentos. 2004. p 65-72.

SANCHO, Rubén. Diseño de una micro-planta de fabricación de cerveza y estudio de técnicas y procesos de producción. [en línea]. [20 de marzo de 2019]. Disponible en internet: [\[https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/76575/02\\_Memoria.pdf?sequence=5&isAllowed=y\]](https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/76575/02_Memoria.pdf?sequence=5&isAllowed=y). p. 61 – 66.

STEWART, G. Y RUSSELL, I. Yeast Management. Brewing Science & Technology: Brewer's Yeast. Citado por TORIBIO, Karin. Evaluación de la estabilidad como stater de *Saccharomyces Pastorianus ssp. Carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo lager. [En línea]. Trabajo de grado para obtener el grado de Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad

de ciencias, 2015. p. 37. [Consultado: 5 de marzo de 2019. Disponible en Internet: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1894/Q02.T67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

SUÁREZ LEPE, José Antonio. A. Y IÑIGO LEAL. Baldomero. Microbiología enológica: fundamentos de vinificación. Citado por TORIBIO, Karin. Evaluación de la estabilidad como stater de *Saccharomyces Pastorianus ssp. Carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo lager. [En línea]. Trabajo de grado para obtener el grado de Biólogo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de ciencias, 2015. p. 39. [Consultado: de marzo de 2019. Disponible en Internet: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1894/Q02.T67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

TAIDI, Behnam. et al., Wort Substitutes and Yeast Nutrition. Citado por: SMART. Katherine. Brewing Yeast Fermentation Performance. 2 ed. Estados Unidos. Blackwell Science. 2003. p. 88. ISBN: 9780470696040

TORRES. MARIA PAULA. Valoración de la calidad microbiológica del producto en proceso de una planta productora de bebidas alcohólicas. [En línea]. Trabajo de grado para optar por el título de Microbiólogo Industrial. Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. 2007. p. 24. [Consultado: 08 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis16.pdf>

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. Pruebas de análisis a bebidas fermentadas. [En línea]. [20 de marzo]. Disponible en internet: [http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php?option=com\\_content&view=article&id=92&Itemid=94](http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php?option=com_content&view=article&id=92&Itemid=94)

VARNAM, Alan; SUTHERLAND, Jane. Bebidas alcohólicas: Cerveza. Bebidas. Tecnología, Química y Microbiología. Zaragoza, España. Editorial Acribia. 1996. Pág. 307 - 373.

WHITE, L. Comparison of yeast viability/vitality methods and their relationship to fermentation performance. Brewing Yeast Fermentation Performance (2da Edición). Oxford, Inglaterra. Blackwell Science. 2003. Pág. 138-147

## **ANEXOS**

## ANEXO A. ESPECIFICACIONES TECNICAS DE LA MALTA MUNICH USADA EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA TIPO PALE ALE BELGA.



*Maltas Belgas que Hacen Sus Cervezas Tan Especiales*

### ESPECIFICACIÓN

CHÂTEAU MUNICH  
Cosecha 2018

PARÁMETRO	Unidad	Min	MÁX
Humedad	%		4.5
Extracto (sustancia seca)	%	80.0	
Color del mosto	EBC(Lov.)	21.0 (8.4)	28.0 (11.1)
Total proteínas (malta seca)	%		11.5

#### Propiedades

Malta de especialidad belga tipo Munich. Secada a una temperatura de hasta 100-105 °C.

#### Características

Malta rica y dorada. Intensifica ligeramente el color acercándolo a un agradable color naranja dorado. Añade un marcado sabor de malta y grano a numerosos estilos de cerveza sin afectar ni a la estabilidad ni al cuerpo de la espuma. También se utiliza en pequeñas cantidades en combinación con la malta Pilsen 2RS a fin de producir cervezas de color claro mejorando su sabor a malta y dándoles un color más rico. Potencia el sabor de las cervezas con carácter.

#### Uso

Pale ale, ámbar, oscura, cervezas fuertes y negras, bocks. Hasta el 60% de la mezcla.

#### Almacenamiento y tiempo de caducidad

La malta debe almacenarse en un lugar limpio, fresco (< 22 °C), seco (< 35 RH %) y sin plagas. En estas condiciones, recomendamos utilizar todos los productos de grano en un plazo de 24 meses a partir de la fecha de producción y todos los productos molidos en un plazo de tres meses. Las maltas almacenadas incorrectamente pueden perder su frescor y sabor.

#### Embalaje

A granel; A granel en Liner Bag en contenedor; Sacos (25 kg, 50 kg); Big bags (400-1.250 kg). Todos los tipos de embalaje en contenedores de 20' o 40' para las exportaciones.

#### IMPORTANTE

Nosotros garantizamos para todas nuestras maltas una trazabilidad de 100% desde el campo de cebada a través del proceso de producción de la malta hasta la entrega según el Reglamento (CE) n° 178/2002 con respecto a la trazabilidad de los productos alimenticios.

Todas nuestras maltas son fabricadas según el método tradicional de fabricación de la malta que dura de 8 a 10 días lo que constituye una sólida garantía de alta modificación de los granos y de la calidad superior de las maltas Premium.

Nuestras maltas son fabricadas en estricta conformidad con la legislación con respecto a la utilización de los OGM que prohíbe la producción de la malta obtenida a partir de cebada genéticamente modificada dentro de la Comunidad Europea (Directiva 2001/18/CE).

Nuestra producción está en estricta conformidad con las normas HACCP (Hazard Analyses of Critical Control Points) en vigor.

Nuestras maltas no sobrepasan los valores límite de los índices admisibles de pesticidas, herbicidas, micotoxinas y nitrosaminas según las normas de la UE e internacionales.

Las entregas de nuestras maltas están efectuadas exclusivamente para transportadores compulsados GMP.

Sobre nuestro sitio [www.castlemalting.com](http://www.castlemalting.com) vosotros podéis visualizar e imprimir los boletines de análisis de la malta suministrada.

## ANEXO B.

### ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DE LA MALTA 2RP USADA EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA TIPO PALE ALE BELGA.



*Maltas Belgas que Hacen Sus Cervezas Tan Especiales*

#### ESPECIFICACIÓN

CHÂTEAU PILSEN 2RS  
Cosecha 2018

PARÁMETRO	Unidad	Min	MÁX
Humedad	%		4.5
Extracto (sustancia seca)	%	81.0	
Diferencia fig	%	1.5	2.5
Color del mosto	EBC(Lov.)		3.5 (1.9)
Postcoloración	EBC(Lov.)		6 (2.8)
Total proteínas (malta seca)	%		11.5
Proteína soluble	%	3.5	4.4
Índice Kolbach	%	35.0	45.0
Viscosidad	cp		1.6
Beta glucans	mg/l		250
pH		5.6	6.0
Potencia diastásica	WK	250	
Friabilidad	%	80.0	
Vidriado (granos enteros)	%		2.5
PDMS			5.0
Filtración			Normal
Tiempo de sacarificación	Minutos		15
Claridad del mosto			Claro
Calibración: - superior a 2.5 mm	%	90.0	
Calibración: - rechazado	%		2.0

#### Propiedades

La malta belga de color más claro. Se produce utilizando las mejores variedades de cebada europea de 2 hileras primavera. Secada a una temperatura de hasta 80-85 °C.

#### Características

Se trata de una malta con un color más claro. Está bien modificada y resulta fácil de macerar con una infusión simple, de una sola temperatura. Nuestra malta Château Pilsen tiene un sabor de malta fuerte y dulce a la vez, y contiene una potencia enzimática suficiente como para ser utilizada como malta base.

#### Uso

Todos los tipos de cerveza. Hasta el 100% de la mezcla para las cervezas Pale (Pilsner, Lager) o como parte de la mezcla para otras cervezas.

#### Almacenamiento y tiempo de caducidad

La malta debe almacenarse en un lugar limpio, fresco (< 22 °C), seco (< 35 RH %) y sin plagas. En estas condiciones, recomendamos utilizar todos los productos de grano en un plazo de 24 meses a partir de la

## ANEXO C. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DE LA MALTA CRYSTAL USADA EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA TIPO PALE ALE BELGA.



*Maltas Belgas que Hacen Sus Cervezas Tan Especiales*

### ESPECIFICACIÓN

**CHÂTEAU CRYSTAL®**  
Cosecha 2018

PARÁMETRO	Unidad	Min	MÁX
Humedad	%		4.5
Extracto (sustancia seca)	%	78.0	
Color del mosto	EBC(Lov.)	140 (53.1)	160 (60.6)
pH			6.0
<b>Propiedades</b>			
Malta aromática típicamente belga con una caramelización especial desarrollada por Castle Malting. Sigue un proceso especial de germinación. Se carameliza en varios pasos a fin de desarrollar un aroma y un sabor únicos.			
<b>Características</b>			
Esta malta de color caramelo-cobre proporciona un aroma y un sabor rico de malta a las cervezas lager ámbar y negras. En comparación con otras maltas tradicionales de color, la malta Château Crystal® tiene mayor potencia diastática y proporciona un amargor más suave.			
<b>Uso</b>			
Cervezas aromáticas y de color. Perfecta para cualquier cerveza que requiera de una malta de alta calidad. Se trata de una elección ideal para las ales belgas y las cervezas bock alemanas. Hasta el 20% de la mezcla.			
<b>Almacenamiento y tiempo de caducidad</b>			
La malta debe almacenarse en un lugar limpio, fresco (< 22 °C), seco (< 35 RH %) y sin plagas. En estas condiciones, recomendamos utilizar todos los productos de grano en un plazo de 24 meses a partir de la fecha de producción y todos los productos molidos en un plazo de tres meses. Las maltas almacenadas incorrectamente pueden perder su frescor y sabor.			
<b>Embalaje</b>			
A granel; A granel en Liner Bag en contenedor; Sacos (25 kg, 50 kg); Big bags (400-1.250 kg). Todos los tipos de embalaje en contenedores de 20' o 40' para las exportaciones.			
<b>IMPORTANTE</b>			
Nosotros garantizamos para todas nuestras maltas una trazabilidad de 100% desde el campo de cebada a través del proceso de producción de la malta hasta la entrega según el Reglamento (CE) n° 178/2002 con respeto a la trazabilidad de los productos alimenticios.			
Todas nuestras maltas son fabricadas según el método tradicional de fabricación de la malta que dura de 8 a 10 días lo que constituye una sólida garantía de alta modificación de los granos y de la calidad superior de las maltas Premium.			
Nuestras maltas son fabricadas en estricta conformidad con la Legislación con respeto a la utilización de los OGM que prohíbe la producción de la malta obtenida a partir de cebada genéticamente modificada dentro de la Comunidad Europea (Directiva 2001/18/CE).			
Nuestra producción está en estricta conformidad con las normas HACCP (Hazard Analyses of Critical Control Points) en vigor.			
Nuestras maltas no sobrepasan los valores límite de los índices admisibles de pesticidas, herbicidas, micotoxinas y nitrosaminas según las normas de la UE e internacionales.			
Las entregas de nuestras maltas están efectuadas exclusivamente para transportadores compulsados GMP.			

## ANEXO D. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DE LA MALTA SPECIAL BELGUIM USADA EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA TIPO PALE ALE BELGA.



*Maltas Belgas que Hacen Sus Cervezas Tan Especiales*

### ESPECIFICACIÓN

CHÂTEAU SPECIAL Belgium®  
Cosecha 2018

PARÁMETRO	Unidad	Min	MÁX
Humedad	%		6.0
Extracto (sustancia seca)	%	77.0	
Color del mosto	EBC(Lov.)	260.0 (98.1)	320.0 (120.6)

#### Propiedades

Malta oscura belga muy especial que se obtiene a través de un proceso específico de doble secado.

#### Características

Se utiliza para obtener un color de rojo oscuro a negro-marrón oscuro y conseguir un cuerpo más pleno. Sabor y aroma únicos. Da mucho color y un sabor a pasas. Proporciona un rico sabor a malta y un matiz de sabor de nuez y ciruela. Puede utilizarse en lugar de las maltas chocolate y negra si se desea evitar que la cerveza sea amarga.

#### Uso

Ales abadía, dubbel, porter, ales oscuras, doppelbock. Hasta el 10% de la mezcla.

#### Almacenamiento y tiempo de caducidad

La malta debe almacenarse en un lugar limpio, fresco (< 22 °C), seco (< 35 RH %) y sin plagas. En estas condiciones, recomendamos utilizar todos los productos de grano en un plazo de 24 meses a partir de la fecha de producción y todos los productos molidos en un plazo de tres meses. Las maltas almacenadas incorrectamente pueden perder su frescor y sabor.

#### Embalaje

A granel; A granel en Liner Bag en contenedor; Sacos (25 kg, 50 kg); Big bags (400-1.250 kg). Todos los tipos de embalaje en contenedores de 20' o 40' para las exportaciones.

#### IMPORTANTE

Nosotros garantizamos para todas nuestras maltas una trazabilidad de 100% desde el campo de cebada a través del proceso de producción de la malta hasta la entrega según el Reglamento (CE) n° 178/2002 con respecto a la trazabilidad de los productos alimenticios.

Todas nuestras maltas son fabricadas según el método tradicional de fabricación de la malta que dura de 8 a 10 días lo que constituye una sólida garantía de alta modificación de los granos y de la calidad superior de las maltas Premium.

Nuestras maltas son fabricadas en estricta conformidad con la Legislación con respecto a la utilización de los OGM que prohíbe la producción de la malta obtenida a partir de cebada genéticamente modificada dentro de la Comunidad Europea (Directiva 2001/18/CE).

Nuestra producción está en estricta conformidad con las normas HACCP (Hazard Analyses of Critical Control Points) en vigor.

Nuestras maltas no sobrepasan los valores límite de los índices admisibles de pesticidas, herbicidas, micotoxinas y nitrosaminas según las normas de la UE e internacionales.

Las entregas de nuestras maltas están efectuadas exclusivamente para transportadores compulsados GMP.

Sobre nuestro sitio [www.castlemalting.com](http://www.castlemalting.com) vosotros podéis visualizar e imprimir los boletines de análisis de la malta suministrada.

Sede administrativo: Chemin du Couloiry 1, 4800 Lambertmont, Bélgica  
Silo de producción: Rue de Mons 94, 7970 Bevel, Bélgica  
Tel. : + 32 (0) 87 662065; Fax : +32 (0) 87 352234; [info@castlemalting.com](mailto:info@castlemalting.com); [www.castlemalting.com](http://www.castlemalting.com)

## ANEXO E. PRUEBA MICROBIOLÓGICA CORRESPONDIENTE A LA PRIMER TOMA DE MUESTRA DE LEVADURA EN A CERVECERÍA MMONSHINE.



### CENTRO DE DIAGNOSTICO MICROBIOLÓGICO

Análisis de productos farmacéuticos, cosméticos, veterinarios, aguas, materias primas, ambientes, envases, superficies, equipos, personal, evaluación de desinfectantes, cursos de capacitación y asesorías técnicas.

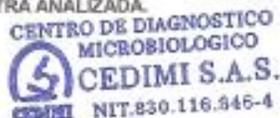
#### REPORTE MICROBIOLÓGICO

NÚMERO DE ANÁLISIS	CC 18563
NOMBRE DEL CLIENTE	LEONARDO CRUZ
PRODUCTO	LEVADURA CERVECERA
LOTE	090219
PRESENTACIÓN	1 FRASCO DE VIDRIO X 200 mL
FECHA DE TOMA DE MUESTRA	09 – FEBRERO – 2019
FECHA DE ANÁLISIS	09 – FEBRERO – 2019
FECHA DE REPORTE	18 – FEBRERO – 2019
MÉTODO	RECuento EN PLACA
CIUDAD	BOGOTÁ D. C.
RECUEENTOS E INVESTIGACIONES	RESULTADOS
RECuento TOTAL DE MESOFILOS AEROBIOS Medio PCA T° 32.5°C ± 2.5°C X 48 Horas Lote: 109674B. FV: Octubre/31/2020	43 ufc / mL
RECuento TOTAL DE HONGOS Medio Sabouraud Agar T° 22.5°C ± 2.5°C X 7 Días Lote: 111149B. FV: Septiembre/30/2022	< 10 ufc / mL
RECuento TOTAL DE LEVADURAS Medio Sabouraud Agar T° 22.5°C ± 2.5°C X 7 Días Lote: 111149B. FV: Septiembre/30/2022	27 x 10 <sup>2</sup> ufc / mL
RECuento TOTAL DE COLIFORMES Medio VRB Agar T° 32.5°C ± 2.5°C X 48 Horas Lote: 110369B. FV: 31/Octubre/2021	90 ufc / mL
DETERMINACION A/P DE <i>Paedococcus</i> sp. Medios: AGAR MRS, T° 32.5°C ± 2.5°C X 24 Horas Lote: 108637A. FV: Abril /30/2020	AUSENTE
DETERMINACION A/P DE <i>Lactobacillus</i> sp. Medios: AGAR MRS, T° 32.5°C ± 2.5°C X 24 Horas Lote: 108637A. FV: Abril /30/2020	AUSENTE
DETERMINACION A/P DE <i>Acetobacterias</i> Medios: AGAR MRS, T° 32.5°C ± 2.5°C X 24 Horas Lote: 108637A. FV: Abril /30/2020	AUSENTE
<b>OBSERVACIONES:</b>	
Se aisló: <i>Citrobacter koseri</i> : Enterobacteria que se encuentra en las heces, el suelo, el agua, las aguas residuales y los alimentos; aislado de la orina, garganta, nariz, esputo y heridas; se informó en casos de meningitis neonatal en los que con frecuencia es grave, lo que resulta en la formación de abscesos cerebrales. <i>Escherichia coli</i> : Cocobacilos Gram Negativos. Habitante de la flora intestinal de animales y humanos. Puede causar enfermedades gastrointestinales.	
Muestra tomada por el cliente	

Ufc / mL: Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de muestra analizada.  
RESULTADOS VALIDOS UNICAMENTE PARA LA MUESTRA ANALIZADA.

Atte:

*Teresa de Jesús López Martínez*  
TERESA DE JESUS LOPEZ MARTINEZ  
Directora Técnica



Carrera 22 No 159A-31- Teléfonos: 6057746 / 7741063 Celular: 310-2 67 27 80  
E-mail: cedimi@hotmail.com – ce\_di\_mi@yahoo.com - Bogotá D.C. Colombia

**ANEXO F. PRUEBA MICROBIOLÓGICA CORRESPONDIENTE A LA SEGUNDA TOMA DE MUESTRA DE LEVADURA EN LA CERVECERÍA MOONSHINE.**



**CENTRO DE DIAGNOSTICO MICROBIOLÓGICO**

Análisis de productos farmacéuticos, cosméticos, veterinarios, aguas, materias primas, ambientes, envases, superficies, equipos, personal, evaluación de desinfectantes, cursos de capacitación y asesorías técnicas.

**REPORTE MICROBIOLÓGICO**

NÚMERO DE ANÁLISIS	CC 19018
NOMBRE DEL CLIENTE	LEONARDO CRUZ
PRODUCTO	LEVADURA CERVECERA
LOTE	040319
PRESENTACIÓN	1 FRASCO DE VIDRIO X 200 mL
FECHA DE TOMA DE MUESTRA	04 - MARZO - 2019
FECHA DE ANÁLISIS	04 - MARZO - 2019
FECHA DE REPORTE	08 - MARZO - 2019
MÉTODO	RECuento EN PLACA
CIUDAD	BOGOTÁ D. C.
<b>RECUENTOS E INVESTIGACIONES</b>	
RECuento TOTAL DE MESOFILOS AERÓBIOS MEDIO PCA T° 32.5°C ± 2.5°C X 48 Horas Lote: 109674B FV: Octubre/31/2020	11 x 10 <sup>2</sup> ufc / mL
RECuento TOTAL DE COLIFORMES Medio VRB Agar T° 32.5°C ± 2.5°C X 48 Horas Lote: 110968B FV: 31/Diciembre/2021	6 ufc / mL
<b>OBSERVACIONES:</b>	
Se aisló:	
<b>Bacillus sp:</b> Bacteria Gram-positiva contaminante del medio ambiente. No patógeno	
<b>Escherichia coli:</b> Cocobacilos Gram Negativos. Habitante de la flora intestinal de animales y humanos. Puede causar enfermedades gastrointestinales	
<b>Levaduras:</b> Hongos contaminantes del medio ambiente. No patógenos.	
Muestra tomada por el cliente	

Ufc / mL: Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de muestra analizada.

**RESULTADOS VALIDOS UNICAMENTE PARA LA MUESTRA ANALIZADA.**

Ate:

*Teresa de Jesús López M.*  
TERESA DE JESUS LOPEZ M.  
Gerente General



*Angie Julieth Chaparro P.*  
ANGIE JULIETH CHAPARRO P.  
Directora Técnica

**ANEXO G. PRUEBA MICROBIOLÓGICA CORRESPONDIENTE A LA TERCERA TOMA DE MUESTRA DE LEVADURA EN LA CERVECERÍA MOONSHINE.**



**CENTRO DE DIAGNOSTICO MICROBIOLÓGICO**

Análisis de productos farmacéuticos, cosméticos, veterinarios, aguas, materias primas, ambientes, envases, superficies, equipos, personal, evaluación de desinfectantes, cursos de capacitación y asesorías técnicas.

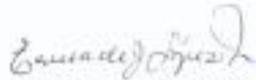
**REPORTE MICROBIOLÓGICO**

NÚMERO DE ANÁLISIS	CC 19179
NOMBRE DEL CLIENTE	LEONARDO CRUZ
PRODUCTO	LEVADURA CERVECERA
LOTE	150319
PRESENTACIÓN	1 FRASCO DE VIDRIO X 200 mL
FECHA DE TOMA DE MUESTRA	15 - MARZO - 2019
FECHA DE ANÁLISIS	15 - MARZO - 2019
FECHA DE REPORTE	19 - MARZO - 2019
MÉTODO	RECUENTO EN PLACA
CIUDAD	BOGOTÁ D. C.
<b>RECUENTOS E INVESTIGACIONES</b>	
RECUENTO TOTAL DE COLIFORMES Medio VRB Agar T° 32.5°C ± 2.5°C X 48 Horas Lote: 1103988. FV. 31/Diciembre/2021	<b>RESULTADOS</b>  3 ufc / mL
<b>OBSERVACIONES:</b>	
Se aisló:	
<i>Escherichia coli</i> : Cocobacilos Gram Negativos. Habitante de la flora intestinal de animales y humanos. Puede causar enfermedades gastrointestinales.	
Muestra tomada por el cliente	

Ufc / mL: Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de muestra analizada.

**RESULTADOS VALIDOS UNICAMENTE PARA LA MUESTRA ANALIZADA.**

Año:

  
TERESA DE JESUS LOPEZ M.  
Gerente General

**CENTRO DE DIAGNOSTICO  
MICROBIOLÓGICO  
CEDIMI S.A.S.**  
 NIT.830.116.846-4

  
ANGIE JULIETH CHAPARRO P.  
Directora Técnica

Carrera 22 No 158A-31- Teléfonos: 6057746 / 7741063 Celular: 310-2 57 27 88  
E-mail: cedimi@hotmail.com - ce\_di\_mi@yahoo.com - Bogotá D.C. Colombia

**ANEXO H. PRUEBA MICROBIOLÓGICA CORRESPONDIENTE A LA CUARTA TOMA DE MUESTRA DE LEVADURA EN LA CERVECERIA MOONSHINE.**



**CENTRO DE DIAGNOSTICO MICROBIOLÓGICO**

Análisis de productos farmacéuticos, cosméticos, veterinarios, aguas, materias primas, ambientes, envases, superficies, equipos, personal, evaluación de desinfectantes, cursos de capacitación y asesorías técnicas.

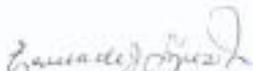
**REPORTE MICROBIOLÓGICO**

NÚMERO DE ANÁLISIS	CC 19179
NOMBRE DEL CLIENTE	LEONARDO CRUZ
PRODUCTO	LEVADURA CERVECERA
LOTE	150319
PRESENTACIÓN	1 FRASCO DE VIDRIO X 200 mL
FECHA DE TOMA DE MUESTRA	15 - MARZO - 2019
FECHA DE ANÁLISIS	15 - MARZO - 2019
FECHA DE REPORTE	19 - MARZO - 2019
MÉTODO	RECuento EN PLACA
CIUDAD	BOGOTÁ D. C.
<b>RECuentos e investigaciones</b>	
RECuento TOTAL DE COLIFORMES Medio VRB Agar T° 32.5°C ± 2.5°C X 48 Horas Lote: 1103988. FV: 31/Diciembre/2021	<b>RESULTADOS</b>  3 ufc / mL
<b>OBSERVACIONES:</b>	
Se aisló:	
<i>Escherichia coli</i> : Cocobacilos Gram Negativos. Habitante de la flora intestinal de animales y humanos. Puede causar enfermedades gastrointestinales.	
Muestra tomada por el cliente	

Ufc / mL: Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de muestra analizada.

**RESULTADOS VALIDOS UNICAMENTE PARA LA MUESTRA ANALIZADA.**

Año:

  
TERESA DE JESUS LOPEZ M.  
Gerente General

**CENTRO DE DIAGNOSTICO  
MICROBIOLÓGICO  
CEDIMI S.A.S.**  
 NIT.830.116.846-4

  
ANGIE JULIETH CHAPARRO P.  
Directora Técnica

**ANEXO I. MUESTRA DE RESULTADOS DE VIABILIDAD PARA CADA FASE DE PROPAGACIÓN DE LEVDURA - EXPERIMENTO 1.**

**Conteo celular luego de la primera fase de propagación (inoculación de 15 ml levadura en 100 ml de mosto estéril).**

En esta primera fase el stater se dejó en agitación constante durante 3 días y una vez finalizado este tiempo se realizó el conteo celular con el fin de determinar la viabilidad antes de pasar a la segunda propagación en este caso se contaron 159 células, en la tabla número 40 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 40.** Recuento de células viables en la primera fase de propagación del experimento número 1.

<b>Cuadrante</b>	<b>Número de células vivas</b>	<b>Número de células muertas</b>
1	5	2
2	6	0
3	4	0
4	4	1
5	5	0
6	6	0
7	7	0
8	6	0
9	4	1
10	6	0
11	6	0
12	7	0
13	6	1
14	7	0
15	6	0
16	8	1
17	4	0
18	5	1
19	7	0
20	7	1
21	8	0
22	5	1
23	8	0
24	6	0
25	7	0

**Recuento de células viables: 150**

**Recuento de células no viables: 9**

Teniendo el conteo celular, es posible determinar la viabilidad de esta etapa de igual manera a como se vio anteriormente.

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = \text{Levadura total} * F * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = 150 * 10^1 * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = \mathbf{1,50 * 10^7}$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = \text{Celulas no viables} * F * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = 9 * 10^1 * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = \mathbf{9 * 10^5}$$

Una vez realizado esto es posible determinar el porcentaje de células muertas en la muestra a partir de la siguiente ecuación.

$$\% \text{Celulas muertas} = \frac{\text{Conc. de células teñidas}}{(\text{Conc. de levaduras} + \text{Conc. de celulas teñidas})} * 100$$

$$\% \text{Celulas muertas} = \frac{9 * 10^5 \text{ celulas teñidas/ml}}{(1,50 * 10^7 \text{ levaduras/ml} + 9 * 10^5 \text{ celulas teñidas/ml})} * 100$$

$$\% \text{Celulas muertas} = \mathbf{5,6603}$$

Con los datos hallados es posible conocer la viabilidad en la primera fase de la propagación del experimento 1.

$$Viabilidad = 100 - \%Celulas\ muertas$$

$$Viabilidad = 100 - 5,6603\%$$

$$\%Viabilidad = 94,33$$

**conteo celular luego de la segunda fase de propagación (transvase de la primera propagación a 200 ml de mosto estéril).**

Una vez que se la primera fase terminó se agregó el producto obtenido en mosto estéril para continuar con el proceso de propagación, de igual forma que en el numeral anterior el montaje de dejo en agitación constante durante 3 días y al término de este periodo de tiempo se evaluó la población de células vivas y muertas que se puede observar en la tabla 41, para este experimento se contaron un total de 172 células.

**Tabla 41.** Recuento de células viables en la segunda fase de propagación del experimento número 1.

Cuadrante	Número de células vivas	Número de células muertas
1	7	0
2	8	1
3	5	0
4	6	0
5	4	0
6	9	0
7	6	1
8	8	0
9	5	0
10	6	0
11	7	0
12	8	0
13	5	0
14	6	0
15	5	0
16	7	0
17	8	0
18	6	0
19	8	0
20	5	0
21	6	0
22	7	2

23	8	0
24	9	0
25	8	1

**Recuento de células viables: 167**

**Recuento de células no viables: 5**

Teniendo el conteo celular, es posible determinar la viabilidad de esta etapa de igual manera a como se vio anteriormente.

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = \text{Levadura total} * F * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = 167 * 10^1 * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = \mathbf{1,67 * 10^7}$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = \text{Celulas no viables} * F * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = 5 * 10^1 * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = \mathbf{5 * 10^5}$$

Una vez realizado esto es posible determinar el porcentaje de células muertas en la muestra:

$$\% \text{Células muertas} = \frac{\text{Conc. de células teñidas}}{(\text{Conc. de levaduras} + \text{Conc. de células teñidas})} * 100$$

$$\% \text{Células muertas} = \frac{5 * 10^5 \text{ células teñidas/ml}}{(1,67 * 10^7 \text{ levaduras/ml} + 5 * 10^5 \text{ células teñidas/ml})} * 100$$

$$\% \text{Células muertas} = \mathbf{2,9069}$$

Con los datos hallados es posible conocer la viabilidad en la segunda fase de la propagación del experimento 1

$$Viabilidad = 100 - \%Celulas\ muertas$$

$$Viabilidad = 100 - 2,9069\%$$

$$\%Viabilidad = 97,09$$

**Conteo celular luego de la tercera fase de propagación (transvase de la segunda propagación a 500 ml de mosto estéril).**

Esta es la última fase de propagación de la levadura a reutilizar en la cual el producto final va a realizar la fermentación del lote de 10 litros de cerveza, se realizó la misma metodología de los ítems anteriores y una vez obtenido el stater final se evaluó el número final de células vivas previas a la fermentación.

Los resultados se muestran a continuación:

**Tabla 42.** Recuento de células viables en la tercera fase de propagación del experimento número 1.

Cuadrante	Número de células vivas	Número de células muertas
1	9	0
2	6	0
3	7	0
4	6	0
5	4	0
6	8	0
7	6	1
8	7	0
9	5	0
10	7	0
11	9	0
12	9	0
13	8	0
14	8	0
15	8	0
16	6	0
17	6	1
18	7	0
19	6	0
20	9	0
21	10	0

22	5	0
23	9	0
24	8	1
25	5	0

**Recuento de células viables: 178**

**Recuento de células no viables: 3**

Teniendo el conteo celular, es posible determinar la viabilidad de esta etapa de igual manera a como se vio anteriormente.

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = \text{Levadura total} * F * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = 178 * 10^1 * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = \mathbf{1,78 * 10^7}$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = \text{Celulas no viables} * F * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = 3 * 10^1 * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = \mathbf{3 * 10^5}$$

Una vez realizado esto es posible determinar el porcentaje de células muertas en la muestra:

$$\% \text{Celulas muertas} = \frac{\text{Conc. de células teñidas}}{(\text{Conc. de levaduras} + \text{Conc. de celulas teñidas})} * 100$$

$$\% \text{Celulas muertas} = \frac{3 * 10^5 \text{ celulas teñidas/ml}}{(1,78 * 10^7 \text{ levaduras/ml} + 3 * 10^5 \text{ celulas teñidas/ml})} * 100$$

$$\% \text{Celulas muertas} = \mathbf{1,6574}$$

Con los datos hallados es posible conocer la viabilidad en la tercera fase de la propagación del experimento 1.

$$Viabilidad = 100 - \%Celulas\ muertas$$

$$Viabilidad = 100 - 1,6574\%$$

$$\%Viabilidad = \mathbf{98,34}$$

De igual manera se determinó la viabilidad del experimento número 2 a lo largo de la propagación de levadura teniendo en cuenta como se dijo anteriormente que las cantidades de levadura reutilizada y de mosto estéril empleado fueron iguales en relación al E1.

**ANEXO J. MUESTRA DE RESULTADOS DE VIABILIDAD PARA CADA FASE DE PROPAGACIÓN DE LEVADURA - EXPERIMENTO 2.**

**Conteo celular luego de la primera fase de propagación (inoculación de 15 ml levadura en 100 ml de mosto estéril)**

**Tabla 43.** Recuento de células viables en la primera fase de propagación del experimento número 2.

Cuadrante	Número de células vivas	Número de células muertas
1	6	0
2	3	0
3	6	2
4	5	2
5	9	0
6	7	0
7	6	0
8	6	0
9	2	0
10	5	0
11	5	0
12	7	1
13	4	1
14	5	0
15	2	0
16	5	1
17	8	0
18	6	1
19	8	0
20	4	0
21	6	0
22	8	1
23	6	0
24	3	1
25	3	0

**Recuento de células viables: 135**

**Recuento de células no viables: 10**

Teniendo el conteo celular, es posible determinar la viabilidad de esta etapa de igual manera a como se vio anteriormente.

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = \text{Levadura total} * F * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = 135 * 10^1 * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = \mathbf{1,35 * 10^7}$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = \text{Celulas no viables} * F * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = 10 * 10^1 * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = \mathbf{1 * 10^6}$$

$$\% \text{Celulas muertas} = \frac{\text{Conc. de células teñidas}}{(\text{Conc. de levaduras} + \text{Conc. de celulas teñidas})} * 100$$

$$\% \text{Celulas muertas} = \frac{1 * 10^6 \text{ celulas teñidas} / \text{ml}}{(1,35 * 10^7 \text{ levaduras} / \text{ml} + 1 * 10^6 \text{ celulas teñidas} / \text{ml})} * 100$$

$$\% \text{Celulas muertas} = \mathbf{6,8965}$$

Con los datos hallados es posible conocer la viabilidad en la primera fase de la propagación del experimento 2.

$$\text{Viabilidad} = 100 - \% \text{Celulas muertas}$$

$$\text{Viabilidad} = 100 - 6,8965\%$$

$$\% \text{Viabilidad} = \mathbf{93,10}$$

- **Conteo celular luego de la segunda fase de propagación (transvase de la primera propagación a 200 ml de mosto estéril).**

**Tabla 44.** Recuento de células viables en la segunda fase de propagación del experimento número 2.

Cuadrante	Número de células vivas	Número de células muertas
1	7	0
2	6	0
3	6	0
4	5	0
5	5	0
6	7	1
7	4	0
8	7	0
9	7	0
10	9	1
11	7	0
12	5	0
13	4	0
14	6	0
15	7	0
16	7	0
17	6	0
18	9	0
19	7	2
20	7	0
21	4	0
22	6	1
23	8	0
24	5	0
25	6	1

**Recuento de células viables: 157**

**Recuento de células no viables: 6**

Teniendo el conteo celular, es posible determinar la viabilidad de esta etapa de igual manera a como se vio anteriormente.

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = \text{Levadura total} * F * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = 157 * 10^1 * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = \mathbf{1,57 * 10^7}$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = \text{Celulas no viables} * F * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = 6 * 10^1 * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = \mathbf{6 * 10^5}$$

$$\% \text{Celulas muertas} = \frac{\text{Conc. de células teñidas}}{(\text{Conc. de levaduras} + \text{Conc. de celulas teñidas})} * 100$$

$$\% \text{Celulas muertas} = \frac{6 * 10^5 \text{ celulas teñidas/ml}}{(1,57 * 10^7 \text{ levaduras/ml} + 6 * 10^5 \text{ celulas teñidas/ml})} * 100$$

$$\% \text{Celulas muertas} = \mathbf{3,6809}$$

Con los datos hallados es posible conocer la viabilidad en la segunda fase de la propagación del experimento 2.

$$\text{Viabilidad} = 100 - \% \text{Celulas muertas}$$

$$\text{Viabilidad} = 100 - 3,6809\%$$

$$\% \text{Viabilidad} = \mathbf{96,31}$$

- **Conteo celular luego de la tercera fase de propagación (transvase de la segunda propagación a 500 ml de mosto estéril).**

**Tabla 45.** Recuento de células viables en la segunda fase de propagación del experimento número 2.

Cuadrante	Número de células vivas	Número de células muertas
1	9	0
2	7	0
3	5	0
4	6	1
5	7	0
6	5	0
7	5	0
8	8	0
9	6	0
10	6	0
11	9	0
12	7	0
13	8	0
14	4	0
15	9	1
16	6	0
17	8	0
18	6	0
19	6	0
20	4	0
21	6	1
22	8	0
23	5	0
24	10	1
25	5	0

**Recuento de células viables: 165**

**Recuento de células no viables: 4**

Teniendo el conteo celular, es posible determinar la viabilidad de esta etapa de igual manera a como se vio anteriormente.

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = \text{Levadura total} * F * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = 165 * 10^1 * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{levaduras}}{\text{ml}} \right) = \mathbf{1,65 * 10^7}$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = \text{Celulas no viables} * F * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = 4 * 10^1 * 10^4$$

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{celulas no viables}}{\text{ml}} \right) = \mathbf{4 * 10^5}$$

$$\% \text{Celulas muertas} = \frac{\text{Conc. de células teñidas}}{(\text{Conc. de levaduras} + \text{Conc. de celulas teñidas})} * 100$$

$$\% \text{Celulas muertas} = \frac{4 * 10^5 \text{ celulas teñidas/ml}}{(1,65 * 10^7 \text{ levaduras/ml} + 4 * 10^5 \text{ celulas teñidas/ml})} * 100$$

$$\% \text{Celulas muertas} = \mathbf{2,3668}$$

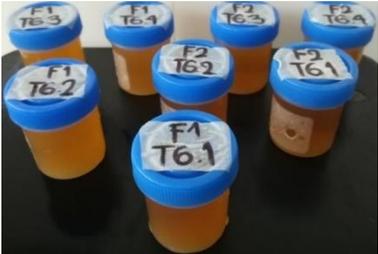
Con los datos hallados es posible conocer la viabilidad en la tercera fase de la propagación del experimento 2.

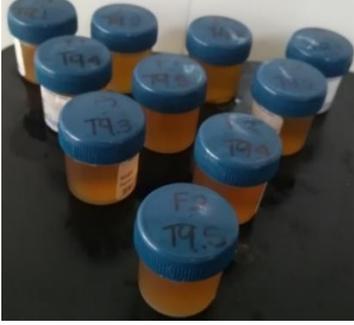
$$\text{Viabilidad} = 100 - \% \text{Celulas muertas}$$

$$\text{Viabilidad} = 100 - 2,3668\%$$

$$\% \text{Viabilidad} = \mathbf{97,63}$$

**ANEXO K. TOMA DE MEUSTRA EN LOS DIAS DE FERMENTACIÓN.**

Día de fermentación	Imagen
Día 1	
Día 2	
Día 3	
Día 5	
Día 6	

<p>Día 7</p>	
<p>Día 8</p>	
<p>Día 9</p>	

# ANEXO L. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS DE LA CERVEZA- EXPERIMENTO 1.



## Reporte de Análisis Microbiológico 20190410799

Página: 1 de 1

Razón Social: LINA MARÍA MEYER SANCHEZ Principal		C.C 1010232757
Contacto: Lina Meyer Sánchez		Correo electrónico: linamariameyersanchez@gmail.com
Dirección: Diagonal 46 Sur #50-79		
Ciudad: Bogotá	Teléfono: 3188863135	FAX: N.D.
Observaciones: N.A.		
Fecha Recepción: 2019-04-15	Fecha Análisis: 2019-04-15	Fecha Reporte: 2019-04-25

### INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

Proveedor	Cantidad	Presentación	Lugar Muestra	Lote	Vencimiento	Temp. °C	Condiciones específicas de la muestra
N.A.	330ml	BOTELLA DE VIDRIO	ENVIADA AL LABORATORIO	2803	N.A.	14,9	Los resultados se aplican a la muestra como se recibió. La información de la muestra ha sido proporcionada por el cliente.

### RESULTADOS

Descripción de la muestra	# LAB	Recuento	Recuento
		Muestras aerobias (FC/g/ml)	Coliformes Totales (STP/g/ml)
CERVEZA FERMENTADOR #1	A0799	4500	Menos de 3
SUGERIDOS NULAB CERVEZAS ARTESANALES		1600	Menos de 3
<b>MÉTODO DE ANÁLISIS EMPLEADO</b>		AOAC Ed. 20 de 2018 - Método 991.25-C-2009*	ISO 4853 Método 3*

La muestra **NO CUMPLE** con los parámetros SUGERIDOS NULAB para CERVEZAS ARTESANALES en recuento de Muestras aerobias, en los análisis realizados.

Para emitir el concepto de cumplimiento se tuvo en cuenta la regla de decisión adoptada por el laboratorio en el INMF-002 Ingreso de muestras, registro, revisión y aprobación de resultados.

Nulab Ltda con acreditación ONAC vigente a la fecha, con código de acreditación 16-LAB-003, bajo la norma ISO/IEC 17025:2005, manifiesta que los análisis identificados con este símbolo (\*) se encuentran cubiertos por el alcance de acreditación.

FIN DEL REPORTE

Revisó:  
  
 Alejandra Salamanca  
**COORDINACIÓN MICROBIOLOGÍA**

Aprobó:  
  
 Claudia Cienfuegos  
**DIRECCIÓN TÉCNICA**

VERIFIQUE LA AUTENTICIDAD DEL RESULTADO CON EL LABORATORIO. RESULTADO VÁLIDO DE LA MUESTRA ANALIZADA.  
 Prohibida la reproducción parcial o total de este documento. Todos los análisis son realizados en Nulab Ltda, a menos que se especifique lo contrario.

Carrera 16 No. 58 A-73 (Chapinero) • Teléfono: 745 2050 • Celular: (310) 625 8306  
 www.nulab.com.co • E-mail: info@nulab.com.co • Bogotá D.C., Colombia

## ANEXO M. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS DE LA CERVEZA - EXPERIMENTO 2.



### Reporte de Análisis Microbiológico 20190410798

Página: 1 de 1

Razón Social: LINA MARÍA MEYER SANCHEZ Principal		C.C. 1010232757
Contacto: Lina Meyer Sánchez		Correo electrónico: linamariameyersanchez@gmail.com
Dirección: Diagonal 46 Sur #50-75		
Ciudad: Bogotá	Teléfono: 3188863135	FAX: N.D.
Observaciones: N.A.		
Fecha Recepción: 2019-04-15	Fecha Análisis: 2019-04-15	Fecha Reporte: 2019-04-25

#### INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

Proveedor	Cantidad	Presentación	Lugar Muestra	Lote	Vencimiento	Temp. °C	Condiciones específicas de la muestra
N.A.	330ml	BOTELLA DE VIDRO	ENTRADA AL LABORATORIO	2603	N.A.	14,9	Los resultados se aplican a la muestra como se recibió. La información de la muestra ha sido proporcionada por el cliente.

#### RESULTADOS

Descripción de la muestra	# LAB	Recuento	Recuento
		Mesófilos aerobios/CFU/g/ml	Coliformos Totales/MPN/g/ml
CERVEZA FERMENTADOR (2)	AD 061	3600	Menos de 3
SUGERIDOS NULAB CERVEZAS ARTESANALES		1800	Menos de 3
<b>MÉTODO DE ANÁLISIS EMPLEADO</b>		AOAC Ed. 20 de 2018 - Método 986.29-C-2008*	ISO 4853 Método 3*

La muestra **NÓ CUMPLE** con los parámetros SUGERIDOS NULAB para CERVEZAS ARTESANALES en recuento de Mesófilos aerobios, en los análisis realizados.

Para emitir el concepto de cumplimiento se tuvo en cuenta la regla de decisión adoptada por el laboratorio en el PMF-002 Ingreso de muestras, registro, revisión y aprobación de resultados.

Nulab Ltda con acreditación ONAC vigente a la fecha, con código de acreditación 10-LAB-002, bajo la norma ISO/IEC 17025:2005, manifiesta que los análisis identificados con este símbolo (\*) se encuentran cubiertos por el alcance de acreditación.

FIN DEL REPORTE

Revisó:  
  
 Alexandra Salamanca  
**COORDINACIÓN MICROBIOLÓGIA**

Aprobó:  
  
 Claudia Clavijo  
**DIRECCIÓN TÉCNICA**

VERIFIQUE LA AUTENTICIDAD DEL RESULTADO CON EL LABORATORIO. RESULTADO VÁLIDO DE LA MUESTRA ANALIZADA.  
 Prohíbase la reproducción parcial o total de este documento. Todos los análisis son realizados en Nulab Ltda. a menos que se especifique lo contrario.

Carrera 16 No. 50 A-73 (Chapinero) • Teléfono: 745 8050 • Celular: (310) 685 8006  
 www.nulab.com.co • E-mail: info@nulab.com.co • Bogotá D.C., Colombia

ANEXO N. PRUEBA ORGANOLEPTICA CERVEZA - EXPERIMENTO 1.

FORMATO BEER SCORESHEET DE LA ORGANIZACION BJCP.



# BEER SCORESHEET

AHA/BJCP Sanctioned Competition Program <http://www.homebrewersassociation.org>



<http://www.bjcp.org> <http://www.homebrewersassociation.org>

Judge Name (print) Oscar Weinstein Category # \_\_\_\_\_ Subcategory (a-f) \_\_\_\_\_ Entry # F1

Judge BJCP ID \_\_\_\_\_ Subcategory (spell out) \_\_\_\_\_

Judge Email \_\_\_\_\_ Special Ingredients: \_\_\_\_\_

BJCP Rank or Status:  Apprentice  Recognized  Certified  National  Master  Grand Master  Honorary Master  Honorary GM  Medal Judge  Provisional Judge  Rank Pending  Club Judge

Non-BJCP Qualifications:  Professional Brewer  Beer Sommelier  GABF/WBC  Certified Cicerone  Adv. Cicerone  Master Cicerone  Sensory Training  Other \_\_\_\_\_

**Descriptor Definitions (Mark all that apply):**

- Acetaldehyde – Green apple-like aroma and flavor.
- Alcoholic – The aroma, flavor, and warming effect of ethanol and higher alcohols. Sometimes described as hot.
- Astringent – Puckering, lingering harshness and/or dryness in the (oral)pharynx; harsh graininess; huskiness.
- Diacetyl – Artificial butter, butterscotch, or toffee aroma and flavor. Sometimes perceived as a stickiness on the tongue.
- DMS (dimethyl sulfide) – At low levels a sweet, cooked or canned corn-like aroma and flavor.
- Estery – Aroma and/or flavor of any ester (fruits, fruit flavorings, or rices).
- Grassy – Aroma/flavor of fresh-cut grass or green leaves.
- Light-Struck – Similar to the aroma of a skunk.
- Metallic – Tinny, coin, copper, iron, or blood-like flavor.
- Mousy – Stale, mousy, or mucky aromas/flavors.
- Oxidized – Any one or combination of stale, waxy/vinous, cardboard, papery, or sherry-like aromas and flavors.
- Phenolic – Spicy (clove, pepper), smoky, plastic, plastic adhesive strip, and/or medicinal (chlorophenolic).
- Solvent – Aromas and flavors of higher alcohols (fusel alcohols). Similar to acetone or lacquer thinner aromas.
- Sour/Acidic – Tartness in aroma and flavor. Can be sharp and clean (lactic acid), or vinegar-like (acetic acid).
- Sulfur – The aroma of rotten eggs or burning matches.
- Vegetal – Cooked, canned, or rotten vegetable aroma and flavor (cabbage, onion, celery, asparagus, etc.)
- Yeasty – A bready, sulfury or yeast-like aroma or flavor.

**Aroma** (as appropriate for style) \_\_\_\_\_/12  
Comment on style, hops, fermentation characteristics, balance, finish/aftertaste, and other flavor characteristics  
Maiz cocido, Acido Acetico, Cator, Dado de

**Appearance** (as appropriate for style) \_\_\_\_\_/3  
Comment on color, clarity, and head (condition, style, and retention)  
Claro, limpiu, carbonatacion mellica, dorado pálido.

**Flavor** (as appropriate for style) \_\_\_\_\_/20  
Comment on style, hops, fermentation characteristics, balance, finish/aftertaste, and other flavor characteristics  
Acido Acetico, malfermentado, Brama extra por tostado, red

**Mouthfeel** (as appropriate for style) \_\_\_\_\_/5  
Comment on body, carbonation, astringency, and other tactile sensations  
Astringente, Alcoholes, Superiores, Carbonate, ed retrogusto Pasticamente y acido.

**Overall Impression** \_\_\_\_\_/10  
Comment on overall drinking pleasure (may start with entry, give suggestions for improvement)  
Atenuacion Buena, alcoholes superiores, astringencia, Acidez y Oxidacion presente.

Total \_\_\_\_\_/50

SCORING GUIDE	Outstanding (45 - 50):	World-class example of style.
	Excellent (38 - 44):	Exemplifies style well, requires minor fine-tuning.
	Very Good (30 - 37):	Generally within style parameters, some minor flaws.
	Good (21 - 29):	Shows the mark on style and/or minor flaws.
	Fair (14 - 20):	Off characteristics or major style deficiencies. Unpleasant.
Problematic (00 - 13):	Major off-flavors and/or serious deviations. Hard to drink.	

Classic Example <input type="checkbox"/>	Stylistic Accuracy <input type="checkbox"/>	Not in Style <input type="checkbox"/>
Flawless <input type="checkbox"/>	Technical Merit <input type="checkbox"/>	Significant Flaws <input type="checkbox"/>
Wonderful <input type="checkbox"/>	Intangibles <input type="checkbox"/>	Likable <input type="checkbox"/>

BJCP Beer Scoresheet Copyright © 2017 Beer Judge Certification Program rev. 1/06/12 Please send any comments to [Comp\\_Director@BJCP.org](mailto:Comp_Director@BJCP.org)

ANEXO O. PRUEBA ORGANOLPEPTICA CERVEZA - EXPERIMENTO 2.

FORMATO BEER SCORESHEET DE LA ORGANIZACIÓN BJCP.



# BEER SCORESHEET

AHAB/JCP Sanctioned Competition Program <http://www.bonchbrewersassociation.org>



<http://www.bjcp.org>

Judge Name (print) Oscar Martínez Category # \_\_\_\_\_ Subcategory (a-f) \_\_\_\_\_ Entry # F2

Judge BJCP ID \_\_\_\_\_ Subcategory (spell out) \_\_\_\_\_

Judge Email \_\_\_\_\_ Special Ingredients: \_\_\_\_\_

(Do Alter label # 516)

**BJCP Rank or Status:**

Apprentice     Recognized     Certified

National     Master     Grand Master

Honorary Master     Honorary GM     Mead Judge

Provisional Judge     Rank Pending     Cider Judge

**Non-BJCP Qualifications:**

Professional Brewer     Beer Sommelier     GABF/WBC

Certified Cicerone     Adv. Cicerone     Master Cicerone

Sensory Training     Other \_\_\_\_\_

**Bottle Inspection:**  Appropriate size, cap, fill level, label removal, etc.

Comments: \_\_\_\_\_

**Aroma** (as appropriate for style) \_\_\_\_\_/12

Comment on style, hops, yeast, and other aromas

Oxidación, Acido Acético, Brett. Metálico.

**Descriptor Definitions (Mark all that apply):**

**Acetaldehyde** – Gives apple-like aroma and flavor.

**Alcoholic** – The aroma, flavor, and warming effect of ethanol and higher alcohols. Sometimes described as hot.

**Astringent** – Puckering, tingling harshness and/or dryness in the fluids/orofaringeal, harsh graininess, harshness.

**Diacetyl** – Artificial butter, butterscotch, or toffee aroma and flavor. Sometimes perceived as a slickness on the tongue.

**DMS (dimethyl sulfide)** – At low levels a sweet, cooked or canned corn-like aroma and flavor.

**Estery** – Aroma and/or flavor of any ester (fruits, fruit flavorings, or roses).

**Grassy** – Aroma/flavor of fresh-cut grass or green leaves.

**Light-Struck** – Similar to the aroma of a skunk.

**Metally** – Tarry, crusty, copper, iron, or blood-like flavor.

**Musty** – Stale, musty, or moldy aromas/flavors.

**Oxidized** – Any one or combination of stale, waxy/stale, cardboard, papery, or sherry-like aromas and flavors.

**Plastic** – Spicy (clove, pepper), smoky, plastic, plastic adhesive strip, and/or medicinal (chlorophenolic).

**Solvent** – Aromas and flavors of higher alcohols (fusel alcohols). Similar to acetone or lacquer (thinner) aromas.

**Sour/Acidic** – Tartness in aroma and flavor. Can be sharp and clean (lactic acid), or vinegar-like (acetic acid).

**Sulfur** – The aroma of rotten eggs or burning matches.

**Vegetal** – Cooked, canned, or rotten vegetable aromas and flavors (cabbage, onion, celery, asparagus, etc.)

**Yeasty** – A bready, waxy or yeast-like aroma or flavor.

**Appearance** (as appropriate for style) \_\_\_\_\_/3

Comment on color, clarity, and head (amount, color, and texture)

Coloro pálido carbonatación media, lengua, claridad alta.

**Flavor** (as appropriate for style) \_\_\_\_\_/20

Comment on malt, hops, fermentation characteristics, balance, equilibrium, and other flavor characteristics

Sinve sensación de malta, poca, acidez media-alta, amargor repartido por acidez

**Mouthfeel** (as appropriate for style) \_\_\_\_\_/5

Comment on body, carbonation, mouth, astringency, and other palate sensations

Cuerpo bajo, astringencia alta, retrogusto ácido.

**Overall Impression** \_\_\_\_\_/10

Comment on overall drinking pleasure associated with style, give suggestions for improvement

Cerveza atenuada, atenuación presente, presenta alcoholos superiores que calientan el paladar. Acidez y oxidación

**Total** \_\_\_\_\_/50

SCORING GUIDE	<b>Outstanding</b> (45 - 50): World-class example of style.
	<b>Excellent</b> (38 - 44): Exemplifies style well, requires minor fine-tuning.
	<b>Vary Good</b> (30 - 37): Generally within style parameters, some minor flaws.
	<b>Good</b> (21 - 29): Meets the mark on style and/or minor flaws.
	<b>Fair</b> (14 - 20): Off characteristics or major style deficiencies. Unpleasant.
<b>Problematic</b> (00 - 13): Major off flavors and aroma dominant. Hard to drink.	

<b>Classic Example</b>	<input type="checkbox"/>	<b>Stylistic Accuracy</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<b>Not in Style</b>
	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<b>Flawless</b>	<input type="checkbox"/>	<b>Technical Merit</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<b>Significant Flaws</b>
	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<b>Wonderful</b>	<input type="checkbox"/>	<b>Intangibles</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<b>Likable</b>
	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

BJCP Beer Scoresheet Copyright © 2017 Beer Judge Certification Program Inc. 170612 Please send any comments to [Comp\\_Director@BJCP.org](mailto:Comp_Director@BJCP.org)

# ANEXO P. PRUEBA ORGANOLEPTICA CERVEZA MOONSHINE.

## FORMATO BEER SCORESHEET DE LA ORGANIZACIÓN BJCP.



### BEER SCORESHEET

http://www.bjcp.org AHABJCP Sanctioned Competition Program http://www.homebrewersassociation.org



Judge Name (print) OSCAR MARTINEZ Category # \_\_\_\_\_ Subcategory (a-f) \_\_\_\_\_ Entry # MOONSHINE

Judge BJCP ID \_\_\_\_\_ Subcategory (spcl. rate) \_\_\_\_\_

Judge Email \_\_\_\_\_ Special Ingredients: \_\_\_\_\_

Use Anyly label # 2388

**BJCP Rank or Status:**

<input type="checkbox"/> Apprentice	<input type="checkbox"/> Recognized	<input type="checkbox"/> Certified
<input type="checkbox"/> National	<input type="checkbox"/> Master	<input type="checkbox"/> Grand Master
<input type="checkbox"/> Honorary Master	<input type="checkbox"/> Honorary GM	<input type="checkbox"/> Head Judge
<input type="checkbox"/> Provisional Judge	<input type="checkbox"/> Rank Pending	<input type="checkbox"/> Cider Judge

**Non-BJCP Qualifications:**

<input type="checkbox"/> Professional Brewer	<input type="checkbox"/> Beer Sommelier	<input type="checkbox"/> GABRIWBC
<input type="checkbox"/> Certified Cicerone	<input type="checkbox"/> Adv. Cicerone	<input type="checkbox"/> Master Cicerone
<input type="checkbox"/> Sensory Training	<input type="checkbox"/> Other _____	

**Descriptor Definitions (Mark all that apply):**

- Acetaldehyde – Green apple-like aroma and flavor.
- Alcoholic – The aroma, flavor, and warming effect of ethanol and higher alcohols. Sometimes described as hot.
- Astringent – Puckering, lingering harshness and/or dryness in the mouth/throat; harsh graininess; harshness.
- Diacetyl – Artificial butter, butterscotch, or toffee aroma and flavor. Sometimes perceived as a slickness on the tongue.
- DMS (dimethyl sulfide) – At low levels a sweet, cooked or canned corn-like aroma and flavor.
- Estery – Aroma and/or flavor of any ester (fruits, fruit flavorings, or rums).
- Grassy – Aroma/flavor of fresh-cut grass or green leaves.
- Light-Struck – Similar to the aroma of a skunk.
- Metallic – Tinny, coin-y, copper, iron, or blood-like flavor.
- Musty – Stale, rummy, or moldy aromas/flavors.
- Oxidized – Any one or combination of stale, waxy/vinous, cardboard, papery, or sherry-like aromas and flavors.
- Phenolic – Spicy (clove, pepper), smoky, plastic, phenolic adhesive strip, and/or medicinal (chlorophenolic).
- Solvent – Aromas and flavors of higher alcohols (fusel alcohols). Similar to acetone or lacquer thinner aromas.
- Sour/Acidic – Tartness in aroma and flavor. Can be sharp and clean (lactic acid), or vinegar-like (acetic acid).
- Sulfur – The aroma of rotten eggs or burning matches.
- Vegetal – Cooked, canned, or rotten vegetable aroma and flavor (cabbage, onion, celery, asparagus, etc.)
- Yeasty – A bread-y, sulfury or yeast-like aroma or flavor.

**Bottle Inspection:**  Appropriate size, cap, fill level, label removal, etc.

**Aroma** (as appropriate for style) \_\_\_\_\_/12  
Comments on style, aroma, esters, and other descriptors  
MALTAZ, OXIDACION

**Appearance** (as appropriate for style) \_\_\_\_\_/3  
Comments on color, clarity, and head retention, ratio, and lacing  
CARBONATACION TORCADA, DIFASO PALIDO

**Flavor** (as appropriate for style) \_\_\_\_\_/20  
Comments on style, aroma, esters, chlorophenolics, sulfides, diacetyl, sulfur, and other descriptors  
SOAVE, SENSACION DE MALTAZ

**Mouthfeel** (as appropriate for style) \_\_\_\_\_/5  
Comments on body, carbonation, astringency, and other palate sensations  
BAJA ASTRIBOENCIA

**Overall Impression** \_\_\_\_\_/10  
Comments on overall quality, balance, consistency with style, and how well it compares to other styles  
ATENCION BAJA COMPARADA CON FL Y P2

**Total** \_\_\_\_\_/50

BEER SCORESHEET	<b>Outstanding</b> (45 - 50): World-class example of style.	<table border="0"> <tr> <td colspan="2">Stylistic Accuracy</td> <td colspan="2">Not to Style</td> </tr> <tr> <td>Classic Example</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Technical Merit</td> <td colspan="2">Significant Flaws</td> </tr> <tr> <td>Flawless</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Intangibles</td> <td colspan="2">Likable</td> </tr> <tr> <td>Wonderful</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>	Stylistic Accuracy		Not to Style		Classic Example	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Technical Merit		Significant Flaws		Flawless	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Intangibles		Likable		Wonderful	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Stylistic Accuracy		Not to Style																							
	Classic Example		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																					
	Technical Merit		Significant Flaws																							
Flawless	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																							
Intangibles		Likable																								
Wonderful	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																							
<b>Excellent</b> (38 - 44): Exemplifies style well, requires minor fine-tuning.																										
<b>Very Good</b> (30 - 37): Generally within style parameters, some minor flaws.																										
<b>Good</b> (21 - 29): Meets the mark in style and/or aroma/flavor.																										
<b>Fair</b> (14 - 20): Off-flavor/odors or major style deficiencies. Unpleasant.																										
<b>Problematic</b> (00 - 13): Major off-flavors and aroma/odors; hard-to-drink.																										

BJCP Beer Scoresheet Copyright © 2007 Beer Judge Certification Program. ver. 170012 Please send any comments to Comp\_Director@BJCP.org